文章编号:1000-5404(2007)07-0561-04

论著

成纤维细胞生长因子受体3腺病毒载体的包装与鉴定

刘志君,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤中心实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 构建成纤维细胞生长因子受体3(fibroblast growth factor receptors 3, FGFR3)腺病毒载体,并进行鉴定、包装及表达检测。**方法** 将小鼠FGFR3 cDNA亚克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV上,通过电击转化使其在BJ5183细菌中与AdEasy-1同源重组,通过酶切及测序筛选阳性重组子。以脂质体介导法转染HEK293细胞进行包装、扩增并测定其滴度;并用RT-PCR及Western blot检测FGFR3在HT29细胞中的表达。**结果** 经限制性内切酶检测、测序鉴定和细胞转染后GFP的表达等证实成功地构建了携带FGFR3 cDNA的重组腺病毒载体并制备出有感染能力的高滴度重组腺病毒。将构建的腺病毒重组子转染HT29细胞,RT-PCR及Western blot均检测到FGFR3的表达。**结论** 成功地构建了含有FGFR3 cDNA的重组腺病毒载体并在HT29中表达了小鼠FGFR3分子,为进一步研究FGFR3的功能及其在骨折愈合中的作用提供有效的基因转移载体。

关键词: FGFR3;腺病毒;转染
中图法分类号: R373; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Construction and identification of recombinant adenovirus encoding mouse FGFR3 cDNA

LIU Zhi-jun, CHEN Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus encoding mouse wild type FGFR3 cDNA. **Methods** Mouse FGFR3 cDNA obtained from MoFR3/SV was subcloned into plasmid pBluescript KS and further cloned into plasmid pAdTrack-CMV. The plasmid (pAdTR3) was transferred into BJ5183 cells which contained the adenovirus plasmid (pAdeasy-1) to produce recombinant adenovirus vector encoding FGFR3 cDNA (pAdE-FGFR3). The recombinant adenovirus vector was identified and transfected into the adenoviral packaging cell HEK293 by lipofectamine 2000 to get recombinant adenovirus particles. The adenovirus was confirmed by polymerase chain reactin (PCR) and its titer was determined. Then the recombinant vector was transfected into HT29 cells. The expression of FGFR3 mRNA and protein in HT29 cells was assayed by RT-PCR and Western blotting. **Results** The recombinant adenovirus vector encoding FGFR3 cDNA was correctly constructed and confirmed by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing analysis. The transfected HEK 293 cells were lysed by freeze-thawing to obtain the recombinant adenovirus in the lysate. Further, PCR product of the lysate confirmed the presence of recombinant adenovirus. The viral titer was 3×10^9 pfu/ml. RT-PCR and Western blotting showed that pAdE-FGFR3 transfected HT29 group expressed FGFR3 higher than that of GFP controlled group. **Conclusion** Infective recombinant adenovirus encoding FGFR3 cDNA was successfully obtained by plasmid homogenous recombination in bacteria, and highly expressed in HT29 cells after transfection, which paves a way for studying the effect of FGFR3 in bone fracture healing.

Key words: FGFR3; adenovirus; transfection

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptors, FGFRs)属于酪氨酸激酶类受体,通过与相应的配体分子成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)结合后介导信号向细胞内传递[1]。迄今为止,已经确定了的FGFRs有5种即FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4和FGFR5。它们均为单链糖蛋白,分别由独立的基因编码组成,其结构主要包括细胞外糖

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB22604) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB22604)
作者简介:刘志君(1975-),女,湖南省洞口县人,博士研究生,主要从事干细胞与组织工程方面的研究。电话:(023)68757572, E-mail: lily7512@163.com
通讯作者:陈 林,电话:(023)68757122, E-mail: Linchen70@163.com
收稿日期:2006-05-26;修回日期:2006-07-20

基化的配体结合区、疏水的跨膜区和含酪氨酸激酶催化区的胞内区3部分[1]。FGFRs广泛参与组织细胞的增殖、分化过程、并在血管生成、骨骼的发育与形成，伤口愈合及肿瘤的发生、发展等生理病理过程中起重要作用。与FGFRs家族的其他成员一样，FGFR3也是一个参与个体发育的重要基因，它参与和调控软骨及长骨生长的多个阶段，如对软骨细胞的增生、软骨基质的钙化、血管的入侵以及成骨形成等有着重要影响[2]。为了观察FGFR3在骨折愈合过程中的作用，本实验利用AdEasy系统构建了表达FGFR3 cDNA的重组腺病毒载体。该载体不仅可用于FGFR3基因功能的研究，也可应用于FGFR3相关的基因治疗和骨组织工程中对种子细胞的基因修饰。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

MoFR3/SV质粒由美国Onitz教授惠赠。人结肠癌细胞HT29由西南医院肿瘤科李焱博士惠赠。穿梭质粒pAdtrack-CMV、腺病毒骨架质粒pAdEasy-1、HEK293细胞、DH5α以及大肠杆菌BJ5183为本实验室保存；T_4 DNA连接酶与限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ、*EcoR*Ⅴ购自TaKaRa公司；限制性内切酶*Xmn*Ⅰ、*Pme*Ⅰ、*Pac*Ⅰ购自NewEngland公司；DMEM高糖培养液购自Hyclone公司、小牛及胎牛血清购自甘肃明海生物公司；Lipofectamine 2000购自Invitrogene公司；质粒小量抽提试剂盒与凝胶回收试剂盒为测序由上海Omega公司产品；电穿孔仪为Bio-Rad公司产品；引物与DNA生工生物技术有限公司完成。FGFR3引物：P1：5′-CTAGTGTTCTGCGTGGCGGT-3′；P2：5′-TTCTTATCCATTCGCTCCGG-3′；P3：5′-CCCGCTCTGGAGCCATGGTAGTC-3′；P4：5′-ACCAGGATGAAGAGGAAGAAGA-3′；β-actin引物：正义链：5′-TTGTTACCAACTGGGACGACATGG-3′；反义链：5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3′。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK 293细胞用含有10% FBS的DMEM高糖进行常规培养。

1.2.2 重组质粒pAdTR3的构建 用*Hind*Ⅲ与*Xmn*Ⅰ对质粒MoFR3/SV进行双酶切，同时对KS用*Hind*Ⅲ与*EcoR*Ⅴ进行双酶切；凝胶电泳分离酶切产物，胶回收的目的cDNA片段与载体片段后用T_4 DNA连接酶进行连接得重组质粒KSR3，并经限制性内切酶*Hind*Ⅲ与*Xba*Ⅰ酶切鉴定和DNA序列测定。将测序正确的KSR3与pAdTrack-CMV分别用*Hind*Ⅲ与*Xba*Ⅰ进行双酶切，凝胶电泳回收目的片段与载体并将二者用T_4 DNA连接酶进行连接。对连接后的重组子进行酶切鉴定。

1.2.3 pAdTR3与pAdEasy-1的同源重组 将质粒pAdTR3与pAdTrack-CMV经*Pme*Ⅰ线性化后，分别电穿孔转化已含有pAdEasy-1的大肠杆菌BJ5183，转化条件为200 Ω、2.5 kV、20 μF，使二者在BJ5183细胞内发生同源重组，用含卡那霉素抗性的LB平板进行筛选。所得质粒pAdE-R3与pAdE-GFP经*Pac*Ⅰ酶切及DNA测序鉴定；并将正确的重组腺病毒DNA转化DH5α大量扩增。

1.2.4 有感染能力的腺病毒的获得和鉴定 根据pAdEasy-1系统说明书，将pAdE-FGFR3与pAdE-GFP经*Pac*Ⅰ线性化后，分别用脂质体Lipofectamine 2000介导转染生长融合至70%～80%的HEK293单层细胞（转染方法按照Invitrogen公司说明书进行）。培养7 d左右细胞出现肿胀、变圆甚至部分细胞脱壁浮起即细胞病变效应（CPE）。待大部分细胞脱壁后，吹打并收集上清，离心沉淀后在37 ℃与-70 ℃条件下反复冻融4次。取5 μl病毒上清100 ℃煮沸10 min，用引物P1与P2进行PCR鉴定病毒中的目的基因，反应体系为25 μl；反应条件为94 ℃×2 min，94 ℃×30 s，55 ℃×30 s，72 ℃×90 s，72 ℃×10 min。取部分病毒上清再次感染293细胞以扩增重组病毒。通过反复感染HEK293细胞提高病毒的滴度，病毒悬液保存于-70 ℃。

1.2.5 重组腺病毒滴度的测定 根据pAdEasy-1系统说明书，采用TCID50法，将病毒储存液做不同比例的稀释，取100 μl稀释液加至接种有10^4个HEK293细胞的96孔培养板中，每排设2孔对照，培养10 d，于荧光显微镜下观察并计数每排的CPE数，按公司计算病毒滴度：病毒滴度=CPE数×病毒上清稀释倍数/0.1 ml（pfu/ml）。

1.2.6 RT-PCR检测FGFR3 mRNA的表达 分别提取转染pAdE-FGFR3与pAdE-GFP的HT29细胞总RNA，进行半定量RT-PCR，反应体系为25 μl，反应条件同前。

1.2.7 Western blot检测FGFR3分子的表达 收集并提取转染pAdE-FGFR3与pAdE-GFP的HT29细胞总蛋白，浓度测定后加等体积SDS上样缓冲液99 ℃变性5 min，12% SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜，进行化学发光显色。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行配对t检验。

2 结果

2.1 pAdTR3的构建与鉴定

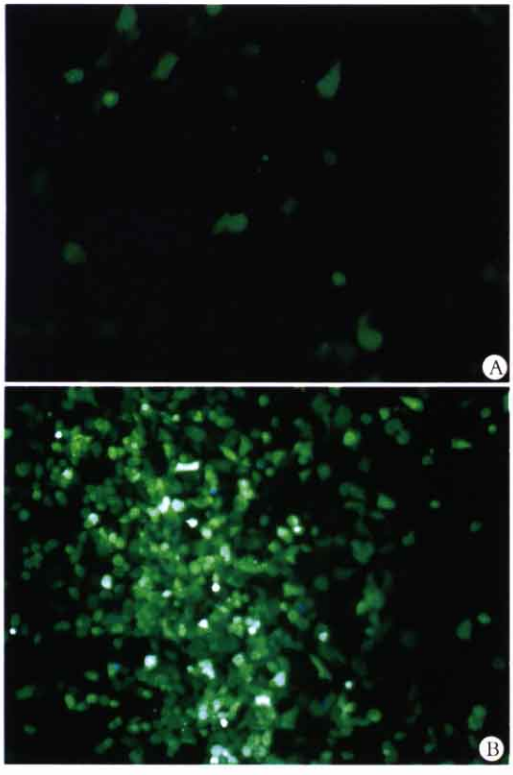
质粒KSR3经*Hind*Ⅲ与*Xba*Ⅰ双酶切与测序鉴定与文献[3]完全一致。pAdTR3经*Hind*Ⅲ与*Xba*Ⅰ双酶切后获得2个片段分别为9 kb与3.6 kb，与预期结果一致。

2.2 pAdE-FGFR3的重组鉴定

pAdE-FGFR3质粒经*Pac*Ⅰ单酶切后分别得到大于23 kb与4.5 kb 2个片段，证明pAdTR3与pAdEasy-1已成功进行同源重组，且通过对pAdE-FGFR3进行DNA测序亦证实二者的重组。

2.3 重组病毒的产生与扩增

PacI线性化的pAdE-R3经Lipofectamine 2000介导转染HEK293单层细胞，转染后24 h即可观察到绿色荧光蛋白的表达（图1），并且表达荧光蛋白的细胞数量随着培养时间的延长而增加。培养7～10 d后可以观察到细胞CPE的产生，至14 d可见部分细胞悬浮，待细胞全部悬浮时收集培养上清。

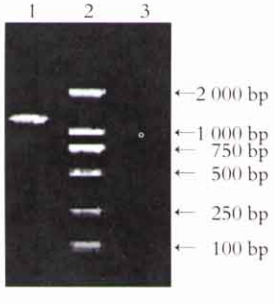


A：HEK 293 转染 pAdE-FGFR3 24 h；B：HEK 293 扩增 pAdE-FGFR3 病毒

图 1　重组腺病毒 AdE-FGFR3 的产生　（荧光显微镜 ×100）

2.4　病毒颗粒 DNA 检测

凝胶电泳图像显示引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增后获得一片段大约 1.2 kb，与预期大小一致（图 2）。



1：FGFR3 PCR 产物；2：DL2000 标准；3：对照组 PCR 产物

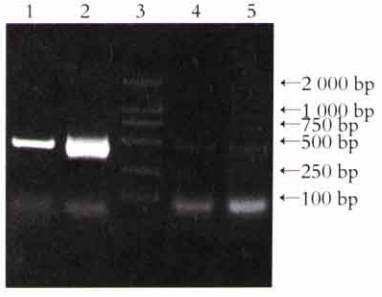
图 2　pdE-FGFR3 PCR 鉴定电泳图

2.5　病毒滴度的测定

腺病毒感染 HEK293 细胞 10 d 后，观察到在 10^{-9} ~ 10^{-1} 稀释度的样本中 HEK293 细胞出现完全 CPE 现象，腺病毒滴度约为 3×10^{9} pfu/ml。

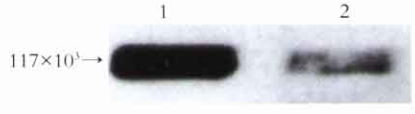
2.6　FGFR3 mRNA 及蛋白的表达检测

DNA 电泳结果显示，转染 pAdE-FGFR3 与 pAdE-GFP 组细胞均在 500 bp 处显现亮度基本一致的内参 β-actin 条带，转染 pAdE-FGR3 细胞组在近 500 bp 处可见一非常明亮条带，约为转染 pAdE-GFP 对照组细胞的 2.6 倍（图 3），提示转染重组腺病毒 pAdE-FGFR3 后，HT29 能表达 pAdE-FGFR3 mRNA。Western blot 结果显示，转染 pAdE-FGFR3 组细胞在相对分子质量为 117×10^{3} 处出现一明亮的蛋白条带，而转染 pAdE-GFP 对照组细胞则非常弱（图 4），说明转染重组腺病毒 pAdE-FGFR3 后，HT29 显著提高 FGFR3 蛋白的表达（$P<0.05$）。



1，2：β-actin PCR 产物；3：DNA 标准（DL2000）；4：转染组 FGFR3 PCR 产物；5：对照组 FGFR3 PCR 产物

图 3　RT-PCR 分析 FGFR3 mRNA 表达电泳图



1：转染 pAdE-FGFR3 组细胞；2：转染 pAdE-GFP 组细胞

图 4　Western blot 分析 FGFR3 蛋白的表达

3　讨论

FGFR3 基因包括 19 个外显子和 18 个内含子，全长 16.5 kb，由 3 个细胞外免疫球蛋白样结构、跨膜区（TM）和含酪氨酸激酶区（TK1 和 TK2）的胞内段组成[1]。FGFR3 属于酪氨酸激酶受体家族中的一员，在个体组织发育期组织细胞的增殖、分化；血管生成；神经营养性；骨骼的发育与形成等过程中发挥了重要的作用。并与其后的组织伤口愈合及肿瘤的发生、发展等生理病理过程密切相关。FGFR3 与成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）结合后，可以引起自身的二聚化和酪氨酸的磷酸化，活化后的 FGFR3 可以使细胞质内含 SH2 结构域的蛋白和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶磷酸化（MAPK、MAPKK 和 MAPKKK），从而激活细胞核内的转录因子，调控信号向细胞内传导[4-6]。近年来研究表明 FGFR3 在骨骼发育形成中通过抑制 Ihh（Indian hedgehog）及影响其他调节因子的表达来调控软骨细胞的分化、增殖、软骨基质的沉积、钙化；成骨的形成等生理过程，从而参与并影响骨

骼生长的多个阶段[7]。研究表明，FGFR3 位于跨膜区的第 10 号外显子区段的碱基突变可引起多种如侏儒(ACH)，软骨发育不良等骨骼疾病[8-10]。而在 FGFR3 基因敲除的小鼠主要表现出长骨和脊椎过度增长，骨骼生长时间延长；长骨中的软骨组织染色显示软骨生长区狭窄，除了几个区域内具有短而肥大的成排排列的细胞和不规则的临时钙化带外，没有正常的规则柱状排列；且生长板区内软骨细胞的增殖降低，提示 FGFR3 是通过抑制软骨细胞增殖和分化从而抑制骨骼的生长，是骨骼生长的负性调控因子[8]。这些研究结果均显示了 FGFR3 在骨骼发育生长过程中具有非常重要的作用，但对 FGFR3 是否在骨折修复、骨的再生过程中发挥了同样重要的作用尚不了解。本实验为观察 FGFR3 在骨折愈合过程中的作用，构建了含 FGFR3 cDNA 的腺病毒载体 pAdE-FGFR3，用以观察其对骨折愈合的影响。

腺病毒载体是高效表达的基因转导载体，相较于逆转录病毒载体和其他非病毒载体，它的优点是转染率高，易于调控，且进入细胞后它所携带的 DNA 片段是游离状态的，不会整合至细胞染色体 DNA；它的另一优点是既可感染静止期细胞，又可感染分裂期细胞，并能获得高滴度病毒和高效基因表达[10-12]。但腺病毒的缺点是具有较高的免疫原性，因而在体实验时，往往难以达到预期的治疗效果。本实验中所采用的腺病毒都是 E1 和 E3 区基因的复制缺陷性重组腺病毒，降低了其毒性和免疫反应。此缺陷性病毒需要通过 HEK 293 细胞包装才能进行复制与扩增，HEK 293 细胞是一种转化了 E1 区的人胚肾细胞系，能编码腺病毒的 E1 区。在 293 细胞内产生的复制缺陷性腺病毒颗粒能感染许多类型的细胞，并表达所插入的外源基因，但不能在感染的细胞中复制。这就决定了这种 E1 区缺失的腺病毒既能减少本身对宿主细胞的损害，同时又达到基因治疗的目的。再加上重组腺病毒导入细胞的目的基因并不插入到宿主细胞染色体中，故该病毒具有无激活致癌基因或插入突变的危险等优点[12]。

重组腺病毒的传统构建方法是将穿梭质粒与骨架质粒在脂质体的介导下，同时感染 293 细胞，即在 293 细胞内进行同源重组后并进行扩增与包装。由于两种质粒同时感染同一细胞的几率很低，故在同一细胞内发生同源重组的几率就更低。改进后的重组方法是两种质粒的同源重组在 BJ 5183 中完成，由于质粒转化细菌的效率极高，BJ 5183 菌中的 RecA 具有很强的重组活性，用这种方法构建重组腺病毒载体克服了细胞内质粒共转染效率较低的缺点，比起常用的细胞内同源重组法，具有高效、快速的优点。本实验成功地构建并包装了 pAdE-FGFR3 腺病毒，获得了 3×10^9 pfu/ml 的高病毒滴度，研究并证实了其感染 HT29 细胞后能有效的促使细胞高表达 FGFR3，为进一步深入了解 FGFR3 在骨折愈合中的作用打下牢固的基础。

参考文献：

[1] Ornitz D M, Marie P J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1446-1465.

[2] Coumoul X, Deng C X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003, 69(4): 286-304.

[3] Ornitz D M, Leder P. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3[J]. J Biol Chem, 1992, 267(23): 16305-16311.

[4] Ornitz D M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development[J]. Bioessays, 2000, 22(2): 108-112.

[5] Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation[J]. Cell, 1995, 80(2): 179-185.

[6] Rousseau F, El-Ghouzzi V, Delezoide A L, *et al*. Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1)[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(4): 509-512.

[7] Perez-Castro A V, Wilson J, Altherr M R. Genomic organization of the mouse fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3) gene[J]. Genomics, 1995, 30(2): 157-162.

[8] Li C, Chen L, Iwata T, *et al*. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(1): 35-44.

[9] Chen L, Adar R, Yang X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 104(11): 1517-1525.

[10] Wilkie A O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 187-203.

[11] Kochanek S. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(15): 2451-2459.

[12] Schiedner G, Morral N, Parks R J, *et al*. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity[J]. Nat Genet, 1998, 18(2): 180-183.

(编辑 汪勤俭)