

小窝蛋白-1 重组慢病毒载体的构建及鉴定

董雷 马春芳 蔡宛如

【摘要】目的 构建小窝蛋白-1(Cav-1)重组慢病毒载体,并在 293T 细胞和小鼠中验证 Cav-1 过表达。**方法** 将 Cav-1 基因克隆至慢病毒载体 GV287,然后利用酶切、PCR 扩增鉴定、阳性克隆鉴定及测序验证构建 Cav-1 重组慢病毒。将 Cav-1 重组慢病毒转染至 293T 细胞,通过荧光检测慢病毒转染效果,采用 Western blot 法检测 Cav-1 蛋白表达情况,同时转染 C57BL6 小鼠,免疫组化法检测小鼠肺组织中 Cav-1 的表达情况。**结果** 经酶切、PCR 扩增鉴定以及阳性克隆测序,提示 Cav-1 重组慢病毒构建正确。荧光检测显示转染 Cav-1 重组慢病毒后的 293T 细胞可见强荧光,Western blot 法检测结果显示目的基因可表达,小鼠肺组织中 Cav-1 呈强阳性表达,且实时定量 PCR 检测 Cav-1 重组慢病毒滴度为 1.3×10^{12} copies/ml,达到可利用标准。**结论** 采用本研究方法可成功构建 Cav-1 重组慢病毒载体。

【关键词】 小窝蛋白-1 重组慢病毒载体 急性肺损伤

Construction and identification of recombinant Caveolin-1 lentivirus vector DONG Lei, MA Chunfang, CAI Wanru. Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China

【Abstract】Objective To construct and identify a recombinant lentivirus vector containing high expression of caveolin-1 (Cav-1) gene. **Methods** Cav-1 gene was cloned into lentivirus vector GV287, and then identified by restriction enzyme digestion and PCR. Positive clones were identified and sequenced to construct a recombinant lentivirus with high expression of Cav-1. After Cav-1 recombinant lentivirus was transfected into 293T cells, the effect of lentivirus transfection was detected by fluorescence, the expression of Cav-1 protein was detected by Western blot. Meanwhile, C57BL6 mice were transfected with Cav-1 recombinant lentivirus, and the expression of Cav-1 in lung tissue of the mice was detected by immunohistochemistry. **Results** Restriction enzyme digestion, PCR amplification and sequencing of positive clones suggested that Cav-1 recombinant lentivirus was constructed correctly. Fluorescence assay and Western blot both indicated the expression of the target gene in 293T cells transfected with Cav-1 recombinant lentivirus. Immunohistochemistry showed that Cav-1 was strongly expressed in lung tissue of the mice. The titer of recombinant lentivirus was 1.3×10^{12} copies/ml, which was up to the available standard by RT-PCR. **Conclusion** The recombinant lentivirus vector of Cav-1 has been successfully constructed by this method.

【Key words】 Caveolin-1 Recombinant lentivirus vector Acute lung injury

小窝蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)是细胞膜上膜内陷型胞膜囊泡-小窝的结构和功能标志蛋白,在细胞信号转导、胆固醇转运、细胞内吞等方面发挥重要作用^[1]。Cav-1 广泛存在于肺泡 I 型上皮细胞膜上。近年研究发现 Cav-1 在急性肺损伤肺水肿发病始动机制中起重要作用,与肺泡上皮细胞通透性、钠水转运有关^[2]。本课题

组前期研究结果也表明 Cav-1 在小鼠急性肺损伤时的表达水平明显高于正常小鼠^[3],这提示 Cav-1 在急性肺损伤发病中起重要作用。本研究试图构建 Cav-1 重组慢病毒,并验证其在 293T 细胞中的表达,以期构建 Cav-1 高表达的急性肺损伤动物模型提供实验材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 293T 细胞购于上海 ATCC 细胞库,大肠杆菌 DH5 α 、GV287 慢病毒载体购自上海吉凯基因公司。

1.1.2 实验动物 清洁级雄性 C57BL6 小鼠 24 只购于

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.14.2018-2773

基金项目:浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C37125)

作者单位:310005 杭州,浙江中医药大学附属第二医院呼吸内科

通信作者:蔡宛如, E-mail: sundaymoreu@126.com

上海斯莱克公司。

1.2 主要试剂和仪器 1kp DNA ladder Marker(批号: #SM0311)购于加拿大 Fermentas 公司, 250bp DNA ladder Marker(批号: DL250+, 100T)购于上海捷瑞公司, 琼脂糖(批号: GA4-100)购于上海赛百盛基因技术有限公司, Taq 酶、dNTP、内切酶等购于大连 TAKARA 公司, In-Fusion™ PCR Cloning Kit(批号: 63962)购于美国 Clontech 公司, 质粒抽提试剂盒(批号: A1460)购于美国 Promega 公司, FBS、DMEM 细胞培养试剂购于美国 Gibco 公司, invitrogen lipofectamine 2000 转染试剂购于美国 invitrogen 公司, Cav-1(D46G3)X 兔单抗和 β -actin 抗体购于美国 CST 公司。PCR 仪(型号: 2720 thermal cycler)购于美国 Applied Biosystems 公司, 稳压 DNA 电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像仪购于上海天能科技有限公司, 细菌摇床(型号: HI-9211K)购于华利达实验设备公司。

1.3 方法

1.3.1 Cav-1 重组慢病毒质粒的构建和检验 慢病毒载体 GV287 原件顺序为 Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP, 克隆位点为 BamHI / BamHI。根据目的基因 Cav-1(NM_007616)设计 PCR 引物, 上游引物: 5'-GGAG-GTAGTGGAATGGATCCCGCCACCATGTCTGGGGGCA-AATACGTAG-3', 下游引物: 5'-TCACCATGGTGGCGG-GATCTATCTCTTTCTGCGTGCTGATGC-3'。该引物已含交换配对碱基、酶切位点, 并含有目的基因 5'端部分序列用于 PCR 钓取目的基因。采用 PCR 法获取 Cav-1 基因。慢病毒质粒经酶切后琼脂糖电泳回收, PCR 产物 Cav-1 基因交换入线性 GV287 慢病毒质粒, 克隆成 Cav-1 重组慢病毒质粒。经过 PCR 鉴定, 鉴定引物为 Globin-F 上游引物: 5'-ATTCTGAGTCCAAGCTAGGC-3', pEGFP-N-3 下游引物: 5'-CGTCGCGCTCCAGCTC-GACCAG-3', 筛选出阳性克隆。用氯化钙制备新鲜大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 对阳性克隆进行测序鉴定。

1.3.2 Cav-1 重组慢病毒的包装 将处于对数生长期的 293T 细胞接种于 24 孔板中, 每孔细胞数约为 2×10^4 /ml, 37℃、5%CO₂ 培养箱培养至细胞融合度达到约 80%。按照 invitrogen lipofectamine 2000 转染试剂使用说明转染 293T 细胞, 转染 6h 后更换新鲜的完全培养基。

1.3.3 Cav-1 重组慢病毒的功能测定 转染 293T 细胞 24h 后, 观察质粒上荧光标记基因的表达情况, 若荧光率 > 80%, 拍完荧光后补加 500 μ l 正常培养基, 待长满后收集细胞用于 RNA 提取或蛋白质检测。

1.3.4 293T 细胞中 Cav-1 蛋白表达水平检测 采用

Western blot 法收集转染后 24h 的 293T 细胞, 在冰浴条件下用细胞裂解液裂解细胞, 13 000r/min 低温离心, 收集上清液煮沸备用。取 20 μ g 上样量用 10%SDS-PAGE 电泳分离, 400mA 1.5h 转至 PVDF 膜, 用 5%BSA 封闭 2h, Cav-1(1:1 000)4℃孵育过夜, 次日 TBST 洗涤后, 用标记二抗(1:1 000)孵育 2h 后显影。

1.3.5 Cav-1 重组慢病毒质粒的收集、浓缩及滴度测定 收集富含病毒的细胞上清液, 密度梯度离心和超滤去除绝大部分细胞蛋白, 浓缩后得到高浓度重组慢病毒, 分装保存于 -80℃。取少量采用实时定量 PCR 法测定病毒滴度, 用质粒作为标准品设立标准曲线, 待测样品与标准曲线比较后, 得到 Cav-1 重组慢病毒的滴度。

1.3.6 Cav-1 重组慢病毒质粒转染小鼠 将 24 只 C57BL6 小鼠分为阴性对照组、 1×10^8 pfu/鼠组、 5×10^8 pfu/鼠组和 10×10^8 pfu/鼠组 4 组, 每组 6 只。所有小鼠均采用乙醚麻醉, 固定头部使鼻腔垂直向上。阴性对照组用 1×10^8 pfu/鼠浓度的 Cav-1 空载体病毒经鼻腔滴注至肺内, 对肺组织中的支气管平滑肌细胞、肺泡上皮细胞和血管内皮细胞进行转染; 1×10^8 pfu/鼠组、 5×10^8 pfu/鼠组和 10×10^8 pfu/鼠组分别采用 1×10^8 pfu/鼠、 5×10^8 pfu/鼠、 10×10^8 pfu/鼠 3 个梯度的重组慢病毒 Cav-1 经鼻腔滴注至肺内进行转染, 3d 后采用免疫组化法检测肺组织中 Cav-1 的表达情况。

2 结果

2.1 目的载体酶切结果以及目的基因获取 慢病毒载体经 BamHI 酶切电泳后, 为 6kb 左右的载体片段(图 1)。目的基因 Cav-1(NM_007616)经 PCR 扩增后获得 580bp 的片段(图 2)。

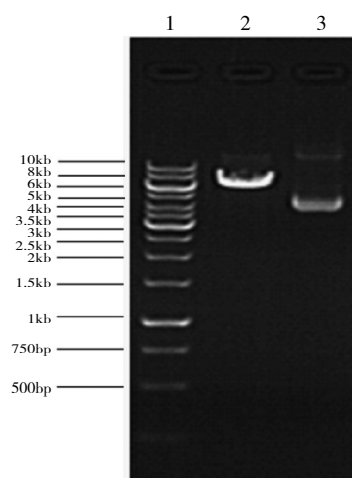


图 1 目的载体酶切电泳图(1: 10kb Marker; 2: 载体酶切电泳; 3: 未酶切载体电泳)

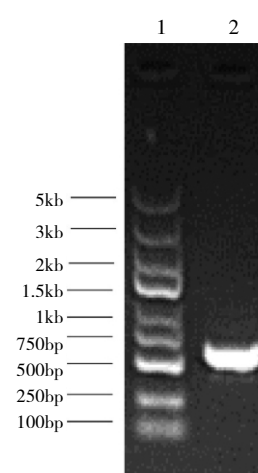


图 2 目的基因 Cav-1 PCR 产物电泳图(1: Marker; 2: Cav-1 产物)

2.2 Cav-1 重组慢病毒构建及 PCR 扩增鉴定测序 PCR 产物交换入线性化表达载体,PCR 鉴定的阳性转化子为 805bp(图 3),经过测序鉴定,序列正确。

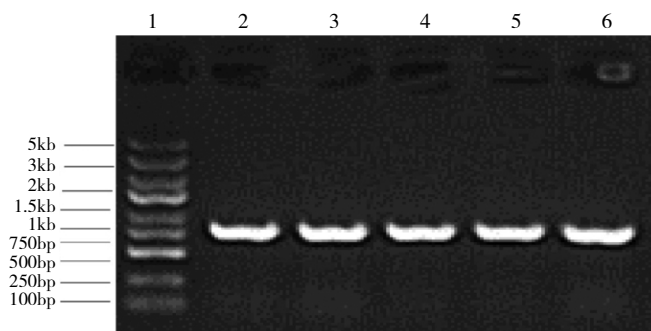


图 3 PCR 扩增鉴定结果(1:Marker;2~6:阳性转化子)

2.3 Cav-1 重组慢病毒转染 293T 细胞及鉴定 Cav-1 重组慢病毒转染 293T 细胞后进行荧光检测,细胞内可观察到明显的荧光(图 4),说明目的质粒转染正常、目的质粒荧光标记基因表达正常。Western blot 法检测 293T 细胞 Cav-1 蛋白表达,目的基因融合蛋白大小为 48kd,结果可见 48kd 附近有特征条带,与目的基因融合蛋白相吻合(图 5)。

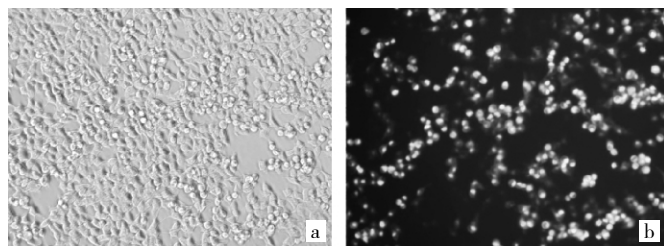


图 4 Cav-1 重组慢病毒转染 293T 细胞的荧光检测(a:明场;b:暗场;荧光显微镜下,×200)

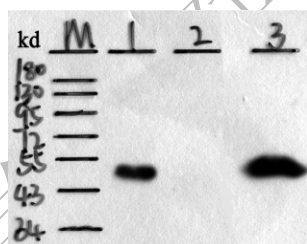


图 5 Western blot 法检测 Cav-1 蛋白表达(M:蛋白 Marker;1: SURVIVIN-3FLAG-GFP 阳性对照;2:未转染 293T 细胞样品;3: Cav-1 重组慢病毒转染 293T 后样品)

2.4 Cav-1 重组慢病毒滴度测定 实时定量 PCR 法检测重组慢病毒滴度,结果得出 Cav-1 重组慢病毒滴度为 1.3×10^{12} copies/ml。

2.5 Cav-1 重组慢病毒在动物体内的验证 Cav-1 重组慢病毒转染 3d 后,免疫荧光显示,小鼠肺组织结构正常,Cav-1 在平滑肌细胞、肺泡上皮细胞和血管内皮细

胞呈现表达,其中阴性对照组 Cav-1 表达稍微弱,随着 Cav-1 重组慢病毒在小鼠体内的浓度升高,其肺组织中 Cav-1 表达也逐渐增高,其中 5×10^8 pfu/鼠组、 10×10^8 pfu/鼠组转染后肺组织 Cav-1 表达水平明显高于 1×10^8 pfu/鼠组和阴性对照组(图 6)。

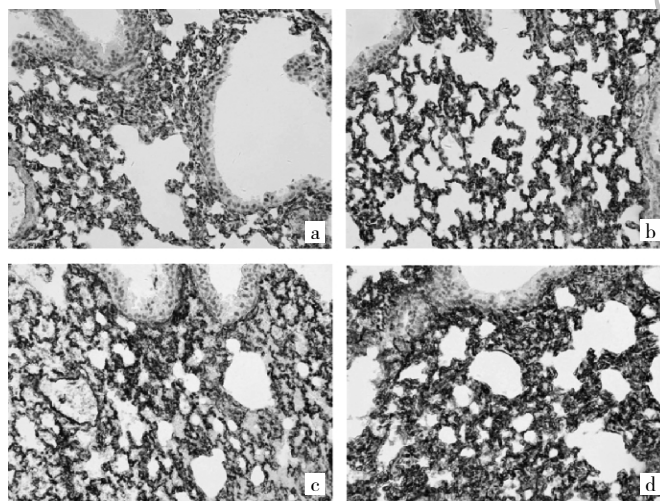


图 6 慢病毒转染小鼠体内肺组织中 Cav-1 的表达情况(a:阴性对照组;b: 1×10^8 pfu/鼠组;c: 5×10^8 pfu/鼠组;d: 10×10^8 pfu/鼠组;免疫组化法,×400)

3 讨论

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的发病过程极其复杂,其机制尚未完全明了,但目前认为肺泡上皮屏障的破坏是其重要的发病机制之一,即肺泡上皮细胞的弥漫性损害,肺泡表面活性物质减少,基底膜通透性增加,导致肺脏实质细胞损伤和肺间质水肿^[2]。Cav-1 是肺泡上皮细胞膜上小窝的主要结构蛋白,处于细胞各路信息平台的中心位置,使得各路信号通路之间相互影响成为可能^[4]。当肺泡上皮细胞受到外界有害物质(如脂多糖)侵袭后,首先激活的是位于细胞膜小窝内的磷脂酶 A2 (PLA2),水解肺泡上皮细胞膜磷脂,造成膜结构和功能破坏,导致渗透性肺水肿;其次 PLA2 启动炎症介质生成,促进炎症介质聚集和活化,并作用于其他细胞如肺泡巨噬细胞、肺血管内皮细胞、中性粒细胞等效应细胞,释放各类炎症介质如 TNF- α 、IL-6 等^[5-6]。这些炎症介质又可激活小窝内各类络氨酸膜类受体及下游分子、G 蛋白偶联受体及下游分子、非受体类络氨酸激酶等。这其中 Cav-1 通过其“脚手架”结构域与各信号通路起到了调节信号传导互通的功能。因此 Cav-1 在急性肺损伤炎症反应中起重要作用。

本实验成功构建 Cav-1 重组慢病毒,为进一步建立

(下转第 1485 页)

- autophagy[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(20): 5639–5649.DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-12-1213.
- [6] Yang Y, Blair HC, Shapiro IM, et al. The Proteasome Inhibitor Carfilzomib Suppresses Parathyroid Hormone-induced Osteoclastogenesis through a RANKL-mediated Signaling Pathway[J]. J Biol Chem, 2015, 290(27): 16918–16928.DOI:10.1074/jbc.M115.663963.
- [7] Liang Y, Fang JQ, Du JY, et al. Effect of Electroacupuncture on Activation of p38MAPK in Spinal Dorsal Horn in Rats with Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 568273. DOI: 10.1155/2012/568273.
- [8] 池里群, 周彬, 高文远, 等. 治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2851–2858.DOI:10.4268/cjcmm.20141512.
- [9] 陈小燕, 张建中, 倪海华, 等. 卡非佐米的药理学及临床研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(9): 717–720.DOI:10.3969/j.issn.1001-8689.2015.09.017.
- [10] Gao M, Chen G, Wang H, et al. Therapeutic potential and functional interaction of carfilzomib and vorinostat in T-cell leukemia/lymphoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 29102–29115. DOI: 10.18632/oncotarget.8667.
- [11] Tang W, Su G, Li J, et al. Enhanced anti-colorectal cancer effects of carfilzomib combined with CPT-11 via downregulation of nuclear factor- κ B in vitro and in vivo[J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 995–1010.DOI:10.3892/ijo.2014.2513.
- [12] Yannaki E, Papadopoulou A, Athanasiou E, et al. The proteasome inhibitor bortezomib drastically affects inflammation and bone disease in adjuvant-induced arthritis in rats[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(11): 3277–3288.DOI:10.1002/art.27690.
- [13] Huang XY, Chen FH, Li J, et al. Mechanism of fibroblast-like synoviocyte apoptosis induced by recombinant human endostatin in rats with adjuvant arthritis[J]. Anat Rec (Hoboken), 2008, 291(8): 1029–1037.DOI:10.1002/ar.20722.
- [14] Akira S. Toll-like receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38105–38108.DOI:10.1074/jbc.R300028200.
- [15] Goh FG, Midwood KS. Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51(1): 7–23.DOI:10.1093/rheumatology/ker257.
- [16] Lu M, Zhang Q, Chen K, et al. The regulatory effect of oxymatrine on the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced MS1 cells[J]. Phytomedicine, 2017, 36(1):153–159. DOI:10.1016/j.phymed.2017.10.001.
- [17] Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways[J]. Science, 2003, 300(5625): 1524–1525.DOI:10.1126/science.1085536.
- [18] van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(3): 164–172. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.4.
- [19] Zhai KF, Duan H, Luo L, et al. Protective effects of paeonol on inflammatory response in IL-1 β -induced human fibroblast-like synoviocytes and rheumatoid arthritis progression via modulating NF- κ B pathway[J]. Inflammopharmacology, 2017, 25(5):523–532. DOI: 10.1007/s10787-017-0385-5.
- [20] Yao RB, Zhao ZM, Zhao LJ, et al. Sinomenine inhibits the inflammatory responses of human fibroblast-like synoviocytes via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. Pharmazie, 2017, 72(6): 355–360.DOI:10.1691/ph.2017.6946.

(收稿日期:2018-08-14)

(本文编辑:陈丽)

(上接第 1479 页)

过表达 Cav-1 的肺泡上皮细胞株及动物小鼠 C57BL/6 的肺损伤模型,研究 Cav-1 在急性肺损伤中肺泡 I 型上皮细胞炎症反应中的作用以及与各信号通路之间的作用和关系提供了实验依据。

4 参考文献

- [1] 高磊,孙耕耘.小窝蛋白-1 的生物学功能及其急性肺损伤[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(12):1919–1921. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2011.12.046.
- [2] 谢曼洁, 王德明. 小窝蛋白-1 在急性肺损伤中的作用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2012, 28(15):2336–2338.
- [3] 洪辉华, 杨瑞超, 蔡宛如. 芪冬活血饮对急性肺损伤大鼠 Cav-1/NF- κ B 炎症反应信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1):239–243.
- [4] Zhang J, Jiang Z, Bao C, et al. Cardiopulmonary bypass increases pulmonary microvascular permeability through the Src kinase pathway: Involvement of caveolin-1 and vascular endothelial cadherin[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(3):2918–2924. DOI: 10.3892/mmr.2016.4831.
- [5] Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lin Z, et al. Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator[J]. Cell Cycle, 2011, 10(11):1784–1793.DOI: 10.4161/cc.10.11.15674.
- [6] Qin L, Zhu N, Ao BX, et al. Caveolae and Caveolin-1 Integrate Reverse Cholesterol Transport and Inflammation in Atherosclerosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 429. DOI:10.3390/ijms17030429.

(收稿日期:2018-11-12)

(本文编辑:陈丽)