·论 著·

CXCR4 基因慢病毒表达载体的构建、包装及鉴定

徐丽娟[1],王淑芳[2],张云巍[1],潘美妍[3],胡亚卓[4],阎 丽[1] (1. 解放军总医院南楼临床部消化内科,北京 100853;2. 解放军总医院输血科,北京 100853;3. 解放军济南军区第二疗养院,山东 济南 250000;4. 解放军总医院老年医学研究所病理科,北京 100853)

[摘 要] **目的** 构建 CXCR4 基因慢病毒过表达载体并对其进行包装、鉴定。**方法** 首先设计合成引物,采用 PCR 法扩增目的基因 CXCR4,将目的基因与酶切线性化的载体进行定向交换,成功构建重组载体慢病毒表达载体 pGC-FU-CXCR4,将其产物转化大肠杆菌感受态细胞。对培养出的克隆先进行菌落 PCR 鉴定,再对 PCR 鉴定阳性的克隆进行测序和比对分析,最后将获得的病毒载体共同转染 293T 细胞,收集病毒颗粒,并采用 Real time PCR 法测定病毒滴度。**结果** PCR 鉴定结果显示扩增的目的基因已成功插入 pGC-FU 载体,Western Blot 结果显示得到的片段与理论大小相符,阳性克隆测序结果与目的基因序列一致,说明重组慢病毒载体的插入序列完全正确。**结论** 本实验成功构建了 CXCR4 慢病毒表达载体,并成功对慢病毒进行了包装及病毒滴度测定。

[关键词] 慢病毒载体;CXCR4 基因;293T 细胞

[中图分类号] Q344 + .13 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)05-0473-04

Construction, package and identification of lentiviral vector for CXCR4 gene

XU Li-juan[1], WANG Shu-fang[2], ZHANG Yun-wei[1], PAN Mei-yan[3], HU Ya-zhuo[4], YAN Li[1] (1. Department of Gastroenterology, Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Blood Transfusion Department, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 3. Second Sanatorium, Jinan Military Region, Jinan Shandong 250000, China; 4. Department of Pathology, Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To construct and identify lentiviral vector pGC-FU-CXCR4 gene. **Methods** CXCR4 gene amplification was used by real-time polymerase chain reaction. The target gene fragments with the digested plasmids were exchange. Then the lentiviral vector pGC-FU-CXCR4 was constructed successfully. Use the constructed lentiviral vector to infect the competent escherichia coli cells. Polymerase chain reaction analysis was used to identify the cultural clones and DNA sequencing and comparative analysis were used to positive fragments. The successfully constructed plasmids had the same sequence with the target gene. **Results** Polymerase chain reaction tests showed that amplified target genes were inserted in pGC-FU vectors. The electrophoresis results, digestion showed that the reconstructed plasmid was consistent with the theoretical fragment and the sequence result of the positive fragments were exactly the same with the target gene. **Conclusion** Lentiviral vectors of CXCR4 gene over-expression were successfully constructed.

Keywords: lentiviral vector; CXCR4 Gene; 293T cell

CXC 型趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)是基质细胞衍生因子(stromal derived factor1, SDF-1,又称为 CXCL12)的受体,CXCR4 是 G 蛋白偶联受体,含有 7 个跨膜结构域[1]。SDF-1 为 CXCR4 唯一特异性配体,两者共同构成 SDF-1/CXCR4 轴,不仅在人类免疫缺陷病毒感染、炎性反应和创伤修复等病理生理过程中发挥重要作用,而且在正常细胞和肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡等细胞生物学行为及分子水平的调控中起重要作用[2-3]。干细胞移植是目前治疗终末期肝病及急、慢性重症肝炎的一种新的治疗手段,目前较为常用的成体间充质干细胞(adult mesenchymal stem cells, ADSCs)有包括骨髓间充质干细胞(BMSCs)、外周血干细胞、脂肪间充质干细胞等,其中最为常用的为骨髓间充质干细胞。但研究显示仅有少数 BMSCs 能够定植于受损的肝脏组织,这限制了干细胞移植治疗肝损伤的有效性[4-5]。CXCR4 高表达于骨髓间充质干细胞,但体外扩增培养的 BMSCs 随培养代数的增加,CXCR4 的表达水平却逐渐降低,并逐渐失去了其向受伤组织迁移分化的能力[6-7]。慢病毒表达载体由慢病毒衍生而来,慢病毒是一组复杂的反转录病毒,可引起人和哺乳动物缓慢的慢性免疫缺陷疾病。慢病毒对分裂和非分裂细胞都能有效感染,慢病毒表达载体的设计也是利用了慢病毒能够整合到感染细胞

doi:10.11659/jjssx.01E015050

[基金项目] 国家自然科学基金(30900669);北京市科技新星计划基金(ZXKTYANLI001)

[通讯作者] 阎 丽,E-mail:yanlifmu@126.com

[收稿日期] 2015-01-27 [修回日期] 2015-02-15

的基因组中并能够较长期稳定地表达导入的目的基因或片段独特特性。为进一步研究提高移植的 BMSCs 的 CXCR4 表达水平是否能够促进修复受损肝脏组织，本研究构建了 pGC-FU-CXCR4-柔性肽-GFP 慢病毒表达载体。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

pGC-FU Vector 载体(GENECHEM 公司)；1 kp DNA ladder Marker(Fermentas 公司)；250 bp DNA ladder Marker(捷瑞公司)；Age I(NEB 公司)；In-Fusion™ PCR Cloning Kit(clontech)；Taq polymerase(SinoBio)；dNTP(Takara)；Primer(捷瑞生物)；Plasmid 抽提 Kit(Promega)；大肠杆菌。

1.2 实验方法

1.2.1 pGC-FU Vector 载体的构建 pGC-FU Vector 慢病毒载体信息，见图 1。

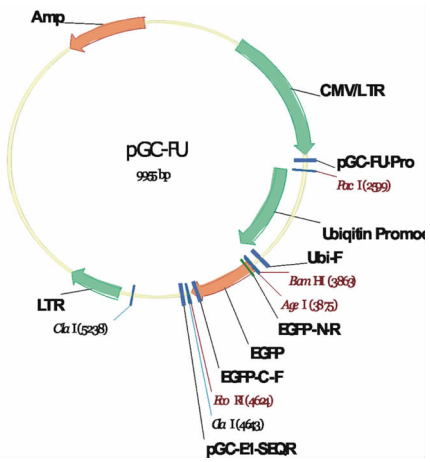


图 1 慢病毒载体信息

1.2.2 慢病毒载体的酶切 Age I 进行酶切消化：取 ddH_2O 42 μl，10 × buffer 15 μl，纯化的 DNA 质粒(1 μg/μl)2 μl，Age I(5 U/μl)1 μl，总体积 50 μl，构成酶切体系，将上述混合物置于 37 ℃，反应 2 h。

1.2.3 目的基因片段的获取 引物合成，引物信息如下：①CXCR4-Age I-F 序列为 GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGAAATATACACTTCGGA，该引物含交换配对碱基、Age I 酶切位点(下划线标记)以及表达增强序列(双下划线记)，并含有目的基因 5'端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。②CXCR4-Age I-R 序列为 TCACCATGGTGGCGACCGGGCTTCCTCCGCCTCCGCTTCCGCCTCCGCCGCTGCCGCCACCGCCGCTGGAGTGAAAACTTGAG，该引物含交换配对碱基和 Age I 酶切位点(下划线标记，为了调整读码框去掉了 T 碱基)，并含有目的基因 3'端部分序列用于 PCR 钓取目的基因，双下划线标记的为柔性肽序列。③CXCR4-SEQF 序列为 CTGACTATCCCTGACATCATC，该引物位于目的基因中，用于菌落 PCR 鉴定转化子。④Ubi-F 序列为 GGGTCAATATGTAATTTTCAGTG，该引物位于 Ubiquitin 启动子中，用于菌落 PCR 鉴定转化子以及测序。⑤EGFP-N-R 序列为 CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG，该引物位于 EGFP 基因的 N 端，用于菌落 PCR 鉴定转化子以及测序。

1.2.4 PCR 扩增目的基因 扩增程序如下：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 90 s，扩增 30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。抽取扩增产物，用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果，用 DNA marker 来判断扩增片段的大小。

1.2.5 重组克隆制备及细胞转染 用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞备用，PCR 产物交换进入线性化慢病毒载体，建立反应体系(表 1)，25 ℃反应 30 min，42 ℃反应 15 min 后准备转化。将反应体系转染已制备好的大肠杆菌感受态细胞，37 ℃条件下培养 16 h。长出的克隆进行后续 PCR 鉴定。

表 1 反应体系的建立

反应体系(μl)	阳性对照	自连对照	交换组
dd H_2O	2.5	12.5	2.5
10 × In-Fusion 交换酶缓冲液	2.0	2.0	2.0
线性化载体 DNA	5.0	5.0	5.0
纯化的 PCR 产物	10.0	0.0	10.0
In-Fusion 交换酶	0.5	0.5	0.5
Total	20.0	20.0	20.0

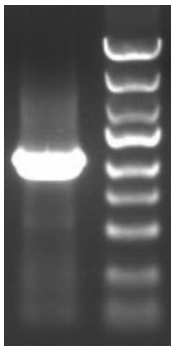
1.2.6 阳性克隆的 PCR 鉴定 用 PCR 扩增的方法鉴定阳性克隆。建立 PCR 反应体系，反应条件如下：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 30 s，60 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 40 s，扩增 30 个循环，最后 72 ℃延伸 6 min，4 ℃冷却。电泳鉴定 PCR 产物。接种阳性转化子，37 ℃培养 16 h 后保存为甘油菌，分装并测序。

1.2.7 慢病毒颗粒的包装和滴度测定 取生长良好的 293T 细胞，用 pGC-LV 载体，pHelper 1.0 载体，pHelper 2.0 载体共同转染 293T 细胞，转染 8 h 后，弃掉含有转染混合物的培养基，用 PBS 洗涤 1 次，注意动作应轻柔，避免洗掉贴壁的细胞，用含 10% FBS 的完全培养基继续培养。转染后 48 h，收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，保存备用。在病毒滴度测定的前 1 d 传代 293T 细胞，并调整细胞密度，次日，分别将不同浓度的病毒稀释液(1×10^{0}、1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4} μl)加入到 293T 细胞中，培养 48 h 后更换培养基，4 d 后抽提 RNA 并采用 Real time PCR 法测定病毒滴度。

2 结果

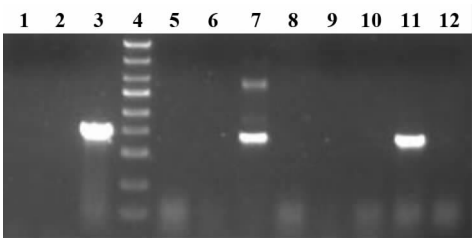
以含有 CXCR4 基因的质粒为模板，采用特异引物，扩增 CXCR4 基因片段，产物长度为 1 138 bp，电泳可见特异条带，与预期结果一致，结果见图 2；将阳性克隆进行 PCR 鉴定，2 个阴性对照组没有明显的蛋白印迹，阳性对照组和实验组均有较明显的印迹，而感染慢病毒颗粒印迹较强，说明构建表达 CXCR4 基因的慢病毒载体可高效表达 CXCR4 蛋白。阳性克隆得到 682 bp条带，与预期一致，见图 3；目的质粒转染后 24 h，293T 细胞荧光表达结果呈阳性，结果见图 4；Western blot 法验证 PGC-FU-CXCR4 质粒为 CXCR4 的过表达慢病毒载体，目的基因融合 GFP 共同表达，见图 5；采用 Real time 定量 PCR 法测定包装的病毒滴度，病毒包装滴度为：2×10^{8} TU/mL，见图 6、表 2。

在本次滴度检测中，1×10^{-4} μl 组样品和对照组组样品的 Ct 值存在 3 个左右差异，认为在 1×10^{-4} μl 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少有 1 个病毒颗粒，则病毒的滴度为：$1/(1\times10^{-4})\times20=2\times10^{5}$ TU/μl $=2\times10^{8}$ TU/mL。



marker:5 kb,3 kb,2 kb,1.5 kb,1 Kb,750 bp,500 bp,250 bp,100 bp

图 2 目的基因 CXCR4 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱



1：阴性对照（ddH_2O）；2：阴性对照（空载自连对照组）；3：阳性对照（GAPDH）；4：Marker 5 kb，3 kb，2 kb，1.5 kb，1 Kb，750 bp，500 bp，250 bp，100 bp；5～12：CXCR4-1～8 号转化子

图 3 PCR 阳性克隆鉴定图片

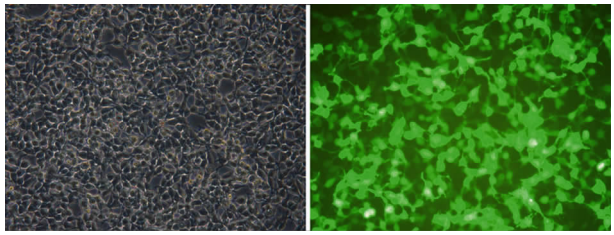


图 4 转染后 24 h 293T 细胞荧光表达结果（×200）

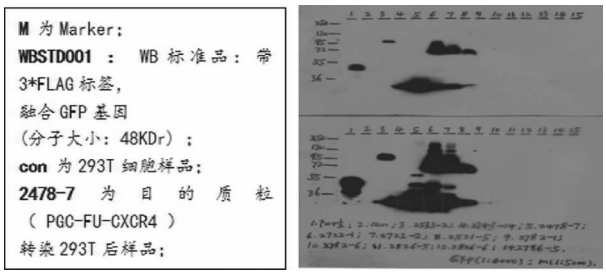


图 5 CXCR4-GFP 融合蛋白的表达

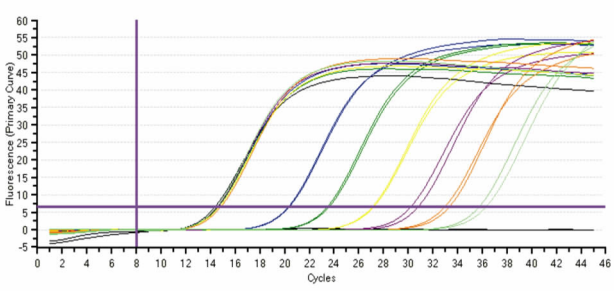


图 6 Real-time PCR 曲线图

表 2 不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析

组别		Ct Actin	Ct Target gene 均值	△Ct = Ct Target gene 均值-Ct Actin	△Ct 对照组-△Ct 样品组
对照组		14.23	36.17	21.940	0.000
样品组	1×10^{0} μl	14.35	20.315	5.965	15.975
	1×10^{-1} μl	14.29	23.51	9.220	12.720
	1×10^{-2} μl	14.48	27.165	12.685	9.255
	1×10^{-3} μl	14.35	30.465	16.115	5.825
	1×10^{-4} μl	14.67	33.235	18.565	3.375

3 讨论

通过此次研究，我们成功构建了 CXCR4 慢病毒表达载体，并采用琼脂糖凝胶电泳法、Western blot 法、Real time 定量 PCR 法、病毒滴度测定进行了证实。CXCR4 广泛表达在各种不同的外周组织中，包括淋巴组织、胸腺、脑、脾，并且已在乳腺、结肠、胃、卵巢、肺、前列腺、黑素瘤和胰腺的肿瘤细胞的细胞表面上检测到 CXCR4 的表达[8-11]。研究发现，CXCL12/CXCR4 不仅参与机体免疫和造血干细胞迁移等生理过程调节，并被认为是多种不同细胞信号转导中的关键分子[11]。CXCL12/CXCR4 能启动多个信号传导途径并能促进细胞趋化、增殖，提高细胞内钙离子浓度和基因转录[8,10]。这些正常的生理反应还与多个病理过程共享多个下游信号转导通路，包括肿瘤细胞的转移，以及自身免疫性和炎症性疾病[8]。此外，CXCL12/CXCR4 也可以激活肿瘤细胞中的许多信号传导途径，包括有丝分裂原激活的蛋白激酶和磷脂酰肌醇 3-激酶[12-13]。因此，CXCL12/CXCR4 信号传导途径可作为多种疾病潜在的治疗靶点。

最近已有学者提出，CXCL12/CXCR4 信号途径在肿瘤发生和发展的多个方面包括血管生成、转移和生存等起着重要作用[14]。CXCR4 的高表达原发性肿瘤比 CXCR4 低表达的原发性肿瘤表现较高的增殖和转移能力[15]。Sehgal 等[16]的研究结果显示胶质母细胞瘤表达高 CXCR4，而经过 CXCR4 特异性抗体治疗后，

胶质母细胞瘤的细胞增殖显著降低。在大肠癌组织中,比相应的正常组织,CXCL12 显著下调和 CXCR4 是显著上调[17]。CXCR4 的高表达可能加快肿瘤进展,并被认为是胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌、卵巢癌和胃癌患者生存预后不良的因素[18-19]。然而,最近已经报道,降低 $CD34^+$ 细胞 CXCR4 的表达可能会引发原发性骨髓纤维化[18]。Bogani 等[20]从原发性骨髓纤维化患者的 $CD34^+$ 细胞发现 CXCR4 启动子的超甲基化,并在用 5-dAzaC 治疗的原发性骨髓纤维化患者细胞内发现 CXCR4 蛋白的表达增加了 3 ~ 10 倍。鉴于 CXCR4 受体介导的上述多种重要生物学功能,及在肿瘤发展过程中的重要作用,CXCR4/SDF-1 受体的抑制剂,在将来有望成为艾滋病、癌症、炎症和关节炎等疾病的治疗方法。

常用的病毒性载体包括慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘苗病毒载体和单纯疱疹病毒载体等。慢病毒载体是以人类免疫缺陷 1 型病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体。相较于其他病毒性载体,慢病毒表达载体具有独特的优越性,其转染效率高,可以有效转导分裂和非分裂细胞,慢病毒载体整合进入宿主细胞基因组中,能稳定的表达转基因和维持转基因的种系传递,并且转导的细胞能保留自我复制和亚全能性的性能,因此被广泛应用于基因功能研究和基因治疗领域[21-22]。

鉴于 CXCR4 基因在众多生理病理过程中的重要作用,以及科研和临床都急需建立高效稳定安全的 CXCR4 慢病毒载体。因此,我们探索了一种稳定的 CXCR4 慢病毒基因表达载体的构建方法,并成功对其进行了包装,而且鉴定结果也表明 pGC-FU-CXCR4 慢病毒载体成功构建,为下一步针对 CXCR4 基因的体内实验提供了可行性。

[参考文献]

[1] Moll NM, Ransohoff RM. CXCL12 and CXCR4 in bone marrow physiology[J]. Expert Rev Hematol, 2010, 3(3): 315 – 322.

[2] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4[J]. Science, 1999, 283(5403): 845 – 848.

[3] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med, 2004, 10(8): 858 – 864.

[4] Yu Y, Yao AH, Chen N, et al. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regenera tion[J]. Mol Ther, 2007, 15(7): 1382 – 1389.

[5] Du Z, Wei C, Yan J, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing C-X-C chemokine receptor type 4 improve early liver regeneration of small-for-size liver grafts[J]. Liver Transpl, 2013, 19(2): 215 – 225.

[6] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases[J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 1254 – 1264.

[7] Liu N, Patzak A, Zhang J. CXCR4-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve repair of acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(7): F1064 – 1073.

[8] Choi WT, Duggineni S, Xu Y, et al. Drug discovery research targeting the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)[J]. J Med Chem, 2012, 55(3): 977 – 994.

[9] Zlotnik A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis[J]. J Pathol, 2008, 215(3): 211 – 213.

[10] Sehgal A, Ricks S, Boynton AL, et al. Molecular characterization of CXCR-4: a potential brain tumor-associated gene[J]. J Surg Oncol, 1998, 69(4): 239 – 248.

[11] Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, et al. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotescolonic carcinoma metastasis[J]. Oncogene, 2006, 25(36): 4986 – 4997.

[12] Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways[J]. J Bio Chem, 1998, 273(36): 23169 – 23175.

[13] Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, De Ana A Martín, et al. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway[J]. FASEB J, 1999, 13(13): 1699 – 1710.

[14] Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768(4): 952 – 963.

[15] Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(11): 2927 – 2931.

[16] Sehgal A, Keener C, Boynton AL, et al. CXCR4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells[J]. J Surg Oncol, 1998, 69(2): 99 – 104.

[17] Wang TB, Hu BG, Liu DW, et al. The influence of lentivirus-mediated CXCR4 RNA interference on hepatic metastasis of colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1861 – 1869.

[18] Lee HJ, Kim SW, Kim HY, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression, function, and clinical implications in gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(2): 473 – 480.

[19] Maréchal R, Demetter P, Nagy N, et al. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2009, 100(9): 1444 – 1451.

[20] Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, et al. Hypermethylation of CXCR4 promoter in $CD34^+$ cells from patients with primary myelofibrosis[J]. Stem Cells, 2008, 26(8): 1920 – 1930.

[21] Escors D, Brecktpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2010, 58(2): 107 – 119.

[22] Xu K, Ma H, McCown TJ, et al. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2001, 3(1): 97 – 104.

(编辑:杨 颖)