DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.006
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0763-04

论著

NT3基因的克隆、鉴定及高表达胚胎干细胞的构建与筛选

钟小林[1],秦茂林[2] (第三军医大学基础医学部:[1]生物化学与分子生物学教研室,[2]组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 从小鼠肝脏组织中克隆神经营养因子NT3基因,在此基础上构建能稳定表达NT3的MESPU35细胞株。方法 RT-PCR扩增目的基因,克隆入穿梭载体pExchange-1neo,酶切及测序鉴定。重组载体转染MESPU35胚胎干细胞株,G418长期筛选,RT-PCR检测转染细胞NT3水平。结果 RT-PCR得到长度为777 bp的基因片段,克隆后酶切鉴定正确,测序结果经BLAST对比,与GenBank中小鼠NT-3序列完全一致。成功构建了NT3真核表达载体及高表达细胞株。结论 从小鼠肝脏组织中PCR克隆了正确的NT3基因,所获得的NT3稳定表达MESPU35-NT3细胞株为后续相关实验提供了保证。

关键词:NT3;克隆;胚胎干细胞;小鼠
中图法分类号:R321.4;R329.2;Q78 文献标识码:A

Cloning and identification of normal mouse NT3 gene and the establishment and screening of cell strain expressing high level of NT3 gene

ZHONG Xiao-lin[1], QIN Mao-lin[2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology; [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone and identify neurotrophic factor NT3 gene from mouse liver so as to establish a cell strain expressing high level of NT3 gene. Methods The target genes amplified by RT-PCR were cloned into the shuttle vector pExchange-1neo, and then the DNA sequence was analyzed by enzyme digestion and sequencing. The recombinant expression vector pExchange-NT3-1neo was employed to transfect the embryonic stem cell strain MESPU35, and then the transfected cells were selected by G418. The NT3 level in the transfected cells was detected by RT-PCR. Results A gene fragment of 777 bp was obtained by RT-PCR, and the DNA sequence was identical to mice NT-3 gene sequence of GenBank. The recombinant vector was constructed successfully and the constructed cell strain could express high level of NT-3 gene. Conclusion The successful cloning of NT3 gene from mouse liver, construction of pExchange-NT3-1neo expression vector, and establishment of cell strain stably expressing high level of NT3 gene have laid a foundation for the further studies.

Key words: NT3; cloning; embryonic stem cell; mice

神经生长因子家族是一类与神经元存活、生长、分化和再生密切相关的蛋白质。已发现成员至少包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF),脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF),神经营养因子3(neurotrophin-3, NT-3),神经营养因子4/5(neurotrophin-4/5, NT4/5)和神经营养因子6(neurotrophin-6, NT6)。NT-3广泛表达于周围组织和中枢神经系统,肝、肾、骨骼肌、肠、脾、心、肺、肾上腺、脑、交感神经节均有NT-3 mRNA分布[1,2]。NT-3不仅能促进培养中的交感神经元、感觉神经元和运动神经元存活[3,4],而且也能够促进中枢神经系统损伤的神经元功能和结构恢复[5],对治疗中枢神经系统损伤有促进作用。

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)是一种胚胎时期具有多项分化潜能的细胞,Fraichard等[6]发现ES细胞体外用维甲酸(retinoic acid, RA)诱导能够使之分化为功能性神经元和胶质细胞。Brustle等[7]报道用ES细胞体外培养分化的胶质细胞前体用于移植到患有人类髓鞘疾病的小鼠模型的脑和脊髓中,移植物能与受体的神经元的轴突生成髓鞘并延伸,提示ES细胞能够用于治疗中枢神经系统损伤。本实验选取小鼠肝

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000172)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000172)
作者简介:钟小林(1965-),男,重庆市人,实验师,主要从事基因工程产品开发方面的研究。电话:(023)68752261
通信作者:秦茂林,电话:(023)68752231
收稿日期:2004-01-13;修回日期:2004-02-26

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

脏组织，采用 RT-PCR 法进行 NT3 基因的克隆，与 pExchange-1neo 载体重组后转染 MESPU35 胚胎干细胞株（北京大学生命科学院建株），经 G418 长期筛选获得 NT-3 高表达的胚胎干细胞，为研究 NT-3 在 CNS 损伤中的作用提供了较为可靠的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

正常健康的昆明小鼠 4 只，雌雄各 2 只，3 月龄，体质量（30±2.0）g，分离肝脏组织用于 NT3 基因的克隆。从 GenBank 中查找小鼠 NT3 的 cDNA 序列，全长 777 bp，以其为模板设计扩增全长 cDNA 及特异片段的引物，由上海基康生物技术公司合成。RNA 提取试剂盒、Titan One-Tube RT-PCR 试剂盒购自 Roche 公司、lipofectin 购自 Invitrogen 公司，限制性内切酶及 T4DNA 连接酶（*Sac*Ⅰ、*Bam*HⅠ）购自 New England 公司，质粒提取试剂盒由我校生物化学和分子生物学教研室提供，PCR 产物回收及纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。载体 pExchange-1neo，宿主菌 *E. coli* DH-5α 由组织胚胎学教研室李成仁博士提供。NH3T3-neo 成纤维细胞株由北京大学遗传学教研室韩嵘博士提供。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计和合成 根据 NCBI Genbank 中小鼠 NT3 cDNA 序列设计扩增小鼠 NT3 全长 cDNA 的引物。引物的 5′端分别加上限制性内切酶 *Sac*Ⅰ和 *Bam*HⅠ的酶切位点。用于特异性扩增全长 cDNA 的引物是：

P1：5′ GCC GAGCTC ATG TCC ATC TTG TTT TAT 3′

P2：5′ GCA GGATCC TCA TGT TCT TCC AAT TTT 3′

下划线分别为 *Sac*Ⅰ、*Bam*HⅠ的酶切位点。用于特异性扩增 NT3 cDNA 第 146～687 碱基的引物是：

P3：5′CCAAACAGATGGTGGATGT 3′

P4：5′AGTCAGTGCTCGGACATAG 3′

引物合成采用二异丙基亚磷酰胺法，由上海基康生物技术有限公司合成，PAGE 纯化。

1.2.2 总 RNA 提取 采用 Tripure 法，按用户手册进行，提取肝脏组织中总 RNA，电泳鉴定 RNA 完整性，紫外分光光度计定量。

1.2.3 RT-PCR 扩增 NT3 全长 cDNA 采用 Titan One Tube RT-PCR 试剂盒，操作按说明书进行。所用引物为 P1＋P2，热循环参数：94 ℃变性 30 s，50 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，共 30 个循环，最后一个循环 72 ℃延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的纯化、连接和转化 对上述 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳纯化，*Sac*Ⅰ＋*Bam*HⅠ双酶切，同样双酶切载体 pExchange-1neo，琼脂糖凝胶电泳后，回收、纯化所需的粘性目的片段 NT-3 及载体 pExchange-1neo。取粘性目的片段和载体按 1∶1（摩尔比）混合，加 T4DNA 连接酶进行连接反应（12 ℃过夜），取适量产物转化大肠杆菌 DH-5α。

1.2.5 酶切鉴定和 DNA 测序 随机挑选 4 个单克隆菌落，转入含 Amp 的 LB 中大量扩增，抽提质粒，*Sac*Ⅰ＋*Bam*HⅠ双酶切鉴定并送上海生工公司进一步测序鉴定。

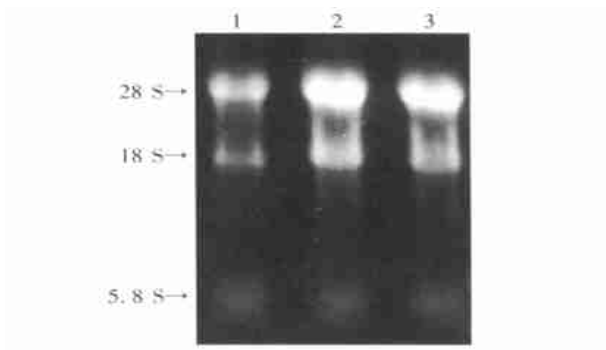
1.2.6 NT3 高表达细胞株的构建与筛选 NH3T3-neo 细胞作为胚胎干细胞培养的饲养层，MESPU35 细胞培养具体方法参见文献[8]，采用脂质体 lipofectin 法，将重组质粒转染细胞，操作按说明书进行。转染完成后，用 G418 长期筛选后去除 NH3T3-neo 细胞，进行扩增。

1.2.7 RT-PCR 检测细胞株 NT3 水平 提取扩增后细胞总 RNA，采用 Titan One Tube RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR，操作按说明书进行；同样条件下以 NT3 表达质粒 pExchange-1neo-NT3 为 PCR 阳性对照。所用引物为 P3＋P4，热循环参数：94 ℃变性 30s，50 ℃退火 30s，72 ℃延伸 45 s，共 30 个循环，最后一个循环 72 ℃延伸 10 min。

2 结果

2.1 总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增 NT3 基因

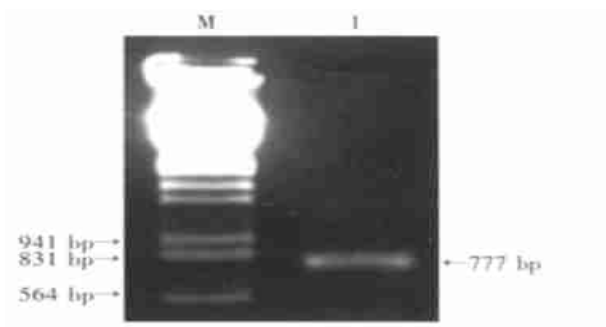
Tripure 提取肝脏组织总 RNA，电泳显示，RNA 无明显降解（图 1）。以总 RNA 为模板，RT-PCR 扩增全长 NT3 基因，电泳显示，所得产物为 7.8 kb，与 NT3 分子量相当（图 2）。



1—3：Total RNA of mouse liver

图 1 小鼠肝脏总 RNA

Fig 1 Total RNA extracted from mouse liver



M：Marker；1：RNA products using NT3 specific primers

图 2 RT-PCR 扩增全长 NT3 基因

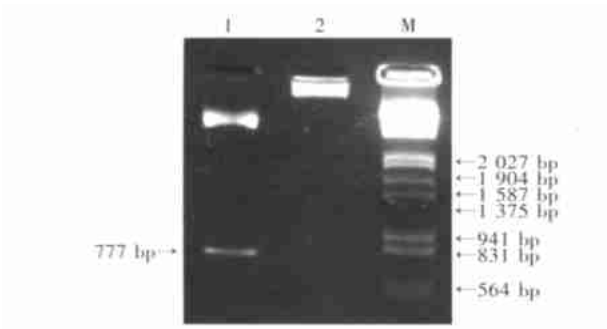
Fig 2 Cloning of NT3 gene by RT-PCR

2.2 NT3 真核表达载体的构建及鉴定

用 *Sca*Ⅰ和 *Bam*HⅠ分别双酶切 PCR 产物和载体 pExchange-1neo，将 PCR 产物定向连接至载体中，转化大肠杆菌，筛选到 4 个阳性克隆，提取质粒，双酶切后电泳鉴定，所得产物与

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

预期相符(图 3)。质粒进一步经测序鉴定, 表明构建正确, 且与 GenBank 中小鼠 NT-3 序列比较的结果, 二者完全一致。



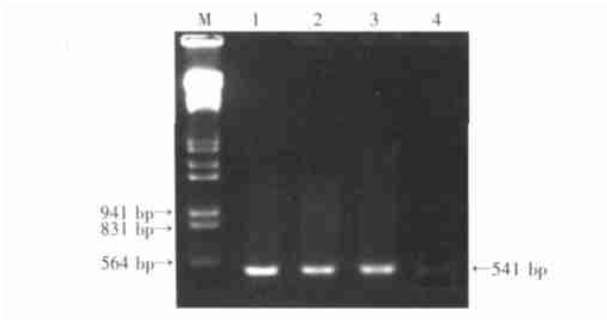
1: Recombinant vector digested by *Sac* Ⅰ + *Bam*HⅠ; 2: Recombinant vector not digested; M: Marker

图 3　重组质粒的酶切鉴定

Fig 3　Identification of recombinant plasmid by *Sac* Ⅰ + *Bam*HⅠ digestion

2.3　NT3 高表达细胞株的构建与筛选

Lipofectin 法将 NT3 表达质粒 pExchange-1neo-NT3 转染 MESPU35 细胞, 经 G418 长期筛选后获得 3 个细胞集落, 细胞扩增后提取总 RNA, RT-PCR 检测 pExchange-1neo-NT3 转染细胞与空载体转染细胞 NT3 表达的差异(图 4), 最终选定一个高表达 NT-3 的细胞集落。



M: Marker; 1－3: NT3 specific RT-PCR of cells transfected by pExchange-1neo-NT3; 4: NT3 specific RT-PCR of cells transfected by pExchange-1neo

图 4　PCR 检测转染细胞中 NT3 的 mRNA 水平

Fig 4　Detection of NT3 mRNA in transfected MESPU35 cells by PCR

3　讨论

神经营养因子(neurotrophin)是一组与神经结构和功能密切相关的家族蛋白, 其中神经营养因子-3(NT3)是外周和中枢神经系统中最重要的内源性蛋白, 调控着神经元的发育、生长、分化和再生。在发育中及成熟后的大鼠中, NT-3 都能促进脊髓损伤后皮质脊髓束的生长, 且能阻止大鼠发育中损伤红核神经元的退行性死亡[9]。Goto 等[10]利用 BDNF 和 NT-3 的抗体, 调查了大鼠脊髓横切伤后 BDNF 和 NT-3 样免疫反应分布, 证实 BDNF 和 NT-3 的免疫反应都都定位于灰质。在脊髓横切损伤模型中, 损伤后 3 周, 运动神经元显示 NT-3 强阳性, 而抗 BDNF 抗体稍弱, 提示 BDNF 和 NT-3 都参与了脊髓修复过程。

近年来, 大量的研究工作证实损伤的中枢神经具有可塑性, 也能再生。脊髓损伤的治疗便成为人们感兴趣的研究领域。在以往用来促进损伤脊髓恢复的治疗方法中, 包括移植胚胎组织、给予髓鞘相关蛋白抗体、外周神经搭桥术及提供使轴突生长的基质等方法, 但这些方法使神经元恢复效果不尽人意。文献[5]报道移植胚胎干细胞治疗脊髓损伤, 发现 NT-3 基因在促进神经元轴突生长方面有作用。因此, 进一步研究 NT3 对神经元存活、再生和分化的作用, 尤其是将其用于治疗脊髓损伤具有十分重要的临床意义。

本实验利用国产昆明小鼠的肝脏, 成功地克隆了 NT3 基因, 进一步构建了相应的真核表达载体。在克隆小鼠肝脏 NT3 基因的过程中, 要注意的关键问题之一是引物的设计。首先从 GenBank 中寻找目的基因序列, 以此为模板, 至少应选择 cDNA 启始密码和终止密码旁 5～7 个氨基酸的密码子为引物序列, 并在各序列的 5′端加入相应限制性酶位点, 限制性酶位点的 5′端还应有 2～3 个保护碱基, 这样有利于限制性酶正常发挥作用。在限制性酶位点的设计上, 最好采用两中不同的酶, 这样在重组时可以将目的序列定向克隆至载体中, 减少后续筛选正向克隆的工作量。在载体的选择上, 我们采用了 pExchange-1neo。该载体是一个穿梭载体, 这类载体的特点是既可在原核细胞中扩增, 也可在真核细胞中表达, 这就为我们构建稳定表达 NT3 的 ES 细胞提供了便利。脂质体法是目前应用比较多的将基因转染至真核细胞的一种方法, 该方法转染效率高, 方法成熟可靠, 但对细胞的毒性比较大, 所以转染时一定要选取生长活性高的培养细胞(一般是 40%～60%满瓶), 但由于转染过程中会损失大量细胞, 所以细胞数不能太少。我们根据经验, 将细胞培养至 70%～80%满瓶再进行转染, 可以有效提高转染效率。总之, 我们以小鼠肝脏组织为材, 成功克隆了 NT3 基因并且将之克隆在穿梭载体 pExchange-1neo 中, 成功构建并筛选出稳定表达 NT3 的小鼠 ES 细胞。该细胞的成功构建, 为今后进一步研究应用 NT3 基因及其表达产物提供了基础, 也为 NT3 等神经营养因子在中枢神经系统损伤治疗中应用打下基础。

参考文献:

[1] Emfors P, Wetmore C, Olsong L, *et al*. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing m RNA for members of nerve growth factor family[J]. Neuron, 1990, 5(1): 511－526.

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

[2] Zhou X F, Rush R A. Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in peripheral tissues of the rat[J]. Brain Res, 1993, 621(2): 189—199.

[3] Farinas I, Jones K R, Backus C, *et al*. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking NT-3[J]. Nature, 1994, 369(6482): 658—661.

[4] Hory-lee F, Russell M, Lindsay R M. Neurotrophin-3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(7): 2613—2167.

[5] McDonald J W, Liu X Z, Qu Y. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1410—1412.

[6] Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, *et al*. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons[J]. J Cell Sci, 1995, 108(Pt10): 3181—3188.

[7] Brustle O, Jones K N, Learish R D, *et al*. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285(5428): 754—756.

[8] 童 英, 韩 嵘, 郑玉兰, 等. 具高效种系嵌合能力的C57BL/6J小鼠ES细胞系的建立[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 468—473.

[9] Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, *et al*. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion[J]. Am J med, 1994, 367(6459): 170—173.

[10] Goto A, Furukawa S. Experimental changes in BDNF- and NT-3-like immunoreactivities in the spinal cord following its transection[J]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1995, 69(7): 506—516.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)09-0766-02

肾血管平滑肌脂肪瘤25例临床分析

Clinical analysis of 25 cases of renal angiomyolipoma

易善红，张艮甫，叶 钢，黄赤兵，杨清浩，王祥卫，金欢胜，杨唐俊 （第三军医大学新桥医院泌尿外科，全军肾脏病中心，重庆 400037）

肾血管平滑肌脂肪瘤(renal angiomyolipoma, AML)又名肾错构瘤，是较少见的肾良性肿瘤。近年随着B超、CT的广泛应用，早期发现和确诊此症已不困难，手术治疗是主要的治疗手段。作者收集了1987年1月至2001年6月25例AML病案，现回顾性分析报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

25例中，男性9例，女性16例。年龄19～68岁，平均43.6岁，小于30岁3例。肿瘤位于左侧13例，右侧9例，双侧3例。有症状者14例，其中血尿2例，腰腹部疼痛11例，发热7例，腰腹部包块7例。无症状者11例，均在健康查体时B超偶然发现。2例伴有结节性硬化。无1例有破裂出血，无1例有家族史。

1.2 诊断

静脉肾盂造影19例，双肾功能均显示良好，13例显示有肾盂、肾盂变形受压，肾影增大及肾脏受压推移。B超检查22例，均显示肾脏有不规则强回声或中等回声，边界清楚的占位病变。CT检查17例，13例显示低密度影，CT值－28～－91 HU，明确诊断为AML。2例为高密度影，CT值在10～59 HU。另2例为混合密度。增强扫描15例，13例有不均匀强化。肾动脉造影4例，均发现有肾脏占位。

1.3 治疗结果

肿瘤最小直径为0.6 cm，最大直径12 cm，平均7.8 cm，其中小于4 cm 3例次。位于肾中部15例，上下极10例。手术治疗24例，其中2例为双侧分次手术。肾切除13例，肾部分切除5例，肿瘤剜除5例。选择性肾动脉柱塞1例，3例行保守治疗。手术24例无外科并发症，随访(11人)无肿瘤复发。

2 讨论

2.1 分类及病理改变

肾血管平滑肌脂肪瘤分为伴有结节性硬化和不伴有结节性硬化。结节性硬化症是由常染色体显性基因引起的先天性遗传疾病(1/15万)，它的特征是智力低下、癫痫、皮脂腺病和多脏器错构瘤，这种AML多为双侧、多发，肿瘤较小，男女发病无区别[1]。AML主要由成熟的脂肪组织、平滑肌及厚壁血管组成，可单发或多发，大小形态不一，没有包膜，外观呈黄色或灰色。淋巴结及邻近器官受累者经彻底切除肿瘤后不易复发或转移。AML恶变的依据：①肿瘤浸润性生长，侵犯肾盂肌层及血管；②高倍镜下出现10个以上病理核分裂[1]。本组仅有1例病理报告有恶变倾向。

2.2 临床特点

在不伴有结节性硬化的病人中，因AML生长缓慢，常常是在体格检查时发现肾脏肿块。有症状者主要表现为疼痛。多为腰腹部的隐痛不适或间歇性疼痛，占48%(12/25)。疼痛原因主要是肿瘤内出血，同时与肿瘤膨胀性生长牵扯肾包膜有关。腰腹部包块以腹部包块多见，中等硬度，界限清楚，表面光滑。本组血尿2例占8%，为肉眼血尿，多系肿瘤向肾盂内破裂出血所致。其它报道的症状有高血压，贫血，尿路感染，和上尿路不

作者简介：易善红(1970－)，男，河南省息县人，博士，主治医师，讲师，主要从事膀胱癌多药耐药性及肾移植免疫耐受方面的研究，发表论文5篇。电话：(023)68755775

收稿日期：2002-08-20；修回日期：2003-03-12

（下转773页）

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