文章编号:1000-5404(2008)01-0053-04

论著

TH 和 GDNF 双基因表达载体的构建及其在 MES23.5 细胞中的表达

刘天蔚[1],谢俊霞[2] (青岛大学医学院:[1]脑血管病研究所,[2]生理学教研室,山东 青岛 266021)

摘 要:**目的** 构建酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)和胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)双基因表达载体并检测其在体外的表达,为帕金森病提供新的治疗措施。**方法** 采用分子克隆技术,从 pWAV2-TH 质粒酶切获得人 TH 基因片段,将其克隆入真核表达质粒载体 pIRES 的上游,构建出 pIRES-TH。PCR 法扩增小鼠 GDNF 基因片段,克隆入 pIRES-TH 的下游,构建出携带 TH 和 GDNF 双基因的重组质粒 pIRES-TH-GDNF。用酶切电泳验证重组结果的正确性,测序检测质粒重组后的序列。随后将重组质粒用 Lipofectamine2000 转染至 MES23.5 细胞,经 G418 筛选后,以 RT-PCR 及免疫荧光法检测 TH 和 GDNF 基因在 mRNA 及蛋白水平的表达。**结果** 重组质粒酶切后其片段大小与预期结果相同,测序发现基因序列完全正确。转染后 MES23.5 细胞中 TH 和 GDNF 基因的水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 重组 pIRES-TH-GDNF 质粒构建成功并能在体外正确表达 TH 和 GDNF 基因。

关键词:帕金森病;基因治疗;酪氨酸羟化酶;胶质细胞源性神经营养因子
中图法分类号:R394-33;R394.3;R742.5 **文献标识码**:A

Construction of TH-GDNF vector and its expression in a dopaminergic cell line MES23.5

LIU Tian-wei[1], XIE Jun-xia[2] ([1]Research Institute of Cerebrovascular Disease, [2]Department of Physiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To construct a vector carrying tyrosine hydroxylase (TH) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in order to establish a new gene therapy method in Parkinson's disease. **Methods** Human TH gene fragment from the plasmid pWAV2-TH was cloned into pIRES to construct pIRES-TH. The mouse GDNF gene, amplified by PCR was inserted into pIRES-TH to construct pIRES-TH-GDNF. Restriction analysis and nucleotide sequencing were used to confirm the structure of pIRES-TH-GDNF. Then MES23.5 cells were transfected with this eukaryon vector using Lipofectamine ™2000. The expression of TH and GDNF in mRNA and protein levels were detected by RT-PCR and immunofluorescence after G418 selection. **Results** The 2 objective fragments were inserted into pIRES correctly. RT-PCR and immunofluorescence results showed that TH and GDNF were highly expressed in MES23.5 cells. **Conclusion** The plasmid pIRES-TH-GDNF is constructed successfully and can express TH and GDNF *in vitro*.

Key words: Parkinson's disease; gene therapy; tyrosine hydroxylase; glial cell line-derived neurotrophic factor

帕金森病(Parkinson's disease, PD)的主要病理改变为中脑黑质致密区的多巴胺(dopamine, DA)能神经元渐进性变性坏死,导致纹状体中 DA 含量下降,引起椎体外系的功能失调,从而出现静止性震颤、僵直和运动迟缓等临床症状。目前临床主要应用的治疗手段如药物治疗、外科手术和细胞移植等限于暂时改善症状,不能从根本上延缓或阻止病程进展。理想的 PD 治疗方法应该不仅能纠正脑内 DA 含量的不足,而且能保护残存的 DA 能神经元。目前认为,基因治疗可能是实现这一目标的最佳途径之一[1-3]。

PD 基因治疗主要有两条途径:通过将促进 DA 合成的相应酶基因如酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)引入纹状体,以提高纹状体内神经细胞 DA

基金项目:山东省教育厅重点项目(J04E15)
Supported by the Key Program of Educational Committee of Shandong Province (J04E15)
作者简介:刘天蔚,女,山东省济宁市人,博士研究生,助理研究员,主要从事帕金森病保护因素方面的研究。电话:(0532)82911351
通信作者:谢俊霞,电话:(0532)85955891
收稿日期:2007-03-22 修回日期:2007-10-28

含量,或者通过将神经营养因子如胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)引入黑质-纹状体系统,阻止 DA 能神经元凋亡,维持其存活和促进其功能修复,使受损的 DA 能神经元有可能重建和恢复功能。若同时给予神经营养因子基因和 TH 基因,可能达到防治兼备的目的,应该是目前 PD 基因治疗的理想策略。因此我们拟构建 TH 和 GDNF 双基因表达载体,以期为帕金森病的基因治疗提供新的方法和手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 pIRES、pWAV2-TH、pBluescript-mGDNF 由北京医科大学王晓民教授惠赠;大肠杆菌 JM109、MES23.5 细胞为本室保存。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、*Eag*Ⅰ等均购自 New England Biolab 或 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品;$MgCl_2$、逆转录酶(AMV)、Raisin、*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品;高保真 Primer Star *Taq* DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品;T_4 DNA 连接酶为 Invitrogen 公司产品;胎牛血清为 HyClone 公司产品;DMEM 培养基为 Invitrogen 公司产品;GDNF 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;TH 单克隆抗体购自 Sigma 公司;FITC 标记的二抗购自北京中山生物公司;Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品;E.Z.N.ADNA 凝胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.3 引物设计与合成 PCR 引物以 Prime Premier 5.0 软件辅助设计,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,序列如下:GDNF 克隆引物(653 bp):上游 5′-GTCGACATGAAGT-TATGGGATGTCGT-3′(划线处为 *Sal*Ⅰ酶切位点);下游 5′-GT-GGATGTATCTGACCCTGGTCGAC-3′(划线处为 *Sal*Ⅰ酶切位点)。GDNF 检测引物(597 bp):上游 5′-TGTCTGCCTGGTGTT-GCTC-3′;下游 5′-CGTTTAGCGGAATGCTTTC-3′。TH 检测引物(148 bp):上游:5′-TCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTC-3′;下游:5′-ACTGGAAGGCGATCTCAGCAATCAGCTTCC-3′。GAPDH 检测引物(340 bp):上游:5′-GACCACAGTCCATGCCAT-CAC7GC-3′;下游 5′-GCTGTTGAAGTCGCAGGAGACAAC-3′。

1.2 方法

1.2.1 pIRES-TH 载体的构建及检测 从 pWAV2-TH 质粒上以 *Eco*RⅠ酶切获得人 TH 片段,切下含目的片段的凝胶,按试剂盒说明回收纯化目的片段并将其克隆入真核表达质粒载体 pIRES 的上游,构建出 pIRES-TH。转化感受态 JM109 大肠埃希菌,挑取单克隆细菌进行培养。提取质粒用 *Eco*RⅠ+*Xho*Ⅰ酶切鉴定连接方向,方向正确者送上海生工生物工程公司进行测序。

1.2.2 PCR 扩增目的基因 GDNF 片段 根据上述引物序列,以 pBluescript-mGDNF 为模板,扩增体积为 50 μl,其中含有模板 1 μl,PCR 扩增缓冲液 5 μl,dNTP 4 μl(浓度皆为 2.5 mmol/L,Promega 公司),引物各为 1 μl(浓度皆为 50 pmol/L),2 U *Taq* DNA 多聚酶。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收约 653 bp 条带。扩增片段用 *Sal*Ⅰ酶切并纯化(Wizard PCR Preps DNA PurificationSystem,Promega),备用。

1.2.3 pIRES-TH-GDNF 载体的构建及检测 pIRES-TH 以 SalⅠ酶切,经 CIAP 处理末端后,将回收纯化的目的片段 GDNF 克隆入其下游,构建出 pIRES-TH-GDNF。转化感受态 JM109 大肠杆菌,挑取单克隆细菌进行培养。提取质粒用 *Sal*Ⅰ+*Eag*Ⅰ酶切鉴定连接方向,方向正确者送上海生工生物工程公司进行测序。

1.2.4 细胞转染与筛选 MES23.5 细胞用含有 5% 胎牛血清和 2% Sato 添加液的 DMEM/F12 培养基悬浮,然后接种于涂有多聚赖氨酸的培养瓶中,在 37 ℃,5% CO_2 培养箱培养,2 d 换液 1 次。转染按 Lipofectamine™ 2000 试剂说明进行。细胞接种于 24 孔板,待细胞生长至 80% ~90% 融合时进行转染,每孔用质粒 DNA 0.8 μg、脂质体 2 μl。24 h 后将细胞按 1∶10 比例传代。转染 48 h 后加入 G418 筛选,浓度为 700 μg/ml。约 2 周后将 G418 减为维持量 350 μg/ml。待抗性克隆形成后,挑取抗性克隆进行扩大培养。

1.2.5 细胞免疫荧光 细胞用 37 ℃ PBS 洗 3 次,3 min/次;4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗 3 次,3 min/次;10% 山羊血清 37 ℃封闭 1 h 加一抗 4 ℃过夜;PBS 洗 3 次,3 min/次 加 FITC 标记的二抗室温孵育 2 h;PBS 洗 3 次,3 min/次;70% 甘油封片;激光共聚焦显微镜下观察、照相。

1.2.6 RT-PCR 检测 TH、GDNF 的 mRNA 表达 转染并筛选后的细胞终止培养,加入 Trizol,按 Trizol 说明书操作,提取细胞总 RNA,按逆转录酶试剂操作说明合成 cDNA。目的基因与内参基因采用同管扩增,参照标准 PCR 反应体系,分别优化退火温度、循环参数,建立适宜的半定量 PCR 反应体系。将 PCR 产物在琼脂糖中电泳,溴化乙锭(EB)染色后,采用 Tanon 凝胶成像系统对每一 PCR 扩增产物进行分析。

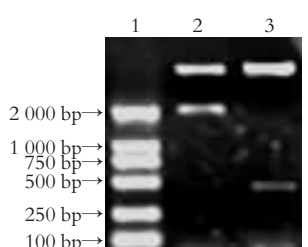
1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 pIRES-TH-GDNF 载体的构建及检测

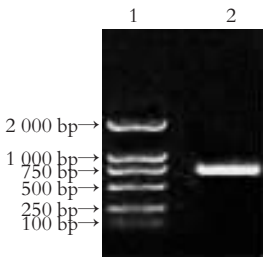
2.1.1 pIRES-TH 载体的构建及检测 从 pWAV2-TH 质粒上以 *Eco*RⅠ酶切获得人 TH 片段,将其克隆入真核表达质粒载体 pIRES 的上游,构建出 pIRES-TH。质粒用 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切鉴定,电泳显示 1 898 bp 和 505 bp 的 DNA 片段,与预期结果一致,表明质粒构建正确(图 1)。



1:标准(DL2000);2:*Eco*RⅠ酶切后质粒片段;3:*Xho*Ⅰ酶切后质粒片段

图1 克隆载体 pIRES-TH 酶切鉴定

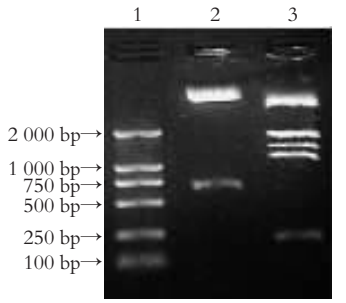
2.1.2　PCR 扩增 GDNF 基因　　PCR 获得约 653 bp DNA 片段，与 GDNF 长度相符（图 2）。测序证实扩增片段为 GDNF 全长 cDNA，序列同基因库公布序列相符。



1：标准（DL2000）；2：GDNF 扩增片段

图 2　PCR 产物 GDNF 琼脂糖凝胶电泳图

2.1.3　pIRES-TH-GDNF 载体的构建及检测　　将回收纯化的目的片段 mGDNF 克隆入 pIRES-TH 载体下游，构建出 pIRES-TH-GDNF。质粒用 *Sal* Ⅰ和 *Eag* Ⅰ酶切鉴定，电泳显示 653 bp 和 208 bp 的 DNA 片段，表明质粒构建正确（图 3）。

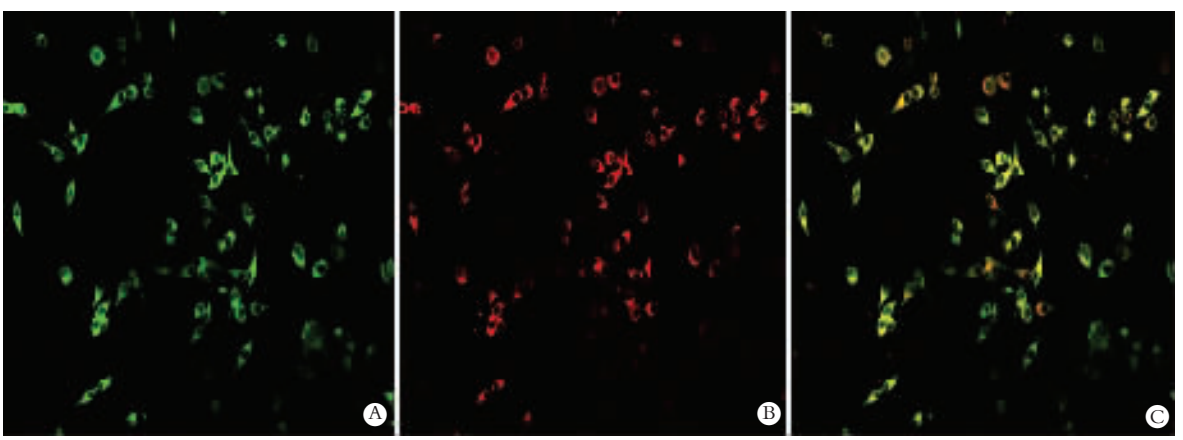


1：标准（DL2000）；2：*Sal* Ⅰ酶切后质粒片段；3：*Eag* Ⅰ酶切后质粒片段

图 3　克隆载体 pIRES-TH-GDNF 酶切鉴定

2.2　质粒转染 MES23.5 细胞及其体外表达

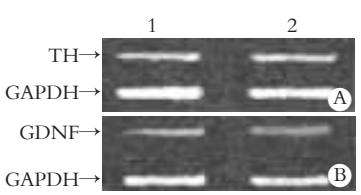
2.2.1　细胞免疫荧光结果　　图 4 显示 TH 和 GDNF 在转染的 MES23.5 细胞中都有较强表达：图 4A（绿色）为 TH 阳性细胞；图 4B（红色）为 GDNF 阳性细胞；图 4C（黄色）为 TH、GDNF 双阳性细胞。



A：TH-FITC 染色；B：GDNF-TRITC 染色；C：双染

图 4　转染 pIRES-TH-GDNF 后 MES23.5 细胞中 TH 和 GDNF 的表达　（激光共聚焦显微镜 ×200）

2.2.2　RT-PCR 结果　　显示转染后 TH 和 GDNF 能同时在 MES23.5 细胞内转录（图 5），未转染的细胞中也可观察到 TH 和 GDNF 的转录，但转染组与对照组（非转染组）相比，基因表达水平（TH/GAPDH mRNA 及 GDNF/GAPDH mRNA 值）明显升高（$P<0.05$）。



A：TH；B：GDNF

1：对照组；2：转染组

图 5　RT-PCR 显示转染前后 MES23.5 细胞中 TH 与 GDNF 的表达

3　讨论

由于 PD 病变部位较明确和病变范围局限，变性细胞单一，相关基因已被克隆，动物模型和移植方法也比较成熟，因此 PD 被认为是适合基因治疗的疾病之一[4]。用鼠 TH 基因表达质粒 TKBPVTH 转染猴 CV1-P 成纤维细胞、鼠 C6 神经胶质瘤细胞和人 NHA 星型胶质细胞，均能获得很高的转染效率，并表达 TH[5]；构建编码 TH 和 GTP cyclohydrolase-1（GCH）基因的真核质粒载体导入永生化成纤维细胞或神经干细胞，筛选扩增后植入 PD 模型大鼠，移植细胞长期存活、动物行为学显著改善[6,7]。徐强等[8]以重组质粒 pcDNA3.1 his-hTH 与 pEGFP-C2 共转染恒河猴骨髓基质细胞源性神经干细胞，结果显示 hTH、EGFP 和 6His 基因在细胞内有效表达。而 GDNF 可提高 DA 能神经元摄取 DA 的能力，同时不影响 γ-氨基丁酸（Gamma-aminobutyric acid，GABA）能神经元对 GABA 的摄取和 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）能神经元对 5-HT 的摄取，表现出对 DA 能神经元作用的特异性。GDNF 能显著促进 DA 能神经元的分化，可挽救处于凋亡坏死

边缘状态下 DA 能神经元的结构和功能,完善黑质-纹状体的神经投射通路,恢复其合成内源性 DA 的功能。Park 等[9]将 GDNF 成功导入骨髓细胞并移植到 PD 大鼠模型脑内,证实细胞存活并表达基因产物。段德义等[10]将转染了 GDNF 基因的成纤维细胞移植到大鼠 PD 模型中,发现实验组 PD 大鼠单侧旋转行为明显减少,患侧纹状体内 DA 含量显著提高甚至恢复到移植前水平,而且转基因细胞在脑内存活了 1 年以上。由于引起 PD 的因素很多,单靠给予某一种基因或因子所起的效果有限,同时应用两种或两种以上的基因治疗可能更具疗效[11,12]。

如何将两个不同的外源基因同时克隆于一个载体上,并保持两个基因均具有明确的转基因生物学活性,而且要保证含有两个基因的表达盒大小控制在载体的有效承载范围内,是本研究的关键问题。为此,我们采用了内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)序列串联两个不同的目的基因,IRES 是来自脑心肌炎病毒的序列[13],其大小不超过 0.6 kb,它允许从一个 mRNA 上翻译两个开放阅读框,IRES 的作用类似于原核生物的 SD 序列,在启动阶段有助于 RNA 与核蛋白体小亚基结合,从而使我们的双表达设想成为可能[14-16]。本研究获得的 IRES 序列来自 CLONTECH 公司商品化双顺反子表达质粒 plRES,在共表达载体的构建中,利用 IRES 构建多/双顺反子表达载体是较为被肯定的一种方法[17]。表达载体 pIRES 在上下游克隆位点之间有一段 IRES 序列,此段序列在转录后能够自动断裂,从而使上下游克隆位点插入的基因能够独立高效的表达,避免了融合表达 TH 和 GDNF 蛋白活性低下问题。在质粒载体的骨架上有新霉素抗性基因,供转染后选择阳性细胞克隆使用。同时该质粒具有真核和原核细胞启动子序列,为穿梭质粒,是集克隆、测序与表达于一体的高效表达载体。因此,构建的共同表达质粒 pIRES-TH-GDNF 既可以在大肠杆菌中大量复制,在真核细胞中研究 TH 与 GDNF 表达产物的特性,又为将来在动物实验中提供了方便。本实验通过酶切、测序证实质粒构建成功;通过转染 MES23.5 细胞及 RT-PCR、免疫荧光等的检测证实了重组质粒的稳定表达,从而为达到 PD 基因治疗与预防兼备的目的奠定了坚实的实验基础。

参考文献:

[1] Hodaie M, Neimat J S, Lozano A M. The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies[J]. Neurosurgery, 2007, 60(1): 17-30.

[2] Koike H, Ishida A, Shimamura M, *et al*. Prevention of onset of Parkinson's disease by *in vivo* gene transfer of human hepatocyte growth factor in rodent model: a model of gene therapy for Parkinson's disease[J]. Gene Ther, 2006, 13(23): 1639-1644.

[3] Chen S, Le W. Neuroprotective therapy in Parkinson disease[J]. Am J Ther, 2006, 13(5): 445-457.

[4] Beal M F. Experimental models of Parkinson's disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(5): 325-334.

[5] Lampela P, Huotari M, Harjula A, *et al*. Production of functional recombinant tyrosine hydroxylase by the BPV-1 expression plasmids in the cell cultures[J]. Plasmid, 2003, 50(3): 230-235.

[6] Chen S, Xianwen C, Dehua X, *et al*. Behavioral correction of Parkinsonian rats following the transplantation of immortalized fibroblasts genetically modified with TH and GCH genes[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2003, 9(Suppl 2): S91-S97.

[7] Ryu M Y, Lee M A, Ahn Y H, *et al*. Brain transplantation of neural stem cells cotransduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 in Parkinsonian rats[J]. Cell Transplant, 2005, 14(4): 193-202.

[8] 徐 强,徐如祥,姜晓丹,等. 重组质粒 pcDNA3.1 his-hTH 与 pEGFP-C2 共转染骨髓基质细胞源神经干细胞的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(2): 118-122.

[9] Park K W, Eglitis M A, Mouradian M M. Protection of nigral neurons by GDNF-Engineered marrow cell transplantation[J]. Neurosci Res, 2001, 40(4): 315-323.

[10] 段德义,杨 慧,张京钟,等. GDNF 转基因成纤维细胞脑内移植治疗帕金森病大鼠模型[J]. 神经解剖学杂志, 2002, 18(3): 197-202.

[11] 樊志刚,刘 翔,白瑞樱,等. 脐血干细胞移植对帕金森病大鼠神经功能恢复的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(4): 646-649.

[12] Wang Z H, Ji Y, Shan W, *et al*. Therapeutic effects of astrocytes expressing both tyrosine hydroxylase and brain-derived neurotrophic factor on a rat model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2002, 113(3): 629-640.

[13] Qiao J, Roy V, Girard M H, *et al*. High translation efficiency is mediated by the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sites if the natural sequence surrounding the eleventh AUG is retained[J]. Hum Gene Ther, 2002, 3(7): 881-887.

[14] Fletcher S P, Jackson R J. Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5′ untranslated region important for IRES function[J]. J Virol, 2002, 76(10): 5024-5033.

[15] Wong E T, Ngoi S M, Lee C G. Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from human genes[J]. Gene Ther, 2002, 9(5): 337-344.

[16] 何 飞,谭颖徽,杨峥嵘. Deltal-IRES-EGFP 双顺反子逆转录病毒表达载体的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1197-1200.

[17] Kleiman S E, Pastan I, Puck J M, *et al*. Characterization of an MDR1 retroviral bicistronic vector for correction of X-linked severe combined immunodeficiency[J]. Gene Ther, 1998, 5(5): 671-676.

(编辑 龙 亮)