论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0068-03

小鼠PPARδ腺病毒载体的构建及其在INS-1细胞中的表达

姜友昭[1],张 玲[2],周 艳[3],陈 兵[1] (第三军医大学西南医院:[1]内分泌科,[2]门诊部,[3]乳腺中心,重庆 400038)

提 要:目的 构建含有小鼠过氧化物酶增殖激活受体δ(peroxisome proliferate activated receptor delta,PPARδ)基因的重组腺病毒表达载体。**方法** 通过*Kpn* Ⅰ和*Eco*RⅤ双酶切,从pCDNA3.0-mPPARδ载体中得到含有小鼠PPARδ全长编码序列的片段,将mPPARδ与pAdtrack-CMV相连接并用*Pme* Ⅰ线性化后,转化含有pAdeasy骨架质粒的细菌BJ5183,在细菌内同源重组后得到pAd-mPPARδ质粒。pAd-mPPARδ经*Pac* Ⅰ线性化后用Lipofectamine™ 2000转染HEK293细胞,包装得到含PPARδ基因的病毒重组子,将病毒重组子在HEK293细胞中扩增后,反复冻融得到滴度较高的含PPARδ的病毒液。将收集的病毒液感染INS-1细胞,绿色荧光观察GFP和Western blot检测PPARδ蛋白的表达。**结果** 成功构建了含有小鼠PPARδ基因的重组腺病毒载体,病毒滴度为1.5×10^{10} pfu/ml。重组腺病毒感染后可使INS-1细胞PPARδ蛋白表达明显增加。**结论** 该重组腺病毒载体的构建为研究PPARδ基因在胰岛细胞中生物学功能提供了一定的工作基础。

关键词:腺病毒载体;PPARδ;INS-1细胞

中图法分类号:R322.57;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Construction of mouse PPARδ adenovirus vector and its expression in INS-1 cells

JIANG You-zhao[1], ZHANG Ling[2], ZHOU Yan[3], CHEN Bing[1] ([1]Department of Endocrinology, [2]Outpatient Department, [3]Breast Diseases Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant adenovirus vector containing mouse PPARδ, and infect the INS-1 cells. **Methods** The pCDNA3.0-mPPARδ plasmid was digested with *Kpn* Ⅰ and *Eco*RⅤ to obtain full-length coding sequence of mPPARδ, then the mPPARδ cDNA was ligated to the pAdtrack-CMV vector. The plasmid of pAdTrack-mPPARδ was linearized with *Pme* Ⅰ, and the fragment was reclaimed and transformed into BJ5183 which contains pAdeasy. After being screened, the extracted plasmid of positive bacteria linearized with *Pac* Ⅰ was transfected into HEK293 cells with lipofectamine™ 2000 and was identified by the green fluorescence protein (GFP). The harvested virus was amplified in HEK293 cells and infected INS-1 cells. After infection, the expression of PPARδ was proved by GFP expression and Western blotting. **Results** The recombinant adenovirus vector containing mouse PPARδ was constructed successfully and the titer was 1.5×10^{10} pfu/ml. The PPARδ expression in INS-1 cells infected by the virus was much higher than the controls. **Conclusion** The constructed recombinant adenovirus vector containing mouse PPARδ provides a potent tool to investigate its biological function in pancreatic islets and other tissues.

Key words: adenovirus vector; PPARδ; INS-1 cells

过氧化物酶增殖激活受体δ(peroxisome proliferator activated receptor delta,PPARδ)是过氧化物酶增殖激活受体的亚型之一,相对于PPARγ、PPARα表达的局限性,PPARδ的表达相当广泛,如在心肌、骨骼肌、胰岛、脂肪、皮肤、子宫等组织中均有较高的表达[1,2]。目前虽然已有研究表明PPARδ在脂质代谢、抗细胞凋亡等方面起着重要作用[3,4],但是其在很多组织中的生物学功能尚无深入研究。本研究以复制缺陷型腺病毒为载体,采用细菌内同源重组技术,构建小鼠PPARδ基因的腺病毒,为进一步研究其生物学功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌和细胞 pCDNA 3.0-mPPARδ真核表达载体由Grimaldi PA教授惠赠。pAdtrack-CMV穿梭质粒和含pAdeasy骨架质粒的BJ5183细菌由第三军医大学大坪医院野战外科研究所胡义杰博士惠赠,HEK293细胞由第三军医大学

作者简介:姜友昭(1980-),男,湖北省大冶市人,博士研究生,医师,主要从事内分泌与代谢疾病方面的研究。电话:(023)68765216

通讯作者:陈 兵,电话:(023)68754138,E-mail:cb@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-08-05;修回日期:2006-08-30

西南医院皮肤科翟志芳博士惠赠。

1.1.2　主要试剂和耗材　　*Pme* Ⅰ和 *Pac* Ⅰ内切酶（New England Biolab 公司），*Kpn* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、T_4 DNA 连接酶、CA2 离心柱型胶回收试剂盒（赛百盛生物技术有限公司），PCR 产物纯化试剂盒（北京博大泰克生物基因技术有限责任公司），小量快速质粒提取试剂盒（V-Gene 公司），卡那霉素和氨苄青霉素（上海华舜公司），兔抗人 PPARδ 一抗（Santa Cruz），Lipofectamine™ 2000（Invitrogen 公司），RPMI1640 培养基和胎牛血清（Hyclone）。

1.2　方法

1.2.1　mPPARδ 穿梭质粒的构建　　在 pCDNA3.0-mPPARδ 载体中，mPPARδ 克隆于 *Bam*H Ⅰ酶切位点上。选用 *Kpn* Ⅰ和 *Eco*R Ⅴ双酶切 pCDNA3.0-mPPARδ 载体，将小片段（约 1 440 bp）进行胶回收。同时对 pAdtrack-CMV 穿梭质粒用 *Kpn* Ⅰ和 *Eco*R Ⅴ双酶切后胶回收大片段（约 9 200 bp）。将两个回收产物 mPPARδ 和 pAdtrack-CMV 按照 3∶1（mPPARδ∶pAdtrack-CMV）的摩尔比，在 16 ℃条件下，T_4 连接酶连接过夜后，连接产物用 $CaCl_2$ 法转化 DH5α 大肠杆菌感受态，Kana 抗性筛选出阳性克隆后，进行酶切鉴定。

1.2.2　重组腺病毒质粒的构建　　提取 pAdTrack-CMV-mPPARδ 质粒，以 *Pme* Ⅰ酶线性化后，将产物胶回收。$CaCl_2$ 法转化 BJ5183 感受态细菌，在 BJ5183 中同源重组，Kana 抗性筛选出阳性克隆。提质粒，*Pac* Ⅰ酶切鉴定后，$CaCl_2$ 法转化入大肠杆菌 DH5α，大量制备重组质粒 DNA，命名为 pAd-mPPARδ。以 *Pac* Ⅰ线性化后，采用 PCR 纯化试剂盒纯化产物后备用。

1.2.3　重组质粒在 HEK293 细胞中的包装　　按 Lipofectamine 的使用说明，将 *Pac*Ⅰ酶切线性化的 pAd-mPPARδ 质粒导入 HEK293 细胞中，转染 7～14 d 后于荧光倒置显微镜观察 HEK293 细胞中 GFP 的荧光表达情况。

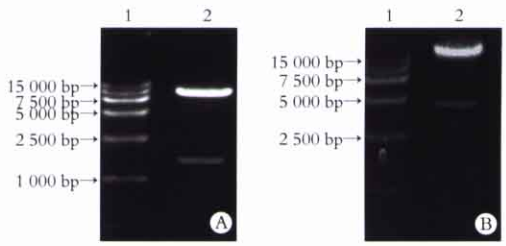
1.2.4　重组腺的病毒扩增、纯化　　将 HEK293 细胞接种于 75 cm^2 培养瓶中，当细胞融合率达 80% 后，取 200 μl 重组腺病毒保存液加入到培养液中，混匀，培养 3～4 d，待细胞基本上完全脱落死亡后。收集液体，液氮和 37 ℃反复冻融 3 次。离心：4 000 r/min，10 min。取上清即为病毒初提液。将病毒初提液经过氯化铯密度梯度离心，收集的病毒液即为纯化的病毒液。将病毒液用 DMEM 以 10^{-1}～10^{-12} 的浓度稀释，分别加入培养有 HEK293 细胞的 12 孔培养板中，培养 21 d，观察 10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12} 4 个培养孔细胞生长情况，计数最低稀释度培养孔中病理效应细胞的数量，依据公式：（病理效应细胞数 × 稀释倍数）/培养液体积计算病毒滴度 pfu/ml。

1.2.5　重组腺病毒的 Western blot 鉴定　　用 pAd-mPPARδ 重组病毒子和空载体腺病毒子 Ad（阴性对照）感染胰岛细胞 INS-1，72 h 后可见较多绿色荧光，收获细胞，提取核蛋白，10% SDS-PAGE 电泳，电转移至硝酸纤维素膜（NC 膜）上，经 2% BSA 封闭过夜，pH 7.4、10 mmol/L TBS 洗涤后，分别用兔抗人 PPARδ 抗体和抗兔二抗孵育 2 h，pH 7.4、10 mmol/L TBS 洗涤后，DAB 显色。

2　结果

2.1　pAd-mPPARδ 腺病毒载体的构建和鉴定

pCDNA3.0-mPPARδ 用 *Kpn* Ⅰ和 *Eco*R Ⅴ酶切后，将小片段回收后与 Padtrack-CMV 连接，用 *Kpn* Ⅰ和 *Eco*R Ⅴ酶切鉴定 pAdTrack-CMV-mPPARδ 可见 2 个条带，大的约 9 200 bp，小的约 1 440 bp，证明连接成功（图 1A）。将 pAdTrack-CMV-mPPARδ 与 pAdeasy 重组后，*Pac* Ⅰ酶切可见一约 34 kb 条带和一 4.5 kb 条带，说明 pAd-mPPARδ 载体构建成功（图 1B）。



A：pAdTrack-CMV-mPPARδ 质粒双酶切鉴定　1：DNA 标准；2：pAdTrack-CMV-mPPARδ 酶切后；B：pAd-mPPARδ 质粒 pacI 线性化鉴定　1：DNA 标准；2：pAd-mPPARδ 酶切后

图 1　pAdTrack-CMV-mPPARδ 和 pAd-mPPARδ 酶切鉴定电泳图

2.2　重组腺病毒在 HEK293 中的包装、扩增和滴度测定

pAdEasy-mPPARδ 转染 293 细胞后，24 h 可见 GFP 表达，此后荧光逐渐增多，12 d 时可见荧光成片出现（彗星状）（图 2）

AdEasy-mPPARδ 腺病毒滴度的测定：培养 21 d 后，10^{-9} 浓度孔的 HEK293 细胞观察到 30 个病理效应细胞，其它更低的浓度孔未发现病理效应细胞。依据公式可以计算出 Ad-mPPARδ 腺病毒滴度为 1.5×10^{10} pfu/ml。

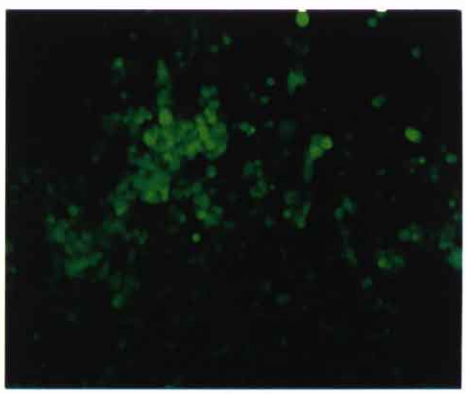


图 2　pAdEasy-mPPARδ 转染 HEK293 细胞 12 d 后的荧光显微镜观察　（×200）

2.3　Ad-mPPARδ 腺病毒在 INS-1 中的表达和 Western blot 鉴定

Ad-mPPARδ 腺病毒感染 INS-1 细胞后，96 h 后可见较强的荧光表达。感染后的 INS-1 细胞形态完整，没有因感染腺病毒而出现死亡的现象（图 3）。

分别用 pAd-mPPARδ 重组病毒子（实验组）和空载体腺病毒子 Ad（对照组）转染 INS-1 细胞后，提取核蛋白用 Western blot 鉴定后，可见 pAd-mPPARδ 重组病毒子使 INS-1 的 PPARδ 表达明显增高（图 4）。

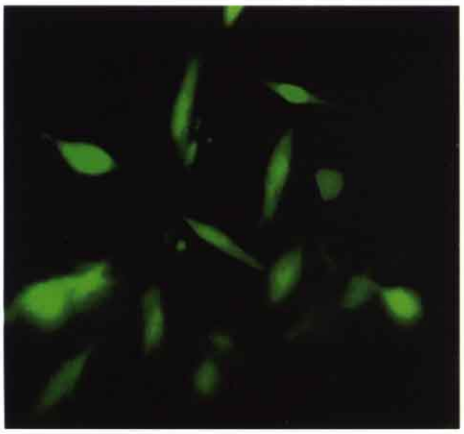
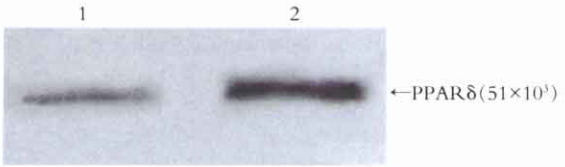


图3 Ad-mPPARδ 腺病毒感染 INS-1 细胞的荧光显微镜观察 （×200）



1：对照组；2：实验组

图4 pAd-mPPARδ 重组病毒子对 INS-1 细胞 PPARδ 蛋白表达的影响

3 讨论

PPARδ 是 PPAR 家族的成员之一，其分布相当广泛。作为一种核受体，它在脂质代谢、细胞凋亡、皮肤愈合等方面发挥着重要作用。研究表明 PPARδ 激动剂 GW501516 能够促进脂肪酸氧化，改善机体的糖脂代谢[5]。基于以上因素，PPARδ 近年来被看作是代谢综合征新的治疗靶点[6]。但是对于 PPARδ 在胰腺、心肌等组织中的生物学功能目前无深入研究，而在动脉粥样硬化发病中的作用研究也有各个实验结果也不尽相同[7,8]。因此，研究某些特定组织中 PPARδ 的生物学功能必将为将来 PPARδ 激动剂的临床应用提供依据。

腺病毒载体是基因功能研究和基因治疗的有力工具，具有以下多个优点：①宿主范围广，对人致病性低。②能有效进行增殖，滴度高。③无需辅助病毒，可容纳较大的外源片段。④不整合到染色体中，无插入致突变性。⑤能同时表达多个外源基因。因此在基因克隆和基因治疗等领域发挥着重要作用。本研究采用改良的 Adeasy 系统[9]，首先将 mPPARδ 与 pAdtrack 重组构建含 mPPARδ 全长编码序列的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-mPPARδ，该质粒用 *Pme* Ⅰ 线性化后，转化含有 pAdeasy 的细菌 BJ5183，在 BJ5183 内 recA 重组酶的作用下，同源重组形成 pAd-mPPARδ 腺病毒质粒。然后在 *Pac* Ⅰ 线性化暴露反向末端重复序列后，转染 HEK-293 细胞后产生重组病毒颗粒。反复冻融收集病毒后，再在 HEK-293 细胞中扩增，得到较高滴度的含 mPPARδ 的病毒重组子。分别将含 mPPARδ 的病毒和空的腺病毒感染大鼠胰岛细胞株 INS-1 后，Western blot 检测显示含 mPPARδ 的病毒使 INS-1 细胞的 PPARδ 表达明显增高，提示 PPARδ 腺病毒表达载体构建成功。该方法简化了腺病毒载体的构建步骤，缩短了载体构建的时间，而且所得病毒滴度足够满足体外实验的要求，同时在大量扩增病毒的基础上进行纯化，所得病毒也能满足体内实验。

本实验成功构建了 mPPARδ 的重组腺病毒载体，为进一步研究 PPARδ 在胰岛细胞、脂肪组织和骨骼肌细胞中的生物学功能奠定了良好的基础。

参考文献：

[1] Berger J, Moller D E. The mechanisms of action of PPARs[J]. Annu Rev Med, 2002, 53: 409 - 435.

[2] Braissant O, Foufelle F, Scotto C, *et al*. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat[J]. Endocrinology, 1996, 137(1): 354 - 366.

[3] Di-Poi N, Michalik L, Tan N S, *et al*. The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85(2 - 5): 257 - 265.

[4] Wang Y X, Lee C H, Tiep S, *et al*. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity[J]. Cell, 2003, 113(2): 159 - 170.

[5] Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15924 - 15929.

[6] Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, *et al*. Roles of peroxisome proliferators-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome[J]. Biochimie, 2004, 86(11): 833 - 837.

[7] Vosper H, Patel Lisa, Graham T L, *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages[J]. J Biol Chem, 2001, 276(47): 44258 - 44265.

[8] Grahama T L, Mookherjee C, Suckling K E, *et al*. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice[J]. Atherosclerosis, 2005, 181(2): 29 - 37.

[9] 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 薛国文）