

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)17-1537-04

人骨形成蛋白-7 基因重组腺病毒的构建及其在兔骨髓间充质干细胞中的表达

鱼兵¹, 范清宇¹, 马保安¹, 周勇¹, 张明华¹, 龙华¹, 闫露²(第四军医大学¹, 唐都医院全军骨肿瘤研究所, 陕西 西安 710038, ²西京医院康复诊疗中心, 陕西 西安 710033)

Construction of recombinant adenoviruses carrying human BMP-7 and its expression in rabbit bone marrow stem cells

YU Bing¹, FAN Qin-Yu¹, MA Bao-An¹, ZHOU Yong¹, ZHANG Ming-Hua¹, LONG Hua¹, YAN Lu²¹PLA Institute of Orthopedics Oncology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China, ²Center of Rehabilitation, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the replication-deficient recombinant adenoviruses AdBMP-7 and to investigate BMP-7 expression of AdBMP-7 in rabbit bone marrow stem cells (BMSc). METHODS: Human BMP-7 cDNA was amplified by RT-PCR method from human fetal kidney and cloned into shuttle vector to generate pAdTrack-CMV-BMP-7 which was linearized by PmeI and then transformed into AdEasier-1 competent cells bearing adenoviral backbone plasmid to obtain recombinant adenoviral plasmid pAdBMP-7. The recombinants were selected and further confirmed by restriction endonuclease analysis. The pAdBMP-7 was then linearized with PacI enzyme and transfected into 293 cells to get packed adenoviruses which were then transduced into rabbit BMSc. The mRNA expression of BMP-7 in rabbit BMSc was detected using RT-PCR method and the expression of green fluorescence protein was observed under fluorescent microscope. RESULTS: A 1296 bp cDNA was amplified by RT-PCR from human fetal kidney and its sequence analysis was documented as expected. The recombinant plasmid pAdBMP-7 was established by homologous recombination and confirmed by restriction endonuclease digestion. GFP

expression could be observed on the third day after the packing of the linearized pAdBMP-7 in 293 cells and 3×10^9 efu/L titer of Ad-BMP-7 was obtained by CsCl gradient purification. Expressions of BMP-7 were confirmed by RT-PCR and observed with fluorescent microscope 72 hours after the rabbit BMSc were infected by the viruses. CONCLUSION: Human BMP-7 gene is successfully cloned and its recombinant adenoviruses are constructed. Our data may offer a novel approach to local gene therapy of bone regeneration. **【Keywords】** adenovirus; expression vector; human BMP-7; gene cloning

【摘要】目的: 克隆人骨形成蛋白-7(BMP-7)基因并构建其重组腺病毒, 观察其在兔 BMSc 中的表达。方法: 用 RT-PCR 方法从人胎肾组织中克隆人 BMP-7 基因全长 cDNA 并测序; 将 BMP-7 基因 cDNA 克隆到穿梭载体形成转移质粒 pAdTrack-CMV-BMP-7 经 PmeI 酶切线性化后与骨架质粒感受态细胞 AdEasier-1 Cells 经电穿孔法同源重组得到腺病毒质粒 pAdBMP-7 并酶切鉴定, PacI 酶切线性化后转染 293 细胞包装后获得复制缺陷型重组腺病毒 AdBMP-7 将 AdBMP-7 体外感染兔 BMSc 后, 以 RT-PCR 方法及观察 AdEasy 系统上的绿色荧光蛋白表达鉴定 BMP-7 基因的表达。结果: 用 RT-PCR 方法从胎肾组织中克隆出 1296 bp 的 cDNA, 测序证实为人 BMP-7 基因, 酶切鉴定表明 BMP-7 基因已插入到 pAdTrack-CMV 穿梭质粒且腺病毒重组质粒 pAdBMP-7 构建成功; 经 293 细胞包装 3 d 后可观察到绿色荧光蛋白表达(GFP), 氯化铯梯度离心法最终获得约 3×10^9 efu/L 滴度的重组病毒; 体外感染兔 BMSc 后 RT-PCR 方法及荧光显微镜证实 BMP-7 基因可在兔 BMSc 中表达。结论: 成功克隆人 BMP-7 基因并构建其重组腺病毒, 证实了其在 BMSc 的表达, 为骨再生的局部基因治疗打下基础。

【关键词】 腺病毒; 表达载体; 人骨形成蛋白-7 基因克隆**【中图分类号】** R735.2 **【文献标识码】** A

收稿日期 2004-04-13; 修回日期 2004-05-08

基金项目 国家自然科学基金重点项目(30330610)

通讯作者 范清宇, Tel. (029) 83377639 Email. bontum@fmmu.edu.cn

作者简介 鱼兵(1975-)男(汉族), 新疆维吾尔自治区哈密市人。

博士生(导师范清宇), 医师, Tel. (029) 83377591 Email. kevin99208

@yahoo.com.cn

0 引言

人骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)又称成骨蛋白-1(osteogenic protein-1, OP-1)是骨形态发生蛋白家族的成员, 具有广泛的生理功能及较强的骨诱导能力^[1-3]。随着基因治疗技术及组

织工程的发展,将成骨作用较强的诱骨因子基因导入骨髓基质干细胞期望获得 BMP 在局部的持续释放而发挥其诱骨作用成为骨再生及骨缺损修复的较为理想的方法。我们利用 AdEasy 腺病毒表达系统介导 BMP-7 转导骨髓基质干细胞并观察其体外表达,为进一步的骨再生及骨缺损的局部基因治疗奠定良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

AdEasy 腺病毒表达由美国 Tong-Chuan He 博士惠赠,人胚肾 293 细胞、pT7Blue 测序载体、大肠杆菌 DH5 α 及 JM109 为本室保存。PCR 试剂盒、RT-PCR 试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂、转染试剂 LipofectAMINE2000, TRIzol 购自 Gibco 公司,各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, *Pme* I, *Pac* I 为 New England Biolabs 公司产品,小量质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 人胎儿肾总 RNA 的提取及反转录

采用 TRIzol 试剂一步法提取 13~14 wk 孕龄胎儿(唐都医院妇产科提供)肾的总 RNA。设计并合成与 BMP-7 基因特意配对的引物,使用 Gibco 公司的反转录试剂盒反转录得 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增人 BMP-7 基因

根据 GenBank 中报道的人 BMP-7 序列,设计合成一对扩增引物,其中上游引物为:5'-GGGTCGACATGCACGTGCGCTCACTGCG-3',含有 *Sal* I 酶切位点;下游引物为:5'-CCGATATCCTAGTGGCAGCCACAGGCCCGG-3',含有 *Eco*R V 酶切位点。以上述反转录产物为模板进行常规 PCR 反应后,取 4 μ L PCR 产物在琼脂糖凝胶(15 g/L)中电泳分析。

1.2.3 人 BMP-7 基因测序及腺病毒穿梭载体的构建

取 PCR 产物及约 3 μ g 的 pT7Blue 测序载体分别经 *Sal* I 和 *Eco*R V 双酶切,各自回收并纯化片段及载体后进行连接、转化,经蓝白筛选获得阳性克隆。经 *Sal* I 和 *Eco*R V 双酶切及前述特异性引物 PCR 扩增反应对重组质粒进行鉴定后,重组质粒命名为 pT7-BMP-7 由北京赛百盛公司测序,测序正确克隆扩大培养后于 -70 $^{\circ}$ C 低温保存。将测序正确的 BMP-7 基因自 pT7-BMP-7 亚克隆至 pAdTrack-CMV 穿梭质粒的 *Sal* I 和 *Eco*R V 位点间,经连接、转化并经 *Sal* I 和 *Eco*R V 双酶切进行鉴定,重组穿梭质粒命名为 pAdTrack-BMP-7。

1.2.4 细菌内同源重组 hBMP-7 腺病毒质粒 用

100 mL/L 的冰浴冷的无菌甘油制备 AdEasier-1 Cells 及 *E. coli* DH5 α 电穿孔感受态菌,提取重组质粒 pAdTrack-CMV-BMP-7 用 *Pme* I 酶切线性化,电泳回收片段取约 1 μ g 与 20 μ L 腺病毒骨架质粒感受态细胞 AdEasier-1 Cells 混合,在 2500 V 200 Ω 25 μ F 条件下,电穿孔共转化感受态菌,卡那霉素(50 mg/L)固体 LB 培养基筛选,16 h 后随机挑取 15 个克隆,提质粒。挑选电泳鉴定大小与 pAdEasy-1 相似的质粒,将其电穿孔转化 *E. coli* DH5 α 感受态菌,大量提取重组腺病毒质粒并经 *Pac*I 酶切鉴定,命名为 pAd-BMP-7。

1.2.5 hBMP-7 重组腺病毒的制备及滴度测定

转染前 24 h 将 293 细胞以 2×10^6 /孔接种于 60 mm 培养皿待细胞密度生长至 60%~80% 时,将 pAd-BMP-7 质粒用 *Pac*I (NEB) 酶切回收后取 4 μ g 线性化质粒,取 Lipofectamine2000 试剂按照说明书转染 293 细胞,24 h 后更换含 100 mL/L 小牛血清的新鲜培养液,3 d 后通过荧光显微镜观察 GFP 的表达。7 d 后收集 293 细胞于液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴中反复冻融 4 次,取病毒上清再次感染 293 细胞进行扩增,5 d 后收集细胞,1500 r/min 离心 7 min 小心弃上清以 2 mL PBS/皿重悬,反复冻融 4 次,重复感染、收集步骤,将最终收集的 PBS 重悬病毒上清用氯化铯(*CsCl*)梯度离心纯化。将 293 细胞以 5×10^5 /孔接种于六孔板,于次日待细胞生长约 70%~80% 后,将病毒上清倍比稀释分别感染细胞,72 h 后荧光显微镜下计算表达 GFP 细胞个数,测定 AdBMP-7 滴度(*efu*/L)。

1.2.6 兔骨髓间充质干细胞的取材培养及 BMP-7 基因的转导

按照文献[4]的方法分离兔骨髓间充质干细胞。由于兔 BMSc 缺乏特有的表面标记物,因此其鉴定是通过培养过程中出现的分化表型如 ALP 染色、钙染色、HE 染色及电镜观察等来证实^[5]。取生长良好的兔骨髓间充质干细胞以 5×10^5 /皿接种于 60 mm 培养皿,将 AdBMP-7 病毒以 MOI 10~20 感染细胞,3 d 后观察 GFP 的表达。

1.2.7 荧光镜及 RT-PCR 检测 BMSc 中 hBMP-7 基因的表达

各组分别于感染后的 3, 5, 7 和 10 d 于荧光镜下观察被感染兔 BMSc 中绿色荧光蛋白的表达,以 Trizol 试剂盒提取转染细胞总 RNA 后,逆转录反应同前,取 4 μ L PCR 产物,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,紫外检测仪观察结果。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物的鉴定

RT-PCR 产物在含 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,可见在 1000 ~ 1600 bp 之间有一条较淡的扩增条带,将此条带回收再次 PCR,电泳可见特异性条带,与目的基因大小相符(1296 bp, Fig 1).

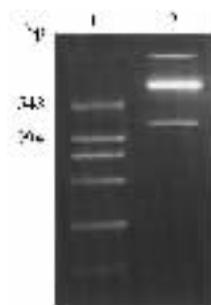


1: DL2000 marker; 2: BMP-7.

Fig 1 RT-PCR results of BMP-7 gene

图1 BMP-7 基因 RT-PCR 扩增结果

2.2 重组质粒 pAdTrack-BMP-7 的酶切鉴定及序列测定 重组质粒 pAdTrack-CMV-BMP-7 经 *Sal* I 和 *Eco*RV 双酶切后,进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定可见清晰地切出与 BMP-7 基因大小相符的片段并与 DNA marker 相符(Fig 2). 对此质粒进行序列测定分析表明该序列与 GenBank 中报道的 BMP-7 序列完全一致.



1: DL2000 marker; 2: *Sal* I and *Eco*RV digestion of plasmid pAdTrack-CMV-BMP-7.

Fig 2 Enzymatic digestion analysis of recombinant plasmid pAdTrack-CMV-BMP-7

图2 pAdTrack-CMV-BMP-7 重组质粒酶切鉴定结果

2.3 BMP-7 基因修饰的 BMSc 的荧光镜检测 兔 BMSc 在 AdBMP-7 病毒感染后的 72 h 在荧光显微镜下观察到感染细胞可表达绿色荧光蛋白(Fig 3),报告基因 GFP 的表达说明有感染能力的病毒颗粒包装成功.

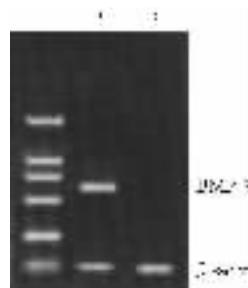
2.4 BMP-7 基因修饰的 BMSc 的 RT-PCR 检测 取 AdBMP-7 感染组及空白组细胞于感染后 48 h 提

取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测,结果显示外源 BMP-7 基因在兔的 BMSc 中在 mRNA 水平得到表达,而空白组没有检测到相应大小的特异性片段(Fig 4).



Fig 3 Green fluorescent protein expression in BMSc infected with AdBMP-7 virus for 72 h \times 400

图3 AdBMP-7 病毒感染后的 72 h BMSc 中绿色荧光蛋白的表达



1: DL2000 marker; 2: AdBMP-7; 3: Control.

Fig 4 RT-PCR results of BMP-7 gene 48 h after infection

图4 感染 48 h 后 RT-PCR 检测 BMP-7 的表达

3 讨论

人 BMP-7 全长 cDNA 编码 431 个氨基酸残基,分为信号肽段、前体肽段和成熟肽段。成熟肽段具有三个 Cys 形成三个链内的二硫键,两成熟肽单体通过一个链间二硫键形成二聚体。成熟肽单体有一个位点被糖基化。信号肽段和前体肽段参与 BMP-7 表达的胞内翻译后加工过程。我们在用 RT-PCR 方法克隆人 BMP-7 全长 cDNA 的过程中,先分别取我室建立的人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9901 及 SOSP-9607 一步法制备 RNA,常规以 OligdT 引发反转录获得 cDNA 模板,重复多次并不断改变 PCR 条件均不能获得到目的基因。后经查阅文献,BMP-7 转录本在 12 ~ 14 wk 孕龄胎儿的心、肾表达最高^[6]。因此从人胚肾组织提取总 RNA,并经甲醛变性凝胶电泳和分光光度法 RNA 定量证明我们获得了适合作为反转录模板的

总 RNA. 参阅文献, 单纯由 OligdT 引发反转录得到的 cDNA 构建的文库无法筛出含全长 BMP-7 cDNA 的克隆^[7], 故而我们设计了特异性引物引发反转录. 又由于人 BMP-7 mRNA 的 GC 含量较高(62%), 常温反转录无法得到目的基因, 经条件摸索, 在较高温度下进行. RT-PCR 扩增后, 电泳可见很淡的 1000 ~ 2000 bp 扩增条带, 将此条带回收再次 PCR, 升高退火温度, 获得特异性扩增条带. 我们克隆了人 BMP-7 全长 cDNA, 有利于今后在真核系统中表达可分泌的活性产物.

传统的细胞内同源重组腺病毒载体制备方法^[8]是先先将目的基因亚克隆至穿梭质粒中构建成转移质粒, 再与腺病毒基因组质粒共转染 293 细胞, 两质粒借所带的部分同源序列在 293 细胞内发生同源重组而形成重组体, 并进一步包装成重组腺病毒颗粒. 因为该种制备方法要求两种质粒的共转染及同源重组必须同时发生在 293 细胞内, 才有可能形成重组体并包装成病毒, 该方法涉及的步骤及环节较多, 成功率较低、工作量大, 实验周期长. 我们采用新型的细菌内同源重组法^[9]来制备重组腺病毒载体, 与细胞内同源重组法的根本不同之处在于, 两种质粒共转染和同源重组均在细菌内完成^[10], 继用经筛选鉴定的重组体克隆质粒 DNA 转染 293 细胞, 包装和扩增病毒. 重组体腺病毒载体制备的关键环节是同源重组和对重组体进行的筛选、鉴定. 我们采用的 pAdEasy 系统具有明显优点 ①腺病毒质粒的同源重组在大肠杆菌中高效进行, 且细菌繁殖快, 同源重组能力强, 因而从根本上克服细胞内同源重组率低的缺陷. ②腺病毒中可插入 10 000 bp 的基因片段或同时插入多个基因片段. ③由于在腺病毒骨架中含有的 GFP 报告基因, 非常便于我们监测病毒包装成功与否、检测病毒滴度及感染效率等. 所有这些都避免了病毒的空斑克隆纯化过程, 大大减少了病毒的制备时间. 因此, 细菌内同源重组法是一种快速、高效、简便、可行的重组体腺病毒载体制备方法, 值得进一步推广应用.

我们通过采用新型高效腺病毒表达系统成功包装出 BMP-7 重组腺病毒并转染兔 BMSc, RT-PCR 及荧光显微镜观察证明, BMP-7 在靶细胞中得到转录和

表达, 这为骨缺损及骨再生的局部基因治疗打下良好的实验基础.

【参考文献】

- [1] Nussenbaum B, Rutherford RB, Teknos TN, et al. Ex vivo gene therapy for skeletal regeneration in cranial defects compromised by postoperative radiotherapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2003;14(11): 1107-1115.
- [2] Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, et al. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7[J]. *J Orthop Res*, 2003;21(4):573-583.
- [3] Paul H, Keni G, Renny T, et al. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7 transduced human fibroblasts form bone in vivo[J]. *Hum Gene Ther*, 2000;11:1201-1210.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999;284(5411):143-147.
- [5] 曹 罡, 毛天球, 席 庆, 等. 人骨髓基质干细胞体外培养的生物学特性[J]. 第四军医大学学报, 2002;23(3):207-209. Cao G, Mao TQ, Xi Q, et al. Biological characteristics of human bone marrow stromal stem cell cultured in vitro[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002;23(3):207-209.
- [6] Helder MH, Ozkaynak E, Sampath KT, et al. Expression pattern of osteogenic protein (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development[J]. *J Histochem Cytochem*, 1995;43(10):1035-1044.
- [7] Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in TGF-beta family[J]. *EMBO J*, 1990;9(7):2085-2093.
- [8] Bett AJ, Haddara W, Prevec L, et al. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91(19):8802-8806.
- [9] He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenovirus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95(5):2509-2514.
- [10] 赵 亚, 宫卫东, 刘 军, 等. HBV-TR 重组腺病毒载体的构建[J]. 第四军医大学学报, 2004;25(4):321-324. Zhao Y, Gong WD, Liu J, et al. Construction of the HBV-TR recombinant adenovirus vector[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2004;25(4):321-324.

编辑 王小仲