文章编号:1000-5404(2008)02-0153-04

论著

人 BMP-7 基因重组腺病毒的构建与鉴定

方针强[1],叶 钢[1],欧阳一辛[2],刘永亮[1],贾维胜[1],冯嘉瑜[1] (第三军医大学新桥医院:[1]泌尿外科,全军肾脏病中心,[2]检验科,重庆 400037)

摘 要:**目的** 构建含有人骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)基因的重组腺病毒载体,并对其相关指标进行鉴定,观察其对肾小管上皮细胞株(HKC)细胞的转染情况。**方法** 用基因工程技术将人 BMP-7 基因 cDNA 亚克隆至穿梭质粒 pDC316 上,利用脂质体介导的方法将 AdMax 腺病毒包装系统的骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和穿梭质粒 pDC316-BMP-7 转染入 HEK293 细胞,进行同源重组,得到腺病毒重组质粒 Ad5-BMP-7,并在其中包装扩增病毒。采用 PCR 方法对重组腺病毒进行鉴定,利用穿梭质粒中所带绿色荧光蛋白 GFP 报告基因,进行病毒滴度的测定和对 HKC 细胞感染效率的检测。**结果** 酶切鉴定及 PCR 结果证明 BMP-7 基因重组腺病毒载体构建成功,病毒滴度达 1.25×10^{10} PFU/ml,对 HKC 有较强感染能力。**结论** 应用细胞内同源重组方法成功构建了含人 BMP-7 基因的重组腺病毒载体。

关键词:腺病毒;骨形成蛋白-7;同源重组
中图法分类号:R373;R394-33 **文献标识码**:A

Construction and identification of human BMP-7 gene recombinant adenovirus

FANG Zhen-qiang[1], YE Gang[1], OUYANG Yi-xin[2], LIU Yong-liang[1], JIA Wei-sheng[1], FENG Jia-yu[1] ([1]Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, [2]Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct and identify the recombinant adenovirus encoding human BMP-7 gene and observe its ability to infect HKC cells. Methods The human BMP-7 gene fragment was cloned into the shuttle plasmid pDC316 to form pDC316-BMP-7. Then pDC316-BMP-7 and the framework plasmid pBHGlox_E1,3Cre were transfected into HEK293 cells for homogenous recombination in cells with Lipofectamine 2000. The target gene was detected by polymerase chain reaction (PCR). The titer and its infection rate were determined using the green fluorescent protein (GFP) expression in the shuttle plasmid. Results Restriction endonuclease and PCR analysis confirmed that the human BMP-7 gene was successfully inserted into the adenovirus vector. The titer of the recombinant adenovirus was 1.25×10^{10} PFU/ml. The adenovirus has a strong effect on human HKC cells. Conclusion The recombinant adenovirus containing human BMP-7 gene was successfully constructed by the method of homogenous recombination in cells.

Key words: adenovirus; BMP-7 gene; homogenous recombination

骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)是骨形态发生蛋白家族中的一种,属于 TGF-β 细胞因子超家族,不仅在肾脏发育中具有重要作用,而且与多种肾脏疾病关系密切,包括急性缺血性肾损害、肾小管间质纤维化、糖尿病肾病和狼疮性肾炎等[1-3]。目前 BMP-7 在肾脏中的作用机制尚未明确,利用转基因技术对肾脏疾病的干预和治疗虽然尚处于研究阶段,但已成为肾脏发育和肾脏疾病研究中的一个热点。因此,我们利用基因工程技术和另一种腺病毒包装系统 AdMax,体外构建表达人 BMP-7 基因的重组腺病毒载体,旨在提高转染效率和效果,为进一步研究 BMP-7 在肾脏发育和肾脏疾病中的分子作用机制及治疗作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含人 BMP-7 基因的质粒 pT7-BMP-7(第四军医大学唐都医院骨肿瘤研究所鱼兵博士惠赠);大肠埃希菌 DH5α 菌株和腺病毒包装细胞 HEK293 细胞(本院中心实

作者简介:方针强,男,湖北省嘉鱼县人,博士研究生,主治医师,主要从事肾脏疾病及肾脏移植方面的研究,发表论文 9 篇。电话:(023)68774624, E-mail: fangzhenqiang123@sina.com
通信作者:叶 钢,电话:(023)68774624
收稿日期:2007-09-01;修回日期:2007-10-11

验室保存);肾小管上皮细胞株 HKC(本院全军肾脏病中心张静波博士惠赠);穿梭质粒 pDC316 和腺病毒基因组质粒 pBHGlox_E1,3Cre(加拿大 Microbix Biosystems Inc. 公司)。

1.1.2 酶类及主要生化试剂 限制性内切酶、连接酶购自基因公司,质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自杭州维特洁公司,脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取、酶切、连接及转化 参照文献[4]的方法进行。

1.2.2 PCR 引物设计 参照已在 GenBank 上发表的人 BMP-7 序列,应用 Primer Primer 5.0 程序设计特异性人 BMP-7 基因上游引物:5′- GCCGACTTCAGCCTGGACAA-3′,下游引物:5′- CGCCAACTTGGGGTTGATGC-3′。

1.2.3 腺病毒穿梭质粒 pDC316-BMP-7 的构建及鉴定 用 *Sal* Ⅰ酶切腺病毒穿梭质粒 pDC316 和 pT7-BMP-7,琼脂糖凝胶电泳回收 4 000 bp 左右大小的 pDC316 质粒酶切片段和约 1 500 bp 的 BMP-7 目的片段,用 T_4 连接酶将二者连接起来,热休克法转化入感受态大肠埃希菌 DH5α,提取质粒 pDC316-BMP-7,*Xho* Ⅰ酶切初步鉴定重组质粒,并送 TaKaRa 公司测序鉴定。

1.2.4 重组腺病毒质粒载体 Ad5-BMP-7 的构建与鉴定 按照 Lipofectamine™2000 脂质体的说明书,利用脂质体介导的方法将 AdMax 腺病毒包装系统的骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和鉴定正确的穿梭质粒 pDC316-BMP-7 转染入 HEK293 细胞,进行同源重组,大量扩增克隆,得到腺病毒重组质粒 Ad5-BMP-7。PCR 鉴定:分别以 pBHGlox_E1,3Cre(阴性对照)、pT7-BMP-7(阳性对照)和 Ad5-BMP-7 为模板;用前面合成的人 BMP-7 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。扩增反应的条件为:变性 94 ℃ ×5 min,然后 94 ℃ ×30 s,退火 56 ℃ ×45 s,延伸 72 ℃ ×60 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ ×5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

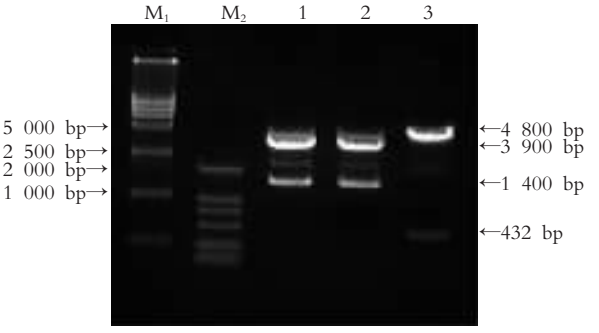
1.2.5 人 BMP-7 基因重组腺病毒包装、扩增及鉴定 ①重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞:同 1.2.4 法利用脂质体介导的方法将骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和鉴定正确的穿梭质粒 pDC316-BMP-7 转染 HEK293 包装细胞进行同源重组,每天观察细胞出毒迹象。待细胞大部分出现明显噬斑并从底部脱落后回收病毒,将其加入 HEK293 细胞中继续培养,直至扩增出足量的腺病毒。②重组腺病毒的鉴定:用前面合成的人 BMP-7 基因的特异性引物进行 PCR 鉴定,取 50 μl 供试病毒样品(Ad5- BMP-7)加入 2 μl 蛋白酶 K(10 mg/ml),55 ℃ 1 h,煮沸 10 min,冰水浴,用 PCR 缓冲液进行 10、100 倍稀释,和原液作为模板。设立阴性对照(ddH_2O)、阳性对照:pT7-BMP-7。人 BMP-7 特异性引物 PCR 扩增条件同前。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.6 病毒滴度和感染效率的测定 ①病毒滴度的测定:参照文献[5]方法进行,按下面公式计算病毒滴度:病毒滴度(PFU/ml) = GFP 阳性细胞数 × 病毒稀释倍数/0.01 ml。②病毒感染效率的测定:在 6 孔板上按照 2×10^5/孔接种 HKC 细胞,待融合至 80% 时,用感染复数病毒/细胞(multiply of infection,MOI)为 25、50、75、100 的腺病毒感染 HKC 细胞。48 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞率。

2 结果

2.1 腺病毒穿梭质粒 pDC316-BMP-7 的鉴定

由于 BMP-7 基因靠近上游区域引入了 *Xho* Ⅰ位点,pDC316 质粒中也有 *Xho* Ⅰ位点,可以用此酶切鉴定插入方向,正向获得 4 800 bp 和 432 bp 的片段,反向插入获得 3 900 bp 和 1 400 bp 的条带。电泳结果如图 1 所示,从电泳图可以看到,泳道 1 和 2 为反向插入,泳道 3 为正向插入。测序鉴定:经 TaKaRa 公司测序的结果与 GenBank 公布的序列完全一致。

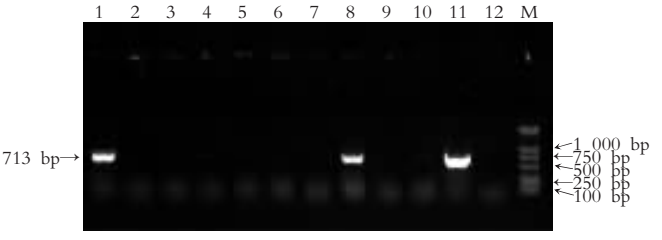


M_1:DNA 标准(DL 15000);M_2:DNA 标准(DL 2000);1 – 3:*Xho* Ⅰ单酶切 pDC316-BMP-7 质粒

图 1 质粒酶切电泳图

2.2 重组腺病毒质粒载体 Ad5-BMP-7 的鉴定

以人 BMP-7 基因的特异性引物对质粒 Ad5-BMP-7 进行 PCR 扩增,可得到大小约 700 bp 的片段(图 2)。从电泳图中看出泳道 1 和 8 扩增条带大小与预期结果相同,为阳性克隆。



M:DNA 标准(DL 2000);1 – 10:Ad5-BMP-7 质粒模板;11:pT7-BMP-7(阳性对照);12:pBHGlox_E1,3Cre(阴性对照)

图 2 PCR 检测重组腺病毒质粒

2.3 人 BMP-7 基因重组腺病毒的鉴定

重组腺病毒质粒转染 HEK293 包装细胞,培养 24 h 后可见绿色荧光蛋白 GFP 的表达(图 3),8 d 后细胞逐渐呈悬浮生长,并出现细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)(图 4)。将提取的重组腺病毒以人 BMP-7 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,人 BMP-7 基因重组腺病毒得到约 700 bp 的特异性目的条带,阴性对照未见目的条带(图 5)。

2.4 病毒滴度和感染效率的测定

根据 GFP 计数法进行滴度测定,测得重组腺病毒 Ad5-BMP-7 的滴度为 1.25×10^{10} PFU /ml,阴性对照腺病毒的滴度为 8×10^{10} PFU /ml。用不同 MOI 的 Ad5-BMP-7 感染 HKC 细胞,当 MOI 为 75 时,48 h 后 80% 的细胞出现荧光(图 6),表明所构建的腺病毒 Ad5-BMP-7 对 HKC 细胞具有较高的感染能力。

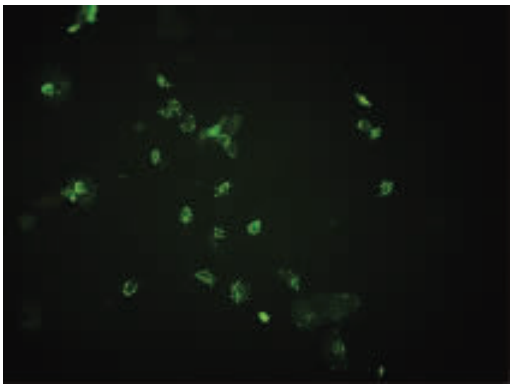


图 3　腺病毒转染 HEK293 细胞 24 h 后 GFP 的表达（荧光显微镜 ×200）

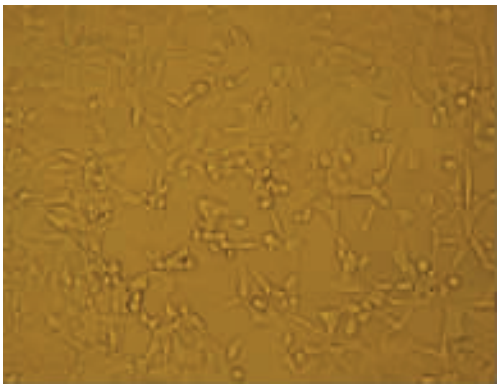
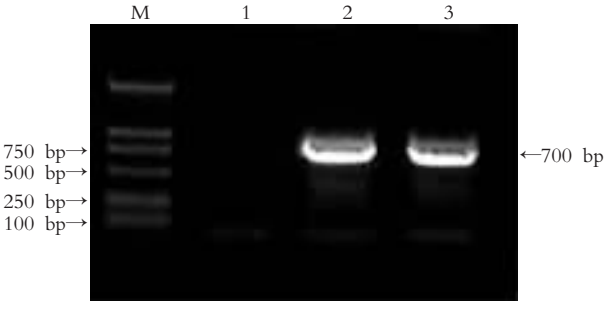


图 4　腺病毒转染 HEK293 细胞 8 d 后出现的细胞病变效应　（倒置相差显微镜 ×100）



1：阴性对照；3：阳性对照（以 pT7-BMP-7 为模板所得 PCR 产物）；2：以 Ad5-BMP-7 为模板所得 PCR 产物；M：DNA 标准（DL 2000）

图 5　PCR 检测人 BMP-7 基因重组腺病毒 DNA

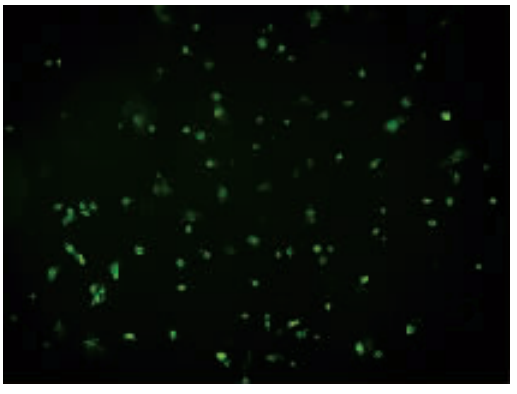


图 6　重组腺病毒转染 HKC 细胞后 48 h 绿色荧光蛋白的表达　（荧光显微镜 ×100）

3　讨论

BMP-7 也称为骨调素-1（osteogenic protein-1，OP-1），最初从骨基质中分离纯化得到，其功能是调控骨和软骨的发生[6]。最近几年研究表明此蛋白与肾脏关系密切。在哺乳动物胎肾和成年肾脏中，BMP-7 含量最丰富，而肾脏也是机体中 BMP-7 产生较多的部位[7]。研究证实肾脏表达 BMP-7，也存在 BMP-7 受体[8]，提示 BMP-7 可能通过自分泌和旁分泌途径来调节肾脏功能。Davies 等[9]检测了小鼠胚胎后肾中 BMP-7 mRNA 及其蛋白的表达、分布情况，证实 BMP-7 对小鼠肾脏的发育和功能具有重要调节作用。Dudley 等[10]制备了 BMP-7 基因缺陷小鼠模型，发现基因缺陷小鼠除了骨骼发育存在缺陷外，肾脏和眼的发育也受到明显影响，尤其是肾脏的发育。体外肾脏细胞培养研究的结果也均提示 BMP-7 能调节肾脏细胞的增生、分化以及凋亡[11,12]。近年来研究表明，BMP-7 还与肾脏疾病的发生、发展、转归有着密切联系。Klahr 等[2]研究组发现 BMP-7 能延缓大鼠输尿管梗阻后慢性肾功能不全的进展，其作用机制目前尚不清楚，有待进一步研究。Klahr 等[3]的研究表明 BMP-7 能维持和恢复糖尿病肾病的肾脏功能和结构，在糖尿病肾病早期阶段，BMP-7 有潜在的应用价值。Liu 等[1]研究证实 BMP-7 能够减轻大鼠肾脏缺血性损伤，防止肾功能丧失。

总之，近年来研究表明 BMP-7 不仅在肾脏发育中具有重要作用，还与多种肾脏疾病关系密切，已成为肾脏发育和肾脏疾病研究中的一个热点。因此有必要对 BMP-7 进行深入研究，进一步探讨并明确 BMP-7 的分子作用机制及治疗作用，故本实验构建人 BMP-7 基因重组腺病毒。

本实验所用腺病毒 AdMax 包装系统，其骨架质粒 pBHGlox_E1，3Cre 带有病毒的大部分基因组，可以与克隆了外源基因并带有 loxP 位点的腺病毒穿梭质粒 pDC316 配合，通过 Cre-loxP，使转染进 HEK-293 细胞的穿梭质粒和骨架质粒发生定点重组，产生带有外源基因的重组腺病毒（Ad5）。其发生定点重组的原理：穿梭质粒和骨架质粒各含有 1 个同向排列的 loxP 位点，将穿梭质粒和骨架质粒共转染包装细胞株 HEK-293 细胞，骨架质粒所携带的 Cre 基因开始表达，介导 2 个 loxP 位点之间的重组。Cre 剪切掉骨架质粒上的细菌内复制元件、抗性基因以及 Cre 基因，同时完成目的基因的插入。通过这种方法转染 7 ~ 10 d 后就能观察到病毒噬菌斑，比一般细胞内同源重组获得重组腺病毒的效率要高约 100 倍，而且只要插入的外源基因不大于 8 000 bp，那么几乎 100% 的重组腺病毒都携带有目的基因[13]。通过 Cre 基因介导 2 个 loxP 位点（分

别位于穿梭质粒和骨架质粒)之间的重组从而获得重组病毒,这个过程发生在 HEK-293 细胞中,从而避免在细菌中重组[14,15]。这个系统有多种优势,包括操作简便、出毒快、重组效率高、稳定性好、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高(因为 mCMV 启动子比 hCMV 启动子强若干倍)等。

本实验利用腺病毒 AdMax 包装系统成功构建了携带人 BMP-7 基因的重组腺病毒 Ad5-BMP-7,简化了实验步骤,缩短了构建周期,并获得了较高的病毒滴度,对 HKC 细胞具有较高的感染能力,这对利用所构建的重组腺病毒转染 HKC 细胞及肾脏其他细胞,进一步研究 BMP-7 在肾脏发育和肾脏疾病中的分子作用机制及治疗作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Liu K D. Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure [J]. Crit Care Med, 2003, 31(8 Suppl): S572 - S581.

[2] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor[J]. Kidney Int Suppl, 2003, (87): S105 - S112.

[3] Klahr S, Morrissey J, Hruska K, *et al*. New approaches to delay the progression of chronic renal failure[J]. Kidney Int Suppl, 2002, (80): 23 - 26.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 16 - 56.

[5] 江千里, 王建民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1034 - 1035.

[6] Knippenberg M, Helder M N, Zandieh-Doulabi B, *et al*. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 902 - 908.

[7] Davies J A, Fisher C E. Genes and proteins in renal development[J]. Exp Nephrol, 2002, 10(2): 102 - 113.

[8] Bosukonda D, Shih M S, Sampath K T, *et al*. Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys[J]. Kidney Int, 2000, 58(5): 1902 - 1911.

[9] Davies J A. Morphogenesis of the metanephric kidney[J]. Scientific World J, 2002, 2: 1937 - 1950.

[10] Dudley A T, Lyons K M, Robertson E J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye[J]. Genes Dev, 1995, 9(22): 2795 - 2807.

[11] Zeisberg M, Shah A A, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8094 - 8100.

[12] Piscione T D, Phan T, Rosenblum N D. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis *via* Smad1 dependent and independent pathways[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 280(1): F19 - F33.

[13] 房亚东, 徐 雪, 党永明, 等. 大鼠微管相关蛋白4重组腺病毒载体的构建及在细胞中的表达鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 880 - 882.

[14] 李钊伦, 田普训, 薛武军, 等. sCD40L Ig 重组腺病毒载体的构建鉴定和体外表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2107 - 2110.

[15] 丁涵露, 吴雄飞, 高闻达, 等. 重组 AdPD-L1 腺病毒的构建表达及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1190 - 1193.

(编辑 王小寒)

(上接149页)

CBMC 分泌的 IL-4、IL-10、IFN-γ 均低于 PBMC,其中 IL-10 和 IFN-γ 显著低于 PBMC($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

有研究表明,母亲-胎盘-胎儿环境中的细胞因子在调节母体对胎儿同种异体抗原的反应中扮演了重要角色,其中 Th2 类细胞因子 IL-4 和 IL-10 有利于妊娠的继续,故妊娠期间母体的免疫系统和母胎界面的细胞因子微环境是偏向于 Th2 型体液免疫反应的[1],推测新生儿 T 细胞可能有向 Th2 细胞发育的潜能。近年来,研究表明在 Th1/Th2 分化过程中, ICOS、T-bet、GATA-3 和 Foxp3 均位于 Th1/Th2 分化的上游。对 T 细胞的激活、分化起着非常重要的作用。

本组对新生儿脐血的研究资料显示:培养前新生儿 CBMC $CD3^+ICOS^+$ 细胞阳性率明显高于成人 PBMC,且 T-bet mRNA 的表达显著低于 PBMC,进一步提示在出生时新生儿 $CD3^+$ T 细胞本身可能存在 Th2 分化发育的优势趋向。我们的研究表明,培养前 CBMC Foxp3 mRNA 与 PBMC 无显著性差异,而经 PHA 刺激后 CBMC Foxp3 mRNA 表达明显高于 PBMC,表明新生儿 T 细胞经活化后具备向 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞方向分化的能力。我们的研究结果还显示经 PHA 刺激后 CBMC 的细胞因子 IFN-γ、IL-4 与 IL-10 水平均较 PBMC 低下,其中 IL-10、IFN-γ 两者具有显著性差异。有研究表明,新生儿期 Th 细胞功能明显低下,产生各种细胞因子的能力普遍不足,可能与新生儿脐血 T 淋巴细胞较原始且又缺乏 T 淋巴细胞活化/生长因子有关,抗原表达既弱又不充分。但 Th1 类细胞因子 IFN-γ 水平低下更显著,呈现低水平的 Th2 优势状态[2],此为胚胎期免疫发育特性的延续[3]。

总之,通过对新生儿 Th1/Th2 分化上游阶段 ICOS、T-bet、GATA-3 和 Foxp3 研究,我们进一步证实 CBMC T 细胞有向 Th2 发育的倾向,经活化后向 Th2 分化的能力更强,并且具备向 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞分化的能力,同时,与健康成人相比,新生儿时期 T 细胞功能明显低下。

关键词: ICOS;转录因子;新生儿;T 细胞亚群
中图法分类号: R392.12 ;R392.11 文献标识码: B

参考文献:

[1] Gonzalo J A, Delaney T, Corcoran J, *et al*. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 1 - 5.

[2] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(2): 330 - 336.

[3] 蒋力学, 史桂英, 石学耕, 等. 新生儿、儿童及成人外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞分泌 IFN-γ 及 IL-4 变化的研究[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(1): 23 - 25.

(编辑 王小寒)