DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.020
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2026 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-2026-03

逆转录病毒载体介导胰岛素原基因突变体与葡萄糖激酶基因共转染的应用价值

郑宏庭,邓华聪,蹇 锐,兰丽珍,方 芳 (重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

提 要:目的 研究逆转录病毒载体介导基因共转染的效率,探讨其在基因共转染领域的应用价值。方法 以携葡萄糖激酶(glucokinase, *gk*)基因的逆转录病毒及携人胰岛素原基因突变体(mutant proinsulin gene, *mpin*)的逆转录病毒共同感染HepG2细胞,经G418筛选,放免法、SDS-PAGE、Western-blot挑选联合表达GK及成熟胰岛素的HepG2细胞,RT-PCR鉴定。结果 G418筛选3周获阳性细胞克隆,采用放射免疫法、SDS-PAGE、Western-blot从20个细胞克隆中挑选出联合表达GK及成熟胰岛素的HepG2细胞4株,选取1株命名为细胞克隆"β";RT-PCR证实细胞"β"中已有两个目的基因的转录。结论 在需要目的基因长期表达的基因共转染领域,逆转录病毒载体仍有一定的应用价值,但如何提高其介导的基因共转染效率有待进一步探究。

关键词:逆转录病毒载体;基因共转染
中图法分类号:R373.9;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Glucokinase gene and mutant proinsulin gene transfected by retroviral vector

ZHENG Hong-ting, DENG Hua-cong, JIAN Rui, LAN Ni-zhen, FANG Fang (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the application of retroviral vector in gene cotransfection. **Methods** The HepG2 cells were infected with recombinant retrovirus carrying glucokinase (*gk*) gene and mutant proinsulin (*mpin*) gene, and then screened with G418. HepG2 cells transfected with *gk* and *mpin* genes were selected by radioimmunoassay, SDS-PAGE, and Western blot and identified by RT-PCR. **Results** The positive clones were obtained by screening with G418 for 3 weeks. Four clones with *gk* and *mpin* gene expression were selected out by radioimmunoassay, SDS-PAGE, and Western blot from 20 positive clones. We picked up one clone with strong *gk* and *mpin* gene expression and named it as clone "β". RT-PCR confirmed that the clone "β" had *gk* gene and *mpin* gene transcription. **Conclusion** In the cotransfection field which needs long-term expression of the target genes, retroviral vectors are of some applied values, but how to improve the efficiency of cotransfection needs further studies.

Key words: retroviral vector; gene; cotransfection

基因共转染是指将两个目的基因分别构建在两个互不相连的载体上,一同导入宿主细胞的过程,它与单独转染相比有着许多的优点:①可以避免构建一个复杂的重组体;②可以根据实验目标,任意调整两载体间的比例;③可以充分发挥两个目的基因间的协同作用或者用于探讨两基因间的相互作用和关系[1]。目前,共转染常用的载体是质粒和腺病毒,逆转录病毒载体由于不能转染有丝分裂后细胞,故较少应用于这一领域。但是,逆转录病毒载体又具有质粒和腺病毒载体所不具备的特点:它可以将目的基因整合到靶细胞染色体中稳定表达,适用于需长期表达的转基因治疗[2]。因此,我们尝试以逆转录病毒为载体,介导葡萄糖激酶(glucokinase, *gk*)基因与人胰岛素原基因突变体(mutant proinsulin gene, *mpin*)的共转染,构建具有葡萄糖反应性胰岛素分泌能力的"胰岛代理细胞",并由此探讨逆转录病毒载体在基因共转染领域的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

携*gk*基因的逆转录病毒已先行构建,携*mpin*的逆转录病毒由本室兰丽珍[3]博士构建,HepG2细胞购自中山医科大学病理研究所。Polybrene购自Sigma公司,DMEM、G418购自Gibco公司,TriPure™ Isolation Reagent Kit购自Boehringer Mannheim公

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070356)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070356)
作者简介:郑宏庭(1974-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事糖尿病基因治疗方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)65220382,E-mail:fnf7703@sina.com
通信作者:邓华聪,电话:(023)68700611
收稿日期:2004-03-22;修回日期:2004-07-15

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

司, RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, 引物由上海申友公司合成。羊抗鼠 GKIgG 由 Dr. Magnuson Mark(Vanderbilt University Medical School)惠赠, 兔抗羊 IgG 购自 Southern Biotechnology 公司。

1.2　方法

1.2.1　*gk* 基因与 *mpin* 共转染　　HepG2 细胞在含 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养基中, 37 ℃, 5% CO_2 培养至对数生长期, 加入携 gk 基因的逆转录病毒(滴度为 1.8× 10^6 cfu/ml)3.6× 10^5 cfu、携 *mpin* 的逆转录病毒(滴度为 2.6× 10^5 cfu/ml)2.6× 10^5 cfu, 并加 Polybrene 至终浓度 8 μg/ml, 吸附 4 h 后, 换用 DMEM 培养基培养 12 h; 用携目的基因的逆转录病毒同前再度感染 HepG2 细胞 3 次, 最后一次吸附 4 h 后, 换用 DMEM 培养基培养 24 h。将感染后的 HepG2 细胞按 1∶20 分传, 用含 G418(1 mg/ml)的选择培养基筛选, 直至抗性细胞集落形成, 用克隆环挑取分隔良好的细胞克隆扩大培养并进行产物鉴定。

1.2.2　胰岛素浓度的测定　　挑取的细胞克隆移至 24 孔板, 换含 G418(600 μg/ml)的选择培养基扩大培养。细胞计数, 测定上清胰岛素浓度, 以 HepG2 细胞及转了空载体(PLXSN)的 HepG2 细胞对照。胰岛素浓度在新桥医院内分泌科实验室以放射免疫法测定。

1.2.3　SDS-PAGE 和 Western-blot　　测出胰岛素表达的各细胞克隆转入中号瓶培养, 取 5× 10^6 个细胞悬于 150 μl PBS 中, 加入等体积缓冲液, 超声破碎, 行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析, ECL 显色, 检测 GK 表达。并用 Hela 细胞、HepG2 细胞及转了空载体(PLXSN)的 HepG2 细胞对照。

1.2.4　RT-PCR　　用 TriPure™ Isolation Reagent Kit 提取共表达 GK 及成熟胰岛素的 HepG2 细胞总 RNA 及转了空载体(PLXSN)的 HepG2 细胞总 RNA, 分别用大鼠 *gk* 基因及人 *mpin* 特异性引物进行 RT-PCR, 方法按 Promega 公司说明。取 5% 的反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外透射仪观察。

2　结果

2.1　细胞生长

在 G418 选择培养基中, 约 3 周可见抗性细胞集落形成, 挑选 20 个分隔良好的细胞克隆扩大培养并行产物鉴定。

2.2　胰岛素的检测

细胞计数约(2~3)× 10^5 个/孔, 共 12 个细胞克隆测出胰岛素表达, 结果如表 1; 另 8 个克隆以及对照的 HepG2 细胞及 PLXSN-HepG2 细胞测不出胰岛素表达, 记为"0"。

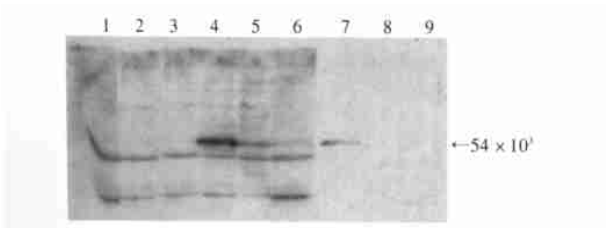
表 1　胰岛素的检测结果(U/L)

Tab 1　Insulin levels secreted by transfected HepG2 cells (U/L)

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Insulin	0.07646	0.07594	0.05155	0.03643	0.02426	0.02117	0.01937	0.03754	0.05582	0.01836	0.06644	0.05562

2.3　SDS-PAGE 和 Western-blot 结果

测出胰岛素表达的 12 个细胞克隆分两组进行 SDS-PAGE 和 Western-blot, 每组 6 个样本, Hela 细胞、HepG2 细胞及 PLXSN-HepG2 细胞 3 个对照。第 1 组检测结果见图 1, 共 4 个细胞克隆测出 GK 表达(克隆 1、2、3、4), 对照的 Hela 细胞、HepG2 细胞及 PLXSN-HepG2 细胞均为阴性; 第 2 组所有样本均为阴性。挑选出胰岛素和 GK 表达均较强的克隆 1, 命名为细胞克隆"β"。



1: Hela cells; 2: HepG2 cells; 3: HepG2 cells transfected with PLXSN; 4—9: Clones 1—6 (HepG2 cells transfected with *mpin* and *gk* genes)

图 1　第 1 组样本 Western-blot 的检测结果

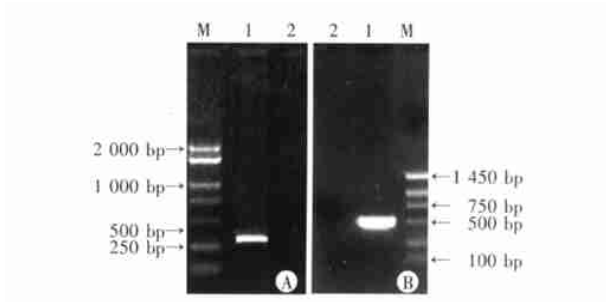
Fig 1　Western blot analysis of GK in Group 1

2.4　RT-PCR 结果

mpin 特异性引物的 RT-PCR 结果(图 2A): 以细胞"β"总 RNA 为模板阳性扩增, 产物 286 bp; 以 PLXSN-HepG2 细胞总 RNA 为模板阴性扩增。

大鼠 *gk* 基因特异性引物的 RT-PCR 结果(图 2B): 以细胞"β"总 RNA 为模板阳性扩增, 产物 498 bp; 以 PLXSN-HepG2 细胞总 RNA 为模板阴性扩增。

证明在细胞"β"中已有两个目的基因的转录表达。



A: Electrophoretic analysis of RT-PCR products of *mpin* gene　M: Marker DGL2000; 1: "β" Clone; 2: HepG2 cells transfected with PLXSN

B: Electrophoretic analysis of RT-PCR products of *gk* gene　M: Marker; 1: "β" Clone; 2: HepG2 cells transfected with PLXSN

图 2　RT-PCR 产物凝胶电泳图

Fig 2　Gel electrophoretic analysis of the RT-PCR products

3　讨论

糖尿病的细胞移植治疗是近来研究的热点, 但由于胰岛 β 细胞分离技术难度较大、代价昂贵, 我们希望

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

通过细胞工程及转基因技术建立新的移植细胞来源[4]。这种新的移植细胞首先必须能够表达成熟胰岛素,而且其胰岛素的分泌还要受血糖浓度的调控。体内胰岛素分泌反应的强度与葡萄糖在胰岛β细胞内的代谢率成正比,因而控制葡萄糖流入β细胞速率的酶类被认为是调节胰岛素释放的葡萄糖传感器,GK就是β细胞内的葡萄糖传感器。其活性直接或间接受血糖浓度的调节,从而改变葡萄糖在胰岛β细胞内的代谢率、调节胰岛素分泌[5]。而肝细胞是胰岛素作用的靶细胞之一,其内含有多种与葡萄糖代谢相关的关键酶,是构建生理性胰岛素分泌反应的理想靶细胞。因此,本研究将 *gk* 基因与 *mpin* 基因[3]共同转染HepG2细胞,体外构建具有葡萄糖反应性胰岛素分泌能力的细胞模型。一方面,该细胞可以表达成熟胰岛素,并通过GK的作用,使胰岛素的分泌受血糖浓度的调节;另一方面,通过GK促进葡萄糖磷酸化,还可以协同胰岛素控制血糖及其他代谢紊乱。

构建这一工程细胞系需要高效、稳定的转染载体,简便、易行的转染途径。质粒和腺病毒载体虽可高效转染靶细胞,却不能将目的基因整合到染色体中长期、稳定表达,故不适用于需长期表达的转基因治疗。因此,我们运用基因共转染技术,选用逆转录病毒载体介导两个目的基因的共转染,使目的基因能够整合入宿主细胞染色体DNA中长期、稳定表达的同时,又避免因先后导入两个单独基因而带来繁琐操作[6]。

由于逆转录病毒载体对于非分裂期细胞无感染能力,故其介导的基因转染效率较低[7]。在研究中我们认为一定间隔期的多次重复感染有助于提高基因转染效率。一方面,通过间隔期可以清洗掉封闭靶细胞表面结合位点的病毒;另一方面,多次重复感染可以保证更多的细胞处于分裂期,从而提高逆转录病毒载体介导的基因转染效率。另外,根据研究目标不同,调整两个携目的基因病毒间的比例,可以得到不同的表达结果。

本研究中,我们挑选了20个细胞克隆进行产物鉴定,检测出GK与胰岛素共表达的细胞克隆4个,共转染效率为20%。挑选出胰岛素和GK表达均较强的克隆命名为细胞克隆"β",并对其进行RT-PCR分析,证实在细胞"β"中已经存在两个目的基因的转录。通过放射免疫法以及Western-blotting,测出了GK与胰岛素的共同表达。

综上所述,我们认为在需要目的基因长期表达的基因共转染领域,逆转录病毒载体仍有一定的应用价值,但其介导的基因共转染效率远远低于质粒或腺病毒,由此带来后期筛选、鉴定的难度较大。如何进一步提高其介导的基因共转染效率是该方法迫切需要解决的问题。

参考文献:

[1] 薛丽香,张宗玉,童坦君. 共转染技术在基因表达与功能方面的应用[J]. 生命的化学,2002,22(4):392-394.

[2] Leibowitz G, Beattie G M, Kafri T, *et al*. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors[J]. Diabetes, 1999, 48(4): 745-753.

[3] 兰丽珍,邓华聪,孙 辽,等. 人胰岛素原突变体重组逆转录病毒及稳定包装细胞系的构建和鉴定[J]. 山西医科大学学报,2004,35(2):97-100.

[4] Robertson R P. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress[J]. N Engl J Med, 2004, 350(7): 694-705.

[5] Tappy L, Dussoix P, Iynedjian P, *et al*. Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene[J]. Diabetes, 1997, 46(2): 204-208.

[6] Ding C L, Yao K, Zhang T T, *et al*. Expression of HBcAg in eukaryotic cells by retroviral vector mediated gene transfer[J]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2003, 17(1): 81-84.

[7] Merten O W. State-of-the-art of the production of retroviral vectors[J]. J Gene Med, 2004, 6(Suppl 1): S105-124.

(编辑 栗 嘉)

欢迎订阅《中华现代眼科学杂志》

《中华现代眼科学杂志》为中华临床医药学会主办的医学专业学术刊物,月刊,具有ISSN/CN标准刊号。现已被中华首席医学网(www.shouxi.net)全文收录。国内外读者可以在网上免费阅读杂志全文。本刊贯彻党和国家的卫生工作、方针、政策,旨在反映我国临床科研工作的重大进展,促进国内外学术交流。刊登该学科领域的科研成果和临床诊治经验、学术研究、技术改进以及对临床有指导作用的专家评论等。

本刊主要栏目有:论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药(专科经方验方)、新技术新材料、专题讲座、技术与方法、学术动态、国外研究进展、病例报告、误诊分析、经验交流、流行病学与人群防治、基层园地、保健知识讲座、专科检查与临床、药物与临床、专科护理等。本刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省、部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

地 址:北京市100035-55邮政信箱《中华现代眼科学杂志》编辑部 邮 编:100035

电 话:(010)62245829,62242528 E-mail:yankexue@sohu.com

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