

人 I 型基质金属蛋白酶基因真核表达重组质粒的构建

彭 慧, 汪 谦, 黄洁夫

(中山医科大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】构建人 I 型基质金属蛋白酶基因 (*MMP1*) 真核表达重组质粒, 并进行序列分析。【方法】用逆转录聚合酶链反应扩增人 I 型基质金属蛋白酶 cDNA, 获得目的基因片段(1 407 bp)连接至 pcDNA3 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆并鉴定, 并对片段全长进行 DNA 序列测定。【结果】所克隆人 I 型基质金属蛋白酶 cDNA, 含全长 *MMP1* 编码区, 与 GeneBank 公布序列比较, 仅 1 318 位的胞苷酸 C 突变为腺苷酸 A。并成功构建了含有 *MMP1* 的真核表达质粒 pcDNA3-MMP1。【结论】以逆转录聚合酶链反应方法成功构建了人 I 型基质金属蛋白酶 cDNA 克隆, 并获得该基因真核表达质粒 pcDNA3-MMP1, 从而为下一步抗肝纤维化基因治疗研究提供物质基础。

关键词: 人 I 型基质金属蛋白酶; DNA; 互补; 克隆; 分子; 质粒

中图分类号: R657.3⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)06-0433-03

Construction of Eukaryotic expression Recombinant Plasmid with Human Matrix Metalloproteinase I Gene

PENG Hui, WANG Qian, HUANG Jie-fu,

(Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080 China)

Abstract: 【Objective】To construct expression recombinant plasmid and to analyze the sequence of human matrix metalloproteinase I gene (*MMP1*). 【Methods】The full human *MMP1* cDNA was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The obtained fragment of 1 407 bp was inserted into pcDNA3 vector and transformed into *E. Coli* DH5 α and positive clone was selected. Also the automatic DNA sequencer sequenced the full fragment. 【Results】A full human *MMP1* fragment was obtained, and a base substitution (C to A) of coding region at the position 1 318 was compared with the GeneBank information. Eukaryotic expression recombinant plasmid with *MMP1* fragment was successfully constructed. 【Conclusion】The human *MMP1* cDNA clone is constructed by RT-PCR, and recombinant plasmid pcDNA3-MMP1 is successfully constructed; It may provide a basis for further anti-liver fibrosis gene therapy.

Key words: *MMP1*; DNA, complementary; clones, molecular; plasmid

近年来,随着基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族的研究进展, MMPs 作为降解细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)水解蛋白酶类,在肝纤维化发生发展过程中关键作用日益受到重视。其中 I 型基质金属蛋白酶(MMP1)作为 MMPs 重要一员,它参与 I 型和 III 基质胶原

的分解,与肝纤维化形成尤为密切^[1,2]。我们利用逆转录聚合酶链反应方法从一名中国汉族人肝组织中成功克隆人 I 型基质金属蛋白酶 cDNA,进行了序列测定,随即构建了 pcDNA3-MMP1 真核表达重组质粒。本文拟对这一部分工作进行阶段性的总结。

收稿日期: 2001-08-01

基金项目: 教育部高校博士学科点科研基金资助项目(1996056904)

作者简介: 彭 慧(1973-), 男, 湖北武汉人, 硕士, 医师。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 来自广东省汉族 45 岁女性肝血管瘤患者, 手术中切除肿瘤旁正常肝脏组织 10 g, 迅速投入液氮中冻存。

1.2 试剂 Trizol Reagent RNA 提取试剂盒, AMV 逆转录酶购自 Gibco-BRL 公司。cDNA 第一链合成试剂盒, Expend TM High Fidelity PCR System 购自 Boehringer Mannheim 公司。限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III T₄DNA 连接酶均购自 Promega 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工(Sangon)公司。Qiagen plasmid mini kit 高纯质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。高效真核表达载体质粒 pcDNA3 由中山医科大学分子实验中心朱振宇教授惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 购自 Boehringer Mannheim 公司。其它试剂均为进口分装或国产分析纯

1.3 方 法

1.3.1 引物设计与合成 根据已报道的 *MMP1* cDNA GeneBank 序列^[3] 资料设计合成一对引物, 在 P1 引入 *Hind* II 酶切位点、起始密码子; 在 P2 引入 *Xho* I 酶切位点、TGA 终止子。引物由上海生工(Sangon)公司合成。P1 5' ggc aag ctt atg cac agc ttt cct cca ct 3'; P2 5' ggc ctc gag tca att ttt cct gca gtt g 3'。

1.3.2 肝组织总 RNA 制备 参照 Trizol Reagent RNA 提取试剂盒一步法提取人肝脏组织总 RNA。将 100 mg 肝组织匀浆移入 EP 管。加 TRIzol 试剂 1 mL, 混匀吹打, 置室温 5 min。加氯仿 0.2 mL, 摇振 15 s, 置室温 3 min。4 $^{\circ}$ C 离心(Beckman CS-15R), 12 000 \times g, 15 min 去上层水相, 移至另一 EP 管中加入 0.5 mL 异丙醇, 置室温 10 min。4 $^{\circ}$ C 离心, 12 000 \times g, 10 min, 加入体积分数 75%乙醇 1 mL 洗涤沉淀。4 $^{\circ}$ C 离心, 7 500 \times g, 5 min 弃上清。真空干燥后, 沉淀重悬于无 Rnase 水中, -70 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.3 逆转录和 PCR 扩增 ①逆转录: 取 2 μ g 人肝细胞总 RNA, 1.25 mmol/L dNTPs 6 μ L, 1.6 μ g 的 Oligo(dT), 2 μ L 10 \times RT 缓冲液, AMV 逆转录酶 200 IU, 加双蒸水至总体积为 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 保温反应 1 h 后, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min 以终止反应。②PCR 扩增: 从上面反应中逆转录得到的 20 μ L cDNA, 加入 2 IU 的 *Taq* 聚合酶, P1 和 P2 的引物

(0.2 μ mol/L), 10 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 加双蒸水使总体积为 100 μ L。表覆 50 μ L 石蜡油。利用 PE480 型 PCR 扩增仪进行扩增, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 2 min。30 个循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 温育 7 min, 4 $^{\circ}$ C 冷却终止反应。特异性扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.4 PCR 反应产物纯化^[4] 吸弃上层石蜡油, 加等体积酚氯仿抽提 1 次, 再氯仿抽提 1 次, 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠后, 用 2 倍体积无水乙醇 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 体积分数为 70%乙醇洗涤沉淀。干燥后溶于一定体积的无菌 ddH₂O 中, 保存 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.5 构建 pcDNA3-MMP1 重组体及鉴定^[5] 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离扩增片段, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 *MMP1* 片段。*Xho* I、*Hind* III 双酶切 pcDNA3 质粒, 及 *MMP1* 片断(已含 *Xho* I、*Hind* II 酶切位点), 在 T₄DNA 连接酶作用下将 *MMP1* 与 pcDNA3 载体连接成重组体。将重组体转化经 CaCl₂ 处理感受态大肠杆菌 DH5 α , 铺在含氨苄 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑选氨苄抗性菌落, 少量扩增碱变性法快速抽提质粒 DNA。电泳初筛检出阳性克隆, 用 PCR 法, *Xho* I、*Hind* II 双酶切鉴定。最后获得正向插入阳性重组体 pcDNA3-MMP1。

1.3.6 pcDNA3-MMP1 重组体中插入 *MMP1* 片断序列测定 Qiagen plasmid mini kit 高纯质粒提取试剂盒抽提重组质粒 pcDNA3-MMP1。以 pcDNA3 多克隆位点两端通用引物 T7, SP6 为测序引物, 中间合成测序引物 P3。采用 Sanger 双脱氧末端终止法进行正反向测序, 使用 PERKIN E-LIMER 公司 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 试剂盒进行序列模板反应, 在 ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer 全自动 DNA 序列分析仪上进行 *MMP1* 全序列分析。

2 结 果

2.1 *MMP1* cDNA 的 RT-PCR

RT-PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下见一清晰的特异扩增带, 与标准 DNA 分子对照, 大小与理论预期(1.4 kb)相符(图 1)。

2.2 pcDNA3-MMP1 重组体的鉴定

重组质粒 pcDNA3-MMP1 用 *Xho* I、*Hind* III

双酶切后产生2条带,大小分别为5.4 kb和1.4 kb,提示获得正向插入阳性克隆。PCR扩增也显示出特异扩增条带(1 407 bp),证明该重组子确为含有MMP1片段的重组克隆(图2)。

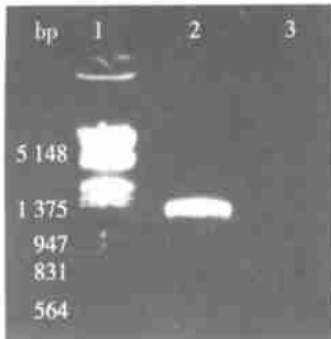


图1 MMP1 cDNA的RT-PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 MMP1 cDNA RT-PCR product was electrophorised in agrose gel

1: PCR Marker (λ DNA/ *Eco*R I + *Hind* III 21 227, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 947, 831, 564, 125);
2: MMP1 cDNA RT-PCR product; 3: ddH₂O



图2 重组质粒pcDNA3-MMP1的双酶切与PCR鉴定
Fig. 2 Recombinant plasmid pcDNA3-MMP1 was verified with restriction endonuclease enzyme analysis and PCR technique

M: PCR Marker (λ DNA/ *Eco*R I + *Hind* III 21 227, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 947, 831, 564, 125),
1: pcDNA3-MMP1 was digested with *Xho*I、*Hind* III; 2: Recombinant plasmid pcDNA3-MMP1 PCR product; 3: MMP1 RT-PCR product; 4: pcDNA3 was digested with *Xho*I、*Hind* III

2.3 MMP1全序列测定分析

MMP1的序列分析结果与GeneBank上公布序列基本相同, 同源性达99%。仅1 318位的胞苷酸C突变为腺苷酸A, 导致编码脯氨酸的密码子CCU改变为编码组氨酸的CAU。

3 讨论

肝纤维化过程中, 胶原纤维等细胞外基质(ECM)的合成与降解是一个复杂的过程。肝内基质金属蛋白酶作为降解肝内ECM主要酶系, 从而

直接参与调节ECM合成与降解的动态平衡, 与肝纤维化发生、发展及形成关系密切^[2]。

人I型基质金属蛋白酶(MMP1), 又称间质胶原酶, 是第一个被定性的基质金属蛋白酶, 多种器官、组织都有MMP1存在, 肝组织内MMP1主要来源于Ito细胞、(KC)细胞、成纤维细胞、肝细胞。它参与I型和II基质胶原的分解。人成纤维细胞间质胶原酶基因, 已成功被克隆、测序。MMP1表达及活性明显下降, 是肝纤维化时ECM内胶原病理性沉积的重要原因之一, 致使胶原纤维降解明显下降而沉积加速, 从而加速肝纤维化的进程^[2,6]。我们克隆获得的中国人I型基质金属蛋白酶基因cDNA全长1 469 bp, 含有全长的人MMP1编码区。与早先文献[2]报道MMP1 cDNA序列相比有如下特点: ①组织来源上: 本组为人正常肝组织扩增出MMP1 cDNA, 文献报道来源于人脑转移瘤细胞; ②技术方法上: 我们采用逆转录聚合酶链反应扩增出目的基因, 文献报道则使用构建cDNA文库方法, 技术较为复杂; ③序列比较上: 与报道序列比较, 本组同源性达99%。仅1 318位的C被A代替, 导致编码脯氨酸改为编码组氨酸。由于测序中进行正反向多次测定, 结果可信度高。另外PCR过程中采用了具有校正功能的Taq酶(ExpendTM High Fidelity PCR System含有PwoDNA聚合酶^[7], 除具有5'-3'聚合酶活性, 还具有3'-5'核苷酸外切酶的校正活性), 可以认为此变异来源于MMP1在不同人种中多态性的表现。pcDNA3质粒含有人类巨细胞病毒(CMV)的高效启动子和增强子, 是一种外源基因在哺乳动物细胞中高效表达的理想载体。此次成功构建pcDNA3-MMP1重组质粒, 为了进一步研究MMP1在真核系统中表达, 探讨其能否作为逆转肝纤维化有效治疗基因, 也为后期肝纤维化基因导入治疗研究提供物质基础。

参考文献:

- [1] Arthur M J, Fibrogenesis I I. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis [J] . Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(2): 245.
- [2] Okazaki I, Watanabe T J, Hozawa S, *et al.* Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis; with special reference to the role of matrix metalloproteinases [J] . Gastroenterol Hepatol, 2000, 15 Suppl: 26.

(下转第453页)

与脉络膜,视网膜脉络膜的炎症并非继发于虹膜睫状体炎,从而提出内毒素诱导的葡萄膜炎模型可作为人类全葡萄膜炎动物模型的观点。我们用伤寒杆菌内毒素诱导出了严重的葡萄膜炎,组织学表现为视网膜中大量的炎症细胞浸润,这一结果有力支持上述观点。

以往研究发现,不同种属动物对内毒素的敏感性不同。人们已经成功地在 Lewis 大鼠、FVB/N 小鼠上诱发出葡萄膜炎,但却难在 Brown Norway、Fischer 大鼠诱发临床显著的葡萄膜炎^[2]。目前,国外大多数作者采用 Lewis 大鼠作为研究对象。目前,国内尚无法得到敏感的 Lewis 大鼠,我们根据现有的条件对两种大鼠进行了研究。最初我们每只用 100~300 μg 的大肠杆菌内毒素,均未能在 SD 与 Wistar 大鼠上诱发临床可见的葡萄膜炎,而绿脓杆菌内毒素在 SD 大鼠上的诱发率仅为 3/6,且不能在 Wistar 中诱发。考虑到不同内毒素致病力的差异,我们又改用了伤寒杆菌内毒素,发现这种内毒素在 SD 大鼠可诱导出临床可见的葡萄膜炎,成功率达 100%。这为我们进行葡萄膜炎发病机制、预防和治疗的研究提供了良好而稳定的动物模型。我们用伤寒杆菌内毒素诱导的葡萄膜炎有以下特点:其发生、发展过程中的临床表现与文献报道的在 Lewis 大鼠上诱发的模型基本相符,但表现似乎更重,于 24 h 不仅发生前房积脓,还发生了严重的后房积脓;后房积脓、瞳孔闭锁及纤维素渗出的发生率几达 100%;房水蛋白浓度明显增高;组织受累广泛,虹膜、睫状体、玻璃体、视网膜、视乳头以及脉络膜均发生了严重的炎症反应,出现全葡萄膜炎的表现。

总之,SD 大鼠伤寒杆菌内毒素双足底注射能诱发全葡萄膜炎,可为研究人类全葡萄膜炎发病机

制,及其预防、治疗等提供良好的动物模型。

(本文图 1,图 2 见插页 3)

参考文献:

- [1] 杨培增,李绍珍,毛文书,等. 视网膜 S 抗原在不同动物诱发的实验性自身免疫性葡萄膜炎视网膜炎[J]. 中山医科大学学报, 1993, 14(1): 7.
- [2] 杨培增, de Vos A F, Broersma L, *et al.* 内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的组织平片和切片研究[J]. 中华眼底病杂志, 1996, 12(1): 33.
- [3] Li Q, Peng B, Whitcup S M, *et al.* Endotoxin induced uveitis in the mouse: susceptibility and genetic control[J]. *Exp Eye Res* 1995, 61(5): 629.
- [4] Hoekzema R, Murray P I, van Haren M A, *et al.* Analysis of interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, 32(1): 88.
- [5] Okumura A, Mochizuki M. Endotoxin-induced uveitis in rats: morphological and biochemical study[J]. *Jpn J Ophthalmol* 1988, 32(4): 457.
- [6] Bhattacharjee P. Release of prostaglandin-like substances by Shigella endotoxin and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory compounds[J]. *Br J Pharmacol* 1975, 54(4): 489.
- [7] Rosenbaum J T, McDevitt H O, Guss R B, *et al.* Endotoxin-induced uveitis in rat as a model for human disease [J]. *Nature* 1980, 286(5733): 611.
- [8] Ruiz-Moreno J M, Thialye B, de Kozak Y. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat [J]. *Ophthalmic Res* 1992, 24(3): 162.
- [9] Yang P, de Vos A F, Kijlstra A. Macrophages in the retina of normal Lewis rat and their dynamics after injection of lipopolysaccharide[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37(1): 2708.

(编辑 刘清海)

(上接第 435 页)

- [3] Templeton N S, Brown P D. Cloning and characterization of human tumor cell interstitial collagenase[J]. *Cancer Res* 1990, 50(17): 5431.
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版, 1999. 61~67.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~56.
- [6] Lichtinghagen R, Breitenstein K, Arndt B, *et al.* Com-

parison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver[J]. *Virchows Arch*, 1998, 432(2): 153.

- [7] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2216.

(编辑 张敏瑞)