技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）09-1073-04

携带人脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶（APE1）基因重组慢病毒载体的构建及体外表达检测

张 璐[1]，方 宇[2]，曾昭书[3]，连亚军[1]，许予明[1]

（郑州大学第一附属医院 1. 神经内科；2. 急诊科；3. 郑州大学基础医学院法医学教研室，郑州 450052）

【摘 要】目的：构建携带人脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶-1（Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1，APE1）基因重组慢病毒载体内英文摘要中，并检测其体外表达目的基因的水平。方法：应用基因克隆技术将人 APE1 基因克隆入慢病毒载体 LV 中，经过PCR、酶切和测序鉴定后，与包装四质粒系统共转染 293T 细胞，制备并收集携带 APE1 基因的慢病毒，重组慢病毒感染体外培养大鼠神经元细胞，利用实时定量 PCR、蛋白质免疫印迹方法检测 APE1 的表达情况，观察病毒转染效果。结果：PCR、酶切和测序鉴定，成功克隆了 LV-APE1 重组质粒。包装慢病毒，浓缩病毒悬液的滴度为 1.0×10^9 TU/ml。慢病毒颗粒稳定转染大鼠神经元细胞，当感染复数为 50 时，感染效率 100%，实时定量PCR、蛋白质免疫印迹方法可以检测到重组慢病毒感染大鼠神经元细胞后能高水平表达 APE1。结论：成功构建了携带人 APE1 基因慢病毒载体，并可在体外高水平表达其所携带的目的基因，为将其进一步应用于神经系统退行性疾病的治疗研究奠定了方法学基础。

【关键词】人 APE1；慢病毒载体；基因治疗

【中国图书分类法分类号】Q781 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-06-01

Construction and identification of lentivirus vector encoding APE1 gene

ZHANG Lu, FANG Yu, ZENG Zhao-shu, LIAN Ya-jun, XU Yu-ming

(*1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital; 3. Department of Forensic, College of Basic Medicine, Zhengzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To construct lentivirus vector encoding human apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 (APE1) gene and examine its ability to express the APE1 gene in vitro. *Methods*: The specific APE1 sequence was cloned into the plasmid of LV to construct the APE1 expression plasmid LV-APE1. The recombinant plasmids were identified by DNA sequencing and restriction digestion. Then the packaging cell lines (293T cell) were cotransfected with the LV-APE1 together with the plasmids pRsv-REV, pMDlg-PRRE, PMD2G and interfered by phosphate-calcium deposit method. The recombinant lentivirus vector was used to infect the Wistar rat neuron cell. The expression of APE1 was detected by real-time quantitative PCR and Western blot. *Results*: The results showed the recombinant lentivirus vector carrying APE1 gene was constructed successfully; the virus titers were above 1.0×10^9 TU/ml, and its infection efficiency in the Wistar rat neuron cell was 100%. The recombinant lentivirus vector could up-regulate the expression of the APE1 gene. *Conclusion*: The lentivirus vector carrying APE1 gene can enhance the expression of APE1 gene significantly, which lays the basis for its application in the treatment of neurodegenerative disease.

【Key words】APE1; lentivirus vector; gene therapy

人脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1（Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1，APE1/Redox factor-1，Ref-1）是生物大分子功能复合体。它在线粒体 DNA 的碱基切除修复、对转录因子的氧化还原调控和活性氧族的调控等重要的生物学中发挥着主要作用。最近研究表明，线粒体功能障碍在神经系统退行性疾病和老年化进程中起着关键作用[1]，并且 APE1 蛋白的不正常表达、分布及功能改变与其病理过程密切相关[2]。正常细胞 mtDNA 修复活性较弱，通过基因治疗的手段提高 mtDNA 修复能力成为增强细胞对氧化应激耐受性的新策略。因此 APE1 是神经系统疾病基因治疗的重要候选基因[3]。本研究旨在探索将人 APE1 基因构建于慢病毒载体上，并检测重组病毒在体外基因表达的水平，为将其进一步应用于神经系统退行性疾病的研究奠定基础。

作者介绍：张 璐（1976-），女，主治医师，博士，研究方向：神经免疫及痴呆。

通信作者：许予明，男，教授，Email：xuyuming@zzu.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：31071100）。

括增殖的调控、细胞凋亡、ROS 产生以及作为第二信使的细胞因子和急速的信号传递，而且作为线粒体 DNA(mtDNA)修复酶，是线粒体碱基切除修复途径(BER)的限速酶，在这一过程中作为脱嘌呤/脱嘧啶位点(AP 位点)核酸内切酶发挥着极其重要的作用[4]

国外学者 Michael R.Vasko 等[5]采用 RNA 干涉(RNA interference，RNAi)技术，靶向干涉神经细胞内 APE1 基因的表达及蛋白质的合成，观察暴露于过氧化氢(H_2O_2)培养基中的海马神经元和感觉神经细胞的生存率、caspase-3 活性、磷酸化H2A组蛋白(DNA双链的断裂数目)，结果发现干涉组 APE1 表达水平的减少引起神经细胞毒性的增加，表现为细胞生存率降低、caspase-3 活性增强，DNA 双链的断裂数目增多。这提示 APE1 可以通过线粒体 DNA 修复途径，抵抗氧化 DNA 损害，减少细胞凋亡，从而保护神经细胞。不仅如此，实验还观察了野生型 APE1(APE1-WT)组和 Ref-1 功能缺乏的APE1(APE1-C65A)组分别对暴露于过氧化氢(H_2O_2)培养基中的海马神经元和感觉神经细胞的生存率的影响，结果发现 Ref-1 功能缺乏的 APE1 组神经细胞死亡率较野生型 APE1 组明显增高，这表明 APE1/Ref-1 在维持神经组织处于稳定状态起着关键的作用，具有调节转录因子使其处于氧化还原状态的功能。因此，APE1/Ref-1 的 DNA 修复功能和氧化还原功能对于神经细胞的正常生存都是必须的，二者缺一不可。在正常细胞线粒体中 APEl 表达水平相对较低，因此 mtDNA 修复活性较弱，这是导致在氧化应激情况下 mtDNA 损伤更严重的重要因素。研究表明，线粒体功能障碍在帕金森氏病、肌萎缩侧索硬化症、阿尔兹海默氏病等神经系统退行性疾病发病机制中占主导作用[6,7]，线粒体 DNA 修复蛋白(APE1)表达的减少是引起神经元凋亡坏死的关键因素[8,9]。通过外源性增加 DNA 修复酶的线粒体表达水平能有效增强 mtDNA 的修复活性，从而提高哺乳动物细胞在氧化应激条件下的存活率。因此如何有效地加入外源性 APE1 已成为神经退行性疾病治疗的新靶点。目前在许多神经系统疾病的治疗研究中，采用关键基因的过表达技术已成为新发展起来极有前景的治疗策略。

如何将目的基因高效转染靶细胞并能长期稳定表达是基因治疗的核心技术。2005 年以后，基于人类免疫缺陷症病毒基础上制备的慢病毒载体逐步发展成为一种高效、安全的基因载体，已成为近年来研究者们的常用选择[10]。与其他逆转录病毒载体相比，慢病毒载体具有可高效感染分裂期及非分裂细胞、目的基因整合至靶细胞基因组能长期表达、免疫反应小，可以容纳大小约 10 000 kb 左右的外源基因，还可兼容多个转录启动子等优点，是目前较为理想的基因转移载体。本课题拟在通过慢病毒载体将靶向修复蛋白 APE1 导入线粒体，对线粒体功能异常进行修复及氧化还原状态的调节，从而为神经系统退行性疾病的治疗提供一种新的思路及理论依据。

本研究根据 GENEBANK 检索到的人 APE1 基因序列(NM_001641.2 950 bp)，设计构建上游含酶切位点 *EcoR* Ⅰ和线粒体前导序列 MTS 序列及 APE1 上游的引物和下游含*Not* Ⅰ和 APE1 木偶短序列的引物，通过 PCR 方法从模板中获取并扩增目的片段。采用 LV-PCDH 慢病毒载体，慢病毒载体包装系统(Tronolab)为四质粒系统，由 pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G，干扰质粒组成。其中干扰质粒能表达绿色荧光蛋白，pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 含有病毒包装所必须的元件。构建携带人 APE1 基因的慢病毒，病毒滴度为1.0×10^9 TU/ml。将 APE1 基因转入大鼠神经元细胞线粒体内，并在 mRNA 水平和蛋白水平检测到 APE1 的大量表达，证实构建的病毒是有功能的重组病毒，转染细胞能稳定有效的使目的基因表达增加。

本研究成功构建人 APE1 慢病毒载体为神经系统退行性疾病治疗开辟新的途径和作用靶点。为进一步观察在体内外试验中，APE1 基因对病损区神经元、轴突的修复和氧化还原调节作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] de Souza-Pinto N C，Wilson D M，Stevensner T V，et al.Mitochondrial DNA，base excision repair Neurodegeneration[J].DNA Repair，2008，7(7)：1098-1109.

[2] Lauritzen K H，Moldestad O，Eide L，et al.Mitochondrial DNA toxicity in forebrain neurons causes apoptosis，neurodegeneration，and impaired behavior[J].Mol Cell Biol，2010，30(6)：1357-1367.

[3] Stetler R A，Gao Y，Zukin R S，et al.Apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 is required for PACAP-induced neuroprotection against global cerebral ischemia[J].Proc Natl Acad Sci USA，2010，107(7)：3204-3209.

[4] Fung H，Demple B A.A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells[J].Mol Cell，2005，17(3)：463-470.

[5] Vasko M R，Guo C，Kelley M R.The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress[J].DNA Repair，2005，4(3)：367-379.

[6] Yang J L，Weissman L，Bohr V A，et al.Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders[J].DNA Repair，2008，7(7)：1110-20.

[7] Yan J J，Liu Y X.Research progress of Ape/Ref and central nervous system diseases[J].Sheng Li Ke Xue Jin Zhan，2005，36(4)：319-321.

[8] Harrison J F，Hollensworth S B，Spitz D R，et al.Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance[J].Nucleic Acids Research，2005，33(14)：4660-4671.

[9] Cho K J，Kim H J，kim H W，et al.Decisive role of apurinic/apyrimidinic endonuclease/Ref-1 in initiation of cell death[J].Mol Cell Neurosci，2010，45(3)：267-176.

[10] 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.

（责任编辑：冉明会）