

携带人胰岛素样生长因子-1重组腺病毒的构建和鉴定

黄宗强, 刘尚礼, 郑召民, 沈慧勇, 黄东生, 崔力扬
(中山大学附属第二医院骨科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】采用 Cre-LoxP 同源重组系统构建并鉴定携带人胰岛素样生长因子-1(human insulin-like growth factor-1, hIGF-1) 目的基因的复制缺陷重组腺病毒, 为椎间盘退变的 hIGF-1 基因治疗奠定基础。【方法】PCR 合成 hIGF-1 基因, 用 pMD18-T 载体克隆 hIGF-1 目的基因, 酶切、测序并进行 NCBI BLAST 相似性在线分析。将 pMD18-T-hIGF-1 和 pDNR-1r 质粒分别行 EcoR I 和 BamH I 双酶切, DNA 连接酶连接双酶切产物, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 合成中间载体 pDNR-hIGF-1, 酶切鉴定。Cre-loxP 系统介导 pDNR-hIGF-1 和 pInt. AV1. SpaT 同源重组形成 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组表达质粒, 行 EcoR I 酶切鉴定。复苏 293 细胞, 将 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 和 pInt. B. B 质粒在 293 细胞内进行同源重组成含 hIGF-1 基因的复制缺陷重组腺病毒。倒置显微镜观察 293 细胞病变样效应(cytopathogenic effect, CPE); 透射电镜观察 293 细胞中的病毒颗粒; 提取细胞裂解液中病毒 DNA, PCR 鉴定 hIGF-1 目的基因的存在; Western blot 检测 hIGF-1 蛋白表达。用半数组织培养感染量(tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀)方法测定重组腺病毒的滴度。【结果】克隆的 hIGF-1 目的基因经 NCBI BLAST 相似性在线分析证实与 Homo sapiens IGF-1 (GI: 19923111) 完全相同。pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 酶切鉴定, 出现 5.4 kb 和 1 kb 两条片段, 与理论值完全相符。转染 293 细胞 12~14 d 后, 大部分细胞出现肿胀, 脱落等细胞病变样效应。PCR 鉴定细胞裂解液中含有 hIGF-1 目的基因。Western blot 证实重组腺病毒表达 hIGF-1 蛋白。第 2 代腺病毒的滴度为 80×10^6 PFU/mL。【结论】成功构建出含有 hIGF-1 目的基因的复制缺陷重组腺病毒。

关键词: 腺病毒; 胰岛素样生长因子; 克隆, 分子

中图分类号: Q132.1+4

文献标识码: A

文章编号: 1643-3554(2004)01-0045-07

Construction and Identification of Adenovirus with Human Insulin-like Growth Factor-1 Gene

HUANG Zong-qiang, LIU Shang-li, ZHENG Zhao-min, SHEN Hui-yong,
HUANG Dong-sheng, CUI Li-yang

(Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To construct and identify replication defective adenoviral vectors with human insulin-like growth factor-1 gene of interest for hIGF-1 gene therapy of intervertebral disk degeneration by Cre-LoxP homologous recombination system, in order to lay a basis for hIGF-1 gene therapy of intervertebral disk degeneration. 【Methods】hIGF-1 gene of interest was synthesized by polymerase chain reaction(PCR) and cloned with pMD18-T vector. The cloned hIGF-1 cDNA fragments were sequenced and similar analysis was done with NCBI BLAST technique in the internet. The pMD18-T-hIGF-1 and empty plasmid pDNR-1r were digested by EcoR I and BamH I, ligated and transformed competence *E. coli* DH5 α . Positive recombinants were identified by EcoR I and BamH I digestion. pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 was synthesized by homologous recombination of pDNR-hIGF-1 and

收稿日期: 2003-11-13

基金项目: 广东省科技攻关基金资助项目(C30702); 中山大学重点启动基金资助项目(F002003039)

作者简介: 黄宗强(1971-), 男, 河南信阳人, 博士, 主治医师; 刘尚礼, 教授, 导师. E-mail: gzhuangzq@163.com

pInt. AV1. SpaT with Cre-loxP system and identified by *EcoR* I digestion. Replication defective adenovirus with *hIGF-1* gene was synthesized by cotransfection of pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 and pInt. B. B plasmids into 293 cells. Cytopathogenic effects were observed through invert microscope. Adenovirus inclusions were observed through transmission electron microscope. Adenovirus DNA was extracted from cell lysis, *hIGF-1* gene was identified with PCR technique. hIGF-1 protein expression was identified by Western blot technique. The second generation adenovirus titers were tested by tissue culture infection dose 50(TCID₅₀) method. 【Results】The synthesized *hIGF-1* gene of interest had the same sequence as that of Homo sapiens (GI: 19923111). Both fragments of 5 400 and 1 000 base pairs were seen by restriction endonuclease digestion of pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 as expected. Cytopathogenic effects including cell swelling and shedding were observed in most of 293 cells 12 ~ 14 days after transfection. *hIGF-1* gene existed in the cell lysis. Hexahedron adenovirus inclusions were found in the cytopathic 293 cellular nuclei. *hIGF-1* gene existed at recombinant adenovirus. Recombinant adenovirus expressed hIGF-1 protein. The second generation adenovirus titers were 80×10^6 PFU/mL. 【Conclusion】Replication defective adenovirus with *hIGF-1* gene of interest has been constructed successfully.

Key words: adenovirus; insulin-like growth factor-1; cloning, molecular

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(1):45-51]

人胰岛素样生长因子-1(human insulin-like growth factor-1, hIGF-1)是一种由 70 个氨基酸组成的多肽,相对分子质量 $M_r = 7.6 \times 10^3$ 。血清中游离存在的 hIGF-1 与胰岛素样生长因子受体-1(insulin-like growth factor receptor-1, IGF-1r)结合能够促进椎间盘细胞增生,促进蛋白多糖(proteoglycan, PG)和 II 型胶原合成。腺病毒载体是椎间盘退变(intervertebral disk degeneration, IVDD)基因治疗的常用载体,但携带 *hIGF-1* 基因的重组腺病毒用于 IVDD 的基因治疗尚未见报道,因此构建携带 *hIGF-1* 基因的重组腺病毒,无疑对研究 *hIGF-1* 基因在 IVDD 中所发挥的分子机制及生物学效应的基础研究,以及 IVDD 基因治疗的临床应用研究提供重要的实验基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株

①菌株:大肠杆菌 DH5 α 、Top10 菌株、大肠杆菌 BNN132(非重组酶缺陷型)为本实验室保存;293 细胞株购自美国拓普基因公司。②质粒:pDNR-1r 质粒(Cre-loxP 系统的供体分子)、pInt. AV1. SpaT 质粒(Cre-loxP 系统的受体分子)、pInt. B. B 质粒(含腺病毒骨架基因)购自广州拓谱公司;pMD18-T 载体购自 Takara(大连)公司。

Lipofectamine 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *PML* I、*Pac* I 购自 New England Biology 公司。*EcoR* I、*BamH* I,其它限制性内切酶、T₄ DNA ligase、Ex TaqDNA 及 marker 购自 TaKaRa(大连)公司。QIAGEN Plasmid Mini Kit, QIAGEN Gel Extraction Kit 购自美国 QIAGEN 公司。UNI-Q-10 病毒 DNA 提取试剂盒购自上海申工生物技术公司。Western blot 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司

1.3 携带 *hIGF-1* 基因重组腺病毒载体的构建

1.3.1 *hIGF-1* 基因的克隆和鉴定 通过 PCR 方法合成 *hIGF-1* 功能基因序列(编码分泌肽和成熟肽的 cDNA 序列)。基因合成方法:将 *hIGF-1* 功能基因序列拆分成 8 个片段,分别命名为 GF 1、GF 2、GF 3、GF 4、GF 5、GF 6、GF 7 和 GF 8,人工合成。再将 GF 1 ~ GF 4 为一组进行 PCR 反应,条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;反应产物行琼脂糖电泳分析,回收条带。GF 5 ~ GF 8 按照同样程序操作。回收的两段 DNA,等体积混合,再按照上述的 PCR 条件,合成完整的 hIGF-1 功能基因序列。用 pMD18-T 载体进行克隆。用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切鉴定;测序并将测序结果行 NCBI BLAST 相似性在线分析。

1.3.2 中间载体 pDNR-hIGF-1 的构建 分别用

含 pDNR-1r、pMD18-T-hIGF-1 质粒的菌液铺板,挑取单克隆,摇菌。按照 QIAGEN Plasmid Mini Kit 操作规程提取 pDNR-1r、pMD18-T-hIGF-1 质粒 DNA。电泳观察质粒 DNA 的量决定酶切反应体系。用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 pDNR-1r 质粒、pMD18-T-hIGF-1 质粒。按照 QIAGEN Gel Extraction Kit 回收大小约 4 kb 左右两端具有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 黏性末端的 pDNR-1r 和约 400 bp 两端带有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 黏性末端 *hIGF-1* 基因片段。用 T4 DNA ligase 连接 pDNR-1r 和 *hIGF-1* 基因片段成 pDNR-hIGF-1,再用 pDNR-hIGF-1 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选单克隆,摇菌,提取菌液上清 DNA,PCR 鉴定;抽提质粒 DNA,酶切鉴定。

1.3.3 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组表达质粒的构建及鉴定 通过 Cre-loxp 系统介导 pDNR-hIGF-1 之间的重组,获取 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组质粒。具体操作如下:将 pDNR-hIGF-1 20 μ L、pInt. AV1. SpaT 20 μ L 和 BNN132 感受态细胞 200 μ L 组成转化体系,冰上放置 30 min,42 $^{\circ}$ C 水浴 40 s,冰上放置 3~5 min 后,加入 800 μ L 的 LB,37 $^{\circ}$ C,(150 \times g)~(200 \times g) 震荡培养 60 min,以表达氯霉素抗性基因。取 200 μ L 转化液涂布于氯霉素抗性选择平板(含 70 g/L 蔗糖),37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑选单克隆,摇菌扩增,提取质粒 DNA,进行酶切鉴定。酶切鉴定正确行测序证实。

1.3.4 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组表达质粒的体外包装 冻存的 293 细胞 37 $^{\circ}$ C 水浴解冻后,用 DMEM (含 φ = 10% FBS) 培养。细胞达到 70%~80% 融合后,用 0.5 mg/L 胰酶 + 0.2 mg/L EDTA 消化 50 s,将细胞一分十传入 25 mL 的培养瓶中,细胞数密度为 0.5 $\times 10^6$ /L,继续培养 24 h,细胞达到 60% 左右融合后用脂质体介导转染。具体转染方法:① 移去含血清的培养基,加入 4 mL 无血清、无抗生素的 Opitonal-MEM 培养基温浴 35 min。② 在 Eppendorf 管(EP 管)中配置 DNA/脂质体复合物:用 *Pac* I、*PML* I 双酶切 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1,用 *Cla* I 酶切 pInt. B. B 质粒。将 4 μ g 的 pInt. B. B / *Cla* I 和 2 μ g 的 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 / (*Pac* I + *PML* I) 在 EP 管中混合,在上述混合液中加入 200 μ L 的 opitonal-MEM; 在另一只 EP 管中加入 10 μ L 脂质体和 200 μ L 的 opitonal-MEM; 将上述两管混合,室温孵育 45 min。③ 取出孵育的

293 细胞,再加入 1.6 mL 的培养基,逐滴缓慢加入 400 μ L DNA/脂质体复合物,轻轻振荡。④ 在 37 $^{\circ}$ C、 φ = 5% CO₂ 培养箱中培养 3 h 后更换为 DMEM 完全培养基,孵育过夜。⑤ 移去 DMEM/DNA/脂质体的混合物,加入 DMEM (含 φ = 10% FBS) 继续培养,每天根据培养基的颜色判断是否需要换液。观察细胞病变。10~12 d 后,大部分细胞出现细胞病变效应(CPE),倒掉培养液,用细胞刮刀将细胞刮至培养瓶一侧,收集细胞,25 mL 的培养瓶用 2 mL 磷酸缓冲溶液(PBS)洗涤、离心。37 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,从中取出 0.5 mL 病毒上清转染融合达 70% 左右的 293 细胞进行第 2 代病毒扩增。其余 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 重组腺病毒载体的鉴定

1.4.1 倒置显微镜观察细胞病变 病毒转染 293 细胞后,开始 3 d 不动,以后每天在倒置显微镜下观察 293 细胞形态,进而判断重组腺病毒的包装情况。

1.4.2 透射电镜观察重组腺病毒 293 细胞按 0.1 $\times 10^9$ /L 传代至 6 孔板中,当细胞融合达到 80%~90% 时用第 2 代病毒上清转染 4 孔,另两孔设为阴性对照。4 d 后,转染细胞出现完全 CPE。分别收集处理组和对照组 293 细胞于 15 mL 的离心管中,离心去上清,30 g/L 戊二醛固定,PBS 冲洗,脱水,环氧树脂包埋后,切片、电镜检查。

1.4.3 重组腺病毒的 PCR 鉴定 按照 UNIQ-10 病毒 DNA 提取试剂盒操作步骤提取第 2 代病毒上清中的病毒 DNA。用 *hIGF-1* 基因合成时的 GF1 和 GF6 分别为上下游引物,PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 2 min、72 $^{\circ}$ C 2 min、30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 样品,20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。上游引物:5'TGATGAATTCATGGGAAAAATCAGCAGTCTTCCAACCCAATTATTTAAGTGCTGCTTTT G3'; 下游引物:5'ACGATGCCTGTCTGAGCCGCCCTCCGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGCTGTG AAA 3'。

1.4.4 SDS-PAGE、Western blot 检测 hIGF-1 的表达 在 24 孔板中,每孔接种 0.5 $\times 10^6$ 293 细胞,当细胞融合达到 80% 左右,用 200 μ L 第 2 代病毒上清转染,37 $^{\circ}$ C、 φ = 5% CO₂ 培养箱中继续培养 48~72 h,观察 CPE。出现完全 CPE 后,取 400 μ L 的培养上清转移到 1.5 mL 离心管中,800 r/min

离心 5 min(型号 L×J-II 10989, $r = 10$ cm), 弃上清, 加入 20 μ L PBS 重悬。加入 20 μ L 2×上样缓冲液, 煮沸 5 min。上样进行 SDS-PAGE 电泳; 将其中一块凝胶浸入 2.5 g/L 考马斯亮蓝染色, 观察蛋白条带。另一张凝胶进行 Western blot 检测 hIGF-1 的表达: 将与凝胶一样大小的滤纸及 PVDF 膜分别浸入缓冲液 A、B、C 中 15 min, 将凝胶置入缓冲液 C 中 15 min。从电极板的负极到正极依次放置滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸, 用针在凝胶上做记号, 各层之间不可留有气泡。用 25 V×45 min 通电进行蛋白转移。转印过蛋白的膜按试剂盒操作程序进行 hIGF-1 表达的检测。

1.5 含 hIGF-1 重组腺病毒滴度测定

用半数组织培养感染量 (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀) 方法测定第 2 代重组腺病毒的滴度, 具体方法如下: ① 在 2×96 孔平底板中每孔加入 293 细胞 100 μ L (10×10³ 个细胞); ② 准备病毒稀释液: 在无菌 EP 管中准备 8 个系列病毒稀释液, 在第 1 个 EP 管中加 0.9 mL 其它各管加 1.35 mL DMEM (含 $\varphi = 10\%$ FBS), 在第 1 管中加 0.1 mL 病毒储液, 混匀。取出 0.15 mL 10⁻¹ 稀释液并转移到第 2 个 EP 管, 重复稀释到第 8 个稀释度。③ 96 孔板的每一行, 从 #1 ~ #10 每孔分别加入 100 μ L (每个稀释度 10 孔) 至第 8 个稀释度。纵行 #11 和 #12 用做阴性对照, 每孔加入 100 μ L DMEM (含 $\varphi = 10\%$ FBS)。④ 平板放在 37 °C $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养箱中培养 10 d, 观察细胞病变。

2 结果

2.1 hIGF-1 基因的克隆和鉴定

将合成的 hIGF-1 基因连接到 pMD18-T 克隆, 菌液经全自动测序, 用 NCBI BLAST 进行相似性在线分析, 发现与报道的 Homo sapiens IGF-1 (GI: 19923111) 的序列完全相同。用 EcoR I 和 BamH I 对 pMD18-T-hIGF-1 进行双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示两条带, 分别位于 2 000 bp 和 350 bp 处, 与理论值完全相符(图 1)。

2.2 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组质粒的鉴定

pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 为 6.4 kb 的重组质粒, 含有两个 EcoR I 酶切位点, 酶切可产生 5.4 kb 和 1 kb 两片段, 电泳鉴定结果与预期值完全相符(图 2)。再次测序, NCBI BLAST 在线分析, 与 Homo

sapiens IGF-1 (GI: 19923111) 的序列完全相同。

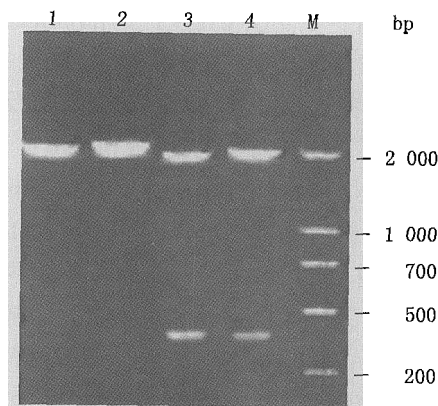


图 1 重组质粒 pMD18-T-hIGF-1 的酶切鉴定

Fig. 1 Endonuclease identification of recombinant plasmid pMD18-T-hIGF-1 (8 g/L agarose gel electrophoresis) Lane 1, 2: pMD18-T; Lane 3, 4: pMD18-T-hIGF-1 digested by EcoR I + BamH I; M: DL2000 DNA marker

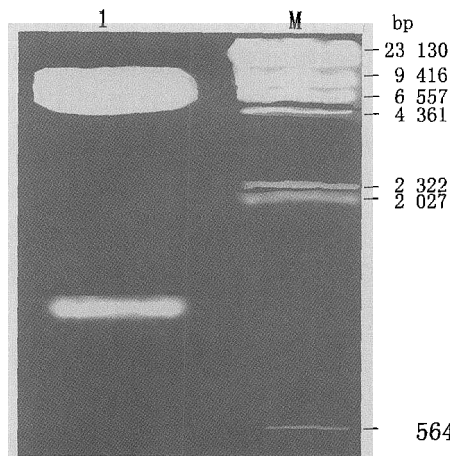


图 2 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction identification of recombinant plasmid pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 (10 g/L agarose gel electrophoresis)

Lane 1: pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 digested by EcoR I; M: λ -Hind III digest marker

2.3 倒置显微镜观察

正常 293 细胞呈多角形、不规则形, 细胞之间分界明显, 贴壁能力较强。第 1 代病毒转染 4 d 后, 293 细胞出现腺病毒感染的早期病变, 少量细胞变圆但不脱落, 7 d 后, 培养瓶有肉眼可见的蚀斑形成, 以后病变的细胞逐渐增多呈葡萄串状脱落, 12~14 d 后, 几乎所有细胞均变圆、脱落(图 3)。

2.4 电子显微镜观察

正常的 293 细胞细胞膜、胞核和细胞器完整。出现病变的 293 细胞细胞膜、核膜破裂, 细胞浆、细

胞核内出现大量的正六面体的病毒晶格状的包涵体(图 4)。

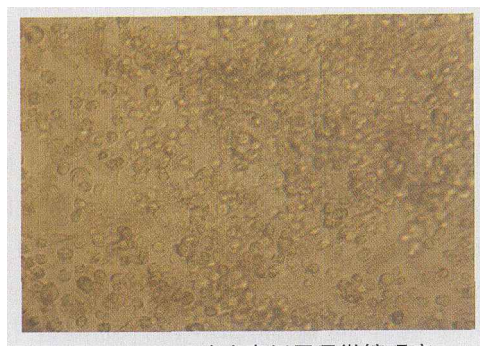


图 3 重组腺病毒倒置显微镜观察

Fig. 3 Invert microscope observation of Cytopathogenic 293 cells ($\times 400$)

Cytopathogenic 293 cells looked like round swelling and thysitorm

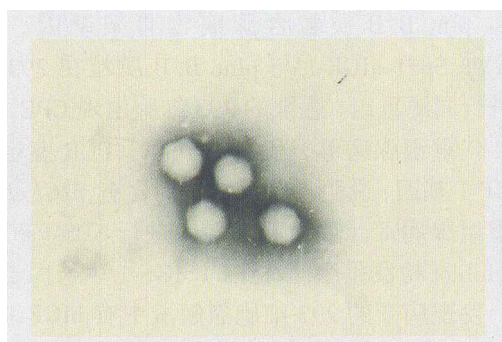


图 4 重组腺病毒的电镜观察

Fig. 4 Transmission electron microscope observation of recombination adenovirus ($\times 8\ 000$)

Hexahedron adenovirus inclusions were found in cytopathogenic 293 cellular nuclei

2.5 重组腺病毒 PCR 鉴定

分别提取出现病变的 293 细胞、正常 293 细胞的 DNA, PCR 后, 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在约 300 bp 处病变的 293 细胞出现条带(图 5)。

2.6 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

与正常 293 细胞裂解液中的蛋白条带相比, 病毒上清液中蛋白经煮沸裂解后 SDS-PAGE 在约 $M_r = 7.6 \times 10^3$ 处出现条带, Western blot 进一步证实(图 6)。

2.7 第 2 代重组腺病毒的滴度测定

第 2 代重组腺病毒用 TCID₅₀ 方法测定, 10 d 后在倒置显微镜下读板, 观察 CPE, 计数每行的阳性孔的百分率。本实验测定第 2 代重组腺病毒滴度 (T) = 80×10^6 PFU/mL。

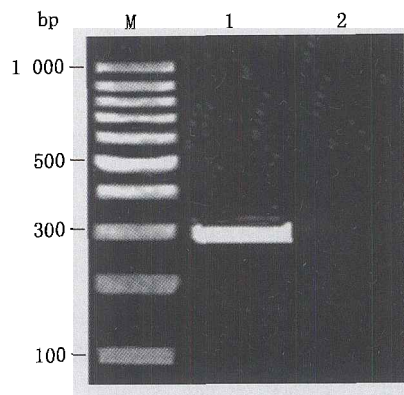


图 5 重组腺病毒 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant adenovirus with PCR (20 g/L agarose gel electrophoresis)

M: 1 000 bp DNA ladder; Lane 1: cytopathogenic 293 cells; Lane 2: normal 293 cells

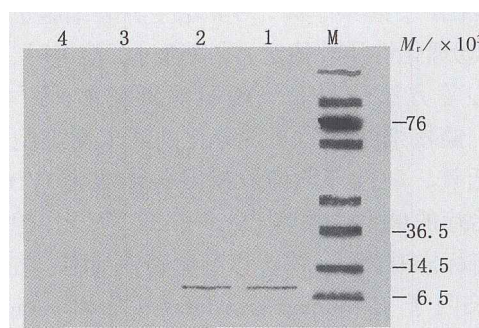


图 6 重组腺病毒 Western blot 鉴定

Fig. 6 hIGF-1 growth factor expression of recombinant adenovirus with Western blot technique

M: broad range biotinylated protein marker; Lane 1, 2: cytopathogenic 293 cells; Lane 3, 4: normal 293 cells

3 讨 论

目的基因的选择是制约 IVDD 的基因治疗能否成功的关键之一。hIGF-1 是一种由 70 个氨基酸组成的多肽, $M_r = 7.6 \times 10^3$ 。主要由肝脏产生, 分泌到血液中, 大部分与胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) 结合无生物学作用, 少部分以游离形式存在, 与 IGF-1r 结合促进髓核细胞分泌 PG, 刺激纤维环细胞、髓核细胞再生^[1]。Okuda 等^[2]体外培养不同年龄鼠的椎间盘细胞, 发现 IGF-1 对 PG 合成的影响与 IGFBP 合成呈负相关、与 IGF-1r 合成呈正相关。Osada 等^[3]研究认为在牛的椎间盘组织中, 随着年龄的增长, IGF-1 和 IGF-1r mRNA 的表达下降, IGF-1 与 PG 的合成存在剂量依赖关系, IGF-1 剂量

越高,PG 合成越高,但 100 ng/L IGF-1 为刺激髓核细胞合成 PG 最适质量浓度。Gruber 等^[4]研究认为 hIGF-1 能逆转椎间盘软骨样细胞凋亡。以上研究说明 IGF-1 蛋白能够促进椎间盘细胞分泌 PG, 逆转 IVDD,故选择 hIGF-1 基因。

载体的选择是制约 IVDD 的基因治疗能否成功的又一关键。IVDD 的基因治疗常用载体是病毒载体。Wehling 等^[5]用逆转录病毒分别将 *LacZ*、*IL-1Ra* 基因转移到椎间盘软骨终板细胞,发现 *LacZ* 标志基因转染率约 1%。转入 *IL-1ra* 编码基因 48 h 后, 10^6 个细胞产生 *IL-1Ra* 24 $\mu\text{g/L}$ 。说明在 IVDD 的基因治疗中, 逆转录病毒载体转染率较低。与逆转录病毒载体相比,腺病毒载体具有以下优点: ①腺病毒载体比较容易制备和操作; ②宿主范围广、感染率高,对非增生分裂细胞也有感染性; ③理化性质较稳定,可以通过沉淀、柱层析或超离心等方法获得高滴度腺病毒载体。纤维环细胞、髓核细胞均为高度分化的终末期细胞,椎间盘低氧、酸性环境使腺病毒载体成为 IVDD 的基因治疗的最主要载体^[6]。Nishida 等^[7,8]用腺病毒载体将标志基因 *LacZ* 转移至兔髓核细胞,将人转化生长因子 β_1 (human transforming growth factor- β_1 , hTGF- β_1)、荧光素酶标志基因(luciferase)直接注入新西兰大白兔椎间盘局部,结果显示与对照组相比,在椎间盘中, hTGF- β_1 呈强染色,髓核组织中,活化的 hTGF- β_1 增加 30 倍; hTGF- β_1 总量(潜活 + 活化的 hTGF- β_1)增加 5 倍($P < 0.05$); PG 增加 2 倍($P < 0.05$)。Moon 等^[9]从手术摘除椎间盘组织中分离髓核细胞,单层培养。用腺病毒载体将 *LacZ* 基因、luciferase 基因转染到髓核细胞,结果显示:髓核细胞的基因转染率与 *LacZ* 基因腺病毒的滴度存在剂量依赖关系,髓核细胞 100% 转染的最适滴度为 75×10^{10} PFU / L。Luciferase 基因转染后,细胞转染数 2 d 最高,持续表达可达 21 d。Tan 等^[10]亦构建成 hTGF- β_1 基因重组腺病毒载体(Ad/CMV-hTGF- β_1)。Zhao 等^[11]用 Ad/CMV-hTGF- β_1 转染体外单层培养的人髓核细胞,发现 hTGF- β_1 基因对髓核细胞转染率为 30% 左右。Saxer 等^[12]用腺病毒介导的 IGF-1 基因转染关节的滑膜细胞,发现 IGF-1 能够促进滑膜细胞产生 PG。但尚未见到腺病毒介导的 IGF-1 基因转染髓核细胞和/或直接注射椎间盘的报道。

为了使外源的 hIGF-1 基因转染髓核细胞后能

够分泌到细胞外发挥生物学作用,在编码 210 bp 成熟肽序列之前加上 154 bp 的信号肽序列。本研究采用 PCR 合成、pMD18-T 克隆 hIGF-1 功能基因片段(含成熟肽和分泌肽 cDNA 序列),酶切、测序并行 NCBI BLAST 相似性在线分析,发现与报道的 Homo sapiens IGF-1 (GI: 19923111) 的序列完全相同。说明 hIGF-1 可以通过 PCR 技术体外正确合成。与从肝脏中通过 RT-PCR 技术扩增目的基因相比,具有以下优点: ①避免 RNA 提取过程中的 mRNA 降解。②操作简单,实验周期短。将获得目的基因 hIGF-1 与中间载体 pDNR-1r 载体连接成 pDNR-hIGF-1, 该载体含有 lox P 位点,与 pInt. AV1. SpaT 载体上的 lox P 位点在 Cre 重组酶作用下,形成 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1, 酶切鉴定证明转化子中的重组质粒为含有 hIGF-1 基因的重组质粒。pInt. B. B 质粒含腺病毒骨架基因,将 pInt. AV1. SpaT-hIGF-1 与 pInt. B. B 质粒在 293 细胞中进行同源重组,感染的 293 细胞出现 CPE,提取第 2 代重组腺病毒裂解液中 DNA, PCR 鉴定含有 hIGF-1 基因,说明已获得成熟的含有 hIGF-1 基因的重组腺病毒。重组腺病毒又进行 SDS-PAGE、Western blot 检测重组病毒中的 hIGF-1 生长因子的表达,发现病变的 293 细胞裂解液中有 hIGF-1 生长因子的表达,而正常的 293 细胞中没有 hIGF-1 生长因子的表达。本实验构建的第 2 代病毒的滴度为 80×10^6 PFU/mL。为本课题的下一步——IVDD 的 hIGF-1 基因治疗的动物实验奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] 郑召民, 黄宗强, 刘尚礼. 椎间盘再生研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(5): 341-2.
- [2] Okuda S, Myoui A, Ariga K, et al. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells [J]. Spine, 2001, 26(22): 2421-9.
- [3] Osada R, Ohshima H, Ishihara H, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs [J]. J Orthop Res, 1996, 14(5): 690-9.
- [4] Gruber H E, Norton H J, Hanley E N Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells *in vitro* [J]. Spine, 2000, 25(17): 2153-7.
- [5] Wehling P, Schultiz K P, Robbins P D, et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine [J].

- Spine, 1997, 22(10): 1092-7.
- [6] 黄宗强, 刘尚礼, 郑召民. 椎间盘退变分子生物学研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(1): 55-6.
- [7] Nishida K, Kang J D, Suh J K, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 1998, 23(22): 2437-42.
- [8] Nishida K, Kang J D, Gilbertson L G, *et al.* Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc transfer of the human transforming growth factor β_1 encoding gene[J]. Spine, 1999, 24(23): 2419-25.
- [9] Moon S H, Gilbertson L G, Nishida K, *et al.* Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer: implications for the clinical management of intervertebral disc disorders[J]. Spine, 2000, 25(20): 2573-9.
- [10] Tan J, Hu Y, Zheng H, *et al.* Construction of recombinant adenoviral vector Ad-CMV-hTGF beta1 for reversion of intervertebral disc degeneration by gene transfer[J]. Chin J Traumatol, 2002, 5(2): 97-102.
- [11] Zhao J, Jia L, Chen D, *et al.* Adenovirus-mediated TGF-beta (1) gene transfer to human degenerative lumbar intervertebral disc cells[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(3): 409-12.
- [12] Saxer R A, Bent S J, Brower-Toland B D, *et al.* Gene mediated insulin-like growth factor-I delivery to the synovium[J]. J Orthop Res, 2001, 19(6): 759-67.

(编辑 张敏瑞)

· 简 讯 ·

方积乾英文专著《Advanced Medical Statistics》 由 World Scientific 出版

在我校公共卫生学院的医学统计与流行病学专业被评为广东省重点学科之际,由学科带头人方积乾教授和美国加利福尼亚大学旧金山医学院放射医学系的陆盈教授共同主编的英文专著《Advanced Medical Statistics》最近由新加坡 World Scientific 出版发行 (ISBN 981-02-4799-0; ISBN 981-02-4800-8(pbk))。全书 1101 页,共分四篇二十九章。第一篇生物医学中的统计方法,含医学中的统计思想、医学诊断、相依资料、医学测量的质量控制、成本效果分析、与健康有关的生存质量、META 分析、描述与图像、时间序列和模式识别等十章。第二篇药物开发中的统计方法,含药理学和非临床试验、制药与开发研究、毒理学和临床试验等四章,均系现代药物研究和开发中普遍推行的统计学方法。第三篇流行病学中的统计方法,含遗传统计、危险度评价、传染病模型、抽样调查的特殊模型、重捕获模型、肿瘤筛查资料分析和因果推断等七章。第四篇现代统计学方法与理论,含生存分析、纵向资料分析、非参数回归、贝叶斯统计、随机过程、树结构回归、EM 算法和人工神经网络等八章,均系与医学统计密切相关的、实用性很强的基础性内容。书中各章的作者都是海内外的华人医学统计学专家。他们根据各自的特长和兴趣,合作撰写了这本专著。该书博采众家之长,是国际上医学统计学专业最新的专著。通过此书,读者不仅可迅速进入现代医学统计学的前沿领域,而且能领略优秀华人统计学家的学术风采。本书的出版得到了中国华夏英才基金和中山大学“211”工程重点学科建设经费的资助,它的中文版已于 2002 年 4 月由人民卫生出版社出版。

(郝元涛)