技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1836-04

小鼠血红素氧合酶 -1 复制缺陷型重组腺病毒的构建

王荣琦,南月敏,吴文娟,赵素贤,韩 芳,付 娜
(河北医科大学第三医院中西医结合肝病科,石家庄 050051)

【摘 要】目的:利用细菌内同源重组法构建含血红素氧合酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1)基因的重组腺病毒(Adenovirus,Ad)。方法:采用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)以小鼠成纤维细胞扩增目的基因HO-1,经 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ双酶切后克隆至含绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)基因的 pAdTrack-CMV 穿梭载体,将之 *Pme* Ⅰ酶切线性化后,在含有 Ad 骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 大肠杆菌内进行同源重组,选取经鉴定含目的基因的重组体质粒,*Pac* Ⅰ酶切后用脂质体转染人胚肾 293 细胞,包装成重组体 Ad Ad-HO-1。采用 RT-PCR 对重组体 Ad 进行鉴定,利用穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中带有的 GFP 报告基因,监测病毒滴度和感染效率。结果:PCR、序列测定、以及限制性酶切法证实 HO-1 基因正确插入 Ad 表达载体,并在人胚肾 293 细胞中包装出重组 Ad,荧光显微镜下可观察到 GFP 表达,收获病毒的滴度为 1.25×10^{11} pfu/ml。结论:成功构建 pAd-HO-1 重组 Ad 表达载体,且重组 Ad 在人胚肾 293 细胞中能有效转录,为非酒精性脂肪性肝炎及其它慢性肝病的基因治疗奠定了基础。

【关键词】血红素氧合酶 -1;重组腺病毒;基因治疗
【中国图书分类法分类号】R373.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-22

Construction of recombinant replication-defective adenovirus expressing heme oxygenase-1 gene in mouse

WANG Rong-qi, et al
(*Department of Traditional and Western Medical Hepatology, the Third Hospital of Hebei Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a recombinant adenovirus (Ad) vector expressing heme oxygenase-1 (HO-1) gene by the homologous recombination in Escherichia coli strain BJ5183. *Methods*: HO-1 gene was amplified from embryonic fibroblast cell of mouse by RT-PCR. Digested with *Bgl* Ⅱ and *Xho* Ⅰ, the HO-1 gene was cloned into shuttle vector pAdTrack-CMV that carried a green fluorescence protein (GFP) gene. *Pme* Ⅰ linearized shuttle plasmid was transformed into *E.coli* BJ5183 containing adenovirus backbone vector pAdEasy-1 to achieve the homologous recombination. The DNA of identified recombinant plasmid was digested with Pac I and transfected to HEK293 cells to package recombinant adenovirus particles Ad-HO-1. The target gene was detected by RT-PCR. Infection efficiency and titre of the Ad-HO-1 in 293 cells was measured through the expression of GFP. *Results*: It was confirmed by RT-PCR, sequencing and restriction enzyme analysis that the target gene was cloned correctly to the shuttle plasmid. The expression of GFP could be observed by fluorescence microscope. The viral titer purified adenovirus was 1.25×10^{11} pfu/ml. *Conclusion*: Recombinant adenovirus vector was constructed successfully and packed in HEK293 cells, which can serve as a good gene transfer vector for the study of gene therapy in chronic liver diseases, such as non-alcoholic steatohepatitis.

【Key words】Heme oxygenase-1; Recombinant adenovirus; Gene therapy

随着分子生物学技术的飞速发展和日渐成熟,基因治疗技术已倍受青睐。在基因治疗中,基因导入系统是基因治疗的核心技术。腺病毒(Adenovirus,Ad)是一类无包膜的双链 DNA 病毒,可以感染分裂期或静止期细胞、某些高度分化的组织细胞,并能高效的复制、表达其基因产物,其 DNA 游离在细胞核内,不整合入细胞基因组,因此 Ad 成为基因治疗、基因功能研究的首选工具[1-3]。血红素氧合酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1)是血红素降解的起始酶和限速酶,其产物胆绿素或胆红素、一氧化碳具有抗氧化损伤和抗炎等作用,近年来对其研究倍受重视[4]。本研究拟包装含有小鼠 HO-1基因的重组 Ad,以为非酒精性脂肪性肝炎及其它慢性肝病基因治疗的研究提供基础。

作者介绍:王荣琦(1975-),女,主治医师,博士,
研究方向:非酒精性脂肪性肝病的基因治疗。
通讯作者:南月敏,女,教授,E-mail:nanyuemin@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

携带绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)报告基因的 Ad 穿梭质粒 pAdTrack-CMV,E1 区和 E3 区缺失的复制缺陷 5 型腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1,大肠杆菌BJ5183 和人胚肾 293 细胞(Human embryonic kidney 293 cells,HEK293)购于天津赛尔生物技术有限公司;核酸内切酶 *Pac* Ⅰ和 *Pme* Ⅰ为英国 New England Biolabs 公司产品;DNA Marker、限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ、T4DNA 连接酶为大连宝生物工程公司产品;Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司;DNA 片段回收试剂盒、质粒大提试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京博大生物技术公司。

1.2 目的基因克隆

根据 GenBank 中的小鼠 HO-1 全长基因序列设计扩增 HO-1 基因的特异性引物,并分别在两条引物中的 5'端引入 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ限制性酶切位点以及保护性碱基。上游引物序列为:5'-GGAAGATCTCCGGTGATGG AGCGTCCACAGC-3' 下游引物序列为 5'- CGACGCTCGAGGGCCAGTATTGCATT-TACATGG-3'。引物由上海生工生物技术有限公司合成。扩增片段长度为 900 bp。从小鼠成纤维细胞(NIH-3T3 细胞)中提取总 RNA,用 Oligo (dT)18 为引物进行反转录合成 cDNA 后,用特异性引物进行 PCR 扩增。扩增条件为 95℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增目的片段符合预期大小后,切胶纯化。

1.3 含有 HO-1 基因片段重组质粒 pAdtrack-CMV-HO-1 的构建

分别用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ双酶切 PCR 产物和穿梭质粒 pAdTrack-CMV,酶产物经胶回收试剂盒纯化后,将线性化的载体与 HO-1 片断按 1:3 摩尔比混合,用 T4DNA连接酶于 16℃连接过夜,取适量连接产物转化大肠杆菌 XL-1 感受态细菌,随机挑选卡那霉素抗性菌落扩增后碱裂解法小量提取质粒,用 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定,有 900 bp 左右的片段出现,初步表明质粒构建正确。含有 HO-1 基因片段的重组质粒进行双向测序:上游引物 5'-CGTAAGTTATGTA ACGCGGA-3',下游引物 5'-CCTTATATATTCTTTCCCAC-3',经上海博亚生物技术有限公司测序,结果与 Genbank 中的基因序列一致。

1.4 同源重组 Ad 载体 pAd-HO-1 的构建

首先将骨架质粒 pAdEasy-1 用热休克法转化进 BJ5183 菌株,以 Amp+ 抗性筛选成功转化的菌株,然后制备上述含骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌株的感受态菌。将构建好的含有小鼠 HO-1 基因片段的重组质粒 pAdtrack-CMV-HO-1 用 *Pme* Ⅰ酶进行单酶切,使质粒线性化,回收并纯化后取 1 μg 线性化质粒电击转化 BJ5183(含 pAdEasy-1)感受态菌(2.2 kV,5.0 ms),Kan+ 抗性筛选成功转化并进行同源重组的菌株。碱裂解法提取质粒,用 *Pac* Ⅰ单酶切消化,0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定,若出现一条约 30 kb 的条带,和另一条约 4.5 kb 或 3 kb(同源重组的两种方式)的条带,则表明同源重组成功。

1.5 重组 Ad Ad-HO-1 的包装、扩增和滴度测定

扩增并纯化上述同源重组好的 Ad 质粒,用 *Pac* Ⅰ酶切线性化。将 HEK293 细胞接种于 6 孔板中培养 18~24 h后,细胞密度达到 60%左右,用 Lipofectamine™2000 脂质体将上述线性化后的重组 Ad 质粒 1 μg 转染入 HEK293 细胞。至转染后第 7~10 d,观察见绝大多数细胞已发生细胞病变反应(Cytopathic effect,CPE),即细胞发生完全转染,收获细胞,于-80℃和 37℃之间反复冻融 3 次,充分释放病毒。裂解细胞、离心、收取病毒上清。取病毒上清的 30%~50% 2 次感染 HEK293 细胞,荧光显微镜监测 GFP 表达。转染 2~3 d 即可收集重组 Ad 上清,经反复感染 HEK293 细胞,可扩增病毒至所需滴度。氯化铯密度梯度离心法进行纯化,空斑实验法测定转染液病毒滴度。病毒滴度用 pfu/ml 表示,计算方法为:病毒滴度(pfu/ml)=空斑均数 × 稀释度的倒数 ÷ 病毒量。测得的 Ad-HO-1 病毒滴度为 1.25×10^{11} pfu/ml。

1.6 病毒感染 HEK293 细胞后 RT-PCR 检测目的基因

取重组 Ad 上清,离心后收集细胞,Trizol 一步法提取细胞总 RNA,所获 RNA 加 *Dnase* Ⅰ消化处理可能污染的DNA,应用 RT-PCR 检测目的基因 mRNA 的表达。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。反应条件同前,同法处理空白对照 Ad Ad-GFP。重组 Ad Ad-HO-1 的构建流程图见图 1。

2 结 果

2.1 表达质粒的酶切鉴定

将 HO-1 cDNA 克隆到 pAdTrack-CMV 载体中进行酶切鉴定。结果发现,构建的质粒 pAdTrack-CMV-HO-1 经限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ和 *Xho* Ⅰ双酶切后,重组质粒得到约 900 bp 的相应 DNA 片段,与预期 HO-1 长度一致(图 2)。

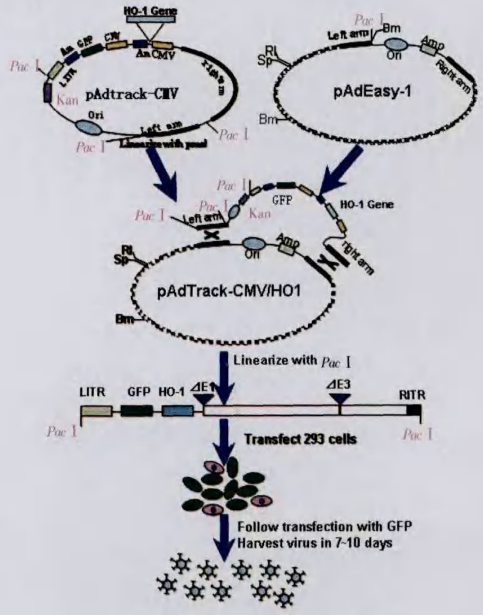


图 1 重组 Ad Ad-HO-1 的流程图

2.2　重组质粒 pAdTrack-CMV-HO-1 测序鉴定

将经酶切鉴定的重组质粒 pAdTrack-CMV-HO-1 测序，结果如图 3。经 GeneBank 网上检索，证明序列完全正确无突变，表明目的基因片段成功插入表达载体。

2.3　目的基因与腺病毒载体重组鉴定

将 *Pme* Ⅰ线性化的重组穿梭质粒 pAdTrack-HO-1 转化 XL-1 感受态细菌后，在细菌内与同源重组有关酶的作用下，以超螺旋形式存在的 pAdEasy-1 与线性化的重组穿梭质粒的同源序列发生基因重组，获得重组 Ad 质粒pAd-HO-1，经过琼脂糖凝胶电泳初筛后，用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，重组 Ad 质粒被切成约 30 kb 和 4.5 kb 的 2 个片段（图 4），说明已成功获得重组 Ad 质粒。

2.4　重组 Ad 质粒 pAd-HO-1 转染 HEK293 细胞后鉴定

用 *Pac* Ⅰ酶切重组 Ad DNA 质粒，获得重组 Ad 基因组的 DNA 分子转染 HEK293 细胞，约经过 7~14 d 后，进行形态学观察发现正常 HEK293 细胞生长旺盛，胞体饱满，呈梭形、三角形或不规则形，大小一致，胞浆丰富，细胞表面伸出较长伪足，贴壁能力佳。脂质体介导的重组质粒转染HEK293 细胞后观察，见多数细胞胞质肿胀、变形，细胞呈椭圆形、圆形，伪足减少，随后聚集成葡萄状，部分细胞溶解、死亡、脱落，细胞间隙增大，形成蚀斑（图 5）。荧光显微镜采用 490 nm 蓝光激发观察，HEK293 细胞中出现绿色荧光蛋白表达，且随转染时间延长，表达绿色荧光蛋白的细胞逐渐增加，说明目的基因成功表达（图 6）。

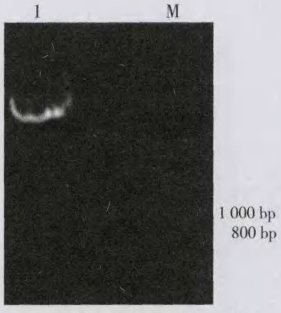
2.5　RT-PCR 检测目的基因

提取经重组 Ad 感染的 HEK293 细胞总 RNA，用 HO-1 cDNA 引物进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳后可明显观察到长约 900 bp 的片段，而空载体对照 Ad-GFP 无目的片段，证实在 Ad-HO-1 基因组中整合有 HO-1 片段（图 7）。

3　讨　论

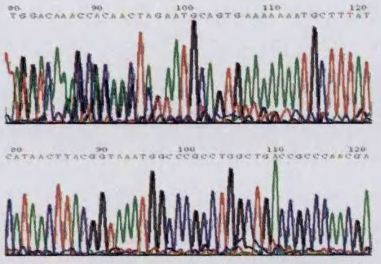
如何选择适当的载体使目的基因在机体内获得安全、稳定、长期表达是基因治疗的关键，病毒重组技术是目前研究的重点和热点。复制缺陷型腺病毒是当前基因治疗最常用的载体之一，可携带较大的目的基因；转染效率极高，在宿主细胞内可获得大量表达；不会整合至宿主染色体内，安全性高，避免了突变危险；在表达时间上具有自限性，不会因过度表达而造成负面后果[5]。

本研究采用 AdEasy 系统成功构建了含 HO-1 和 GFP 的



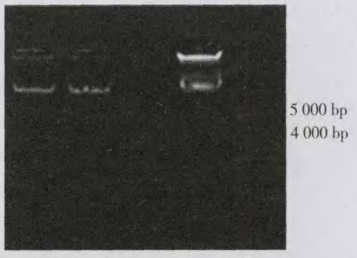
1.PAdtrack-CMV-Ho-1；M. marker

图 2　重组质粒 PAdtrack-CMV-HO-1 的双酶切



A. positive sequencing；B. reverse sequencing

图 3　重组质粒 pAdtrack-CMV-HO-1 测序图



1、2. PAd-HO-1；3. PAdEasy-1；M.marker

图 4　重组 Ad 质粒 pAd-HO-1 *PAC* Ⅰ酶切鉴定

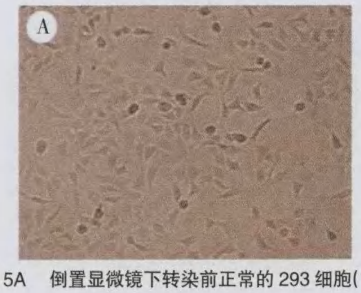


图 5A　倒置显微镜下转染前正常的 293 细胞（×200）



图 5B　倒置显微镜下转染后的细胞病变（×200）



图 6A　转染后显微镜下的细胞病变（×100）

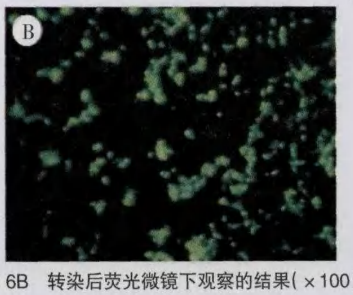
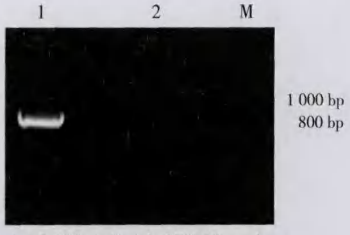


图 6B　转染后荧光微镜下观察的结果（×100）



1.Ad-HO-1;2. Ad-GFP;M. marker

图 7 PCR 鉴定重组腺病毒(×100)

Ad 毒载体。AdEasy 是新一代的腺病毒载体构建系统[6,7],是一种简便的 Ad 制备方法,其优点为:①骨架pAdEasy-1 具有氨苄青霉素抗性,呈超螺旋形,易于酶切操作;它包含Ad 除 E1 和 E3 区外的大部分 DNA,E1 区的缺失使 Ad 复制缺陷,E3 区编码的蛋白可逃避宿主的免疫攻击,减轻了 Ad 感染时出现的炎性反应和免疫反应[8-10];②在细菌 BJ5183 中,而不是在哺乳动物的细胞中进行重组,免去了许多细胞内操作过程;同时,利用含不同抗生素的平板筛选重组子,简化了筛选工作, 克服了传统的细胞内同源重组法成功率低的缺陷;③允许插入 10 kb 以上的序列,在同一病毒中可以插入多个基因;④穿梭载体 pAdTrack-CMV,具有卡那霉素抗性,包含多克隆位点、与同源重组有关的 Ad 序列、GRP 基因和包装信号等;⑤Ad 穿梭质粒中带有绿色荧光蛋白 GFP 报告基因[11],可以直接观察转染和感染效率,简便、快速和高效。

HO-1 是血红素降解的起始酶和限速酶,它的主要功能是代谢血红素形成胆绿素、一氧化碳和游离铁,在哺乳动物体内的胆绿素则被胆绿素还原酶进一步还原生成胆红素。体内存在 3 种形式,HO-1 为其诱导型,多种因素,包括血红素、重金属、细胞因子、低氧、高温和紫外线照射等可诱导 HO-1 的大量表达[12,13],这些刺激的共同特点是能诱发机体的氧化应激反应。HO-1 的诱导表达是细胞应激时最重要的细胞保护机制之一。最初人们认为 HO-1 的作用仅限于催化血红素氧化降解,保持体内血红素的平衡。近年的研究发现,血红素分解产物中的一氧化碳和胆绿素等不只是作为废物排泄,而且在生物体内还具有重要的生理作用[14]。研究发现,在多种肝损伤模型(如氧中毒、缺血再灌注等)中,HO-1 表达的上调均具有重要的抗氧化和抗炎症功能[15,16]。目前已有研究表明 HO-1 过表达可减轻缺血再灌注损伤,而利用基因转移技术使 HO-1 基因过表达则起到很好的保护作用[17]。Taille 等[18]发现巨噬细胞内 HO-1 编码质粒转染后,HO-1 的表达限制了烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸氧化酶的组装并使其氧化活性降低。Shan 等[19]证实 HO-1 过表达可抑制丙肝病毒的复制,减轻病毒引起的氧化损伤,是潜在的治疗性靶基因。但 HO-1 基因过表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用尚不清楚。

正是由于 HO-1 在抗氧化应激损伤、抗炎、抗凋亡、调节微循环等方面具有重要的作用,所以成为近几年的研究热点。本实验成功构建了携带外源性 HO-1 基因的重组 Ad 表达载体,并在 HEK293 细胞中包装获得重组 Ad Ad-HO-1,应用 RT-PCR 鉴定结果表明,Ad-HO-1 重组 Ad 可在靶细胞中高效转录。下一步我们将把重组 Ad Ad-HO-1 导入非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型中,为进一步研究 HO-1 高表达对非酒精性脂肪性肝炎等慢性肝病的保护作用及其在临床诊断和治疗中的应用奠定基础。

参 考 文 献

[1] Majhen D,Ambriovic Ristov A. Adenoviral vectors-How to use them in cancer gene therapy[J]?Virus Res,2006,119(2):121-133.

[2] 庞小娟,李晓军,秦浚川. 腺病毒载体纯化及在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 医学研究生学报,2009,12(22): 1324-1327.

[3] 娄小丽,黄 英,舒 畅,等. 大鼠血清淀粉样物质 P(SAP)基因的克隆及重组腺病毒制备[J].重庆医科大学学报,2010,35(4):579-581.

[4] Yu J,Chu E H,Wang R,et al.Heme oxygenase-1 protects against steatohepatitis in both cultured hepatocytes and mice[J].Gastroenterology,2010,138(2):694-704.

[5] Hayashi S,Leu D,Yamii Y,et al. Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTLA4IG gene in hamster-to-rat xenotransplantation [J].Transplantation,2005,80(4): 494-499.

[6] Wilson D S,Nock S.Recent developments in protein microarray technology[J]. Angew Chem Int Ed Engl,2003,42(5):494-500.

[7] 贾绍昌,陈 坚,赵全年. 带绿色荧光蛋白的米非司酮诱导表达腺病毒载体的构建及表达[J].医学研究生学报,2010,23(1):43-47.

[8] Kinoshita K,Iimuro Y,Fujimoto J,et al. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis[J].Gut,2007,56(3):396-404.

[9] Bueno M,Salgado S,Beas-Zúrate C,et al. Urokinase- type plasminogen activator gene therapy in liver cirrhosis ismediated by collagens gene expression down-ulation and up-regulation of MMPs,HGF and VEGF[J].J GeneMed,2006,8(11):1291-1299.

[10] Lin Y, Xie W F,Chen Y X,et al. Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes[J]. Liver Int,2005,25 (4):796- 807.

[11] Gerrard L,Zhao D,Clark A J,et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency[J].Stem Cells,2005,23(1):124-133.

[12] Bach F H.Heme oxygenase-1:a therapeutic amplification funnel[J].Faseb J, 2005, 19(10): 1216-1219.

[13] Zhu Z,Wilson A T,Mathahs M M,et al.Heme oxygenase-1 supp resses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury[J]. Hepatology,2008,48(5):1430-1439.

[14] Abraham N G,Kappas A.Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase[J].Pharmacol Rev,2008,60 (1):79-127.

[15] Malaguarnera L,Madeddu R,Palio E,et al. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients[J]. J Hepatol,2005,42:585-591.

[16] Wen T,Wu Z M,Liu Y,et al. Upregulation of heme oxygenase-1 with hemin prevents D-galactosamine and lipopolysac-charide-induced acute hepatic injury in rats [J]. Toxicology,2007,237(1-3):184-193.

[17] Tsui T Y,Wu X, Lau C K,et al. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer[J]. Circulation,2003,107(20): 2623-2629.

[18] Taille C,El Benna J,Lanone S,et al.Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability[J].J Biol Chem,2004,279(27):28681-28688.

[19] Shan Y,Zheng J,Lambrecht R W,et al. Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes[J].Gastroenterology,2007,133(4):1166-1174.

(责任编辑:冉明会)