维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0466-04

应用 AdEasy 腺病毒载体系统构建人 GST-π 基因的重组腺病毒

罗小辑,金先庆,陈 瑾

(重庆医科大学附属儿童医院外科, 重庆 400014)

【摘 要】目的:利用 AdEasy 腺病毒载体系统构建人谷胱甘肽转移酶 -π(GST-π) 基因重组腺病毒并在 HEK293 细胞中扩增制备重组病毒。方法:从质粒中通过 PCR 的方法扩增出目的基因 GST-π 并带有适宜的酶切位点,双酶切后连 pAdtrackCMV 中构建成腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-GST-π,经酶切线性化后,采用电穿孔转化到含腺病毒骨架质粒 AdEasy1 的 BJ5183 大肠杆菌电感受态细菌中,挑选同源重组质粒 AdEasy- GST-π,酶切线性化重组质粒并转染 HEK293 细胞包装成重组病毒颗粒,荧光显微镜观察绿色荧光表达。重组病毒上清乒乓交互感染 HEK293 细胞,荧光显微镜观察绿色荧光表达。结果:经限制性内切酶检测和 GFP 表达证实成功地构建了携带 GST-π 基因的重组腺病毒载体并制备出高滴度重组病毒。结论:成功地构建了携带 GST-π 基因的重组腺病毒载体,为利用 GST-π 基因转染造血干细胞的基因治疗奠定了基础。

【关键词】腺病毒;GST-π;基因工程

【中国图书分类法分类号】R737.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-23

Construction of recombinant adenovirus plasmid containing GST-π gene

LUO Xiaoji, et al

(Department of Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To constuct recombinant adenovirus vector carrying the human glutathione transferase π(GST-π)gene and amplify the adenovirus vector in HEK293cells. *Methods:* GST-π gene with the suitable enzyme site are amplified from the original plasmid through PCR,then subcloned into the shuttle plsmid pAdtrackCMV after digested by the same enzyme.The recombinant plasmid pAdtrack-GST-π linearized by PmeI, plasmid pAdtrack-GST-π was electroporated into E. coli BJ5183 cells that had been electroporated adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1. Picking up the homologous recombant plasmid AdEasy- GST-π,then it was digested with PacI and transfected into HEK293 cells to package the adenovirus,followed by identification of the recombinant adenovirus by means of observation of green fluorescence protein expression under fluorescent microscope. Recombinant virus supernatant infected HEK293 cells repeatedly,and the green fluorescence protein expression Was detected. *Results:* Through the restriction enzyme digestion and expression of GFP ,recombinant adenoviral vector GST-π gene was constructed successfully. *Conclusions:* The recombinant adenoviral vector containing GST-π gene was successfuHy constructed ,and based for the gene therapy of GST-π transferring the hematopoietic stem cells.

【Key words】Adenovirus; GST-π; Gene engineering

化疗实施中所致的肿瘤细胞对化疗药物产生耐药和化疗药物引起的骨髓抑制是化疗成功最大的障碍,临床上对肿瘤的治疗多采用联合化疗。因此将具有不同耐药谱的多种耐药基因导入造血干祖细胞回输体内,可防止骨髓造血系统受化疗药物抑制,甚至在提高药物剂量的情况下耐受化疗毒性,使化疗得以顺利实施,具有重要的临床意义。GST-π 基因编码的谷胱甘肽转移酶 π 是一种多功能药物代谢酶,是除 mdr1 基因以外的一种常见耐药相关基因。目前 GST-π 转染造血干细胞仅采用逆转录病毒体系,其潜在的危险和不足限制了临床应用,而腺病毒载体具有高效、低毒、不整合与基因组、转染效率高的特点,已经广泛应用于基因治疗的基础研究与临床试验。本研究利用腺病毒载体,构建 GST-π 基因的腺病毒转染体系,从而为 GST-π 基因转染人造血干细胞抗化疗药物的研究打下基础。

作者介绍:罗小辑(1977-),男,博士研究生,
主要研究方向:基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No.30330590)。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 主要材料和试剂

质粒 pDNR-LIB-GST-π (EcoRI, XbaI)购自美国 ATCC 公司；腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV 和腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 由美国芝加哥 TC.He 教授惠赠，HEK293 和大肠杆菌 BJ5183 由重庆医科大学感染病研究所惠赠；大肠杆菌 XL-1 购自美国 stratagene 公司；限制性内切酶 SalI, XbaI, KpnI, PacI、PmeI 来自纽英伦公司；DMDM-F12 培养基、新生胎牛血清 (杭州 TBD 公司) 和转染试剂 Polyfect Transfection Reagent 购自德国 Qiagene 公司；质粒小量抽提试剂盒为 QIAGENE 产品与凝胶回收试剂盒来自大连 Takara 公司；电穿孔仪为美国 Bio-Rad Micropulser；DNA 序列的测定由上海生物工程有限公司完成。LB 培养基及 LB agarose 培养基为上海生物工程有限公司产品，其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验技术路线与方法

1.2.1 扩增带有 SalI 和 XbaI 接头的目的基因片段 上游引物：ccg-gtcgac-atgggc-atgc cgccctacac cgtggtct；下游引物：gcc-tctaga-tcactgttt cccgttgcca ttg。PCR 条件为 92℃变性 30s，复性温度 61℃20s，72℃延伸 1min，循环数为 25 个。1.2%琼脂糖凝胶电泳扩增片断大小为 701bp，与理论片断大小相同。

1.2.2 腺病毒穿梭质粒载体 pAdtrack-GST-π 的构建 ①GST-π 基因扩增片段经 SalI 和 XbaI 双酶切。1.2%的琼脂糖凝胶电泳，凝胶回收试剂盒回收 701bp 目的基因 GST-π 片段；腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV 经 SalI 和 XbaI 双酶切，0.8%的琼脂糖凝胶电泳，凝胶回收试剂盒回收 pAdtrack-CMV (SalI、Xbal)。回收的载体片断和目的基因片断 16℃过夜进行酶连反应，终产物直接转化 DH5a 感受态细菌，卡那霉素 LB 培养基平板过夜培养，次日筛选出 10 个克隆，在卡那霉素 LB 培养基中培养过夜，质粒小量抽提试剂盒抽提质粒后，利用上述引物扩增目的基因片段，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒，挑取正确克隆菌液送上海生物工程技术有限公司测序，与 Genebank 上的序列比较两序列的相似性达 100%，无启始密码子与终止密码子的突变正确克隆命名 pAdtrack-GST-π 质粒。②BJ-AdEasey-1 电感受态细菌的制备：取 AdEasey-1 质粒与感受态 BJ5183 大肠杆菌 20μl 混和均匀，冰上预冷操作，电穿孔条件为：1.8kV，200ohm。取 0.5ml 的 LB 培养基洗出 cuvvet 中的细菌，37℃孵育 30min，涂布于 LB 培养基平板（氨苄霉素 50μg/ml）过夜筛选，挑出 10 个克隆，质粒小量抽提试剂盒抽提质粒后，0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒，挑取正确克隆即为含 AdEasey-1 质粒的大肠杆细菌 BJ-Adeasy。挑取单克隆过夜培养后继种于 100ml 含卡拉霉素的 LB 培养基中制备电穿孔感受态细菌。

1.2.3 重组腺病毒载体的构建及鉴定 pAdtrack-GST-π 质粒约 200ng，PmeI 酶切线性化后 SeeDNA 沉淀纯化，溶于 10μl 纯水中，2.5kV 电穿孔转化 BJ-AdEasey 电感受态细菌，取 0.5ml 的 LB 培养基洗出 cuvvet 中的细菌，37℃孵育 30min，分别取 20μl 和 200μl 涂布卡那霉素 LB 培养基平板（50μg/ml）筛选，挑取较小的克隆菌落，卡那霉素 LB 培养基中培养过夜，质粒小量抽提试剂盒抽提质粒后，0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒，选择大于与 BJ-AdEasy 质粒的克隆，PacI 酶切鉴定出现 4.5kb 片段，同时采用上述引物扩增出 701bp 的目的条带者，说明质粒重组成功，标记为质粒 Ad-GST-π，将该质粒通过电穿孔转化电感受态细菌 XL-1，大量扩增出在 BJ5183 中产量不足的重组腺病毒质粒 Ad-GST-π，使用 QIAGEN 公司的去内毒素大抽试剂盒抽提质粒，以提高真核细胞感染效率。

1.2.4 重组腺病毒的转染及乒乓交互感染提高病毒滴度 Ad-GST-π 质粒经 PacI 酶切，酒精沉淀法纯化酶切产物后溶于 30μl 纯水中。转染前 HEK293E 细胞融合度调整为 40%～80%(IMDM 培养基置 C02 孵箱于 37℃，体积分数为 5%的 CO_2 及饱和湿度下培养，10%的胎牛血清)，HEK293E 细胞接种后 24 h，使用 QIAGEN 公司的专用试剂盒 Polyfect Transfection Reagent 进行转染，质粒 Ad-GST-π 量为 4μg，转染试剂 40μl，与无血清及抗生素培养基 120μl 在 22℃孵育 8min。转染后 1 天连续观察 GFP 的表达。14～21 天后，收取第一轮病毒上清，离心沉淀后溶于 1mlPBS 中，在 37℃和液氮条件下反复冻融 3 次，每次 10min，收取病毒上清后再次感染 293 细胞提高滴度。

1.3 重组体腺病毒滴度测定

将 293 细胞按 2×10^5 细胞/孔接种 6 孔板中，待 24h 后感染病毒。取病毒原液作不同比例稀释（1:103～1:1010），每种浓度做 3 个复孔。按每孔 400μl 加病毒稀释液至 293 细胞培养板中，放置 37℃，吸附 4～6h。换新鲜培养基，继续培养 24h，于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数。按下列公式分别计算两种重组腺病毒的滴度：

$$\text{病毒滴度(pfu/ml)}=\frac{\text{GFP细胞阳性数}\times\text{病毒上清稀释倍数 pfu/ml}}{0.4\text{ml}}$$

1.4 病毒感染靶细胞感染效率测定

将 HEK293 细胞，按 2×10^5 细胞/孔接种 6 孔板中，待 24h 后感染病毒。分别用 1、10、20、50、100MOI 的腺病毒感染细胞，48h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数。分别计算各种细胞对两种重组腺病毒的 MOI 值。

1.5 将转染组和未转染组的 HEK293 细胞洗脱后涂片，免疫组织化学染色观察有无 GST-π 蛋白，步骤按说明书操作进行。

2 结 果

2.1 含酶切接头的 GST-π 基因片断的扩增

通过设计带有 SalI、XbaI 的引物及翻译启动盒，成功扩增出总长为 701bp 的目的片断，经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定，可见到扩增片断。见图 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 GST-π 基因的扩增片断

2.2 穿梭质粒 pAdtrack-GST-π 质粒的构建与鉴定

用 SalI, XbaI 同时双酶切 pAdtrack-CMV 和目的基因片断，分别回收目的条带后连接，挑取菌落，提取质粒，0.8%的琼脂糖电泳，挑选电泳滞后的质粒进行 SalI, XbaI 的双酶切后 PCR 鉴定，出现目的条带。

2.3 重组质粒 Ad-GST-π 的构建及鉴定

pAdtrack-CMV 和 AdEasy-1 同源重组后挑选电泳条带后的质粒用 PacI 酶切鉴定。PacI 酶切后的正确质粒应该出现 4.5kb 或和 3.0kb 的片断和约 35kb 片断。0.7% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果与质粒多克隆位点图所示 酶切位点相符从而得以鉴定。见图 2。

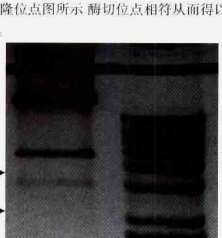


图 2 重组质粒 Ad-GST-π 的鉴定

2.4 重组腺病毒的转染 HEK293 细胞测定

将重组腺病毒 Ad-GST-π 质粒经 PacI 线性化转染 HEK293E 细胞，48h 后在荧光显微镜下即可见 GFP 的表达，随时间的延长表达增强。约 5~7 天后细胞出现病毒感染的病变，细胞出现肿胀，变圆和出现空斑。取病毒上清 PCR 扩增可出现特异的目的基因片断。由此测得的腺病毒滴度为 3.0×10^{9}pfu/ml。见图 3。

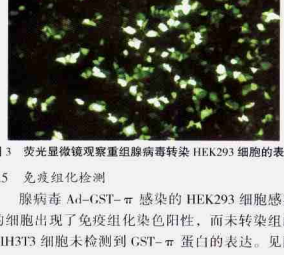


图 3 荧光显微镜观察重组腺病毒转染 HEK293 细胞的表达

2.5 免疫组化检测

腺病毒 Ad-GST-π 感染的 HEK293 细胞感染的细胞出现了免疫组化染色阳性，而未转染组的 NIH3T3 细胞未检测到 GST-π 蛋白的表达。见图 4。

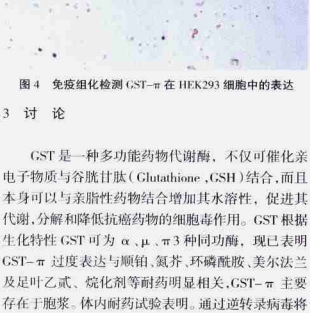


图 4 免疫组化检测 GST-π 在 HEK293 细胞中的表达

3 讨 论

GST 是一种多功能药物代谢酶，不仅可催化亲电子物质与谷胱甘肽(Glutathione，GSH)结合，而且本身可以与亲脂性药物结合增加其水溶性，促进其代谢，分解和降低抗癌药物的细胞毒作用。GST 根据生化特性 GST 可为 α、μ、π 3 种同功酶，现已表明 GST-π 过度表达与顺铂、氮芥、环磷酰胺、美尔法兰及足叶乙甙、烷化剂等耐药明显相关，GST-π 主要存在于胞浆。体内耐药试验表明。通过逆转录病毒将 GST-π 基因转染免疫缺陷鼠骨髓干细胞，进行同种骨髓移植，然后进行环磷酰胺化疗；结果显示，GST-π 基因能保护骨髓细胞，减轻环磷酰胺所致的骨髓抑制作用[1]。体外耐药试验显示，GST-π 基因转染人外周血 $CD34^{+}$ 细胞能增强其对 4-HC 及阿霉

维普资讯 http://www.cqvip.com

素的耐药性[2,3];以上资料直接或间接表明,GST-π 基因与抗肿瘤药物的耐药性有关。从而证实了将 GST-π 基因导入造血干细胞回输骨髓保护化疗中的造血功能切实可行。已有研究表明,细胞对铂类耐药性除与 GST-π 基因有关外,还与硫铁蛋白、多药耐药相关蛋白、核酸剪除修复基因及错配修复基因等的表达有关[4]。

以往将外源性基因导入造血干细胞,多采用鼠白血病病毒 MLV 为基础的逆转录病毒载体,虽然体外实验取得似乎满意的转染效率,但是对造血干细胞亚群的分析及多数基因治疗的效果来看,大多数造血干细胞对逆转录病毒载体具有一定的抵抗性[5-9],可能与造血干细胞多处于静止期有关。由于逆转录病毒载体存在的固有缺陷,病毒滴度低,携带外源基因容量有限,仅感染分裂细胞,表达不稳定并难以控制;随机整合可能导致突变,具有遗传毒性,导致白血病的可能,限制了临床应用。重组病毒因其具有体内外转染效率高,感染细胞范围广,可感染静止期和分裂期细胞,同时又不整合到宿主细胞基因组中,因此常用于多种疾病的基因治疗。由于重组腺病毒具有很高的体内外转染效率,使得更易表达目的基因的功能,越来越多地用于基因功能的研究。1998 年 He[10]等建立的 AdEasy 系统,将线性化的穿梭质粒与骨架质粒共同电转化大肠杆菌 BJ5183 进行细菌内同源重组,所得重组腺病毒质粒可以通过卡那霉素筛选出,并通过质粒大小和限制性内切酶分析鉴定。最后,PacI 酶切后的重组腺病毒质粒转染 293 细胞包装产生重组腺病毒。这种细菌内同源重组法,较之以前的细胞内同源重组法,同源重组效率有了较大提高,方法简便、快速、实验周期短。同时载体自身能同时表达绿色荧光蛋白,因此大大简化了对转染细胞的判断和筛选。

研究显示,腺病毒过表面受体 CAR(科萨奇-腺病毒表面受体)感染造血干细胞,造血干细胞和多种原始的造血系统肿瘤细胞的 CAR 表达丰度较低,如在骨髓 $CD34^+$ 细胞中只有 10%~15%的细胞表达 CAR,CAR 的的低表达是造成腺病毒转染造血细胞低下的主要原因[11]。在无相关细胞因子的前提下重组腺病毒感染造血干细胞能力较差,实验中加大 MOI 值的同时对细胞的毒性也大,MacKenzie 等在腺病毒转染过程中,加入 FL, KL, IL-1,IL-3 因子预处理造血干细胞后,明显起到保护细胞免于腺病毒的细胞毒性作用,从而大幅度提高转染效率,单纯使用含荧光标记的腺病毒感染造血干细胞效率达到 45%~79%[12]。其他研究也证实通过细胞因子的组合,GM-CSF,G-CSF,TNF-α,等处理可以调节腺病毒对造血干细胞的基因转染,并能维持造血干细胞的功能[13,14]。

腺病毒的众多优点是其他载体无法比拟的,以上研究证明,通过对腺病毒转染条件的优化,可显著提高腺病毒的转染效率,从而证实通过腺病毒将 GST-π 基因导入造血干细胞是切实可行的,为 GST-π 基因转染造血干细胞后会输保护化疗状况下的骨髓造血机制的研究提供了实验依据。

(通讯作者:金先庆,重庆医科大学附属儿童医院外科)

参 考 文 献

[1] Dunbar CE, Cottler-Fox M, O'haughnessy JA, et al. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral bloodand bone manow cells contribute to long-term engrftment after autologous transplantation [J]. Blood, 1995; 85:3048-3053.

[2] Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, et al. Firoectin fragment-facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase π gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents [J]. Hum Gene therapy, 1997;8:1901—1910.

[3] Matsunaga T, Sakamaki S, Kuga T, et al. GST-pi gene transduced hematopoietic progenitor cell transplantation overcomes the bone marrow toxicity of cyclophosphamide in mice [J].Hum Gene Ther, 2000;1(12): 1671-1681.

[4] Yang xS, Cui Bx, Jiang S. Molecular mechanism of cisplatin resistallce[J].Prog Obstet Gynecol, 2002;11:475-477.

[5] Dunbar CE, Cottler-Fox M, O'Shaughessy JA, et al. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to longtermengraftment after autologous transplantation [J]. Blood,1995;85:3048-3057.

[6] Hanania EG, Giles RE, Kavanagh J, et al. Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to post-transplant hematopoietic recovery following intensive systemic therapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;94: 15346-15351.

[7] Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy [J]. Nature Med, 1996;12: 1329-1337.

[8] Dao MA, Shah AJ, Crooks GM, et al. Engraftment and retroviral marking of CD341 and CD341CD382 human hematopoietic progenitors assessed in immune-deficient mice[J]. Blood, 1998; 91:1243-1255.

[9] Hessdorfer C, Ayello J, Ward M, et al. Phase 1 trial of retroviral mediated gene transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection

(下转第 493 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

显高于 X 线，参数 MRI 扫描能较清楚的显示椎板切除后硬膜周围软组织的变化及脊髓受压情况，可提高复发性椎间盘脱出与纤维化鉴别诊断的准确率[5,6]。

在动物实验中，MRI 技术也广泛采用。梁裕[7]等采用 MRI 扫描观察，以兔子为实验对象来研究不同剂量非甾类消炎药双氯芬酸钠在预防椎板切除术后硬膜外瘢痕形成中的作用。Ross, JS[8]等指出 MRI 可以半定量评估硬膜外纤维瘢痕的粘连程度。本实验采用 MRI 检测出 24 周时实验节段椎管形态保持完好，人工椎板位置无移位，材料前方椎管侧有 2~3mm 厚骨组织信号影，椎管矢状径比对照节段有扩大，未见材料断裂塌陷、突入椎管，硬膜无粘连受压。对照组椎板缺损处软组织信号影，突入椎管与硬膜粘连，硬膜有受压征象，原因在于瘢痕形成及肌肉突入而非复发性椎间盘的脱出。同时组织学也证实人工椎板材料－组织界面有大量成骨细胞、成熟骨小梁、板层骨出现，n-HA/PA66 碎块被纤维包裹，未见硬膜受牵拉。对照组椎板缺损处由纤维瘢痕组织填塞，硬膜粘连受压。所以采用 MRI 作为椎板切除后纤维粘连、狭窄的检查方法，为 n-HA/PA66 复合材料的临床应用及预后的检测提供一条行之有效的途经。

参 考 文 献

[1] Buroton CV. Lumbosacral arachnoiditis[J]. Spine,1978;1(3):24-30.

[2] Benner B, Ehni G. Spinal arachnoiditis:the postoperative varity in particular[J].Spine,1978;1(3):40-46.

[3] Irstam L. Differential diagnostis recurrent Lumbar discherniation and postoperative deformation by myelography: An impossibie task [J]. Spine, 1984;9(7):759-763.

[4] Brann IF,Hoffman JC,Davis PC, et al.Contrast enhancement in CT differentiation between recurrent discherniation and postoperative scar:a prospective study[J].AJNR Am J Neuroradiol, 1985;6(4):607-612.

[5] Purdy PD, Dumong RT, White CL 3rd, et al. Percutaneous translumbar spinal cord compression injury in a dog model that uses angioplasty balloons: MR imaging and histopathologic findings[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2003;24(2):166-168.

[6] Tidwell AS, Specht S, Blaeser L, et al. Magnetic resonance imaging features of extradural hematomas associated with intervertebral disc herniation in a dog[J]. Vet Radiol Ultrasound, 2002;43(4):319-324.

[7] 梁 裕，张云海，龚耀成.预防椎板切除术后硬膜外瘢痕的实验研究[J].中华创伤杂志，2000;16(6):353-355.

[8] Ross JS,Obuchowski N,Modic MT.MR evaluation of epidural fibrosis: proposed grading system with intra- and inter-observer variability [J]. Neurol-Res,1999; 21(9):6-23.

（上接第 469 页）

in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation[J]. J Clin Oncol, 1998;16:165-172.

[10] 1 He TC, ZhOH S, Costa l, et al. A sim fied system for generation re—eombinant adenovirus [J].Proe NatI Acad Sci USA, 1998;95: 2509-2514.

[11] Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulou G,et al.Effient gene transfer into human CD^{34+} cells by a retargeted adenovirus vector[J].J Virol,2000 ;74:2567-2583.

[12] Karen L, MacKenzie, Neil R. Hackett,et al.Adenoviral vector-mediated gene transfer to primitive human hematopoietic progenitor cells: assessment of transduction and toxicity in long culture[J].blood, 2000; (96)6 1:100-108.

[13] Moldenhauer. Tumor Necrosis Factor Alpha Enhances the Adenoviral Transduction of CD^{34+} Hematopoietic Progenitor Cells[J]. Stem Cells, 2004;22: 283 -291.

[14] Watanabe T,Kelsey NR,Ageitos A,et al.Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to human bone marrow cells [J].Leuk Lymphoma,1998; 29(5-6):439-451.