文章编号:1000-5404(2011)15-1555-04

论著

deltex-1 腺病毒载体的构建及其在大鼠 bMSCs 中的表达

王 荣,王延洲,徐惠成 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 构建 deltex-1 基因腺病毒载体并研究其在大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,bMSCs)中的表达。**方法** 采用高保真酶 PCR 扩增 deltex-1 基因并测序,亚克隆至 pAdTrack-CMV 腺病毒穿梭载体后在 BJ5183 细菌中进行重组,挑选正确的重组子在 FT293 细胞中包装成病毒。以 $CsCl_2$ 方法纯化病毒,并进行滴度测定。将目的基因病毒感染 bMSCs 细胞后收集总 RNA 及蛋白,用 PCR 及 Western blot 方法检测目的基因表达水平。**结果** ①成功扩增了大小为 1 883 bp 的大鼠 deltex-1,并成功构建了大小为 4.5 kb 的同源重组腺病毒穿梭载体,滴度为 1.23×10^{11} IU/ml;②对培养的大鼠 bMSCs 进行流式检测,结果为 CD90、CD44 阳性表达,分别为 99.57% 和 85.66%,而 CD45 表达阴性,阳性率为 0.35%;③荧光显微镜观察 deltex-1 转染效率为 60% ~70%,RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示转染后 deltex-1 表达明显增强,说明转染成功。**结论** 成功构建 deltex-1 基因腺病毒载体并能在 bMSCs 中高表达。

[关键词] deltex-1 基因;克隆;腺病毒载体;骨髓间充质干细胞;表达
[中图法分类号] R331.22; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Expression of deltex-1 in rat bone marrow mesenchymal stem cells by adenovirus vector

Wang Ying, Wang Yanzhou, Xu Huicheng (Department of Obstetrics and Gynaecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an adenovirus vector of rat deltex-1 gene and then investigate its expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells (bMSCs). **Methods** After deltex-1 gene was amplified by high-fidelity PCR, the product was subcloned to the pAdTrack-CMV adenovirus vector after sequencing, and recombined in the BJ5183 bacterium. The correct recombinant were picked and then packaged to virus in FT293 cells. Then the virus was purified with $CsCl_2$ and its titer was determined. At last, the expression of deltex-1 gene was determined by detecting the contents of total RNA and protein of the bMSCs with the target gene by PCR and Western blotting respectively. **Results** Rat deltex-1 gene fragment of 1 883 bp was successfully amplify, and constructed in the reconstituted adenovirus shuttle vector of 4.5 kb, and the titer of the vector was 1.23×10^{11} IU/ml. Flow cytometric analysis showed cell-surface antigens for rat bMSCs were CD90 99.57%, CD44 85.66% and CD45 0.35%. The efficiency of transfection was 60% to 70% under fluorescent microscope. RT-PCR and Western blotting suggested that the expression of deltex-1 of transfected MSCs was obviously higher than controls. All of these reveal that the transfection of deltex-1 into rat bMSCs was successful. **Conclusion** The adenovirus vector of deltex-1 is successfully constructed and the bMSCs infected by the virus express the target gene at a high level.

[**Key words**] deltex-1; clone; adenovirus vector; bone marrow mesenchymal stem cells; expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772309). Corresponding author: Xu Huicheng, Tel: 86-23-8765403, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

Notch 作为一种细胞间相互作用的信号通路,已被证实在细胞增殖、分化、凋亡等环节中具有重要作用,其中包括脊椎动物和非脊椎动物[1]。近几十年来,人们对 Notch 通路的研究也取得了显著进展。Arias 等[2]发现,Notch 除了通过经典的 CSL 途径发挥作用外,细胞内还存在一种 CSL 非依赖途径。有充足证据表明,deltex 介导了一部分 CSL 非依赖的 Notch 信号[3]。

deltex 基因首先在果蝇体内发现,但其体内只有 1 个 deltex 基因。在哺乳动物体内,deltex 家族包括 deltex-1、deltex-2、deltex-3、deltex-4 4 个成员。其中,del-

[基金项目] 国家自然科学基金(30772309)
[通信作者] 徐惠成,电话:(023)68765403,E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

tex-1 对 Notch 通路作用最为重要,如调节淋巴前体细胞分化[4]、调节神经前体细胞分化[5]等。而且在哺乳动物体内 deltex-1 基因高度保守,大小约为 1 880 bp,其编码的 DTX1 蛋白大小为 67×10^3,等电点为 9.63。

本研究构建了 deltex-1 基因的原核质粒及腺病毒表达载体,并以腺病毒载体 Adtrack 为骨架,携带 deltex-1 基因进入大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,bMSCs),从而为进一步研究采用转入 deltex-1 基因的 bMSCs 分化的平滑肌细胞治疗女性压力性尿失禁(stress urinary incontinence,SUI)奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体及细胞 载体 pAdTrack 腺病毒系统(invitrogen 公司),大肠埃希菌 DH5α(北京天根公司),293T 细胞(由金麦公司单佑安博士惠赠)。

1.1.2 主要试剂 KOD-plus 高保真酶,限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ,连接酶 T_4 Lignase, Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒,均购自 TOYOBO 公司。Trizol 胎牛血清购自 Gibco BRL 公司,RNase A 购自 Sigma 公司。Marker DL 2000、Marker-DL 15000 购自北京天根公司。DMEM 培养基购自 HyClone 公司,Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司,*Taq* 酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司,普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自北京天根公司。

1.2 方法

1.2.1 PTA2/deltex-1 重组质粒的构建与鉴定 自行设计扩增 deltex-1 基因引物,序列为:上游:5′-TAGCAGTGCCGGTCCG-GTT-3′,下游:5′-TCAGGCCTTAGCCATAGCC-3′,RT-PCR 法,以肝组织总 RNA 为模板扩增 deltex-1 基因的 cDNA 序列,克隆入载体 PTA2,采用限制性内切酶(*Xba* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ)和菌液 PCR 法对重组子行初步鉴定,将可疑阳性重组子的质粒行测序鉴定,测序正确者命名为 PTA2/deltex-1。

1.2.2 pAdTrack-CMV-deltex-1 重组质粒构建与鉴定 以 PTA2/deltex-1 为模板,扩增含酶切位点(*Xba* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ)的 deltex-1 的 cDNA 片段(PCR 产物)。用限制性内切酶(*Xba* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ)切割以 PTA2/deltex-1 质粒为模板的 PCR 产物和 pAdTrack-CMV 腺病毒载体,回收含 deltex-1 的 cDNA 片段和 pAdTrack-CMV 载体骨架片段,纯化后连接,菌液 PCR 和限制性内切酶对重组子行初步鉴定,可疑阳性重组子送予测序,测序正确者被命名为 pAdTrack-CMV-deltex-1。

1.2.3 腺病毒同源重组 穿梭质粒以 *Pme* Ⅰ线性化后,转入 BJ5183 感受态细胞,与 pAdTrack 在胞内同源重组,卡那霉素筛选 LB 平板抗性克隆。挑取菌落,抽提其质粒,*Pac* Ⅰ酶切与测序鉴定可疑阳性重组子。

1.2.4 重组腺病毒的包装及扩增 *Pac* Ⅰ酶切重组质粒,醋酸钠、乙醇沉淀回收。取培养达对数生长期的 293 细胞,经胰酶消化,计数后将细胞平铺于 6 孔板上,使每孔内细胞数达到 $(7\sim8)\times10^5$。用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养(5% CO_2,饱和湿度,37 ℃)至 20% ~30% 融合度,用脂质体法将 *Pac* Ⅰ线性化的重组腺病毒载体转染 293 细胞,48 h 后可观察到荧光及细胞病变(CPE)。当细胞出现特异的荧光以及明显的 CPE,收取细胞及上清,为第 1 代病毒。在 -80~37 ℃条件下反复冻融及振荡器振荡 3 次,使细胞成分破裂病毒释放出来,离心得到第 2 代病毒。重复上步至第 5 代便可得到较纯的病毒。

1.2.5 重组腺病毒载体的纯化与滴度测定 以 $CsCl_2$ 方法纯化病毒,并进行滴度测定。通过绿色荧光蛋白阳性细胞计数法测定。将 293 细胞以 1×10^5 浓度接种于 96 孔培养板中,轻微振荡分布均匀,培养 24 h,每 10 孔为 1 组,于第 1 孔中加入 20 μl 待测的纯化病毒液,于第 2 孔中加入 10 倍比率稀释液,依此类推,24 h 后于荧光显微镜下观察荧光细胞数(IU = 最后 1 孔荧光细胞数)。滴度 = IU × 计量孔相对于第 1 孔的稀释倍数/第 1 孔加入病毒体积。

1.2.6 大鼠 bMSCs 的分离、培养与扩增 无菌条件下,取雌性大鼠股骨及胫骨,采用冲洗结合密度梯度离心的方法制备骨髓间充质干细胞。用含 10% FCS 的低糖 DMEM 与冲出骨髓充分混匀,转入离心管,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清及脂肪层,沉淀用 DMEM 充分混匀,轻轻叠加到密度为 1.077 g/L 的 Ficoll-Paque 分离液中,2 500 r/min 离心 30 min 收集单核细胞层,用 DMEM 洗涤 2 次。细胞沉淀中加入含 10% FCS 的低糖 DMEM,计数细胞,调整密度,按 $1\times10^6/cm^2$ 密度接种于培养瓶中,37 ℃,5% CO_2,饱和湿度培养。每隔 3~4 d 换液,倒置显微镜下观察细胞生长情况,接近融合的 MSC 用 0.25% 胰蛋白酶室温消化 2~5 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀按1∶2 比例传代培养,留取第 3 代备用。

1.2.7 大鼠 bMSCs 的流式鉴定 取 1×10^6 bMSCs 分别加入流式细胞抗体 CD45、CD44、CD90(BD 公司),室温避光 30 min,PBS 冲洗后行流式检测。

1.2.8 deltex-1 基因转染大鼠 bMSCs 及其转染后的鉴定

1.2.8.1 bMSCs 的转染 参照文献[6]进行:以 $6.5\times10^3/cm^2$ 的细胞数接种第 3 代大鼠 bMSCs,待细胞完全贴壁生长至 60% ~80% 融合时,给予重组腺病毒以感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 100 感染细胞后继续培养 48 h,于倒置荧光显微镜下观察,可见阳性细胞发绿色荧光。以未经转染细胞及转染空病毒的细胞为对照,每组设 3 个孔重复。

1.2.8.2 转染效率的检测 通过绿色荧光蛋白阳性细胞计数检测重组腺病毒载体转染 bMSCs 的效率,以未经转染病毒的 bMSCs 及转染空病毒的 bMSCs 为对照。

1.2.8.3 PCR 法扩增 deltex-1 基因 重新设计用于经 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒感染的 bMSCs 总 RNA 为模板检测 deltex-1 基因的引物,扩增产物约 250 bp,未感染与空载体(pAdTrack-CMV)感染的 bMSCs 的相同检测作对照,以此检测感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 的表达情况。

1.2.8.4 Western blot 鉴定 检测感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 的表达情况。转染 36 h 后,提取感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 总蛋白并检测其含量,行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳后转硝酸纤维膜,浸泡于含 deltex-1 羊多抗(1∶200)封闭液中,4 ℃过夜孵育,加辣根

过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1∶500),室温孵育 1 h,25.2 ℃下,与化学发光底物结合 5 ~ 10 min,保存图片。

2 结果

2.1 pAdTrack-CMV-deltex-1 同源重组腺病毒的构建

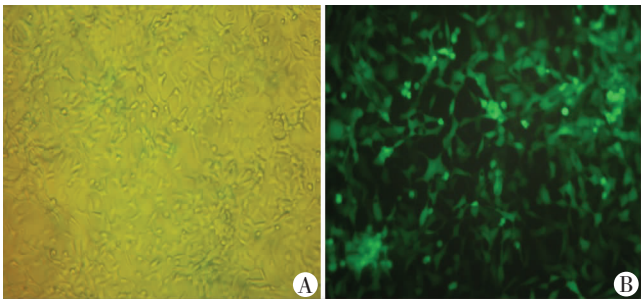
2.1.1 PTA2/deltex-1 重组质粒的构建与鉴定 电泳结果显示,我们成功扩增到 1 883 bp 的 deltex-1 的 cDNA 片段(图 1A)。*Xba* Ⅰ与 *Kpn* Ⅰ酶切重组质粒 PTA2/deltex-1,电泳显示 2 900 bp 的 PTA2 骨架片段与 1 883 bp 的 deltex-1 目的片段(图 1B)。测序证实,所克隆到的大鼠 deltex-1 基因同 GenBank 库显的完全一致。

2.1.2 酶切鉴定 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒穿梭载体 *Xba* Ⅰ与 *Kpn* Ⅰ酶切载体 pAdTrack-CMV-deltex-1,电泳显示 1 883 bp 的 deltex-1 目的片段与约 9 200 bp 的 pAdTrack-CMV 骨架片段(图 1C)。测序证实,携带 deltex-1 基因的 pAdTrack-CMV-deltex-1 重组原核载体被成功构建。

2.1.3 腺病毒同源重组 穿梭质粒以 *Pme* Ⅰ线性化后,转入 BJ5183 细胞,与 pAdTrack 在胞内发生同源重组,卡那霉素抗性 LB 筛选出可疑阳性重组克隆。*Pac* Ⅰ酶切可疑阳性重组子,可得 4.5 kb 左右片段,说明同源重组正确(图 1D)。

2.2 重组腺病毒的包装和扩增

脂质体包裹 pAdTrack-CMV-deltex-1 同源重组腺病毒基因组质粒转染健康 293 包装细胞 10 d 后,光镜下观察到空斑形成,细胞变圆、肿胀、脱壁,细胞核变大等病变(图 2)。



A:倒置显微镜观察;B:荧光显微镜观察,绿色荧光细胞为重组腺病毒阳性细胞

图 2 显微镜下观察转染 10 d 后的 293 包装细胞 (×100)

2.3 重组腺病毒滴度测定

pAdTrack 重组腺病毒经 293 细胞 5 轮扩增提高滴度,之后大量扩增,采用倍比稀释法测定腺病毒滴度,携 deltex-1 基因的腺病毒载体滴度为:1.23×10^{11} IU/ml。

2.4 大鼠 bMSCs 的分离、培养与扩增

原代分离的大鼠 bMSCs,培养 5 d 后传代,细胞贴壁后长势良好。见图 3。

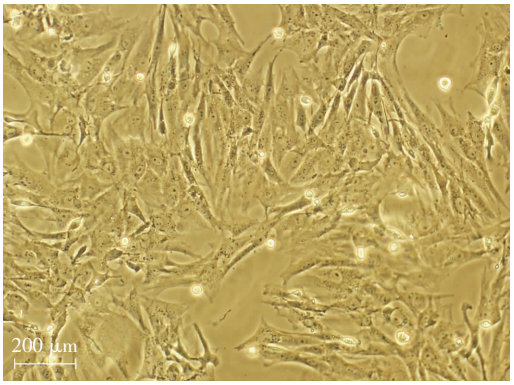


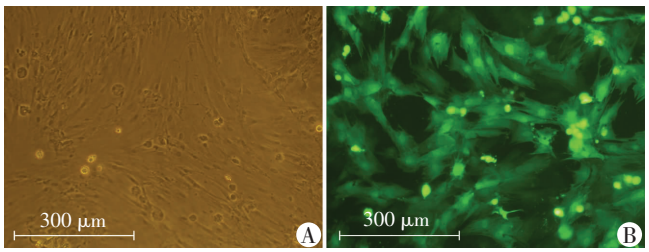
图 3 倒置显微镜观察原代分离的大鼠 bMSCs

2.5 流式细胞术鉴定 bMSCs

大鼠 bMSCs CD90、CD44 阳性表达,分别为 99.57% 和 85.66%,而 CD45 表达阴性,阳性率为 0.35%。

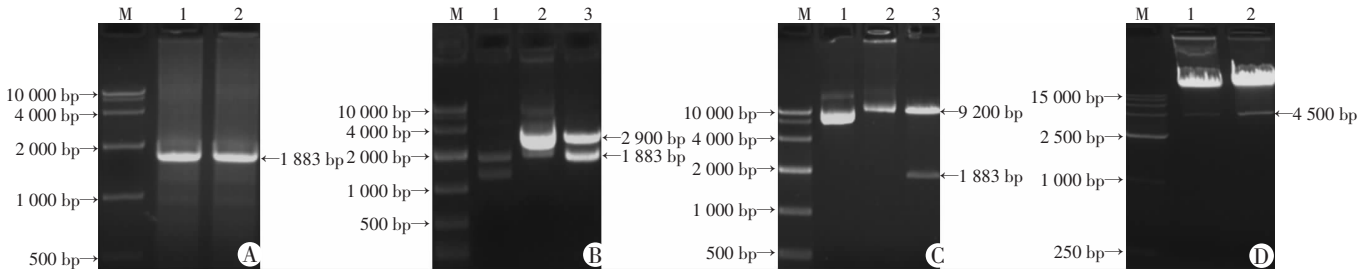
2.6 deltex-1 基因转染效率

图 4 为显微镜下观察到的转染 deltex-1 基因后的骨髓间充质干细胞,转染效率 60% ~ 70%,转染成功。



A:倒置显微镜观察;B:荧光显微镜观察

图 4 显微镜下观察转染 deltex-1 后的 bMSCs

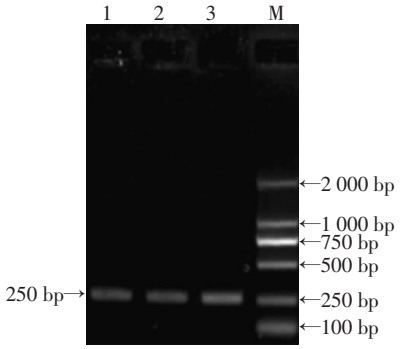


A:deltex-1 基因 PCR 产物的电泳分析 M:DNA 标准(DL 2000);1、2:deltex-1 的 cDNA;B:重组载体 PTA2/deltex-1 酶切分析 M:DNA 标准(DL 10000);1:空质粒;2:重组质粒;3:重组质粒酶切;C:重组载体 pAdTrack-CMV-deltex-1 的酶切分析 M:DNA 标准(DL 10000);1:空质粒;2:重组质粒;3:重组质粒酶切;D:重组质粒 *Pac* Ⅰ酶切鉴定 M:DNA 标准(DL 15000);1、2:重组质粒 *Pac* Ⅰ酶切

图 1 pAdTrack-CMV-deltex-1 同源重组腺病毒的构建

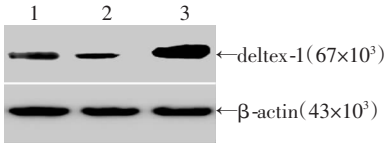
2.7 基因与蛋白水平检测感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 的表达

RT-PCR(图5)与 Western blot(图6)检测结果表明,感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 的表达远强于两对照组。



1:未感染的 bMSCs 内 deltex-1 的 cDNA;2:空载体感染的 bMSCs 内 deltex-1 的 cDNA;3:感染的 bMSCs 内 deltex-1 的 cDNA;M:DNA 标准(DL 2000)

图5 RT-PCR 检测感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 的表达



1:未感染的 bMSCs 内 deltex-1 的蛋白表达;2:空载体感染的 bMSCs 内 deltex-1 的蛋白表达;3:感染的 bMSCs 内 deltex-1 的蛋白表达

图6 Western blot 检测感染 pAdTrack-CMV-deltex-1 腺病毒的 bMSCs 内 deltex-1 蛋白表达

3 讨论

压力性尿失禁是女性常见病,严重影响女性身心健康和生活质量,其主要是由尿道周围平滑肌细胞(smooth muscle cell,SMC)病变或者凋亡所致[7]。近年来,成体干细胞(特别是 MSCs)移植成为再生医学的重要手段[8]。然而目前体外诱导 MSCs 分化产生的平滑肌细胞在数量和功能上均未达到治疗压力性尿失禁的目的。

Notch 家族是由一组高度保守的蛋白质组成,它们具有受体和调节基因转录的功能,可通过细胞内蛋白质之间的相互作用或细胞间信息传递而实现信号的调控。研究表明,Notch 通路的激活可以促进骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化[9-10]。有文献报道,通过转染 Notch 通路胞内段(ICN)等环节增强 Notch 信号[11],从而对 Notch 通路的功能进行进一步研究。deltex-1 作为 Notch 信号通路的下游分子,可增强或者抑制 Notch 信号表达[12]。deltex-1 蛋白在结构上高度保守,它包括 3 个结构域,Domain Ⅰ是 deltex 功能的必须部位,它与 Notch 胞内段 ANK 重复结构结合,从而调节 Notch 信号;Domain Ⅱ为脯氨酸聚集区,它与 SH3 结合,主要调节蛋白与蛋白或者蛋白与脂类之间的相互作用;Domain Ⅲ为 RING-H2,与 deltex 的降解有关。deltex-1 通过与 Notch 胞内段 ANK 重复序列结合,正向调节 Notch 信号,而过表达 deltex 会抑制 Notch 信号的作用。

我们以大鼠肝细胞的总 RNA 为模板,扩增了 deltex-1 基因的全长 cDNA 编码序列,构建了 deltex-1 基因的原核质粒 PTA2/deltex-1 与腺病毒载体 pAdTrack-CMV/deltex-1。通过 RT-PCR、Western blot 检测结果表明,该真核表达载体能够携带 deltex-1 基因并成功转染大鼠 bMSCs。这些结果均提示我们成功构建了 deltex-1 病毒穿梭载体。我们下一步要观察转入 deltex-1 的 bMSCs 向平滑肌细胞分化情况,从而进一步研究其对压力性尿失禁的治疗效果。

参考文献:

[1] Kishi N, Tang Z, Maeda Y, *et al*. Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis[J]. Int J Dev Neurosci, 2001, 19(1): 21-35.

[2] Arias A M. New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality[J]. Trends Genet, 2002, 18(4): 168-170.

[3] Anthony T E, Mason H A, Gridley L, *et al*. Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells[J]. Genes Dev, 2005, 19(9): 1028-1033.

[4] Endo Y, Osumi N, Wakamatsu Y. deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulation of Bmp4 expression in cranial neural crest formation during avian development[J]. Dev Growth Differ, 2003, 45(3): 241-248.

[5] Cui X Y, Hu Q D, Tekaya M, *et al*. NB-3/Notch1 pathway *via* deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(2): 25858-25865.

[6] Park J S, Kim H Y, Kim H W, *et al*. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells[J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(5): 551-559.

[7] Song Y F, Zhang W J, Song J, *et al*. Prevalence and risk factors of urinary incontinence in Fuzhou Chinese women[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(11): 887-892.

[8] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[9] Kurpinski, K, Lam H, Chu J, *et al*. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells[J]. Stem Cells, 2010, 28(4): 734-742.

[10] Tang Y, Urs S, Boucher J, *et al*. Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17556-17563.

[11] Mavrakis K J, Wolfe A L, Oricchio E, *et al*. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(4): 372-379.

[12] Zhang P, Yang Y, Nolo R, *et al*. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness[J]. Oncogene, 2010, 29(20): 2916-2926.

(收稿:2011-02-23;修回:2011-03-21)

(编辑 吴培红)