

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.003

大鼠 Hes1 腺病毒表达载体构建及功能鉴定*

周学亮,方义湖[#],赵勇,邹斌,徐华,刘季春[△]

(南昌大学第一附属医院心脏大血管外科,江西南昌 330006)

[摘要] 目的 构建高滴度大鼠 Hes1 腺病毒过表达载体(Ad-Hes1)。方法 以大鼠 cDNA 文库为模板,PCR 法扩增 Hes1,通过定向克隆构建 pShuttle-CMV-Hes1 穿梭质粒,再以 pShuttle-CMV-Hes1 为基础,构建 pAdeno-Hes1 病毒质粒,将 pAdeno-Hes1 转染 293 细胞,包装 Ad-Hes1,利用改进 TCID50 法进行病毒滴度测定。Ad-Hes1 感染 H9c2 心肌细胞,Western blot 检测 Hes1 表达。结果 pShuttle-CMV-Hes1 穿梭质粒、pAdeno-Hes1 病毒质粒构建成功,总滴度为 1.6×10^{11} PFU,Ad-Hes1 可在 H9c2 心肌细胞内正常表达,其 MOI 值为 30。结论 Ad-Hes1 包装成功,为进一步研究 Hes1 的心肌保护作用奠定实验基础。

[关键词] 腺病毒科;肌细胞,心脏;Hes1;质粒构建;病毒包装

[中图分类号] R511.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)05-0583-03

Construction and functional identification of rat Hes1 adenovirus expression vector*

Zhou Xueliang, Fang Yihu[#], Zhao Yong, Zou Bin, Xu Hua, Liu Jichun[△]

(Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** to construct the high titers rat Hes1 adenovirus expression vector (Ad-Hes1). **Methods** With the rat cDNA as a template, the Hes1 fragment was amplified by PCR, which constructed pShuttle-CMV-Hes1 shuttle plasmid by directly clone. Based on pShuttle-CMV-Hes1, pAdeno-Hes1 virus plasmid was constructed. pAdeno-Hes1 was transfected into 293 cells to package Ad-Hes1, virus titers were determined by modified TCID50. Hes1 was detected by Western blot after Ad-Hes1 infected with H9c2 myocardial cells. **Results** pShuttle-CMV-Hes1 shuttle plasmid and pAdeno-Hes1 plasmid were constructed successfully, with a general titer of 1.6×10^{11} PFU, Ad-Hes1 can be expressed in H9c2 myocardial cells, and its MOI value was 30. **Conclusion** Ad-Hes1 is successfully constructed and packaged, thus provide basis for further research on the protection effect of Hes1 on myocardium.

[Key words] adenoviridae; myocytes, cardiac; Hes1; plasmid construction; virus packaging

Hes 是果蝇 hairy/E(spl) 基因家族同系物,作为 Notch1 信号通路重要靶基因,其通过编码抑制型碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, bHLH),在调节多种细胞分化、增殖的 Notch 信号途径中起关键作用^[1-3],并影响细胞决定、发育、分化、增殖、凋亡、黏附及上皮-间质细胞转化^[4-5]。研究发现, Hes 可与 Stat3 形成 Hes1-Stat3 复合物,促进 Stat3 磷酸化和 HIF-1 α 激活,进而发挥保护作用^[6-7]。本研究发现, Hes1 可作为介导分子,激活 SAFE 信号通路,发挥心肌作用^[8]。因此本文将构建包装高滴度 Hes1 腺病毒病毒过表达载体(Ad-Hes1),为进一步探讨 Hes1 心肌保护中的分子机制奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及菌株 293 细胞购自中科院上海生命科学院细胞库, DH5 α 超级化学感受态细胞购自汉恒生物科技有限公司。

1.1.2 大鼠 cDNA 文库及腺病毒载体系统 大鼠 cDNA 文库购自 TaKaRa 公司; pShuttle-CMV 重组穿梭质粒、pAdeno 质粒购自汉恒生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶(Sfi I, I-Ceu I, I-Sce I, Xho I, Pac I)、Phusion 超保真 DNA 聚合酶购自 New Eng-

land Biolabs 公司, T4 DNA ligase 购自 Fermentas 公司, CIP 酶购自 Promega 公司, dNTPs 购自上海生工生物工程技术有限公司, 质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收与纯化试剂盒购自威格拉斯生物技术有限公司, LipofiterTM 购自汉恒生物科技有限公司, 细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司, Mouse monoclonal to Hes1 购自 Abcam 公司, β -Actin Mouse Monoclonal Antibody 购自 Anbo 公司, HRP affininure goat anti-rabbit IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 增强化学发光底物购自 Pierce Biotechnology 公司。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 中的大鼠 Hes1 基因编码序列(NCBI Reference Sequence: NM_024360.3), Primer Premier 5.0 设计 Hes1 克隆引物并插入 Sfi I 酶切位点(Forward Primer: 5'-AAA AGG CCG CTG CGG CCA CCA TGA AGC GAC GAT GGA-3', Reverse Primer: 5'-AAA AGG CCT GTT TGG CCT CAG TTC CGC CAC GGC CT-3'), 产物大小为 1 200 bp, 由上海桑尼生物技术有限公司合成, 规格为 2A。

1.2 方法

1.2.1 pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒构建及鉴定 以大鼠 cDNA 文库为模板, PCR 法获得 Hes1 片段, Sfi I 酶切 pShuttle-CMV 重组穿梭载体及 Hes1 片段。CIP 去磷酸化处

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81570262);赣鄱 555 领军人才计划(赣组字[2013]58 号);江西省自然科学基金重大项目(20152ACB20026)。作者简介:周学亮(1980-),副主任医师,博士,主要从事心肌疾病的信号通路研究。# 共同第一作者:方义湖(1971-),教授,硕士,主要从事心血管基础疾病研究。△ 通信作者, E-mail: liujichun999@163.com。

理, T4 DNA Ligase 连接过夜, 转化 DH5 α 化学感受态细胞, 接种于含卡那霉素(Kan⁺)LB 平板培养皿。次日随机挑选阳性单克隆菌落, 于 Kan⁺LB 液态培养基摇菌过夜, 隔日小提质粒, 行 SfiI 酶切鉴定, 再送上海桑尼生物技术有限公司基因测序。无突变的克隆命名为 pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒。

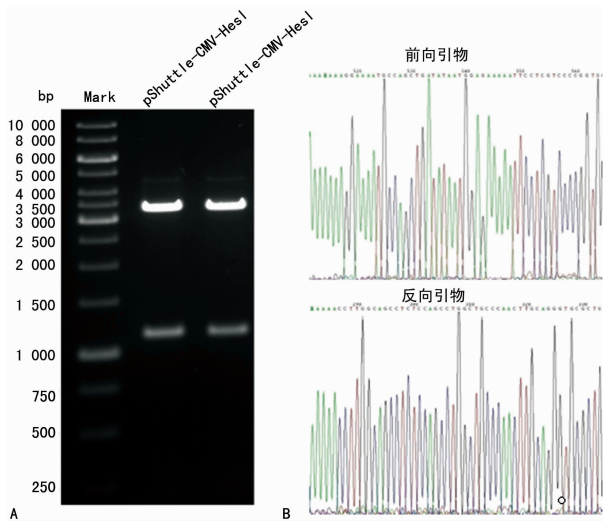
1.2.2 pAdeno-Hes1 病毒质粒构建 I-Ceu I、I-Sce I 双酶切 pAdeno 载体、pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒, CIP 去磷酸化处理, T4 DNA Ligase 连接过夜, 转化 DH5 α 化学感受态细胞, 接种含氨苄西林(Amp⁺)LB 平板培养皿。次日随机挑选阳性单克隆菌落, 于 Amp⁺LB 液态培养基摇菌过夜。隔日小提质粒, 行 Xho I 酶切鉴定, 再送上海桑尼生物技术有限公司基因测序, 无突变的克隆命名为 pAdeno-Hes1 病毒质粒。

1.2.3 Ad-Hes1 包装、收毒、扩增及滴度测定 pAdeno-Hes1 病毒质粒 PacI 限制性内切酶线性化, 转染 293 细胞, 6 h 后更换新鲜细胞培养液, 出毒完毕后收集所有细胞及培养液, 于 -80 °C 和 37 °C 间冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为 Ad-Hes1 第一代毒种(P1), 作为毒种 -80 °C 保存。取 P1 代毒种感染 293 细胞, 待所有细胞脱落底面开始收毒, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL ST buffer(培养液 + 10% 血清 + 2.5% 甘油), Vortex 混匀, 于 -80 °C 和 37 °C 间冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液(P2) -80 °C 保存。依前法利用 P2 代病毒大量扩增病毒, 纯化后利用改良 TCID50 法行病毒滴度测定。

1.2.4 Ad-Hes1 功能鉴定 H9c2 细胞传代 10⁷ 至 6 孔板, 每孔分别加入约 Ad-GFP、10 μ L 和 30 μ L(MOI 约 30 和 90) 的 Ad-Hes1 腺病毒, 4 h 更换培养液, 36 h 后收集细胞蛋白, Western blot 检测 Hes1 表达。

2 结果

2.1 pShuttle-Hes1 重组穿梭质粒成功构建 Hes1 经 PCR 扩增后, 经 Sfi I 酶切插入 pShuttle-CMV 重组穿梭质粒, 获得 pShuttle-Hes1 转化子, Sfi I 酶切后行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得 1 200、3 400 bp 两条带(图 1A), 与预计结果相符。DNA-MAN(Version 6.0.3.99) 比对分析基因测序结果, 与大鼠 Hes1 基因编码序列完全一致(图 1B)。



A: pShuttle-Hes1 酶切鉴定; B: pShuttle-Hes1。

图 1 pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒构建及鉴定

2.2 pAdeno-Hes1 病毒质粒构建 pShuttle-Hes1 经 I-Ceu I、I-Sce I 双酶切, 插入 pAdeno 载体获得 pAdeno-Hes1 转化子, Xho I 酶切后行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得 14.50、11.70、2.66、2.47、1.

45、1.10、0.90、0.60 bp 8 条带(图 2), 与预计结果相符。

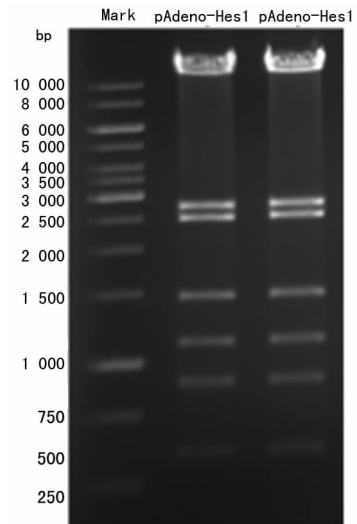
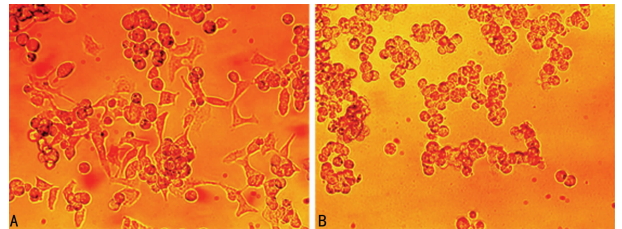


图 2 pAdeno-Hes1 病毒质粒酶切鉴定

2.3 Ad-Hes1 包装、收毒、扩增及滴度测定 pAdeno-Hes1 病毒质粒转染 293 细胞后, 每天观察细胞出毒迹象, 出毒现象为细胞变大变圆, 呈葡萄状, 并开始出现明显噬斑, 待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒(图 3)。利用改进 TCID50 法测定 Ad-Hes1 滴度, 结果为 1.6×10^{11} PFU/mL, 体积 1 mL, 总滴度为 1.6×10^{11} PFU。



A: 出毒初期; Bp: 出毒后期。

图 3 Ad-Hes1 细胞出毒情况($\times 40$)

2.4 Ad-Hes1 功能鉴定 Ad-Hes1 转染 H9c2 心肌细胞, 48 h 后提总蛋白, Western blot 显示 Hes1 在 Ad-Hes1 组表达, 病毒转染量越大, 表达量越大, 提示 Ad-Hes1 构建成功, 可在 H9c2 细胞内正常表达(图 4)。

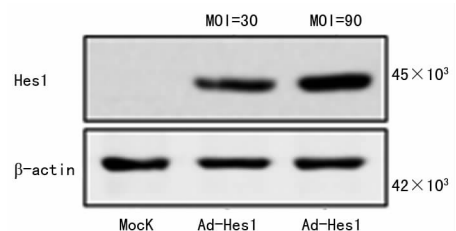


图 4 Ad-Hes1 在 H9c2 心肌细胞内表达

3 讨论

研究表明 Hes 基因家族包含 Hes1-7, 编码 bHLH 发挥转录抑制作用, 在细胞分化、细胞周期停滞、细胞凋亡及细胞自我更新等多个生理过程中发挥关键作用^[5,9]。Hes1 蛋白包含 bHLH、orange、WRPW 保守结构域, bHLH 包括与 DNA 结合的基本区域和螺旋-环-螺旋区域, 其脯氨酸残基使 Hes 与 DNA 相结合, 促进 HLH 形成二聚体。Orange 为双亲性螺旋, 位于 bHLH 结构域下游, 维持 bHLH 相互作用的特异性。WRPW 位于肽链羧基端, 与共抑制子 TLE/Grg 形成复合物

后,再与 DNA 的 N-盒结合,从而改变了染色体的结构,使 DNA 的转录停止^[10-11]。研究表明 Hes1 在心血管系统发挥重要作用,并发现 Hes1 在心脏前体细胞中表达,为心室流出道发育所必需^[12];笔者前期研究也表明心肌缺血后适应可激活 Hes1,从而提高细胞存活率,减少活性氧(ROS)形成,稳定线粒体膜电位,抑制线粒体通透性转换孔开放,最终抑制心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[13]。为深入研究 Hes1 在心肌保护中的分子机制,利用基因异位表达技术,针对 Hes1 构建病毒表达载体,可望在心肌细胞中特异性激活 Hes1,从中观察 Hes1 的心肌保护效应。

目前,用于目的基因转移的病毒载体主要包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和慢病毒载体^[14]。重组腺病毒载体系统是研究基因转染最理想的载体系统,介导的基因转染效率高,适合用于绝大多数细胞和组织的转基因表达研究;同时可以产生高滴度病毒,也可用于基因治疗。重组腺病毒系统是 E1 和 E3 区缺陷的腺病毒载体系统,可重组高达 10 000 bp 的外源基因片段,免疫原性低,不引起宿主基因突变;并在同一载体上可克隆多个基因片段且能长效表达,产生的高滴度病毒既能感染分裂相细胞,又能感染未分裂相细胞,因此宿主范围广,应用广泛^[15]。居于以上特点,考虑到由于 Hes1 片段较大,涉及细胞及动物实验,对病毒感染效率要求高,因此采用腺病毒载体系统构建 Hes1 过表达载体。

本研究应用腺病毒载体系统先构建 pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒,再以 pShuttle-CMV-Hes1 为骨架,构建 pAdeno-Hes1 病毒质粒,然后感染至 293 细胞中进行病毒包装,细胞出毒后收集第一代(P1)毒液,并以此为毒种进行第二代(P2)出毒及大量病毒扩增。病毒滴度测定后,再感染 H9c2 心肌细胞,以确定 Ad-Hes1 构建成功,并可在心肌细胞里正常表达。笔者前期研究发现 Notch1 信号通路有明显的心肌保护效应^[8],Hes1 作为 Notch1 信号的靶基因,是否在其中发挥重要作用需要进一步研究论证,而 Ad-Hes1 的成功构建,正为进一步研究 Hes1 的心肌保护作用奠定实验基础。

参考文献

- [1] Feder JN, Jan LY, Jan YN. A rat gene with sequence homology to the Drosophila gene hairy is rapidly induced by growth factors known to influence neuronal differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(1):105-113.
- [2] Grbavec D, Stifani S. Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223(3):701-705.
- [3] Zhang K, Zhang YQ, Ai WB, et al. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by notch1 and tgf-beta/bmp signaling [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3):878-887.
- [4] Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, et al. The notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6/7):572-581.
- [5] Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: A key role in stemness, metastasis and multidrug resistance [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3):353-359.
- [6] Bhoopathi P, Chetty C, Dontula R, et al. Sparc stimulates neuronal differentiation of medulloblastoma cells via the notch1/stat3 pathway [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14):4908-4919.
- [7] Qiang L, Wu T, Zhang HW, et al. Hif-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating notch signaling pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(2):284-294.
- [8] Zhou XL, Wan L, Xu QR, et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning [J]. *J Transl Med*, 2013(11):251.
- [9] Rani A, Greenlaw R, Smith RA, et al. Hes1 in immunity and cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016(30):113-117.
- [10] Schnell SA, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, et al. Therapeutic targeting of hes1 transcriptional programs in t-all [J]. *Blood*, 2015, 125(18):2806-2814.
- [11] Tian C, Tang Y, Wang T, et al. Hes1 is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia [J]. *Oncotargets Ther*, 2015(8):899-904.
- [12] Rochais F, Dandonneau M, Mesbah K, et al. Hes1 is expressed in the second heart field and is required for outflow tract development [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7):e6267.
- [13] Zhou XL, Zhao Y, Fang YH, et al. Hes1 is upregulated by ischemic postconditioning and contributes to cardioprotection [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8):730-736.
- [14] Liu YP, Berkhout B. Mirna cassettes in viral vectors: Problems and solutions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):732-745.
- [15] Janssen JM, Liu J, Skokan J, et al. Development of an adeno-based system to produce first- and second-generation adenoviral vectors with tropism for car- or cd46-positive cells [J]. *J Gene Medz*, 2013, 15(1):1-11.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-16)

(上接第 582 页)

- [12] Jeong HS, Lee BH, Sung HM, et al. Effect of botulinum toxin type a on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 136(2):171e-178e.
- [13] Xiao Z, Zhang M, Liu Y, et al. Botulinum toxin type a inhibits connective tissue growth factor expression in fibroblasts derived from hypertrophic scar [J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2011, 35(5):802-807.

- [14] 吴晓明, 孙奎, 张宏霞, 等. 丝裂霉素 C 影响增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(2):235-238.
- [15] Zhu HY, Li C, Bai WD, et al. MicroRNA-21 regulates hTERT via PTEN in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e97114.

(收稿日期:2016-06-19 修回日期:2016-08-17)