论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0848-04

TRADD慢病毒载体构建及其对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

袁 月,康秀峰,牟 东,薛世祥,代剑华,彭贵勇 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 构建抗食管支架术后再狭窄携人TRADD基因慢病毒表达载体,并检测其对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响。**方法** 以购买的人TRADD基因为模板,采用PCR法扩增目的基因片段,PCR产物经回收纯化后与线性化的慢病毒表达载体pLVX-EGFP-3FLAG-Puro重组。重组质粒转化DH5α感受态细胞。菌落PCR鉴定转化子,阳性克隆测序无误后,质粒共转染293FT细胞制备慢病毒。Real-time定量PCR法检测病毒滴度。Western blot检测TRADD-GFP-FLAG融合蛋白的表达。MTT法检测TRADD基因慢病毒对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响。**结果** 菌落PCR扩增产物经凝胶电泳,阳性克隆得到1 200 bp片段,基因测序显示重组质粒中TRADD序列与GenBank中序列一致。包装产生的慢病毒转染293 FT细胞48 h后,荧光显微镜下可见大量绿色荧光,病毒滴度为3.22×10^8 IU/ml, Western blot检测到融合蛋白TRADD-GFP-FLAG在293FT细胞中获得有效表达,MTT法证实该融合蛋白具有生物活性,能有效抑制瘢痕成纤维细胞增殖。**结论** 成功构建并包装了pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG-Puro慢病毒表达载体,其可明显抑制增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。

[关键词] TRADD;慢病毒表达载体;食管再狭窄;基因治疗
[中图法分类号] R394-33; R329.28; R364.31 [文献标志码] A

Construction of lentiviral expression vector containing human TRADD gene and its inhibitory effect on proliferation in hyperplastic scar fibroblasts

Yuan Yue, Kang Xiufeng, Mou Dong, Xue Shixiang, Dai Jianhua, Peng Guiyong (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct and identify a lentiviral expression vector containing the human tumor necrosis factor receptor associated death domain protein (TRADD) gene and to determine the effect of the recombinant lentivirus on the proliferation of fibroblasts derived from hypertrophic scars. **Methods** The TRADD specific fragment was amplified by PCR and cloned into the *Eco*R Ⅰ site of the lentiviral vector pLVX-EGFP-3FLAG-Puro. The recombinant plasmid was obtained and transformed into DH5α competent cells, and then identified by PCR using colonies directly as templates. The positive recombinant clones were detected by DNA sequencing analysis. Consequently, recombinant lentiviruses were produced after the 293FT packing cells were co-transfected with pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG-Puro and lentiviral packaging plasmids, while titer of virus was detected by real-time PCR and the expression level of TRADD-GFP-FLag fusion protein was analyzed by Western blotting. MTT assay was used to test the effect of recombinant lentiviruses on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts. **Results** A 1 200-bp strap was obtained from positive clone of colony PCR amplification production after gel electrophoresis, while DNA sequencing confirmed that the positive clone was consistent with that in GenBank. The green fluorescence was observed in 293FT cells under fluorescence microscopy after transfected with recombinat lentiviral vector. Real-time PCR showed the titer of the virus was 3.22×10^8 IU/ml, and Western blotting demonstrated that fusion protein was effectively expressed in 293FT cells. MTT assay indicated that recombinant lentiviruses exerted inhibitory effect on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts. **Conclusion** The recombinant lentiviral vector pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG is constructed successfully, and it has inhibitory effect on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts.

[**Key words**] tumor necrosis factor receptor associated death domain protein; lentiviral vector; restenosis of esophagus; gene therapy

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070384). Corresponding author: Peng Guiyong, Tel: 86-23-68765185, E-mail: pgy63@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81070384)
[通信作者] 彭贵勇,电话:(023)68765185,E-mail: pgy63@163.com

内镜下食管支架置入术是治疗食管狭窄的主要方法,但术后再狭窄,尤其是支架端口部再狭窄已成为支架置入术后最难解决的并发症。再狭窄的病理改变主要为大量肉芽组织增生及纤维化,其生成和成纤维细胞的过度增殖有关,发生与发展和成纤维细胞的凋亡密切相关。成纤维细胞增殖与凋亡的异常直接导致病理性瘢痕的形成,而细胞凋亡最主要的传导通路是死亡受体介导的凋亡传导通路。肿瘤坏死因子受体相关死亡域蛋白(tumor necrosis factor receptor associated death domain protein,TRADD)可通过肿瘤坏死因子-α(TNF-α)介导的信号通路调控细胞的增殖与凋亡。慢病毒(Lentivirus)载体是以人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)为来源的一种病毒载体,在诸多转基因技术中有着不可比拟的优势,近年来成为了理想的基因转移载体[1],已用于体内基因治疗。本实验利用慢病毒载体系统成功构建携带 TRADD 基因的过表达慢病毒,转染至增生性瘢痕成纤维细胞中探索其对细胞增殖的影响,为进一步研究 TRADD 基因的功能及靶向基因治疗食管支架术后再狭窄奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

TRADD 基因模板购自 OPEN 公司,慢病毒表达载体 pLVX-EGFP-3FLAG-Puro 购自上海生博公司, ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix 购自 Invitrogen 公司,DH5α 感受态细胞、293FT 细胞来自本实验室。

1.2 主要试剂

DL2000 DNA 标准、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、*Taq* 聚合酶和 dNTP 购自 TaKaRa 公司,*Eco*R Ⅰ限制性内切酶购自 NEB 公司,BCA Protein Assay kit 购自 HyClone-Perce 公司、Prestained protein marker 购自 Ferments 公司,Rabbit Anti-TRADD 购自 Abcam 公司,Goat Anti-rabbit IgG 购自 Santa Cruz 公司,ECL-plus/kit 购自 Amersham 公司,引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成,阳性克隆测序由华大基因完成。

1.3 TRADD 目的基因获得与慢病毒表达载体构建

以购买的 TRADD 基因为模板,采用 PCR 法扩增目的片段。TRADD 上游:5′-CTCAAGCTTCGAATTCGCCACCATGGCAGCTGGGCAAAATG-3′,含同源重组序列、*Eco*R Ⅰ酶切位点(下划线)、Kozak 序列(双下划线);TRADD 下游:5′-CCATGGTGGCCGAATTCGGCCAGGCCGCCATTGG -3′,含同源重组序列、*Eco*R Ⅰ酶切位点(下划线)。PCR 产物回收纯化后与 *Eco*R Ⅰ酶切线性化的表达载体 pLVX-EGFP-3FLAG-Puro 进行重组连接,37 ℃孵育 15 min,再 50 ℃孵育 15 min,立即转化 DH5α 感受态细胞。最后将已转化的感受态细胞转移至含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37 ℃培养 16 h。

1.4 阳性克隆鉴定

挑取平板上长出的转化子重悬于 10 μl LB 培养液中,从中取 1 μl 做模板进行菌落 PCR 鉴定。阳性克隆鉴定引物:上游:5′-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3′,位于目的基因上游的 CMV 启动子中;下游:5′-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3′,位于多克隆位点的下游序列中。反应体系:Template 1 μl,CMV-F(10 μmol/L)0.8 μl,pEGFP-N-R(10 μmol/L)0.8 μl,dNTP(各 2.5 mmol/L)1.6 μl,10×Buffer(with Mg^{2+})2 μl,*Taq* 酶 0.1 μl,加 dH_2O 至 20 μl。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30 循环;72 ℃ 10 min。接种阳性克隆,保种并分装 100 μl 进行测序。测序验证无误后,接种抽提质粒。

1.5 慢病毒的包装

选择生长状态良好的 293FT 细胞进行包装。取慢病毒表达载体 pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG-Puro 3 μl、virapower packing mix 9 μl 轻柔混合于 1.5 ml 无血清 Opti-MEM Ⅰ中,形成溶液 A;将 36 μl Lipofectamine2000 与 1.5 ml 无血清 Opti-MEM Ⅰ混合形成溶液 B,并室温孵育 5 min;再将溶液 A 和 B 混合,室温孵育 20 min,形成 DNA-Lipofectamine2000 复合物,直接转染 293FT 细胞。转染 48 h 后,收集病毒液。

1.6 滴度测定

用 Real-time 定量 PCR 法检测病毒滴度,引物序列:BAC 上游:5′-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3′, 下游:5′-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3′; GAG 上游引物:5′-GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA-3′, 下游引物:5′-GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC-3′。检测的前 1 d,将长势良好的 293FT 细胞按 1×10^5/孔接种于 24 孔板中,次日分别用 10、1、0.1 μl 病毒原液感染 293FT 细胞。48 h 后,荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光的分布。72 h 后抽提每组细胞基因组 DNA,在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应检测病毒滴度。

1.7 Western blot 检测融合蛋白的表达

收集实验组(转染 PLVX-TRADD-EGFP)、空白对照组(未转染)和空病毒组(转染 PLVX-EGFP)3 组 293FT 细胞,弃去细胞培养液,PBS 洗涤后加入适量预冷的 2×Lysis Buffer,细胞刮刮下细胞,转移入 EP 管中,冰上裂解 10~15 min,超声破碎仪破碎细胞,离心后取上清液。BCA 法测定蛋白浓度后,每个样品蛋白终浓度均调整为 2 μg/μl 。常规蛋白变性、上样电泳、湿转至 PVDF 膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;4 ℃一抗孵育过夜(Rabbit Anti TRADD:1∶200);TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;室温下二抗孵育 PVDF 膜 2 h(Goat Anti rabbit IgG:1∶3 000);TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;最后 ECL-plus/kit 显色、X 线片曝光、显影、定影后进行分析。

1.8 MTT 法检测 TRADD 基因慢病毒对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

将人增生性瘢痕成纤维细胞配成 3.6×10^4/ml 细胞悬液,接种 12 孔板,每孔 1 ml,即 3.6×10^4/孔。根据预实验结果:PLVX-EGFP、PLVX-TRADD-EGFP 感染增生性瘢痕成纤维细胞的效率达到 80%, MOI 应为 100,分别做如下处理:空白对照组(未转染)、空病毒组(转染 PLVX-EGFP)、实验组(转染 PLVX-TRADD-EGFP)。3 d 后,将 3 组细胞分别配成 1.11×10^4/ml 细胞悬液,铺 5 块 96 孔板,每孔 90 μl,即 1.0×10^3/孔,每组设 6 个复孔。490 nm 波长测光密度值[*D*(490)值]。

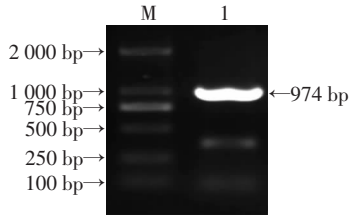
1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,行组间多重比较单因素方差分析。

2 结果

2.1 PCR扩增目的基因

PCR扩增目的基因后,产物经琼脂糖凝胶电泳,可见在750~1 000 bp出现1条特异性阳性条带,大小与预期的974 bp相符(图1)。

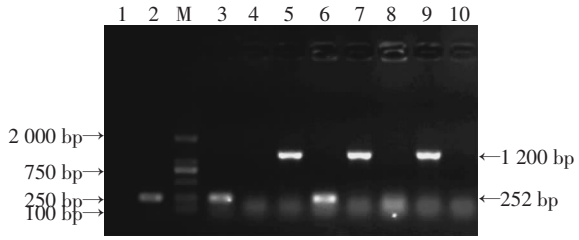


M:标准;1:TRADD

图1 TRADD基因PCR扩增电泳结果

2.2 阳性克隆PCR鉴定

重组质粒转化DH5α感受态细胞,经氨苄抗性培养基筛选后,采用菌落PCR法鉴定,5、7、9泳道可见大小约1 200 bp的阳性克隆条带,2、3、6、8泳道可见大小约252 bp的阴性克隆条带(图2)。阳性克隆送华大基因测序,结果显示重组质粒中插入的序列与GenBank中序列完全一致,说明慢病毒质粒载体构建成功。

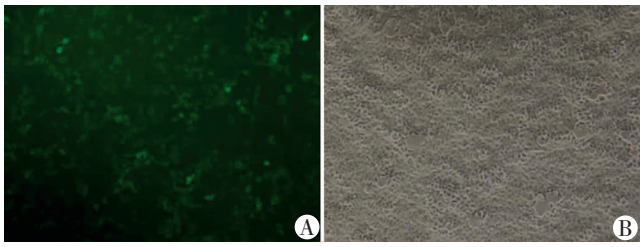


1:ddH_2O;2:pLVX-EGFP-3FLAG-Puro;M:标准;3~10:pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG-Puro

图2 重组质粒菌落PCR鉴定

2.3 慢病毒包装与滴度测定

质粒共转染至293FT包装细胞中,成功包装出慢病毒颗粒。病毒原液感染293FT细胞48 h后,荧光显微镜下可见大量绿色荧光(图3)。感染72 h后抽提每组细胞基因组DNA,Real-time PCR法检测病毒滴度。按病毒滴度公式进行数据分析:(C×N×D×1 000)/V,其中:C=平均每基因组整合的病毒拷贝数,N=感染时细胞的数目(约为2×10^5),D=病毒载体的稀释倍数,V=加入的稀释病毒的体积数(μl)。本次检测出的病毒滴度为3.22×10^8 IU/ml。

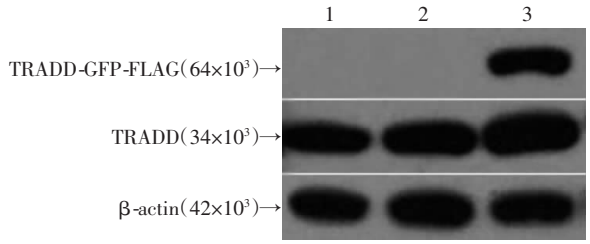


A:荧光显微镜观察;B:光镜观察

图3 慢病毒感染293FT细胞48 h后绿色荧光蛋白的表达 (×100)

2.4 Western blot检测融合蛋白表达

用β-actin作内参,Western blot检测3组293FT细胞样品。目的基因融合GFP与FLAG,共同表达的融合蛋白TRADD-GFP-FLAG理论大小为64×10^3。通过Western blot检测,可以观察到实验组(55~72)$\times10^3$处有阳性条带,其大小与融合蛋白理论值相吻合,空白对照组和空病毒组无阳性条带表达。因此判断TRADD过表达慢病毒在293FT细胞中获得有效表达(图4)。

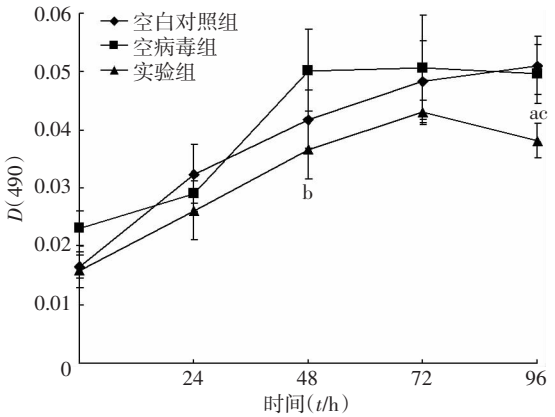


1:空白对照组;2:空病毒组;3:实验组

图4 Western blot检测慢病毒转染293FT细胞后融合蛋白的表达

2.5 MTT检测瘢痕成纤维细胞生长曲线

根据校准后的$D(490)$平均值画出生长曲线(图5)。在48 h检测成纤维细胞$D(490)$值,实验组降低,与空病毒组比较有统计学差异($P<0.05$),与空白对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。在96 h检测$D(490)$值,实验组明显降低,与空白对照组和空病毒组比较均有显著性差异($P<0.01$),同时空病毒组与空白对照组比较无显著性变化($P>0.05$)。



a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与空病毒组比较

图5 MTT检测3组瘢痕成纤维细胞生长曲线

3 讨论

TRADD基因在TNF-α介导的细胞凋亡信号通路中发挥着重要作用。研究表明,TRADD是成纤维细胞膜肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)及TRIF依赖的Toll样受体介导的信号通路中必需的信使分子[2]。人纤维肉瘤细胞中,TNF-α与TNFR1结合后,引起细胞质中TRADD、RIP1、TRAF2三聚体复合物的形成,该三

聚体可直接活化 NF-κB 介导细胞存活。同时，TRADD、RIP1、TRAF2 三聚体也可与 FADD、Caspase-8 结合，引起细胞凋亡[3]。除了在细胞质中发挥作用外，TRADD 还可以直接穿梭到细胞核中激活另外的凋亡通路，包括 PML 和 p53 信号通路[4]。

再狭窄是食管支架术后并发症中棘手的问题。现有的支架安置术后 15～30 d 就出现两端组织增生，而损伤段组织完全修复需要 8～12 周，因此，若 1 个月后取出支架，损伤段食管组织在修复过程中可发生狭窄，若 8～12 周取出支架，此时支架两端组织明显增生，可发生再狭窄[5]。Jeon 等[6]制备了紫杉醇洗脱食管支架用于动物研究，证实紫杉醇洗脱食管支架安置后可明显减少两端组织增生。但药物洗脱支架的疗效与其作用时间长短有明显关系，受药物释放度影响较大。以支架为运载体系将特定基因精确定位转染至局部血管壁，实现外源性基因表达，对血管内再狭窄的基因治疗有良好效果[7]。再狭窄是一个复杂的病理过程，食管支架置入术后，食管黏膜在异物的刺激下，支架上下端口处成纤维细胞活化，过度增殖，肉芽组织增生，并演变为瘢痕组织，最终导致再狭窄的发生。研究表明，瘢痕成纤维细胞不能正常凋亡，同时还能持续产生胶原，是瘢痕组织增生的重要原因[8]。Sayah 等[9]在比较瘢痕疙瘩和正常瘢痕组织中 64 个凋亡相关基因的表达情况时，发现 TRADD 是在瘢痕疙瘩中低表达的 8 个基因之一。丁先超等[10]将 TRADD 基因重组腺病毒转染正常成纤维细胞、增生性瘢痕成纤维细胞与瘢痕疙瘩成纤维细胞，使 3 种细胞中 TRADD 表达均增加，流式细胞术检测细胞凋亡，结果显示：在 TRADD 过表达时，病理性瘢痕成纤维细胞凋亡率明显提高，而正常成纤维细胞凋亡率无明显变化。病理性瘢痕组织成纤维细胞中 TRADD 的低表达，使 TNF-α 介导的细胞凋亡受到明显抑制，这是瘢痕过度增生的重要原因，因此，以食管支架为载体，将 TRADD 基因通过外源基因传递系统整合进宿主细胞基因组中，可促进增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡，减少瘢痕组织的形成，最终有效抑制食管支架术后再狭窄。

基因治疗中，目的基因的靶向性和高效表达是关键。近年来，在各领域基因治疗研究中，构建能同时提供高效的基因转移、长期稳定的基因表达及生物安全性[11-12]的慢病毒转移载体已成为热点。慢病毒介导的 β-Globin 基因进入小鼠的造血干细胞，对治疗 β-地中海贫血有不错的效果[13]。肿瘤基因治疗研究证实，慢病毒载体有着其他病毒载体所不具有的优势[14]。本实验成功构建了 pLVX-TRADD-EGFP-3FLAG-Puro 慢病毒过表达载体。基因测序显示重组质粒中插入的序列与 GenBank 中序列一致，Western blot 检测 TRADD 过表达慢病毒在 293FT 细胞中能获得有效表达，MTT 实验证明融合蛋白 TRADD-GFP-FLAG 的表达能有效抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖，具有生物活性。因此，TRADD 基因慢病毒载体的构建能为后期研究靶向基因治疗食管支架术后再狭窄提供重要的转基因技术平台。

参考文献：

[1] Wiznerowicz M, Trono D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(1): 42-47.

[2] Pobezinskaya Y L, Kim Y S, Choksi S, *et al*. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2008, 9(9): 1047-1054.

[3] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes[J]. Cell, 2003, 114(2): 181-190.

[4] Morgan M, Thorburn J, Pandolfi P P, *et al*. Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis *via* different mechanisms[J]. J Cell Biol, 2002, 157(6): 975-984.

[5] Agrawal D, Habr F G. Removable self-expandable plastic stent to treat postphotodynamic therapy esophageal stricture[J]. Gastrointest Endosc, 2009, 69(4): e27-e30.

[6] Jeon S R, Eun S H, Shim C S, *et al*. Effect of drug-eluting metal stents in benign esophageal stricture: an *in vivo* animal study[J]. Endoscopy, 2009, 41(5): 449-456.

[7] Zhong H S, Matsui O, Xu K, *et al*. Gene transduction into aortic wall using plasmid-loaded cationized gelatin hydrogel-coated polyester stent graft[J]. J Vasc Surg, 2009, 50(6): 1433-1443.

[8] Chen W, Fu X B, Ge S L, *et al*. Development of gene microarray in screening differently expressed genes in keloid and normal-control skin [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(6): 877-881.

[9] Sayah D N, Soo C, Shaw W W, *et al*. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues[J]. J Surg Res, 1999, 87(2): 209-216.

[10] 丁先超，田永静，王丹茹，等. TRADD 基因转染增生性瘢痕与瘢痕疙瘩成纤维细胞并诱导其凋亡的实验研究[J]. 中国美容整形外科杂志，2008，19(6)：427-430.

[11] Cockrell A S, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3): 184-204.

[12] Bauer G, Dao M A, Case S S, *et al*. *In vivo* biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2008, 16(7): 1308-1315.

[13] Li W, Xie S, Guo X, *et al*. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of beta-thalassemia gene therapy[J]. Haematologica, 2008, 93(3): 356-362.

[14] Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, *et al*. Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy [J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1753-1762.

（**收稿**：2012-01-08；**修回**：2012-02-25）

（编辑 王 红）