DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.009
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1439-03

论著

葡萄糖激酶基因逆转录病毒表达载体及包装细胞系的构建及鉴定

郑宏庭,邓华聪,蹇 锐,兰丽珍,方 芳 (重庆医科大学第一附属医院内分泌科,重庆 400016)

提 要:目的 构建葡萄糖激酶(glucokinase, GK)基因逆转录病毒表达载体及稳定的产毒细胞系,为将GK基因应用于糖尿病的基因治疗打下基础。方法 质粒pCMV4-GKZ1经*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切后亚克隆至逆转录病毒载体PLXSN,构建成重组逆转录病毒表达载体PLX-GK,采用酶切及测序对重组体进行鉴定。而后脂质体转染PLX-GK至包装细胞PA317,检测培养上清病毒滴度,挑选滴度较高的稳定产毒细胞系并对其行PCR及免疫组化鉴定。结果 构建了GK基因逆转录病毒表达载体PLX-GK,经酶切及序列分析证实目的基因插入位点和读码框架正确、无突变;建立了稳定产毒细胞系PA317/GK,其培养上清平均病毒滴度为6.8×10^5 cfu/ml,最高为1.8×10^6 cfu/ml,PCR及免疫组化证实GK基因整合入PA317/GK细胞基因组并有GK的表达。结论 成功构建了携GK基因的逆转录病毒表达载体及高滴度的稳定产毒细胞系。

关键词:葡萄糖激酶基因;逆转录病毒载体
中图法分类号:R782;R394-33;R587.102 文献标识码:A

Construction and identification of a retroviral vector containing GK gene and its package cell line

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

Abstract: Objective To establish a retroviral vector containing GK gene and a stable vector production cell line, for the application of GK gene in diabetes treatment. Methods The plasmid pCMV4-GKZ1 was digested by *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ, and then subcloned to retroviral vector PLXSN, which constructed the recombinant plasmid PLX-GK. The recombinant of GK expression vector was evaluated by enzyme-digestion and sequencing. The PLX-GK was transfected to packaging cell line PA317 with lipofectamine2000. The titre of the recombinant virus in the supernatant was detected. The high-titre cell lines were chosen for culture, and then evaluated by PCR and immunohistochemistry. Results The retroviral vector containing GK gene was established successfully, which was confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. The vector production cell lines PA317/GK were established. Average titres of the recombinant virus in the culture supernatants was about 6.8×10^5 cfu/ml (The highest titre was 1.8×10^6 cfu/ml). GK gene integration and expression were detected by immunohistochemistry and PCR. Conclusion A retroviral vector containing GK gene and a high-titre vector production cell line PA317/GK are successfully constructed.

Key words: GK gene; retroviral vector

糖尿病是由遗传和环境因素相互作用而引起的一种疾病,由于其发病机制尚未完全明了,目前其治疗仍以胰岛素替代疗法为主。但随着对糖尿病分子生物学研究的深入,人们对基因在糖尿病发病中的作用有了更多的认识,这就使糖尿病的基因治疗成为一种可能,也为糖尿病的治疗带来新的希望。葡萄糖激酶(glucokinase,GK)是一种己糖激酶,其基因位于第7号染色体短臂上,目前已经证实GK基因突变是青年发病的成年型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young, MODY)发生最重要的原因[1]。研究还表明在糖尿病个体中普遍存在着GK活性下降,改善其活性,可逆转糖尿病的糖、脂等代谢紊乱[2]。为了进一步阐明GK基因与糖尿病的联系,并最终将其应用于糖尿病的基因治疗,我们先行构建了GK基因逆转录病毒表达载体及稳定的产毒细胞系。

1 材料和方法

1.1 材料

Rat GK质粒(pCMV4-GKZ1)、抗鼠GK IgG由Dr M. A. Magnuson惠赠(Vanderbilt University Medical School),逆转录病毒载体

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
通信作用:邓华聪,电话:(023)68700611
收稿日期:2004-01-07;修回日期:2004-06-01

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

PLXSN 由第三军医大学微生物学教研室蹇锐博士惠赠。包装细胞 PA317、NIH3T3 细胞来自第三军医大学微生物学教研室。脂质体 Lipofectamine^{2000}购自 Invitrogen 公司，DNA 限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ，T4 连接酶，*Taq* 酶购自华美生物工程公司，DMEM、G418 购自 Gibco 公司，质粒抽提及回收试剂盒购自上海申友公司，S-P 免疫组化试剂盒购自中山公司。

1.2 方法

1.2.1 GK 基因重组逆转录病毒载体的构建 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切质粒 pCMV4-GKZ1 和逆转录病毒载体 PLXSN，将 *Bam*HⅠ-GKcDNA-*Eco*RⅠ片段亚克隆到双酶切逆转录病毒载体上，构建成重组载体 PLX-GK。*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切、单酶切鉴定，TaKaRa 公司 ABI 测序仪鉴定。

1.2.2 重组逆转录病毒的包装、筛选 转染前，先用荧光载体 pEGFP-N2 转染 PA317 细胞，观察转染效率。PA317 细胞经 HAT（H：1×10^{-4} mol/L；A：4×10^{-7} mol/L；T：1.6×10^{-5} mol/L）筛选，以脂质体 Lipofectamine^{2000}转染重组逆转录病毒载体（PLX-GK）至包装细胞 PA317，3d 后加 G418 选择培养液（1 mg/ml）筛选，直至可见细胞克隆，用克隆环挑取分隔良好的细胞克隆扩大培养。

1.2.3 病毒滴度测定 移出各细胞克隆培养液倍比稀释后加入 6 cm 培养皿中 NIH3T3 细胞上，加 Polybrene 至终浓度 8 μg/ml，37 ℃、5% CO_2 培养 5 h，补加 DMEM 至 Polybrene 终浓度 2 μg/ml 培养 48 h。然后将细胞 1∶10 分传入 G418 选择培养液（1 mg/ml）中，直至可见细胞克隆，倒置显微镜下计算克隆形成数，计算病毒滴度。

1.2.4 产毒细胞系的鉴定 提取病毒滴度最高的产毒细胞基因组 DNA，用大鼠 GK 特异性引物行 PCR 扩增，同时对该细胞中 GK 表达行 S-P 免疫组化鉴定，均分别以转入空载体（PLXSN）的 PA317 细胞作对照。

2 结果

2.1 GK 基因重组逆转录病毒载体鉴定

2.1.1 酶切鉴定 PLX-GK 经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切，1% 的琼脂糖凝胶电泳于 1 450 bp 及 5 800 bp 位置出现目的条带，与目的基因及载体片段大小相符（图 1）。



1：λ-*Hind*Ⅲ DNA Marker；2：PLX-GK；3：PLX-GK digested with *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ；4：DNA Marker DL2,000；5：PLX-GK digested with *Eco*RⅠ；6：PLX-GK digested with *Bam*HⅠ

图 1 GK 基因重组逆转录病毒载体酶切鉴定

Fig 1 Enzyme digestion of the recombinant GK expression vector

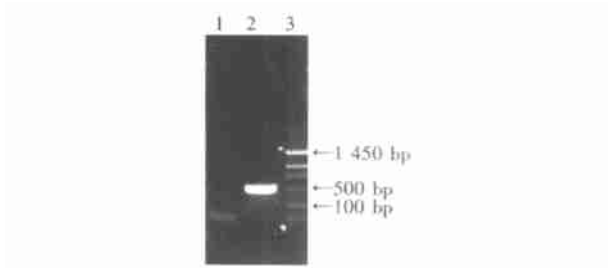
2.1.2 测序鉴定 目的基因与 Andreone[3] 文献中 GKZ1 序列完全相同。

2.2 病毒滴度测定

用 PA317/GK 病毒上清感染 NIH3T3 细胞，在 G418 选择培养基中，约 3 周可见抗性细胞克隆形成，平均病毒滴度为 6.8×10^5 cfu/ml，最高 1.8×10^6 cfu/ml。

2.3 产毒细胞系的鉴定

2.3.1 PCR 鉴定（图 2） PA317/GK 细胞扩增出 500 bp 的条带，而 PA317/PLXSN 细胞未扩出相应条带。



1：PA317/PLXSN；2：PA317/GK；3：Marker

图 2 产毒细胞中 GK 基因 PCR 鉴定

Fig 2 Electrophoresis of GK gene PCR products in virus production cell

2.3.2 S-P 免疫组化鉴定（图 3） PA317/GK 细胞的胞核、胞浆中可见棕黄色阳性颗粒，而 PA317/PLXSN 细胞几乎未见阳性染色。



A：PA317 cell transfected with PLX-GK；B：PA317 cell transfected with PLXSN

图 3 PA317/GK 细胞中 GK 表达的免疫组化鉴定 （S-P×200）

Fig 3 Expression of GK in PA317/GK cell detected by immunohistochemistry （S-P×200）

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

3　讨论

GK 由 465 个氨基酸构成, 特异性存在于成熟肝细胞和胰岛β细胞中, 参与糖代谢与胰岛素分泌过程中的多个重要环节。目前已经证明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[4]。GK 活性直接或间接受血中葡萄糖浓度的调节, 从而改变葡萄糖在β细胞内的代谢率, 调节胰岛素分泌。同时该酶又可通过促进肝糖原合成, 催化葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖来调节血糖浓度, 因而 GK 活性异常在糖代谢紊乱的发生发展中起着重要的作用。研究表明, 在肥胖型糖尿病患者及一些动物模型中, 如饥饿鼠、高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠肝细胞 GK 活性均比正常明显下降[5]; 另一些研究结果还表明, 提高 GK 活性可显著降低血糖[6]。另外, 在糖尿病的候选基因中, GK 基因也在其列, 许多研究结果证明 GK 与 MODY 密切相关, 其基因突变在 MODY 的发病中起着决定性的作用[7]。因此, 将 GK 基因应用于糖尿病的基因治疗有着广阔的应用前景。

将目的基因导入靶细胞获得长期稳定的表达是基因治疗的一个重要环节, 而选择高效、稳定的转染载体是达到这一目的的关键。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, 故不适于需长期表达的转基因治疗[8]。逆转录病毒载体可将目的基因有效输入细胞核, 高效整合并稳定表达, 是目前基础和临床应用研究中最广泛使用的基因载体。因此, 我们构建了 GK 基因逆转录病毒表达载体及稳定的产毒细胞系, 为下一步工作打下基础。

从实验中我们认为, 要建立稳定并且高效的产毒细胞系, 挑选的细胞集落数应较大, 因为外源基因只是随机整合到包装细胞的基因组 DNA 中, 常常受正常机制的降解从细胞中排除出去, 因而外源目的基因容易丢失。本研究中, 我们挑选了 50 个细胞克隆进行病毒滴度测定, 大于 1.0×10^6 cfu/ml 仍只占很小比例也说明了这一问题。从中我们筛选出一株滴度达 1.8×10^6 cfu/ml 的产毒细胞系并对其进行了 PCR 及免疫组化鉴定, 结果证实目的基因已稳定整合到 PA317 细胞基因组中, 并表达出 GK 蛋白。通过感染 NIH3T3 细胞还充分证实了重组病毒的活性及其转染靶细胞的效率, 为下一步的研究工作奠定了基础。

接着, 我们准备将 GK 基因与人胰岛素原基因突变体[9] 一同转入细胞, 获得长期、稳定的表达, 并通过 GK 使该细胞的胰岛素表达受葡萄糖浓度的调节。进一步的动物体内实验, 可望获得完全符合生理要求的胰岛素分泌, 并通过 GK 促进葡萄糖磷酸化, 以协同胰岛素控制血糖及其它代谢紊乱。

参考文献:

[1] Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, *et al*. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Nature, 1992, 356(6365): 162－164.

[2] Reul B A, Amin S S, Buchet J P, *et al*. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats[J]. Br J Pharmacol, 1999, 126(2): 467－477.

[3] Andreone T L, Andreone T L, Pilkis S J, *et al*. The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA[J]. Biol Chem, 1989, 264(1): 363－369.

[4] Tappy L, Dussoix P, Jynedjian 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.

[5] Caro J F, Triester S, Patel V K, *et al*. Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes[J]. Horm Metab Res, 1995, 27(1): 19－22.

[6] Milagro F I, Gomez A J, Martinez A E, *et al*. Effect of a beta3-adrenergic agonist on liver glucokinase gene expression in alloxan-diabetic rats[J]. Physiol Biochem, 1999, 55(1): 25－31.

[7] Cao H, Shorey S, Robinson J, *et al*. GCK and HNF1A mutations in Canadian families with maturity onset diabetes of the young(MODY)[J]. Hum Mutat, 2002, 20(6): 478－479.

[8] 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.

[9] 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.

（编辑　栾　嘉）

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