文章编号:1000-5404(2013)04-0297-05

论著

构建人三叶因子3腺病毒载体对胆管上皮细胞迁移的调控作用

田 驹,程 哲,郑树国 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 构建含有人三叶因子3(trefoil factor family 3, TFF3)基因的腺病毒载体,并观察其对胆管上皮细胞迁移的调控作用。**方法** 利用PCR技术对目的基因TFF3全长进行扩增,测序后亚克隆至腺病毒穿梭质粒构建载体pAdTrack-CMV-TFF3,转化至含腺病毒骨架质粒pAd-Easy的大肠杆菌株BJ5183感受态细胞中进行同源重组,筛选重组子并经内切酶*Pac* Ⅰ线性化,转染293细胞进行病毒包装及扩增,并进行滴度测定。构建的TFF3腺病毒载体感染人胆管上皮细胞后用RT-PCR及Western blot检测目的基因表达水平,并进行划痕实验观察细胞迁移能力的变化。**结果** 成功扩增了大小约为458 bp的人TFF3基因,测序报告显示目的基因序列与NCBI报道一致;成功构建了TFF3的同源重组腺病毒穿梭载体,经293细胞包装及扩增的病毒滴度为1.3×10^9 CPU/mL。RT-PCR及Western blot结果显示转染人胆管上皮细胞后其TFF3表达明显增强,细胞迁移能力也明显高于对照组。**结论** 成功构建含TFF3基因的腺病毒载体,为进一步研究TFF3在胆管上皮损伤修复中的作用奠定了基础。

[关键词] TFF3基因; 腺病毒载体;重组;损伤修复;细胞迁移
[中图法分类号] R322.48;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Recombinant adenovirus containing human TFF3 gene regulates migration in human biliary epithelial cells

Tian Ju, Cheng Zhe, Zheng Shuguo (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To construct a recombinant adenovirus vector of human trefoil factor family 3 (TFF3) and to determine its effect on the migration in human biliary epithelial cells. Methods The genomic fragment of target gene TFF3 was amplified with PCR with genomic DNA of liver cancer tissue as template. The obtained product was subcloned into adenovirus shuttle plasmid to construct vector pAdTrack-CMV-TFF3 after sequencing. Homologous recombination was performed by transfering the vector to *E. coli* BJ5183 containing the backbone pAd-Easy. The correct recombinant pAdEasy-TFF3 was selected and linearized with *Pac* Ⅰ, then transfected into 293 cells for packaging and amplification. The titration of the recombinant adenovirus was determined. RT-PCR and Western blotting were used to determine the expression of TFF3 at mRNA and protein levels in human biliary epithelial cells after transfection. Finally, cell scratch test was performed to observe the effect on cell migration before and after transfection. Results The target fragment of TFF3 with 458 bp was successfully amplified, which was completely the same as the sequence published GenBank by DNA sequencing. The TFF3 homologous recombination adenovirus vector was successfully constructed with a titer of 1.3×10^9CPU/mL. RT-PCR and Western blotting indicated significant increased expression of TFF3 at mRNA and protein levels in human biliary epithelial cells after transfection. Cell scratch test showed that cell migration was obviously activated and enhanced after transfection. Conclusion Recombinant adenovirus vector containing TFF3 gene is successfully constructed, which provides a satisfactory transduction vector to research the role of TFF3 in human biliary epithelium wound healing.

[**Key words**] trefoil factor family 3; adenovirus vector; recombination; wound healing; cell migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972948). Correspondence author: Zheng Shuguo, Tel: 86-23-68752193, E-mail: Shuguozh@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30972948)
[通信作者] 郑树国,电话:(023)68752193. E-mail:shuguozh@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.0838.001.html(2013-01-25)

三叶因子3(trefoil factor family 3,TFF3)属三叶肽家族成员之一,其单聚体相对分子质量为6.7×10^3。编码人TFF3的基因位于21号染色体长臂21q22.3区,其cDNA全长为222 bp,共编码73个氨基酸,前14个为信号肽,后59个为成熟氨基酸。生理状态下,TFF3主要高表达于大肠、小肠及胃窦黏膜和食管黏膜下腺,在哺乳动物胃肠道上皮黏膜防御、修复、再生等过程中发挥重要作用[1-2]。研究[3-4]报道TFF3在胆管上皮细胞(biliary epithelial cell,BEC)中也有表达,可能通过促进BEC迁移参与了胆管上皮的损伤修复。目前TFF3在胆道疾病中的研究尚不多见,其在胆管上皮损伤修复中的作用及机制尚待进一步探讨。本研究拟构建TFF3基因的穿梭载体,并采用细菌内同源重组技术构建含有TFF3基因的重组腺病毒,为进一步研究TFF3在胆道上皮损伤修复中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞载体及主要试剂

293T细胞由金麦公司单佑安博士惠赠,大肠埃希菌DH5α购自北京天根公司,人胆管上皮细胞(5100,ScienCell)由本实验室保存,pAdTrack腺病毒系统购自Invitrogen公司,DMEM培养基购自HyClone公司,Trizol胎牛血清购自GibcoBRL公司,限制性内切酶(*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ)、T_4 DNA连接酶、KOD-plus高保真酶、ReverTre Ace-a-逆转录试剂盒均购自TOYOBO公司,RNase A购自Sigma公司,普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、Marker DL2000、Marker-DL 15000均购自北京天根公司。Lipofectamin2000购自Invitrogen公司。*Taq*酶、dNTP购自TaKaRa公司。Anti-TFF3购自SANTA CRUZ公司。

1.2 TFF3重组质粒的构建

以肝癌组织总为模板,Trizol法提取总RNA,反转录成cDNA。自行设计引物(选用T载体上*Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ酶切位点,上游序列:5′-CCCAAGCAAACAATCCAGAGC-3′,下游序列:5′-GGGAGCAAAGGGACAGAAAAGC-3′)并扩增TFF3基因,PCR反应条件为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s共35个循环,再72 ℃延伸10 min。扩增产物经聚腺苷加尾反应(A-Tailing),酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳证实后进行胶回收。回收的目的条带连接载体PTA2(16 ℃ 4 h),转化氨苄抗性的DH5α感受态细胞,采用菌液PCR法对重组子进行初步鉴定,抽提可疑阳性重组子的质粒进行测序,测序正确者命名为PTA2-TFF3。

1.3 pAdTrack-CMV-TFF3穿梭质粒的构建

重组质粒PTA2-TFF3及穿梭质粒pAdTrack-CMV经*Xba*Ⅰ、*Eco*R Ⅴ双酶切后进行1%琼脂糖凝胶电泳,回收含TFF3的cDNA片段和pAdTrack-CMV载体骨架片段,纯化后用T_4 DNA连接酶连接(16 ℃ 6 h),转化DH5α感受态细胞,挑取卡那抗性菌落抽提质粒,并进行测序和酶切鉴定。

1.4 腺病毒同源重组穿梭质粒的构建

鉴定正确的质粒pAdTrack-CMV-TFF3经*Pme* Ⅰ线性化后(37 ℃ 16 h),转入BJ5183感受态细胞,与pAd-Easy在胞内同源重组,用卡那霉素、氨苄西林、链霉素抗性LB平板筛选。16 h后挑取菌落,抽提其质粒,*Pac* Ⅰ酶切鉴定可疑阳性重组子。重组病毒质粒转化DH5α感受态细菌,获得高拷贝数的质粒备用。

1.5 重组腺病毒的包装及扩增

Pac Ⅰ酶切重组质粒,用Lipofectamin 2000将线性化的重组质粒转染至70%~80%的293细胞,培养6~8 h更换1%的DMEM(含10%胎牛血清),24 h后可观察到荧光。72 h后当细胞出现特异的荧光以及明显的细胞病理征,90%细胞浮起时收取细胞,为第1代病毒。在-80~37 ℃条件下反复快速冻融及振荡3次,离心得到第2代病毒。重复上述步骤将重组腺病毒在293细胞中反复扩增3轮后纯化,即得到高滴度的腺病毒pAdEasy-TFF3,-80 ℃保存备用。

1.6 重组腺病毒载体的滴度测定

通过绿色荧光蛋白阳性细胞计数法(GFP法)进行滴度测定。将293细胞稀释至1×10^5/mL并接种于96孔板中,培养24 h使细胞生长达90%融合;用DMEM高糖培养基将待测病毒液分别稀释为10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}倍。每孔设置3复孔,吸去96孔板内的培养基,分别加入100 μL不同稀释倍数的病毒液,培养48 h后于倒置荧光显微镜下观察荧光细胞数,计算公式如下:

$$\text{滴度(CPU/mL)}=\frac{\text{GFP阳性细胞数}\times\text{病毒液稀释倍数}}{\text{加入病毒液体积}}$$

1.7 pAdEasy-TFF3转染人BECs及鉴定

1.7.1 TFF3基因转染人BECs 将人胆管上皮细胞接种至6孔板,细胞密度为2×10^5/孔,培养24 h,待细胞完全贴壁生长至60%~80%融合时,分别以感染复数(multiplicity of infection,MOI)为30、50、80的重组腺病毒感染人BECs,感染2 h后更换完全培养基继续培养48 h,于倒置荧光显微镜下观察荧光细胞计数检测重组腺病毒载体感染人BECs的效率,每组设3个孔重复。

1.7.2 RT-PCR及Western blot检测转染后人BECs中的TFF3表达 转染24 h后提取BECs总RNA作为模板,引物及反应条件同1.2;转染48 h后提取BECs总蛋白,测定浓度后电泳,转膜1 h,滴加TFF3兔多抗(1∶250),4 ℃孵育过夜,加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1∶1 000),室温孵育2 h后,与化学发光底物结合10 min,拍照存图。分别设置未转染及转染空载体的BECs作为对照,β-actin为内参。

1.8 BECs划痕实验

以MOI值为80的TFF3腺病毒感染接种至6孔板的人BECs(2.5×10^5/孔),培养24 h后用1 mL移液器枪头在孔内划痕,划痕前2 h加入1 μg/mL丝裂霉素C抑制细胞增殖,镜下观察确保每孔内划痕宽度一致,在37 ℃含10% FBS的完全培养基中培养,以12 h后的损伤缘细胞迁移的平均线性速度来定量细胞的,分别设置未转染及转染空载体的BECs为对照。

1.9 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较选用独立样本t检验。

2 结果

2.1 pAdTrack-CMV-TFF3 同重组腺病毒的构建

从人肝癌组织中扩增出大小 458 bp 的目的基因条带(图 1A),经测序显示,所获得基因序列与 GenBank 报道的 TFF3 基因序列完全一致;穿梭质粒 pAdTrack-CMV-TFF3 经 *Xba* Ⅰ、*Eco*RⅤ双酶切,电泳显示大小为 458 bp 的 TFF3 基因片段与约 9 200 bp 的 pAdTrack-CMV 骨架片段(图 1B),证实穿梭质粒构建成功;经 *Pme* Ⅰ酶线性化后的穿梭质粒在 BJ5183 细胞中与 pAd-Easy 发生胞内同源重组后,*Pac* Ⅰ酶切可疑阳性重组子,获得 3 000 bp 或 4 500 bp 左右片段,证明同源重组正确(图 1C)。

2.2 重组腺病毒滴度测定

携带 GFP 的 pAdEasy-TFF3 腺病毒转染 293 细胞,48、72 h 后于镜下即可观察到 293 细胞出现明显的细胞病理征及荧光表达(图 2A、B)。在稀释倍数为 10^{-1} ~ 10^{-5} 各孔的细胞荧光表达强,10^{-6} ~ 10^{-8} 孔内细胞荧光表达随着稀释度的增大逐渐减弱,10^{-9} ~ 10^{-10} 孔内无明显荧光表达。因此选择稀释度为 10^{-7} 孔计算,算得滴度为 1.3×10^{9} CPU/mL。

2.3 TTF3 腺病毒感染人 BECs

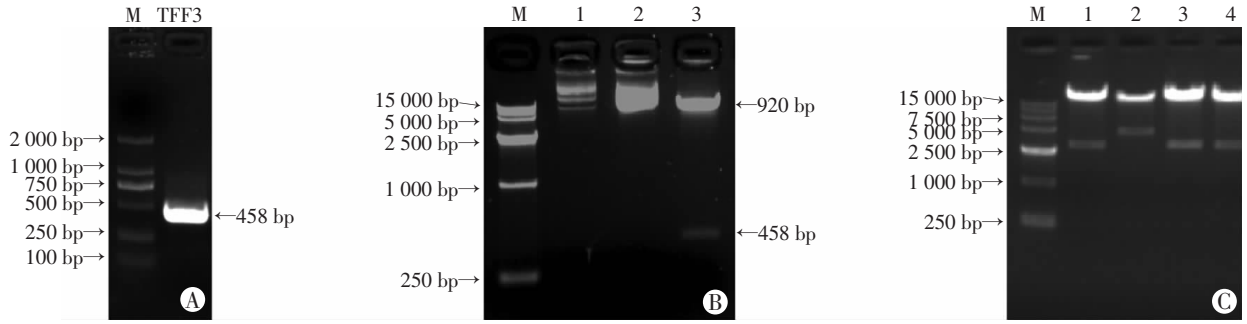
分别以 MOI 值为 30、50、80 的重组腺病毒感染人 BECs,感染效率为 MOI 值为 80 最佳,约 90%(图 2C ~ F),其余次之。感染后细胞形态规则,结构清晰,胞核完整,未出现细胞自溶、漂浮现象,说明 MOI 值为 80 的腺病毒进行后续实验。

2.4 RT-PCR 及 Western blot 检测转染后人 BECs 中的 TFF3 表达

以 MOI 值 80 的腺病毒转染人 BECs 后,RT-PCR(图 3A)及 Western blot(图 3B)显示 BECs 内 TFF3 的表达明显强于对照组,说明转染成功。

2.5 BECs 细胞划痕实验

划痕 12 h 后,光镜下观察转染 TFF3 腺病毒载体的人 BECs 损伤缘较正常细胞及转染空载体的 BECs 明显变窄(图 4);划痕 12 h 3 组细胞的迁移速度分别为:TIF3 腺病毒组(35.2 ± 5.7) μm/h,未感染组(8.1 ± 2.6) μm/h,感染空载体组(18.2 ± 4.8) μm/h。转染 TFF3 腺病毒载体的人 BECs 迁移能力明显强于其他两组($P < 0.05$)。



A:PCR 扩增出 TFF3 目的条带;B:双酶切鉴定穿梭质粒 pAdTrack-CMV-TFF3 M:标准 DL15000;1:空载体;2:重组载体;3:酶切重组载体;C:酶切鉴定重组载体 pADEasy-TTF3 M:标准 DL15000;1 -4:酶切重组子

图 1 PCR 产物电泳及重组质粒的酶切鉴定结果

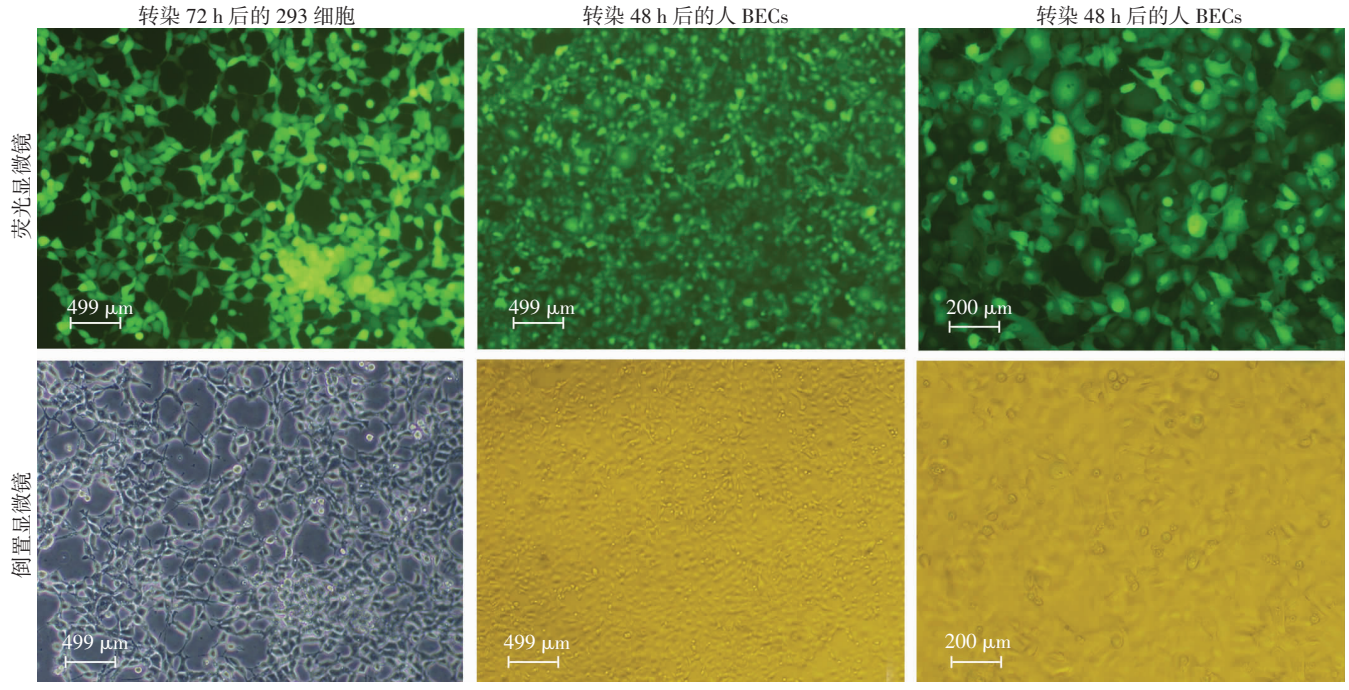
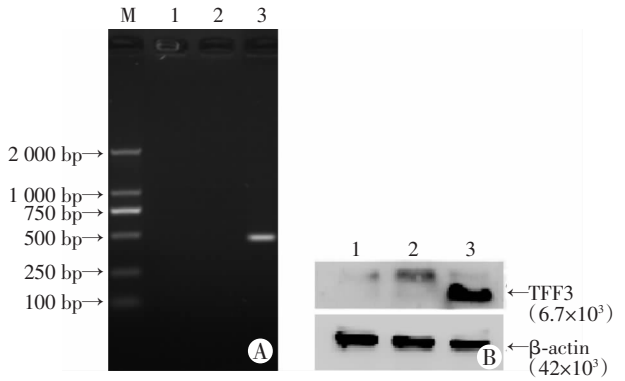


图 2 TIF3 腺病毒转染 293 细胞及人胆管上皮细胞后形态学观察



A:RT-PCR 检测 mRNA 表达 1:未感染组;2:感染空载体组;3:感染腺病毒组;M:标准 DL2000;B:Western blot 检测蛋白表达 1:未感染组;2:感染空载体组;3:感染腺病毒组

图3 RT-PCR 与 Western blot 检测转染后人胆管上皮细胞中的 TFF3 表达

3 讨论

哺乳动物的三叶肽包括:TFF1(乳腺癌相关肽,pS2)、TFF2(解痉多肽,SP)和 TFF3(肠三叶因子,ITF)。三叶肽家族成员结构上共有至少1个或多个类似三叶草的结构域(又称 P 结构域),具备耐热、耐酶消化的理化特性[5]。生理状态下,三叶肽家族成员主要分布于胃肠道,而在病理状态下,该家族成员可出现异位表达,其作用与黏膜修复和再生有关[2,6-7]。自 Srivatsa 等[8]发现 TFF3 在患者病变胆管中的表达明显增强后,针对 TFF3 在胆道疾病中的研究逐渐得到重视,研究[9-10]报道在诸如原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化、肝胆管结石等疾病中,TFF3 主要表达于肝内及肝门部大胆管的上皮细胞和管周腺体中,并参与了疾病状态下胆管上皮的损伤修复。更深入的研究发现在损伤因子可激活胆管上皮细胞中 IL-6/STAT3 信号通路,TFF3 作为此通路的下游效应因子,主要通过促进上皮细胞移行从而参与上皮损伤修复的过程,除了参与上皮损伤修复外,TFF3 与肝胆系统肿瘤的发生、发展及预后也可能有一定关系。目前 TFF3 的生物学效应及其结合蛋白未明确,其细胞内作用机制、具体信号转导途径的相关研究尚处于起始阶段。故本研究通过构建含 TFF3 基因的第4代腺病毒载体,感染人胆管上皮细胞,使其高表达 TFF3 基因,从而深入研究 TFF3 在胆管上皮损伤修复中的作用及机制。

在众多的病毒载体中,腺病毒具有以下特点:①基因包装容量较大,并能同时表达多个基因;②可感染分裂期/非分裂期的多种细胞和组织,感染效率高;③可悬浮培养,增殖速度快,病毒滴度高;④可瞬时高效表达重组蛋白,生物活性高;⑤病毒在体外稳定,易于构建和操作,贮备方便,宿主范围广。目前,腺病毒载体已被广泛应用于体外基因转导、基因工程疫苗和体内基因治疗等各个领域[11-14]。相对传统腺病毒载体的同源重组,本研究采用的 Ad-Easy 载体系统极大简化了构建过程,明显提高了重组效率,获得了滴度较高的重组腺病毒载体,且避免了产生野生型腺病毒的可能;其穿梭载体 pAdTrack-CMV 携带有绿色荧光蛋白,在

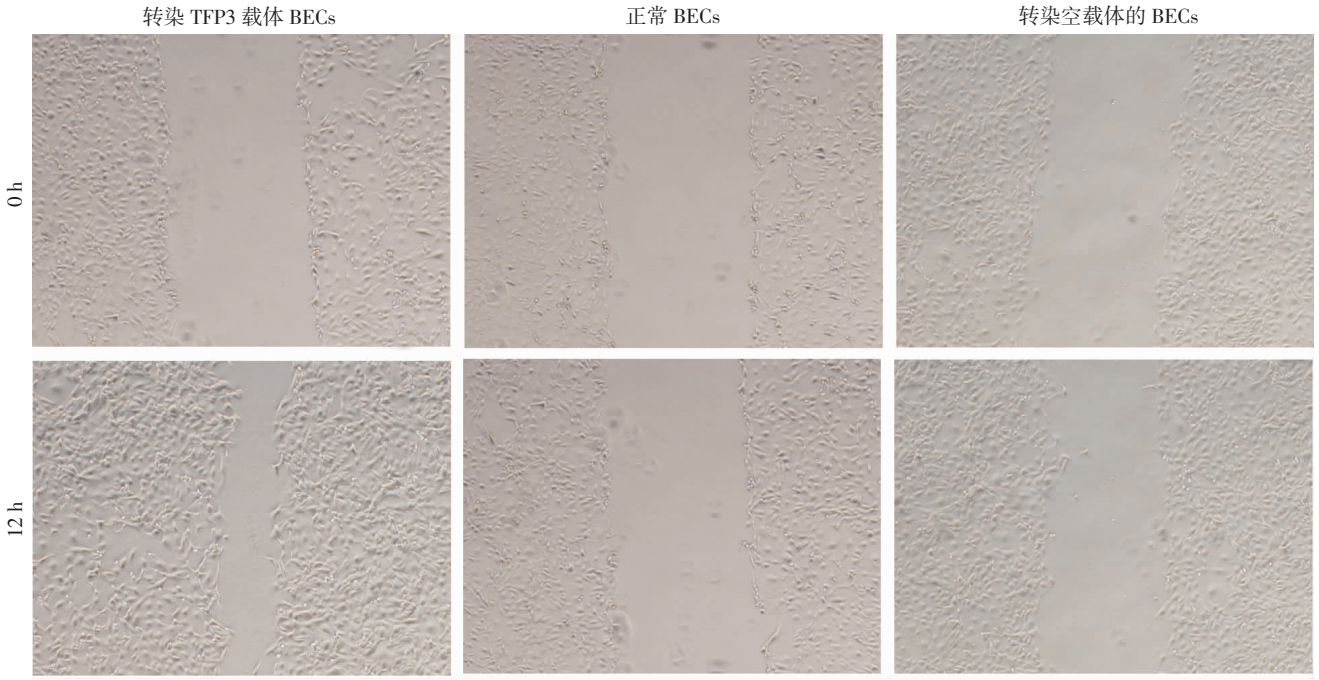


图4 划痕实验观察转染 TIF3 腺病毒对人胆管上皮细胞迁移的调控作用 (LM×100)

感染细胞后可于荧光显微镜下直接观察。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,利用我们构建的携带 TFF3 基因的腺病毒载体感染人胆管上皮细胞后,其 TFF3 基因及蛋白表达水平明显上调。在细胞划痕实验中我们加入了防止细胞分裂增殖的丝裂霉素 C,结果让我们更为直观地观察到 TFF3 明显促进 BECs 迁移,起到参与上皮损伤修复的作用。

本研究成功构建了携带 TFF3 基因的腺病毒载体,成功感染人肝内胆管上皮细胞后明显促进了细胞的迁移,为进一步研究 TFF3 在胆管上皮损伤修复中的作用奠定了良好的技术基础。

参考文献:

[1] Kalabis J, Rosenberg I, Podolsky D K. Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium[J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6434-6441.

[2] Podolsky D K, Gerken G, Eyking A, *et al*. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency [J]. Gastroenterology, 2009, 137(1): 209-220.

[3] Jiang G X, Zhong X Y, Cui Y F, *et al*. IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(8): 3813-3818.

[4] Nozaki I, Lunz J G 3rd, Specht S, *et al*. Regulation and function of trefoil factor family 3 expression in the biliary tree[J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 1907-1920.

[5] Wong W M, Poulsom R, Wright N A. Trefoil peptides[J]. Gut, 1999, 44(6): 890-895.

[6] Kjellev S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(8): 1350-1369.

[7] Xue L, Aihara E, Podolsky D K, *et al*. *In vivo* action of trefoil factor 2 (TFF2) to speed gastric repair is independent of cyclooxygenase[J]. Gut, 2010, 59(9): 1184-1191.

[8] Srivatsa G, Giraud A S, Ulaganathan M, *et al*. Biliary epithelial trefoil peptide expression is increased in biliary diseases[J]. Histopathology, 2002, 40(3): 261-268.

[9] Sasaki M, Ikeda H, Ohira S, *et al*. Expression of trefoil factor family 1, 2, and 3 peptide is augmented in hepatolithiasis[J]. Peptides, 2004, 25(5): 763-770.

[10] Kimura Y, Leung P S, Kenny T P, *et al*. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2002, 36(5): 1227-1235.

[11] 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.

[12] Liu J, Cheng X, Guo Z, *et al*. Truncated active human matrix metalloproteinase-8 delivered by a chimeric adenovirus-hepatitis B virus vector ameliorates rat liver cirrhosis[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53392.

[13] Korrapati A B, Swaminathan G, Singh A, *et al*. Adenovirus delivered short hairpin RNA targeting a conserved site in the 5' non-translated region inhibits all four serotypes of dengue viruses[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(7): e1735.

[14] Williams B J, Bhatia S, Adams L K, *et al*. Dendritic cell based PSMA immunotherapy for prostate cancer using a CD40-targeted adenovirus vector[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46981.

(**收稿**:2012-12-27;**修回**:2013-01-23)

(编辑 王 红)

(上接296页)

表1 氯胺酮和丙泊酚诱导下剖宫产手术中患者生命体征比较 ($n=36$, $\bar{x}\pm s$)

时间	SBP(mmHg)	HR(次/min)	SpO_2(%)
插管前	124±10	74±9	98±1
插管时	148±12	96±10	99±1
插管后	131±10	86±9	99±1
手术结束时	121±7	79±4	98±1

3 讨论

由于产妇椎管内麻醉或 CSEA 失败以及伴有区域麻醉禁忌证时,必须应用全身麻醉。全麻药物可通过胎盘屏障,因此应强调麻醉诱导要在产科医师及护士就位后开始,避免新生儿体内药物浓度过高而致呼吸抑制[2]。氯胺酮镇痛作用强,可迅速通过胎盘,但静脉用 1~1.5 mg/kg 氯胺酮对胎儿没有明显影响。丙泊酚的镇静效果和呼吸抑制呈剂量依赖性,我院使用的 1 mg/kg 的氯胺酮和 1 mg/kg 的丙泊酚合用全麻诱导对产妇循环及呼吸都影响轻微,互补了它们相互的不足,它们的合用比单独大剂量使用氯胺酮和丙泊酚能更好地抑制插管反应和手术的应激反应[3]。新生儿娩出后静脉追加了咪达唑仑和舒芬太尼,并间断推注丙泊酚,也大大减少了产妇术中知晓率的发生,也减低了产妇的术后躁动[4]。36 例新生儿中发生 4 例轻度窒息(Apgar 4~7 分),经清理呼吸道面罩通气人工辅助呼吸后,5 min 和 10 min 的 Apgar 评分都在 10 分,无 1 例新生儿行气管插管。

综上所述,静注氯胺酮 1.0 mg/kg、丙泊酚 1 mg/kg、琥珀胆碱 1.5 mg/kg 全麻诱导;0.75% 异氟谜麻醉维持;丙泊酚、舒芬太尼、维库溴胺间断推注能很好地抑制插管的应激反应,对新生儿呼吸无明显的抑制,产妇无躁动和术中知晓,具有较高的安全性和可行性,是全麻剖宫产中一种比较安全理想的诱导方法。

参考文献:

[1] 傅玉纯. 全身麻醉用于危重孕妇剖宫产的体会[J]. 中国美容医学, 2011, 20(Z3): 329.

[2] 刘新伟, Pole M. 84 例全麻剖宫产分析[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(4): 612-614.

[3] 杨进. 氯胺酮+异丙酚复合麻醉在 87 例小儿眼科手术的临床探讨[J]. 中外健康文摘, 2012, 9(26): 70-71.

[4] 李宝萍. 全身麻醉在产前子痫剖腹产术中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(18): 2581-2582.

(**收稿**:2012-11-30;**修回**:2013-01-24)

(编辑 栾 嘉)