

• 短篇论著 •

小鼠神经生长因子前导肽和人内啡肽-2 融合基因重组腺病毒载体的构建与鉴定

Construction and identification of recombinant adenovirus carrying fusion gene of prepropeptide of nerve growth factor and endomorphin-2 gene

吴飞翔¹, 俞卫锋^{1*}, 黄盛东², 徐学武¹, 龚德军², 董刚¹, 袁扬², 孙玉明¹

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438; 2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 解放军胸心外科研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 制备并鉴定携带小鼠神经生长因子前导肽(PN)和人内啡肽-2(EM-2)融合基因的重组非增殖型腺病毒。**方法:** PN-EM-2 目的基因经酶切插入 pAxCawt 载体, 构建 PN-EM-2-pAxCawt 重组黏粒, 脂质体转染 293 细胞获取重组腺病毒。PCR 鉴定后扩增不含野生型病毒的阳性克隆并纯化, 采用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度; 体外感染 NIH3T3 细胞观察转基因的表达, 酶联免疫反应(EIA)法测定表达产物浓度。**结果:** 融合基因序列正确, PCR 可检测到 401 bp 的融合基因条带并排除野生病毒株, 腺病毒 Ad-PN-EM-2 滴度为 2.03×10^{10} pfu/ml。NIH3T3 细胞转染病毒后, 细胞培养液内可检测到 EM-2 的表达, 明显高于空转染及未转染细胞 ($P < 0.05$), 且随时间的延长, 表达水平逐渐上升。**结论:** 成功构建能够在非神经内分泌细胞内转基因表达成熟人 EM-2 的非增殖型腺病毒, 为进一步将其应用于慢性疼痛的基因治疗奠定了基础。

[关键词] 内啡肽-2; 神经生长因子; 腺病毒科

[中图分类号] R **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1269-03

目前发现的 5 种内源性阿片肽, 包括 β -内啡肽、脑啡肽、强啡肽、孤啡肽和内啡肽中, 以内啡肽镇痛作用最强^[1]。Zadina 等^[2] 1997 年从牛前脑皮层中分离纯化出一种四肽, 是 μ 阿片受体高亲和力和高选择性的内源性配体, 命名为“内啡肽”, 其镇痛效能与啡啡相近, 且对于啡啡无效的神经源性疼痛仍有镇痛作用。但外源性内啡肽也存在心血管等副作用, 同样具有耐受性和成瘾性, 而且在体内的降解速度较快^[3]。这些缺点限制了外源性内啡肽的直接应用, 但作为体内的内源性物质, 内啡肽的发现仍为临床医师提供了一种新的镇痛治疗思路, 即基因治疗方案。转基因表达的内啡肽可由靶控的器官或相邻组织定向、持续地以可诱导的方式合成和分泌, 直接作用于细胞本身或邻近细胞, 解决了临床上常规药物半衰期短的问题; 而且这种持续分泌的方式可以避免临床上因药物高剂量带来的不良反应, 有效地避免或减少了耐受现象的发生。

前期研究^[4-5] 发现以小鼠神经生长因子前导肽(PN)为外分泌肽, 以 β -内啡肽为目的基因, 分泌产物能够缓解大鼠神经病理性疼痛。为了取得更好的镇痛效果, 本研究拟构建携带小鼠神经生长因子前导肽(PN)和人内啡肽-2(EM-2)融合基因的重组非增殖型腺病毒, 体外转染细胞, 观察 EM-2 的表达情况, 为进一步将其应用于慢性疼痛动物模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 质粒和细胞株: pUC19 质粒、大肠杆菌 TG1 菌株由复旦大学遗传学研究所提供; 质粒 pTCNE(含 PN、EM-2 序列)为本实验室前期构建^[4]; 黏粒载体 pAxCawt 及菌株 LE392 为日本 TaKaRa 公司腺病毒表达载体试剂盒所带。人胚肾细胞株 293(ATCC CRL-1573), NIH3T3 细胞为中

国科学院上海细胞生物研究所提供。PCR 试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等为美国 BioLabs 公司产品; DNA 分子量标准品为上海皓嘉科技发展有限公司产品; 腺病毒表达载体试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品; 质粒纯化试剂盒为德国 Qiagen 公司产品; DNA 包装蛋白为美国 Novagen 公司产品。EM-2 酶联免疫反应 (enzyme immunoassay, EIA) 试剂盒购自北京康肽生物科技有限公司。

HH-W21-600 型电热恒温水箱购自上海医用恒温设备厂; 5804/5804R 型台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司; PC707-02 型 PCR 仪购自日本 STEL 公司; CK-40-F200 型倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; HWO301-VBA 型 CO₂ 培养箱购自美国 Harris 公司。DMEM、胎牛血清为 Gibco 公司产品; 胰蛋白酶、酵母提取物购自美国 Oxoid 公司; 琼脂糖、琼脂粉购自美国 Difco 公司。

1.2 目的基因的获取与鉴定 PCR 方法从质粒 pTCNE 中扩增出 401 bp 的融合基因 PN-EM-2。将 PN-EM-2 及 pUC19 质粒分别由 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切后, 胶回收, 纯化后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 命名为 pUC19-PN-EM-2, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 表达产物进行测序鉴定。

1.3 重组腺病毒黏粒的构建及鉴定 pAxCawt 黏粒用 *Swa* I 酶切, pUC19-PN-EM-2 质粒用 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切后用 Klenow 两端补平, 再用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜将两者连接。酚氯仿抽提、纯化后用 DNA 包装蛋白包装, 转染 LE392 细菌, 挑取菌落培养抽提黏粒。PCR 扩增出阳性且 *Swa* I 酶切未被切断的黏粒判断为重组阳性克隆。用 PCR

[作者简介] 吴飞翔, 博士生. E-mail: feixiangwu@yahoo.com.cn
* Corresponding author. E-mail: ywf808@sohu.com

方法进行正、反向鉴定,后进一步用 *Sal* I 酶切,自连后转染 TG 感受态菌,抽提质粒后用 *Bam*H I 酶切电泳再次证实。

1.4 重组腺病毒的制备、鉴定及滴度测定 用脂质体转染法将 8 μ g 黏粒 DNA 与 5 μ l DNA-TPC 转染 293 细胞。观察细胞死亡和病毒扩增情况,收集细胞发生死亡的样孔中培养液,反复冻融数次,上清保存于 -80 $^{\circ}$ C。重组腺病毒的鉴定用上述上清液感染 293 细胞及 HeLa 细胞,293 细胞受病毒感染而 HeLa 细胞无明显病毒感染现象的克隆初步判断为重组腺病毒株,丢弃 HeLa 细胞出现病态反应的克隆,选取上述复制缺陷型腺病毒再用 PCR 鉴定。用 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 法测定病毒滴度,重复 3 次,取平均值。

1.5 重组腺病毒的体外转染及 EM-2 蛋白的表达 用六孔板常规培养 NIH3T3 细胞,2 \times 10⁵ 细胞/孔。按 MOI=10 进行病毒感染试验,对照组分别为带绿色荧光增强蛋白 Ad-EGFP 组和无病毒感染组。感染后第 1、3、7 天吸取细胞培养液,EIA (enzyme immunoassay) 方法测定其内 EM-2 蛋白的浓度。

1.6 统计学处理 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SAS 8.2 统计软件进行分析,组间和组内比较均采用近似 *F* 检验 (SNK-*q*),*P*<0.05 具有显著差异。

2 结果

2.1 融合基因的鉴定 酶切鉴定结果显示,小鼠 PN 和人 EM-2 融合基因片段为 401 bp (图 1),与预期结果一致。测序结果亦与预期一致 (图未列出)。

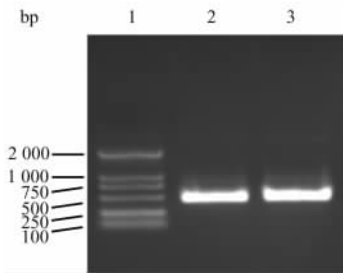


图 1 目的基因的鉴定

1:DL2000;2,3:PN-EM-2 融合基因

2.2 PN-EM-2-pAxCawt 重组黏粒的鉴定 PCR 扩增出阳性且 *Swa* I 酶切未被切断的黏粒判断为重组阳性克隆。在阳性克隆中进一步行 PCR (上游引物),扩增出 508 bp 条带的为正向插入序列,未扩增出条带的为反向插入序列 (图 2A)。取扩增出条带的克隆进一步用 *Sal* I 酶切,得到 5 775 bp 大小的片段,自连后转染 TG 感受态菌,LB 培养挑取阳性克隆,抽提质粒后用 *Bam*H I 酶切电泳,2 592 bp 和 3 183 bp 的片段被进一步证实为正向插入序列。

2.3 腺病毒阳性克隆及重组腺病毒株的筛选 阳性克隆可以扩增出 401 bp 大小的融合基因条带 (图 2B)。野生型病毒的鉴定时,293 细胞受病毒感染而 HeLa 细胞无明显病毒感染现象的克隆初步判断为重组腺病毒株,而后进一步用 PCR 法鉴定野生病毒,野生病毒可扩增出大小为 880 bp 的目的片段,而重组病毒为复制缺陷型,不能扩增出目的片段,故扩

增出目的片段的加以去除 (图 2C)。

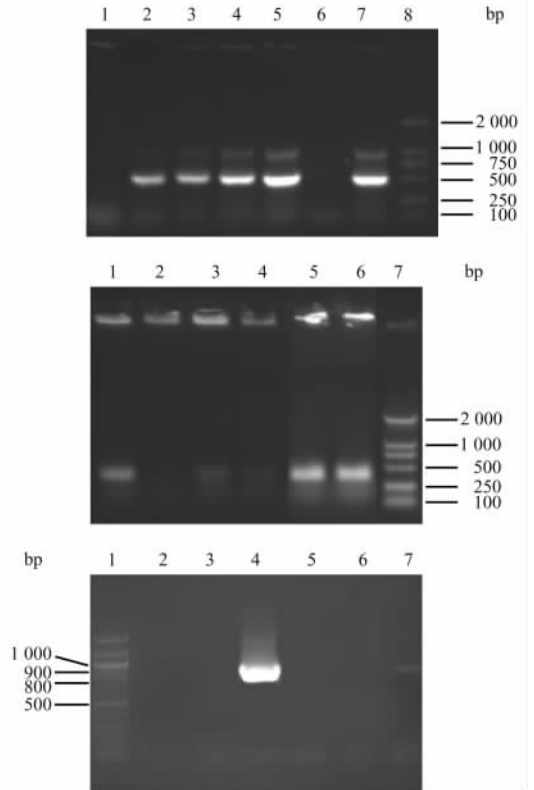


图 2 PCR 法鉴定黏粒 (A)、Ad-PN-EM-2 (B) 和野生病毒 (C) 上图: 1,6: 反向插入序列;2-5,7: 正向插入序列;8: DL2000。中图: 1: 阳性对照;2: 阴性对照;3-6: Ad-PN-EM-2;7: DL2000。下图: 1: 100 bp DNA ladder;2,3: 阴性对照;4: 阳性对照;5,6: 重组病毒;7: 野生型病毒

2.4 病毒滴度的测定结果 经扩增及纯化,TCID₅₀ 方法测定病毒滴度为 2.03 \times 10¹⁰ pfu/ml。

2.5 转基因的体外表表达 EIA 方法测定转染后上清内啡肽-2 蛋白浓度,结果说明:插入到病毒基因组内表达 EM-2 的 DNA 序列是正确的,能够正确翻译出蛋白质;且随着时间的延长,转基因的表达呈上升趋势 (图 3)。

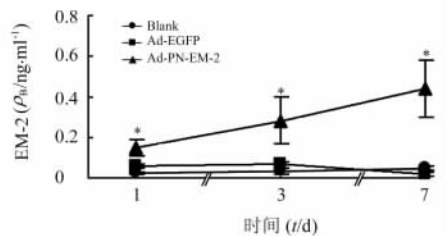


图 3 感染后细胞培养液内 EM-2 蛋白的浓度

* *P*<0.05 与 Ad-EGFP 组和无病毒感染组相比。*n*=8, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

慢性疼痛是目前最常见也最缺乏有效治疗手段的疾病,是一个世界性难题。静脉或口服阿片类药物是目前缓解疼

痛的最佳方法, 但会带来很多不良反应, “内源性吗啡”——内啡肽的发现为疼痛的治疗开辟了一条新的途径。但是如果将腺病毒直接转染这些神经元进行基因治疗, 并不能分泌成熟的内啡肽。因此, 在应用 EM-2 作为目的基因进行转染表达时需要考虑未成熟肽的水解和成熟肽的分泌机制。

Beutler 等^[6]将小鼠神经生长因子前导肽与人 β -内啡肽编码基因融合, 用这种融合基因重组的逆转录病毒转染 NIH3T3 细胞, 培养基中可检测到高浓度的 β -内啡肽, 而对照组并未检测到表达。这就提示可以利用旁分泌的机制在细胞内转染目的基因载体, 利用信号肽酶或相应的蛋白水解酶的水解, 使目的基因与信号肽或前导肽分离, 并分泌至细胞外^[7-8]。国内尤圣武等^[4]、徐学武等^[5]分别成功构建了携带神经生长因子前导肽- β -内啡肽融合基因的重组腺病毒, 以及携带神经生长因子前导肽- β -内啡肽融合基因的腺病毒-腺相关病毒杂合病毒, 这两套系统在体外转染 A431 细胞后可检测到 β -内啡肽的大量表达。大部分分泌性蛋白从翻译到转运进入核糖体都需要 60~80 个氨基酸长度, 小于这个长度可能很快被降解而不能产生足量的分泌蛋白^[4]。而神经生长因子的第二前导肽有 121 个氨基酸, 与内啡肽-2 基因构成的目的基因, 能够满足分泌条件。研究^[9-10]表明, 只要 PN 中的两个主要信息编码盒存在, 就能产生和分泌稳定的成熟蛋白, 而采用信号肽分析软件分析它的断裂部位与实际断裂部位并不相同, 但是如果在前导肽尾部连接一个 furins 酶的酶切位点, 就可以产生成熟的内啡肽-2。

本研究中采用的目的基因序列是根据 GenBank 登录的小鼠 PN 和人内啡肽-2 序列拼接而成的, 并且对 PN 末端的一个碱基点突变, 使其能够识别内啡肽-2 的第 1 个氨基酸 Tyr, 从而由 furins 酶将其剪切并分泌至细胞外。本实验在体外转染 NIH3T3 细胞后, 检测到较高浓度的 EM-2 的表达 ($P < 0.05$), 但是 EM-2 作为四肽的短肽, 其多克隆抗体的抗原性不够强, 而且容易受到其他小片段肽或氨基酸的影响, 导致背景表达量较高。在转染细胞后的第 1、3、7 天内随着时间的延长 EM-2 表达水平呈现明显的上升趋势, 但是由于体外细胞培养时细胞生长、培养液等的局限, 使蛋白表达的长期观察受限, 因此还需要动物实验的进一步验证。

腺病毒载体和其他基因载体系统相比, 具有宿主范围广、感染率高; 靶细胞内多拷贝高效表达; 理化性质稳定; 遗传毒性较低等优点, 是目前研究最多的载体^[11]。以往的重组腺病毒产生步骤为首先将所获目的基因插入穿梭质粒, 构建成转移质粒, 然后将转移质粒与腺病毒空病毒 DNA 共转染 293 细胞, 筛选得到重组腺病毒。该方法虽然具有穿梭质粒较小, 目的基因易于插入的优点, 但所产生的腺病毒中野生型腺病毒占了相当大的比例, 故重组腺病毒产生效率不高且筛选困难^[11]。而用基因组 DNA 末端蛋白复合物和重组黏粒共同转染 293 细胞的方法使重组腺病毒阳性提高了几十倍到几百倍^[12], 该系统较其他腺病毒系统在重组腺病毒的产生方面更为稳定可靠。但由于所用的黏粒较大, 所以使

用 DNA 包装蛋白对提高转染率起到了至关重要的作用。同样, 在鉴定黏粒载体中是否有目的基因插入及插入方向时, 直接用酶切鉴定几乎是不可能的。因此, 本研究在用 PCR 粗筛后, 用 *Sal* I 酶切并自连成为带有目的基因的亚克隆重组质粒, 进一步酶切鉴定是否有插入及插入方向, 较好的解决了片段大的问题。

总之, 本研究成功构建能够在非神经内分泌细胞内转基因表达成熟人 EM-2 的非增殖型腺病毒, 为进一步将其应用于慢性疼痛的基因治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Yu Y, Cui Y, Wang X, et al. *In vitro* characterization of the effects of endomorphin 1 and 2, endogenous ligands for mu-opioid receptors, on mouse colonic motility[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73: 1384-1393.
- [2] Zadina J E, Hackler L, Ge L J, et al. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor [J]. *Nature*, 1997, 386: 499-502.
- [3] Janecka A, Kruszynski R, Fichna J, et al. Enzymatic degradation studies of endomorphin-2 and its analogs containing N-methylated amino acids[J]. *Peptides*, 2006, 27: 131-135.
- [4] 尤圣武, 俞卫锋, 于布为, 等. 重组小鼠神经生长因子前导肽和人 β -内啡肽融合基因非增殖型腺病毒的构建和鉴定[J]. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24: 896-900.
- [5] 徐学武, 俞卫锋, 王星华, 等. 含人 β -内啡肽融合基因的腺病毒/腺相关杂合病毒载体的构建与鉴定[J]. *生物技术*, 2005, 15: 6-8.
- [6] Beutler A S, Banck M S, Bach F W, et al. Retrovirus-mediated expression of an artificial beta-endorphin precursor in primary fibroblasts[J]. *J Neurochem*, 1995, 64: 475-481.
- [7] Hosaka M, Nagahama M, Kim W S, et al. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 12127-12130.
- [8] Koo B H, Longpre J M, Somerville R P, et al. Cell-surface processing of pro-ADAMTS9 by furin[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 12485-12494.
- [9] Okun M M, Eskridge E M, Shields D. Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 7478-7484.
- [10] Ren B, Shen Y, Shao H, et al. Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 377(1-2): 83-87.
- [11] Schalk J A, de Vries C G, Orzechowski T J, et al. A rapid and sensitive assay for detection of replication-competent adenoviruses by a combination of microcarrier cell culture and quantitative PCR[J]. *J Virol Methods*, 2007, doi: 10.1016/j.jviromet.2007.05.010[Epub ahead of print]
- [12] Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, et al. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1320-1324.

[收稿日期] 2007-03-01

[修回日期] 2007-09-30

[本文编辑] 贾泽军