

自我失活型逆转录病毒载体在衰老基因 转录调控中的应用*

汪 维 吴军峰 张宗玉 童坦君**

(北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 以自我失活型逆转录病毒载体 pSIR 为基础, 构建了含有增强型绿色荧光蛋白报告基因的载体 pSIR-EGFP 和含有 870bp p16 启动子载体 pSIR-EGFP-870. 将两种病毒载体转染至包装细胞包装成病毒颗粒. 病毒感染 2BS 靶细胞, 病毒 5' LTR 在逆转录过程中自我灭活. 通过该系统观察到 p16 启动子在 2BS 细胞衰老过程中, 转录活性明显增强. 结果表明, 自我失活型逆转录病毒载体能很好地用于衰老基因转录调控的研究.

关键词 自我失活, 逆转录病毒, 衰老, 基因转录调控

学科分类号 Q753, Q343

近年来, 随着人们对衰老问题的研究不断深入, 越来越多的衰老相关基因相继被克隆和分离^[1]. 对于一些重要的衰老相关基因, 特别是与细胞生长和细胞周期调控密切相关的基因转录调控的研究, 有助于深入理解衰老的分子机理. 体外培养的人成纤维细胞是研究人体细胞衰老的重要模型^[2]. 人成纤维细胞特别是衰老的成纤维细胞转染效率低下, 是研究细胞衰老过程中基因转录调控的一大难题. 因此, 目前有关衰老基因转录调控的文章罕见报道. 本文以体外培养的人二倍体成纤维细胞为研究对象, 以增强型绿色荧光蛋白为报告基因, 探讨和评价了自我失活型逆转录病毒载体在衰老基因转录调控研究中的应用.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: 2BS 细胞, 人胚肺二倍体成纤维细胞, 购自卫生部北京生物制品研究所; PT-67 细胞, 为 3T3 细胞来源的逆转录病毒包装细胞, Clontech 公司产品; NIH3T3 细胞, 本实验室冻存.

1.1.2 载体: pSIR (自我失活型逆转录病毒载体) 和 pEGFP-1 (增强型绿色荧光蛋白基因载体), Clontech 公司产品; p16 promoter-Luc, 包含 p16^{INK4A} 基因 ATG 上游 3 017 bp 启动子载体, 由英国皇家癌症研究基金实验室惠赠; pBluescript II SK (+/-), Stratagene 公司产品; pcDNA3.1 (+), Invitrogene 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组逆转录病毒载体的克隆: 以 *Afl* II 酶切 pEGFP-1, 补平后再以 *Sal* I 酶切, 电泳分离 1.0 kb 含 EGFP-SV40polyA 片段. 将该片段亚克隆到 pBluescript II 之 *Eco* R V 和 *Sal* I 位点. 以 *Eco* R I 和 *Bam* HI 酶切, 并回收 EGFP-SV40polyA 片段部分. 将其插入到 pSIR *Eco* R I 和 *Bam* HI 位点, 得到含 EGFP-SV40polyA 的逆转录病毒载体, 命名为 pSIR-EGFP. 以 *Eco* R I 和 *Hind* III 酶切 p16 promoter-Luc, 分离 ATG 上游 870 bp p16 启动子片段. 亚克隆到 pcDNA3.1 *Eco* R I 和 *Hind* III 位点. 以 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切, 回收 0.9 kb 之 p16 启动子, 插入到 pSIR-EGFP 载体 EGFP 上游 *Xho* I 和 *Hind* III 位点, 命名为 pSIR-EGFP-870 (图 1).

1.2.2 用脂质体介导重组逆转录病毒载体转染 PT-67 细胞包装产生逆转录病毒: 待转染的 PT-67 细胞培养至占培养皿表面积 60% 时, 参照 lipofectin 说明书, 使用 lipofectin 介导将重组逆转录病毒载体转染至包装细胞. 培养 48 h 后加入 500 mg/L 的 G418 进行筛选. 至细胞长成克隆后, 于荧光显微镜下观察荧光. 所有成活的细胞均可检测到绿色荧光时, 去除 G418 并将细胞扩大培养. 获得稳定产毒细胞系.

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000517001); 国家自然科学基金资助重点项目 (39930170).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62091454, E-mail: biochem@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 2001-04-12, 接受日期: 2001-05-17

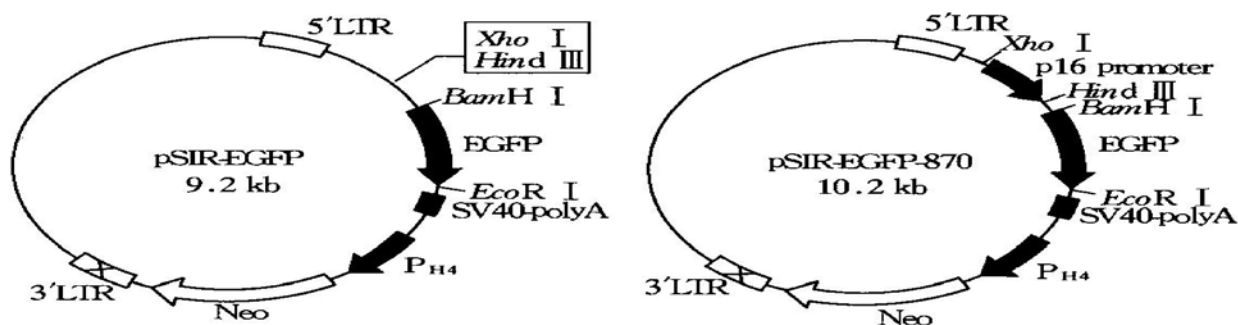


Fig. 1 Physical map of pSIR-EGFP and pSIR-EGFP-870

将产毒细胞系培养至占培养皿表面积 90% 时, 按照 1:4 稀释传代. 细胞贴壁后换成 1 ml 的含 4 μ g/L 的 polybrene 的培养基继续培养 24 h. 收集含病毒的培养基上清. 用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存病毒.

1.2.3 逆转录病毒滴度的测定: 将 NIH3T3 细胞按 1×10^4 的密度接种于 6 孔板中. 培养 24 h 后, 取病毒液, 分别用含 4 μ g/L 的 polybrene 的培养液, 按照 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍稀释病毒液至终体积 0.5 ml. 将病毒液加入到培养皿感染 24 h, 更换完全培养基继续培养 48 h 后, 加入 500 mg/L 的 G418 进行筛选. 约 10 d 左右, 细胞形成明显克隆. 计算克隆形成数, 并按照下列公式计算病毒滴度.

病毒滴度 (cfu/ml) = 最大稀释病毒液感染形成的克隆数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 2

1.2.4 用逆转录病毒感染靶细胞并检测绿色荧光蛋白的表达强度: 将待感染的年轻 2BS 细胞按照 10^5 密度接种于 25 cm^2 塑料培养瓶中. 细胞培养至占细胞瓶表面积 40% 时, 加入约 10^5 cfu 的病毒感染 24 h. 取同样量的病毒再连续感染 2 次. 培养 48 h 后, 加入 200 mg/L 的 G418 进行筛选. 约两周左右, 细胞形成克隆. 混合克隆培养并以 50 mg/L 的 G418 维持培养至细胞衰老.

待检测的细胞生长至占细胞瓶表面积 90% 时, 收集细胞. 用 PBS 调整细胞密度至 10^5 /ml. 于激发波长 480 nm, 发射波长 508 nm 下检测荧光强度^[3].

2 结 果

2.1 克隆载体的鉴定

将 pSIR-EGFP 用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切后得到 8.1 kb 和 1.1 kb 两个片段. 以 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切 pSIR-EGFP-870, 得到 0.9 kb 和 9.2 kb 两片

段. 与预期结果一致 (图 2).

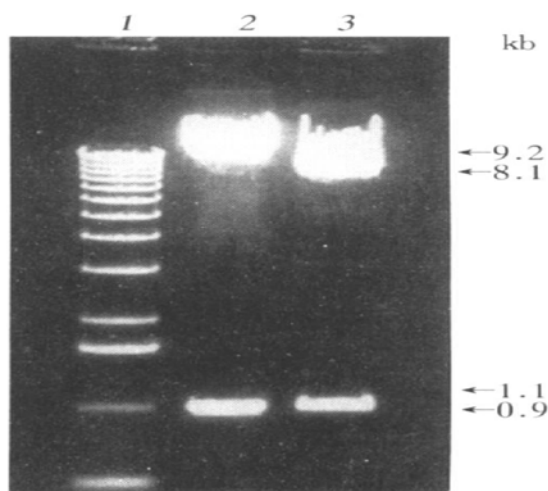


Fig. 2 Identification of pSIR-EGFP and pSIR-EGFP-870

1: 1 kb DNA ladder; 2: Digested by *Hind* III and *Xho* I pSIR-EGFP-870 was cut to 9.2 kb and 0.9 kb fragments; 3: Digested by *Bam* H I and *Eco* R I pSIR-EGFP was cut to 8.1 kb and 1.1 kb fragments.

2.2 稳定产毒细胞系的获得

Lipofectin 介导的 DNA 转染成功的 PT-67 细胞, 经 G418 筛选培养约两周后, 将细胞置于荧光显微镜下观察, 各种细胞均全部能检测出荧光. 将逆转录病毒上清液按照不同的倍数, 进行稀释后感染 NIH3T3 靶细胞, 经 G418 筛选培养约 10 d, 细胞形成明显的克隆. 根据细胞的克隆数计算得出病毒滴度 (表 1).

Table 1 The titer of two viruses

Virus	Titer/cfu $\cdot$ ml $^{-1}$
pSIR-EGFP	1.4×10^5
pSIR-EGFP-870	1.8×10^5

2.3 细胞荧光强度的检测

以未经病毒感染的正常 2BS 细胞作为阴性对

照, 用荧光分光光度计在 480 nm 激发波长, 508 nm 发射波长下为分别检测两种包装细胞: PT-67 (pSIR-EGFP) 和 PT-67 (pSIR-EGFP-870); 两种逆转录病毒感染的年轻 2BS 细胞 (24 代): 2BS-y (pSIR-EGFP) 和 2BS-y (pSIR-EGFP-870) 及培养至衰老的两种感染细胞 2BS-o (pSIR-EGFP) 和 2BS-o (pSIR-EGFP-870) (图 3). 两种病毒载体转染的包装细胞均可以检测到很强的绿色荧光, 以 PT-67 (pSIR-EGFP) 荧光为最强. 用经包装细胞包装后产生的病毒感染 2BS 细胞, pSIR-EGFP 逆转录病毒感染的年轻 2BS 细胞及培养至衰老 2BS 细胞与未经病毒感染的阴性对照 2BS 细胞荧光强度无差别 ($P < 0.01$). pSIR-EGFP-870 逆转录病毒感染的年轻 2BS 细胞, 可以检测到较弱的荧光强度, 当感染细胞培养至衰老, 荧光强度明显增强, 增加约 6 倍.

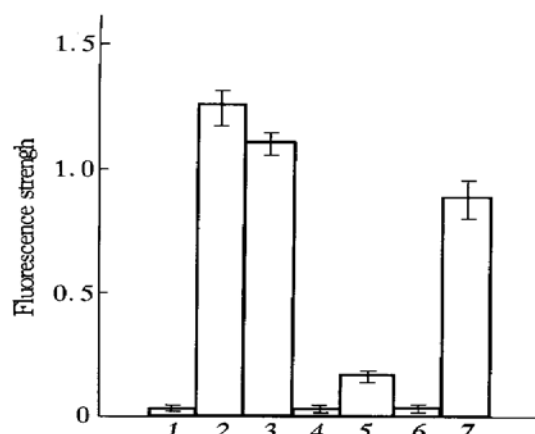


Fig. 3 Fluorescence strength (FS) of different cells

1: Negative control; 2: PT-67 (pSIR-EGFP); 3: PT-67 (pSIR-EGFP-870); 4: 2BS-y (pSIR-EGFP); 5: 2BS-y (pSIR-EGFP-870); 6: 2BS-o (pSIR-EGFP); 7: 2BS-o (pSIR-EGFP-870).

3 讨 论

目前, 对于基因转录调控的研究多采用瞬时转染及检测报告基因的表达情况分析启动子活性. 然而, 一些物理的基因转染方法用于人成纤维细胞特别是衰老的成纤维细胞时, 转染效率很低. 所以采用瞬时转染的方法研究衰老基因转录调控敏感性低, 重复性差. 对于一些衰老晚期表达发生变化的基因, 转录调控的研究则困难更大. 理想的解决办法可以通过提高转染效率, 或在较低代龄时将启动子和报告基因导入细胞, 并使之整合至细胞基因组中稳定表达来分析细胞衰老进程中所研究的启动子活性的变化.

逆转录病毒是目前应用最广泛的高效的转基因

载体之一^[4], 利用逆转录病毒将外源基因导入靶细胞具有很多优点. 逆转录病毒对于多种类型的靶细胞都具有极高的感染效率. 在逆转录酶的帮助下, 病毒所携带的外源治疗基因能高效地整合到宿主基因组中稳定表达, 并随宿主细胞 DNA 的复制而传给子代细胞. 然而, 由于病毒载体上 5' 和 3' 长末端重复序列 (LTR) 具有很强的启动子活性, 如果直接将逆转录病毒载体用于基因转录调控的研究, 病毒的 LTR 也会启动报告基因的转录而影响启动子活性的分析. 必须对病毒载体进行适当的改造. 本实验中使用的逆转录病毒载体 pSIR 的 3' LTR, 由于缺失了一段 176 bp 部分而丧失了启动子活性, 但 5' LTR 仍然保留了完整的启动子活性. 由于逆转录病毒是一种小 RNA 病毒, 在其感染宿主细胞时, 在逆转录酶的作用下逆转录成双链 DNA. 此时, 突变的 3' LTR 被复制并取代 5' LTR, 使之丧失启动子活性, 所以将这类病毒载体称为自我失活型逆转录病毒载体^[5].

绿色荧光蛋白基因是目前发现的唯一能在细胞内表达, 且不需要其他外源性底物参与的报告基因^[6]. 本室曾以 GFP 为报告基因, 研究了细胞凋亡过程中, p21^{WAF1} 启动子转录活性的变化^[7]. 本研究采用的是增强型绿色荧光蛋白作为报告基因, 它较野生型 GFP 在哺乳动物细胞内表达更强、荧光更亮. 实验中虽然 pSIR-EGFP 载体没有外源的启动子, 但 EGFP 仍然可在 5' LTR 的启动下表达, 所以在包装细胞 PT-67 (pSIR-EGFP) 能检测到很强的荧光强度. 然而, 从包装细胞包装产生的 pSIR-EGFP 病毒在感染靶细胞时, 5' LTR 丧失启动子活性. 该病毒感染的年轻及衰老 2BS 细胞, 既没有外源性的启动子, 也没有具有启动子活性的 5' LTR, 所以 EGFP 不能表达. p16^{INK4A} 是一种重要的衰老相关基因, 在年轻 2BS 细胞中 p16 的含量很低, 到细胞衰老阶段 p16 的转录活性显著升高^[8]. 本实验中构建了含有 870 bp p16 启动子的逆转录病毒载体 pSIR-EGFP-870, 经包装产生病毒后感染年轻 2BS 细胞, 并将感染成功细胞培养至衰老. 结果发现年轻 2BS 细胞中, EGFP 在 p16 启动子启动下表达较弱. 当感染细胞培养至衰老, EGFP 的表达明显增强. 这一结果不仅说明了 p16 启动子和 EGFP 被稳定地整合到成纤维细胞基因组, 并随细胞 DNA 复制而传给子代细胞, 而且有力地证明了自我失活型逆转录病毒载体能很好地用于衰老基因转录调控的研究.

总之, 将自我失活型逆转录病毒载体用于衰老基因转录调控的研究不失为一种简单、高效的方法.

参 考 文 献

- 1 郭淑贞, 童坦君, 张宗玉. 细胞衰老相关基因的探索. 生物化学与生物物理学进展, 2001, **28** (4): 467~ 469
Guo S Z, Tong T J, Zhang Z Y. Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (4): 467~ 469
- 2 童坦君, 张宗玉主编. 医学老年学——衰老与长寿. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 99~ 128
Tong T J, Zhang Z Y. Medical Gerontology—Senescence and Longevity. Beijing: People's Medical Public House, 1995: 99~ 128
- 3 Hellweg C E, Baumstark-Khan C, Rettberg P, *et al.* Suitability of enhanced green fluorescent protein as a reporter component for bioassays. Analytica Chimica Acta, 2001, **426** (1): 175~ 184
- 4 Wu N, Atai M M. Production of viral vectors for gene therapy applications. Curr Opin Biotechnol, 2000, **11** (2): 205~ 208
- 5 Schnell T, Foley P, Wirth M, *et al.* Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. Hum Gene Ther, 2000, **11** (3): 439~ 447
- 6 张晓伟, 童坦君. 绿色荧光蛋白 cDNA 在腺病毒重组载体转染中的应用. 生物化学与生物物理学进展, 1998, **25** (3): 266~ 268
Zhang X W, Tong T J. Prog Biochem Biophys, 1998, **25** (3): 266~ 268
- 7 黄 英, 张宗玉, 童坦君. p21WAF1 在丁酸钠诱导的人成纤维细胞凋亡中的表现. 生物化学与生物物理学进展, 2000, **27** (2): 182~ 185
Huang Y, Zhang Z Y, Tong T J. Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (2): 182~ 185
- 8 Zhang Z Y, Liu P H, Duan J M, *et al.* Involvement of p16^{INK4A} in replicative senescence of human fibroblast which senescence delay can be induced by anti-sense p16^{INK4A} expression. FASEB J, 2000, **14** (8): A1544

Application of Self-inactivating Retrovirus Vector in Studying Gene Transcription Regulation During The Aging Process^{*}

WANG Wei, WU Jun-Feng, ZHANG Zong-Yu, TONG Tai-Jun^{**}

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract Two retrovirus vectors: pSIR-EGFP containing enhance green fluorescence protein (EGFP) reporter gene and pSIR-EGFP-870 with 870 bp p16 promoter were constructed on the base of self-inactivating retrovirus vector pSIR. Then retrovirus vectors were transduced into package cells for virus production and 2BS cells were infected with virus. During the course of reverse transcription, the 5' LTR lost its promoter activity. The transcriptional activity of p16 promoter in 2BS cells obviously increased during the aging process. The results demonstrate that self-inactivating retrovirus vector can be used for gene transcription regulation research during the aging process.

Key words self-inactivating, retrovirus, aging, gene transcription regulation

^{*} This work was supported by grants from special funds for Major State Basic Research Program of China (G2000057001) and the National Natural Science Foundation of China (39930170).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62091454, E-mail: biochem@mail.bjmu.edu.cn

Received: April 12, 2001 Accepted: May 17, 2001