

可溶性 TGF- β_1 II 型受体逆转录病毒表达载体的构建

高巍, 周永兴, 张惠中, 聂青和

高巍, 周永兴, 聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊治中心 陕西省西安市 710038

张惠中, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院中心实验室 陕西省西安市 710038

高巍, 女, 1971-02-03 生, 江苏省镇江市人, 2002 年第四军医大学医学博士, 主要从事肝纤维化方面的研究。

通讯作者: 高巍, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊治中心。weiwei5858@163.com
电话: 029-83377128

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-26

Construction of expression vector containing TGF- β RII-IgG1 Fc genes

Wei Gao, Yong-Xing Zhou, Hui-Zhong Zhang, Qing-He Nie

Wei Gao, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Diagnosis and Treatment Center of Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Hui-Zhong Zhang, Central Laboratory, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Dr Wei Gao, Diagnosis and Treatment Center of Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. weiwei5858@163.com

Received: 2005-01-06 Accepted: 2005-01-26

Abstract

AIM: To construct recombinant human retroviral vector carrying soluble TGF β_1 Type II receptor (T β R II) gene.

METHODS: The cDNA fragments of human T β RII and IgG1 Fc were amplified by RT-PCR from total RNAs of peripheral blood mononuclear cells. The purified cDNA fragments were ligated and subcloned into vector pGEM-T-Easy to get the fusion gene of T β RII-IgG1Fc. The fusion gene was then subcloned into retroviral vector pLXSN. The obtained recombinant retroviral vector pL (T β RII-IgG1-Fc) SN was transfected into PA317 cells and selected with G418. The stable expression of the T β RII-IgG1-Fc fusion gene in positive clones was identified by RT-PCR.

RESULTS: The restriction endonuclease digestion results and DNA sequencing indicated that the retroviral vector pL (T β RII-IgG1 Fc) SN was successfully constructed. The T β RII-IgG1 Fc fusion gene was integrated into the PA317 genome and expressed stably in the host cells.

CONCLUSION: The target retroviral vector pL(T β RII-IgG1 Fc) SN was constructed successfully. It provides an ef-

fective tool for gene therapy and will lay a foundation for clinical treatment of liver fibrosis.

Key Words: TGF- β RII-IgG1 Fc; RT-PCR; Recombinant retroviral vector

Gao W, Zhou YX, Zhang HZ, Nie QH. Construction of expression vector containing TGF- β RII-IgG1 Fc genes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(6):760-765

摘要

目的: 构建表达人 TGF- β_1 II 型受体细胞外结合区和人 IgG1 Fc 的融合蛋白逆转录病毒载体, 为进一步肝纤维化的基因治疗奠定实验基础。

方法: 以 RT-PCR 方法扩增目的基因 T β R II -IgG1 Fc, 扩增产物纯化后克隆至测序载体 pGEM-T-Easy, 挑取阳性克隆酶切鉴定后测序; 利用重组 DNA 技术, 将 T β R II -IgG1 Fc 基因亚克隆至逆转录病毒载体 pLXSN 中, 重组质粒 pL(T β R II -IgG1 Fc)SN 在脂质体介导下转染 PA317 包装细胞, G418 筛选, 直至出现抗性克隆, 扩大培养, 测定病毒滴度。

结果: 经测序、限制性酶切分析及 PCR 方法鉴定, 载体插入基因序列、大小、位置均正确, 并用 PA317 细胞进行包装、病毒滴度测定、筛选, 建立具有较高滴度的感染性重组病毒产生细胞系。

结论: 成功构建了重组质粒 pL(T β R II -IgG1 Fc)SN, 可望为肝纤维化的基因治疗提供有效途径。

关键词: TGF- β R II -IgG1 Fc 基因; RT-PCR; 重组逆转录病毒载体

高巍, 周永兴, 张惠中, 聂青和. 可溶性 TGF- β_1 II 型受体逆转录病毒表达载体的构建. *世界华人消化杂志* 2005;13(6):760-765
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/760.asp>

0 引言

肝纤维化的形成是一系列作用的结果^[1-3], 转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 与肝纤维化的发生有密切的关系, 是最强的肝纤维化促进因子^[4-9], TGF- β_1 与 TGF- β 受体 (T β R) 结合而发挥作用, T β R 由三部分组成, 细胞外部分与 TGF- β_1 结合, 通过跨膜蛋白使胞质内部分-丝氨酸/苏氨酸激酶激活, 直接参与 TGF- β_1 的信号转导^[10]. 一旦其

特异的膜受体缺乏细胞内激酶区, 其生物学效应就不能下传. 抑制 TGF- β_1 信号传导可能是很有价值的治疗肝纤维化的方法^[11]. 我们运用基因重组技术构建表达人 TGF- β_1 II 型受体细胞外结合区和人 IgG1 Fc 的融合蛋白的真核细胞表达载体, 为进一步肝纤维化的基因治疗奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* JM109 购自 Promega 公司. *E. coli* DH5 α 购自 Invitrogen 公司; 克隆载体 pGEM-T-easy 购自 Promega 公司; pLXSN 逆转录病毒表达载体由第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所张惠中副教授惠赠, 其上 LTR(long terminal repeated sequence) 下四个多克隆位点依次为 *Eco*RI、*Hpa*I、*Xho*I、*Bam*HI. (图 1) 逆转录病毒包装细胞 PA317 细胞购自美国 ATCC 公司. 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、X-gal 及 IPTG: GIBCO 公司. Tag DNA 聚合酶: 上海生物工程有 限公司 产 品. 质 粒 提 取 及 纯 化 试 剂 盒 WizardTM Plus Minipreps, PCR 片段回收及纯试剂盒 WizardTM Mini-column 均购自 Promega 公司. 逆转录酶、Trizol 购自 GIBCO 公司. 脂质体转染试剂盒 Lipofect amine 2000 购自 Gibco 公司. DMEM: Gibco 公司. 小牛血清: 杭州四季青生物工程材料研究所. 引物合成及 cDNA 测序由上海基康生物工程公司完成.

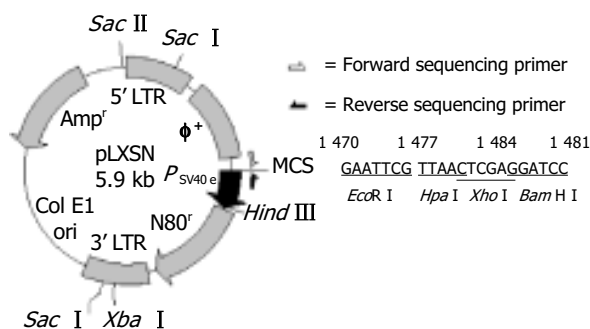


图 1 pLXSN 质粒图谱(引自 Clontech 公司).

1.2 方法 根据人的 TGF- β_1 II 型受体、人 IgG1 全基因序列^[12]设计 PCR 扩增的内外两组引物, 通过 RT-PCR 获得人 T β RII 基因细胞外片段和 IgG₁ Fc 片段. 引物序列 P₁: 5'-GGAATTCACCATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGC-3', P₂: 5'-GCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTGTCCAACAAGTCAGGATTGCTGGTGTAT-3', P₃: 5'-ATAACACCAGCAATCC TGACTTGTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC-3' P₄: 5'-GGGATCCCTCATTTACCCGAGACAGGGAGAGGCTCTTC-3'. 划线部分为设计的酶切位点 *Eco*RI 和 *Bam*HI, P₂ 和 P₃ 中斜体的部分分别为人 IgG₁ Fc 序列和 T β RII 的互补序列. IgG₁ Fc 和 T β RII 细胞外结合区的融合片段, 以 P₁/P₂, P₃/P₄ 联合 PCR 产物为模板, 以 P₁, P₄ 为引物, 通

过复式 PCR 获得. 以上引物由上海基康生物工程公司合成. 取健康成人外周血 20 mL, 分离外周血淋巴细胞, 普通 RPMI1640 常规培养, 加 PHA 5 mg/L 培养 3 d, 1 000 r 离心 10 min 沉淀后重悬细胞加 IL-2 100 kU/L 传代培养, 以刺激细胞生长, 培养 6 d 观察细胞大量生长, 离心、洗涤、沉淀后以 Trizol 试剂提取 PBMC 总 RNA, 以反转录体系经 RT-PCR 制备 PBMC cDNA.

1.2.1 目的基因的扩增和克隆 以 PBMC cDNA 为模板, PCR 反应条件: 94℃ 5 min, T β RII 为 60℃, IgG₁ Fc 为 64℃, 融合片段为 55℃ 2 min, 72℃ 2 min 后 94℃ 1 min, T β RII 为 60℃, IgG₁ Fc 为 64℃, 融合片段为 55℃ 1 min, 72℃ 2 min 35 个循环, 最后 72℃ 继续延伸 10 min. 取 PCR 产物 4 μ L, 在含 0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶(15 g/L)中电泳分析, 紫外观测仪观察结果. 将上述 PCR 扩增产物进行低熔点琼脂糖凝胶电泳, 以 WizardTM Mini-column 试剂盒回收纯化片段, 与 pGEM-T-Easy 测序载体按 3:1 比例连接, 4℃ 连接反应过夜. 制备 JM109 感受态宿主菌, 冰浴条件下加入上述连接产物 5 μ L, 冰浴 30 min, 42℃ 休克 90 s 后, 迅速冰浴 2 min, 加 LB 培养液 800 μ L, 37℃ 保温 1 h, 涂布于含有氨苄青霉素(100 mg/L), X-gal, IPTG 的 LB 琼脂平板, 37℃ 培养 15 h 后经蓝白斑筛选后随机挑选. 命名为 pGEM/ T β R II -IgG1 Fc, 酶切鉴定. 选择酶切鉴定符合的克隆作为阳性克隆, Mini-column 纯化质粒, 用通用引物 T7 Primer 进行双向测序.

1.2.2 pL(T β R II -IgG1 Fc)SN 构建 首先制备线性化双粘末端的 pLXSN 载体. *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切载体 pLXSN, 37℃ 4 h 后以低熔点琼脂糖凝胶回收载体片段, WizardTM Minicolumn 纯化. 再制备线性化双粘末端的 T β R II -IgG1 Fc 基因片段. *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切含 T β R II -IgG1 Fc 基因的正确重组子 pGEM/T β R II -IgG1 Fc 质粒, 37℃ 4 h 后以低熔点琼脂糖凝胶回收大小约 1.1 kb 基因片段, WizardTM Minicolumn 纯化. 将上述纯化的 T β R II -IgG1 Fc 基因片段与线性化双粘末端的 pLXSN 载体片段以 3:1 的比例连接. 4℃ 连接反应过夜. 最后制备 DH5 α 感受态宿主菌, 冰浴条件下加入上述连接产物, 冰浴 30 min, 42℃ 休克 90 s 后, 迅速冰浴 2 min, 加 LB 培养液 800 μ L, 37℃ 保温 1 h, 涂于氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜.

随机挑取上述连接产物转化的单个菌落, 扩大培养, 碱裂解法小量快速提取载体 DNA, *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切载体 pL(T β R II -IgG1 Fc)SN, 酶切产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外透射仪观察结果. 并送测序鉴定.

1.2.3 重组 PLXSN 载体的包装及病毒滴度测定 活化

重组 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 宿主菌单个菌落, 接种于 5 mL LB 培养液中培养过夜, Minicolumn 纯化质粒, 溶于无菌 Nuclease-Free 水 50 μ L 中, 加 1/10 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠, 2.5 倍体积的无水乙醇, 混匀后置于 -70°C (>30 min) 后 $14\ 000\ g$ 离心, 弃上清, 700 mL/L 乙醇于超净台内冲洗晾干, 溶于无菌 Nuclease-Free 水 60 μ L 中备转染用. PA317 细胞于 HAT 培养液中选择性培养 5 d, 换以 HT 培养液过渡培养 4 d, 转入含 100 mL/L 牛血清的普通 DMEM 培养液中培养. 在转染前 1 d, 选择生长状态良好的细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后将 6×10^5 细胞接种于 90 mm 培养皿中, 置 37°C , 50 mL/L CO_2 孵箱内培养 24 h. 转染前 4 h 换 10 mL 新鲜完全 DMEM 培养液, 置 37°C , 50 mL/L CO_2 孵箱内培养. 取 5 μ g 纯化的重组 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 质粒稀释于无血清的 DMEM 培养液 250 μ L 中, LF2000 转染试剂 4 μ L 稀释于无血清的 DMEM 培养液 250 μ L 中, 将二者混匀, 室温孵育 20 min 后将混合物逐滴加入接种 PA317 细胞的培养皿中, 置 37°C , 50 mL/L CO_2 孵箱内培养 16 h, 换完全 DMEM 培养液继续培养 36 h. 换含有 500 mg/L G418 的完全 DMEM 培养液. 5 d 换液 1 次, 直至抗性细胞集落形成, 挑选细胞集落, 用普通完全 DMEM 培养液扩大培养, 以制备含病毒的包装细胞上清并测定病毒滴度. 转染的包装细胞命名为 PA317/T β R II-IgG1 Fc. 空白质粒 pLXSN 包装方法同上, 转染的包装细胞命名为 PA317/0. 收集 PA317/T β R II-IgG1 Fc 细胞培养上清液, $1\ 200\ \text{r/min}$ 离心 10 min, -80°C 保存备用. 病毒滴度测定以空白 PA317 细胞为指示靶细胞. 2×10^5 空白 PA317 细胞培养 1 d 后, 吸去培养液, 加入 1 mL 倍比稀释的 PA317/T β R II-IgG1 Fc 细胞上清液 (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2}), 置 37°C , 50 mL/L CO_2 孵箱内培养 5 h, 补加完全 DMEM 培养液 5 mL 继续培养 24 h, 换以含有 500 mg/L G418 的完全 DMEM 培养液 7-14 d, 直至细胞集落形成, 计数并计算集落形成率 (colony forming unit, CFU). 空质粒 pLXSN 的包装及病毒滴度测定完全同上.

1.2.4 PA317/T β R II-IgG1 Fc 基因组 DNA 中 PCR 分析 分别提取逆转录病毒产生细胞 PA317/T β R II-IgG1 Fc 对照 PA317 细胞中的基因组 DNA. 取 1×10^6 细胞重悬于溶液 A 37.5 μ L, 加溶液 B 37.5 μ L 及蛋白酶 K 1 μ L, 58°C 水浴 1 h, 98°C 30 min, $12\ 000\ g$ 离心 1 min, 转移上清至一新的离心管, -20°C 保存待用. 用 T β R II-IgG1 Fc 基因引物分别扩增 PA317/T β R II-IgG1 Fc 细胞及对照 PA317 细胞中的基因组 DNA 中 T β R II-IgG1 Fc 基因, 以证实外源基因导入靶细胞. PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察.

2 结果

2.1 目的基因 PCR 扩增结果 取 PCR 反应产物 4 μ L 进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果在 518 bp 区域可见一条特异性强荧光带与 T β R II 细胞外结合区片段大小相符, 在 714 bp 区域可见一条特异性强荧光带与 IgG1 Fc 基因片段大小相符, 在约 1 200 bp 区域可见一条特异性强荧光带与融合基因片段大小相符 (图 2). 各基因序列经测序证实均与文献报道一致.

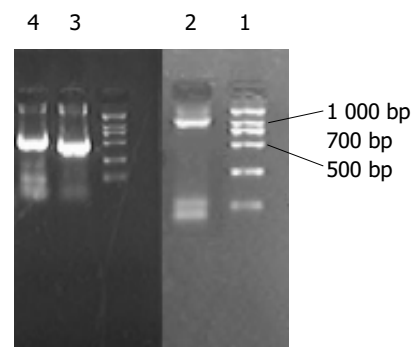


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳. 1: PCR marker; 2: 融合基因 (1 222 bp); 3: T β R II 细胞外结合区 (518 bp); 4: IgG1 Fc 基因 (714 bp).

2.2 含目的基因的重组载体的酶切鉴定 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 经 *Eco*RI、*Bam*HI 酶切得到大小约 1.2 kb 的 T β R II-IgG1 Fc 基因片段 (图 3), 测序证实均与文献报道一致.

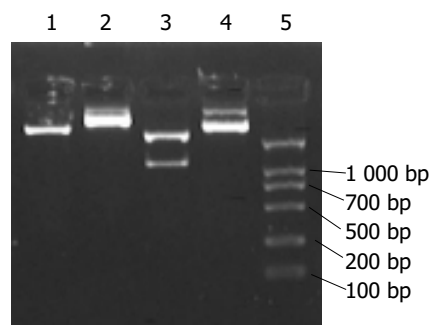


图 3 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 酶切分析. 1: pLXSN 载体 / *Eco*RI + *Bam*HI; 2: pLXSN 载体; 3: pL(T β R II-IgG1 Fc)SN / *Eco*RI + *Bam*HI (T β R II-IgG1 Fc 1.2 kb); 4: pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 载体; 5: PCR marker.

2.3 PCR 鉴定目的载体 以 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 重组载体为模板, 以 P₁、P₄ 为特异性引物, 总体积 25 μ L, 反应条件同前, 扩增插入片段, 得到大小正确的各条带 (图 4), 与酶切分析结果相一致, 证明各重组表达载体构建成功.

2.4 逆转录病毒产生细胞系的建立及鉴定 重组 pL(T β R II-IgG1 Fc)SN 载体 DNA 5 μ g 经脂质体转染法转染 6×10^5 PA317 包装细胞, 500 mg/L G418 筛选 10 d 后挑选 50 个细胞集落, 于不含 G418 的完全 DMEM 培养液中扩大培养, 其中 24 个细胞集落存活, 生长至

2 wk 左右测 CFU. 以 PA317 为靶细胞测定 24 个细胞集落的 CFU, 用倍比稀释的 PA317/T β R II -IgG1 Fc 细胞上清感染 PA317 细胞, 24 h 后 500 mg/L G418 筛选, 7-14 d 后镜下可见抗性细胞集落形成, 结晶紫染色, 计数. 用引物 P₁, P₄ 扩增细胞基因组 DNA 中的 T β R II -IgG1 Fc 基因, PCR 产物电泳后观察, 可见 PA317/T β R II -IgG1 Fc 细胞扩增出 1.2 kb 的条带(图 5), 证实细胞中有外源性 T β R II -IgG1 Fc 基因的导入, 同时也证实了重组病毒的活性及转导靶细胞的可能性, 而对照 PA317 细胞未扩增出 1.2 kb 的条带.

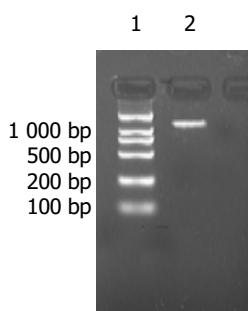


图 4 重组载体 PCR 鉴定. 1: PCR marker; 2: pL(T β R II -IgG1 Fc)SN/ T β R II -IgG1 Fc 基因.

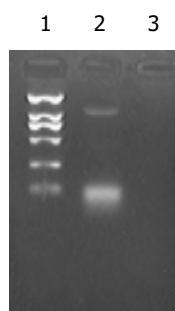


图 5 PA317/T β R II -IgG1 Fc 细胞. 基因组 DNA 的 T β R II -IgG1 Fc 基因扩增结果. 1: PCR markers; 2: PA317/T β R II -IgG1 Fc; 3: PA317/0.

3 讨论

TGF- β 是由两条多肽链组成的蛋白质, 是一个多功能的细胞因子家族, 共有 5 个亚型并已克隆化, 哺乳类动物仅有 I、II、III 型. TGF- β_1 为双硫键联结的二聚体碱性蛋白, 分子质量为 25 ku, 体内多种细胞如淋巴细胞、血小板、巨噬细胞等均可合成与分泌 TGF- β_1 . TGF- β_1 在肝内由非实质细胞合成, 主要在库普弗细胞 (Kupffer cell, KC) 中表达, 其表达量是肝星状细胞 (HSC) 的 9 倍. 肝纤维化时 HSC 可自分泌、旁分泌 TGF- β_1 , 并产生自我增生的循环过程. 细胞外基质 (ECM) 的合成和降解主要由 TGF- β_1 调控, TGF- β 家族中的激活素 A 过度表达也是发生肝纤维化的一个重要因素^[13-15]. TGF- β_1 与 TGF- β 受体 (T β R) 结合而发挥作用, T β R 由三部分组成, 细胞外部分与 TGF- β_1 结合, 通过跨膜蛋白使胞质内部分 - 丝氨酸 / 苏氨酸激酶激活, 直

接参与 TGF- β_1 的信号转导^[16].

SMAD 是新近发现的一族能完成 TGF- β 细胞生物信息由细胞膜到细胞核传递的胞内信号转导蛋白. TGF- β_1 信号的转导始于 TGF- β I 型和 II 型受体形成异源二聚体, 激活的 TGF- β I 型受体使 Smad2 和 Smad3 磷酸化, 而 Smad7 与 I 型受体稳定结合后可阻断此磷酸化, 使 TGF- β_1 信号转导中断^[17-18]. 肝内 TGF- β_1 的主要激活途径是通过 TGF- β_1 前体相关蛋白上的低聚糖残基与 IGF 受体 II / 6- 磷酸甘露糖 (IGF- II M6P) 受体结合, 酶裂解相关蛋白, 释放出活性 TGF- β 同源二聚体, 其中丝氨酸蛋白酶性纤溶酶可能起一定作用^[19-20].

随着分子生物学和肝细胞分离技术的进步, 证实肝纤维化可以逆转, 针对 ECM 的沉积增加、降解减少的因素, 制定出抑制 ECM 的生成, 加速其降解的有效治疗措施, 不仅可以逆转肝纤维化, 而且可以有有效的防治肝硬化的发生^[21-22]. 抑制肝纤维化刺激因子 TGF- β_1 治疗肝纤维化的工作已经开展, 已取得一定的进展^[23]. TGF- β_1 必须通过其特异的膜受体才能发挥生物学效应. 汪玲 *et al*^[24] 通过构建不含胞内激酶区、仅仅保留有胞外区和跨膜区的 TGF- β_1 II 型受体, 脂质体包裹腹腔注射导入动物活体内, 与内源性 TGF- β_1 II 型受体竞争结合配体. 外源受体由于缺乏胞内激酶区, 不能磷酸化, 信号不能下传, TGF- β_1 作用在受体水平被阻断. 结果显示在肝纤维化形成早期应用 TGF- β_1 II 型受体表达质粒进行治疗可以预防肝纤维化的形成. Yata *et al*^[25] 证实腹腔注射可溶的 TGF- β II 型受体 (STR), 剂量为 4.0, 1.0, 和 0.1 mg/kg 体重, 大鼠 I 型胶原 RNA (mRNA) 表达比 IgG 对照组减少 31%、49%、和 60%, TGF- β 受体可能成为治疗肝纤维化的有效手段. Arias *et al*^[26] 研究了编码 TGF- β_1 3' 序列的反义 mRNA 载体腺病毒在培养的 HSC 中能否抑制 TGF- β_1 的生成. 实验证实腺病毒载体转基因的高水平表达, 应用免疫沉淀、蛋白质印迹、TGF- β_1 定量 ELISA 法等证实反转录的基因具有生物活性, 并且应用细胞 ELISA、RNA 印迹等对 TGF- β_1 基因活性差异的检测验证了转基因的生物学功能. 作者同时研究了转基因对 TGF- β_2 、TGF- β_3 、转化生长因子联结蛋白 1、 α_1 (I) 型胶原、I 型、II 型 TGF- β 受体和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响. 结果显示反义 mRNA 可以阻断 TGF- β_1 在 HSC 自分泌的信号, 这也许是将来治疗肝纤维化的一个有效的治疗途径. 蒋炜 *et al*^[27-29] 运用重组 DNA 技术构建反义 TGF- β I 型受体 (T β R I) 真核细胞表达质粒, 观察到反义 T β R I 表达质粒对实验性肝纤维化有较好的改善作用. 而本实验在上述实验基础上, 将 TGF- β II 型受体细胞外结合区和人 IgG₁ Fc 段结合起来, 增加了 TGF- β II 型受体细胞外结合区的可溶性

和靶向性,可能会产生更加良好的治疗作用。

本实验所采用真核表达载体pLXSN为逆转录病毒载体^[30-32],来源于Moloney小鼠白血病病毒(MoMuLV),转染包装细胞后能够瞬时或稳定表达包装信号 Ψ 、插入的目的基因及标志基因Neo。由于逆转录病毒为切除了gag、pol、env基因的缺陷型病毒,不能包装子代病毒颗粒,必须借助包装细胞中缺乏 Ψ 序列的辅助病毒为其提供病毒结构蛋白。包装细胞是由各种不同的辅助病毒转染小鼠成纤维细胞系NIH3T3而建成,辅助病毒含有完整的gag、pol、env基因,可为逆转录病毒载体提供包装所需蛋白组份,但缺乏辅助病毒基因组包装成病毒颗粒的包装信号 Ψ 序列。将逆转录病毒载体导入包装细胞,二者相互补偿,就能够包装成具有感染性但无复制能力的子代病毒颗粒,以芽生的方式从包装细胞膜分泌至培养上清,即建立了产生重组逆转录病毒颗粒的细胞系。由于逆转录病毒包膜中含有env基因编码的一种糖蛋白,而许多哺乳动物细胞具有识别这种糖蛋白的受体,二者结合可介导逆转录病毒对靶细胞的有效感染,进而整合到宿主细胞染色体DNA中。

逆转录病毒载体具有将外源基因稳定整合进入靶细胞的基因组中及感染效率高的优点,而且能够实现目的基因的长期、高效、稳定表达,此外,逆转录病毒载体还有安全性确定、宿主细胞范围广、制备方便等优点,最适于体外间接基因治疗,在本实验中,我们将T β R II-IgG1 Fc基因亚克隆至逆转录病毒表达载体pLXSN,用脂质体转染法转染PA317包装细胞,G418筛选,扩大培养后测定细胞集落的病毒滴度并收集上清,为进一步研究肝纤维化的实验研究奠定了良好的实验基础。

4 参考文献

- Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Chignard N, Housset C, Poupon R, Rosmorduc O. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol* 2002;160:613-620
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- Vozenin-Brotans MC, Sivan V, Gault N, Renard C, Geffrotin C, Delanian S, Lefaix JL, Martin M. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001;30:30-42
- Branton MH, Kopp JB. TGF-beta1 and fibrosis. *Microbes Infect* 1999;1:1349-1365
- Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15231-15236
- Yu L, Border WA, Anderson I, McCourt M, Huang Y, Noble NA. Combining TGF-beta inhibition and angiotensin II blockade results in enhanced antifibrotic effect. *Kidney Int* 2004;66:1774-1784
- Suh N, Roberts AB, Birkey Reffey S, Miyazono K, Itoh S, ten Dijke P, Heiss EH, Place AE, Risingsong R, Williams CR, Honda T, Gribble GW, Sporn MB. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res* 2003;63:1371-1376
- Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGF beta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999;30:77-87
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1010-1021
- George J, Roulot D, Koteliensky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: Apotential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12719-12724
- Haviv YS, Takayama K, Nagi PA, Tousson A, Cook W, Wang M, Lam JT, Naito S, Lei X, Carey DE, Curiel DT. Modulation of renal glomerular disease using remote delivery of adenoviral-encoded soluble type II TGF-beta receptor fusion molecule. *J Gene Med* 2003;5:839-851
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol* 2000;6:824-828
- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- Shen F, Yin C, Jia J, Wang B. Receptors of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *Chin J Hepatol* 2002;10:479-480
- Cheng J, Zhou X, Gao Z, Huo Y, Xu Q, Li D. Influence of TGF-beta1 on expression of Smad7 mRNA and protein in rat liver cells. *Natl Med J China* 2002;82:111-113
- Gao R, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;40:431-438
- Zhou GD, Zhao JM, Wang SS, Sun YL, Meng EH, Zhang TH, Liu P. Clinical and pathological analysis on characteristics of primary biliary cirrhosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003;11:483-486
- Zeitlin L, Resnick MB, Konikoff F, Schuppan D, Bujanover Y, Lerner A, Belson A, Lifschitz B, Reif S. Divergent patterns of extracellular matrix protein expression in neonatal versus adult liver fibrosis. *Pediatr Pathol Mol Med* 2003;22:349-362
- Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003;37:1067-1078
- Meyer K, Ueberham E, Gebhardt R. Influence of organosulphur compounds from garlic on the secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 by cultured HUVEC cells. *Cell Biol Toxicol* 2004;20:253-260
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- Wang L, Hu GL, Tan DM. Effects of truncated type II receptor of TGF-beta1 expressing plasmid on rat liver fibrosis. *Chin J Infect Dis* 2002;20:168-171

- 25 Yata Y, Gotwals P, Koteliensky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-beta soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002; 35:1022-1030
- 26 Arias M, Lahme B, Van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ* 2002;13:265-273
- 27 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1634-1638
- 28 Jiang W, Wang JY, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM. Effects of antisense transforming growth factor beta receptor-II(TGFbetaRII)expressing plasmid on experimental liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:137-140
- 29 Liu WB, Yang CQ, Jiang W, Wang YQ, Guo JS, He BM, Wang JY. Inhibition on the production of collagen type I, III of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid. *World J Gastroenterol* 2003;9:316-319
- 30 Hoeben RC, Valerio D, van der Eb AJ, van Ormondt H. Gene therapy for human inherited disorders: techniques and status. *Crit Rev Oncol Hematol* 1992;13:33-54
- 31 Cornetta K. Regulatory issues in human gene therapy. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31:51-56
- 32 Armbruster V, Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmid A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantzsch N. Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol* 2004;78:10310-10319

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)