

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.005

骨形成蛋白 9 腺病毒表达载体的构建及鉴定*

方芳,张青蓝,杨宇,鄢国义,朱丹平[△]

(重庆市中医院/重庆市第一人民医院内分泌科 400021)

[摘要] 目的 构建骨形态发生蛋白 9(BMP9)基因腺病毒表达载体及稳定产毒细胞系,为观察其对 T2DM 糖、脂代谢异常的干预效应奠定基础。**方法** 质粒 pCMV/BMP9 双酶切克隆至腺病毒载体 Ad5. F,构建重组腺病毒表达载体 Ad5. BMP9. F,酶切测序鉴定;转包装细胞,经抗性筛选检测病毒滴度,挑选滴度较高的稳定产毒细胞克隆进行逆转录 PCR(RT-PCR)鉴定。**结果** 建立 BMP9 基因腺病毒表达载体 Ad5. BMP9. F 经酶切及测序证实目的基因插入位点及读码框架正确;建立稳定产毒细胞克隆最高病毒滴度达 7.4×10^5 CFU/mL,RT-PCR 证实 BMP9 基因整合其中并稳定表达。**结论** 成功构建含 BMP9 基因的腺病毒表达载体及其稳定产毒细胞系。

[关键词] 骨形成蛋白质类;腺病毒科;糖尿病,2 型**[中图分类号]** Q781**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)17-2318-02**Construction and identification of a adenovirus vector containing BMP9 gene***Fang Fang, Zhang Qinglan, Yang Bei, Yan Guoyi, Zhu Danping[△]

(Department of Endocrinology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine/Chongqing First People's Hospital, Chongqing 400021, China)

[Abstract] **Objective** To establish a adenovirus vector containing BMP9 gene and a stable toxin-producing cell line, for observing the intervention effect of the glucolipid metabolic on type2 diabetes mellitus. **Methods** The plasmid pCMV/BMP9 was digested by EcoRI/BamHI, then cloned to adenovirus vector Ad5. F, constructed the recombinant plasmid Ad5. BMP9. F. The plasmid Ad5. BMP9. F was evaluated by enzyme-digestion and sequencing. The plasmid Ad5. BMP9. F was transfect to packaging cell line 293. The titer of the recombinant virus was detected. The high-titer cell lines were chosen for culture, and then evaluated by RT-PCR. **Results** The retroviral vector containing BMP9 gene was established successfully, which was confirmed by enzyme-digestion and sequence analysis. The toxin-producing cell lines was established. The highest titer of the recombinant virus was 7.4×10^5 CFU/mL. BMP9 gene can express stably in 293 cells. **Conclusion** A adenovirus vector containing BMP9 gene and a high-titer vector production cell line are successfully constructed.

[Key words] bone morphogenetic proteins; adenoviridae; diabetes mellitus, type 2

骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)属转化生长因子 B 超家族成员,在众多生命活动中均扮演重要角色。其中 BMP9 与糖、脂代谢中多个关键转变环节有直接相关性。本课题组前期发现 BMP9 基因表达异常可能与 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)代谢紊乱及胰岛素分泌缺陷相关,结合 Chen 等^[1]的研究,可推测:BMP9 基因表达下降也许是导致 T2DM 代谢异常的重要因素之一,增加其基因拷贝,可能使糖、脂代谢紊乱得到一定程度的改善。因此,课题组先行构建 BMP-9 基因腺病毒表达载体及其稳定的产毒细胞系,为后续观察其对 T2DM 糖、脂代谢异常的干预效应奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 质粒 pCMV/BMP9 由 Helm GA(University of Virginia Health System)馈赠,质粒 pDV60 含腺病毒 Ad5 纤维 cDNA 由 Nemerow GR 博士(The Scripps Research Institute, California)馈赠;293 细胞系购自上海易莎生物有限公司;脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;EcoR I、BamH I 酶购自华美生物工程公司;T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公

司;Ploybrene、FBS 均购自 Gibco 公司;质粒抽提及回收试剂盒购自上海品美公司。

1.2 方法

1.2.1 去纤维腺病毒载体 Ad5. BMP9. F 构建 质粒 pCMV/BMP9 与腺病毒载体 Ad5. F 分别以 EcoR I、BamH I 双酶切,切胶回收 BMP9 cDNA 与 Ad5. F 线性载体片段,连接、转化后,提取质粒作酶切与测序鉴定。

1.2.2 Ad5. BMP9. F 包装与滴度测定 Lipofectamine2000 介导 Ad5. BMP9. F 转染 293 细胞,以空载体 Ad5. F 作对照(阴性对照组);筛选直至肉眼可见抗性细胞克隆形成,挑选分隔良好的细胞克隆扩大培养,收集抗性细胞克隆上清测病毒滴度,留取滴度较高的细胞克隆及病毒原液备用。

1.2.3 腺病毒纤维 cDNA 定点突变(F+) 质粒 pDV60 含腺病毒 Ad5 纤维 cDNA 采用 PCR 体外定点突变(PCR-SDM)法在 pDV60 上进行定点突变,突变位点 S408E、P409A(参见 Xia-D 纤维结构定位),致突变引物如下,结果经测序鉴定。正向 5'-CGC AGC CTT AAC CTC AGC-3',反向 5'-GTT GGA

* 基金项目:重庆市医学科技计划项目(2010-2-238)。 作者简介:方芳(1977—),主治医师,硕士,主要从事糖尿病基因治疗研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13594616916; E-mail: zdpf90203@163.com。

GGC AGG CGT AGA-3'.

2 结 果

2.1 BMP9 基因重组腺病毒载体鉴定

2.1.1 酶切鉴定 重组腺病毒载体 Ad5. BMP9. F 经 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切, 获得 1 290 bp 的 BMP9 cDNA 片段, 证实 BMP9 cDNA 已插入载体 Ad5. F 中且插入位点正确。

2.1.2 测序鉴定 经酶切粗筛正确的重组质粒送生工生物工程公司测序, 证实目的基因序列与所赠质粒附注 BMP9 cDNA 序列相同, 见图 1。

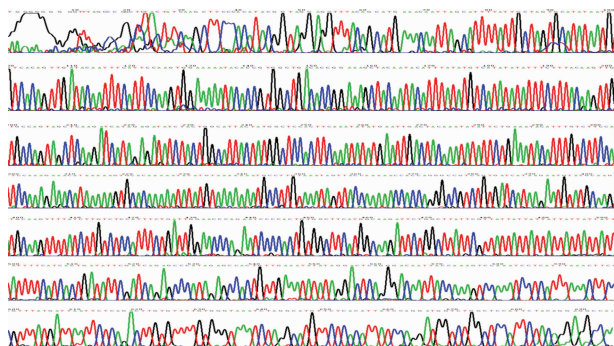
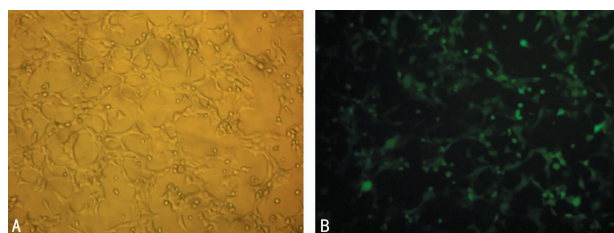


图 1 BMP9 基因测序图

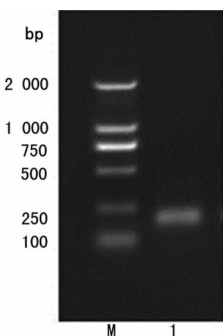
2.2 病毒滴度测定 脂质体包裹 Ad5. BMP9. F 同源重组腺病毒基因组质粒转染 293 细胞 15 d 后, 光镜及荧光显微镜下观察到空斑形成, 细胞变圆、肿胀、脱壁, 细胞核变大等病变, 转染效率 90% 以上, 见图 2。用 Ad5. BMP9. F 感染包装细胞 293 细胞, 约 15 d 可见抗性细胞克隆, 平均滴度 6.0×10^5 CFU/mL, 最高滴度 7.4×10^5 CFU/mL。



A: 普通光学显微镜; B: 荧光显微镜。

图 2 转染重组 Ad5. BMP9. F 载体 15 d 后细胞形态变化 ($\times 100$)

2.3 产毒细胞克隆鉴定 将 293/BMP9 细胞提取总 RNA, 逆转录后用检测引物进行 PCR, 产物电泳于 162 bp 处出现目的条带, 但阴性对照组 RT-PCR 产物电泳无目的条带出现, 证明 BMP9 基因已成功整合与转录。



M: DNA 分子标记物 (DL2 000); 1: 293/BMP9。

图 3 BMP9 基因 RT-PCR 鉴定

3 讨 论

BMP 属转化生长因子 β 超家族成员, 因其强烈的骨诱导活性而受到关注, 故目前研究多集中在其与骨疾病的关系及其调控骨再生的应用上^[2-3]。而事实上, BMP 在众多生命活动中均扮演着重要角色, 其能触发神经干细胞向神经原分化、维持肾小管上皮细胞形态、调控造血干细胞数量及平衡内皮细胞死亡等^[4-8]。近期, 通过高通量功能基因组筛选发现 BMP9 与糖、脂代谢中多个关键转变环节有直接相关性, 提示 BMP9 还可能是一种新的糖、脂代谢调节因子^[9-10]。Chen 等^[1]研究表明, BMP9 能阻止磷酸烯醇式丙酮激酶 (P-enolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 合成并激活丝/苏氨酸激酶 Akt, 从而抑制肝内糖异生并促进肌糖原合成以降低血糖; 同时, BMP9 还能调控苹果酸酶 (malic enzyme, ME) 与脂酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 的转录, 这两个酶均为涉及肝脂代谢的关键酶。BMP9 可能通过对这些关键酶的调控而在糖、脂代谢中发挥着重要的调节作用。随后的动物体内、外实验则证实了, BMP9 具有部分类似胰岛素的糖代谢调节作用^[11], 并与 B 细胞的胰岛素分泌直接相关, 而糖代谢紊乱与第一时相胰岛素分泌缺陷又是 T2DM 的主要特征。前期研究工作中发现在长时间高糖状态下, BMP9 基因表达与血糖浓度呈异向变化趋势, 与急性胰岛素对葡萄糖反应 (AIRg) 呈同向变化趋势, 提示 BMP9 基因表达异常可能与 T2DM 糖代谢紊乱及胰岛素分泌缺陷相关^[12]。结合 Chen 等^[1]的研究可推测: BMP9 基因表达下降也许是导致 T2DM 代谢异常的重要因素之一, 增加 BMP9 基因拷贝, 可能使糖、脂代谢紊乱得到一定程度的改善。

为更好达成上述研究目的, 选择高效、稳定的转染载体较为重要。BMP9 主要在肝脏表达, 然而, 腺病毒具有较高的转染效率及一定的亲肝性。而更重要的是, 如何进一步提高其肝靶向性? 近期研究表明在经典的柯萨奇-腺病毒受体 (coxsackie-adenovirus receptor, CAR)/整合素通路以外, 腺病毒对肝细胞还有其特异的感染通路, 并在腺病毒侵入肝细胞过程中起主导作用^[12]。阻断 CAR/整合素通路, 机体其他部位的基因导入明显下降, 在肝脏却没有影响^[13]。因此, 本研究拟采用 PCR-SDM 致 5 型腺病毒纤维头部的 CAR 结合位点突变, 由此阻断 CAR/整合素通路, 此种改良的腺病毒将具有更强的肝靶向性。本研究基于此法成功构建了携 BMP9 基因的稳态产毒细胞克隆, 其最高病毒滴度可达 7.4×10^5 CFU/mL。

下一步, 课题组拟将 BMP9 基因在 T2DM 鼠体内定向导入肝细胞并特异表达, 观察其对 T2DM 糖、脂代谢紊乱的干预效应, 同时从胰岛素敏感性、激素分泌、酶活性调节及基因转录调控等角度出发, 就其作用机制进行探讨, 从而为深入理解 T2DM 代谢紊乱的发生机制及制订新的治疗策略提供理论与实验依据。

参考文献

[1] Chen Y, Grzeqowski KJ, Barash S, et al. An integrated function genomics screening program reveals a role for BMP9 in glucose homeostasis[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(3): 294-301.
 [2] Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, et al. Bone morphogenetic proteins: structure, biological(下转第 2323 页)

和胶原酶可引发滑膜炎性反应、软骨基质的崩解。TNF- α 与 IL-1 常常同时合成与分泌,还促进对方的合成,对 RA 共同起到“中心犯罪”的作用。大量研究也表明在 RA 患者血清及关节液中的 IL-6 水平升高,活动期患者滑液中 IL-6 含量是血清内的 1 000 多倍,其阻滞剂能明显改善实验动物以及临床 RA 患者的症状^[10]。

现代研究认为 NO 的过度合成是 RA 发病机制的重要因素之一。研究发现在 RA 和骨关节炎患者的滑膜液和血液中可检测到大量 NO 代谢产物亚硝酸盐,推测 NO 参与这两种疾病关节炎的病理过程。DLVT 明显减少 NO 生成,抑制了关节炎的进一步发展。

本研究显示 DLVT 减轻 AA 小鼠原发性和继发性关节炎,减少多发性关节炎指数,增强 AA 小鼠站立和爬梯能力,抑制 AA 小鼠脾淋巴细胞的增殖反应,通过细胞因子的检测进一步发现,模型小鼠外周血清中的 IL-6、IL-1、NO 及 TNF- α 水平显著升高。从病理改变程度方面,DLVT 能有效控制 AA 小鼠关节纤维增生和滑膜增生,减少炎症细胞的浸润。因此,DLVT 能控制 AA 小鼠的病情发展,其明显抑制促炎症细胞因子 IL-6、IL-1、NO 及 TNF- α 病理性的升高可能是 DLVT 有效治疗 RA 的作用机制之一。

参考文献

- [1] 邓庆华,周岐新,陈勇,等. 脱氢洛伐他汀的调脂和抗炎作用的关系[J]. 中国新药杂志,2011,20(2):162-166.
- [2] 王贵林,朱路. 生姜油对小鼠佐剂性关节炎的作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):94-95.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:919-922.

- [4] Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. THR0921, a novel peroxisome proliferators activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 8(1):10-18.
- [5] Ghittoni R, Paturssi L, Pirozzi K, et al. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras super-family GTPases[J]. FASEBJ, 2005, 19(6):605-607.
- [6] Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins-basic research and clinical perspectives[J]. Circ J, 2010, 74(5):818-826.
- [7] 李可大. 免疫调节和前炎症因子(TNF- α)在类风湿性关节炎中的作用与意义[J]. 中医药学刊, 2004, 22(10):1844-1849, 1865.
- [8] 唐恩洁. 医学免疫学[M]. 3 版. 成都:四川大学出版社, 2004:75-77.
- [9] Kokebie R, Aggarwal R, Lidder SA, et al. The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(2):R50.
- [10] 魏伟, 李晓辉, 张洪泉. 抗炎免疫药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:283-284.
- [11] Abdin AA, Abd El-Halim MS, Hedeya SE, et al. Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 676(1/3):34-40.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-03-10)

(上接第 2319 页)

- function and therapeutic applications[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561(6):64-73.
- [3] Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(2):403-418.
- [4] Porlan E, Manuel Morante-Redolat J, Angeles Marques-Torreon M, et al. Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance[J]. Nat Neurosci, 2013, 16(11):1567-1575.
- [5] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9):8094-8100.
- [6] Karlsson S. Stem cell expansion: success and complexities [J]. Blood, 2004, 104(8):2210-2211.
- [7] Roux C, Pisani DF, Ben Yahia H, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: A powerful pharmacological tool[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4):786-791.
- [8] Derynck R, Akhurst RJ. BMP-9 balances endothelial cell fate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(47):18746-

18747.

- [9] Groop L. Bringing diabetes therapeutics to the big screen [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(3):240-241.
- [10] Luan HY, Yang LM, Liu L, et al. Effects of platycodins on liver complications of type 2 diabetes [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3):1597-1603.
- [11] Sosa I, Cvijanovic O, Celic T, et al. Hepatoprotective role of bone morphogenetic protein-9[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(12):HY33-HY35.
- [12] 方芳, 郑宏庭, 刘理, 等. 2 型糖尿病大鼠肝脏骨形成蛋白 9 基因表达的变化及意义[J]. 中国临床康复, 2006, 10(32):66-68.
- [13] Smith T, Idamakanti N, Kylefjord H, et al. In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor [J]. Mol Ther, 2002, 5(6):770-779.
- [14] Deng G, Huang XJ, Luo HW, et al. Amelioration of Carbon tetrachloride-induced cirrhosis and portal hypertension in rat using adenoviral gene transfer of Akt [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(43):7778-7787.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2014-02-15)