

· 基础研究 ·

大鼠 CGRP 基因重组慢病毒载体的构建及滴度测定*

陈攀科, 石蓓[△], 许官学, 刘志江, 王冬梅

(遵义医学院附属医院心血管内科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 构建含大鼠降钙素相关基因肽(CGRP)基因的慢病毒表达载体,为后续转染目的细胞并研究 CGRP 的功能奠定基础。方法 通过基因工程技术将 CGRP 基因克隆到穿梭质粒中,构建 Puc57-CGRP 质粒,用双酶切法构建慢病毒表达载体(pLenO-DCE-CGRP),将该质粒载体与 4 种辅助包装质粒共转染 293T 细胞,转染的 293T 细胞继续培养 48 h 后,收集其上清液,浓缩得到高滴度的慢病毒液,然后采用倍比稀释法和流式细胞术检测病毒滴度,并通过实时定量聚合酶链反应(PCR)检测 293T 细胞中 CGRP 基因的表达。结果 成功构建了 pLenO-DCE-CGRP 的重组慢病毒载体,滴度为 5.1×10^8 TU/mL。结论 成功构建了含 CGRP 基因高滴度的慢病毒载体,为后续转染间充质干细胞(MSC)并研究 CGRP 的功能奠定了基础。

关键词:降钙素基因相关肽;慢病毒属;DNA,重组

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4157-03

Construction and titration of rat CGRP gene recombinant lentivirus

Chen Panke, Shi Bei[△], Xu Guanxue, Liu Zhijiang, Wang Dongmei

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To construct lentiviral vector carrying rat's calcitonin gene-related peptide(CGRP) gene for the following-up study on the function of CGRP. **Methods** CGRP gene segment was subcloned into shuttle plasmid, become Puc57-CGRP. The pLenO-DCE-CGRP expression vector was be constructed by double digests. The pLenO-DCE-CGRP and 4 auxiliary packaging plasmids were co-transfected into 293T cells. Cells were cultured for 48 hours. The supernant was collected and concentrated, and then the viral titers were tested by multiple proportions dilution method and flow cytometer. The expression levels of CGRP were detected in CGRP-modified 293T cells by Real-time PCR. **Results** The results of digestion and sequencing show that the pLenO-DCE-CGRP vector was constructed successfully. The titer of the lentiviral particles was 5.1×10^8 TU/mL. **Conclusion** The high-titer lentivirus vector containing CGRP gene is constructed successfully, which lay a foundation for transfecting mesenchymal stem cell (MSC) and studying the function of CGRP.

Key words: calcitonin gene-related peptide; lentivirus; DNA, recombinant

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是神经肽家族的一种的血管活性肽,广泛分布于神经及心血管系统,主要由感觉神经合成与分泌,具有多种生理功能,是目前体内最强的内源性扩血管肽^[1]。在心血管系统, CGRP 具有多种生物活性,比如强大的扩血管作用、抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖、保护内皮细胞及参与血管新生等作用^[2-3]。本研究拟构建 CGRP 基因的慢病毒载体,包装高滴度的慢病毒颗粒,为进一步在细胞和动物模型的研究中奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与材料 Puc57-CGRP 基因(南京金斯瑞生物科技有限公司合成);pLenO-DCE 载体、4 个病毒包装质粒系统(pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G、Transfer Vector, 上海英为信科技有限公司);人胚肾 293(293T)细胞由本中心保存;T4 DNA 连接酶(NEB 公司);Taq polymerase, BamH I、EcoR I 限制性内切酶, DL15 000、2 000 DNA 分子标记物(Takara 公司);AxyPrep 质粒小量制备试剂盒(Axygen 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 重组慢病毒载体(pLenO-DCE-CGRP)的构建及鉴定 通过对慢病毒载体(pLenO-DCE)和 Puc57-CGRP 分别使用

EcoR I 和 BamH I 进行酶切,将酶切产物去磷、1.5%琼脂糖电泳、胶回收后,将 pLenO-DCE 载体和 CGRP 基因通过 T4 DNA 连接酶进行连接,然后转化、质粒抽提,挑克隆酶切鉴定,并送华大基因测序。

1.2.2 CGRP 基因重组慢病毒包装、纯化 制备慢病毒穿梭质粒及其辅助病毒包装 4 种质粒载体,其中 Transfer Vector 含有绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因,pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 含有病毒包装所必需的元件。分别进行高纯度无内毒素抽提,共转染 293T 细胞(CGRP 组),6~8 h 更换为完全培养基后继续培养 48 h,收集病毒上清液,浓缩后获得高滴度慢病毒浓缩液。同时,通过荧光显微镜对比明、暗视野以确定其转染率。另外,转染 pLenO-DCE 空载体的细胞命名为空载病毒组,未作任何处理的细胞命名为 293T 组。

1.2.3 CGRP 重组慢病毒滴度测定 使用逐孔稀释滴度测定法,取一定体积病毒感染的 293T 细胞上流式细胞仪检测阳性细胞数量,并根据公式[滴度数值(TU/mL)=细胞数量×阳性细胞数的比率(%) / 加入病毒体积(mL)]计算病毒滴度。

1.2.4 实时定量 PCR 将上述病毒转染的 293T 细胞,按 RNA 抽提试剂盒说明提取总 RNA,进行逆转录、cDNA 扩增,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060014)。 作者简介:陈攀科(1982~),硕士,主治医师,主要从事血管及冠心病介入的研究。

[△] 通讯作者, Tel:15085117532; E-mail:Shibei2147@163.com。

用特殊低聚核苷酸作 CGRP 基因引物,大鼠 18S 基因作为内参对照。CGRP 上游引物:5'-AGC CCC AGA TCT AAG CGG TGT G-3',下游引物:5'-TCC TTG GCC ATA TCC CTT TTC TTG -3';18S 上游引物 5'-AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG-3',下游引物 5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'。数据通过 Ct(C:Cycle;t:threshold;Ct 值的含义为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)比较法进行并定量分析。

2 结 果

2.1 重组慢病毒载体 (pLenO-DCE-CGRP) 的鉴定及测序
 将 pLenO-DCE 载体和 pUC57-CGRP 的酶切产物,经琼脂糖电泳,分别可见相应载体,见图 1A;将 pLenO-DCE 载体和 CGRP 基因通过 T4 DNA 连接得到 pLenO-DCE-CGRP,用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 进行酶切,琼脂糖电泳可见正确的克隆,见图 1B。测序结果证实与 GeneBank 中公布的大鼠 CGRP 基因 (NM_017338.2) 序列一致。

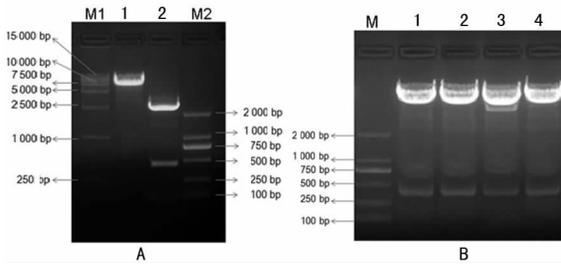


图 1 酶切产物的琼脂糖电泳图
 A:pLenO-DCE、pLenO-DCE-CGRP 载体酶切对比图;M1:DNA 分子标志物 (DL15 000);1: pLenO-DCE 载体 (7 544 bp);2: pUC57-CGRP(2 710 bp);M2:DNA 标志物 (DL2 000)。1: pLenO-DCE-CGRP 载体酶切鉴定图;M: DNA 分子标志物 (DL2 000);1、2、3、4: pLenO-DCE-CGRP。

2.2 重组慢病毒载体转染 293T 细胞 将慢病毒穿梭质粒和辅助包装质粒共转染 293T 细胞,6 h 后即可在荧光显微镜下观察到表达 EGFP 的阳性细胞,随时间延长,荧光表达增强,48 h 达最强,通过明、暗视野对比,转染率达 90% 以上,见图 2。

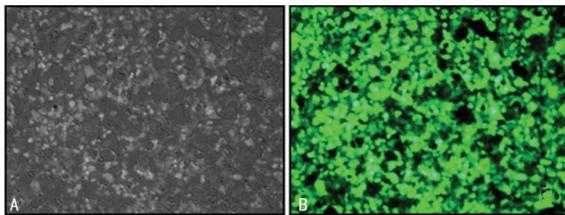


图 2 慢病毒载体转染 293T 细胞
 A: 明视野;B: 暗视野。

2.3 重组慢病毒载体的滴度测定 取 0.1 μL 病毒感染的 293T 细胞流式检查结果,见图 3,根据公式计算滴度为:5.1 × 10⁸ TU/mL。

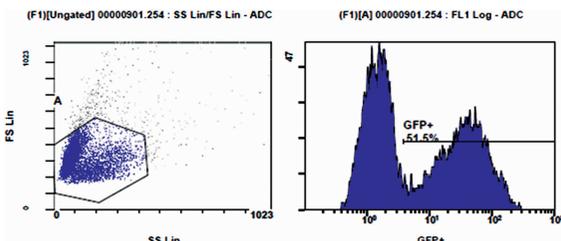


图 3 流式细胞术检测病毒感染的 293T 细胞

2.4 转染重组慢病毒载体细胞的 CGRP 的表达 实时定量 PCR 检测转染后 293T 细胞 CGRP 的 mRNA 表达水平,结果分别为:与 293T 组 (1.00 ± 0.34) 及空载病毒组 (1.12 ± 0.28) 相比,CGRP 组 (8.72 ± 0.98) 的表达明显增加,差异具有统计学意义 (P < 0.01),见图 4。

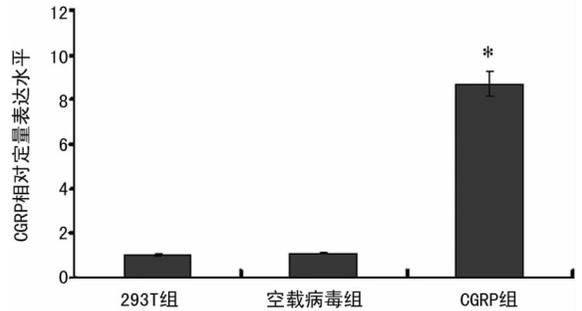


图 4 RT-PCR 检测各组细胞中 CGRP 在 mRNA 水平的表达情况

3 讨 论

CGRP 是 1983 年 Rosenfeld 等利用 DNA 基因重组技术和分子生物技术,在神经组织内发现的一种的多功能生物活性多肽^[4]。其相对分子质量为 3 786.91,由 37 个氨基酸残基组成,CGRP 主要源于感觉神经纤维,由脊髓后根神经节的神经元产生,通过轴浆运输至神经末梢,以分泌颗粒的方式储存于胞浆中,随神经末梢广泛分布于周围各个器官^[5]。在心血管系统中,CGRP 神经纤维几乎遍及心脏所有的区域,其中血管中的含量甚至高于心脏,动脉又高于静脉;但 CGRP 在外周血的半衰期很短,直接注入体内是很难持续发挥作用的,故需要通过合适的载体和靶细胞将其带入体内以发挥作用。

CGRP 除具有强大的扩血管、降低血压之外,还具有保护缺血心肌、抑制血管平滑肌细胞 (VSMCs) 增殖等作用^[6-7]。体外研究显示:腺病毒载体介导 CGRP 基因转染至骨髓间质细胞 (MSCs) 后分泌的 CGRP 蛋白,在体外有抑制主动脉和肺动脉平滑肌增殖作用,其作用可能通过阻滞细胞周期由 G₀/G₁ 期进入 S 期而抑制 VSMCs 增殖^[1,6]。细胞培养也证实 CGRP 可通过抑制周期蛋白 D、E,使 VSMCs 停留于 G₀/G₁ 期,限制细胞周期进程而达到抑制 VSMC 增殖的作用^[8]。此外,CGRP 可使 VSMCs 从合成型向收缩型转化^[9]。以上研究资料显示,CGRP 在 VSMCs 增殖及表型改变等方面表现出较强的干预作用。

基因转移是将目的基因导入靶细胞,得到稳定且高效的表达,是基因治疗取得良好效果的关键点之一,而对载体的选择是基因转移的一个重要方面。目前基因专业的载体分为病毒载体和非病毒载体两类。与非病毒载体相比,病毒载体具有以下优点:(1)在转化细胞中传播重组的 DNA 分子可作为稳定的遗传成分;(2)能将缺陷或突变的基因置于病毒调节信号的控制下进行研究;(3)能将克隆的基因作为病毒微染色体的一部分,并随之分离;(4)转移效率较高^[10-11]。因此,基因治疗的载体选择中,病毒载体更加令人关注。

本课题组在既往实验研究中所选择的腺病毒载体具有容量大且制备简单等优点,但腺病毒载体感染细胞时缺乏特异性,病毒 DNA 游离在细胞核内,并不整合到染色体上,在体内不能实现稳定的长期表达,可能随时间延长而出现目的基因丢失的现象,且反复应用容易引起免疫反应,因而在应用上仍受

到一定的限制^[12-13]；而研究证实，慢病毒载体较其他病毒载体具有既可感染分裂期细胞，也可感染静止期细胞，还可整合于宿主基因组内，并随细胞基因组的分裂而分离，实现基因稳定长效表达，感染效率更高，容纳外源性大片段目的基因，免疫原性小，生物安全性好等优点，可作为基因治疗的理想载体^[14]。但艾滋病病毒-1(human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1)毕竟是获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)的病原，其安全性是人们一直关注的问题，也是该载体能否应用到人体试验的关键；对此，人们不断改进以确保其安全性，在迄今的体内外研究中，尚未见因为慢病毒载体而出现 HIV 的产生，提示它是安全的^[15]。因此，本实验选择的以 HIV-1 为代表的慢病毒载体，具有更大时效优势。

本研究成功构建了含 CGRP 基因高纯度和滴度的慢病毒载体，同时检测到 293T 细胞高表达 CGRP，证实该过表达载体具有功能性，为后续转染载体细胞并研究 CGRP 的功能奠定了实验基础。

参考文献：

- [1] Vause CV, Durham PL. Calcitonin gene-related peptide differentially regulates gene and protein expression in trigeminal glia cells; findings from array analysis[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(3):163-167.
- [2] Wang Z, Jin D, Tuo Y, et al. Calcitonin gene-related peptide promoting migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells and stimulating expression of vascular endothelial growth factor[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2011, 25(11):1371-1376.
- [3] Bullen ML, Miller AA, Andrews KL, et al. Nitroxyl (HNO) as a vasoprotective signaling molecule[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(9):1675-1686.
- [4] Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing [J]. *Nature*, 1983, 304(5922):129-135.
- [5] 黄泰源, 张光武. 降钙素基因相关肽与骨折愈合[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, (3):826-829.
- [6] Deng W, Hilaire RC, Chattergoon NN, et al. Inhibition of

vascular smooth muscle cell proliferation in vitro by genetically engineered marrow stromal cells secreting calcitonin gene-related peptide [J]. *Life Sci*, 2006, 78(16):1830-1838.

- [7] 潘孝贵. 降钙素基因相关肽参与运动诱导的心脏保护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, (2):172-174.
- [8] 邓水秀, 曾泗宇, 任俊芳, 等. 降钙素基因相关肽对大鼠血管平滑肌细胞 CDK2 和 Cyclin E 的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011(3):249-253.
- [9] 方立, 陈晓彬, 陈美芳, 等. 降钙素基因相关肽介导内皮祖细胞抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, (2):99-104.
- [10] Bai Y, Soda Y, Izawa K, et al. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(17):1446-1457.
- [11] Ruitenberg MJ, Plant GW, Christensen CL, et al. Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(2):135-146.
- [12] Hendriks WT, Ruitenberg MJ, Blits B, et al. Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord[J]. *Prog Brain Res*, 2004, 146:451-476.
- [13] Bo X, Wu D, Yeh J, et al. Gene therapy approaches for neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord and spinal root injury[J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(2):101-115.
- [14] 郭淑军, 万艳, 李丽玲, 等. FGFR2IIIc 重组慢病毒载体的构建及其在肌原细胞 L6 中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(5):1-7.
- [15] Klonjkowski B, Klein D, Galea S, et al. Gag-specific immune enhancement of lentiviral infection after vaccination with an adenoviral vector in an animal model of AIDS [J]. *Vaccine*, 2009, 27(6):928-939.

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-10-01)

(上接第 4156 页)

2012, 119(25):5989-5995.

- [6] British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy[J]. *Br J Haematol*, 2003, 120(4):574-596.
- [7] 胡成琳, 陈林. 对免疫性血小板减少症发病机制及治疗的研究进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(24):2541-2544.
- [8] 朱愿超, 王文, 周郁鸿, 等. 标准剂量利妥昔单抗治疗复发难治性原发免疫性血小板减少症的临床研究[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(3):163-167.
- [9] Zaja F, Vianelli N, Volpetti S, et al. Low-dose rituximab in adult patients with primary immune thrombocytopenia

[J]. *Eur J Haematol*, 2010, 85(4):329-334.

- [10] 袁玉芳, 蒯文霞, 何蓉, 等. 利妥昔单抗治疗儿童难治性特发性血小板减少性紫癜的临床观察[J]. *中华全科医师杂志*, 2012, 11(1):67-69.
- [11] 接贵涛, 王明松, 周倩. 小剂量利妥昔单抗治疗特发性血小板减少性紫癜的疗效分析[J]. *临床血液学杂志*, 2012, 24(7):418-421.
- [12] Cervinek L, Cerna O, Caniga M, et al. Efficacy of rituximab in primary immune thrombocytopenia: an analysis of adult pretreated patients from everyday hematological practice[J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(5):594-599.

(收稿日期:2013-09-15 修回日期:2013-10-12)