

人神经营养索-3 受体基因的扩增及其重组腺病毒载体的构建

王俊梅¹, 曾园山¹, 刘然义², 吴立志², 薛刚², 黄嘉凌², 黄必军², 黄文林²
(中山大学 1.中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室; 2.肿瘤防治中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建人神经营养索-3(neurotrophin-3,NT-3)受体(即酪氨酸蛋白激酶受体 C, tyrosine protein kinase C, TrkC)基因重组的腺病毒表达载体。【方法】从人脑组织 mRNA 中扩增 TrkC 基因全长 cDNA, 定向克隆于穿梭质粒 pShuttle 中, 获得一个带有 CMV 启动子的表达盒。再将表达盒与腺病毒骨架 DNA (Adeno-X viral DNA) 体外连接, 形成重组腺病毒质粒(pAd-TrkC)。用 pAd-TrkC 转染人胚肾 293 细胞后包装成有感染能力的重组腺病毒颗粒(Adeno-TrkC)。【结果】TrkC 基因 RT-PCR 扩增产物为 2 478 bp。Adeno-TrkC 经 PCR 鉴定为正确重组子。【结论】应用体外连接法已构建了人 TrkC 重组腺病毒表达载体, 这为进一步应用 NT-3 进行基因治疗中枢神经损伤奠定了基础。

关键词: 酪氨酸蛋白激酶受体 C; 基因克隆; 重组腺病毒

中图分类号: R322.85

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0493-05

Amplification of Human Neurotrophin-3 Receptor Gene and Construction of Recombinant Adenovirus Expression Vector for TrkC

WANG Jun-mei¹, ZENG Yuan-shan¹, LIU Ran-yi², WU Li-zhi², XUE Gang², HUANG Jia-ling²,
HUANG Bi-jun², HUANG Wen-lin²

(1.Division of Neuroscience, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College; 2.Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To construct a recombinant adenovirus expression vector carrying human neurotrophin-3 (NT-3) receptor TrkC gene. 【Methods】The mRNA were extracted from human brain tissue and the full-length cDNA of human TrkC gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Firstly, an expression cassette with CMV promoter was made by cloning NT-3 into pShuttle vector. Secondly, the expression cassette was ligated to Adeno-X viral DNA to form a recombinant adenoviral plasmid (pAd-TrkC), which was packaged into infectious recombinant adenoviral particles (Adeno-TrkC) by transfecting human embryonic kidney 293 cells. 【Results】The amplified TrkC gene was 2 478 bp in length; Adeno-TrkC was proved to be correct by PCR. 【Conclusion】A recombinant adenovirus carrying TrkC was constructed successfully by in vitro ligation reaction, which may provide the basis for using NT-3 in gene therapy.

Key words: tyrosine protein kinase C (TrkC); gene clone; recombinant adenovirus

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26 (5):493- 497]

用基因修饰细胞移植治疗中枢神经损伤是目前研究的热点之一, 但所运用的多是神经生长因子(NGF)和脑源性神经营养因子(BDNF)等基因。现已证明 NGF 主要作用于感觉神经元, 对运动神经元作用不明显, 而 BDNF 作用的神经元类型范围较为窄小。许多研究认为, 神经营养索-3 (neurotrophin-3, NT-3)对神经元的发育和分化以及对损

伤的中枢神经元存活及其轴突再生有促进作用^[1,2]。有研究表明, NT-3 对脊髓损伤处皮质脊髓束神经纤维的再生有明显促进作用。本课题组先前的研究也显示, NT-3 基因修饰的施万细胞和神经干细胞联合移植能促进脊髓全横断损伤结构与功能的修复; 并见脊髓移植处的神经干细胞更多地分化为神经元样细胞^[3-5]。据认为, 这是 NT-3 基因修

收稿日期: 2004-09-06

基金项目: 国家重点基础研究发展规划基金资助项目(G1999054009); 国家自然科学基金资助项目(30270700); 广东省社会发展攻关基金资助项目(2003C33808)

作者简介: 王俊梅(1970-), 女, 内蒙古包头人, 在职博士生, 讲师; 曾园山, 教授, 博士生导师, 课题负责人, 通讯作者. E-mail:

yzeng@gzsums.edu.cn

饰的施万细胞过量分泌 NT-3 的缘故。已知 NT-3 可以特异激活其分布在神经元细胞膜上的 NT-3 受体 TrkC, 发挥其生物效应作用^[6]。Takahashi 等^[7]已发现, 神经营养因子能使带有 TrkC 的神经干细胞更多地分化为神经元。因此, 本研究试图通过构建人 NT-3 受体 TrkC 基因重组腺病毒表达载体, 为下一步应用人 TrkC 基因修饰的神经干细胞移植到脊髓损伤处, 让含有更多 NT-3 受体的神经干细胞在 NT-3 的作用下分化为神经元, 更好地实现治疗脊髓损伤的目的。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

PCR 仪 (Gene Amp PCR system 9700)、低温离心机 (美国 Beckman)、超高速离心机 (美国 Beckman)、CO₂ 孵箱 (NAPCO)、PRISM377DNA 测序仪 (美国 ABI)、高速台式离心机 5415D (德国 eppendorf) 和 BeckmanDV640 型紫外分光光度仪 (美国 Beckman)。

1.2 载体与菌株

Adeno-X™ Expression System 试剂盒为 Clontech 公司产品, HEK293 细胞株与大肠杆菌 DH5 为中山大学肿瘤防治中心黄文林教授实验室惠赠。

1.3 主要试剂

RT-PCR 试剂盒为 Promega 公司产品, 限制性内切酶 XbaI、KpnI、DNA Marker DL2000、DNA Ligation Kit Ver.2 为大连 Takara 公司产品, DNA Marker 1kb Ladder 为申能博采生物公司产品, 人脑 mRNA 为深圳市君轩生物技术有限公司产品, 质粒提取试剂盒、QIAquick (R) Gel Extraction Kit 为 QIAGEN 公司产品。Agarose Gel 为 Biowest 公司产品, Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.4 方法

1.4.1 引物设计合成 从 GenBank 检索人 TrkC 基因, 针对基因全长, 设计两端引物(引物由上海申弓生物技术有限公司合成)。上游引物: 5' TGTCTAGAAGCAGCGATCGGAGATG3'; 下游引物: 5' ACGGTACCACTAGCCAAGAATGTC 3'。上、下游引物 5' 端分别包含 XbaI 和 KpnI 限制性内切酶切位点, 扩增产物为 2 478 bp。

1.4.2 RT-PCR 取人脑 mRNA 进行反转录, 反应体系参照 Promega 公司 Reverse transcription system 试剂盒说明。42 °C 60 min 反转录, 95 °C 5 min 灭活反转录酶 AMV; 然后做 PCR: 94 °C 1 min、50 °C

1.5 min、72 °C 3.5 min, 35 个循环, 最后 72 °C 10 min。另设一阴性对照, 以双蒸水代替 cDNA, 余相同。反应结束后, 取反应液 5 mL 于 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察结果。

1.4.3 克隆穿梭载体 pShuttle-TrkC 的构建及鉴定 取 RT-PCR 反应液, 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 用 QIAquick(R) Gel Extraction Kit 试剂盒, 割胶纯化目的基因片段。分别用 XbaI 和 KpnI 双酶切目的基因及载体 pShuttle 用 Gel Extraction Kit 试剂盒切胶, 按 DNA Ligation Kit Ver.2 试剂盒说明配制连接反应体系, 16 °C 温育过夜。连接纯化 TrkC 基因和线性化的 pShuttle, 产物按常规方法转化 DH5 菌感受态, 将转化菌涂布于含 20 mg/mL 卡那霉素的 LB 琼脂糖平板, 37 °C 培养过夜。挑取存活的菌落, 扩增并提取质粒, PCR 鉴定及 XbaI 和 KpnI 双酶切鉴定后, 再测序鉴定质粒中目的基因的序列。

1.4.4 重组腺病毒载体 pAdeno-TrkC 的构建及鉴定 将 pShuttle-TrkC 用 I-CeuI 和 PI-SceI 双酶切后, 与 Adeno-X™ Expression System 试剂盒中的腺病毒骨架质粒 (已用 I-CeuI 和 PI-SceI 切开) 连接, 常规方法转化后, 将转化菌涂布于含 50 mg/mL 氨苄的 LB 琼脂糖平板, 37 °C 过夜培养。挑取菌落, PCR 鉴定, 选阳性克隆扩增并提取质粒, I-CeuI 和 PI-SceI 双酶切及 HindIII 和 XhoI 单酶切鉴定, 并测序鉴定。

1.4.5 293 细胞包装 pAdeno-TrkC 用 PacI 酶切成线性后, 用脂质体介导在 24 孔板内转染 HEK293 细胞, 细胞长满后, 转入 25 mL 培养瓶内继续培养, 转染后第 10 天出现 293 细胞病变 CPE (cytopathic effect)。收集病变细胞于 -80 °C /37 °C 反复冻融 3 次获得病毒粗裂解液, 并反复感染 293 细胞扩增病毒。

1.4.6 重组腺病毒的鉴定 (1) PCR 鉴定: 抽提病毒 DNA 为模板, 以目的基因内的一段 112 bp 序列设计两端引物 (引物由上海申弓生物技术有限公司合成) 进行 PCR 鉴定。上游引物为: 5' TTGGATCCTCACCCTGATGACAG3'; 下游引物为: 5' TTGCTGCTTTTGCCTGTGTCTCTG 3'。反应条件为: 94 °C 50 s、55 °C 50 s、72 °C 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 7 min。阳性对照以 pAdeno-TrkC 为模板, 阴性对照以水为模板, 余相同。

2 结果

2.1 RT-PCR

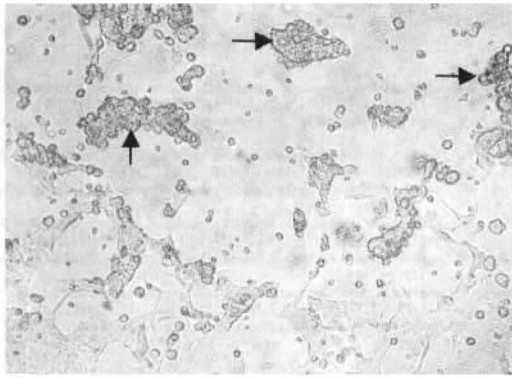


图 4 转染 pAd-TrkC 的 293 细胞出现 CPE

Fig.4 CPE of 293 cells transfected by pAd-TrkC
() showed 293 cells with CPE becoming round and collecting in grape-like

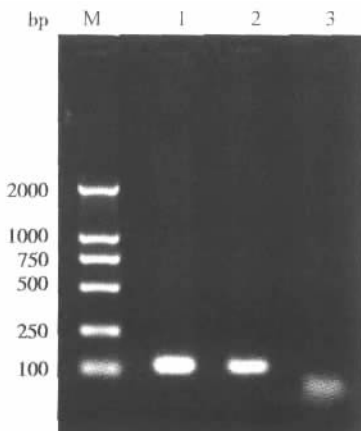


图 5 Ad-TrkC 的 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of Ad-TrkC by PCR

M: DL 2000 DNA marker; 1: positive control; 2: product of PCR; 3: negative control

3 讨论

本研究所用的 Adeno-X 全长 32.6 kb, 它是将 5 型腺病毒 (Ad5)E1 区 (342~3 528 bp) 和 E3 区 (27 865~30 995 bp) 缺失, 本研究将人 TrkC 表达盒替代腺病毒基因组 DNA 的 E1 区, 因此 TrkC 基因由 CMV 启动子控制, 由此得到的是 E1 区缺失的复制缺陷型腺病毒。由于人胚肾 293 细胞基因组上有整合 Ad5E1 区的基因, 因而 Adeno-TrkC 需通过感染方式进入 293 细胞内大量复制。但对非 293 细胞(普通细胞)仅可一次性感染而不能复制, 这是重组腺病毒用于基因治疗的安全性保证。腺病毒作为神经营养素-3(NT-3)受体 TrkC 基因的表达载体具有一些优点: 如具有较广的敏感谱, 既能感染分裂细胞, 也能感染分化后非分裂状态的细胞, 这比用逆转录病毒作为表达载体更具应用性;

能获得较高的感染率; 能容纳大片段的外源基因; 无外源基因插入靶细胞基因组引起基因突变的危险。由于腺病毒携带的基因组主要是以游离附加体形式存在于细胞质中, 不能整合到靶细胞的基因组, 因此认为腺病毒携带的目的基因只能表达一段时间。

构建带有目的基因的表达载体往往是整个过程的难点, 本研究借助体外连接法已构建了人 TrkC 重组腺病毒表达载体 Adeno-TrkC。这与其它构建重组腺病毒表达载体的方法相比, 较为简易, 成功机会较高。此外, 本研究应用 Adeno-X 表达系统, 将腺病毒作为基因转移载体 (Adeno-X), 借助体外连接法用于重组腺病毒的构建。因此只需将携带的目的基因表达盒与腺病毒骨架 DNA 连接, 就能形成重组腺病毒质粒 pAd-TrkC^[9], 这可避免在重组过程中目的基因产生突变, 因而显得更为安全可靠。

TrkC 是 Trk 受体的一种, 它们由胞外一个大的糖基化的配体结合区、跨膜区和胞内区组成, 其中胞外区含亮氨酸富集结构和免疫球蛋白域。Trk 受体是通过其免疫球蛋白域和配体相互作用^[9], 这种配体结合域为晶体结构^[10]。高亲和力的 Trk 受体与神经营养因子 (NTFs) 结合后, 形成二聚体并被激活, 通过 Trk 受体的磷酸化过程进行细胞内信号传导, 产生生物效应。在没有 NTFs 的情况下, 高密度表达的 Trk 受体还可通过相互作用引发自动磷酸化而被激活^[11]。Trk 受体介导的信号转导有 Ras 信号途径、PI3K 信号途径和 PLC-1 信号途径。在大多数神经元内, NTFs 与 Trk 受体结合能提高神经元的存活^[12,13]。

Trk 受体分 TrkA、TrkB 和 TrkC 三种。一般认为, NGF 与 TrkA 结合, BDNF 和 NT-4/5 与 TrkB 结合, 而只有 NT-3 能与 TrkC 结合^[14]。Castellanos 等^[15]将 TrkC 基因逆转录病毒感染神经干细胞移植到正常大鼠脊髓内, 发现移植前在体外用 NT-3 预处理的神经干细胞可过量表达 TrkC, 结果这种神经干细胞移植到脊髓后其存活率可达到 100%。如果缺少 NT-3 或 TrkC 任何一个因素时, 神经干细胞的存活率只有 30%~50%。且两者联合应用可减少神经干细胞向星形胶质细胞分化, 促进其更多地向神经元分化。因此认为, TrkC 过量表达促进移植的神经干细胞在脊髓内存活和迁移, 这提示 TrkC 基因修饰神经干细胞与神经营养因子联合应用可能是脊髓损伤后神经环路修复的有效治疗策略。

在成年哺乳动物中枢神经中, 受损伤的神经

纤维之所以不能再生的另一个重要的原因是中枢神经微环境缺乏神经营养因子。如果将 NT-3 受体 TrkC 基因的重组腺病毒在体外感染神经干细胞后再移植到中枢神经损伤处,同时联合移植 NT-3 基因重组腺病毒感染的施万细胞,目的是通过 NT-3 在损伤处过量表达更好地促进神经纤维再生^[3];同时诱导带有 NT-3 受体(TrkC)的神经干细胞更好地向神经元分化,生长出轴突,建立突触联系,在损伤处形成神经元网络,起传导神经冲动的桥梁作用。这是本课题组治疗脊髓全横断损伤的主要策略。本研究虽然已构建了带有人 TrkC 基因的表达载体,为实现基因治疗脊髓全横断损伤的策略打下良好基础,但是下一步还要对此表达载体进行功能方面的检测。

参考文献:

- [1] Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, et al. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion[J]. *Nature*, 1994, 367(6459):170-3.
- [2] Senut M C, Tuszynski M H, Raymon H K, et al. Regional differences in responsiveness of adult CNS axons to grafts of cells expressing human neurotrophin 3 [J]. *Exp Neurol*, 1995, 135(1):36-55.
- [3] 郭家松,曾园山,李海标,等.NT-3 基因修饰施万细胞与神经干细胞联合移植治疗全横断脊髓损伤的 implementation 研究[J].*解剖学报*, 2003, 34(5):466.
- [4] 郭家松,曾园山,李海标,等.神经干细胞与 NT-3 基因修饰雪旺细胞联合移植促进全横断脊髓损伤大鼠功能修复的实验研究[J].*中国康复医学杂志*, 2005, 36(5):323-6.
- [5] 吴立志,曾园山,丁英,等.施万细胞移植治疗脊髓全横断损伤后大脑皮质锥体神经元和红核神经元的存活[J].*中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(1):10-4.
- [6] Ren ZG, Porzgen P, Zhang JM, et al. Autocrine regulation of norepinephrine transporter expression [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 17(3):539-50.
- [7] Takahashi J, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell culture [J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1):65-81.
- [8] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5):2509-14.
- [9] Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, et al. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors [J]. *J Biol Chem* 1998, 273(10):5829-40.
- [10] Ultsch M H, Wiesmann C, Simmons L C, et al. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC[J]. *J Mol Biol* 1999, 290(1):149-59.
- [11] Friedman W J, Greene L A. Neurotrophin signaling via Trks and p75[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1):131-42.
- [12] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24:677-736.
- [13] Sofroniew M V, Howe C L, Mobley W C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection and neural repair [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24:1217-81.
- [14] Lindsay R M, Wiegand S J, Altar C A, et al. Neurotrophic factors: from molecule to man[J]. *Trends Neurosci*, 1994, 17(5):182-90.
- [15] Castellanos D A, Tsoulfas P, Frydel B R, et al. TrkC overexpression enhances survival and migration of neural stem cell transplants in the rat spinal cord[J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(3):297-307.

(编辑 张恩健)