

腺病毒载体介导 SCL 基因转染 Cajal 间质细胞及其表达

张林 童卫东 刘宝华 李春穴

【摘要】 目的 构建含有人干细胞白血病(stem cell leukemia, SCL)基因的重组腺病毒载体,并观察其对 Cajal 间质细胞的转染及其介导的 SCL 基因的表达。为下一步在体转染 Cajal 间质细胞,观察其对 Cajal 间质细胞表型逆转的影响奠定基础。**方法** 利用 Ad-Easy 系统、细菌内同源重组法快速构建重组腺病毒 Ad-GFP/SCL。通过观察绿色荧光蛋白的表达评估重组腺病毒对培养的 Cajal 间质细胞的转染效率。通过 RT-PCR 法分析转染 Cajal 间质细胞后 SCL mRNA 的表达。**结果** 酶切鉴定及 PCR 结果证明成功构建了含有人 SCL 基因的重组腺病毒,病毒滴度为 1.6×10^{11} pfu/ml;对 Cajal 间质细胞的转染率高达 100%;RT-PCR 法检测转染 Cajal 间质细胞后 SCL mRNA 有表达。**结论** 成功构建的含人 SCL 基因的重组腺病毒对 Cajal 间质细胞有很强的转染能力,可介导 SCL 基因在 Cajal 间质细胞中表达。

【关键词】 腺病毒载体; 干细胞白血病基因; 同源重组; 转染; Cajal 间质细胞

【中图分类号】 Q782 **【文献标识码】** A

Adenovirus vector mediating SCL gene expression and transfecting Cajal interstitial cells and expression of adenovirus vector ZHANG Lin, TONG Wei-dong, LIU Bao-hua, LI Chun-xue. Department of General Surgery, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Corresponding author: LIU Bao-hua, E-mail: lbh57268@163.com

【Abstract】 Objective To construct recombinant adenovirus vector containing human stem cell leukemia (hSCL) gene to observe its ability in transfecting Cajal interstitial cells and mediating SCL gene expression, which may lay basis for further in vivo transfection of Cajal interstitial cells to observe the effect of the recombinant adenovirus vector on changes of monotype of Cajal interstitial cells. **Methods** The recombinant adenovirus Ad-GFP/SCL was rapidly constructed by using Ad-Easy system based on the homologous recombination in bacteria. Then, Cajal interstitial cells cultured *in vitro* were infected with 1.6×10^9 pfu of recombinant adenovirus. The distribution and efficiency of recombinant adenovirus mediated hSCL was observed by expression of green fluorescence protein (GFP) under the fluorescent microscope. The expression of hSCL mRNA transfected with Cajal interstitial cells was measured by RT-PCR method. **Results** Restriction endonuclease and PCR analyses confirmed that the hSCL gene was successfully inserted into the adenovirus vector, with titer of the recombinant adenovirus for 1.6×10^{11} pfu/ml. The adenovirus had a high transfection efficiency up to 100%. RT-PCR analysis showed expression of hSCL mRNA in Cajal interstitial cells transfected by hSCL. **Conclusions** The recombinant adenovirus containing human hSCL gene is successfully constructed by homogenous recombination in bacteria and it has a high transfection efficiency and can mediate expression of Cajal interstitial cells.

【Key words】 Adenovirus vector; Stem cell leukemia gene; Homogenous recombination; Transfection; Cajal interstitial cells

干细胞白血病(stem cell leukemia, SCL)基因最早发现于 T 淋巴细胞急性白血病细胞内,编码一种螺旋-环-螺旋类转录因子。研究证明 SCL 是 c-kit 上游的重要调控基因,通过作用于 c-kit 基因启动子调节 c-kit 表达,具有强烈的促 c-kit 表达作用^[1]。近期研究表明,一些外源性因素导致 c-kit 表达下调,

引发 SCF/c-kit 通路异常,驱使 Cajal 间质细胞发生平滑肌细胞样表型转化(而非凋亡),最终导致胃肠动力障碍,可能是慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)等众多胃肠动力紊乱性疾病 Cajal 间质细胞减少的共同机制^[2]。为此,本实验拟构建表达人 SCL 基因的重组腺病毒载体,观察其对 Cajal 间质细胞的转染及其介导的 SCL 基因的表达能力。为下一步在体转染 Cajal 间质细胞,观察其对 Cajal 间质细胞表型逆转的影响奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30300156)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科

通讯作者:刘宝华, E-mail: lbh57268@163.com

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞株、实验动物和主要试剂

含有人 SCL cDNA 质粒 pIRES2-EGFP/SCL 由本科李春穴博士惠赠, BJ5183 菌株、pAdTrack-CMV、pAdEasy-1 由 Johns Hopkins 大学 He TC 教授惠赠, pcDNA3.1(+), Ad-GFP/Wnt 由重庆医科大学季业伟博士惠赠, DH5 α 、Hela 以及 HEK293 细胞株由大坪医院野战外科研究所 7 室长期保存。Balb/c 小鼠, 出生后 15~20 d 内, 雌雄不限, 清洁级, 由大坪医院野战外科研究所动物试验中心提供。各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶分别购自 MBI、Promega 公司, 脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Roche 公司, 小量质粒 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司, RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 重组腺病毒的快速构建

参照文献[3]进行:(1)pcDNA3.1(+)/SCL 的构建:用 EcoR I 单酶切法将 pIRES2-EGFP/SCL 的 SCL 片段克隆到 pcDNA3.1(+)的 EcoR I 位点。(2)pAdTrack-CMV/SCL 的构建:用 Hind III 和 Xho I 双酶切法将 SCL 片段定向克隆到 pAdTrack-CMV。(3)重组腺病毒质粒载体 pAdeasy-1/SCL 的构建及鉴定:电穿孔法。抗性筛选、酶切鉴定转化阳性菌落。

1.3 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增和纯化

参照文献[3]进行。其中 PCR 鉴定引物如下:上游为:5'-TCCGGCGGAGTGGAGATCCTATTC-3', 下游为:5'-TGGCTGATCTGCTGGCCAGAC-3'。扩增条件是 94℃变性 40 s→60℃退火 50 s→72℃延伸 60 s(35 个循环)→72℃延伸 10 min。

1.4 病毒滴度测定以及生物安全性的观察

病毒滴度参照文献[3]进行。在六孔板上按照 2×10^6 浓度接种 Hela 细胞, 待长至融合度约 70% 时, 重组腺病毒感染 Hela 细胞 (MOI = 50), 经反复传代 3 次以上观察细胞形态变化以观察重组腺病毒的生物安全性。

1.5 Cajal 间质细胞的体外培养、实验分组及处理

参照文献[4]方法培养 Cajal 间质细胞。实验分组及处理:正常对照组、阳性对照组和腺病毒处理组。其中腺病毒处理组给予 1.6×10^9 pfu 的重组腺病毒 Ad-GFP/SCL。

1.6 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 对培养的 Cajal 间质细胞的转染效率

于转染后 48 h 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性

细胞数。在荧光显微镜下随机挑取 5 个高倍视野, 分别计算绿色荧光阳性和阴性的细胞的平均数, 阳性细胞百分数代表细胞的转染效率。

1.7 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 介导的 SCL 基因在 Cajal 间质细胞中的表达

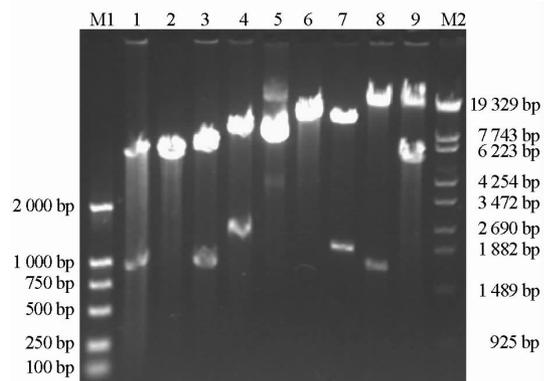
分别于转染后 2、7、15 d 提取 Cajal 间质细胞总 RNA, RT-PCR 法分析 SCL mRNA 表达。上、下游引物及反应参数同前。

2 结果

2.1 构建的中间质粒及重组腺病毒鉴定

酶切鉴定:对 pcDNA3.1(+)/SCL 质粒进行 EcoR I 酶切, 可得到约 1 kb 小片段和约 5 kb 大片段, 其中约 1 kb 小片段与插入的目的片段大小相一致(图 1)。对 pAdTrack-CMV/SCL 质粒进行 Hind III 和 Xho I 双酶切, 前者得到约 1 kb 小片段和约 9 kb 大片段, 其中约 1 kb 小片段与插入的目的片段大小相一致(图 1)。两质粒的插入目的片断经测序鉴定:与 GenBank 报道完全一致。对 pAdeasy-1/SCL 质粒进行 Hind III 和 Xho I 双酶切, 可得到约 1 kb 小片段和约 35 kb 大片段, 其中约 1 kb 小片段与插入的目的片段大小相一致(图 1)。用 Pac I 酶切, pAdeasy-1/SCL 质粒可出现一个约 30 kb 的大片段和一个约 4.5 kb 的特征性小带而得以鉴定。

PCR 法:以 pAdeasy-1/SCL 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 上、下游引物同上, 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 得到约 1 kb 片段, 与插入的目的片段大小相一致。



M1:DL 2000; 1:pIRES2-EGFP/SCL(EcoR I); 2:pcDNA 3.1(+)(EcoR I); 3:pcDNA3.1(+)/SCL(EcoR I); 4:pcDNA3.1(+)/SCL(Hind III + Xho I); 5:pAdTrack-CMV; 6:pAdTrack - CMV(Hind III + Xho I); 7:pAdTrack-CMV/SCL(Hind III + Xho I); 8:pAdeasy-1/SCL(Hind III + Xho I); 9:Ad-GFP/SCL(Pac I); M2: λ -EcoT14 I digest

图 1 中间质粒及重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 酶切鉴定电泳图

2.2 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 的产生、鉴定及滴度测定

pAdeasy-1/SCL 经脂质体转染 293 细胞后 24 h 出现绿色荧光蛋白表达, 荧光表达随时间增强。约 5~7 d 左右, 293 细胞开始出现细胞病变效应, 表现为细胞肿胀、变圆、蚀斑出现(图 2)。阳性空斑抽提物经 PCR 扩增检测, 可特异性扩增出约 1 kb 的 SCL cDNA 片段。而未转染的细胞基因组未扩增出相应条带(图 3)。本实验单孔细胞计数平均为 8.0×10^8 , 根据前述滴度测定公式, 计算病毒滴度为 1.6×10^{11} pfu/ml。

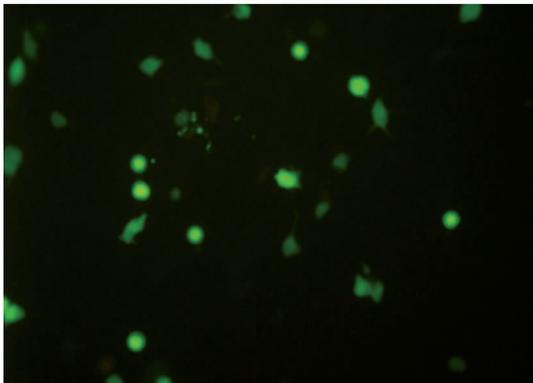
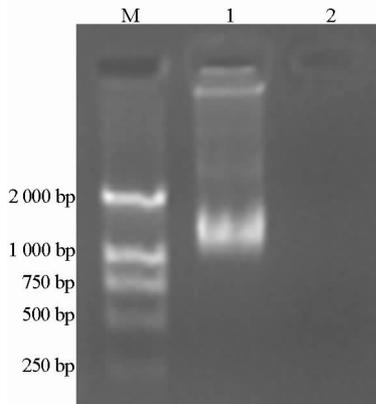


图 2 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 形成的空斑 (×200)



M: DL 2000; 1: 转染 293 细胞; 2: 未转染 293 细胞
图 3 重组 Ad/SCL 质粒转染 293 细胞后病毒上清及其空白对照 PCR 产物(1 kb)

2.3 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 生物安全性的观察

重组腺病毒感染 HeLa 细胞(MOI = 50), 经反复传代 3 次以上细胞生长未受影响, 未见细胞病变效应, 排除了有复制能力的腺病毒污染的可能性(图 4)。

2.4 重组腺病毒对 Cajal 间质细胞的转染

用不同 MOI 的重组腺病毒感染 Cajal 间质细胞, 当 MOI 为 50 时, 超过 90% 的细胞出现绿色荧光蛋白表达。当 MOI 为 100 时, 100% 的细胞出现绿色荧光蛋白表达。表明所构建的重组腺病毒生物活性高, 可以有效地转导目的基因表达(图 5)。

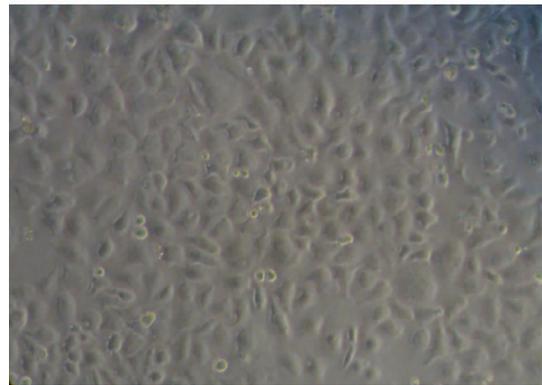


图 4 HeLa 细胞感染重组腺病毒 Ad-GFP/SCL (MOI = 50) 后的生长状态 (×200)

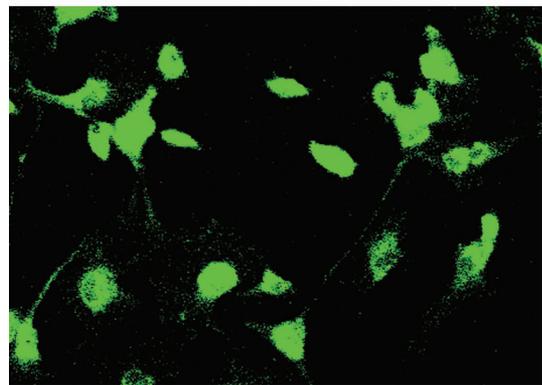
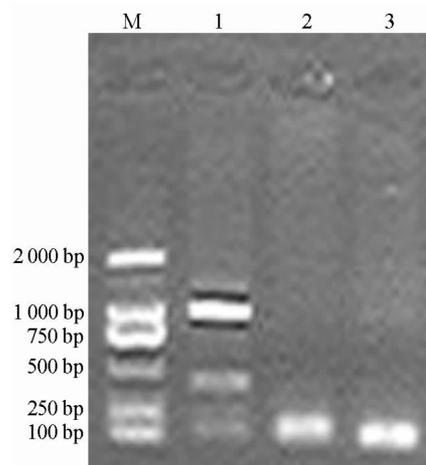


图 5 Cajal 间质细胞转染重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 后 48 h GFP 的表达 (×200)

2.5 重组腺病毒 Ad-GFP/SCL 介导的 SCL 基因在 Cajal 间质细胞中的表达。

RT-PCR 法分析 15 d 时 Cajal 间质细胞中 SCL mRNA 的表达, 实验组可见约 1.2 kb 针对 SCL 基因的特异性条带表达, 而阳性对照组以及正常对照组均未见表达(图 6)。



M: Dell 2000 marker; 1: Cajal 间质细胞; 2: 阳性对照组; 3: 阴性对照组

图 6 RT-PCR 分析 15 d Cajal 间质细胞中 SCL mRNA 表达

3 讨论

Cajal 间质细胞是胃肠道的起搏细胞,具有产生、传播慢波的功能,参与调控肠神经信号传递^[5]。业已证明慢传输性便秘、慢性假性肠梗阻等众多胃肠动力紊乱性疾病都存在 Cajal 间质细胞数目减少^[6]。新近的研究提示 Cajal 间质细胞发生平滑肌细胞样表型转化(而非凋亡)可能是众多胃肠动力紊乱性疾病 Cajal 间质细胞减少的共同机制^[2]。

研究证明 Cajal 间质细胞细胞膜特异性表达 c-kit。c-kit 作为受体酪氨酸激酶家族的重要成员,与其配体干细胞因子(stem cell factor, SCF)结合后所启动的信号通路,不仅对造血干细胞、成黑色素细胞等具有重要的调控作用,对 Cajal 间质细胞发育、分化及胃肠道节律性活动的稳定也至关重要^[7]。腹腔注射 c-kit 封闭性单抗 ACK2 可使小鼠肠道 Cajal 间质细胞表型转化呈平滑肌细胞样表型,肠道慢波消失。我们前期的研究表明 c-kit 表达下调可能是引起上述病变的主要病理机制。

SCL 基因位于 1 号染色体短臂(1P32),最早发现于 T 淋巴细胞急性白血病细胞内,编码一种螺旋-环-螺旋类转录因子。SCL 主要表达于造血系统、上皮及部分中枢神经系统,对 SCF 依赖型细胞的生存具有重要的调控作用。研究证明 SCL 是 c-kit 上游的重要调控基因,通过作用于 c-kit 基因启动子调节 c-kit 表达来发挥其“生存基因”的功能,具有强烈的促 c-kit 表达作用^[1]。如果采用基因工程技术,将 SCL 基因导入 Cajal 间质细胞,能否增加 c-kit 的表达,从而逆转 Cajal 间质细胞表型转化呢?

本实验所使用的构建重组腺病毒的 AdEasyTM系统是代替传统腺病毒重组系统的一个快捷系统。在这个系统中,只需两步即可产生重组腺病毒:先将表达盒装入转移载体,然后再通过同源重组插入腺病毒基因组。在 AdEasyTM载体系统中,含有大部分腺病毒基因组的载体为超螺旋质粒,而不是线性 DNA,同源重组在大肠杆菌内进行。相对于传统的同源重组法而言,这两点改进使病毒 DNA 操作更容易,同时由于利用了大肠杆菌的高效同源重组特性

而使重组载体的筛选变得更为简单。本实验中,由于携带目的基因 SCL 的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 多克隆位点两侧及腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 基因组两侧均存在相同的同源序列,在大肠埃希氏菌 BJ5183 中很快实现同源重组,获得重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/SCL。经脂质体转染 HEK293 细胞,最终包装产生重组腺病毒。超速离心纯化后病毒滴度测定在 $10^{10} \sim 10^{11}$ pfu/ml 之间。整个实验过程前后耗时约 2 个月,证实该法确实简便、可靠、高效,值得进一步推广应用。

我们构建了含人 SCL 基因的腺病毒载体,经酶切鉴定以及 PCR 结果证实含人 SCL 重组腺病毒构建成功。病毒滴度达 1.6×10^{11} pfu/ml,能高效、安全地转染体外培养的 Cajal 间质细胞,并且能介导的 SCL 基因在 Cajal 间质细胞中的表达。表明此重组腺病毒能有效介导人 SCL 基因转染 Cajal 间质细胞,为下一步 Cajal 间质细胞表型逆转的基因治疗研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Sánchez M J, Bockamp E O, Miller J, *et al*. Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Sclder the control of a stem cell enhancer. *Development*, 2001, 128(23):4815-4827.
- [2] Lyford G L, He C L, Soffer E, *et al*. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut*, 2002, 51(4):496-501.
- [3] 赵峰,周清华,覃杨. 突变 k-ras 基因重组腺病毒的构建. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(1):14-17.
- [4] 李春穴,童卫东,刘宝华,等. Cajal 间质细胞的分离、培养方法探讨. *消化外科*, 2004, 3(4):267-269.
- [5] Rich A, Hanani M, Ermilov L G, Malysz J, *et al*. Physiological study of interstitial cells of Cajal identified by vital staining. *Neurogastroenterol Motil*, 2002, 14(2):189-196.
- [6] Sanders K M, Ordog T, Ward S M, *et al*. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(5):G747-756.
- [7] Blumer-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature*, 2001, 411(6835):355-365.

(收稿日期: 2006-12-25)

(本文编辑: 毛蜀)