DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.009
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
898 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0898-03

bFGF cDNA重组逆转录病毒表达载体的构建及在哺乳动物细胞中的表达

阴金波,周 政,刘 俊,杨 辉,张可成,宋业纯 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 建立逆转录病毒介导的人bFGF体外表达体系。方法 应用DNA重组技术,将人bFGF cDNA片段重组到逆转录病毒质粒pLXSN中,经PA317细胞包装后,产生的重组逆转录病毒感染COS-7细胞,用RT-PCR和Western Blotting检测bFGF mRNA和蛋白表达。结果 重组pLXSN-bFGF质粒,经酶切鉴定正确。重组逆转录病毒pLXSN-bFGF滴度可达2.3×10^4CFU/ml,感染COS-7后能稳定表达。结论 逆转录病毒能介导人bFGF在哺乳动物细胞中的稳定表达,本研究为下一步开展基因治疗帕金森病等中枢神经系统疾病奠定了基础。

关键词:bFGF;逆转录病毒载体;基因转移
中图法分类号:R392.12;R394-33;R392.4 文献标识码:A

Construction of a recombinant retroviral vector containing human bFGF cDNA and its expression in mammalian cells

YIN Jin-bo, ZHOU Zheng, LIU Jun, YANG Hui, ZHANG Ke-cheng, SONG Ye-chun (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To constract a retroviral-mediated expression system of human basic fibroblast growth factor (bFGF). **Methods** Recombinant retroviral vecter pLXSN-bFGF was generated by cloning a full-length human bFGF cDNA into retroviral vecter pLXSN. COS-7 cells were infected with the viral supernatant from the highest productive PA317 clones. RT-PCR was used for the detection of bFGF mRNA and bFGF protein in the COS-7 cells was detected with Western Blotting. **Results** The restriction enzyme analysis with *EcoR* Ⅰ and *Xho* Ⅰ showed that the recombinant retroviral vector had been constructed correctly. The titer assayed on NIH3T3 cells was up to 2.3× 10^4 CFU/ml. Using the RT-PCR and Western Blotting methods, the bFGF mRNA and bFGF protein were expressed in COS-7 cells after pLXSN-bFGF infection. **Conclusion** The constructed retroviral vector is able to generate effective expression of human bFGF in mammalian cells, with potential utility in the gene therapy for central nervous system diseases such as Parkinsonism dimentia.

Key words: bFGF; retroviral vector; gene transfer

碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)具有广泛的生物学活性,对来源于中胚层及神经外胚层的细胞具有促分裂作用。目前,bFGF保护中枢神经系统的神经元及促进神经生长和神经组织再生的功能越来越受到人们的重视[1,2]。国内和国外的研究多围绕局部或全身用药,然而全身用药难以达到有效治疗浓度,局部用药疗效难以持久,用基因治疗方法解决bFGF治疗中枢神经系统疾病的给药途径问题是目前最有希望的方案。

逆转录病毒介导的基因转移技术是进行基因治疗、细胞增殖、分化、死亡、癌变等调控研究的基础之一[3,4]。本研究利用DNA重组技术,将bFGF cDNA重组到逆转录病毒载体pLXSN中,经PA317细胞包装后成功地构建了产缺陷重组逆转录病毒的细胞株。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶,T4 DNA连接酶,Taq酶购自TaKaRa公司,质脂体LipofectAMINE™、DMEM培养基,G418、RNA提取试剂Trizol购自GIBCO公司,聚凝胺(Polybrene)购自Sigma公司。反转录试剂盒为Promega公司产品。bFGF单抗、HRP标记的二抗及ECL显色系统购自Santa Cruz公司。pTB627质粒(包含bFGF cDNA全长)由日本冈山大学Seno M博士赠送,逆转录病毒质粒pLXSN、PA317细胞由军事医学科学院王立生研究员赠送。NIH3T3细胞、COS-7细胞、大肠杆菌DH5α由本室保存。

1.2 bFGF cDNA重组逆转录病毒质粒的构建

设计并人工合成一对bFGF cDNA特异引物,在其5′端分别引入*EcoR* Ⅰ与*Xho* Ⅰ酶切位点。PCR上游引物5′CGGAATTCATG-GCAGCCGGGAGCATC 3′,下游引物5′CCGCTC-GAGTCAGCTCTTAGCAGACAT 3′。以pTB627质粒为模板,进行PCR扩增条件为94 ℃变性1 min,55 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min。扩增产物用*EcoR* Ⅰ与*Xho* Ⅰ双酶切,经低熔点琼脂糖电泳回收485 bp DNA片段,与经相应酶切、回收的5.8 kb的pLXSN载体以10 mol/L∶1 mol/L连接,转化感受态大肠杆菌DH5α,提取转化子质粒DNA,根据分子量大小及相应双酶切图谱鉴定阳性重组子。

1.3 重组载体包装及包装细胞克隆

按Wizard® Plus SV Minipreps DNA纯化试剂盒操作说明提取重组逆转录病毒质粒,用质脂体LipofectAMINE™转染病毒包装细胞PA317,转染后48 h,胰酶消化,稀释传代,培养24 h后,以400 mg/L G418进行筛选。两周后,挑选单克隆细胞,转入24孔培养板培养,经扩增后,转入6 cm培养皿培养。

1.4 重组逆转录病毒滴度的测定

NIH3T3细胞以每6 cm平皿接种5×10^5细胞,接种后24 h,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800046)
作者简介:阴金波(1974-),男,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事帕金森病基因治疗方面的研究。电话:(023)68755610
收稿日期:2001-09-03;修回日期:2002-04-15

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

加入产病毒细胞上清及 polybrene 4 mg/ L, 继续培养 24 h 后, 胰酶消化、1∶50 稀释传代, 培养 24 h, 再加入 400 mg/ L G418 筛选 2 周后, 经甲醛固定, Giemsa 染色, 计抗性细胞克隆数, 以此计算病毒滴度, 以克隆形成单位表示(CFU/ml)。

1.5　包装细胞及靶细胞外源基因整合的鉴定

bFGF 重组逆转录病毒按相同方法感染 COS-7 细胞, G418 筛选 2 周, 挑取单克隆细胞扩增。取 COS-7 抗性细胞和 PA317 产病毒细胞, 按分子克隆实验指南进行培养细胞染色体 DNA 的提取[5], 并以此 DNA 为模板, 用 bFGF cDNA 特异引物, 进行 PCR 扩增, 条件同前述, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6　bFGF mRNA 在哺乳动物细胞中表达的检测

取 1×10^7 COS-7 抗性克隆细胞, 按 Trizol RNA 提取试剂盒的操作说明提取 COS-7 细胞总 RNA, 用 bFGF cDNA 特异引物做 RT-PCR, 测定 bFGF mRNA 的表达。以 Oligo(dT)为起始引物, 加入总 RNA 1 μg, 70 ℃ 10 min 后, 依次加入无 RNase 水, 10× RT buffer, 25 mmol/ L $MgCl_2$, 250 μmol/ L dNTPs, Rnasin 和 AMV 逆转录酶, 反应体系为 20 μl, 42 ℃保温 15 min 后, 加去离子水至 100 μl, 取 5 μl 反转录产物为模板, 50 μl PCR 反应体系为: 2 μl dNTP, 5 μl 10× PCR buffer, 上游引物 2 μl, 下游引物 2 μl, 0.5 μl Taq 聚合酶。94 ℃热变性 5 min 后进行如下循环: 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环, 72 ℃延伸 7 min。

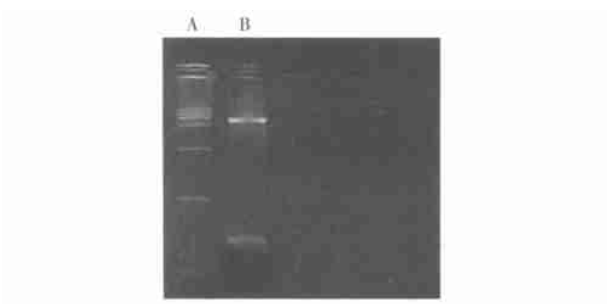
1.7　bFGF 蛋白在哺乳动物细胞中表达的检测

取 5×10^5 的 COS-7 抗性细胞, 消化混合培养, 每 2～3 d 传代一次。分别于 1、4、7 代测定 bFGF 蛋白表达。用冰冷的 PBS 清洗细胞, 在 0～4 ℃条件下用 1 ml RIPA 缓冲液(临用前加入 10 μl 浓度为 10 mg/ml 的 PMSF 和 30 μl/ ml Aprotinin)裂解细胞。于 4 ℃离心(12 000 r/ min) 20 min, 转移上清至一新的 EP 管, 蛋白定量后按标准方法进行 SDS-PAGE, 电泳完毕后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭过夜。加入适当浓度的一抗孵育 45 min 后, 用含 0.05% Tween20 的 TBS 洗 3 次, 每次 5 min。然后加入 HRP 标记的二抗于含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中孵育 30 min, 同上洗 3 次。ECL 显色系统压片, 洗片后扫描。

2　结果

2.1　bFGF cDNA 重组逆转录病毒质粒的构建

以 pTB627 为模板, PCR 所得的 bFGF cDNA 扩增产物经酶切、回收后与逆转录病毒载体 pLXSN 进行连接, 得到阳性重组质粒 pLXSN-bFGF。重组质粒经 *EcoR* Ⅰ 与 *Xho* Ⅰ 双酶切, 可切下 485 bp 的 bFGF cDNA 片段, 表明重组质粒正确, 见图 1。



A: DL-15000 markers; B: pLXSN-bFGF/ *Xho* Ⅰ and *EcoR* Ⅰ

图 1　重组质粒 **pLXSN-bFGF** 双酶切图谱

Fig 1　Restriction map of recombinant plasmid pLXSN-bFGF

2.2　重组病毒分泌细胞株的构建及滴度测定

bFGF cDNA 重组逆转录病毒质粒及空载体 pLXSN 转染包装细胞 PA317 后, 出现大量 G418 抗性细胞克隆, 单个克隆经扩增培养, 收集培养上清, 感染 NIH3T3 细胞, 均出现 G418 抗性的阳性克隆, 每个克隆的产病毒滴度不同, pLXSN-bFGF 最高为 2.3×10^4 CFU/ml, pLXSN 最高为 1.8×10^4 CFU/ml。此结果表明重组质粒转染 PA317 细胞后, 该细胞内产生的外壳蛋白、核心蛋白与逆转录酶的组装, 能产生具有感染靶细胞能力并能介导 bFGF 基因转移的重组逆转录病毒。

NIH3T3 细胞经逆转录病毒感染后产生的 G418 抗性克隆培养后, 按相同的方法收集其培养上清再进行 NIH3T3 细胞的感染, 未能形成任何 G418 抗性克隆, 表明其辅助细胞的产生为阴性。

2.3　包装细胞及靶细胞 bFGF 基因整合表达

为进一步鉴定 bFGF cDNA 是否在感染后的靶细胞染色体基因组中有整合, 通过提取各组细胞染色体基因组 DNA, 进行 bFGF 的特异 PCR, 结果表明 PA317/ pLXSN-bFGF, COS-7/ pLXSN—bFGF 组均能扩增出特异的 bFGF cDNA 片段, 表明 bFGF cDNA 已成功地整合到感染后的靶细胞及产病毒细胞的基因组中, 见图 2。



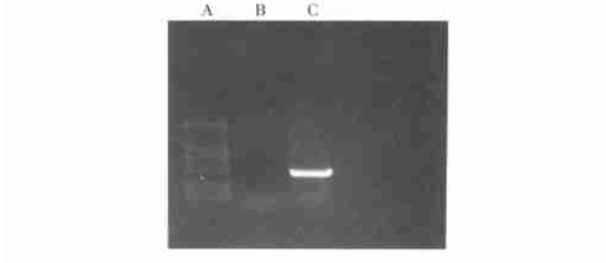
A: DL-2000 markers; B: PA317/ pLXSN; C: PA317/ pLXSN-bFGF; D: COS-7/ pLXSN; E: COS-7/ pLXSN-bFGF

图 2　包装细胞与靶细胞基因组 **bFGF cDNA** 整合鉴定

Fig 2　Integration analysis of recombinant retrovirus by PCR

2.4　bFGF mRNA 在哺乳动物细胞中表达的检测

bFGF cDNA 重组逆转录病毒感染 COS-7 细胞 48 h 后, 提取 COS-7 细胞总 RNA 做 RT-PCR, 同时用空载体 pLXSN 组感染 COS-7 细胞做对照。结果表明, 感染 pLXSN-bFGF 组 COS-7 细胞有 bFGF mRNA 表达, 而阴性对照组 COS-7 细胞无 bFGF mRNA 表达, 见图 3。



A: DL-2000 markers; B: COS-7/ pLXSN; C: COS-7/ pLXSN-bFGF

图 3　**RT-PCR** 检测 **bFGF mRNA** 在靶细胞中的表达

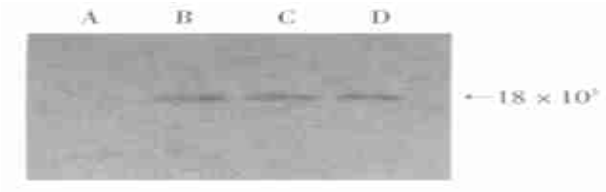
Fig 3　RNA analysis of recombinant retrovirus by PT-PCR

2.5　bFGF 蛋白在哺乳动物细胞中表达的检测

重组逆转录病毒感染 COS-7 细胞, 筛选 2 周后, 混合传代

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

培养，取第 1、4、7 代细胞，提取细胞总蛋白，进行常规 SDS-PAGE 后做 Western blotting 检测。并以 pLXSN 感染组作阴性对照。结果表明，在感染 1、4、7 代均有 bFGF 蛋白表达，且无明显差异，而对照组无 bFGF 蛋白表达。表明转移至哺乳动物细胞的 bFGF cDNA 能在较长一段时间内稳定表达，见图 4。



A: COS-7/pLXSN; B: Passage 1; C: Passage 4; D: Passage 7

图 4 **Western blotting** 检测感染 **bFGF cDNA** 重组逆转录病毒的 **COS-7** 细胞不同时相 **bFGF** 蛋白的表达

Fig 4 Western blot of bFGF in COS-7 cells at different passages after recombinant retrovirus transfection

3 讨论

逆转录病毒是目前基因转移中应用最为广泛的一类载体，它能将外源基因有效的整合到宿主细胞基因组中，并随细胞分裂而传给后代。PLXSN 是美国 FDA 批准许可进行临床实验的新一代逆转录病毒载体。外源基因由内部启动子 LTR 启动。此载体将逆转录病毒基因组中编码自身结构蛋白的基因 gag、pol、env 缺失掉，由外源基因取代这一空白区，故为缺陷型病毒，不能包装成子代病毒颗粒。包装细胞系可为逆转录病毒载体提供结构蛋白组分，二者相互补偿，就能包装成子代病毒颗粒。因此重组逆转录病毒仅能在包装细胞系中扩增，感染靶细胞后不能扩增，具有很高的安全性[6,7]。

bFGF 是一种多功能细胞生长因子，对外胚层、中胚层和内胚层多种来源细胞，均有促丝裂原作用和趋化作用。最近研究表明 bFGF 也是一种神经营养因子，具有保护中枢神经系统和神经源及促进神经细胞生长和神经组织再生的作用，并已逐渐应用于临床。实验表明，bFGF 能延缓 PD 及 AD 等神经系统退行性疾病的进程，对中枢和周围神经损伤也有其特殊应用价值先前的研究多为局部或全身直接应用 bFGF[8]，但全身用药时，难以达到有效药物浓度，局部用药也存在药效难以持久、靶点难以到达等困难，其应用受到了极大限制。本研究应用基因重组技术构建了 bFGF 逆转录病毒重组体，该重组逆转录病毒成功地感染了靶细胞，并介导了 bFGF cDNA 的转移，实现了 bFGF 在哺乳动物细胞内的稳定表达，为脑内移植基因治疗奠定了基础。目前正将 bFGF 基因修饰的神经前体细胞或非神经细胞移植于脑内，对 PD 等中枢神经系统退行性疾病进行实验治疗。

参考文献：

[1] Himmelseher S, Pfenninger E, Georgieff M. Basic fibroblast growth factor reduces lactic acid-induced neuronal injury in rat hippocampal neurons[J]. Crit Care Med, 1998, 26(12): 2 029—2 036.

[2] Wagner J P, Black I B, DiCicco-Bloom E. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor[J]. J Neurosci, 1999, 19(14): 6 006—6 016.

[3] Mann R, Mulligan R C, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus[J]. Cell, 1983, 33(1): 153—159.

[4] Miller A D, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6(8): 2 895—2 902.

[5] J. 萨姆布鲁克, E F. 费里齐, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 468—469.

[6] Miller A D, Rosman G J. Improved Retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980—986.

[7] Franceschini I A, Feigenbaum-Lacombe V, Casanova P, *et al*. Efficient gene transfer in mouse neural precursors with a bicistronic retroviral vector [J]. J Neurosci Res, 2001, 65(3): 208—219.

[8] Abe K, Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions[J]. Pharmacol Res, 2001, 43(4): 307—312.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)08-0900-01

异体肾移植手术麻醉中颅内出血 1 例

A case report of intracranial hemorrhage during anaesthesia for allogenic renal transplantation

赵宝生，鲁开智，陶国才 （第三军医大学附属西南医院麻醉科，重庆 400038）

患者，男，28 岁，因慢性肾衰、终末期尿毒症、双肾多发性囊肿，拟在全麻下行异体肾脏移植术。既往有高血压病史，术前 Hb 7.2g、血小板(PLT)47× 10/L，2 d 前曾解黑大便 2 次，大便隐血(+)，提示有出血倾向，否认颅脑外伤史。入手术室时神志清楚，测 Bp 24.1/17.0 kPa(181/127 mmHg)、HR 126 次/mim，以氟哌利多、芬太尼、维库溴铵、异丙酚、佩尔地平诱导插管，N_2O、芬太尼、维库溴铵维持麻醉。开放肾血管前 Bp 23.0/14.0 kPa、HR 71 次/min；

（下转 903 页）

作者简介：赵宝生(1962—)，男，陕西省武功县人，主管技师，主要从事静脉麻醉新药的临床应用方面的研究，发表论文 7 篇。电话：(023)68754000—73095

收稿日期：2001-08-15；修回日期：2002-02-05

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