技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)01-0064-04

携带 KGF 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定

贾庆华,哈小琴,吕同德,刘春杰

(中国人民解放军兰州军区兰州总医院医学实验中心 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室,兰州 730050)

【摘 要】目的:构建携带角化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor,KGF)的腺病毒载体并观察其在细胞中的表达。方法:通过 PCR 从 pcDNA3-KGFpIRES2-EGFP-KGF 质粒中扩增出目的片段 KGF,定向克隆至穿梭质粒载体 pShuttle-CMV 中,构建 pShuttle-KGF。经酶切及测序鉴定后,再将 KGF 定向克隆至重组腺病毒骨架载体 pAdxsi,构建携带 KGF 的重组腺病毒载体(pAdxsi-GFP-KGF)。酶切鉴定正确后,转染人胚肾细胞系 HEK293 细胞,进行重组腺病毒的包装、生产及纯化,半数组织感染量法(50% tissue culture infective dose,TCID50)测定重组腺病毒滴度。用重组腺病毒及空病毒 Ad-null(作为阴性对照)转染人肺腺癌细胞 A549,荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白的表达,ELISA 鉴定 KGF 的表达。结果:成功构建了携带 KGF 的重组腺病毒,纯化后病毒滴度达 1.6×10^{10} pfu/ml。Ad-KGF 转染 A549 细胞后 24 h 在荧光显微镜下即可观察到绿色荧光蛋白,48 h 表达更强,ELISA 实验证实细胞表达 KGF。结论:成功构建了携带 KGF 的重组腺病毒,为下一步研究 KGF 用于肺纤维化治疗研究奠定了实验基础。

【关键词】角化细胞生长因子;腺病毒;构建;表达

【中国图书分类法分类号】R392 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-26

作者介绍:贾庆华(1979-),女,硕士,研究方向:细胞生物学。

通信作者:哈小琴,女,主任医师,Email:haxq@yahoo.com。

胞生长时明显受到抑制,结果显示 rAd-CTGF 作用胰腺癌细胞后呈时间依赖性抑制其生长。胰腺癌细胞迁移实验和集落形成实验显示感染 rAd-CTGF 后人胰腺癌细胞迁移能力和集落形成能力明显较对照组减弱,CTGF 表达水平与胰腺癌发生、恶性程度、转移及预后密切相关,具体机制有待进一步研究。总之,本研究认为 CTGF 在胰腺癌细胞中的高表达与癌细胞转移和恶性程度呈负相关,CTGF 可能成为一种新的胰腺癌治疗靶向基因,通过提高 CTGF 的生物学活性,从而抑制肿瘤的生长和淋巴结转移。

参 考 文 献

[1] 李 辉,周武元,吕丽红,等. 胰腺癌组织 Syk 和 VEGF-D 蛋白表达及其临床意义的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(15):1166-1168.

[2] 苏 燕,李宏伟,崔培林,等. 转化生长因子-β1 通过促进结缔组织生长因子表达抑制胰腺癌细胞 PANC-1 增殖[J]. 现代生物医学进展,2007,7(12):1761-1764.

[3] Douglass M,Bradham,Atsuyuki I,et al.Connective Tissue Growth Factor:a cyst-eine-rich mitogen secreted by human vascular endoth-elial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF10 [J].J Cell Biol,1991,114(6):1285-1294.

[4] 颜廷启,易继林,杨志芳,等. CTGF 和 VEGF 在肝癌中的表达及相关性研究[J].临床外科杂志,2009,17(6):394-395.

[5] Shakunaga T,Ozaki T,Ohara N,et al.Expressionof connective tissue growth factor in cartilaginous-tumors[J].Cancer,2000,89(7):1466-1473.

[6] Hishikawa K,Oemar B S,Tanner F C,et al.Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7[J].J Biol Chem,1999,274(52):37461-37466.

[7] Lin B R,Chang C C,Che T F,et al.Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer[J].Gastroenterology,2005,128(1):9-23.

[8] Chang C C,Shih J Y,Jeng Y M,et al.Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis[J].J Natl Cancer Inst,2004,96(5):364-375.

[9] Takuma A,Jason G,Suzanne M,et al.Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic can-cer[J].Mol Cacer Ther,2006,5(5):1108-111.

[10] 杨竹林,黄生福,苗雄鹰,等.胰腺癌组织中 CCN 家族基因和转化生长因子-β1 表达及其临床病理意义[J].中华实验外科杂志,2005,22(10):1276.

(责任编辑:关蕴良)

Construction and identification of recombinant adenovirus vector of keratinocyte growth factor

JIA Qing-hua, et al

(*Experimental Center of Medicine, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Key Labaratory of Stem Cell and Gene Drug in Gansu Province*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify a recombinant adenovirus vector expressing keratinocyte growth factor (KGF) gene. *Methods*: KGF gene was amplified from the plasmid pIRES2-EGFP-KGF by polymerase chain reaction (PCR) and then inserted into the plasmid pShuttle-CMV to construct pShuttle-KGF. After being confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, the DNA encoding KGF in the new structure was inserted into the vector of recombinant plasmid adenovirus and confirmed by restriction enzyme digestion. Then the human embryonic kidney cell line 293 was transfected with correctly identified pAdxsi-KGF, and the recombinant adenovirus were amplified and purified, and the virus titer was detected using 50% tissue culture infective dose (TCID50) assay. The expression of the green fluorescent protein and KGF were detected by fluorescent microscope and ELISA after the recombinant adenovirus transfected human lung cancer A549 cell line. *Results*: The recombinant adenovirus pAdxsi-KGF was constructed and amplified with titer of 1.6×10^{10} pfu/ml; the green fluorescence proteins could be observed under fluorescent microscope in A549 24 h after transfection and with a stronger degree after 48 h, and KGF expression was detected by ELISA. *Conclusion*: The recombinant adenovirus pAdxsi-KGF was constructed successfully, which will be a good foundation for the research on the therapy of KGF for pulmonary fibrosis.

【Key words】keratinocyte growth factor(KGF); adenovirus; construct; expression

角化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)又称KGF-7,主要表达于成纤维细胞,是由间质细胞分泌的介导间质与上皮之间相互作用的一种生长因子,可以特异性地促进上皮细胞的增殖和分化。大量研究表明在肺损伤的情况下,KGF 可以促进肺泡Ⅱ型细胞增生,并促进肺泡Ⅱ型细胞的表型标志肺泡表面活性物质蛋白 C 的 mRNA 的表达[1,2]。肺纤维化是一种以肺泡结构破坏、大量纤维组织增生为基本病理改变的疾病,目前肺纤维化几乎是不可逆性疾病,KGF 治疗肺纤维化的研究相对较少。本研究旨在构建携带 KGF 基因的腺病毒载体,并制备病毒,转染细胞后实现细胞内 KGF 胞内区的表达,为研究 KGF 对肺纤维化治疗的机制提供相关依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体质粒和细胞 pIRES2-EGFP-KGF 质粒;pShuttle-CMV 重组穿梭载体和 pAdxsi 重组腺病毒骨架载体(诺赛基因组研究中心有限公司提供);293 细胞系(ATCC)。

1.1.2 主要试剂和工具酶 限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ、*I-Ceu* Ⅰ和 *I-Sce* Ⅰ(Biolab)(New England Biolabs 公司);T4 DNA ligase(晶美生物公司的 MBI(Fermentas)产品);CIP 酶(promega 公司);pfx DNA ploymerase(invitrogen 公司);dNTPs(10 mmol/L each)(上海生工生物工程技术服务有限公司);感受态为自制的 DH5a,菌株超级化学感受态。人 KGF ELISA 试剂盒(R&D 公司)

1.2 方法

1.2.1 携带 KGF 基因的重组穿梭质粒的构建 (pShuttle-CMV-KGF) 及鉴定 用 *BamH* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ酶切重组穿梭载体 pShuttle-CMV-KGF,CIP 去磷酸化处理,切胶回收载体片段。以 pIRES2-EGFP-KGF 质粒为模板,用高保真酶 (pfx DNA ploymerase)扩增 KGF 目的基因,引物序列:KGF-*BamH* Ⅰ-F: CGCGGATCCACCATGAGCTATGATTACATG(下划线部分为 *BamH* Ⅰ限制性核酸内切酶的酶切位点),KGF-*EcoR* Ⅰ-R: CCGGAATTCTCAAGTGATTGCCATAGGCA(下划线部分为 *EcoR* Ⅰ限制性核酸内切酶的酶切位点)。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收约 0.4 Kb 的目的片段(KGF cDNA,440 bp)。将 KGF cDNA 克隆至 pAdxsi 载体的 *BamH* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ位点之间,获得重组穿梭质粒(pShuttle-CMV-KGF)。用该质粒转化化学感受态细胞 DH5a 菌株,筛选出阳性单克隆菌落,提取质粒后用 *BamH* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ酶切并测序进行双向鉴定。

1.2.2 携带 KGF 基因的重组腺病毒载体的构建(pAdxsi-KGF)及鉴定 用 *I-Ceu* Ⅰ和 *I-Sce* Ⅰ酶切处理 pAdxsi 载体,跑胶回收含目的基因片段(KGF cDNA),将 KGF cDNA 克隆至 pAdxsi 重组腺病毒骨架载体的 *I-Ceu* Ⅰ和 *I-Sce* Ⅰ位点之间,获得重组腺病毒(pAdxsi-KGF)载体。用该质粒转化化学感受态细胞 DH5a 菌株,利用氨卞抗性筛选出阳性单克隆菌落,提取质粒后用 *Xho* Ⅰ酶切鉴定。

1.2.3 重组腺病毒的生产、纯化及滴度检测 大量繁殖处于对数生长期的成功转化有 pAdxsi-KGF 的 DH5a 菌,实现重组质粒 pAdxsi-KGF 大量制备。将鉴定正确的腺病毒质粒 pAdxsi-KGF 用 *Pac* Ⅰ限制性内切酶线性化。于 6 孔板中接种 HEK293 细胞(5×10^5 个/孔),用 DMEM+10% FBS,置 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞生长至底面积的 80%~90%时,按照 Lipofectamine 2000 使用说明书进行转染。每天观察细胞出毒迹象。待细胞大部分病变并从底部脱落时进行收

毒。将 6 孔板中所有细胞及培养液收于离心管中，反复冻融 3 次后，离心收集含病毒的上清液，记为第 1 代毒种，除少量作为毒种保存外，其余直接转染 HEK293 细胞，实现重组腺病毒的大量扩增与收集，并用半数组织培养感染量（50% tissue culture infective dose，TCID50）[3]法测定病毒样品的活性后 -80℃保存。

1.2.4　重组腺病毒 pAdxsi-KGF 在真核细胞中的表达　将鉴定正确的重组腺病毒 pAdxsi-KGF 以前期工作中得出的最佳感染复数（Multiplicity of infectin，MOI=100 pfu/cell）转染人肺腺癌细胞（A549），转染 24 h 和 48 h 后荧光显微镜下观察细胞示踪物绿色荧光蛋白的表达情况。采用人 KGF ELISA 试剂盒检测细胞上清中的 KGF 浓度，鉴定 pAdxsi-KGF 在细胞中的表达情况。

2　结　果

2.1　重组穿梭质粒 pShuttle-KGF 的构建及鉴定

通过酶切、连接、转化等步骤，将 KGF 基因克隆至穿梭质粒 pShuttle-KGF 中。对 pShuttle-KGF 进行测序及用限制性内切酶酶切的方法进行鉴定。测序结果显示与 Genbank 中序列一致。重组质粒用 *BamH* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ双酶切后琼脂糖凝胶电泳（图 1），可见切下一大小约为 0.4 kb/3.4 kb，分别为 pShuttle 质粒和 KGF 片段，表明 KGF 基因已成功克隆至穿梭质粒 pShuttle-KGF 中。

2.2　重组腺病毒质粒 pAdxsi-KGF 的构建及鉴定

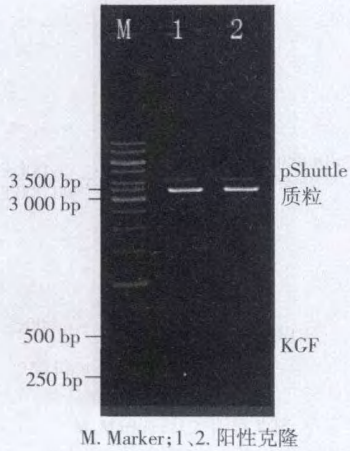
通过酶切、连接、转化等步骤，将 KGF cDNA 克隆至 pAdxsi 重组腺病毒骨架载体上。用限制性核酸内切酶 *Xho* Ⅰ酶切进行鉴定。重组腺病毒质粒 pAdxsi-KGF 用 *Xho* Ⅰ酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱可见切出大小不一的 7 条带（图 2），而空腺病毒质粒用 *Xho* Ⅰ酶切后可见切出大小不一的 6 条带（图 3）。

2.3　重组腺病毒 pAdxsi-KGF 的制备

用 Lipofectamine2000 脂质体和重组质粒 pAdxsi-KGF 共转染 HEK293 细胞后，10~15 d 可在光镜下观察到细胞变大变圆，呈葡萄状，并开始出现中间区域的细胞变圆、漂浮，边缘细胞不规则收缩的噬斑。多次感染 HEK293 细胞获得大量重组腺病毒，经氯化铯纯化后用 TCID50 法测定病毒滴度为 1.6×10^{10} pfu/mL。

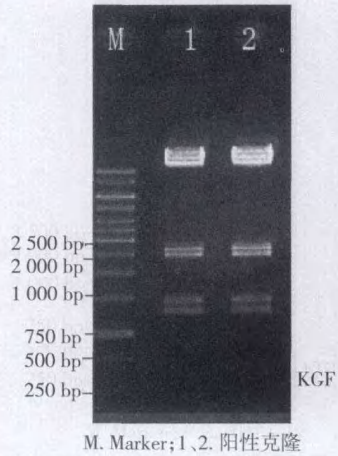
2.4　重组腺病毒 pAdxsi-KGF 在细胞中的表达

将构建的重组腺病毒 pAdxsi-KGF 以 MOI=100 pfu/cell 转染人肺腺癌细胞（A549），24 h 后荧光显微镜下观察，可见转染细胞的胞浆和细胞核中均有特异性绿色荧光蛋白的表达（图 4），48 h 时荧光表达更强（图 5），ELISA 结果表明载体在细胞中能够正常地进行转录及翻译（图 6）。



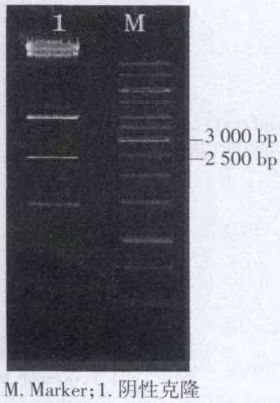
M. Marker；1、2. 阳性克隆

图 1　pShuttle-KGF 鉴定结果



M. Marker；1、2. 阳性克隆

图 2　pAdxsi-KGF 鉴定结果



M. Marker；1. 阴性克隆

图 3　pAdxsi 空载体 *Xho* Ⅰ酶切电泳图（阴性对照）



图 4　重组腺病毒 pAdxsi-KGF 转染 A549 后 24 h 在细胞中表达（荧光显微镜，×100）

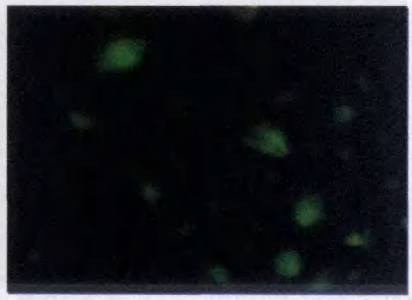


图 5 重组腺病毒 pAdxsi-KGF 转染 A549 后 48 h 在细胞中表达（荧光显微镜，×100）

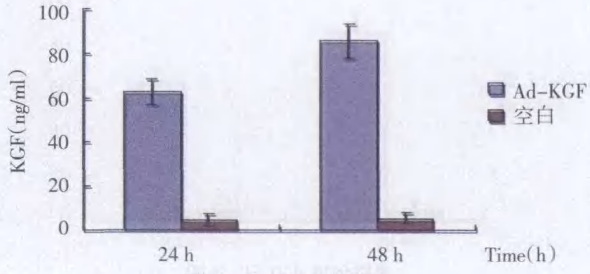


图 6 ELISA 实验结果

3 讨 论

KGF 是肺发育和肺损伤保护的关键生长因子，对各种刺激引起的急、慢性肺损伤具有保护作用。Galiacy 等[4]就证实 KGF 在肺泡Ⅱ型细胞中扮演着主要角色，其中机制是通过诱导肺泡Ⅱ型细胞增殖、分化和迁移，修复受损上皮，维持肺泡上皮的完整性，对不同损伤起到保护作用。王艳等[5]实验证明在肺损伤的情况下，KGF 可以进一步促进骨髓间充质干细胞向肺泡上皮细胞诱导分化，为 KGF 具有保护及修复肺损伤的作用机制提供了新的证据。

肺纤维化是一种弥漫性肺部炎症疾病，病变主要累及肺间质，也可累及肺泡上皮细胞及血管。其损伤引起上皮生长因子和成纤维生长因子家族的参与，其中就包括 KGF、HGF、MCP-1 等，这些因子相互合作刺激整联蛋白、基质物质、金属蛋白酶、黏着斑和细胞骨架联合促使细胞扩展和迁移，充分说明 KGF 作为肺纤维化修复的起始因子是至关重要的[6]。此外，KGF 还可以阻止肺成纤维细胞和炎性细胞进入肺泡腔，从而抑制肺纤维化的发生。Marchand-Adam 等[7]发现 KGF 具有预防肺纤维化的作用。

肺泡上皮是肺纤维化类似的慢性反应过程中的主要目标，KGF 是肺泡Ⅱ型上皮细胞增殖和分化的有效的生长因子并诱导肺泡增生，肺纤维化中 KGF 在肺泡上呈现出一定的生物学活性效应，刺激保护性表面活性蛋白增多及 Na^+-K^+ ATP 酶的基因表达[8]，参与肺泡修复的机制可能通过分泌或者旁分泌效应[9]。动物实验已经证明运用可诱导表达 KGF 的基因系统对大鼠肺损伤有很成功的治疗效果[10]。

本研究首先从 pIRES2-KGF 质粒中克隆出 KGF cDNA，经酶切后将其克隆至重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-KGF 中。利用同样方法不同的酶切位点再将 KGF 克隆至 pAdxsi 骨架载体上，构建重组腺病毒质粒 pAdxsi-KGF。经鉴定后反复转染 HEK293 细胞，实现重组腺病毒载体的包装及扩增。经检测病毒滴度后转染 A549。由于 pAdxsi-KGF 自身携带绿色荧光蛋白基因，荧光显微镜观察到转染细胞胞浆和胞核内均有特异性绿色的荧光蛋白的表达，ELISA 证实细胞有 KGF 表达。本实验为 KGF 的基础性研究，为临床应用 KGF 预防和治疗肺纤维化等肺损伤疾病提供了依据，随着研究不断深入，KGF 将不久运用于人类急性或者慢性肺损伤的治疗。

参 考 文 献

[1] Zheng W J, Yuan L, Liu X D, et al. Issues within Keratinocyte Growth Factor(KGF) research[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(4): 335-338.

[2] Zhang F J, Nielsen L D, Lucas J J, et al. Transforming growth factor-β antagonizes alveolar type Ⅱ cell proliferation induced by keratinocyte growth factor[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(6): 679-686.

[3] Lin H T, Tsai H Y, Liu C P, et al. Comparability of bovine virus titers obtained by TCID50/ml and FAID50/ml[J]. J Virol Methods, 2010, 165(1): 121-124.

[4] Galiacy S, Planus E, Lepetit H, et al. Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelail repair in vitro[J]. Experimental Cell Research, 2003, 283(2): 215-229.

[5] 王 艳，杨志军，封志纯. 角化细胞生长因子对骨髓间充质干细胞体外诱导分化为肺泡上皮细胞的实验研究[J]. 中国输血杂志，2009，22(8)：628-632.

[6] Crosby L M, Waters C M. Epithelial repair mechanisms in the lung[J]. Am J Physil Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(6): 715-731.

[7] Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, et al. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(5): 470-477.

[8] Stern J B, Jaffré S, Dehoux M, et al. Keratinocyte growth factor and Hepatocyte growth factor: their roles in alveolar epithelial repair[J]. Rev Mal Repair, 2003, 20(6): 896-903.

[9] Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, et al. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-β and IL-10[J]. Eur Respir, 2003, 22(1): 69-76.

[10] Aguilar S, Scotton C J, McNulty K, et al. Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. PloS One, 2009, 4(11): 8013.

（责任编辑：关蕴良）