文章编号:1000-5404(2006)14-1495-04

论著

含 hIGF-1 基因腺病毒的构建及在兔骨髓间充质干细胞的表达

丁幸坡,金先庆,罗小辑,邱 林,刘 伟 (重庆医科大学儿童医院外科研究室,重庆 400014)

提 要:目的 用 Adeasy 系统构建荧光蛋白基因标记的腺病毒载体 Ad-hIGF-1,然后转染兔骨髓间充质干细胞并检测其表达。**方法** 根据 GenBank 公布的 hIGF-1 序列设计 PCR 引物,从质粒 pcDNA3.1-hIGF-1 中扩增出截短型 hIGF-1,亚克隆至 pMD-T 载体,鉴定后酶切出目的基因插入 pAdtrack-CMV 中构建成腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-hIGF-1,经 *Pme* Ⅰ线性化后采用电穿孔法转化至已包含有腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 大肠杆菌中,挑选同源重组质粒线性化后转染 HEK293 细胞收获腺病毒,然后转染靶细胞兔骨髓间充质干细胞,通过绿色荧光蛋白表达情况以及流式细胞仪、免疫细胞化学等方法检测 hIGF-1 的表达。**结果** 成功构建了绿色荧光蛋白基因标记的腺病毒 Ad-hIGF-1,并在兔骨髓间充质干细胞得以高效表达。**结论** Adeasy 腺病毒系统是基因转染的高效载体系统。腺病毒 Ad-hIGF-1 转染的骨髓间充质干细胞可作为基因修饰的软骨组织工程种子细胞。

关键词:人胰岛素样生长因子-1;腺病毒载体;骨髓间充质干细胞
中图法分类号:Q782;R329.23;R373.1 **文献标识码**:A

Construction of adenovirus vectors contained human insulin-like growth factor-1 gene and expression in rabbit mesenchymal stem cells

DING Xing-po, JIN Xian-qing, LUO Xiao-ji, QIU Lin, LIU Wei (Department of General Surgery, Children's Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct adenovirus vectors containing truncated human insulin-like growth factor-1 gene and green fluorescent protein gene, transfect them into mesenchymal stem cells and detect the expression of hIGF-1 gene. **Methods** After the amplification of truncated human insulin-like growth factor-1 (hIGF-1) gene from pcDNA3.1-hIGF-1 by polymerase chain reaction (PCR), the gene fragment was inserted to shuttle plasmid pAdtrack-CMV for homologous recombination with backbone plasmid pAd-easy-1 in bacteria BJ5183, followed by transfection of restructured adenovirus plasmid to HEK 293 cells to get adenovirus Ad-hIGF-1. The high titer adenovirus supernatant was gotten by repeated infection of HEK 293 cells by adenovirus harvested after confirmation of the adenovirus structure. As target cells, mesenchymal stem cells were infected to determine the expression of hIGF-1 gene by inspection of fluorescence, flow cytometry, immuocytochemistry and Western blotting. **Results** The adenovirus vector was constructed successfully and high efficient expression of hIGF-1 was detected in mesenchymal stem cells. **Conclusion** Adenovirus vector is effective for gene expression and transfection into MSCs. MSCs transfected with Ad-hIGF-1 may be another option to gene-motified seed cells for articular cartilage tissue engineering.

Key words: human insulin-like growth factor; adenovirus vector; mesenchymal stem cells

种子细胞的选择和改良一直是软骨组织工程的首要问题。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)目前被认为是软骨组织工程的最有价值的种子细胞,但被作为基因治疗的靶细胞则尚未引起足够重视。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是软骨细胞增殖、分化过程中已知的作用最强的生长因子之一。Adeasy 腺病毒系统是近年来改良的优秀载体系统,具有操作方便快捷等优点,被广泛用作基因转染的载体。该系统用作 IGF-1 基因载体并转染修饰 MSCs 的研究国内鲜见报道。本实验通过 Adeasy 系统构建含截短型 hIGF-1 的重组腺病毒并感染 MSCs,为下一步组织工程关节软骨的构建准备基因修饰的种子细胞。

作者简介:丁幸坡(1973-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,医师,主要从事关节软骨组织工程方面的研究。电话:(023)63893006, E-mail: dingxingpo@gmail.com
通讯作者:金先庆,电话:(023)63893006, E-mail: etzhl@163.com
收稿日期:2005-03-09;修回日期:2006-04-03

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

pcDNA3.1-hIGF-1(北大人类基因组实验室馈赠);质粒pAdtrack-CMV和pAdEasy-1(匹兹堡大学Jaculyn Duke教授惠赠);大肠杆菌DH5a、BJ5183(本实验室保存);XL-1菌株(Stratagene公司);HEK293细胞(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所馈赠);限制性内切酶*Hind*Ⅲ和*Kpn*Ⅰ、*Not*Ⅰ、*Taq*酶、RT-PCR试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、100 bp DNA标准、宽量程DNA标准(TaKaRa公司);*Pac*Ⅰ、*Pme*Ⅰ(香港基因公司);DMEM/F12培养基、胎牛血清、Percoll细胞分离液(Gibico公司);Polyfect transfection Reagent、Plasmid purification reagent(Qiagen公司);hIGF-1一抗(兔抗人,Santa Cruz公司),二抗(羊抗兔)、DAB显色试剂盒、Western blot试剂盒(Boster);恒温摇床、CO_2恒温孵箱、电穿孔仪、电泳设备、半干转印系统(Bio-rad公司);倒置荧光显微镜、微量核算定量仪(Nikon公司产品)、超声细胞破碎仪(Sonics);其他常规试剂(国产分析纯)和仪器。

1.2 技术路线与方法

1.2.1 重组腺病毒载体的构建

1.2.1.1 目的片段hIGF-1获得和鉴定 参考文献[1]公布的hIGF-1序列及载体pAdtrack-CMV酶切位点设计包括上游*Kpn*Ⅰ和下游*Hind*Ⅲ位点的PCR引物(5′-GCCGGTACCGAAGATGCACACCATGTCCTC,3′-GGCAAGCTTCTACATCCTGTAGTTCTTGTTT),从pcDNA3.1-hIGF-1中扩增截短的目的基因hIGF-1,反应条件为:94 ℃预变性2 min;接94 ℃ 15 s→58 ℃退火20 s→72 ℃延伸20 s(25个循环);72 ℃继续延伸5 min。电泳初步鉴定;将PCR产物即目的基因hIGF-1片段亚克隆至pMD18-T载体转化DH5α感受态细菌,蓝白斑法筛选阳性菌落PCR确认插入片段长度,抽提质粒DNA,*Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切鉴定后,送TaKaRa公司测序。

1.2.1.2 同源重组 *Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ分别双酶切载体pMD18-hIGF-1和pAdtrack-CMV,胶回收二者酶切产物后以T_4DNA连接酶过夜连接、转化、培养、扩增、鉴定后将重组质粒命名为pAdtrack-hIGF-1;取pAdEasey-1质粒与感受态BJ5183大肠杆菌混和后电转、扩增,取扩增细菌进行质粒抽提验证后,将含pAdEasey-1质粒的细菌命名为BJ-Adeasy-1,制备成感受态菌备用;*Pme*Ⅰ酶线性化质粒pAdtrack-hIGF-1和pAdtrack-CMV,纯化回收后转化上述感受态菌BJ-Adeasy-1,挑取较小的克隆菌落扩增、抽提、电泳及*Pac*Ⅰ酶切鉴定。将重组后的质粒分别标记为pAd-hIGF-1(重组阳性质粒)和pAd-0(重组空白质粒),电穿孔转化XL-1,大量扩增出在BJ5183中产量不足的重组腺病毒质粒,去内毒素质粒大抽试剂盒大量抽提质粒备转化HEK293细胞。

1.2.2 腺病毒包装及扩增 用含10% FBS的DMEM/F12培养HEK293细胞至融合率80%左右时开始转化。*Pac*Ⅰ酶切线性化pAd-hIGF-1和pAd-0,纯化后转染HEK293细胞,观察GFP的表达,待细胞90%以上漂浮后,冻融法裂解细胞收集第1轮病毒上清即为Ad-hIGF-1(重组目的腺病毒)和Ad-0(重组空白腺病毒),将收集病毒上清重复多次感染HEK293细胞(乒乓交互感染)以提高病毒滴度。

1.2.3 MSCs的培养及转染 采用通用的标准密度梯度离心法分离纯化兔MSCs,于37 ℃、5% CO_2孵箱培养,隔天换液,10 d细胞融合达70%~80%,贴壁紧密,细胞形态均一,呈典型的涡旋状排列,传代至第3代按病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)分组转染。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 在HEK293的表达及病毒滴度 转染后每8小时在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。取400 μl病毒稀释液感染HEK293细胞后培养18~24 h,于荧光显微镜下计数GFP阳性细胞数,按公式计算病毒滴度:病毒滴度=GFP阳性细胞数×病毒上清稀释倍数/0.4 ml(pfu/ml);收集贴壁细胞抽提总RNA,RT-PCR检测目的基因在包装细胞的表达。

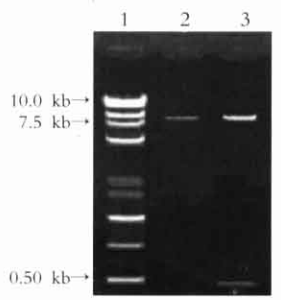
1.2.4.2 靶细胞感染效率 将兔MSCs细胞按2×10^6细胞/孔接种6孔板中,待24 h后分别用10、20、50、100 MOI的腺病毒Ad-hIGF-1和Ad-0感染兔MSCs,于感染后不同时间点观察GFP表达情况,流式细胞仪测定荧光表达情况计算转染效率。

1.2.4.3 目的基因表达 感染第4天收集MSCs进行蛋白表达检测。实验前1 d准备细胞爬片免疫细胞化学方法检测细胞质中蛋白表达;收集培养上清,加入等体积2×SDS-PAGE样品处理液,煮沸5 min变性蛋白,冷却后上样按流程进行SDS-PAGE电泳和Western blot检测上清中hIGF-1的表达。

2 结果

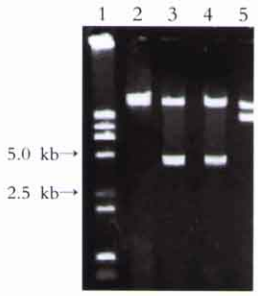
2.1 重组腺病毒的鉴定

按以上扩增条件从质粒pcDNA3.1-hIGF-1中顺利扩增出约400 bp大小的清晰条带,与预期相符。pMD18-hIGF-1测序结果经Blast2.0比对与公布序列一致性达99.9%(281位碱基同义突变,未影响氨基酸翻译:ggt/ggc-Gly)。pAdtrack-CMV空载体和pAdtrack-hIGF-1分别双酶切(*Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ)后电泳,后者应出现414 bp和约9 kb大小条带,电泳结果与预期相符(图1),PCR进一步鉴定大小正确。将重组后的Ad-0和Ad-hIGF-1质粒用*Pac*Ⅰ酶切后均出现4.5 kb的片段和大于15 kb两个清晰条带,空载体Ad-0可以被*Not*Ⅰ线性化而Ad-hIGF-1因为失去了*Not*Ⅰ位点而不能切开,与预期相符(图2),同时可用上述引物扩增出约400 bp的目的条带,说明质粒的同源重组成功。



1:DNA标准;2:pAdtrack-CMV;3:pAdtrack-CMV-hIGF-1

图1 pAdtrack-CMV-hIGF-1质粒双酶切鉴定



1：DNA 标准；2：Ad-0；3：Ad-hIGF-1（Pac Ⅰ）；4：Ad-0（Pac Ⅰ）；5：Ad-hIGF-1（未酶切）

图 2　重组腺病毒质粒 *Pac* Ⅰ酶切鉴定

2.2　指标检测

2.2.1　荧光表达及滴度测定　　重组腺病毒质粒 pAd-hIGF-1 经 *Pac* Ⅰ线性化后转染 HEK293 细胞，48 h 后在荧光显微镜下即可见 GFP 的表达，随时间的延长表达增强（图 3）。5～7 d 后细胞出现病毒感染的特征性 CPE，由此计算出腺病毒滴度为 3.0×10^{9} pfu/ml。用抽提的总 RNA 作 RT-PCR，扩增出明亮的目的条带，进一步证实目的基因在细胞内有 mRNA 水平的 hIGF-1 的表达。

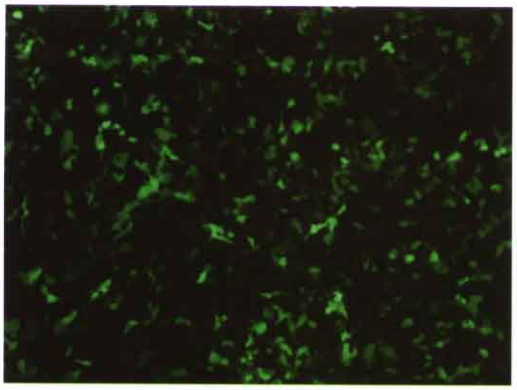


图 3　重组腺病毒质粒转染后 48 h 的 HEK293 细胞
（倒置荧光显微镜×100）

2.2.2　靶细胞的感染及表达效率　　MSCs 以密度 2×10^{9}/孔接种于 6 孔板中用 Ad-hIGF-1 转染 MSCs，24 h 后观察到绿色荧光的表达，72 h 左右荧光达到最强（图 4）。免疫细胞化学 S-P 法 DAB 染色显示在感染的 MSCs 细胞质中有棕黄色阳性颗粒出现，表示目的基因在 MSCs 中得到表达（图 5）。转染后 48 h 取中间 MOI 值（50）病毒感染的 MSCs 作流式细胞仪检测，感染率已达 38.54%。SDS-PAGE 电泳在 7.8×10^{3} 附近出现明显条带，与实际 hIGF-1 分子量 7.6×10^{3} 相符，Western blot 进一步证实了这一结果，证实转染含目的基因的重组腺病毒后的 MSCs 中有较高量的 hIGF-1 的表达，远较对照组明显（图 6）。

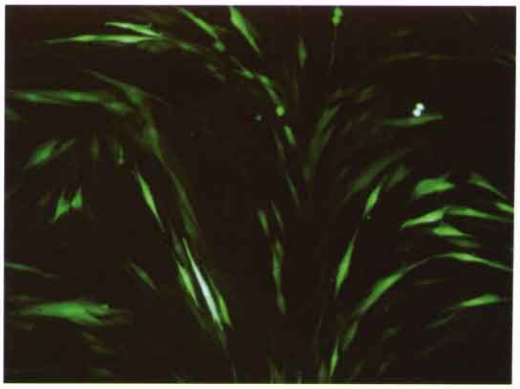


图 4　重组腺病毒转染后 48 h 的 MSCs 细胞
（倒置荧光显微镜×400）

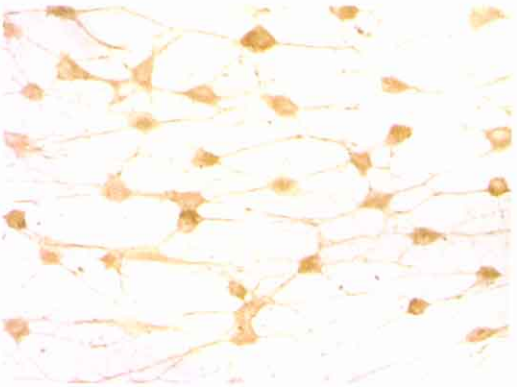
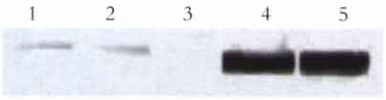


图 5　重组腺病毒 Ad-hIGF-1 转染兔 MSCs 72 h 免疫组化显色　（S-P×200）



1：MSCs；2：MSCs（转染 Ad-0）；3：空白对照；4，5：Ad-hIGF-1 转染组

图 6　重组腺病转染后 72 h MSCs 中 IGF-1 的蛋白表达

3　讨论

在软骨组织工程研究中，基因修饰已成为一种可行的种子细胞改良途径[2,3]。目前用于改良和移植的种子细胞主要集中于自体或同种异体各种来源的软骨细胞，这些细胞具有分化成熟、表型近似、可分泌软骨基质等自身优势，但存在来源有限、增殖能力差、分化终末容易老化等局限。MSCs 由于其具有来源、取材、分化潜能、对外源基因的易感性等方面的多种优势而成为目前软骨组织工程的另一种可选择的种子细胞[4]，或被认为是首选种子细胞。但 MSCs 在体内外向软骨细胞分化增殖过程中需要一定的微环境（如一

定的剪切应力）和生长因子（如 BMP，TGF-β1，IGF-1 等）的作用[5-8]，而由于内源性生长因子的相对缺乏和外源性生长因子价格昂贵以及外源蛋白的免疫应激反应等限制了其功能的发挥和常规使用。

IGF-1 首先被报道于 1978 年，其主要作用是在局部通过自分泌和旁分泌促进软骨细胞增殖与分化，能够促进 MSCs 向软骨细胞谱系分化、增殖，并促进软骨细胞合成其特征性的Ⅱ型胶原和蛋白聚糖、维持软骨细胞表型[9-11]，是目前已知的调节软骨代谢和维持软骨内环境稳定诸多因素中最关键、作用最强的生长因子。若能将 IGF-1 基因导入 MSCs 使其自身表达该蛋白，则能从一定程度上根本解决 MSCs 在向软骨细胞分化过程中内源性和外源性该生长因子相对缺乏的问题，使 MSCs 向软骨细胞分化和稳定表型的早期自身表达、分泌活性蛋白 hIGF-1 来发挥对细胞的积极影响，从根本上解决 MSCs 内源性 IGF-1 相对缺乏的问题。

目前使用的基因转染方法和载体多种多样[11,12]，各有其优缺点。腺病毒作为基因转染载体具有与人类基因同源、大容量、低致病性、强感染力、不整合入宿主染色体中等优势，所以越来越受到重视，被作为基因治疗途径的重要工具载体。1997 年，Hardy 等[13]用 Cre-lox 系统构建了 E1 区缺失的腺病毒，克服了腺病毒作为基因载体具有的强的宿主免疫原性等缺点，改善了腺病毒的功效。Adeasy 是近年进一步改良的一套腺病毒构建方法[14]，这种同源重组法较之以前的细胞内同源重组，效率有了较大提高，操作更加简便、快捷。另外该系统携有绿色荧光蛋白基因，使得对细胞的转染效率和目的基因的表达情况可通过转染靶细胞后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况来形象、直观地显示，具有检测直观、方便等优点。将该腺病毒系统用作 hIGF-1 基因表达载体的方法国内鲜见报道。

本实验用 Adeasy 系统和扩增的截短型外源性基因 hIGF-1 构建了具有较强感染能力的腺病毒载体 pAd-hIGF-1，流式细胞仪显示中滴度（MOI = 50）腺病毒对 MSCs 的感染效率达 38.54%，不断提高滴度可使感染率最高达 90%，同时免疫组化和 Western blot 等方法检测证实了目的基因在靶细胞 MSCs 得到了高效表达，在培养上清中也可检测到较高浓度的分泌型 hIGF-1。本实验通过构建携带功能基因 IGF-1 的腺病毒并成功转染靶细胞 MSC，证实为下一步组织工程关节软骨的实验研究提供了良好的基因修饰的种子细胞。

参考文献：

[1] JANSEN M, VAN-SCHAIK F M, RICKER A T, *et al*. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor [J]. Nature, 1983, 306(5943): 609-611.

[2] SAXER R A, BENT S J, BROWE-TOLAND B D, *et al*. Gene mediated insulin-like growth factor-I delivery to the synovium [J]. J Orthop Res, 2001, 19(5): 759-767.

[3] GELSE K, VON-DER-MARK K, AIGNER T, *et al*. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(2): 430-441.

[4] 孔清泉，项 舟，杨志明. 骨髓基质干细胞作软骨组织工程种子细胞研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(4)：277-280.

[5] 李洪鹏，许建中，周 强，等. 流体剪切应力对人骨髓间充质干细胞增值及细胞周期的影响 [J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1637-1639.

[6] KADIYALA S, YOUNG R G, THIEDE M A, *et al*. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125-134.

[7] GOOMER R S, AMIEL D. Repair of articular cartilage defects by *ex-vivo* gene therapy [J]. Curr Opin Orthop, 2000, 11(5): 378-382.

[8] 许建中，范东伟，张文霞. 经Ⅱ型胶原修饰后的 PLGA 对诱导后的骨髓基质干细胞粘附及分化的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：424-426.

[9] STARKMAN B G, CRAVERO J D, DELCARLO M, *et al*. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK[J]. Biochem J, 2005, 389(Pt 3): 723-729.

[10] FUKUMOTO T, SPERLING J W, SANYAL A, *et al*. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis *in vitro*[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(1): 55-64.

[11] MADRY H, KAUL G, CUCCHIARINI M, *et al*. Enhanced repair of articular cartilage defects *in vivo* by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I) [J]. Gene Ther, 2005, 12(15): 1171-1179.

[12] 李小川，吕 刚，金明熙，等. 胰岛素样生长因子 1 抑制人椎间盘细胞凋亡及促进基质代谢的研究 [J]. 中华实验外科杂志，2004，21(7)：880.

[13] HARDY S, KITAMURA M, HARRIS-STANSIL T, *et al*. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination [J]. J Virol, 1997, 71(3): 1842-1849.

[14] HE T C, ZHOU S, DA-COSTA L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.

（编辑 陈聪连）