

大鼠过氧化物酶体增生因子激活受体 γ 基因慢病毒表达载体的构建与鉴定

朱松明 张 捷 丁新德 陈治泉 高 敏

(上海市崇明中心医院 上海 202150)

摘要 目的:构建大鼠过氧化物酶体增生因子激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)基因慢病毒表达载体,获得可供转染的滴度,为进一步研究该基因在肝星状细胞活化(Hepatic stellate cells, HSC)及肝纤维化中的作用机制提供物质基础。方法:大鼠 PPAR- γ 基因序列进行 PCR 扩增,与经 AgeI 酶切后的 pGC-FU-3FLAG 载体连接产生慢病毒载体表达质粒 pGC-fu-3flag-PPARG,转化 DH5 α ,PCR 筛选阳性克隆,测序并转入 293T 细胞 Western blot 鉴定,而后将 pGC-fu-3flag-PPARG, pHelper 1.0, pHelper 2.0 三质粒共转染 293T 细胞,包装成慢病毒,收集上清浓缩病毒测定病毒滴度。结果:DNA 测序及 Western blot 鉴定证实构建的大鼠 PPAR- γ 基因慢病毒表达载体 pGC-fu-3flag-PPARG 正确,浓缩慢病毒悬液的滴度为 2×10^8 TU/ml。结论:成功构建携带大鼠 PPAR- γ 基因的重组慢病毒表达载体。

关键词:过氧化物酶体增生因子激活受体 γ ;慢病毒载体;肝纤维化

中图分类号:Q95-3 Q75 Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-259-03

Construction and Detection of Lentiviral Expression Vector of Rat PPAR- γ Gene

ZHU Song-ming, ZHANG Jie, DING Xin-de, CHEN Zhi-quan, GAO Min

(Department of general surgery, Chongming hospital, Shanghai 202150)

ABSTRACT Objective: To construction of recombinant lentiviral expression vector carrying rat peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) gene, and to obtain the titer of the lentiviral stock for investigating the mechanism of PPAR- γ expression in the activation of HSC cells and hepatic fibrosis. **Methods:** Rat PPAR- γ encoding sequence was amplified, then was ligated with pGC-FU-3FLAG lentiviral vector to construct the lentiviral expression vector named pGC-fu-3flag-PPARG. It was identified by PCR, DNA sequencing and Western blot. Virus packaging cells (293T cells) were co-transfected with lentiviral vector pGC-fu-3flag-PPARG, pHelper 1.0 and Helper 2.0 to construct lentiviral. The titers of recombinant viruses were determined by Real time qPCR. **Results:** Lentiviral expression vector of rat PPAR- γ gene proved by sequencing and Western blot was successfully constructed. The titer of recombinant viruses was 2×10^8 TU/ml. **Conclusion:** Rat PPAR- γ lentiviral expression vector was constructed successfully.

Key words: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Lentiviral; Hepatic fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q75, Q78R **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-259-03

前言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指各种致病因素引起肝脏损害和炎症。在修复过程中导致肝脏细胞外基质(ECM)异常增多和过度沉积的病理过程,是肝硬化发展的必由之路。肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSC)的激活是肝脏胶原产生和肝纤维化形成的中心环节^[1]。已有研究证实:PPAR- γ 可以在体内外抑制肝星状细胞激活和基质合成,减慢肝纤维化的进程,PPAR- γ 的活化可以减少 HSC 的激活^[2]。本次研究的主要目的是为了设计、构建和鉴定 PPAR- γ 的慢病毒表达载体,为后期研究 PPAR- γ 基因在 HSC 活化中的作用机制和肝纤维化的基因治疗打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PCR 用试剂 primer (上海吉凯基因技术有限公司合成),胎牛血清 FBS (上海微科生化试剂有限公司),DMSO (上海生物试剂厂),DMEM (GIBCO),胰酶(上海化学试剂公司)。293T 细胞(中科院上海细胞所)。慢病毒载体系统(Tronolab 公司 www.tronolab.com/lentivectors.php),该病毒包装系统由 pGC-FU-3FLAG 载体, pHelper 1.0 (gag/pol 元件)载体, Helper 2.0 (VSVG 元件)载体三质粒组成,其中 pGC-FU-3FLAG 载体是对 pGC-LV 载体改造而得,同时能表达荧光蛋白 marker (GFP), pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 含有病毒包装所必须的元件。

1.2 方法

1.2.1 PPAR- γ 基因慢病毒载体构建 从 cDNA 文库中设计出针对 PPAR- γ 基因的引物(上海吉凯基因化学技术公司)。

作者简介:朱松明(1957-),男,本科,教授,研究方向:胃肠外科,肿瘤诊治,电话:021-69692701, E-mail:zhusongming2007@126.com (收稿日期:2010-10-18 接受日期:2010-11-12)

PPARG-Age I-F GATGATGACGACAAACCGGTCATGGGTGAAACTCTGGGAGATCCTCTGTTGACCTGAGC。引物说明:含交换配对碱基、Age I 酶切位点(下划线标记的)以及调整读码框的序列(双下划线记的),并含有目的基因 5' 端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。为了设计引物的需要,把 CCA 同义突变为 CCT。PPARG-Age I-R TCACCATGGTGGCGAC-CGGATACAAGTCCTTGTAGATCTCTG。引物说明:含交换配对碱基和 Age I 酶切位点(下划线标记的,为了调整读码框去掉了 T 碱基),并含有目的基因 3' 端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。PPARG-M-R :CTTGTGAAGTGCTCATAGGCAGT-GCATCAGCGAAGGCACCATGCTCAGGGTCAACAGGAG。引物说明:用来修正模板 N 端缺失序列。PPARG-M-F CC-TATGAGCACTTCACAAGAAATTACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCAC。引物说明:用来修正模板的 N 端缺失序列,以及扩展目的基因的 C 端。PPARG-SEQF GGATTCATGACCAGGGAG。引物说明:该引物位于目的基因中,用于菌落 PCR 鉴定转化子。EGFP-N-R CGTCGC-CGTCCAGCTCGACCAG 引物说明:该引物位于 EGFP 基因的 N 端,用于菌落 PCR 鉴定转化子以及测序。PCR 获得 PPAR- γ 基因片段。该片段与经 AgeI 酶切后的 pGC-FU-3FLAG 线性载体连接,于 23℃ 反应 15 分钟,再于 42℃ 反应 15 分钟制备克隆交换液,最后将连接产物转化到用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞,于 37℃ 培养 16 小时。

1.2.2 慢病毒载体 PCR 鉴定、DNA PCR 反应条件 94℃ 30s, 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s (30 个循环), 72℃ 6 min, 降至 4℃。选取阳性克隆菌液送公司测序。将测序正确的质粒转染 293T 细胞, 24 小时后, 在荧光显微镜下观察融合蛋白 GFP/FLAG 的表达情况, 并通过 Western Blot 检测转染 293T 的样品中 FLAG/PPAR- γ /GFP 融合蛋白的表达。

1.2.3 慢病毒包装及滴度检测

转染按 Lipofectamine™2000 试剂说明书操作进行。待细胞密度达 70%~80% 进行转染。将所制备的各 DNA 溶液 pGC-FU-3FLAG 载体 20 μ g, pHHelper 1.0 载体 15 μ g, pHHelper 2.0 载体 10 μ g 加入灭菌离心管中, 与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀, 调整总体积为 2.5 ml, 在室温下温育 5 分钟。将 Lipofectamine 2000 试剂轻柔摇匀, 取 100 μ l Lipofectamine 2000 试剂在另一管中与 2.4ml Opti-MEM 混合。配制 DNA 与 Lipofectamine 2000 稀释液的转染复合物。将 DNA 与 Lipofectamine 2000 混合液转移至 293T 细胞的培养液中, 混匀, 于 37℃, 5% CO₂, 细胞培养箱中培养。每瓶细胞中加入含 10% 血清的细胞培养基继续培养 48 小时。收集转染后 48 小时(转染即可为 0 小时计起)的 293T 细胞上清液, 将病毒浓缩液移出, 分装后保存在病毒管中, -80℃ 长期保存。

使用 Real time 定量 PCR 法测定病毒滴度。检测前一天, 对 293T 细胞传代, 每个 24 孔中加 1×10^5 个细胞, 体积为 500 μ l。次日, 准备 7~10 个无菌的 Ep 管, 在每个管中加入 90 μ l 的培养基(DMEM+10% FBS)。取待测定的病毒原液 10 μ l 加入到第一个管中, 混匀后, 取 10 μ l 加入到第二个管中, 继续相同的操作直到最后一管。选取所需的细胞孔, 吸去 90 μ l 培养基。加入稀释好的病毒溶液。放入 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。48 小时后, 加入新鲜培养基 500 μ l。小心操作, 不要吹起细

胞。4 天后, 在 RNase-free 条件下, 抽提 RNA, 逆转录获 cDNA, 然后进行 Real-time PCR 检测。通过比较对照组(ACTIN)和实验组(GFP)的 Ct 值差异判断滴度值。通常情况下, 认为 Ct 值差异 2 以上存在显著差异。反转录反应所获得的 20 μ l cDNA 中只取了 1 μ l 用于实时定量检测, 所以该结果仅表示 1/20 样品的情况, 在滴度计算时应该乘以系数 20。

2 结果

2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定

琼脂糖凝胶电泳图片见图 1, PCR 条带大小: 阳性克隆 PCR 片段大小为: 475 bp。

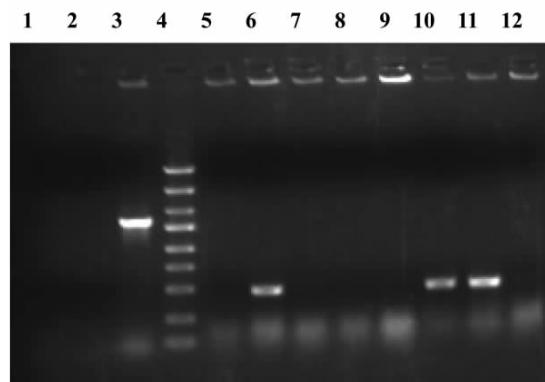


图 1 阳性克隆的 PCR 鉴定: 1: 阴性对照(ddH₂O); 2: 阴性对照(空载自连对照组); 3: 阳性对照(GAPDH); 4# Marker: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 Kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 5-12#: PPARG-1-8

Fig. 1 Identification of Positive Clones PCR: 1: Positive Control (ddH₂O); 2: Negative Control (Blank Control); 3: Positive Control (GAPDH); 4# Marker: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 Kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 5-12#: PPARG-1-8

2.2 DNA 测序鉴定

DNA 测序鉴定的结果与实验要求的 DNA 序列一致。

2.3 细胞内的表达检测

pGC-fu-3flag-PPARG 质粒为 PPAR- γ 的过表达慢病毒载体, 目的基因融合 GFP 和 FLAG 共同表达。目的质粒转染 293T 24h 后通过荧光检测表达, 观察到 GFP 的表达(图 2)。通过 Western Blot 检测转染 293T 的样品, 可以观察到约 90KDr 处有条特征带, 其大小和 FLAG-PPAR- γ -GFP 融合蛋白 (~55+28KDr=~83KDr) 吻合(图-3)。

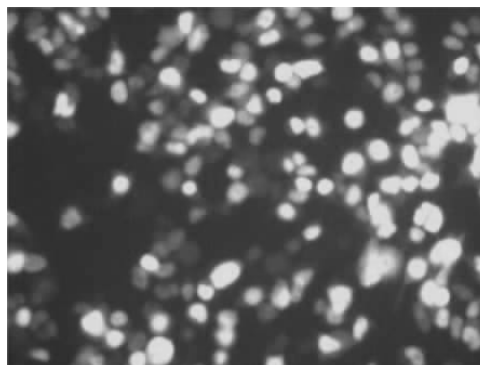


图 2 目的质粒转染 293T 24h 后荧光检测 GFP 表达

Fig 2 Fluorescence Detection of GFP Expression after target Plasmid Transfect into 293T after 24 hour

2.4 慢病毒载体的包装及滴度测定

根据不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析。在本次滴度检测中,1.00E-04 ul 组样品和 control 组样品的 Ct 值存在差异,认为在 1.00E-04 ul 组样品中存在病毒颗粒。则病毒的滴度为 2×10^8 TU/ml。说明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒成功包装。



图3 Western Blot 检测转染 293T 的样品:M 为 Marker;KL859-1 为目标的质粒(pGC-fu-3flag-PPARG)转染 293T 后样品;

Fig.3 Western Blot detect the 293T after Transfection:M is Marker; KL859-1 is the sample transfected with target plasmid(pGC-fu-3flag-PPARG)

3 讨论

肝纤维化是指各种致病因素引起肝脏损害和炎症,在修复过程中导致肝脏细胞外基质(ECM)异常增多和过度沉积的病理过程。肝星状细胞(HSC)被认为是 ECM 的主要来源细胞。HSC(也被称为维甲酸储存细胞,脂肪细胞,空泡细胞,脂肪储存细胞,伊藤细胞)存在于肝小叶的肝内皮细胞和肝实质细胞之间,在其细胞质的脂肪滴中以棕榈酰视黄醛的形式储存了人体 80% 的维甲酸^[3]。HSC 的激活过程是肝脏胶原产生和肝纤维化形成的中心环节,特征性表现就是核周围维生素 A 脂滴的消失^[4,5]。

过氧化物酶体增生因子激活受体(PPAR)是一种新的固醇类激素受体,可被脂肪酸及代谢产物和脂肪酸样的化学物质激活,与基因调控区的 PPAR 反应元件(PPRE)结合后调节相应基因的转录。PPAR- γ 在肝星状细胞含量最为丰富,主要参与调节脂肪细胞的分化、脂肪酸的合成与贮存。研究发现 PPAR- γ 在前脂肪细胞 3T3-L1 向脂肪细胞分化中起重要作用^[6,7]。活化后的 PPAR- γ 可与 PPRE 结合,也有可能和 RXR 结合形成异源二聚体而发挥其转录调控作用^[8]。PPAR- γ 可以在体内抑制肝星状细胞激活和基质合成,减慢肝纤维化的进程;PPAR- γ 的活化可以减少 HSC 的激活,PPAR- γ 激动剂可以抑制 HSC 激活的几种标志物如 α -SMA、胶原的表达,细胞增殖和转移,这些发现支持了 PPAR- γ 在逆转活化的 HSC 向静止期转化的作用^[2,9],PPAR- γ 配体有可能成为抗肝纤维化治疗的一个新的亮点^[10]。

为构建 pGC-fu-3flag-PPARG 慢病毒载体,购买了病毒包装系统 pGC-fu-3flag,Helper 1.0 (gag/pol 元件),Helper 2.0 (VSVG 元件)载体三质粒,其中 pGC-fu-3flag 载体含有能持续

表达小 RNA 的元件,同时能表达荧光蛋白 marker(GFP),可用于病毒包装时转染效率,以及感染宿主细胞的感染效率的检测。pHelper 1.0 质粒中含有 HIV 病毒的 gag 基因,编码病毒主要的结构蛋白;pol 基因,编码病毒特异性的酶;rev 基因,编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子。pHelper 2.0 质粒中含有单纯疱疹病毒来源的 VSVg 基因,提供病毒包装所需要的衣壳蛋白。293T 细胞是 293 细胞的一种,作为包装细胞,转染前 24 h 待细胞密度达 70%~80% 时方可用于转染,细胞状态对于病毒包装至关重要,因此需要保证良好的细胞状态和较少的传代次数。使用 Real time 定量 PCR 测定法测定病毒滴度,获得了浓缩慢病毒悬液的滴度为 2×10^8 TU/ml。

本实验成功构建并包装了大鼠 PPAR- γ 基因慢病毒表达载体,为进一步研究基因在肝纤维化中的作用机制和动物基因治疗奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000, 275:2247-2250
- [2] Hazra S, Miyahara T, Rippe RA, et al. PPAR gamma and hepatic stellate cells[J]. Comp Hepatol, 2004, 3 (Suppl 1): S7
- [3] Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-storing cells (stellate cells)[J]. Vitam Horm, 2007, 75:131-159
- [4] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis [J]. Gut, 2005, 54 (1):142-151
- [5] Jeong DH, Lee GP, Jeong WI, et al. Alterations of mast cells and TGF-beta1 on the silymarin treatment for CCl₄ (4)-induced hepatic fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(8):1141-1148
- [6] Asson-Batres MA, Smith WB. Localization of retinaldehyde dehydrogenases and retinoid binding proteins to sustentacular cells, glia, Bowman's gland cells, and stroma: potential sites of retinoic acid synthesis in the postnatal rat olfactory organ[J]. J Comp Neurol, 2006, 496 (2):149-171
- [7] Kang KW, Kim YG, Cho MK, et al. Oltipraz regenerates cirrhotic liver through CCAAT/enhancer binding protein-mediated stellate cell inactivation[J]. FASEB J, 2002, 16(14):1988-1990
- [8] Karine H, Peggy V, Erik Q, et al. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids [J]. Hepatology, 2004, 39: 97-108
- [9] Rafael Bruck, Sigal Weiss, Hussein A, et al. Additive Inhibitory Effect of Experimentally Induced Hepatic Cirrhosis by Agonists of Peroxisome Proliferator Activator Receptor α and Retinoic Acid Receptor[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54:292-299
- [10] Zhao C, Chen W, Yang L, et al. PPARgamma agonists prevent TGF-beta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350: 385-391