论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1818-04

大鼠促红细胞生成素重组腺病毒载体的构建及其在大鼠SGNs中的表达

钟 诚,姜振东,张学渊 (400038 重庆,第三军医大学西南医院耳鼻咽喉头颈外科)

[摘要] **目的** 构建大鼠促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)重组腺病毒载体,并转染于体外培养的大鼠螺旋神经元(spiral ganglion neurons, SGNs)。**方法** 全基因合成大鼠EPO基因,亚克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV,构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-EPO。经酶切、PCR及测序鉴定,再经*Pac* Ⅰ酶切线性化后电转化感受态细胞,获得重组腺病毒载体pAdTrack-CMV-EPO,经*Pac* Ⅰ酶切后转染至293细胞进行包装,制备重组腺病毒,扩增后进行病毒滴度测定及RT-PCR和Western blot鉴定。并转染至体外培养的螺旋神经元,免疫荧光检测及蛋白水平检测螺旋神经元中EPO表达。**结果** 经*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切与测序鉴定显示,腺病毒载体pAdTrack-CMV-EPO构建成功,重组腺病毒AdEPO在293细胞中成功包装,扩增后病毒滴度为1.17×10^{11} U/ml;经RT-PCR和Western blot检测EPO在293细胞中成功表达。重组腺病毒载体AdEPO经鉴定均构建正确;免疫荧光及Western blot检测转染腺病毒后螺旋神经元中EPO表达显著增强。**结论** 成功构建了EPO重组腺病毒载体,并成功转染螺旋神经元,可显著增强螺旋神经元中EPO表达水平。

[关键词] 促红细胞生成素;腺病毒;构建
[中图法分类号] R339.16;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Construction and expression of recombinant adenovirus vector of erythropoietin in rat spiral ganglion neurons

Zhong Cheng, Jiang Zhendong, Zhang Xueyuan (Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a recombinant adenovirus vector of rat erythropoietin (EPO) and observe its expression in rat spiral ganglion neurons (SGNs). **Methods** EPO gene fragment was amplified and subcloned into shuttle plasmid pAdTrack-CMV-EPO. The constructed recombinant shuttle plasmid pAdTrack-CMV-EPO was identified by restriction analysis, PCR and sequencing, then linearilized with *Pac* Ⅰ and transformed to competent AdEasy systems. The obtained recombinant adenovirus vector AdEPO was digested with *Pac* Ⅰ and transfected to 293 cells for packaging, and the prepared recombinant adenovirus was amplified for titration and identification by RT-PCR and Western blotting. The vector had been transfected into the cultured SGNs, and EPO expressions were detected by immunofluorescence and Western blot analysis respectively. **Results** After the incision enzymes of *Kpn* Ⅰ, *Hind* Ⅲ and sequencing, pAdTrack-CMV-EPO was accomplished. Recombinant adenovirus AdEPO was successfully packaged in 293 cells with a titer of 1.17×10^{11} IU/ml after amplification, and successfully expressed in 293 cells. Both recombinant shuttle plasmid and recombinant adenovirus vector AdEPO were constructed correctly. EPO level was increased obviously after the virus transfection in SGNs either with immunofluorescence or Western blot assays. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector of EPO is successfully constructed and significantly enhances the EPO levels after its transfection into SGNs.

[**Key words**] erythropoietin; adenovirus; construction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81100720). Corresponding author: Zhang Xueyuan, Tel:86-23-68754405, E-mail: yingsc@public.ctq.cq.cn

促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)既往认为是一种经典的促造血因子。近年来,已有研究证实其除了调节造血功能外,可能在中枢神经系统等具有神经保护作用[1],在内外环境因素导致的细胞反应中启动保护应答。而EPO在大鼠内耳螺旋神经元(spiral

[基金项目] 国家自然科学基金(81100720)
[通信作者] 张学渊,电话:(023)68754405,E-mail:yingsc@public.ctq.cq.cn

ganglion neurons, SGNs)、兴奋毒损伤中是否具有保护作用则鲜见报道。本实验拟构建大鼠 EPO 腺病毒载体,并将其转染于体外培养的螺旋神经元细胞中,观察其对 EPO 表达水平的影响,为进一步研究 EPO 的内耳神经保护机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞及试验动物

载体 pAdTrack 腺病毒系统购自 Invitrogen 公司,大肠埃希菌 DH5α 购自北京天根公司,293T 细胞购自美国 ATCC 公司。出生 1~3 d 健康 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 20~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 药品及试剂

KOD-plus 高保真酶,限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*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。RNAnase A 购自 Sigma 公司。Maker D2000、Maker D15000 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。胰蛋白酶、胶原酶等购自 Sigma 公司,DMEM 培养基、胎牛血清等购自 HyClone 公司,神经元特异性烯醇化酶抗体购自博士德公司。EPO 一抗购自 SANTA CRUZ 公司。

1.3 腺病毒载体构建

1.3.1 pAdTrack-CMV-EPO 重组质粒构建与鉴定 全基因合成大鼠 EPO 基因。回收酶切产物及骨架片段。重组产物转化感受态,提取重组质粒并采用 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切。所构建的重组质粒被命名为 pAdTrack-CMV-EPO。

1.3.2 重组腺病毒的包装及扩增 293 细胞消化计数后铺 6 孔板,*Pac* Ⅰ酶切重组质粒制备线性化的 DNA 并回收。使每孔内细胞数达到(7~8)×10^5,重组腺病毒载体转染 293 细胞,48 h 后,收取细胞及上清,为第 1 代病毒。反复冻融、振荡 3 次,离心得到第 2 代。重复上步至第 5 代便可得到较纯的病毒。

1.3.3 重组腺病毒载体的纯化与滴度测定 以氯化铯($CsCl_2$)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 = 最后一孔荧光细胞数)。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。

1.3.4 PCR 法扩增 EPO 基因 用 EPO 基因引物以感染 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒的 293 总 RNA 为模板扩增 EPO 基因的 cDNA 序列,未感染与空载体(pAdTrack-CMV)感染的 293 总 RNA 为模板扩增 EPO 基因的 cDNA 序列作对照,以此检测感染 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒的表达情况。

1.3.5 Western blot 鉴定 检测感染 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒的 293 内 EPO 表达情况。转染 36 h 后,提取感染 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒的 293 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 EPO 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。

1.4 大鼠螺旋神经元培养及鉴定

出生 1~3d 的 SD 大鼠断头处死,于 10× 解剖显微镜下取出耳蜗、去除蜗壳、螺旋韧带及基底膜,仅保留含有螺旋神经元的 Rosenthal' s 管。参考 Lefebvre[2] 方法,将螺旋神经元用 Hanks 洗涤 3 次后,置于 0.1% 胶原酶、0.1% 胰蛋白酶、0.01% DNase Ⅰ 37 ℃消化 25 min,加入含 10% 胎牛血清的培养基终止消化,1 000 r/min 离心 7~10 min,去上清,加入 DMEM/F12 培养基(含 10% 胎牛血清),按 1×10^5/ml 密度接种培养。37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后,待细胞完全贴壁,换用含5 μmol/L 阿糖胞苷(arabinosyl cytosine,Ara-C)、2% B27 无血清 DMEM/F12 培养液继续培养。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况,判断细胞活力。培养 48 h 后用兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶抗体(NSE)为一抗,进行神经元的免疫荧光细胞化学方法鉴定。

1.5 腺病毒对螺旋神经元中 EPO 的影响

1.5.1 免疫荧光细胞化学法检测腺病毒感染后 EPO 在螺旋神经元的表达 转染前细胞培养 48 h,吸出培养基,用无血清无抗生素 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次并稀释病毒液,混匀置于 37 ℃孵箱中孵育 24 h,免疫荧光检测:去培养基,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗涤,10% 正常羊血清室温孵育 15 min,加适量羊抗大鼠 EPO,4 ℃过夜。罗丹明标记山羊抗兔 IgG 抗体,37 ℃培养箱静置 30 min。通过倒置荧光显微镜观察 EPO 表达。

1.5.2 Western blot 测定 EPO 蛋白含量的变化 体外培养 48 h 的螺旋神经元转染腺病毒 48 h 后,提取 SGNs 中总蛋白并电泳转膜检测含量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件,对 Western blot 蛋白表达水平行方差分析。

2 结果

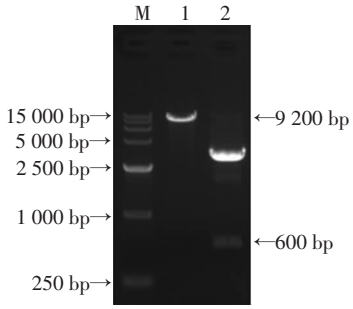
2.1 酶切 pAdtrack-CMV 载体及全基因合成基因 PUC57-EPO

EPO 目的片段合成并经测序证实成功。将 EPO 亚克隆至 Adtrack 载体。以 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ内切酶对骨架 Adtrack、目的基因双酶切。酶切产物电泳,胶回收后,取目的条带测定(图 1)。

2.2 酶切鉴定 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒穿梭载体

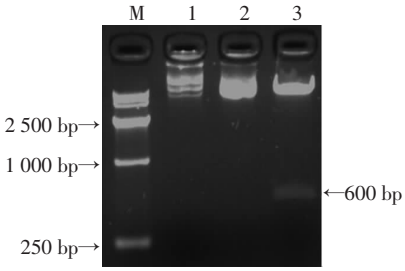
用限制性内切酶(*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ)切割以 PUC57/EPO 质粒和 pAdTrack-CMV 腺病毒载体,回收含 EPO 片段和 pAdTrack-CMV 载体骨架片段,纯化后连接,菌液 PCR 和限制性内切酶对重组子行初步鉴定,可疑阳性重组子送测序,测序正确者被命名为 pAdTrack-CMV-EPO。酶切(*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切)与测序鉴

定显示,腺病毒载体 pAdTrack-CMV-EPO 构建成功(图2)。



M:DL 15 000 标准;1:Ad-track 酶切产物;2: PUC57-EPO 酶切产物

图1 大鼠 EPO 基因 PCR 扩增产物电泳结果

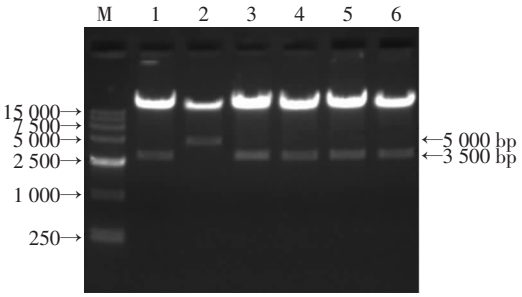


M:DL 15 000 标准;1:Adtrack 空载体;2:Adtrack-EPO 载体;3:Adtrack-EPO 酶切产物

图2 重组载体 pAdTrack-CMV-EPO 的酶切鉴定

2.3 重组 BJ5183-pAdTrack-CMV-EPO 的鉴定

重组 BJ5183-pAdTrack-CMV-EPO 经 *Pac* Ⅰ酶切可见释放4.5、3.0 kb 左右片段,证明重组成功(图3)。

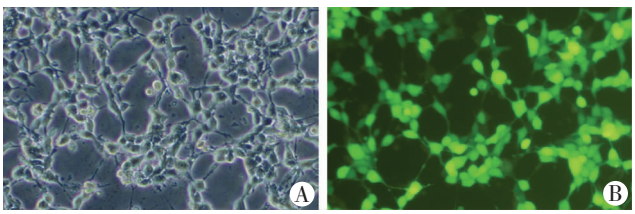


M:DL 15 000 标准;1~6:BJ5183-EPO 质粒酶切

图3 重组 BJ5183-pAdTrack-CMV-EPO 的鉴定

2.4 重组腺病毒的包装和扩增

脂质体包裹 pAdTrack-CMV-EPO 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4)。



A:倒置显微镜观察(×100);B:荧光显微镜观察(×200)

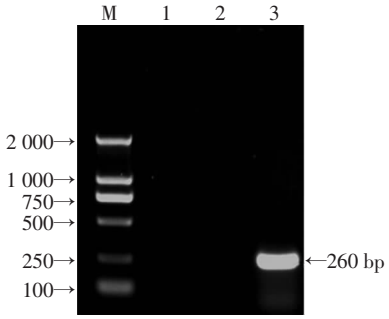
图4 重组腺病毒 pAdTrack-CMV-EPO 转染 293 细胞

2.5 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 1.17×10^{11} U/ml。

2.6 RT-PCR 法检测感染 AdEPO 腺病毒的 293 内 EPO mRNA 表达

RT-PCR 检测293细胞病毒感染后 mRNA 表达水平提示感染 pAdTrack-CMV-EPO 腺病毒的293细胞内 EPO 表达水平高,正常293细胞及空载体感染对照组无表达(图5)。

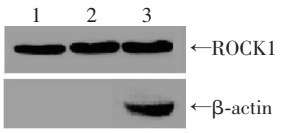


M:DL 2000 标准;1:正常细胞;2:空载体;3:EPO 病毒感染

图5 RT-PCR 检测感染 AdEPO 腺病毒的293细胞内 EPO mRNA 表达

2.7 Western blot 检测感染 AdEPO 腺病毒的 293 内 EPO 的表达

基因与蛋白水平检测结果表明,感染 AdEPO 腺病毒的293内 EPO 的表达很强(1.987±0.023),对照组为空载体转染无表达(0.062±0.001)(图6)。



1:正常293细胞;2:空载体;3:EPO 病毒感染

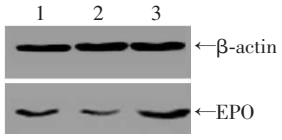
图6 Western blot 检测 AdEPO 感染293细胞 EPO 蛋白的表达

2.8 腺病毒转染螺旋神经元前后 EPO 蛋白表达

腺病毒转染螺旋神经元后,Western blot 结果显示蛋白的表达明显升高(2.103±0.003),与空载体感染对照组(0.272±0.002)比较显著升高($P<0.01$)(图7)。

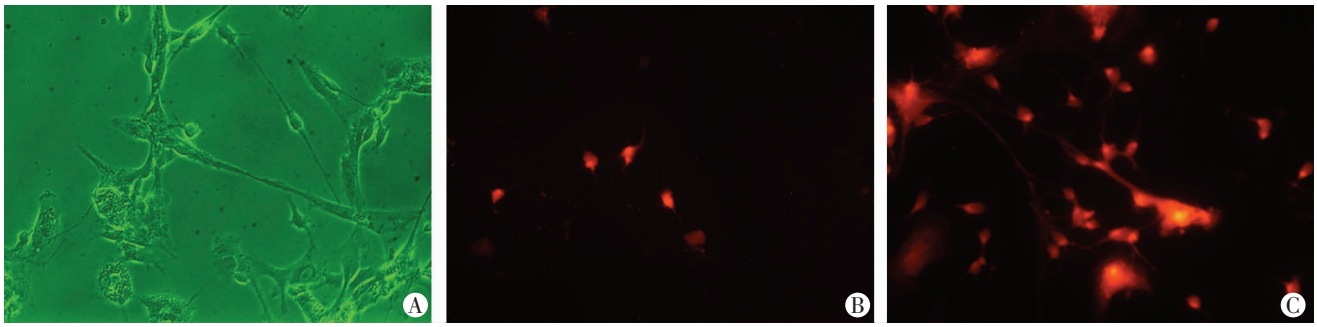
2.9 腺病毒转染大鼠螺旋神经元前后 EPO 表达

培养48 h后的螺旋神经元呈典型的双极形态(图8A),免疫荧光检测 EPO 在螺旋神经元中表达(图8B),转染腺病毒后 EPO 表达显著增强(图8C)。



1:正常螺旋神经元;2:空载体感染的螺旋神经元;3:腺病毒感染后的螺旋神经元

图7 Western blot 检测腺病毒感染螺旋神经元 EPO 蛋白表达



A:体外培养 48 h 的螺旋神经元(倒置显微镜×100);B:正常培养的 SGNs 中 EPO 表达(荧光显微镜×200);C:转染腺病毒后 SGNs 中 EPO 表达明显增强(荧光显微镜×200)

图 8 腺病毒转染大鼠螺旋神经元 EPO 表达

3 讨论

内耳螺旋神经元(spiral ganglion neurons,SGNs)的损伤对感音神经性聋的发生具有重要意义,兴奋毒损伤是可能因素之一[3]。有效的神经保护可能缓解这种损害。促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是一种相对分子质量约 34×10^3 的糖蛋白,主要来自肾脏,最初研究[4]发现认为其为主要的造血调节因子,通过作用于红细胞前体细胞而发挥作用。EPO 在多种组织中有表达,分布在多种细胞,在脑、脊髓、视网膜等的神经保护作用已有文献报道[1],近年来 EPO 神经保护功能成为研究热点[5]。推测 EPO 与其功能性受体结合,拮抗兴奋性中毒等多种效应发挥作用[6]。但其是否在内耳有神经保护作用则未有详细探讨[7]。

大鼠 EPO 的核苷酸序列与人 EPO 的同源性约 79%,有作者研究其 cDNA 包含 5′-非翻译区 22 个核苷酸,终止密码子与多聚腺苷化区域之间的 780 个核苷酸[8]。研究提示 EPO 可能是通过参与 MAPK、PI3K/Akt 等多条信号通路发挥神经保护效应[9-10]。重组腺病毒是复制缺陷型的腺病毒载体,是基因治疗、免疫治疗及基础生物学研究的有力工具[11-12]。作为基因传递的载体,腺病毒具有许多优点,如:易制备高滴度腺病毒;携带基因表达水平高;感染的宿主细胞和组织范围广,包括非分裂细胞[13]。本实验成功构建了携带大鼠 EPO 基因的腺病毒载体 Ad-EPO,经测定其序列正确,酶切、RT-PCR 及 Western blot 等鉴定正确,病毒滴度高。同时,将其成功转染于体外培养的大鼠螺旋神经元,经免疫荧光及 Western blot 检测,在转染腺病毒后螺旋神经元中 EPO 表达水平显著增强。为进一步研究 EPO 对螺旋神经元损伤保护作用及其分子机制奠定了良好基础。

参考文献:

[1] Jin W, Kong J, Lu T, *et al*. Erythropoietin prevents secondary brain injury induced by cortical lesion in mice: possible involvement of Nrf2 signaling pathway[J]. Ann Clin Lab Sci, 2011, 41(1): 25-32.

[2] Lefebvre P P, Van-de-Water T R, Weber T, *et al*. Growth factor interactions in cultures of dissociated adult acoustic ganglia: neuronotrophic effects[J]. Brain Res, 1991, 567(2): 306-312.

[3] Steinbach S, Lutz J. Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(1): 14-19.

[4] Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function[J]. Physiol Rev, 1992, 72(2): 449-489.

[5] Subiros N, Del-Barco D G, Coro-Antich R M. Erythropoietin: still on the neuroprotection road[J]. Ther Adv Neurol Disord, 2012, 5(3): 161-173.

[6] Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, *et al*. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(10): 1291-1303.

[7] Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, *et al*. Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti[J]. Neurosci Lett, 2006, 396(2): 86-90.

[8] Nagao M, Suga H, Okano M, *et al*. Nucleotide sequence of rat erythropoietin[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1171(1): 99-102.

[9] Dreixler J C, Sampat A, Shaikh A R, *et al*. Protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase p38alpha in retinal ischemic postconditioning[J]. J Mol Neurosci, 2011, 45(2): 309-320.

[10] Ma R, Xiong N, Huang C, *et al*. Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Neuropharmacology, 2009, 56(6/7): 1027-1034.

[11] Enomoto T, Furuya Y, Tomimori Y, *et al*. Establishment of a new murine model of hypercalcemia with anorexia by overexpression of soluble receptor activator of NF-κB ligand using an adenovirus vector[J]. J Bone Miner Metab, 2011, 29(4): 414-421.

[12] 王荥, 王延洲, 徐惠成. deltex-1 腺病毒载体的构建及其在大鼠 bMSCs 中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(15): 1555-1558.

[13] Gilson T, Greer A E, Vindigni A, *et al*. The alpha2 helix in the DNA ligase Ⅳ BRCT-1 domain is required for targeted degradation of ligase Ⅳ during adenovirus infection[J]. Virology, 2012, 428(2): 128-135.

(**收稿**:2012-03-31;**修回**:2012-05-04)

(编辑 张 维)