

含人 Apelin-R 重组腺病毒载体 pDC316-apelinR-EGFP 的构建

樊丽娅 张院

【摘要】 目的 构建含有人 Apelin 受体(Apelin-R)基因的 pDC316-apelinR-EGFP 腺病毒穿梭载体,为糖尿病相关基因 Apelin 的体内研究提供新方法。方法 PCR 方法分别扩增 Apelin-R 基因,测序正确后与载体 pDC316-EGFP 连接,构建重组腺病毒载体 pDC316-apelinR-EGFP;脂质体法与腺病毒骨架载体共转染 HEK293 细胞进行重组腺病毒包装,稀释法测定腺病毒滴度。RT-PCR 和 Western blot 方法检测 Apelin-R 的表达。结果 限制性核酸内切酶鉴定及测序结果均证明 Apelin-R 基因成功扩增并克隆到重组腺病毒载体 pDC316-apelinR-EGFP。在 HEK293 中成功包装出含 Apelin-R 的腺病毒 Ad-apelinR-EGFP,病毒滴度为 3.1×10^9 TCID₅₀/ml,感染 Ad-apelinR-EGFP 的 HEK293E 细胞中可检测到 Apelin-R 的 mRNA 和蛋白表达。结论 成功构建了真核表达载体 pDC316-apelinR-EGFP,得到了表达绿色荧光蛋白的 Apelin-R 腺病毒,该病毒有望用于糖尿病的体内研究实验。

【关键词】 腺病毒科; 糖尿病; Apelin-R

Construction of recombinant adenovirus vector pDC316-apelinR-EGFP encoding human Apelin-R FAN Li-ya, ZHANG Yuan. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: FAN Li-ya, Email: lynnfan@126.com

【Abstract】 Objective To construct recombinant adenovirus vector pDC 316-apelinR-EGFP encoding human Apelin-R(Apelin receptor, Apelin-R) gene in order to provide a new method for *in vivo* studies of diabetes-related genes Apelin. **Methods** The Apelin-R gene regions were amplified by polymerase chain reaction and cloned into shuttle vector pDC316-EGFP vector to generate the plasmid pDC316-apelinR-EGFP respectively after the gene regions verified by DNA sequence analysis. Then pDC316-apelinR-EGFP was cotransfected into HEK293E cells with the adenovirus backbone plasmid by Lipofectamine 2000 to get packaged. The titer of recombinant adenovirus was detected by TCID₅₀. The expression of Apelin-R was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Restriction endonuclease digestion analysis and DNA sequencing results showed that the adenovirus vector pDC 316-apelinR-EGFP was constructed in the sequence as designed. Recombinant adenovirus Ad-apelinR-EGFP was obtained in HEK293E cells and virus titer was 3.1×10^9 TCID₅₀/ml. After infection, the expression of Apelin-R mRNA and protein could be detected in HEK293E cells. **Conclusions** The recombinant adenovirus vector pDC316-apelinR-EGFP has been constructed successfully, which provides experimental basis for further studying the diabetes *in vivo*.

【Key words】 Adenoviridae; Diabetes mellitus; Apelin-R

Apelin 是 1998 年由日本科学家 Tatemoto 等首次通过反向药理学方法从牛胃分泌物中提取并纯化的孤儿 G 蛋白偶联受体-血管紧张素受体相关蛋白(angiotensin receptor-like protein J, APJ)的天然配体,是一种具有重要生物学作用的心血管活性多肽,属于肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)新的组分^[1-3]。Apelin 及其受体 Apelin-R 在体内组织中广泛分布,人类 Apelin 主要在

脑、心脏、肾、肺以及血管内皮细胞中高度表达,表明其可作为内分泌、旁分泌、自分泌的活性物质发挥广泛的生物学效应^[4-6],如调节水盐代谢、促进摄水、调节垂体激素释放等。Apelin 可抑制胰岛素释放与调节血液内环境稳定参与 2 型糖尿病的发病。

然而目前为止,对于 Apelin 及 Apelin-R 参与相关疾病的体内实验研究较少。本实验构建的腺病毒载体 pDC316-apelinR-EGFP,即可作为真核表达载体转染细胞用于研究细胞内信号分子和信号转导作用的分子机制,也可将包装得到的腺病毒注射动物用于体内研究 Apelin 参与糖尿病代谢的机制,研究该基因在体内外

参与细胞信号转导及糖尿病的发生机制,结果有助于为基础研究和临床治疗提供新的理论依据和实验基础。

材料与amp;方法

一、材料

质粒 pDC316 和腺病毒的骨架质粒 pBHGloxΔE1、3Cre 以及腺病毒包装所用 HEK293 细胞购自本元正阳公司。人脐静脉细胞株 ECV304、pDC316-EGFP 为本实验室保存。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、抗生素均购自 Gibco 公司。Apelin-R 一抗购自 Abcam(ab84296)公司,羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。反转录试剂盒购自 Promega 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 2000 和 OPTI-MEM 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 EcoR I、Hind III、Taq 酶、T4 连接酶、pMD18-T 载体、JM109 和 DH5α 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和病毒 RNA 提取试剂盒均购自上海华舜公司。

二、方法

1. 引物设计及 PCR 扩增基因序列:根据 Apelin-R 基因序列(NM_005161)和载体酶切位点设计引物,正义引物为:F:5'-CCTGAATTCATGGAGGAAGGTGG-3'(含 EcoR I 酶切位点),反义引物为 R:5'-GGAAGCTTCTAGTCAACCACAAG-3'(含 Hind III 酶切位点),扩增片段大小 1143 bp。以 ECV304 细胞 cDNA 为模板, TaKaRa Ex Taq 酶进行 PCR 扩增,反应体系按常规。PCR 反应参数为:94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。取 10 μl PCR 扩增产物,1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳 0.5 h,凝胶图像分析仪分析结果,用凝胶回收试剂盒对目的片段进行回收。

2. pMD18-T-apelinR 载体构建:将回收目的片段与 pMD18-T 克隆载体连接(16℃,过夜),转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,用 X-gal 和 IPTG 进行蓝白筛选,挑选白色阳性克隆提取质粒并进行酶切鉴定,将连接有 Apelin-R 基因序列的质粒命名为 pMD18-T-ApelinR,送北京奥科生物有限公司进行测序。

3. pDC316-apelinR-EGFP 腺病毒载体构建:将测序正确的 apelin-R 基因序列的 pMD18-T-ApelinR 与载体 pDC316-EGFP(本室构建)用限制酶 EcoR I 和 Hind III 酶切,琼脂糖凝胶电泳分别回收 Apelin-R 基因片段和载体;将回收的载体和目的基因用 T4 连接酶 16℃连接过夜,转化 DH5α 感受态细胞,涂布氨苄抗性的 LB 培养板。挑取单克隆接种于含氨苄的 LB 培养基,提取质粒并将鉴定正确的腺病毒载体命名为 pDC316-apelinR-EGFP。

4. 细胞转染及病毒包装:人胚肾细胞(human embryonic kidney, HEK293)培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。在转染前 1 d,选择生长状态良好的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,按 3×10^5 细胞/孔培养于六孔板,置 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h。细胞生长密度约 70%~80% 时转染。转染采用脂质体转染法,操作步骤按说明书进行,将纯化的腺病毒骨架质粒与 pDC316-apelinR-EGFP 与共转染 HEK293E 细胞进行同源重组,转染 4 h 后,更换不含有抗生素的完全 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂ 培养。腺病毒载体在 HEK293E 细胞中通过基因同源重组,产生具有感染性的重组腺病毒颗粒。由于 pDC316-apelinR-EGFP 系统在细胞内可以表达绿色荧光蛋白(EGFP),转染后的 24 h 在荧光倒置显微镜下观察到荧光,确定转染成功。在转染 4 d 观察到细胞病变(cytopathic effect, CPE)即细胞出现肿胀、变圆、聚集、脱落等形态改变。转染 10 d 左右,大部分细胞出现 CPE 后收集细胞及含病毒的培养液,-80℃冻存。

5. 重组病毒的鉴定:将收集的细胞反复冻融(-80℃,37℃)三次,超声破碎后离心收集上清。取 2×10^6 细胞,抽提病毒 RNA,用 Apelin-R 基因引物 PCR 鉴定重组病毒中是否含有目的基因片段,以转染空载体的细胞作阴性对照。同时取 2×10^6 细胞裂解蛋白,加上样缓冲液,SDS-PAGE 电泳,转膜后脱脂牛奶封闭 2 h,用 Apelin-R 一抗免疫,4℃过夜,TBST 洗一抗后用 FITC 标记的羊抗兔二抗免疫 2 h,发光显影进行 Western blot 检测。将鉴定后的腺病毒命名为 Ad-apelinR-EGFP,并在 HEK293E 细胞中扩增 3 代后获得高滴度重组腺病毒。病毒上清用氯化铯(CsCl)梯度离心纯化,-80℃保存。

6. 重组腺病毒滴度测定(TCID₅₀):制备 96 孔板单层 HEK293E 细胞,每孔 10^4 个细胞,将病毒上清按照 1:10 系列倍比稀释于 2% DMEM 培养液中,100 μl 稀释的上清感染细胞,每个稀释度接种 8 个孔,设阴性对照孔,对照孔加入 100 μl 2% DMEM 维持液,37℃、5% CO₂ 培养。每天观察荧光并记录出现 CPE 的孔数及时间,待细胞病变不再发展后,记录结果,计算病毒滴度 TCID₅₀。

结 果

1. Apelin-R 基因扩增及鉴定:PCR 反应扩增出 Apelin-R 基因片段,1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察,可见 1143 bp 目的基因片段(图 1),扩增的片段与预期片段大小一致。将回收的目的片段构建 pMD18-T-apelinR 载体,测序证实成功扩增 Apelin-R 基因序列。

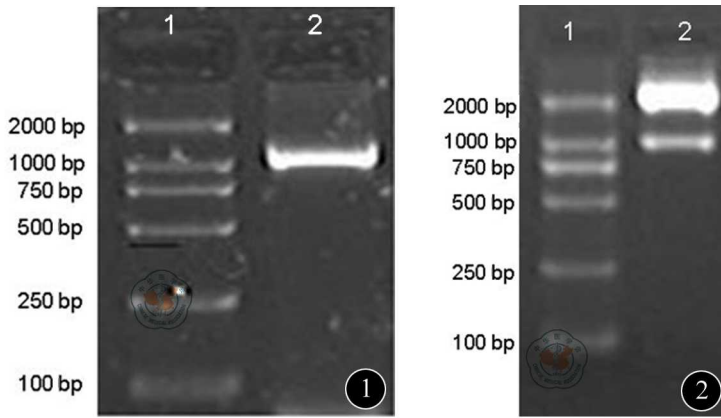


图1 PCR扩增apelin-R基因。1: DL2000; 2: apelin-R 条带 图2 重组腺病毒载体pDC316-apelinR-EGFP的鉴定。1: DL2000; 2: 用EcoR I 和Hind III 酶切鉴定

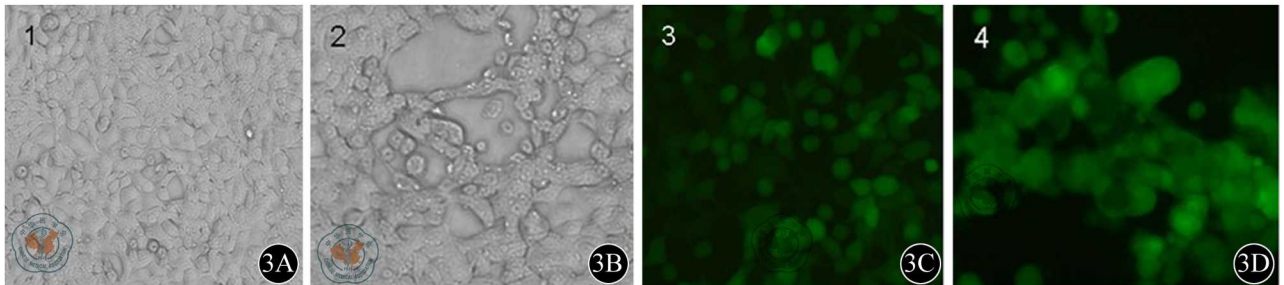


图3 显微镜观察转染后24 h与第4天细胞(×100)。3A: 转染24 h的HEK293E细胞; 3B: 转染24 h的HEK293E细胞EGFP表达; 3C: 转染4 d的HEK293E细胞, 可见细胞病变效应; 3D: 转染4 d的HEK293E细胞, 荧光观察细胞病变效应

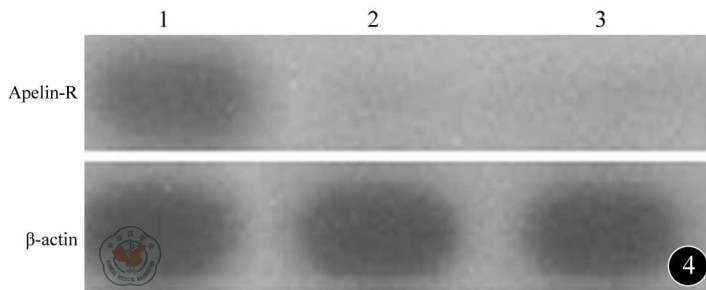


图4 Ad-apelinR-EGFP感染后Western blot检测。1: Ad-apelinR-EGFP感染的HEK293E细胞; 2: 空载体感染的HEK293E细胞; 3: HEK293E细胞

2. 重组腺病毒载体的构建及扩增:将正确的基因序列构建腺病毒穿梭质粒 pDC316-apelinR-EGFP, 构建好的质粒分别经 EcoR I 和 Hind III 依次酶切后,1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见到 1100 bp 左右条带,证实目的基因已成功构建到腺病毒载体中(图 2)。

3. 重组腺病毒 Ad-apelinR-EGFP 的包装及滴度测定: pDC316-apelinR-EGFP 与腺病毒骨架质粒 pBHGloxΔE1、3 Cre 共转染 HEK293E 细胞,24 h 后荧光显微镜见到绿色荧光转染成功,4 d 左右出现细胞病变效应,可见细胞肿胀、变圆、聚集,贴壁能力下降而脱落(图 3)。10 d 大部分细胞病变,收集细胞,冻融及超声后离心收集上清。取部分上清感染 HEK293E 细胞扩增重组腺病毒,扩增 3 代后获得高滴度的重组腺病毒,命名为 Ad-apelinR-EGFP。TCID50 测定重组腺病毒滴

度为 3.1×10^9 TCID50/ml。

4. 重组腺病毒 Ad-apelinR-EGFP 的鉴定:在感染 Ad-apelinR-EGFP 的 HEK293E 细胞中检测 Apelin-R 的蛋白水平;Western blot 鉴定方法如前所述,结果显示,Ad-apelinR-EGFP 感染组提取的蛋白在 58 kDa 处有一阳性条带,而空载体感染组和同期培养的 HEK293E 细胞在此处未见条带(图 4),表明 Ad-apelinR-EGFP 感染的 HEK293E 细胞表达 Apelin-R 蛋白,说明扩增病毒为重组腺病毒 Ad-apelinR-EGFP。

讨 论

2 型糖尿病也称作成人发病型糖尿病,是一种多基因遗传性疾病。一般认为,2 型糖尿病的发生是多源性的,是环境因素和遗传因素共同作用的结果,病因与胰

胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足有关。Apelin作为一种脂肪细胞因子,广泛表达于体内各种组织,并通过其特异性受体 APJ 在垂体激素释放、体液平衡以及摄食等多种生理活动中发挥着重要作用^[7-8]。Apelin/APJ 系统对胰岛素的分泌亦有作用,并且胰岛素可以调节脂肪细胞合成 Apelin,推测 Apelin/APJ 系统可能参与 2 型糖尿病的发生发展^[9]。Apelin 作为 APJ 的一种配体,大部分关于 Apelin 的研究都集中于心血管方面。Lee 等^[10]研究表明,Apelin 广泛分泌于全身的脂肪细胞;肥胖伴有高胰岛素血症导致 Apelin 过度表达。人体研究发现:伴有肥胖的 2 型糖尿病患者血浆中 Apelin 水平高于正常组,这种 Apelin 水平的增高与血糖浓度和胰岛素敏感性密切相关^[11]。这些研究都提示胰岛素可能上调脂肪细胞中 Apelin 的表达水平。Apelin 不仅受到胰岛素的调控,而且初步研究表明 Apelin 也很可能会影响胰岛素的产生,但这一现象及其对应的分子机制尚待进一步验证^[12-13]。越来越多的研究显示 Apelin 在糖尿病发生发展中发挥重要作用。因此,对 Apelin 的深入研究有望为糖尿病的发病机制及临床治疗提供一个新的方法和思路。

腺病毒载体具有转基因效率高,体外实验通常接近 100% 的转导效率;可转导不同类型的人组织细胞,不受靶细胞是否为分裂细胞所限;容易制得高滴度病毒载体,在细胞培养物中重组病毒滴度可达 10^{11} /ml;进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组,仅瞬间表达,安全性高等优点,成为继逆转录病毒载体之后广泛应用且最具前景的病毒载体^[14]。

实验结果表明,我们构建重组腺病毒载体 pDC316-apelinR-EGFP 质粒中带有 EGFP 报告基因,可用于直接观察转染和感染效率及监测重组病毒的滴度,用鉴定正确的重组腺病毒质粒转染 HEK293E 细胞,包装产生的腺病毒可用于细胞实验和动物实验,为体内外研究糖尿病的发病及相关分子通路奠定基础。

参 考 文 献

- [1] O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 1993, 136:355-360.
- [2] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:471-476.
- [3] Tatemoto K. Search for an endogenous ligand of the orphan G protein-coupled receptor-discovery of apelin, a novel biologically active peptide. *Nihon Rinsho*, 2000, 58:737-746.
- [4] O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, et al. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492:72-80.
- [5] Zhang Z, Yu B, Tao GZ. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J*, 2009, 122:2360-2365.
- [6] Habata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1452:25-35.
- [7] Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 2005, 1:1764-1771.
- [8] Grisk O. Apelin and vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Cardiovasc Res*, 2007, 74:339-340.
- [9] Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin--APJ system. *Heart*, 2010, 96:1011-1016.
- [10] Lee DK, George SR, O'dowd BF. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27:190.
- [11] Soriquer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg*, 2009, 19:1574-1580.
- [12] Sörhede WM, Magnusson C, Åhrén B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept*, 2005, 131:12-17.
- [13] Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Celf Metab*, 2008, 8:437-445.
- [14] Liu TC, Kim D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, 2008, 15:877-884.

(收稿日期:2012-03-14)

(本文编辑:戚红丹)