DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.033
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2165-03

技术方法

大鼠反义p38αMAPK腺病毒载体的构建

Construction of recombinant adenovirus vector from the antisense P38α MAPK gene of rats

郑 军[1],黄跃生[1],黄晓元[2],范鹏举[1],贺伟峰[1],张小容[1],蒋建新[1],粟永萍[1] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]中南大学湘雅医院烧伤整形外科,长沙 430008)

提 要:目的 构建大鼠反义p38αMAPK腺病毒载体。方法 用RT-PCR法扩增大鼠p38αcDNA片段,连接到T载体进行测序,经测序正确后与pAdtrack-cmv vector重组,最后转入AdEasy(tm) XL Adenoviral Vector System系统中,得到p38α基因腺病毒载体。结果 成功构建大鼠p38α腺病毒载体。结论 为在基因水平研究p38α的作用提供了良好工具。

p38MAPK激酶属丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族成员,包括p38α,p38β1,p38β2,p38γ和p38δ5种亚型。p38α与炎症、凋亡等反应密切相关,介导烧伤及其它损伤中的炎症和凋亡等反应,参与心肌等多种组织细胞炎症反应的调控,抑制p38αMAPK(以下简称p38α)激酶的合成、分泌及其活性,是抗炎抗损伤的优选途径[1]。但至今缺乏该亚型特异性抑制剂,鉴于此,本研究采用基因工程的方法,扩增和克隆大鼠p38α基因cDNA片段,构建反义p38α腺病毒载体,为深入研究p38α激酶的作用机制及对烧伤和其它损伤中炎症、凋亡等反应的调控奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌DH5α由烧伤研究所分子生物室保存,BJ5183购自美国Stratagene公司。

1.2 质粒

InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit(T载体试剂盒)购自MBI公司;pAdtrack-CMV vector, pAdEasy-1 Vector购自美国Stratagene公司。

1.3 细胞株

293细胞为腺病毒E1基因转化的人胚肾细胞系,购自美国ATCC公司。

1.4 主要试剂

限制性内切酶*Kpn*Ⅰ、*Hind*Ⅲ购自TaKaRa公司,*Pme*Ⅰ、*Pac*Ⅰ、*Pae*Ⅰ购自New England公司,T4 Ligase购自MBI公司、CIAP购自TAKARA公司,质粒提取试剂盒、凝胶DNA片段回收试剂盒、PCR回收试剂盒购自美国Omega公司;DOTAP脂质体转染试剂盒购自美国Roche公司;细胞培养基DMEM购自GIBCO公司。

1.5 主要仪器

CO_2细胞培养箱(Heraeus公司,德国);Biofuge 28RS低温高速离心机(德国);PAC500电泳仪(美国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);PE9600PCR扩增仪(Perkin Elmer, USA)。

1.6 p38α目的基因片段的扩增

引物由上海申友生物工程公司合成,PAGE纯化。上游引物P1:5′ TGGCTGAGCTGTTGACC 3′,下游引物P2:5′ CAGGCTCTTCCATTCGT 3′。以正常大鼠的心肌细胞总RNA为模板,先用OligodT进行逆转录,再以设计引物进行PCR扩增,反应体系:10×PCR Reaction buffer 5μl, $MgCl_2$和dnTP各0.2 mmol/L,上下游引物各0.5 pmol/μl,cDNA5μl,*Taq*聚合酶1 U。dH_2O将总体积加至50μl,置PCR仪,循环条件:95 ℃预变性3 min;95 ℃ 1 min、56 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,30个循环;72 ℃ 10 min。取5μl PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上(含0.5μg/ml溴化乙锭,以下同)电泳。

1.7 反义p38α腺病毒载体的构建

1.7.1 pT-p38α载体构建及筛选、鉴定 自上述PCR产物中回收0.38 kb大小基因片段,与T载体(记为pT)连接,反应体系(30μl):T载体DNA 3μl,PCR回收纯化产物4μl,10× ligation buffer 3μl,PEG 4000 solution 3μl,T4 DNA ligase 1μl(5 U),BSA 0.75μl(500μg/ml),dH_2O补充至30μl。22 ℃连接过夜,钙转法转入感受态DH5α大肠杆菌,取100μl菌液涂布于含60μg/ml氨苄青霉素、表层涂有40μl x-gal(20 ng/ml)和4μl IPTG(200 ng/ml)的LB蓝白斑筛选固体培养基上,37 ℃孵箱过夜培养。挑取白色单克隆菌落,加入1 ml无抗生素LB液体培养基中,振摇3~4 h,取4μl菌液行PCR筛选(扩增体系及反应条件同前)。将经PCR筛选为阳性克隆(重组体命名为pT-p38α)的菌液于37 ℃、200 r/min条件下振摇过夜,用质粒提取试剂盒提取质粒。重组质粒用*Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ内切酶进行双酶切鉴定,应有0.38 kb目的片段。阳性克隆送上海申友公司测序,同时用*Pae*Ⅰ酶切鉴定反义。

1.7.2 pAdtrack-cmv-p38α载体构建及筛选、鉴定 首先使用

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)和国家杰出青年科学基金资助项目(30125040)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202); Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)
作者简介:郑 军(1971—),男,湖南省邵阳市人,博士研究生,讲师,主要从事烧伤基础与临床方面的研究,现在中南大学湘雅医院攻读博士。电话:(0731)4488874
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173, E-mail: Zhenglhwx2001@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

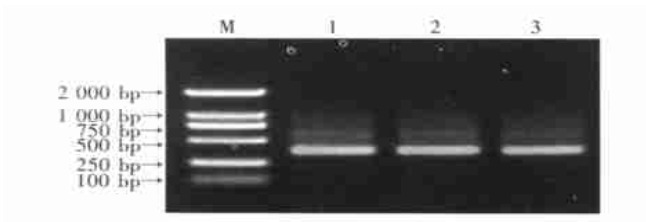
Kpn Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切 pAdtrack-cmv vector 获得 pAdtrack-cmv 片段并经 CIAP 去磷酸化，同时用这两种酶双切 pT-p38α 反义基因（以下简称 p38α），而后将两者用 T4 连接酶连接，获得 pAdtrack-cmv-p38α 载体，转化至感受态 DH5α 细菌中扩增，取 100 μl 涂含 50 μg/ml 卡那霉素的 LB（以下简称卡那 LB）平板。用 PCR 法初筛阳性克隆（扩增体系及反应条件同前），将阳性克隆接种至 5 ml 卡那 LB 培养液中振摇过夜，提取质粒后再用上述两种酶进行酶切鉴定，应有 0.38 kb 目的片段。

1.7.3 pAd-p38α 腺病毒载体构建及转染 293 细胞 将 pAdtrack-cmv-p38α 载体用 *Pme* Ⅰ 酶切线性化后，回收片段与 pAdEasy-1 载体在 BJ5183-AD-1 细胞中进行同源重组得到线性化的 pAd-p38α 载体，该重组体用 *Pac* Ⅰ 单酶切鉴定，应有大小分别为 33.3 kb 和 4.5 kb 片段。将 pAd-p38α 在 DOTAP 介导下转染 293 包装细胞（按 Stratagene 及 Roche 公司操作说明书进行），形成空斑后，提取空斑内容物经 PCR 法检测正确后，将阳性空斑内的提取物继续感染 293 细胞，进行第二次空斑纯化和筛选，得到具有感染能力的 pAd-p38α 腺病毒载体。

2 结果

2.1 心肌细胞总 RNA RT-PCR 产物电泳分析

以正常大鼠心肌细胞总 RNA 为模板进行 p38α 扩增，PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳，在 0.38 kb 左右可见一清晰条带，与预计片段相符（图 1）。



M：DL2000 marker；1、2、3：p38α 基因扩增结果

图 1 p38α 基因 PCR 扩增结果

2.2 pT-p38α 载体的鉴定及反义鉴定

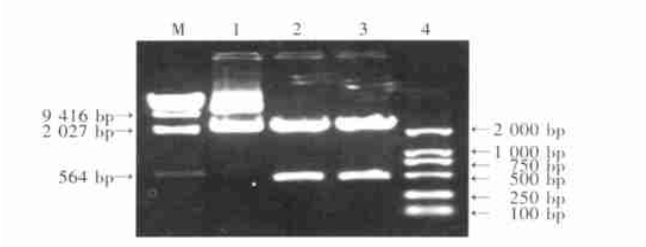
经申友公司测序确定 pT-p38α 中目的基因核苷酸序列与基因库公布的序列完全一致，序列如下：

tgg ctgagctgtt gaccggaaga acgttgtttc ctggtacaga ccatattaac cagcttcagc agataatgcg tctgacgggg acacccccctg cttatctcat taacaggatg ccaagccatg ag-gcaagaaa ctacattcag tctctggccc agatgccgaa gatgaacttc gcaaatgtat ttattggtgc caatcccctg gctgtcgacc tgctggaaaa gatgctggtt ttggactcgg ataagaggat cacag-cagcc caagctcttg cgcatgccta ctttgctcag taccacgacc ctgatgatga gccagtggct gaccctatg accagtcctt tgaaagcagg gacctcctta tagacgaatg gaagagcctg

将测序正确的 pT-p38α 载体用 *Pac* Ⅰ 单酶切鉴定出反义目的基因，取反义 p38α 重组质粒用 *Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定，得到 0.38 kb 片段。

2.3 pAdtrack-cmv-p38α 载体的鉴定

Kpn Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切 pAdtrack-cmv-p38α 重组载体，1% 琼脂糖凝胶电泳，可见大小为 0.38 kb 和 8.3 kb 片段。其中 0.38 kb 片段为 p38α，8.3 kb 片段为 pAdtrack-cmv vector；p38α 片段经核苷酸序列测定法检测与预测结果完全相符（图 2）。

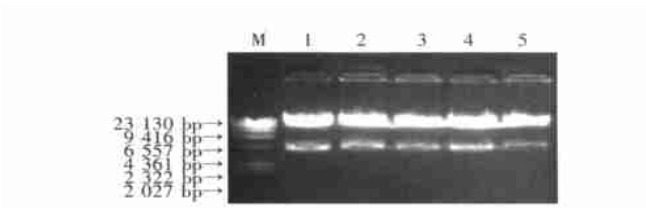


M：λ/*Hind* Ⅲmarker；1：pAdtrack-cmv-p38α 质粒；2、3：pAdtrack-cmv-p38α 经 *Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切后的图谱；4：DL2000marker

图 2 重组质粒 **pAdtrack-cmv-p38α** 经 ***Kpn*** Ⅰ 和 ***Hind*** Ⅲ双酶切鉴定

2.4 pAd-p38α 腺病毒载体的鉴定

Pac Ⅰ 单酶切 pAd-p38α 重组腺病毒载体，0.6% 琼脂糖凝胶电泳可见大小分别为 33.3 kb 和 4.5 kb 片段，与预测结果完全相符（图 3）。将 pAd-p38α 腺病毒载体转染 293 细胞后，7 d 可观察到空斑的产生，提取内容物，经 PCR 检测得到大小为 0.38 kb 的目的片段，用 p38αcDNA 阳性空斑冻融悬液感染 293 细胞，4 d 后均可观察到细胞肿胀，变圆及蚀斑出现。



M：λ/*Hind* Ⅲmarker；1、2、3、4、5：pAd-p38α 经 *Pac* Ⅰ 单酶切后的图谱

图 3 重组体 **pAd-p38α** 经 ***Pac*** Ⅰ 酶切鉴定

3 讨论

丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK），属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是将细胞外刺激信号转导到细胞内并引起细胞核内反应、最终影响基因转录和调控的通路，也是真核细胞转导胞外信号到胞内引起细胞反应的 4 大信号系统之一[2]，参与细胞形成、生长、发育、增殖、分化、转化及运动、凋亡等多种生理过程。其中 p38MAPK 是 Brewster 等 1993 年在研究高渗环境对真菌的影响时发现的一类 MAPK 通路，属“应激激活”的蛋白激酶，许多细胞外刺激如紫外线、脂多糖、缺血缺氧和细胞因子、生长因子、高渗透压等，均可通过细胞内信号传递通路激活 p38MAPK[3,4]。p38MAPK 参与炎症反应、细胞凋亡、肿瘤形成、异常造血等多种调控。其中，炎症、凋亡等反应主要由 p38α 亚型介导。许多研究表明，p38α 激酶途径参与了细胞多种促炎因子的生成调控，是已知信号途径中与炎症关系最为密切的细胞信号转导通路。当细胞受到缺血缺氧、牵张、内毒素、炎症因子等因素刺激后，p38α 激

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶可迅速活化, 引发多种促炎因子表达, 加剧炎症反应和组织损伤。文献[5] 报道, p38α 激酶在烧伤后 1 h 即可迅速激活且长时间保持活化, 在烧伤后炎症反应和心肌损伤中起重要作用。

由于 p38α 激酶在介导炎症、凋亡反应及组织损伤中的重要作用, 抑制其合成、分泌及其活性从而减缓此类不良反应和组织损伤显得尤为必要。然而, 国内外至今缺乏针对 p38α 激酶的特异抑制剂。现有的 SB 类化合物(如 SB203580、SB202190 等)是目前使用最多的 p38 激酶抑制剂, 虽能抑制 α 亚型, 但特异性都不高。鉴于此, 本研究拟用基因工程技术, 克隆 p38α 激酶基因 cDNA 片段, 构建反义 p38α 腺病毒载体, 以导入细胞特异性靶向抑制 p38α 激酶。目前, 有关基因转染研究最多的载体为腺病毒载体, 和其他基因载体相比, 腺病毒载体具有宿主范围广、感染率高、理化性质较稳定、遗传毒性较低等特点, 被广泛用于基因治疗[6]。加之本研究后续实验拟将 p38α 基因导入终末分化性的心肌细胞, 要求载体具有很高的转染能力和较小的细胞毒性, 故采用该载体。首先, 根据基因库中提供的基因序列用 RT-PCR 法扩增出 p38αcDNA。随后, 将 p38αcDNA 与 T 载体连接并扩增, 测序及反义鉴定正确后电转法转入 pAdtrack-cmv 载体进行重组。重组成功的 pAdtrack-cmv-p38α 与 pAdEasy-1 载体在 BJ5183-AD-1 细胞中进行同源重组得到线性化的 pAd-p38α, 但由于 pAdEasy-1 载体, 缺失了 E1 和 E3 区称为复制缺陷病毒, 故必须在经 E1A 转化的人胚肾细胞 293 细胞中, 利用其产生的 E1A 蛋白, 反式作用于重组体 DNA, 使重组体得到有效的复制并包装成具有感染性的缺陷型腺病毒[7]。本实验利用同源重组的方法, 在 293 细胞中成功地构建了具有感染能力的大鼠反义 p38α 腺病毒载体, 将为从 p38α 信号转导水平进行干预, 在信号通路水平阻断和调控 p38α 的表达和活性, 防止细胞凋亡、下调促炎因子的过度表达、减轻炎症反应和组织损伤以及深入研究 p38α 激酶作用机制提供有力武器和开辟新的治疗途径。

关键词: p38αMAPK; 重组腺病毒; 基因
中图法分类号: R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Hommes D W, Peppelenbosch M P, van Deventer S J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets[J]. Gut, 2003, 52(1): 144－151.
[2] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911－1912.
[3] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. Cell, 2000, 103(2): 239－252.
[4] Ellington J K, Elhofy A, Bost K L, *et al*. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in staphylococcus aureus invasion of normal osteoblasts[J]. Infect Immun, 2001, 69(9): 5235－5242.
[5] 张家平, 黄跃生, 刘　敬, 等. 烫伤大鼠心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶的活化及胞内分布规律的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 137－140.
[6] Graham F L. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells[J]. Immunol Today, 2000, 21(9): 426－428.
[7] Rrham F L, Rowe D T, McKinnon R, *et al*. Transformation by human adenoviruses[J]. J Cell Physiol Suppl, 1984, 3: 151－163.

(编辑　刘洪娥)

(上接 2164 页)

截面形状正好与投射方向病灶的形状吻合, 经过等中心照射, 在病人体内形成一高剂量区, 且空间形状与病灶体积一致。靶区获得最大的照射剂量, 同时尽量减低周围正常组织的照射剂量, 以达到精确的适形放疗。采用手动多野光栏, 在使用上应注意以下几个方面。

3.1　MLC 与直线加速器小机头旋转的配合使用

手动 MLC 存在叶片不能过中线的问题, 限制了射野在其纵轴方向上的使用, 通过旋转小机头 90°或 270°, 则可以以 MLC 横轴方向的射野形式满足纵向布野。

3.2　模板制作的注意事项

模板制作应严格按照三维治疗计划系统所给出的有效照射野, 采用有机玻璃制成模板。首次治疗时, 应将其确定好的 MLC 射野轮廓在模拟机对照验证, 避免方向错误和前后颠倒引起的治疗失误。

3.3　注意 MLC 的局限性

由于 MLC 对侧叶片不能过中线, 有时不能满足需要过中线遮挡的部分; 相邻叶片之间由于平面相接, 存在漏射问题; 叶片前端为直面, 存在透射半影等。这些都需要在野的设计时充分考虑, 如确实无法克服, 仍以采用低熔点铅挡块为好。

三维适形放射治疗具有照射精度高, 剂量分布好, 肿瘤靶区可以得到高剂量照射, 同时周围组织能够得到良好保护的特点, 是放射治疗的前沿技术, 高质量的治疗实施是实现上述优点的关键。总之我们在实践中总结出的治疗实施中的重要环节, 我们体会只要把握好上述的 3 个环节, 就能够保证摆位的准确性和良好重复, 能够保证照射野与靶区形状的高度适合, 取得较好的治疗效果。

关键词: 三维适形放射; 多叶准直器
中图法分类号: R730.55　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Lax I, Blomgren H, Naslund I, *et al*. Stereotactic radiotherapy of malignancies in the abdomen[J]. Acta Oncol, 1994, 33(6): 677－679.
[2] Biomgren H, Lax I, Naslund I, *et al*. Stereotactic high dose fraction radiation therapy of extracranial tumors using an accelerator clinical experience of the first thirty-one patients[J]. Acta Oncol, 1995, 34(6): 861－870.
[3] 王　希, 肖　红, 庞学利, 等. 手动式多叶准直器临床应用 53 例报告[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 154, 163.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net