DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.017
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0537-03

论著

人乳头瘤病毒16 E7(HPV16E7)逆转录病毒载体的构建

何清义,李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 构建人乳头瘤病毒16型E7基因片段(HPV16E7)的逆转录病毒载体。方法 PCR扩增HPV16cDNA全长的E7片段,并用酶切、连接等方法将HPV16E7亚克隆到逆转录病毒载体pLXSN上,然后再用酶切、测序进行鉴定。通过Genbank的数据库分析软件对HPV16E7进行同源性分析。结果 经酶切分析、测序证明,从HPV16 cDNA克隆的300 bp的HPV16E7与逆转录病毒载体发生了基因重组,HPV16E7基因片段与数据库中的原HPV16 cDNA的E7有高度的同源性。结论 构建了含HPV16E7的逆转录病毒载体,为人关节软骨细胞的基因转染打下了基础。

关键词:HPV16E7;逆转录病毒载体;构建
中图法分类号:R373.9;R394-3 文献标识码:A

Construction of retroviral vector encoding for human papillomavirus type 16 E7 protein (HPV16E7)

HE Qing-yi, LI Qi-hong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a retroviral vector of human papillomavirus type 16 E7(HPV16E7). Methods The E7 fragment of HPV16 cDNA was amplified with PCR and inserted into the retroviral vector pLXSN with endonuclease digestion and ligation methods, then the recombinant vector was determined with enzyme digestion and sequencing. The homologous features between the obtained HPV16E7 sequence and original HPV16 cDNA E7 fragment was analyzed with the Genbank data analysis software. Results The 300 bp fragment of HPV16E7 cloned from HPV16 cDNA was transferred into the genome of retroviral vector in success. The obtained HPV16E7 showed highly homology with the original HPV16 cDNA in Genbank. Conclusion Successfully constructed retroviral vector encoding for HPV16E7 establishes important basis for gene transfection of human articular chondrocytes.

Key words: HPV16E7; retroviral vector; construction

软骨由软骨细胞、胞外基质(胶原纤维、蛋白多糖)及水组成,其中后二者所占比例较大,软骨细胞数量较少,因此从软骨中获得软骨细胞来源有限[1];并且软骨细胞增殖能力低,代谢缓慢,体外培养对密度高度依赖,且为有限增殖,传代到第5代左右,细胞出现老化现象,使传代难以为继。特别是软骨细胞在体外长期培养有去分化的趋势,表型(特别是Ⅱ型胶原)难以保持[2]。上述问题均为软骨细胞库建立及软骨组织工程必须解决的难题。众多学者一直试图建立一种能够长期培养,表型稳定的永生化软骨细胞。通过基因改造可使细胞的增殖能力大大提高并可建立永生化细胞系(Immortalized cell line)。本研究构建了含HPV16E7的逆转录病毒载体pLXSN-HPV16E7,为进一步研究软骨细胞的基因转染,软骨细胞的增殖与分化、软骨细胞与生物材料的复合以及体内成软骨能力等打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含HPV16cDNA全长的质粒由美国Dr. Chow(University of Arabama, Department of Biochemistry and Molecular Genetics)惠赠,逆转录病毒载体pLXSN购自Clontech公司,PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司,*EcoR*Ⅰ、*Xho*Ⅰ等核酸内切酶购自NewEngland Lab,Taq酶、DNA连接酶购自Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 含HPV16E7逆转录病毒载体的构建

1.2.1.1 利用PCR扩增HPV16E7片段 根据Seedorf等人克隆的HPV16全长设计HPV16E7片段的引物并设计两个酶切位点,由上海Sangon公司合成该引物。

上游引物 P_1:5′-GGC GAATTC ATGCATGGAGAT-3′
(*EcoR*Ⅰ)

下游引物 P_2:5′-GGC CTCGAG ATGGTTTCTGAG-3′
(*Xho*Ⅰ)

其中上游引物含酶切位点*EcoR*Ⅰ,下游引物含酶切位点*Xho*Ⅰ。以HPV16cDNA全长为模板,反应体系为100 μl:模板DNA 0.5 μg,dNTP(10 mmol/L)2 μl,引物各20 pmol/L,Taq酶4 U。扩增条件为:94 ℃预变性7 min,先扩增10个循环(94 ℃变性40 s,45 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min),然后再进行20个循环(94 ℃变性30 s,60 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min 30 s),最后72 ℃延伸10 min。P_1和P_2扩增的目的片段长300 bp,为HPV16E7片段的全长。

1.2.1.2 酶切及连接反应 PCR产物的纯化用上海华舜生物工程公司PCR产物纯化试剂盒纯化,操作按说明书进行,产物纯化后(0.15 μg/μl)用相应的限制性内切酶*EcoR*Ⅰ和*Xho*Ⅰ分别酶切HPV16E7的PCR产物及逆转录病毒载体pLXSN,酶切体

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)
作者简介:何清义(1973—),男,重庆市巴县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754000-73076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

系为 100 μl: 其中 PCR 纯化产物或逆转录病毒载体 pLXSN 60 μl, 限制性内切酶 *EcoR*I、*Xho*I 各 5 μl, 酶切缓冲液 10 μl, 去离子水 20 μl。37 ℃酶切 3 h。0.8%的琼脂糖分离酶切产物, 胶回收试剂盒回收载体和片段, 将载体及片段按摩尔比> 1∶3 T4 连接酶连接过夜, 连接体系 10 μl: 逆转录病毒载体 pLXSN 1 μl, T4 连接酶 1 μl, 连接缓冲液 1 μl, HPV16E7 片段 7 μl。

1.2.1.3 连接产物转入感受态菌及重组质粒的酶切、测序鉴定 连接混合物转化感受态大肠杆菌 XL1-blue, 取 6 μl 连接产物加入 200 μl 的感受态 XL1-blue 菌液中, 冰浴 30 min, 42 ℃热休克 3 min, 再冰浴 5 min, 37 ℃置放 5 min, 加入 800 μl LB 培养基中 200 r/ min 振荡过夜, 取 100 μl 涂布于预制的 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μg/ ml, IPTG 0.4 μmol/ L, X-gal 20 mg/ ml, 40 μl), 37 ℃温育过夜。

1.2.1.4 质粒提取 挑取独立的白菌斑置于 3 ml 的 LB 培养基, 200 r/ min 振荡过夜, 质粒提取回收试剂盒提取质粒。

1.3 重组载体的鉴定

1.3.1 PCR 鉴定 方法同 1.2.1.1。

1.3.2 酶切鉴定 酶切体系为 20 μl, 其中重组质粒 8 μl, 相应的限制性内切酶各 1 μl, 酶切缓冲液 2 μl, 去离子水 8 μl。方法同 1.2.1.2。

1.3.3 测序 用 T7 和 SP6 启动子引物, 采用 ABI377 全自动测序仪(上海 Sangon)进行测序。

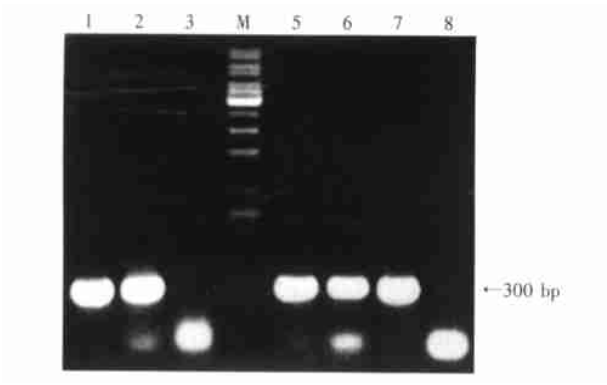
2 结果

2.1 PCR 扩增结果

采用上述反应条件扩增的目的片段位于 250 bp 与 500 bp 之间, 与引物设计时需扩增的 300 bp 片段一致。

2.2 重组载体的 PCR、酶切鉴定

以重组质粒为模板, 用前述设计的引物, 分别 PCR 扩增, 能够扩增出 300 bp 相应大小的片段。以相应的限制性内切酶分别酶切相应的重组质粒, 能从重组质粒上切下约 300 bp 大小的片段, 见图 1。



1, 2: Double enzyme cleavage; 3: Negative control; M: GeneRuler™ 1 kb DNA marker (from down to up 250, 500, 750, 1 000, 1 500 bp); 5—8: Results of PCR analysis

图 1 重组逆转录质粒载体 **pLXSN—HPV16E7** 的限制性酶切及 **PCR** 分析

Fig 1 Restriction endonuclease analysis and PCR of recombinant retroviral vector pLXSN-HPV16E7

2.3 上海 Sangon 的测序报告及同源性分析结果

测序结果如下:

atgcatggagatacacctacattgcatgaatatatgttagatttgcaaccagagacaactgatctctactgtt
atgagcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaatagatggtccagctggacaagcagaaccg
gacagagcccattacaatattgtaaccttgttgcaagtgtgactctacgcttcggttgtgcgtacaaagc
acacacgtagacattggtactttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttct
cagaaaccataa

通过网址: www. ncbi. nlm. nih. gov 进入 Pubmedline 的 Genbank DNA 序列数据库, 调取人的乳头瘤病毒 16 型(HPV16)cDNA 的全长, 并进一步读取 E7 的 cDNA 碱基序列, 然后通过与扩增片段的测序结果进行同源性比较, 二者之间完全相同, 说明扩增、亚克隆的 HPV16E7DNA 与 Genbank 的 HPV16E7 具有高度同源性。

3 讨论

因骨关节炎引起的关节软骨破坏或其他原因所致的软骨缺损, 软骨自身很难再生修复, 用异体软骨移植、假体替代和自身软骨细胞移植由于各种原因效果亦不甚理想[3]。而组织工程化软骨现已逐渐被认为是一种有希望的治疗全层软骨缺损的手段。而软骨细胞作为软骨组织工程的种子细胞在体外培养中经过 5~6 代就会逐渐老化甚至凋亡并丧失分泌基质的功能, 因而难以从少量的软骨组织中分离获得大量的软骨细胞, 成为制约软骨组织工程的"瓶颈"之一[4]。因此, 防止软骨细胞老化以及维持软骨细胞的功能是软骨组织工程需要解决的关键问题。

利用基因改造技术能使体外增殖能力有限的正常细胞在体外长期培养甚至发生"永生化"(Immortalization)转化。目前, 采用较多的是把原癌基因转入靶细胞, 使靶细胞获得持续增殖的能力, 这些原癌基因包括猿猴病毒 40 大 T 抗原(Simian virus 40 large T antigen, SV40LTAg), HPV16E7 和/或 E6, 腺病毒 E1A/E1B 等[5~7], 其中利用 HPV16E7 和/或 E6 已使包括肺动脉内皮细胞、胸主动脉平滑肌细胞、支气管上皮细胞、唾液腺细胞及成纤维细胞永生化[8]。

基因或基因片段在转入靶细胞之前, 必须要选择一个合适的表达载体(Vector), 载体是携带目的基因并将其转移至靶细胞内复制和表达的运载工具, 载体的选择是基因转染的关键之一。逆转录病毒载体是目前临床基因治疗中使用最多的一类载体, 我们选用的 pLXSN 属改良的逆转录病毒载体, 来源于 Molloney 小鼠白血病毒(Mollloney murine leukemia virus)具有极高的转染效率(理论上对有丝分裂期的细胞转染率可达 100%), 不但能将目的基因与靶细胞基因组整合, 并且可使目的基因长久表达[9]。该载体与人类逆转录病毒并无同源性结构从而减少了与人体内自身的病毒发生同源重组的机率; 该载体的基因结构简单便于进行分子操作; 重组的逆转录病毒载体并不表达病毒蛋白, 故应用于人体是安全有效的[9]。但逆转录病毒载体只能转染分裂细胞(Dividing cell)而对非分裂细胞的转染效率就很低[9]。

HPV16E7 基因片段编码的产物 E7 蛋白就如 SV40LTAg 及腺病毒 E1A/E1B 一样都能够与视网膜母细胞瘤基因的产物(product of retinoblastoma gene, pRb)结

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

合,使 pRb-E2F 复合物解体,活性 E2F 释放出来[10]。E2F 是一种重要的转录因子,能使与 DNA 合成有关的酶基因(如 DNA 合成酶, DNA 连接酶等)获得表达; E2F 也可与一些基因启动子结合,促使与细胞生长有关的一些基因(如 C-myc, B-myb, cdc2, 胸苷激酶基因等)表达。上述活动启动了 DNA 复制,细胞周期突破 G_1/S 期关卡(Check point),由 G_1 期进入 S 期,靶细胞的细胞周期因而不断循环下去并使细胞处于持续增殖的状态[11, 12]。

参考文献:

[1] Bwalteuckr J A, Mankin H J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions[J]. Instr Course Lect, 1998, 47: 477—486.

[2] Adolphe M, Thenet S. The concept of cellular immortality, a myth or a reality. Example of "immortalized" articular chondrocytes[J]. Bull Acad Natl Med, 1990, 174(1): 139—144.

[3] Minas T, Nehrer S. Current concepts in the articular cartilage defects[J]. Orthopedics, 1997, 20(6): 525—538.

[4] 何清义, 李起鸿, 许建中. 软骨细胞的永生化及其生物学特性[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 23—25.

[5] Kim B H, Sung S R, Choi E H, *et al*. Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term *in vitro* passage[J]. Exp Mol Med, 2000, 32(1): 29—37.

[6] Oram J F, Mendez A J, Lymp J, *et al*. Reduction in apolipoprotein-mediated removal of cellular lipids by immortalization of human fibroblasts and its reversion by cAMP: lack of effect with Tangier disease cells[J]. J Lipid Res, 1999, 40(10): 1 769—1 781.

[7] Lee W P, Liao Y, Robinson D, *et al*. Axl-gas6 interaction counteracts E1A-mediated cell growth suppression and proapoptotic activity[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(12): 8 075—8 082.

[8] Pace M C, Chambliss K L, German Z, *et al*. Establishment of an immortalized fetal intrapulmonary artery endothelial cell line[J]. Am J Physiol, 1999, 277(Lung Cell Mol Physiol 21): L106—L112.

[9] Oligino T J, Yao Q P, Ghivizzani S C, *et al*. Vector systems for gene transfer to joint[J]. Clin Orthop Res, 2000, 379(supp1): s17—s30.

[10] Broud Mansur C P, Androphy E J. Cellular transformation by papillomavirus oncoprotein[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1993, 1 155(3): 323—345.

[11] Munger K, Jones D L. Analysis of the p53 mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein[J]. J Virol, 1997, 71(4): 2 905—2 912.

[12] Morozov A, Shiyanov P, Barr E, *et al*. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21[J]. J Virol, 1997, 71(5): 3 451—3 457.

(编辑　王　红)

(上接 536 页)

2.3　出院后健康教育需求,见表 4、5

表 4　出院后健康教育需求程度

项目	强烈需要		一般需要		不需要	
	例数	%	例数	%	例数	%
休息与活动	74	37.0	88	44.0	38	19.0
饮食指导	101	50.5	62	31.0	37	18.5
复诊指导	81	40.5	65	32.5	54	27.0
卫生保健指导	70	35.0	79	39.5	51	25.5
咨询方式的指导	52	26.0	79	39.5	69	34.5

表 5　出院后健康教育咨询方式的选择

方式	例数	%
电话咨询	165	82.5
自己返院咨询	47	23.5
医护人员上门服务	35	17.5
书信咨询	66	33.0

3　讨论

在这次调查中我们发现,病员对健康教育的需求贯穿从入院到出院的全过程,在这个过程中患者不仅对自己的病情、治疗、手术提出强烈需求了解,对疾病的病因、饮食、用药、预防、保健、康复也同样需要了解;与医护人员交流、咨询是患者及家属常用的办法。患者在手术期对自己的病情和手术的安全性及效果提出强烈需要了解,同时对术前术后的各项内容都需要了解。所以手术前后的健康教育是紧密联系的。术后患者由于手术的影响,不可能直接参与到健康教育的教与学中,所以健康教育工作的重点应放在术前。术前健康教育不仅包括术前药物、饮食、休息、活动、睡眠、心理知识上,还包括术后指导病员进行行为训练,例如深呼吸、有效咳嗽、体位、体语、肢体功能训练。尤其注意的是术前、术后的活动、休息指导是不同的。术前活动休息是为了保证经历手术的体力;术后患者由于麻醉、疼痛、各种引流管道等原因,使术后的活动时间具有由短到长;活动强度具有由卧床到床上翻身、起坐、床旁坐立、行走、离床活动的由弱到强的一个循序渐进的特点。要求护理人员采用讲解、演示或病员现身说法等适当的教学方法,耐心细致地解释早日下床活动的好处,克服患者依赖、惧疼,甚至是懒惰的心理,尽快恢复健康,减少术后并发症。大量资料表明。心理因素对疾病的发生、发展、转归及愈后有着密切的联系。患者手术前的心理活动是非常复杂的,有恐惧、焦虑、紧张、担忧、预感性悲哀等,这就使患者的心理健康教育显得尤为重要,也是患者健康教育的薄弱环节。但是在这次调查中发现,患者对心理方面的需求不是很强烈,有相当一部份病员根本就不需要。究其原因有三:①病员的整体文化素质较低,还没有充分认识到心理因素对疾病、健康、生活的影响,以及心理护理的重要性;②病员思想上的顾虑也是一个原因,他们不愿意如实反应自己的心理感受,使我们不能及时发现心理问题;③从医护人员本身来说不能正确掌握心理护理的手段和方法、沟通的技巧、语言和态度,也是难以进行心理教育的原因之一。医护人员在患者手术前后应多与病人及家属交谈,正确的运用倾听、沉默、诱导、转移等沟通方法,用和蔼的语言和态度,关心安慰病人及家属,让其说出内心的真实感受,挖掘出患者更多的心理问题,做出针对性的心理疏导,使患者以良好的心态迎接手术。正确的健康教育有利于病人的心身健康。

综上所述:肝胆外科手术病人的健康教育具有计划性、阶段性、针对性的特点。做好病人的健康教育,使其在身心两方面对手术具备良好的应对能力;同时也使患者及家属认识到健康教育的重要性,积极主动的配合和参与到健康教育的教与学中,不仅提高了医护人员的工作质量,更是减少术前术后并发症的发生。

关键词:肝胆手术患者;健康教育
中图法分类号:R195.1　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 黄津芳, 刘玉莹, 杨春梅, 等. 外科患者健康教育需求特点及施教对策[J]. 中华护理杂志, 1999, 34(5): 270.

(编辑　薛国文)

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