

研究简报

降钙素基因相关肽基因直接注射大鼠

孙立春 唐 炯 葛昕晖 黄 好 李光金 严维耀 汤 健¹⁾ 郑兆鑫

(复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

闵 阳 叶汉章

(上海医药工业研究院, 上海 200433)

摘要 所设计的基因表达一个含降钙素基因相关肽 (CGRP, 37 个氨基酸)、及其 N 端信号肽和 C 端酰胺化位点的多肽. 该基因克隆到哺乳动物表达载体 pBPV 上并构成 pBPV-CGRP. 将此质粒 DNA 直接注射自发高血压大鼠并导致其血压在注射样品后 3~22 d 内明显下降, 下降幅度超过了 12%, 在第 16 天甚至达到了 24.42%. 基因直接注射比 CGRP 本身的降压作用维持时间更久.

关键词 降钙素基因相关肽, 自发高血压大鼠, 基因治疗

学科分类号 Q789

DNA 疫苗的研究进展异常迅速, 该技术用于治疗流感病毒、HIV 引起的疾病已分别进入到 I、II 期临床阶段, 为 DNA 疫苗最终应用于人类带来了诱人的前景^[1,2]. 而降钙素基因相关肽 (CGRP) 是一种由 37 个氨基酸组成的活性小肽, 有舒张血管、降低血压等多种生理功能, 尤其在治疗心血管疾病等方面具有临床应用前景^[3~5]. 本文将化学合成的 CGRP 基因克隆到真核表达载体 pBPV 上, 用 pBPV-CGRP 质粒 DNA 直接注射自发高血压大鼠 (SHR), 发现产生了较长时间的降压作

用, 而且这种 DNA 直接注射引起的降压幅度最高达到了 20% 以上, 比 CGRP 蛋白本身的作用更有效更长久, 因而具有潜在的应用价值.

1 材料和方法

1.1 CGRP 基因的合成、连接及克隆

本试验中设计的表达蛋白由 65 个氨基酸组成, 除了 CGRP 本身为 37 个氨基酸外, N 端有一信号肽, 中间有一蛋白裂解点, C 端有一酰胺化位点 (图 1)^[6~8].

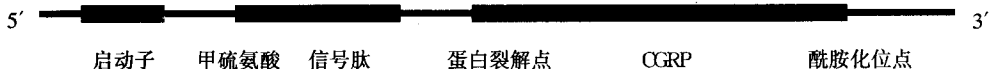


图 1 所设计的带 CGRP 基因的完整结构

该段基因全长 208 bp, 两端皆为双链粘性末端, 在基因 5' 端有一 *Xho* I 切点, 3' 端有一 *Not* I 切点, 共分 14 个片段合成. 多片段经 37℃ 磷酸化、90℃ 退火及 T4 DNA 连接酶连接后, 克隆到 pBluescript II KS+ 的 *Xho* I / *Not* I 位点并命名为 pBL-CGRP 质粒. 阳性转

化子经酶切和 PCR 扩增 (引物: 5' TCGA-GATGGGCTTCCAAAAGTTC3' 和 5' GGC-CGCTTATCAGCGGCGCCTGCC3', 为合成的

¹⁾北京医科大学, 北京 100083.

收稿日期: 1997-11-10, 修回日期: 1998-03-28

CGRP 基因 5' 端片段) 及 DNA 序列分析确定后, 再克隆到真核表达载体 pBPV 的 *Xho* I / *Not* I 位点. 转化子再经酶切及 PCR (引物同上) 鉴定为 pBPV-CGRP 后, 通过 CsCl 梯度离心大量提取 DNA, 用 DNA 直接注射自发高血压大鼠.

pBPV 质粒 (购自 Pharmacia 公司) 有一个 MSV 增强子, 一个鼠金属硫蛋白 I 启动子, 下游有来自于 SV40 的拼接点及 poly A 信号, 该质粒在宿主体内可复制但不发生整合.

1.2 DNA 直接注射自发高血压大鼠

自发高血压大鼠 (鼠龄约 4 个月、体重 200~250 g, 其血压为: 雄性 $2.53 \times 10^4 \sim 3.06 \times 10^4$ Pa, 雌性 $2.13 \times 10^4 \sim 2.53 \times 10^4$ Pa) 每组 6 只 (雌雄各 3 只). 实验前, 喂养一段时间 (约 20 d) 直至其血压稳定. DNA 用生理盐水溶解, 再用鱼肠线吸附, 利用缝线法将 DNA 缝入鼠腿部肌肉中, 残余的 DNA 溶液全部点注射到鼠的四肢及腹腔. DNA 用量为 500 μ g/只. DNA 注射后几天内, 每天测一次血压, 并逐步拉长血压测定的间隔时间. 实验终止后, 对大鼠进行解剖取材 (分别取心脏, 血液, 缝线处肌肉及腹肌), 以备后续其他检测、鉴定试验.

2 结果和讨论

2.1 CGRP 基因鉴定

将合成的 CGRP 基因克隆到 pBluescript II KS+ 的 *Xho* I / *Not* I 位点, 转化子用 *Xho* I / *Not* I 双酶切、PCR 扩增、再经序列分析, 证实片段大小及序列与所设计 CGRP 基因大小及序列完全一致 (图略).

2.2 pBPV-CGRP 的构建与鉴定

CGRP 基因从 pBL-CGRP 上经 *Xho* I / *Not* I 酶切下来, 再克隆到 pBPV 的 *Xho* I / *Not* I 位点 (图 2). 转化子经 *Xho* I / *Not* I 双酶切及 PCR 鉴定, 确证 CGRP 基因已克隆到载体上 (图略).

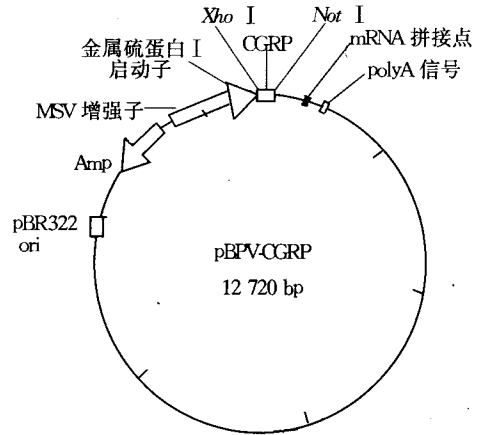


图 2 pBPV-CGRP 质粒结构

2.3 pBPV-CGRP 质粒 DNA 的降压作用

在注射样品后的第一天, 我们就开始测定鼠血压变化情况, 发现鼠血压在第二天开始下降, 下降幅度达到 8.62%, 相对于对照组为 6.3%; 尤其在第 3~22 d 之间, 下降幅度更明显, 相对于对照组而言, 其下降幅度均在 12% 以上, 在第 16 天时, 更是达到最高点 (24.42%); 虽然在第 22 天之后, 血压开始回升, 但是下降幅度最低仍为 5.56%, 相对于对照组, 其下降幅度仍接近 5%. 到第 38 天 (此时为便于解剖 SHR 以进行器官组织取材), 我们终止了实验. 而对照组的血压相对稳定 (其血压变化幅度在 $\pm 4\%$ 以内) (图 3). CGRP 蛋白本身降压作用虽很明显, 但作用时间很短, 易被降解. 而 CGRP DNA 能维持长时间的降压作用, 这除了与注射的 DNA 剂量有关外, 主要与 pBPV 质粒的性质有关. pBPV 含有牛乳头瘤病毒完整的基因组, 因而能自我复制, 保持 CGRP 的稳定表达, 同时, 外源基因又不整合到宿主染色体上, 因此, CGRP DNA 的降压作用对治疗心血管等疾病有临床应用价值, 尤其这类病人在中国很多, 加上 DNA 疫苗技术取得了较大进展^[1,2], 本实验显得更有现实意义. 另外, 为什么大幅度降压不能持续更长时间? 是否是因为 pBPV 质

粒太大 (约 12 kb), 因而 DNA 易断裂为线性而超螺旋成分少, 使之不易进入到细胞内, 也更易降解。基于此, 我们正着手用不同剂量

DNA 及其他小质粒载体进行 SHR 实验, 以对降压作用的持续时间和下降幅度等方面作进一步探讨。

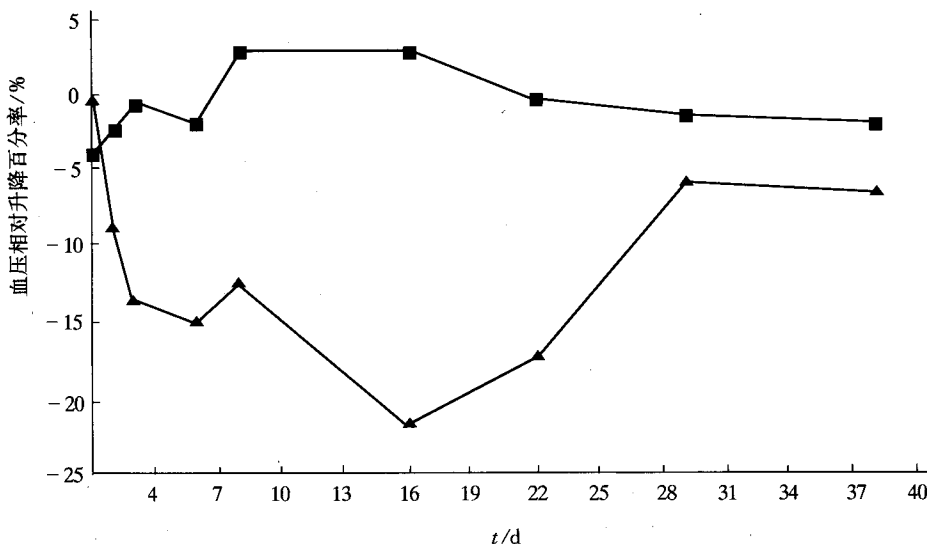


图3 pBPV-CGRP DNA 对 SHR 的降压作用

(Y 轴百分率指鼠血压在注射样品后相对于注射样品前的上升或下降百分率), ▲—▲: 样品; ■—■: 对照。

同时, 我们正在对所取组织材料进行实验后的各种检测、鉴定试验 (包括 PCR、RT-PCR 及免疫组织化学检测)。

参 考 文 献

- 1 Fazio V M. "Naked" DNA transfer technology for genetic vaccination against infectious disease. *Res Virol*, 1997, **148** (2): 101~108
- 2 Smith H A, Goldenthal K L, Vogel F R, *et al.* Workshop on the control and stanardization of nucleic acid vaccines. *Vaccine*, 1997, **15** (8): 931~933
- 3 吴祥声 (Wu X S). 降钙素基因相关肽. 国外医学临床生物化学与检验学分册 (Foreign Medical Science—Clinical Biochemistry and Inspection), 1994, **15** (5): 200~202
- 4 殷基崇, 金建平, 郑兆鑫等 (Yin J C, Jin J P, Zheng Z X, *et al.*). 化学合成的 α -降钙素基因相关肽基因在大肠杆菌和哺乳动物细胞中的表达. 生物化学与生物物理学报 (*Acta Biochemistry & Biochemistry Sinica*), 1993, **25** (6): 561~569
- 5 Amara S G, Jonas V, Rosenfeld M G, *et al.* Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 1982, **298** (5871): 240~244
- 6 Steenbergh P H, Hoppener J W M, Zandberg J, *et al.* Structure and expression of human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Letter*, 1986, **209** (1): 97~103

- 7 Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, *et al.* Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem. Biophys Res Com*, 1993, **194** (2): 720~725
- 8 Steenbergh P H, Hoppener J W M, Zandberg J, *et al.* A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Letter*, 1985, **183** (2): 403~407

Direct Injection of Calcitonin Gene-Related Peptide Gene in Rats. SUN Li-Chun, TANG Jiong, GE Xi-Hui, HUANG Yu, LI Guang-Jin, YAN Wei-Yao, MIN Yang¹⁾, YE Han-Zhang¹⁾, TANG Jian²⁾, ZHENG Zhao-Xin (National Key Labroatory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China; ¹⁾Shanghai Medical & Industrial Institute, Shanghai 200433, China; ²⁾Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The whole designed gene expressing a peptide consisting of calcitonin gene-related peptide (CGRP) (37aa) itself, a signal peptide at its N terminus and an amidated site at its C ter-

minus is cloned into mammalian expression vector pBPV. The pBPV-CGRP plasmid DNA is directly injected into the spontaneous hypertension rats (SHR) and results in the significant decrease of SHR's blood pressure during 3~22 days after injection. The percent of decrease

reaches more than 12%, even up to the top 24.42% on the 16th day. The effect can last for longer time and also be better than that of CGRP protein.

Key words calcitonin gene-related peptide, spontaneous hypertension rat, gene therapy

创伤渗出液对创伤成纤维细胞增殖的影响

陈荣德 张 艳 朱旭东

(第三军医大学外科研究所, 重庆 400042)

摘要 创伤后不同时期渗出液 (wound fluid, WF) 的质和量的变化, 在很大程度上反映伤口组织的愈合进程. 研究伤口不同天数的 WF 对小鼠伤口组织的成纤维细胞 (mouse wound fibroblast, mWf) 体外增殖能力的影响, 探讨伤口微环境 WF 在调控 mWf 的增殖规律. 用两种培养基进行检测: 1640 培养基-10% FCS (fetal calf serum 胎牛血清)-10% WF 或 1640-1% FCS-10% WF. 发现第 1、3、7 天的 WF 能刺激 mWf 增殖. 在高浓度 (10%) FCS 条件下, 9、11、15 天 WF 对 mWf 生长产生抑制作用. 而同一 WF 在低浓度 (1%) FCS 时导致 mWf 死亡. 结果提示, 在损伤后一周期间伤口微环境能刺激 mWf 增殖, 但伤后更长时间的 WF 使细胞生长受阻. 在创伤愈合晚期的微环境中可能存在一些生长抑制因子.

关键词 细胞增殖, 成纤维细胞, 创伤渗出液, 创伤愈合

学科分类号 Q641

随着创伤愈合进程的发展, 伤口微环境中各类细胞生长调控因子伴随质和量的动态变化, 从而对修复生长产生不同的作用, 伤口渗出液 (wound fluid) 综合反映伤口中各类细胞活动, 它基本上反映了伤口愈合进程的微环境. 本文通过检测伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞生长的影响, 探讨伤口微环境各类细胞因子在调控修复细胞生长的变化规律, 提供临床用各类细胞生长因子治疗局部伤口的参考依据.

1 材料与方法

1.1 致伤动物与采集伤口渗出液

随机选取健康昆明小鼠 30 只, 雌雄各半, 体重 20~25 g, 分为 6 组. 麻醉、脱毛, 在无菌条件下, 于背部中央沿脊椎垂直方向切一深

达筋膜约 0.5~1 cm 的伤口, 钝性剥离创面上、下两侧的皮肤, 造成皮下囊袋, 放入两块已消毒的聚乙烯醇海绵 (四川维尼龙厂中心实验室特制), 缝合伤口, 伤后第 1、3、7、9、11、15 天后活杀小鼠, 取出海绵, 离心收集伤口渗出液, 过滤除菌, -20℃ 保存.

1.2 伤口成纤维细胞的培养

按本实验室建立的方法培养伤口修复细胞^[1], 约培养 7~9 d, 伤口成纤维细胞可生长融合成片.

成纤维细胞传代及分组. 生长融合成片的细胞, 经 0.25% 胰酶消化 30 s, 倾去消化液. 用 1640-1% FCS 将细胞调制成 1×10^4 个/ml 细胞悬液, 接种 100 μ l 细胞悬液到 96 孔培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 条件下孵育 12 h, 吸去