

腺病毒载体介导 *PDX-1* 在骨髓间充质干细胞中的表达*

李艳华 张 锐 王韞芳 赵连旭 陈 琳 岳 文 裴雪涛**

(军事医学科学院输血研究所, 干细胞生物研究室, 北京 100850)

摘要 为研究 *PDX-1* 基因在骨髓间充质干细胞中的表达情况及生物学功能的发挥, 构建了含 *PDX-1* 基因的重组腺病毒载体. 酶切 *PDX-1* 基因并连入穿梭质粒 pAdTrack-CMV. 用电穿孔法使穿梭质粒 pAdTrack-CMV-*PDX-1* 与病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中同源重组. 利用脂质体介导重组腺病毒载体转染 293 细胞, 包装出完整的腺病毒. 分离、培养、扩增骨髓间充质干细胞. 用重组腺病毒感染间充质干细胞. 用荧光显微镜、RT-PCR、免疫荧光染色等方法检测 *PDX-1*、胰岛素基因及蛋白质的表达, 用放射免疫分析法检测转基因细胞分泌胰岛素情况. 结果表明: 通过测序、PCR、酶切等鉴定 *PDX-1* 基因已正确插入穿梭质粒中, 并与病毒骨架质粒重组. 重组腺病毒滴度为 6.3×10^7 PFU/ml. 通过荧光显微镜观察证实重组腺病毒可高效感染骨髓间充质干细胞, 经 RT-PCR、免疫荧光染色证实转染 pAd-*PDX-1* 后培养 7 天的细胞中有 *PDX-1* 及胰岛素基因的表达. 这些转基因的细胞向胞外分泌的胰岛素量为 (15.21 ± 3.50) mIU/L.

关键词 *PDX-1*, 腺病毒载体, 间充质干细胞

学科分类号 Q81

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有极强的自我更新能力及多向分化潜能, 是修复骨、软骨等组织或细胞损伤的首选种子细胞, 也是基因治疗的理想靶细胞.

对 MSCs 进行适当的基因修饰, 使之分化为能分泌胰岛素的细胞, 是治疗 I 型糖尿病的一个策略. 用胰腺十二指肠同源框蛋白-1 (pancreatic duodenal homeobox-1, *PDX-1*) 修饰 MSCs, 有可能获得能分泌胰岛素的细胞. *PDX-1* 基因在胰腺生长发育过程中扮演了很重要的角色, 它不但可以调控胰岛素的表达, 还可以调控葡萄糖转运子 (glucose transporter 2, *GLUT2*)、葡萄糖激酶 (glucokinase, *GK*) 等基因的表达^[1].

由于干细胞是相对静止的一群细胞, 利用脂质体转染效率很低, 选用病毒载体则可获得较高的转染效率. 腺病毒载体不整合到染色体中, 携带的外源基因表达水平高, 表达时间短, 是转染 *PDX-1* 最合适的载体. 因为 *PDX-1* 是一个调控基因, 它可以启动自身基因及下游基因的表达^[2], 瞬时表达就足以发挥功能. 为此, 我们构建了腺病毒载体 pAd-*PDX-1*, 并观察了其在 MSCs 中的表达.

1 材料与方法

1.1 材料

携带 *PDX-1* 基因的质粒由美国 Hui HongXiang

博士馈赠. 腺病毒载体系统质粒 pAdTrack-CMV、pAdEasy-1 及大肠杆菌 BJ5183 由本室保存. HEK293 细胞由 302 医院王刚馈赠. RT-PCR 试剂盒、各种限制性内切酶、连接酶购自宝生物公司和 BioLab 公司. 小量质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司. 转染试剂 Lipofectamine 购自 Gibco 公司. *PDX-1* 多克隆抗体及胰岛素单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司. 胰岛素放免试剂盒购自海军放免技术中心.

1.2 方法

1.2.1 *PDX-1* 与穿梭质粒的连接: *PDX-1* 是通过 *Sma* I 位点插入 pBluscript II KS 载体中的. 在 *Sma* I 位点两端选择 *Bam*H I、*Xho* I 酶切. *Bgl* II、*Bam*H I 是同尾酶, 故选择 *Bgl* II、*Xho* I 酶切穿梭质粒 pAdTrack-CMV. 将酶切产物电泳回收, 16℃ 连接过夜. 连接产物转化大肠杆菌 DH5α. 提取质粒, 用 *Bgl* II、*Xho* I 酶切鉴定. *Bgl* III 不能切开同尾酶连接处, 但可以切断 *PDX-1*.

1.2.2 病毒质粒的细菌内同源重组: 选用 *Pme* I 酶切 1 μg 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-*PDX-1* 线性化

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA205051, 2003AA205160) 和国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2001CB509906).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932203, Fax: 010-68164807

E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-12-01, 接受日期: 2003-12-24

的穿梭质粒与 100 ng 超螺旋质粒 pAdEasy-1 电穿孔共转化至 BJ5183 感受态菌中, 菌液涂卡那霉素抗性平板筛选. 选择 20 个小克隆, 37℃ 摇菌过夜. 提取质粒, 重组质粒均大于 40 kb, 所以经 0.7% 琼脂糖电泳可初步鉴定. 根据电泳结果, 选取质粒作 *Pac* I 酶切鉴定.

1.2.3 重组腺病毒 pAd-PDX-1 的包装及扩增: 取鉴定好的重组病毒质粒 5 μ g 进行 *Pac*I 限制性酶切. 用 Lipofectamine 2000 包裹线性化质粒转染 293 细胞 (1×10^6), 转染 12 h 后去掉转染液, 加含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 7~10 天, 当细胞出现病变效应 (CPE) 时, 收集细胞, -70℃ 和 37℃ 反复冻融三次, 离心取上清. 用病毒上清再次感染 293 细胞, 收集上清. 用 TCID50 法测定病毒滴度 (参考 AdEasy Vector System 操作方法).

1.2.4 骨髓间充质干细胞的分离纯化扩增: 无菌条件下, 从健康志愿者髂前上棘抽取 5 ml 骨髓. 向骨髓悬液中加入含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液充分混合, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清. 再加入 5 ml 完全培养液混匀后轻轻叠加到密度为 1.073 的 percoll 分离液上, 1 500 r/min 离心 20 min, 取白细胞膜层以上的部分, 加入完全培养液洗 2 遍. 按 1×10^6 /ml 密度接种于完全培养基中, 置 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养. 培养 72 h 后更换培养液, 以后每 4 天换液一次. 细胞达 80% 融合后用 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 传代继续扩增培养.

1.2.5 重组腺病毒 pAd-PDX-1 感染 MSCs: 用不同量的病毒液 2、5、10、25、50 μ l 和空白对照感染 MSCs (第 3~5 代, 1×10^4), 培养 48 h, 观察绿色荧光蛋白 (GFP) 阳性细胞的比率. 选择病毒感染 MSCs 合适的感染复数 (MOI), 根据细胞数, 计算所需病毒量感染 MSCs, 孵育 2 h 后, 补加含有 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液, 继续培养 1 周. 对照为不转染病毒上清, 培养条件相同的细胞.

1.2.6 RT-PCR 检测基因的表达: 用 Trizol 试剂提取未转基因及转染 *PDX-1* 基因一周的 MSCs 总 RNA. 各取 2 μ g RNA, 按 RNA PCR 试剂盒说明合成 cDNA, PCR 鉴定 *PDX-1* 和胰岛素基因的表达. 引物由上海博亚公司合成, 序列如下: *PDX-1* (5' cccatggatgaagtctacc 3', 5' gtcctcctcctttttccac 3'; 52℃, 262 bp), 胰岛素 (5' acccagcgcgcagcctttgtg 3', 5' ttccacaatgccacgttctge 3'; 56℃, 223 bp).

1.2.7 免疫荧光染色鉴定蛋白质的表达: 将未转基因及转染 *PDX-1* 基因一周的 MSCs 制成细胞爬片, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min. 0.3% Triton X-100 孵育 10 min, PBS 缓冲液洗 3 遍, 山羊血清工作液孵育 10 min, 弃血清, 加入一抗 (山羊抗 *PDX-1* 抗体和兔抗胰岛素抗体), 4℃ 过夜, 再与 TRITC 标记二抗 (兔抗羊或羊抗兔 IgG) 孵育 30 min.

1.2.8 放射免疫分析法检测胰岛素水平: 去除 MSCs 及转染 *PDX-1* 基因一周细胞 (各 1×10^5) 的培养液, 用 KRBB 缓冲液洗 2 遍, 加入 1 ml KRBB 缓冲液, 置 37℃ 孵箱中预孵育 1 h. 弃掉旧缓冲液, 再加入 1 ml 含 5.6 mmol/L 葡萄糖的 KRBB 缓冲液, 孵育 1 h. 取上清, 用放射免疫分析法检测各上清中的胰岛素含量.

2 结 果

2.1 pAdTrack-PDX-1 穿梭质粒的构建及鉴定

插入 pBluescript II KS 载体中的目的基因经测序证实为人 *PDX-1* 全长 cDNA (942 bp). *PDX-1* 与 pAdTrack-CMV (9.22 kb) 的连接产物经 PCR 鉴定后, 提取 PCR 鉴定为阳性的菌液质粒, 行双酶切鉴定, 切出了 400 bp 的小片段及 9.7 kb 的大片段 (图 1).

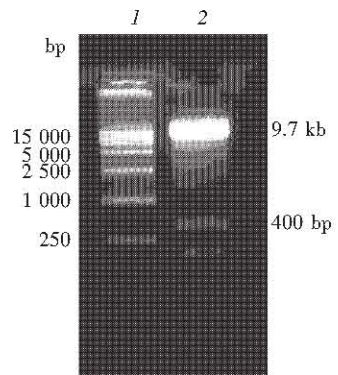


Fig. 1 Identification of pAdtrack-cmv-PDX-1 by digestion with *Bgl* II and *Xho* I

1: Marker; 2: The digested fragments.

2.2 重组腺病毒载体的构建及鉴定

穿梭质粒 pAdTrack-CMV-*PDX-1* 与病毒骨架质粒 pAdEasy-1 (33kb) 在细菌内发生了同源重组. 重组质粒大于 40 kb, 可被 *Pac* I 酶切出 4.5 kb 的小片段及 38.6 kb 的大片段 (图 2).

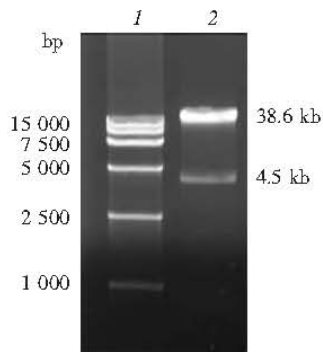


Fig. 2 Identification of recombinant adenoviruses by digestion
1: Marker; 2: The digested fragments.

2.3 重组腺病毒载体的包装、扩增及滴度测定
重组腺病毒载体在 293 细胞中包装并经过 3 次

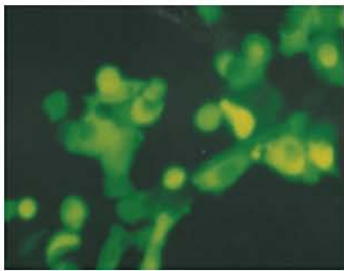


Fig. 3 The expression of GFP in 293 cells (×165)

扩增，荧光显微镜下可见 GFP 蛋白表达（图 3）。用 TCID₅₀ 法测定其滴度为 6.3×10^7 PFU/ml。

2.4 RT-PCR 检测结果

转染 pAdv-*PDX-1* 一周的细胞中可以检测到 *PDX-1*、胰岛素基因的表达，未转染的细胞无这二基因的表达（图 4a, b）。

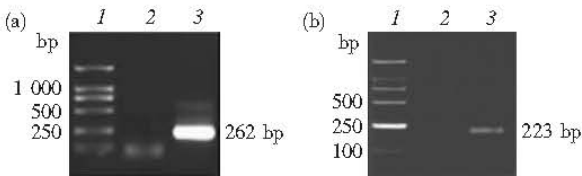


Fig. 4 The expression of *PDX-1* gene (a) and insulin gene (b)
1: Marker; 2: MSCs; 3: The transfected MSCs by pAdv-*PDX-1* for 7 days.

2.5 免疫荧光染色结果

MSCs 为长梭形（图 5a）。转染 pAdv-*PDX-1* 的 MSCs 形态发生变化，细胞逐渐变圆并聚集成团。荧光显微镜下观察到这些细胞胞核、胞浆中都有 GFP 的表达，免疫荧光染色证实它们同时表达 *PDX-1* 及胰岛素蛋白（图 5b ~ d）。未转染的细胞无相应蛋白质表达。

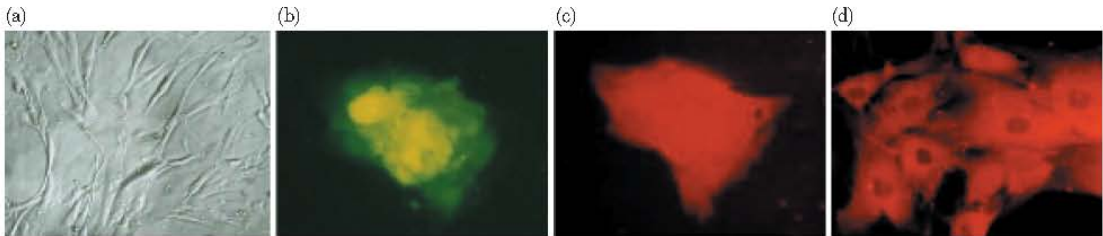


Fig. 5 The morphological change and protein expression in transfected MSCs
(a) MSCs of passage 3, ×100; (b) The expression of GFP in transfected MSCs at 7 days, ×165. (c) The expression of *PDX-1* in transfected MSCs at 7 days, ×165. (d) The expression of insulin in transfected MSCs at 7 days, ×330.

2.6 放射免疫检测结果

MSCs 的培养上清中几乎检测不到胰岛素 (0.19 ± 0.04) mIU/L，而转染 *PDX-1* 基因一周的细胞向胞外分泌的胰岛素为 (15.21 ± 3.50) mIU/L（图 6）。

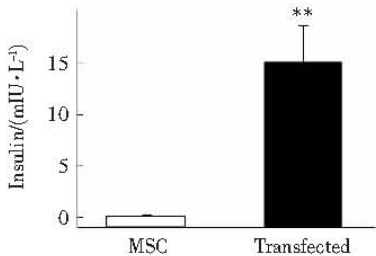


Fig. 6 Secretion of insulin from MSCs and transfected cells at 7 days that were subjected to the same treatment
** $P < 0.05$, $n = 4$.

3 讨 论

PDX-1 基因是胰腺发育的关键基因. 它除了参与早期阶段胰腺的特化及胰芽的形成, 还参与了胰岛细胞的分化成熟过程^[3]. 选用 MSCs 作为 *PDX-1* 基因转染的靶细胞, 是因为 MSCs 易于提取、分离、纯化及扩增, 适合作基因治疗的载体细胞. 患者可以用自己的干细胞治疗疾病, 从而克服了移植排斥反应. 另外, MSCs 具有可植入性, 在特定的条件下还可分化为骨、软骨、肌肉等组织细胞^[4], 是多种疾病细胞替代治疗的理想种子细胞. 最近有报道 MSCs 的基因表达谱很广泛, 表达内、中、外三个胚层的大量基因^[5], 预示着在适当的条件下, MSCs 有可能分化为能分泌胰岛素的细胞. 我们模拟胰腺发育的微环境, 由 MSCs 成功诱导出了胰岛样细胞^[6]. 因为诱导微环境复杂, 添加的细胞因子较多, 所以我们考虑引入 *PDX-1* 基因, 使 MSCs 分化为能分泌胰岛素的细胞. 因为单纯的导入胰岛素基因不具有分泌胰岛素的双时相性^[7].

我们利用 AdEasy 系统成功构建了含 *PDX-1* 的腺病毒载体, 为观察 *PDX-1* 基因在 MSCs 中的表达情况及生物学功能的发挥奠定了基础.

AdEasy 是新一代的腺病毒载体构建系统^[8], 具有很多优点: 穿梭质粒与病毒骨架的同源重组在大肠杆菌 BJ5183 中高效进行, 免去了许多细胞内操作过程; 含 *PDX-1* 的重组腺病毒载体可以在 HEK293 细胞中包装成完整的病毒及进行高效扩增, 避开了病毒的空斑克隆纯化过程, 大大减少了病毒的制备时间; 不经纯化的病毒滴度可达 10^7 PFU/ml, 足以用来感染靶细胞; 穿梭质粒带有 GFP, 可重组至腺病毒的骨架中表达, 因而可对腺病毒的重组过程进行追踪, 并对病毒转染及感染的效率进行观察.

根据病毒感染 MSCs 的预实验, 取病毒上清液 (MOI = 100) 感染 MSCs 48 h, 通过荧光显微镜观

察感染效率约为 80%. 感染 *PDX-1* 基因的细胞由长梭形逐渐变圆, 并聚集成团, 很像胰岛. 未转染基因的细胞仍为长梭形. 这些形态学的变化提示了 *PDX-1* 可能在 MSCs 中发挥了生物学功能. RT-PCR 及免疫荧光染色结果表明, *PDX-1* 基因在 MSCs 中得到了有效的表达, 并激活了下游的胰岛素基因的表达式. 进一步的放射免疫分析结果表明, 转基因的细胞具有了能分泌胰岛素的功能, 但分泌量比较低, 这可能与培养液中添加的血清有关. 有研究人员认为干细胞向胰岛细胞的诱导分化应采用无血清培养液^[9]. 我们也将在今后的工作中论证血清对转基因细胞功能的影响, 并通过动物实验进一步验证转基因细胞的降血糖功能.

参 考 文 献

- 1 Waeber G, Thompson N, Bonny C. Transcriptional activation of the *GLUT2* gene by the *IPF-1/STF-1/IDX-1* homeobox factor. *Mol Endocrinol*, 1996, **10** (11): 1327 ~ 1334
- 2 Taniguchi H, Yamato E, Tashiro F, *et al.* β -cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor *PDX-1* into mouse pancreas. *Gene Ther*, 2003, **10** (1): 15 ~ 23
- 3 Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinology*, 2002, **146** (2): 129 ~ 141
- 4 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284** (5411): 143 ~ 147
- 5 Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, **31** (2): 268 ~ 285
- 6 李艳华, 白慈贤, 谢超, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外定向诱导分化为胰岛样细胞团的研究. *自然科学进展*, 2002, **13** (6): 593 ~ 597
- 7 Soria B, Roche E, Berna G, *et al.* Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000, **49** (2): 157 ~ 162
- 8 Tong-Chuan H, Shibin Z, Luis T C, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (5): 2509 ~ 2514
- 9 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen M A, *et al.* Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes*, 2003, **52** (8): 2007 ~ 2015

The Expression of *PDX-1* Gene in Mesenchymal Stem Cells Transduced by Adenovirus Vector*

Li Yan-Hua, Zhang Rui, Wang Yun-Fang, Zhao Lian-Xu, Chen Lin, Yue Wen, Pei Xue-Tao**

(Laboratory of Stem Cell Biology, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Military Medical Academy of Science, Beijing 100850, China)

Abstract To construct recombinant adenovirus vector contained human pancreatic duodenal homeobox-1 (*PDX-1*) so as to study the expression and effect of *PDX-1* gene in bone marrow mesenchymal stem cells, human *PDX-1* gene was ligated into shuttle vector pAdTrack-CMV. Homologous recombination was performed in BJ5183 bacteria by cotransforming linearized shuttle plasmid with adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1. The recombinant plasmid was packaged and amplified in 293 cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from healthy adult bone marrow. The adenovirus was transfected into MSCs. The recombinant adenovirus vector has been successfully constructed according to the results of sequencing, PCR and enzyme digestion identification. The expression of *PDX-1* and insulin in transfected MSCs at 7 days was detected by RT-PCR and immunocytochemistry. The value of insulin secretion was (15.21 ± 3.50) mIU/L from the transfected cells at 7 days. These results showed that *PDX-1* gene modified MSCs could be the beta cell replacement for those diabetes patients who need insulin-secreting cells.

Key words *PDX-1*, adenovirus vector, mesenchymal stem cells

* This study was supported by research grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA205051 and 2003AA205160) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB509906).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932203, Fax: 86-10-68164807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: December 1, 2003 Accepted: December 24, 2003