

[文章编号] 1000-1182(2010)04-0430-05

小鼠增强型绿色荧光蛋白-过氧化物酶体增长因子活化受体 $\gamma 2$ 融合表达重组腺病毒的构建及表达

廖丽姿¹ 肖金刚¹ 杨苗苗¹ 孔子任¹ 孙钦策² 田卫东¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064)

[摘要] 目的 构建小鼠增强型绿色荧光蛋白(EGFP)-过氧化物酶体增长因子活化受体(PPAR) $\gamma 2$ 基因的腺病毒重组体, 并检测其在感染病毒的小鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)中的表达。方法 从pcDNA flag PPAR γ 质粒上切取目的片段PPAR $\gamma 2$, 克隆入pEGFP-C1和pEGFP-N1, 以pEGFP-C1-PPAR $\gamma 2$ 为模板通过PCR技术获得EGFP-PPAR $\gamma 2$ 基因, 酶切DC315质粒, 获得DC315-EGFP-PPAR $\gamma 2$ 质粒, 在脂质体介导下与腺病毒辅助大质粒pBHGlox Δ E1、3Cre共转染HEK293细胞, 包装产生复制缺陷型重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR $\gamma 2$, 酶切鉴定证实构建成功。转染HEK293细胞并检测其体外表达情况, 经HEK293细胞扩增后, 测定病毒滴度, 转染小鼠BMSC, 72 h后鉴定其成脂分化情况。结果 将pEGFP-C1-PPAR $\gamma 2$ 和pEGFP-N1-PPAR $\gamma 2$ 通过脂质体转染入HEK293细胞后, 在倒置相差显微镜下观察, 前者在细胞核内有较强的绿色荧光, 后者的荧光强度则极低。对重组腺病毒进行酶切和PCR鉴定, 证实含小鼠EGFP-PPAR $\gamma 2$ 的Ad5腺病毒载体构建成功。在倒置相差显微镜下观察到BMSC细胞核内有绿色荧光。结论 成功构建含小鼠EGFP-PPAR $\gamma 2$ 的重组Ad5腺病毒载体, 为基因辅助的脂肪组织工程技术、抗肿瘤研究等提供了安全有效的转基因载体。

[关键词] 过氧化物酶体增长因子活化受体; 重组腺病毒; 骨髓间充质干细胞

[中图分类号] Q 81 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.04.022

Construction of recombinant gene adenovirus encoding enhanced green fluorescence protein-peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma 2$ fusion protein and its expression in bone marrow mesenchymal stem cells LIAO Li-zhi¹, XIAO Jin-gang¹, YANG Miao-miao¹, KONG Zi-ren¹, SUN Qin-ce², TIAN Wei-dong¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

[Abstract] **Objective** To construct mouse enhanced green fluorescence protein(EGFP)-peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) $\gamma 2$, and to detect EGFP-PPAR $\gamma 2$ expression in infected mouse bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC). **Methods** Cut the fragment of PPAR $\gamma 2$ from the expression plasmid pcDNA flag PPAR γ , then cloned the gene fragment into pEGFP-C1 and pEGFP-N1 vector. Subsequently, subclone the fragment EGFP-PPAR $\gamma 2$ from pEGFP-C1-PPAR $\gamma 2$ into the shuttle plasmid DC315. HEK293 cells were co-transfected with the constructed recombinant shuttle plasmid DC315-EGFP-PPAR $\gamma 2$ and large adenovirus helper plasmid pBHGlox Δ E1, 3Cre in mediation of liposome. The obtained replication-defective recombinant adenovirus Ad-EGFP-PPAR $\gamma 2$ was confirmed. Then it was propagated in HEK293 cells. After the BMSC were transfected for 72 h, adipogenic differentiation was demonstrated. **Results** HEK293 cells were transfected with the pEGFP-C1-PPAR $\gamma 2$ or pEGFP-N1-PPAR $\gamma 2$ in mediation of liposome. The former green fluorescence protein was better than the latter by fluorescence microscope. The recombinant plasmids were digested and identified. Western blot analysis showed the expression of EGFP-PPAR $\gamma 2$ *in vitro*. EGFP-PPAR $\gamma 2$ protein was detectable in the nucleus of BMSC. **Conclusion** The recombinant adenovirus encoding EGFP-PPAR $\gamma 2$ fusion protein was successfully constructed, which provided a basis for application of EGFP-PPAR $\gamma 2$ gene to adenovirus-mediated gene therapy.

[Key words] peroxisome proliferator-activated receptor; recombinant adenovirus; bone marrow mesenchymal stem cell

[收稿日期] 2009-12-22; **[修回日期]** 2010-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30973348); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20070610064)

[作者简介] 廖丽姿(1983—), 女, 湖南人, 硕士

[通讯作者] 田卫东, Tel: 028-85501445

过氧化物酶体增长因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)属于核激素受体超家族。PPAR γ 是研究的最为广泛的一种。PPAR激活后具有促进脂肪细胞分化、增强机体对胰岛素的敏感性、调节体内糖和脂类平衡等作用。本研究采用DNA重组技术,构建含小鼠增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)-PPAR γ 2基因的重组Ad5腺病毒载体,在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)中检测目的基因的表达,为基因辅助的脂肪组织工程技术、癌症治疗等提供了安全有效的转基因载体,为研究PPAR γ 在体内的生物学功能、从时空角度上研究PPAR γ 2的生物学特征提供了可能。

1 材料和方法

1.1 材料

In-Fusion™ PCR克隆试剂盒(Clontech公司,美

国),各种限制性内切酶及T4 DNA连接酶(NEB公司,美国),质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA片段纯化试剂盒和DNA提取试剂盒(Qiagen公司,德国),高糖DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone公司,美国),Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国),小鼠来源的EGFP单克隆抗体、NC膜(Milipore公司,美国),HRP标记羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物公司),ECL发光试剂盒(Santa Cruz公司,美国),油红O、DAPI(Sigma公司,美国),IX70倒置相差显微镜(Olympus公司,日本)。含全长PPAR γ 2序列的克隆载体pcDNA flag PPAR γ (Addgene公司,美国),HEK293细胞(口腔疾病研究国家重点实验室,四川大学),BMSC(Cyagen Biosciences公司,美国),AdMax™ Kit D重组腺病毒载体系统(Microbix公司,加拿大),实验引物合成由上海英峻生物科技有限公司完成。

表 1 构建质粒的具体引物序列

Tab 1 The primer sequences used in plasmid construction

| 质粒 | 引物名称 | 序列 | 产物长度/bp |
|-----------------------------|------|---|---------|
| pEGFP-N1-PPAR γ 2 | P1 | 5'-TTTGAGCTCCGATAAAGCAATGGGTGAAACT-3' | 1 526 |
| | P2 | 5'-TTTGGGCCCTATACAAGTCCTTGTAGATCTCCTG-3' | |
| pEGFP-C1-PPAR γ 2 | P3 | 5'-ATCGAGCTCACGATAAAGCAATGGGTGAAACTCT-3' | 1 556 |
| | P4 | 5'-GAGTTTTTGTTCGAAGGGCCCTCTAGACTAATA-3' | |
| pDC315-EGFP-PPAR γ 2 | P5 | 5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATG-3' | 2 315 |
| | P6 | 5'-ATAAGCTTGATATCGAATTCCTAATACAAGTCCTTGTAGATCTCC-3' | |
| | P7 | 5'-CCAAGGATTCATGACCAG-3' | 603 |
| | P8 | 5'-CGATGCTAGACGATCCAGAC-3' | |

1.2 EGFP-PPAR γ 融合表达载体的构建和鉴定

以pcDNA flag PPAR γ 为模板得到目的基因的PCR产物,将产物和pEGFP-C1、pEGFP-N1空载体同时分别用Sac 和Apa 双酶切后切胶回收,分别回收约1 600、4 700 bp片段,将2个片段用T4 DNA连接酶连接过夜,然后转化Top10大肠杆菌感受态,平铺于含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的LB培养基中。挑单克隆摇菌过夜,抽提质粒DNA,用Sac 和Apa 双酶切鉴定,鉴定正确的克隆送出测序。测序证实序列的正确性。转染HEK293细胞,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 饱和湿度下于含10%FBS的DMEM培养基中培养。转染分3组,分别是pEGFP-C1-PPAR γ 2组、pEGFP-C1空载体组(阳性对照组)、空白对照组(阴性对照组)。对应的pEGFP-N1-PPAR γ 2同此处理。各组质粒按照Lipofectamine 2000说明进行转染,24 h后在荧光显微镜下观察绿色荧光的表达和定位。转染了pEGFP-C1-PPAR γ 2的细胞在胞核内有较亮的绿色

荧光,而转染了pEGFP-N1-PPAR γ 2的细胞在胞核内几乎没有绿色荧光。

1.3 重组穿梭质粒pDC315-EGFP-PPAR γ 2的构建

以pEGFP-C1-PPAR γ 2为模板得到融合表达目的基因EGFP-PPAR γ 2的PCR产物,将产物和pDC315-EGFP空载体同时分别用Age 和EcoR 双酶切后切胶回收,分别回收EGFP-PPAR γ 2序列和pDC315-EGFP空载体双酶切后片段,将2片段用In-Fusion交换酶于25 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min,再于42 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min制备克隆交换液,然后转化大肠杆菌感受态,平铺于含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的LB培养基中。挑单克隆摇菌过夜,抽提质粒DNA,阳性克隆行PCR鉴定,正确的克隆送出测序。测序正确的重组穿梭质粒用于后续的同源重组实验。

1.4 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2在HEK293细胞中的包装

将重组穿梭质粒DC315-EGFP-PPAR γ 2与辅助

大质粒pBHGlox Δ E1、3Cre通过Lipofectamine 2000共转染HEK293细胞,每天观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),当出现完全CPE时收获细胞, -80~37℃反复冻融3次,释放重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2。

1.5 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染后目的蛋白的表达检测

将40 μ L腺病毒原液加入HEK293细胞中, 24~48 h后观察细胞生长情况, 然后收集细胞, 制备为蛋白印迹法(Western blot)检测样品。

1.6 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2的扩增和滴度测定

感染前1 d将HEK293细胞传代至60 mm培养皿于DMEM完全培养液中培养, 待细胞融合度达70%~80%时行Ad-EGFP-PPAR γ 2感染。病毒液200 μ L加至含1.0 mL DMEM完全培养液的60 mm培养皿中, 37℃培养90 min, 向细胞中加入4 mL DMEM完全培养液, 继续培养。观察细胞出现典型的CPE, 且有50%的细胞脱壁时低速离心收集细胞并重悬于10 mL DMEM中, -80~37℃反复冻融、振荡3次, 于4℃, 7 000 g离心5 min, 收集病毒上清液于-80℃下保存。重复感染3次, 第2次在100 mm培养皿中进行, 第3次在10个75 cm²培养瓶中进行, 经3次感染可获得大量的重组腺病毒。采用TCID₅₀方法测定病毒滴度后-80℃下分装保存备用。

1.7 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染小鼠BMSC及检测

1.7.1 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染小鼠BMSC 采用第8代BMSC, 胰酶消化后接种到24孔板, 设定感染复数(multiplicity of infection, MOI)

值分别为0、10、50、100、200、400, 并根据各MOI值计算所需病毒载体数量, 换算出体积值, 每个MOI值对应4孔。24 h后观察细胞密度达到70%~80%时, 消化单孔细胞计数。将各MOI值所需病毒载体体积与含10%FBS的DMEM混匀, 使每孔滴加终体积为200 μ L。将孔板细胞用含10%FBS的 α -DMEM轻柔漂洗2次后, 滴加病毒产品与培养液的混合液至相应的孔内。37℃、5%CO₂的培养箱培养1 h, 弃混合液, 更换含10%FBS的 α -DMEM。

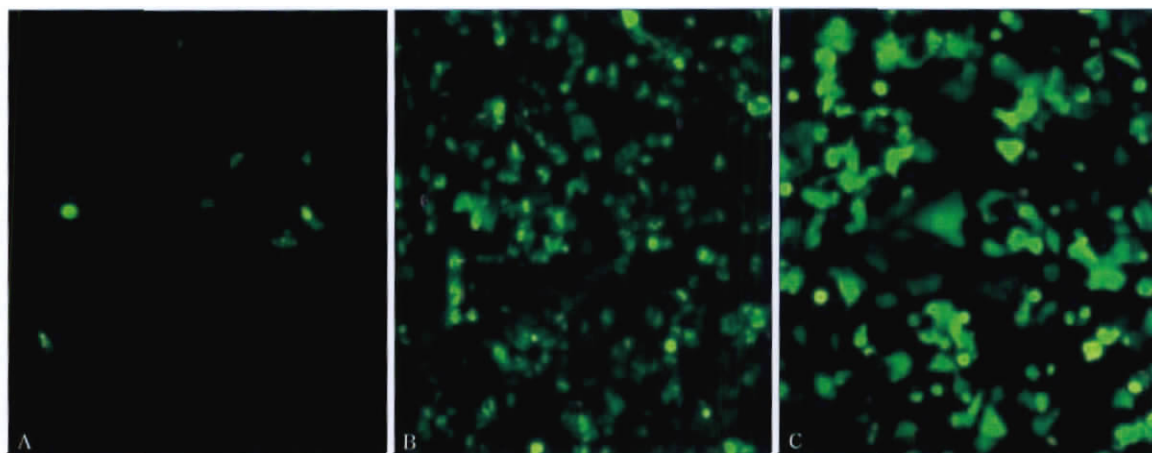
1.7.2 倒置相差显微镜观察以及计算转染效率 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2携带有报告基因-绿色荧光蛋白。分别于转染后24、48、72、96 h, 于倒置相差显微镜下观察EGFP的表达。采用传统人工计数方法计算转染效率, 以表达EGFP的细胞为转染阳性细胞, 根据以下公式计算转染效率: 转染效率=EGFP阳性细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.7.3 油红O染色 观察到BMSC胞质中有脂滴形成时吸去培养液, 磷酸盐缓冲液洗涤2次, 体积分数4%多聚甲醛固定15 min, 以质量分数0.75%油红O染色20 min, DAPI复染2~5 min, 在倒置相差显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 EGFP-PPAR γ 融合表达载体的构建和鉴定

以pcDNA flag PPAR γ 为模板, 2对引物P1、P2和P3、P4行PCR扩增得到目的片段PPAR γ 2的长度依次为1 526 bp和1 556 bp。构建载体DNA测序显示PPAR γ 2片段序列完全正确。pEGFP-N1-PPAR γ 2、pEGFP-C1-PPAR γ 2和pEGFP-C1转染HEK293细胞24 h后, 结果见图1。



A: pEGFP-N1-PPAR γ 2转染HEK293细胞; B: pEGFP-C1-PPAR γ 2转染HEK293细胞; C: pEGFP-C1转染HEK293细胞。

图1 HEK293细胞被转染后的图像 倒置相差显微镜 \times 200

Fig 1 Transfection of HEK293 cells inverted phase contrast microscope \times 200

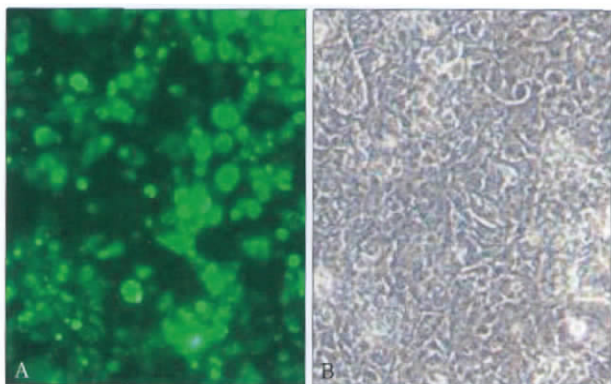
2.2 穿梭载体pDC315-EGFP-PPAR γ 2构建和鉴定 在构建重组穿梭载体pDC315-EGFP-PPAR γ 2

时, 以P5、P6为引物PCR扩增目的基因, 产物大小为2 315 bp, 以P7、P8为引物的阳性克隆的PCR鉴

定,产物大小为603 bp。

2.3 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2在HEK293细胞中的包装

pBHGlox Δ E1、3Cre与pDC315-EGFP-PPAR γ 2共转染HEK293细胞后的第1、2天是整个过程中荧光效率最高的时候,之后由于细胞生长和传代,荧光开始丢失;在转染后的第14天出毒。继而出现特征性CPE,即细胞变大变圆,折光性增强,并开始出现明显噬斑甚至细胞脱落,而正常细胞未出现此现象(图2)。



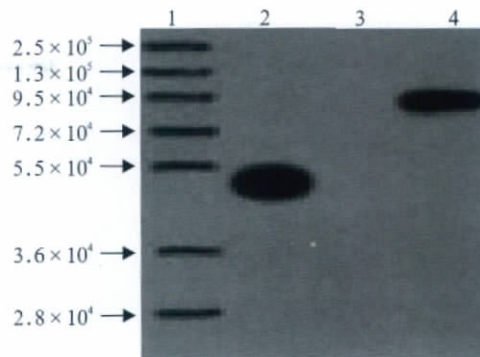
A: 感染腺病毒; B: 未感染腺病毒。

图2 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2感染HEK293细胞前后的形态 倒置相差显微镜 $\times 200$

Fig 2 The shapes of HEK293 cells infected with Ad-EGFP-PPAR γ 2 inverted phase contrast microscope $\times 200$

2.4 Western blot检测EGFP-PPAR γ 2基因的蛋白表达水平

Western blot检测EGFP-PPAR γ 2基因的蛋白表达水平,观察到相对分子质量72 000~95 000间特征条带,其大小与EGFP-PPAR γ 2融合蛋白基本吻合(图3)。



1: Marker; 2: 带绿色荧光蛋白的细胞; 3: HEK293; 4: 感染Ad-EGFP-PPAR γ 2的细胞。

图3 HEK293细胞中EGFP-PPAR γ 2基因的蛋白表达水平

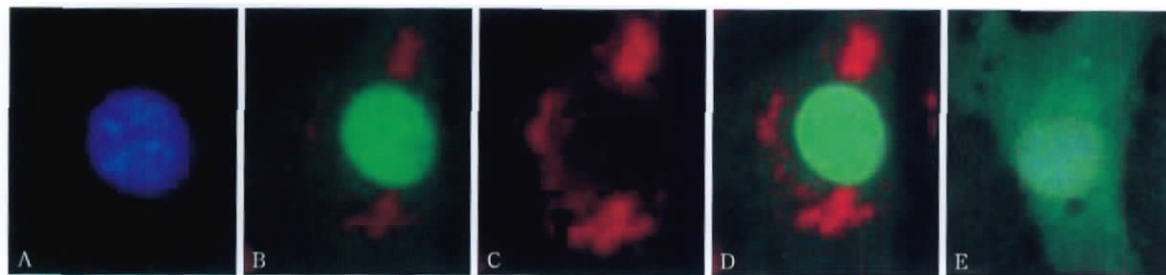
Fig 3 The protein expression of EGFP-PPAR γ 2 in HEK293 cells

2.5 病毒滴度的测定

重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2经反复感染、扩增及测定,获得病毒滴度为 5×10^9 pfu \cdot mL $^{-1}$ 。

2.6 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染小鼠BMSC及检测

以MOI值分别为10、50、100、200、400的重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染小鼠BMSC后48 h,随着MOI的增高,EGFP阳性细胞数量亦增多;当MOI为100时,转染BMSC效果较佳,BMSC细胞形态正常,转染效率超过90%,当MOI为400时细胞形态有细微异常。将重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2及对照组Ad-EGFP转染BMSC后72 h,油红O染色,倒置相差显微镜下观察,可见在转染重组腺病毒的BMSC的胞质中脂肪滴染色后呈红色,且EGFP-PPAR γ 2主要集中在细胞核中,而在空白对照中无此现象。即BMSC在重组腺病毒诱导下成脂分化,可见所构建的融合基因EGFP-PPAR γ 2是有生物学功能的(图4)。



A: DAPI染色; B: EGFP-PPAR γ 2荧光观察; C: 油红O染色; D: A、B、C图像合并; E: 空白对照。

图4 重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2转染小鼠BMSC 倒置相差显微镜 $\times 320$

Fig 4 The transfection of mouse BMSC by Ad-EGFP-PPAR γ 2 inverted phase contrast microscope $\times 320$

3 讨论

3.1 PPAR γ

研究^[1]发现,PPAR γ 除了在脂肪组织表达外,在上皮细胞、多种免疫细胞中也均有表达,甚至在口腔鳞状细胞癌、胃癌、骨髓瘤等多种肿瘤细胞中也有表达。其位于机体多种信号传导途径的交叉

点^[2],被配体激活后诱导多种肿瘤细胞分化,并抑制其恶性增殖,临床上其配体已经显示出良好的抑制肿瘤的效果,可能成为肿瘤治疗的一个新的基因靶点。

从时空角度对PPAR γ 的研究目前还不是很多,且均是使用pC1-nEGFP-C656G^[3]或pEGFP-C2^[4]为载体,质粒通过试剂转染细胞有其局限性,很多细胞

都难以达到理想的转染效率。本实验构建的小鼠EGFP-PPAR γ 2融合表达重组腺病毒能够实时追踪PPAR γ 2,这对于该基因配体的开发,以及与其他蛋白等相互作用的研究都是具有一定意义的。此外成功构建了EGFP-PPAR γ 2融合表达的2个真核载体pEGFP-C1-PPAR γ 2和pEGFP-N1-PPAR γ 2,在蛋白的表达效率上前者明显强于后者,可能是由于在PPAR γ 2的C端连接EGFP影响了相互之间的三级结构,因此在本实验的后续工作中,选择了pEGFP-C1-PPAR γ 2质粒为模板扩增融合基因,构建重组腺病毒。

3.2 BMSC

BMSC是一种中胚层的多能干细胞,具有容易获取、可以体外大量扩增、干细胞特性不易丢失等特点。这些特性使得BMSC作为种子细胞在组织工程、基因治疗等临床应用上极具优势^[5-7]。此外,有研究^[8]表明,肿瘤间充质可以来源于BMSC,BMSC渗入到肿瘤组织的微环境中,分泌多种生长因子,促进肿瘤血管生成、肿瘤干细胞微环境的形成等。故而如何将重组腺病毒Ad-EGFP-PPAR γ 2修饰过的BMSC应用到组织工程及肿瘤治疗还有待进一步的研究。

3.3 腺病毒载体

常用的载体包括病毒载体和非病毒载体。其中病毒载体可应用于基础研究、基因疗法或疫苗,它包括:逆转录病毒载体、慢病毒、腺病毒载体及腺相关病毒载体等。病毒载体较其他载体具有较多的优点,如感染细胞范围广、包装容量大、效率高^[9],因此应用日趋广泛。腺病毒是一种无外壳的双链DNA病毒,基因组长约36 kb,衣壳呈规则的20面体结构,直径约80~110 nm^[10]。病毒壳体蛋白与细胞表面的病毒受体结合,在病毒感染细胞过程中起着非常重要的作用。本实验采用的AdMax包装系统^[11]由以下2个组件构成:1)复制缺陷型腺病毒载体的穿梭质粒pDC315-EGFP,其外源基因克隆位点上游带有人类巨细胞病毒启动子,下游带有SV40polyA终止信号;2)含Cre-loxP系统的pBHGlox Δ E1、3Cre质粒,其含缺失E1和E3区编码序列的人类5型腺病毒基因组。克隆了外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的骨架质粒共转染HEK293细胞,利用Cre/loxP系统实现重组,产

生重组腺病毒。因在真核细胞内出毒,而非AdEasy系统中的细菌重组,保持了对腺病毒的生存压力,提高了目的基因的表达水平且有助于重组腺病毒基因组的完整性^[12]。

[参考文献]

- [1] Wang T, Xu J, Yu X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 58(1): 1-14.
 - [2] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPARgamma[J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 289-312.
 - [3] Akiyama TE, Baumann CT, Sakai S, et al. Selective intranuclear redistribution of PPAR isoforms by RXR alpha[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(4): 707-721.
 - [4] Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5926-5939.
 - [5] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2001, 226(6): 507-520.
 - [6] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation[J]. Transpl Immunol, 2005, 15(2): 81-89.
 - [7] Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery[J]. J Surg Res, 2005, 124(2): 201-208.
 - [8] Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, et al. Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(3): 187-198.
 - [9] St George JA. Gene therapy progress and prospects: Adenoviral vectors[J]. Gene Ther, 2003, 10(14): 1135-1141.
 - [10] Sharma A, Li X, Bangari DS, et al. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery[J]. Virus Res, 2009, 143(2): 184-194.
 - [11] Ng P, Parks RJ, Cummings DT, et al. A high-efficiency Cre/loxP-based system for construction of adenoviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(16): 2667-2672.
 - [12] 郭冬云, 王战会, 周向军, 等. 应用AdMax系统构建携带HCV核心基因Core的重组腺病毒载体[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(6): 552-555.
- WU Dong-yun, WANG Zhan-hui, ZHOU Xiang-jun, et al. Construction of recombinant adenovirus vector with HCV core gene by AdMax system[J]. Chin J Biologicals, 2009, 22(6): 552-555.

(本文编辑 王晴)