

文章编号:1005-6947(2008)07-0687-05

· 基础研究 ·

重组 Akt 腺病毒的构建及其在肝硬化大鼠肝脏中的表达

邓刚¹, 黄飞舟¹, 刘浔阳¹, 罗成群², 郭立武³

(中南大学湘雅三医院 1. 普外一科 2. 烧伤外科, 湖南 长沙 410013, 3. 美国纽约州立大学 Buffalo 分校, Roswell Park 肿瘤研究所, Buffalo 14222)

摘要:目的 探讨持续活化 Akt 且带有 HA 标签 (myr-HA-Akt) 基因的重组腺病毒在肝硬化大鼠肝脏中的表达特性。**方法** 酶切正向插入目的基因的真核表达载体 pcDNA3.1-myr-HA-Akt, 获得 myr-HA-Akt cDNA 后, 将其定向克隆到穿梭质粒 pDC316 中, 然后将重组质粒与病毒骨架质粒 pBHGloxΔE1, 3Cre 共转染 293 细胞, 获得复制缺陷型重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt, 并进行扩增、纯化。通过观察腺病毒感染 293 细胞后是否出现细胞病变效应; PCR 和基因测序方法对所构建病毒进行鉴定, 并采用 TCID50 法检测病毒滴度。自尾静脉注射重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 感染肝硬化模型大鼠。免疫印迹法检测大鼠肝组织内 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达。**结果** 感染的 293 细胞出现明显的细胞病变效应, PCR 产物电泳证实重组腺病毒的存在, 基因测序证实 myr-HA-Akt 的 cDNA 正确插入穿梭质粒且与 pBHGloxΔE1, 3Cre 正确同源重组; 病毒滴度为 5.5×10^{11} vp/mL。从蛋白水平证实感染病毒的肝硬化模型大鼠有外源性 Akt 基因的表达。**结论** 构建的重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 能有效地感染肝硬化模型大鼠, 并可在模型大鼠中正确转录和翻译, 为进一步研究腺病毒介导的 Akt 基因对肝硬化的治疗奠定了实验基础。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 687-691]

关键词: 肝硬化; 重组腺病毒载体; Akt; 转染; 基因表达

中图分类号: R 657.3

文献标识码: A

Construction of recombinant adenovirus containing Akt and its expression in the liver of cirrhotic rats

DENG Gang¹, HUANG FEIzhou¹, LIU Xunyang¹, LUO Chengqun², GUO Liwu³

(1. Department of General Surgery 2. Department of Burns and Plastic Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China; 3. Roswell Park Cancer Institute, State University of New York at Buffalo, Buffalo 14222, USA)

Abstract: Objective To study the expression of the adenoviral vector containing myr-HA-Akt gene in the liver of cirrhotic rats in vivo. **Methods** myr-HA-Akt cDNA obtained from the plasmid pcDNA3.1-myr-HA-Akt was cloned into the plasmid pDC316. Then, pDC316-myr-HA-Akt was cotransferred with adenoviral backbone vector into 293 cells. The recombinant adenovirus was reproduced and purified. The recombinant adenovirus was identified by the cytopathic effect of 293 cells, polymerase chain reaction (PCR), and gene sequencing for myr-HA-Akt cDNA. TCID50 assay was performed to determine the titer of virus. After the adenovirus infected the hepatic cirrhosis rat models via the tail vein, protein and phosphorylation status of Akt were examined by Western blotting. **Results** Infected 293 cells showed significant cytopathic effect. Products of PCR confirmed the presence of recombinant adenovirus. The identification result by DNA sequence analysis showed that myr-HA-Akt cDNA was cloned to pDC316

收稿日期: 2007-11-05; 修订日期: 2008-03-26。

作者简介: 邓刚, 男, 中南大学湘雅三医院住院医师, 主要从事肝硬化门脉高压症治疗方面的研究。

通讯作者: 黄飞舟 E-mail: huangfeizhou@medmail.com.cn

correctly and homologously recombined with pBHGloxΔE1, and 3Cre and Ad-myr-HA-Akts were packaged successfully. The titer of virus was 5.5×10^{11} vp/ml. The expression of Akt in the liver of cirrhotic rats was verified by Western blotting. **Conclusions** The recombinant adenoviral vector containing myr-HA-Akt was constructed and the transgene of hepatic cirrhosis rats expressed Akt gene in vivo successfully. It provides a basis for the further study of treatment for hepatic cirrhosis by Akt gene.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (7) : 687 - 691]

Key words: Liver Cirrhosis; Recombinant Adenovirus Vector; Akt; Transfection; Gene Expression

CLC number: R 657.3

Document code: A

为研究 Akt 基因治疗肝硬化门静脉高压症的可行性,笔者采用细胞内同源重组的方法,将连接有持续活化 Akt 且带有 HA 标签 (myr-HA-Akt) 基因的腺病毒穿梭质粒与腺病毒骨架质粒 pBHGloxΔE1, 3Cre 质粒共转染 293 细胞,获得复制缺陷型重组腺病毒,并研究其在肝硬化大鼠肝脏中的表达,为进一步研究腺病毒介导的 Akt 基因对肝硬化的治疗作用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料及动物

pcDNA3.1-myr-HA-Akt 由美国纽约州立大学 Buffalo 分校 Roswell Park 肿瘤研究所郭立武博士构建。重组腺病毒穿梭质粒 pDC316, pBHGloxΔE1, 3Cre 质粒为加拿大 Microbix Biosystem 公司产品。lipofectamine2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司。293 细胞为人胚肾细胞,购自本原正阳基因有限公司。限制性内切酶、T4DNA 连接酶、DNA 分子量 Marker, 蛋白质 Marker 购自晶美生物公司。免疫印迹 (Western blot) 所用试剂: 蛋白提取试剂盒购自 Biovision 公司; 一抗 anti-Akt, anti-phospho-Akt-Ser-473 (P-Akt) 均购自 Cell Signaling Technology 公司; anti-HA 购自 eBioscience 公司; 二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自 KPL 公司; LumiGLO 化学发光底物购自 KPL 公司; PVDF 膜购自 Roche 公司; 内参 -actin (NeoMarkers 公司)。

雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (220 ± 20) g (湖南农业大学实验动物中心提供), 12 h 光照和 12 h 黑暗交替饲养。

1.2 方法

1.2.1 穿梭质粒的构建 用 EcoRI/BamHI 双酶切已构建好的 pcDNA3.1-myr-HA-Akt 质粒, 回收小片段 myr-HA-Akt; 同时用 EcoRI/BglIII 双酶切商品化穿梭质粒 pDC316 并回收载体, 利用 BamHI/BglIII 为同尾酶的特性将所得的小片段与回收的载体分别用 T4DNA 连接酶连接, 即构建成穿梭载体 pDC316-myr-HA-Akt。以 EcoRI/SalI 双酶切进行鉴定。

1.2.2 复制缺陷型腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 的重组 转染前 1 d, 将 293 细胞接种于 6 孔板中。待细胞生长至底面积的 80% ~ 90% 时, 每一转染孔取 pBHGloxΔE1, 3Cre 质粒 4 μg, pDC316-myr-HA-Akt 质粒 1 μg, 混匀。取 10 μL lipofectamine2000 脂质体以 300 μL 的 DMEM 培养液进行稀释, 室温放置 5 min。将上述两者混和, 室温避光放置 30 min。然后将混合物加入到细胞中。转染后第 2 天, 将长满的细胞传代于 25 cm² 细胞培养瓶中, 每天观察细胞病变反应 (CPE)。CPE 为细胞变大变圆, 呈葡萄状, 并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变后从底部脱落进行收毒。将出毒的细胞培养瓶先后置于 -70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融 3 次, 离心, 收集含病毒的上清液。该上清液即作为随后病毒扩增的毒种。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 扩增、纯化及鉴定 (1) 在方瓶中接种 293 细胞, 培养过夜。待细胞生长至 90% 满时, 取 2 mL 上述毒种接种于培养瓶内 24 h, 显微镜下观察细胞病变。(2) 待细胞完全病变后, 收获病变细胞混悬液, 冻融 3 次, 离心, 取上清液, 按同样方法接种于另外方瓶中, 收获病毒, 接种转瓶。(3) 在每个转瓶中接种 1.8×10^8 个 293 细胞, 待细胞生长至 90% 融合时, 接种第 2 步收获的病毒上清液, 染毒后 70 h 收获病变细胞混悬液。将混悬液 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 细胞沉淀用 Tris 缓冲液重悬, 反复冻融; 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 DNase 酶消化后, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 然后进行柱纯化。用 SOURCE 15Q 进行离子交换纯化, 然后用分子筛进一步纯化; 将纯化后的病毒保存于腺病毒保存液中, 经除盐处理用 0.22 μm 一次性滤器过滤出菌, 获得无菌的纯化病毒。

鉴定包括 3 方面: (1) 腺病毒感染 293 细胞后出现细胞病变效应: 用待鉴定的腺病毒感染 293 细胞, 在感染后 5 ~ 6 d 出现典型的 CPE, 即可初步判断为腺病毒。(2) PCR 扩增外源基因片段的鉴定: 扩增 myr-HA-Akt 片段, 根据 Akt 上游前导肽的编码序列及 Akt 之 CDS 下游序列合成上、下游引

物(Invitrogen 公司合成): myr-HA-Akt-UP: 5'-GG-GAATTCATGGGATGCGTGTGTAGC-3'; Akt -Down: 5'-GGGGATCCTCAGGCCGTGCCGCTGGCCGAGTA-3'。PCR 条件: 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min, 共 30 个循环。(3) PCR 鉴定阳性克隆, 送交测序。

1.2.4 重组腺病毒的滴度测定 采用 TCID50 法测定: 293 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 接种 24 h 后将系列稀释的病毒液加入孔中, 每个稀释度接种 10 孔, 设置 2 孔为阴性对照。37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 10 d, 观察每个稀释度 CPE 出现的百分率, 按照 Admax 操作手册中的公式 $[T = 10^{1+d(s-0.5)}]$ 计算病毒的滴度 (d 为稀释度的对数值, s 为阳性比例之和), 计算出重组腺病毒的滴度。

1.2.5 动物模型制备及分组 随机取 5 只正常大鼠作为正常对照组, 自由进食标准颗粒饲料及饮水。其余 25 只按照动物实验方法学^[1], 采用四氯化碳复合法制备动物模型。大鼠皮下注射 40% 四氯化碳-花生油溶液 0.3 mL/100 g (体重), 每周 2 次。第 2 周开始, 以 10% 乙醇作为惟一饮料, 自由饮用。饲以混有 0.5% 胆固醇存玉米粉饲料, 8 周成模。随机挑选 3 只肝硬化成模大鼠取肝组织右叶约 10 g, 采用 HE 常规染色和标准 Van Gieson (VG) 胶原染色, 光镜下观察肝细胞变性、坏死、炎症细胞浸润及胶原沉积情况。另取 15 只肝硬化大鼠随机分成 3 组: (1) 肝硬化未处理组 (肝硬化组); (2) Akt 重组腺病毒治疗组 (Akt 组); (3) 生理盐水治疗组。肝硬化形成 1 周后, Akt 组和生理盐水组分别自尾静脉注射 3.0×10^{11} vp 的 Akt 重组腺病毒^[2] 或等容积的生理盐水。

1.2.6 免疫印迹 (Western blot) 法检测 Akt, p-Akt, HA 蛋白的表达 取适量肝组织按体积比 1:5 加入组织细胞裂解液, 电动匀浆后冰置 30 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 40 min, 取上清液, Bradford 法测蛋白浓度; 根据目的蛋白分子质量配制 SDS-PAGE 凝胶, 调整上样量统一为 40 μg 进行电泳。常规湿转膜操作。

2 结果

2.1 穿梭质粒的构建

构建的穿梭质粒 pDC316-myr-HA-Akt 经 EcoRI/Sal I 双酶切后, 然后行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳图显示有预期大小的特异性目的条带 (pDC316 质粒 3913 bp, myr-HA-Akt 1506 bp) 出现 (图 1)。



图 1 含有 myr-HA-Akt 片段的 pDC316 酶切鉴定 1: pDC316-myr-HA-Akt 经 EcoRI/HindIII 双酶切后产生的条带; 2: Marker 4 500 (4.5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.2 kb, 800 bp, 500 bp, 200 bp)

2.2 重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 的鉴定

2.2.1 感染性鉴定 用含目的片段的穿梭质粒和 pBHGloxΔE1, 3Cre 质粒共转染 7 d 后, 培养板内 293 细胞出现典型 CPE (图 2)。

2.2.2 PCR 扩增外源基因片段的鉴定 在所包装的病毒 DNA 中均扩增出与理论大小相同的目的片段 (1 506 bp) (图 3)。

2.2.3 PCR 鉴定阳性克隆全自动测序分析结果 经测序鉴定目的片段与 GenBank (基因库) 提供的 Akt 全长 cDNA 序列 (bp) 完全一致 (图 4)。

2.3 重组腺病毒的滴度测定

Ad-myr-HA-Akt 扩增后, 经 TCID50 法测定滴度为 5.5×10^{11} vp/mL。

2.4 各组大鼠肝脏病理形态学

正常组肝小叶形态无异常, 未见肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润; VG 染色亦未见纤维间隔形成。肝硬化组肝小叶正常结构消失, 有大量炎症细胞浸润, 可见肝细胞变性、坏死; VG 染色可见纤维间隔, 假小叶形成 (图 5)。

2.5 蛋白质印迹检测

在肝硬化大鼠 Akt 磷酸化水平降低, 经尾静脉注射途径将编码持续活化 Akt 且带有 HA 标签 (myr-HA-Akt) 的基因导入肝硬化大鼠体内, 能明显恢复 Akt 磷酸化; 而生理盐水组, Akt 磷酸化不能恢复。HA 蛋白表达说明外源性基因在大鼠肝脏内成功表达 (图 6)。

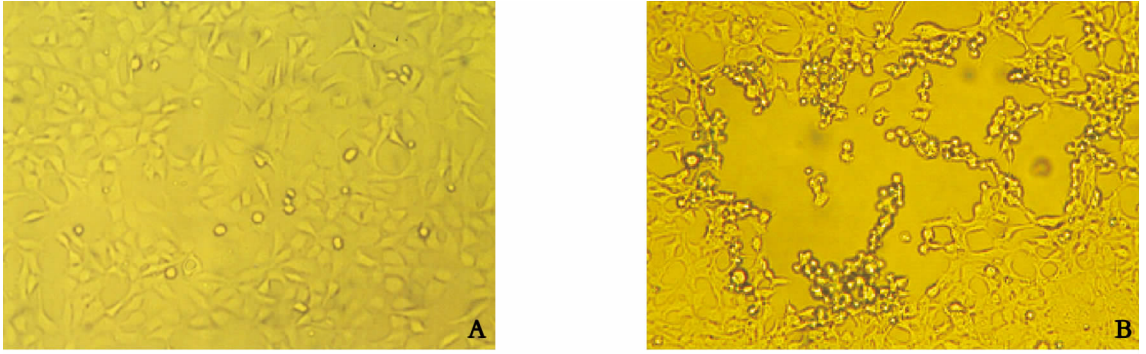


图 2 Ad-myr-HA-Akt 重组腺病毒感染 293 细胞形态改变 (×200) A: 正常 293 细胞; B: 病毒感染后的 293 细胞

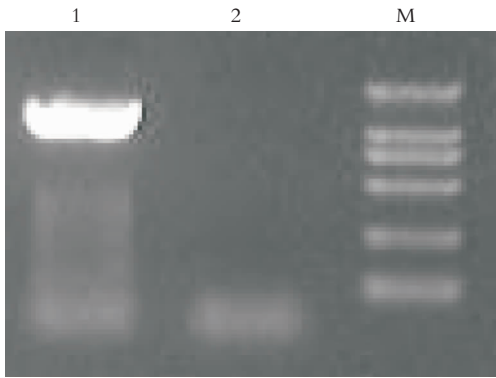


图 3 myr-HA-Akt 的 PCR 鉴定 1: Ad-myr-HA-Akt; 2: 阴性对照; M: DL2 000 Marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp)

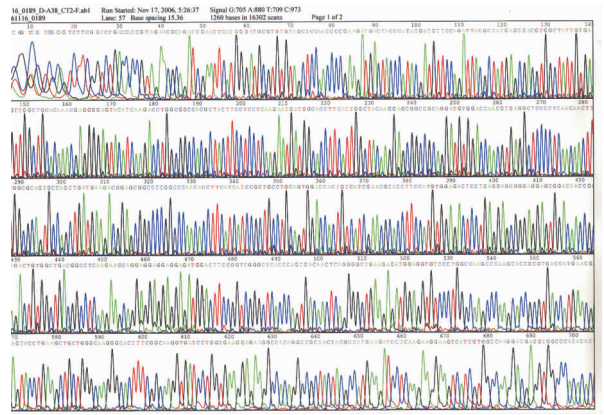


图 4 PCR 鉴定阳性克隆全自动测序分析结果

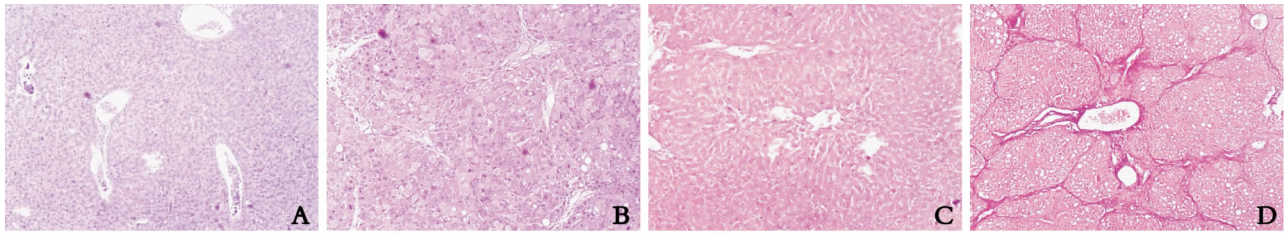


图 5 肝硬化大鼠肝脏病理形态学改变 A: 正常组 (HE × 100); B: 肝硬化组 (HE × 100); C: 正常组 (VG × 100); D: 肝硬化组 (VG × 100)

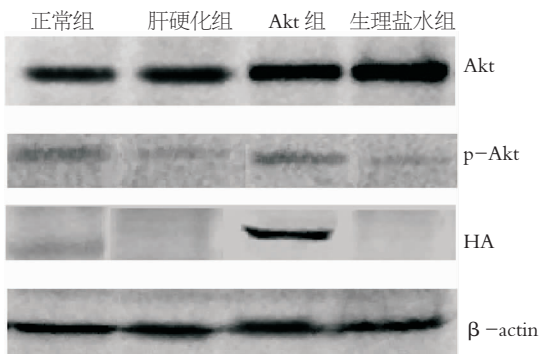


图 6 免疫印迹法检测各组大鼠肝组织内 Akt, p-Akt 蛋白

的表达

3 讨论

细胞凋亡是肝硬化的始动因素, 中心环节; 肝细胞的过度凋亡导致肝星形细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的活化, 从而引起胶原生成增加, 肝纤维化形成^[3]。Song 等^[4]设计抑制 Fas 表达的 siRNA, 在造模的第 2 周开始, 经静脉注射导入刀豆蛋白 (ConA) 致肝纤维化小鼠体内, 发现对照组小鼠肝脏出现不同程度的桥状纤维化, 而 Fas siRNA 治疗组无一出现肝纤维化或肝组织坏死; 血

清羟脯氨酸和 III 型胶原氨基酸分别下降 75% 和 87.5%。研究还发现,在肝损伤后期,Fas siRNA 仍具有保护肝细胞的作用。由此,Song 等^[4]认为通过抑制介导肝细胞凋亡的 Fas 途径,能成功地抑制肝纤维化的形成。提示,如能在肝纤维化形成初期通过抑制肝细胞的过度凋亡,则能抑制肝纤维化的形成,进而阻断肝硬化^[5-7]。

Akt 具有多重作用,其中很重要的是通过抑制介导细胞凋亡的 Fas 途径而拮抗细胞凋亡^[8-9]。本研究发现,肝硬化大鼠肝内 Akt 活性降低,而在导入 Ad-myr-HA-Akt 后,能够恢复 Akt 活性(表现为 Akt 磷酸化水平得以恢复)的事实,笔者推测,可能正是由于 Akt 活性降低,肝硬化大鼠肝内拮抗细胞凋亡的作用大大减弱,导致肝细胞过度凋亡,从而大量激活 HSC。本研究构建重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt,是为了要达到如下目的:通过抑制 Fas 途径而抑制肝细胞的过度凋亡,从而阻断肝硬化的形成。

另外,本研究之所以选用 AdMax 包装系统构建重组腺病毒,是因为它除了具有感染高和插入外源基因容量大等各种腺病毒系统共有的优点外,与目前使用最普及的 Ad-Easy 系统相比,还有其他一些特点,如 AdMax 包装系统只需要 2~4 周就能完成从质粒构建到重组出病毒,成功率大于 98%;在真核细胞内重组出病毒,保持了对腺病毒的生存压力,有助于重组腺病毒的基因组的完整性;可以明显提高病毒产出率^[10-13]。

本研究构建的携带 Akt 基因的腺病毒载体经感染 293 细胞、PCR 扩增外源基因片段和 DNA 测序分析,均证实 Akt 基因成功克隆入重组腺病毒基因组中。经尾静脉将 Akt 重组腺病毒导入肝硬化大鼠体内,通过 Western Blot 法不仅检测到 HA 标记的蛋白质表达,同时还发现能使肝内受损的 Akt 活性恢复。此结论为进一步研究 Akt 基因在肝硬化门静脉高压症的治疗提供了实验基础。

参考文献:

- [1] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005. 474-475.
- [2] Garcia-Bañuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, *et al.* Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(2): 127-134.
- [3] Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury[J]. *Gut*, 2005, 54(7): 1024-1033.
- [4] Song E, Lee SK, Wang J, *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. *Nature Med*, 2003, 9(3): 347-351.
- [5] Akazawa Y, Gores GJ. Death receptor-mediated liver injury[J]. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(4): 327-338.
- [6] Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease[J]. *Liver Int*, 2006, 26(8): 904-911.
- [7] Eichhorst ST. Modulation of apoptosis as a target for liver disease[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9(1): 83-99.
- [8] Su CC, Lin YP, Cheng YJ, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by integrin-tumor matrix interaction suppresses Fas-mediated apoptosis in T cells[J]. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4589-4597.
- [9] Franke TF, Hornik CP, Segev L, *et al.* PI3K/Akt and apoptosis: size matters[J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 8983-8998.
- [10] Chen Z, Guo X, Ge X, *et al.* Preparation of Monoclonal Antibodies Against Pseudorabies Virus Glycoprotein gC by Adenovirus Immunization Alone or as a Boost Following DNA Priming[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2008, 27(1): 36-42.
- [11] 王旭东,刘虹,曹水,等. 表达转化生长因子 β II 型受体胞外区-活化 T 细胞表达和分泌的调节因子融合基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(4): 423-425.
- [12] Parks RJ, Graham FL. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging[J]. *J Virol*, 1997, 71(4): 3293-3298.
- [13] 何金生,王健伟,洪涛. 腺病毒载体构建原理与方法的研究进展[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(4): 399-400.