



可调控性 uPA 诱导表达系统的构建及功能鉴定

陈丽香¹,周晓静³,刘文文⁴,周文江¹,任晓楠¹,于士颜¹,周晓辉^{1,2}

(1.上海市公共卫生临床中心,上海 201508;2.复旦大学医学分子病毒学教育部卫生部重点实验室,上海 200032;
3.蚌埠医学院第一附属医院,安徽 蚌埠 233004;4.赤峰学院附属医院,内蒙古 赤峰 024000)

【摘要】 **目的** 构建可调控性尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator,uPA)诱导表达系统并进行相关鉴定,可为进一步构建可诱导型肝脏人源化 uPA-SCID 动物模型奠定基础。**方法** 可调控性 uPA 诱导表达系统即在强力霉素(doxycycline,Dox)诱导下通过 tet-on 系统调控 uPA 表达。为此,需要构建两个重组质粒,分别为 pLNHXO1O2-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 和 pLNHXO5O6-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen,前者引入 Gaussia 荧光素酶(gaussia enzyme fluorescent element,Gluc)与四环素反式激活因子(reverse tetracycline transactivator,rtTA) 偶联表达,以便于监测 rtTA 表达水平;后者同时偶联表达 ZsGreen,以便于用荧光显微镜观察基因表达。重组逆转录病毒载体进行表达功能鉴定后,将构建质粒与病毒包装衣壳蛋白 VSV-G 质粒共转染 GP2-293 包装细胞系后获得具有感染能力的病毒颗粒,利用该病毒感染 NIH/3T3 细胞,并用 G418 筛选出阳性细胞;期间各取部分细胞,使用 PCR 方法鉴定其基因组内是否含有相应基因转录调控本。**结果** 成功构建 pLNHXO1O2-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 和 pLNHXO5O6-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 克隆。功能鉴定显示,pLNHXO1O2-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 克隆可表达 rtTA;pLNHXO5O6-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 克隆转染 HepG-Tet-on 细胞,加 Dox 可诱导 uPA 表达。包装病毒感染 NIH/3T3 细胞后通过 G418 筛选获得单细胞克隆,通过 PCR 方法鉴定表明其基因组内含有相应转录本,从而成功构建 uPA 诱导表达稳定细胞株。**结论** 本研究初步建立了可调控性 uPA 诱导表达系统,从而为可诱导肝损的 uPA-SCID 转基因小鼠的构建及在此基础上的肝脏人源化动物模型的建立奠定了基础。

【关键词】 可调控肝脏损伤;Alb;uPA;肝脏人源化小鼠

【中图分类号】 Q95-33 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.001

The establishment of the uPA inducible expression system

CHEN Li-xiang¹,ZHOU Xiao-jing³,LIU Wen-wen⁴,ZHOU Wen-jiang¹,REN Xiao-nan¹,YU Shi-yan¹,ZHOU Xiao-hui^{1,2}

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China;

2. Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Ministry of Education and Health, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;3. The first affiliated hospital of Bengbu Medical College,

Anhui Bengbu 233004, China;

4. Affiliated hospital of Chifeng University, Neimenggu Chifeng 024000, China)

【Abstract】 **Objective** To establish uPA inducible expression system using recombinant retroviral system for the further construction of inducible uPA-SCID animal model. **Methods** The inducible expression system need to construct two plasmids: pLNHXO1O2-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA and pLNHXO5O6-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen respectively. Both plasmids were based on retroviral vector pLNHX, Albumin promoter gene (Alb) and rtTA gene or uPA gene and ZsGreen

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(2012CB519005);上海市科技发展基金实验动物研究项目(12140900300);上海市卫生和计划生育委员会科研课题(20144Y0073);上海市公共卫生临床中心中心科研课题面上项目(2014M08)。

【作者简介】 陈丽香(1988-),女,技术员,本科,研究方向:细胞生物学,E-mail: xiaripaomo@126.com。

【通讯作者】 周晓辉(1973-),男,副研究员,博士,研究方向:病毒免疫学,E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org。

were obtained by PCR reaction and inserted into pLNHX. The Gaussia enzyme fluorescent element (GLUC) was used to monitor rtTA expression in pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA, and the ZsGreen for uPA expression monitoring in pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen. The correct constructed plasmids were transfected into packaging cell line GP2-293 to gain recombinant viral particles. NIH/3T3 cells were infected with these viral particles and selected with G418. Gene expression in the surviving cells was confirmed by the PCR method. **Results** The recombinant retroviral vectors harbouring target genes were successfully cloned. The rtTA gene in pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA was expressed, and uPA can be induced to express in pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen by doxycycline (Dox) when the plasmid transfected into the HepG-Tet-on cell. The constructed recombinant two retroviral vectors were transfected into GP2-293 packaging cells respectively to gain infectious viral particles. Then, NIH/3T3 cells were infected with these viral particles and single-cell clones which stably expressed the transgenes were successfully established. **Conclusion** This study primarily established uPA inducible expression system, it laid a foundation for the murine model of inducible liver damage, and provided a novel technical platform for further building the liver humanised murine models for viral hepatitis studying.

【Key words】 Controlled inducible liver damage; Alb; uPA; Liver-humanized mouse

尿激酶型纤溶酶原激活物 uPA 可以激活肝细胞内的纤溶蛋白酶原, 导致肝细胞的损伤和坏死^[1], 目前被认为可能是建立理想肝脏损伤小鼠模型最合适的毒力基因。uPA 参与多种生理病理过程, 在肝脏再生过程中, 它通过激活纤溶酶原可以清除坏死细胞碎片, 破坏细胞外基质以促进肝脏结构的重构, 从而有利于移植肝细胞的成活与增殖^[2]。

肝脏损伤动物模型的建立是研究肝细胞移植和再生的关键性技术平台。外源异种肝细胞移植要在受体动物体内嵌合、再生成功, 首要条件是受体本身肝脏有损伤, 外源植入的肝细胞才有机会克服生存竞争而“殖民”成功; 同时为防止免疫排斥往往需要受体动物有免疫缺陷。肝损小鼠模型是肝脏人源化小鼠模型建立的基础。uPA/SCID 是目前应用较多的一个肝损/移植模型, 在病毒性肝炎等人类肝脏重大疾病研究中发挥着重要作用。应用 uPA/SCID 模型, 外源人肝细胞的嵌合重建率最高能达到 99%。

但现有 uPA/SCID 小鼠模型也存在很多问题和缺陷。例如 uPA 杂合子对肝脏的损伤已很严重, 纯合子新生鼠肝脏的损伤更严重, 造成很高的死亡率^[3], 使 uPA 小鼠繁育和保种比较困难。此外, 小鼠某些肝细胞可能通过重组机制清除 uPA 转基因, 并快速增殖, 直到 8~12 周恢复整个肝脏, 对移植入的肝细胞增殖能力造成很大的限制。因此, 移植手术一般要在出生后最初两周内完成, 以提高移植人肝细胞的嵌合成功率, 但这也给模型建立增加了操

作的难度^[4-5]。

本研究通过建立基于 tet-on 的可调控肝脏损伤的 uPA 诱导表达系统, 为进一步构建可诱导肝损的 uPA-SCID 动物模型奠定了基础。实现 uPA 毒性基因的可控表达, 可克服现有 uPA/SCID 小鼠模型的缺陷, 从而可能为肝炎病毒感染的免疫致病机制、药物及疫苗筛选评价研究等提供一个更加有力的研究平台。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及试剂

质粒、菌株和细胞株: pUC19 载体、逆转录病毒载体 pLNHX 购自美国 Clontech 公司; pTRE2hyg, pLVX-IRES-ZsGreen 质粒实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 实验室保存; 包装细胞 GP2-293 细胞系, NTH3T3 购自中国科学院; 人宫颈癌细胞 Hela, 人肝癌细胞 HepG2 及 HepG2-Tet-on 细胞实验室保存; PCR 反应体系购自 TaKaRa 公司; 逆转录试剂盒购自 ToYoBo 公司; 限制性内切酶及 10 \times buffer 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物技术有限公司; 无内毒素质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司; 1640、DMEM、胎牛血清购自 invitrogen 公司; 胰蛋白酶, 强力霉素 Dox 及 G418 实验室保存; 5 \times Passive Lysis Buffer 购自 Promega 公司; Dual-Luciferase Reporter System 检测试剂盒购自 Promega 公司; 引物合成: 博尚生物技术(上海)有限公司。

表 1 克隆引物序列(包括酶切位点)
Tab. 1 Primers used for clones construction(including restriction enzyme cutting site)

基因 Gene	引物 Primers (5' - 3')
rtTA	Sense (EcoRV) :CGGGATATCTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGC Antisense (NotI) :ATAAGAATGCGGCCGCTACCCACCGTACTCGTCAATTC
Alb	Sense (MfeI) :ATACAATTGTTCCATGCCAAGGCCACACTGAAATG Antisense (KpnI) :AAGGTACCGTTGATAGAAAGGTGATCTGTGTGCAGAAAGA
U19-0304	Sense :AGCTTCAATTGGGGGTACCGGATCCGGATATCATAAGAATGCGGCCGCT Antisense :AATTAGCGGCCGCTTCTTATGATATCGGGATCCGGTACCCCAATTGA
Gluc-FMN2A	Sense (BamHI) :CGGGATCCACCATGGCCAAGCCCACCGAGAACA Antisense (EcoRV) :GATATCCGCGTCGGGCCCTGGGTGGACTC
TRE2	Sense (MfeI) :CCCTAACTGACACACAATTGTTTACCCTCCCTATC Antisense (HpaI) :TGTTAAGGATCCCCGGTACCGAGCTCGAAT
TRE2CMV _m	Sense :GCTTTAGGCGTGTACGGTGGGCGCCTATAAAAGCAGAGCTCGTTTACTGAACCGTCAGATCGCCTGGA Antisense :CGGTCAGGCGATCTGACGGTTCACCTAAACGAGCTCTGCTTTTATAGCGGCCACCGTACACGCCTAAAGC
IRES-ZsGreen	Sense (XhoI) :GTGAATTCCTCGAGACTAGTCTAGAGCGGCC Antisense (MluI) :AGACGCGTTCAGGCCAAGCGCGAGC
uPA	Sense (XhoI) :TAAGCTCGAGACCATGAAAGTCTGGCTGGCGAGC Antisense (BamHI) :CGGGATCCTCAGAAGGCCAGACCTTTCTCT
Fluc	Sense (BamHI) :CGGGATCCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTATGGAA Antisense (MluI) :CATACGCGTCTAGAATTACAGGCGATCTTTCC
LNHX-0102	Sense :TCGAGCAATTGATAAGAATGCGGCCGCA Antisense :GATCTGCGGCCGATTCTTATCAATTGC
LNHX-0506	Sense :TCGACCAATTGAGTGTTAACACCGGTAGATCTCTCGAGCCGACGCGTT Antisense :GATCAACGCGTCCGCTCGAGAGATCTACCGGTGTTAACTCAATTGG

1.2 仪器与设备

Cycler PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;离心机购自 Eppendorf 公司及 Beckman 公司;紫外-可见光分析成像系统购自 Bio-Rad 公司;酶标检测仪购自 Thermo 公司。

1.3 重组质粒构建

1.3.1 pUC19 载体及 pLNHX 载体多克隆位点的改造

由于 pUC19、pLNHX 载体本身不具有后续实验所需的酶切位点,所以首先需对载体的多克隆位点进行改造。

pUC19M 获得:在 pUC19 载体上插入含有 MfeI、KpnI、BamHI、EcoRV、NotI 等酶切位点的 MCS:利用引物设计软件 Vector-NTI 设计引物,引物序列如表 1 U19-0304;将设计的引物 U19-03 与 U19-04 以 1:1 的比例混合后直接进行变性退火获得目的基因 MCS。用 EcoRI-HF/HindIII (Buffer2) 对载体 pUC19 与 MCS 进行双酶切,酶切过夜后,对酶切产物进行割胶回收。将回收后的 pUC19 载体与 MCS 以 1:3 的比例连接,连接条件:15℃ 连接 4 h。连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,挑取克隆进行 EcoRI-HF/HindIII 双酶切鉴定,对阳性结果进行测序;pLNHX0102 获得:对载体 pLNHX 进行改造引入 MfeI、NotI 位点从

而构建新的载体 pLNHX0102;利用引物设计软件 Vector-NTI 设计引物,引物序列如表 1 LNHX-0102;将设计的引物 LNHX01 与 LNHX02 以 1:1 的比例直接置于进行变性退火获得目的基因 MCS。用 XhoI/BglII (Buffer3) 对载体 pLNHX 进行双酶切,酶切过夜后,对酶切产物进行割胶回收。将回收后的 pLNHX 载体与 MCS 以 1:3 的比例连接,15℃ 连接 4 h。转化感受态细胞 DH5 α ,挑取克隆进行 MfeI 酶切鉴定,阳性克隆能够被酶切为线性条带,对阳性结果进行测序;pLNHX0506 获得:在载体上插入含有 MfeI、HpaI、BamHI、XhoI、MluI 等酶切位点的 MCS 从而构建新的载体 pLNHX0506;利用引物设计软件 Vector-NTI 设计引物,引物序列如表一 LNHX-0506;将设计的引物 LNHX05 与 LNHX06 以 1:1 的比例直接置于进行变性退火获得目的基因 MCS。用 XhoI/BglII (Buffer3) 对载体 pLNHX 进行双酶切,酶切过夜后,对酶切产物进行割胶回收。将回收后的 pLNHX 载体与 MCS 以 1:3 的比例连接,15℃ 连接 4 h。转化感受态细胞 DH5 α ,挑取克隆进行 MfeI 酶切鉴定,阳性克隆能够被酶切为线性条带对阳性结果进行测序。

1.3.2 白蛋白启动子调控的 rtTA 克隆 pLNHX0102-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 及 pLNHX0506-TRE2-uPA-

IRES-ZsGreen 克隆的构建

利用引物设计软件 Vector-NTI 设计引物,引物序列如表 1。

以 Jc1-Flag2 质粒, pTet-on 质粒及抽提的小鼠肝脏基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,分别获得 567 bp 的 Gluc-FMN2A, 1 kb 的 rtTA 基因及 308 bp 的 Alb 基因,将 PCR 产物进行割胶回收后逐一插入 pUC19M 载体后将连接产物转化感受态细胞,挑取克隆进行酶切鉴定,对鉴定结果为阳性的质粒进行测序检测。将测序阳性的重组质粒进行酶切获得 Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 基因再与 pLNHX0102 连接转化后挑取克隆进行酶切鉴定,对鉴定结果为阳性的质粒进行测序检测从而获得 pLNHX0102-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 阳性质粒;以 pTRE2hyg 质粒, pLVX-IRES-ZsGreen 质粒及鼠肾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,分别获得 433 bp 的 TRE2(四环素应答元件;tetracycline response element; TRE) 启动子, 1.3 kb 的 MCS-IRES-ZsGreen 及 1.3 kb uPA,并通过 cmv 引物退火连接获得 70 bp 的 TRE2 cmv,将 PCR 产物进行割胶回收后逐一插入 pLNHX0506 载体后将连接产物转化感受态细胞,挑取克隆进行酶切鉴定,对鉴定结果为阳性的质粒进行测序检测,从而获得 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 阳性质粒;实验过程中测序发现 TRE2 缺少一段 CMV,所以后期通过引物设计退火连接获得缺失的 cmv,与建立的重载载体连接,由于插入了 TRE2cmv,所以失去 HpaI 酶切位点,用 HpaI 酶切鉴定可以初步确定阳性克隆。

1.3.3 用于 pLNHX0102-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 功能鉴定的 pTRE2hyg-Fluc 构建

利用引物设计软件 Vector-NTI 设计引物,引物序列如表 1,以 pIFN β -Fluc 为模板进行 PCR 扩增获得 1.7 kb 的 Fluc,将 Fluc 及 pTRE2hyg 用 BamHI, MluI 进行酶切,回收,连接,转化,挑取克隆进行酶切鉴定从而获得 pTRE2hyg-Fluc 阳性质粒。

1.4 重组逆转录病毒载体功能鉴定:双荧光素酶报告基因检测及荧光显微镜观察

双荧光素酶报告基因检测法:细胞铺板后转染相关质粒,48 h 后用 200 μ L 1 \times Passive Lysis 缓冲液裂解并收集上清。用 Dual Luciferase Assay System 试剂盒和 Lumat LB 9507 仪器测定 Fluc、Rluc 活性,积分时间均为 10 s,结果以 Fluc 和 Rluc 比值表示。

荧光显微镜检测法:细胞铺板后转染相应质

粒,48 h 后荧光显微镜观察。

1.5 包装病毒的构建

无内毒素抽提质粒,经过 OD260 定量后与 VSV-G 包装蛋白共转染包装细胞 GP2-293,转染采用 Lipofectamine[™]2000 进行。转染 48 h 后收集病毒。收集病毒即先在 4 $^{\circ}$ C 3861 r/min 离心 15 min,将上清转移至超离管中再用超速离心机在 4 $^{\circ}$ C, 16800 r/min 离心 2 h,弃去上清液,加入 100 μ L DMEM 重悬并置于 4 $^{\circ}$ C 溶解 8 h 使得病毒重新解离为可感染的单体,从而获得病毒原液用于感染靶细胞。

1.6 阳性细胞的选择与培养

以 NIH-3T3 细胞作为靶细胞。于感染的前 1 d 将 1 \times 10⁵ 的 NIH-3T3 细胞接种于 60 mm 细胞培养盘中。病毒感染前细胞先用无血清 DMEM 洗涤一次,再补以 1.5 mL 无血清 DMEM 同时加入 100 μ L 病毒原液。感染 2 h 后重新更换为正常的新鲜培养液,继续培养 24 h,再加入 G418(800 μ g/mL) 筛选阳性克隆。

1.7 PCR 检测阳性细胞中目的基因的表达

将体外反复传代的阳性 NIH/3T3 细胞用 Trizon 裂解后抽提 RNA 并进行定量,用 ToYoBo 试剂盒逆转录后进行 PCR 鉴定。

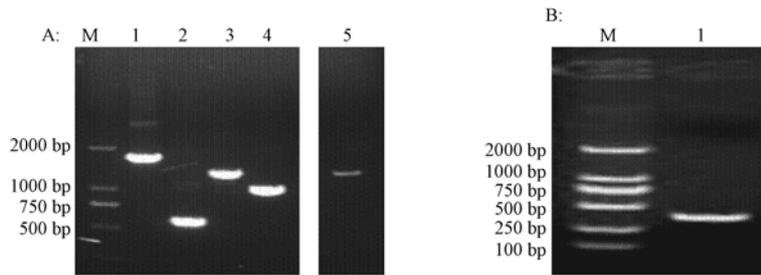
2 结果

2.1 Fluc、Gluc-FMN2A、MCS-IRES-ZsGreen、rtTA、TRE2、Alb、uPA 基因片段扩增

以 pIFN β -Fluc、Jc1-Flag2、pLVX-IRES-ZsGreen、pTet-on、pTRE2hyg 质粒,抽提的小鼠肝脏基因组 DNA 和鼠肾 cDNA 为模板,引物序列见表 1。进行 PCR 反应,扩增出 1.7 kb 的 Fluc,567 bp 的 Gluc-FMN2A,1.3 kb 的 MCS-IRES-ZsGreen,1 kb 的 rtTA 基因,433 bp 的 TRE2 启动子,308 bp 的 Alb 基因和 1.3 kb uPA,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(图 1)。结果显示:在预期位置看到了实验设想的条带。

2.2 重组质粒 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA、pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 及 pTRE2hyg-Fluc 的酶切鉴定

将改造后的 pUC19M 载体与 PCR 扩增获得的 Alb、rtTA、Gluc-FMN2A 基因片段经过酶切(酶切位点见表 1),回收纯化,连接反应构建成功 pUC19M-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA,再通过 PCR 获得整个 Alb-



注:A;M:DL2000 Marker;1,2,3,4,5 分别为 Fluc(1.7 kb)、Gluc-FMN2A(567 bp)、MCS-IRES-ZsGreen(1.3 kb)、rtTA(1 kb)、uPA(1.3 kb), B;M:DL2000 Marker;1: Alb(308 bp)。

图1 Fluc、Gluc-FMN2A、MCS-IRES-ZsGreen、rtTA、uPA、Alb 基因 PCR 产物图

Note:A;M:DL2000Marker;1:Fluc(1.7kb);2:Gluc-FMN2A(567 bp);3:MCS-IRES-ZsGreen(1.3 kb);4:rtTA(1 kb);5:uPA(1.3 kb), B;M:DL2000 Marker;1:Alb(308 bp)。

Fig. 1 PCR product of Fluc、Gluc-FMN2A、MCS-IRES-ZsGreen、rtTA、uPA、Alb gene

GLUC-FMN2A-rtTA 基因片段,与改造后的 pLNHX0102 进行 MfeI/NotI 酶切连接反应,构建 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 重组质粒。阳性质粒经 MfeI/NotI 酶切鉴定获得 5300 bp 线性质粒和 1875 bp Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 片段(图 2C6),表明成功构建重组质粒 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA。

将改造后的 pLNHX0506 载体与 PCR 扩增获得的 TRE2, MCS-IRES-ZsGreen, uPA 基因片段及 cmv 引物退火连接获得的 70 bp TRE2cmv 依次连接,阳性克隆经 MfeI/HpaI, XhoI/MluI, XhoI/BamHI 酶切可分别获得均缺失 70 bp TRE2cmv 的 5300 bp 线性质粒和 433 bp TRE2(图 Ea2), 5733 bp 线性 pLNHX0506-TRE2 和 1300 bp IRES-ZsGreen(图 Eb1、2、4), 7033 bp 线性 pLNHX0506-TRE2-IRES-ZsGreen 和 1300 bp uPA(图 Ec3),经 HpaI 酶切鉴定(由于插入 TRE2cmv,阳性质粒在扩增中会失去 HpaI 酶切位点),阳性 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 不能被酶切(图 Ed4),结果表明已成功构建 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen。

将 pTRE2hyg 载体与 PCR 扩增获得的 Fluc 基因片段经过 BamHI/MluI 酶切,回收纯化,连接反应构建 pTRE2hyg-Fluc(图 2DE)。阳性质粒经 BamHI/MluI 酶切鉴定获得 5300 bp 线性质粒和 1700 bp Fluc 片段见图 2D1、3、5,表明成功构建重组质粒 pTRE2hyg-Fluc。琼脂糖凝胶电泳结果显示:阳性质粒在预期位置看到实验设想的条带,将阳性质粒送检测序发现与预期结果一致。

2.3 重组质粒 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 和 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 功能鉴定

2.3.1 rtTA 特异性表达检测

将重组病毒质粒 pLNHX-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 通过 Fugen HD 转染 Hela 细胞(宫颈癌细胞系)与 HepG2 细胞(肝癌细胞系)。由于 Gluc 与 rtTA 偶联表达可以自行分泌到细胞上清中,转染 48 h 后吸取细胞上清检测 Gluc 活性,即可判定 rtTA 表达。因为 HepG2 细胞是肝细胞来源,所以可以检测到 Gluc 的表达,而 Hela 细胞缺乏调控白蛋白启动子的特异性转录因子,不能启动 Gluc/rtTA 的表达。转染 48 h 后荧光检测结果显示:HepG2 细胞中 Gluc 表达量为 Hela 细胞的 10 倍,表明引入的白蛋白启动子序列具有组织特异的生物学特性(图 3A)。

2.3.2 rtTA 可调控的转录活性检测

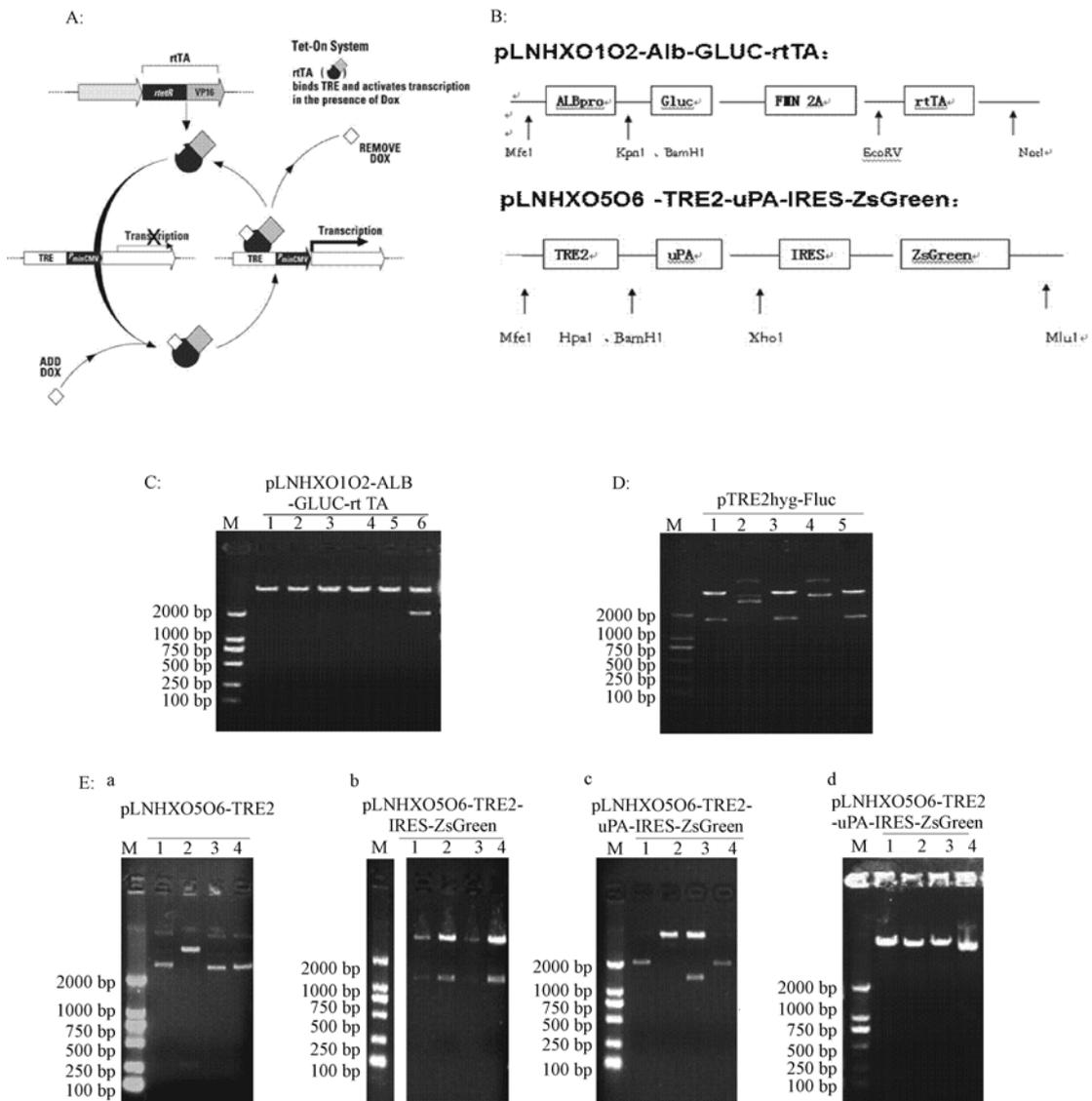
在 HepG2 细胞内共转染 pLNHX-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 和 pTRE2hyg-Fluc 质粒,转染 4 h 后进行 Dox(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理,通过引入 Dox(检测 Fluc 活性,转染 48 h 后双荧光检测结果显示:加入 Dox 后 Fluc/Gluc 值为未加 Dox 诱导的 2~3 倍,确定 pLNHX-Alb-Gluc-FMN2A-rtTA 克隆表达的 rtTA 具有可调控的转录因子活性(图 3B)。

2.3.3 TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 表达的可调控性检测

将重组质粒 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 转染 HepG-Tet-on 细胞,转染 4 h 后进行 Dox(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理,转染 48 h 后观察 ZsGreen 绿色荧光表达,荧光观察结果显示:转入质粒的 HepG-Tet-on 细胞具有绿色荧光表达,确定了 TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 表达的可调控性(彩插 1 图 5)。

2.4 阳性细胞 NIH/3T3 中目的基因表达的检测

包装病毒感染 NIH/3T3 细胞,通过 G418(800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)药物筛选获得阳性细胞,抽提 RNA,逆转录



注:A: Tet-on 系统原理图; B: pLNHXO102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA、pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 质粒结构图; C、D、E: 质粒 pLNHXO102-Alb-GLUC-rtTA、pTRE2hyg-Fluc、pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 的构建; M:DL2000 Marker。

图 2 质粒 pLNHXO102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA、pTRE2hyg-Fluc 和 pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 的构建方法
 Note:A: Tet-on system; B: schematic diagram of plasmid pLNHXO102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA、pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen; C、D、E: Construction of plasmid pLNHXO102-Alb-GLUC-rtTA、pTRE2hyg-Fluc、pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen; M: DL2000 Marker.

Fig.2 Construction of plasmid pLNHXO102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA、pTRE2hyg-Fluc and pLNHXO506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen

后 PCR 检测细胞中目的基因的表达,引物见表 1。经检测 Alb-GLUC-rtTA-NIH/3T3 细胞 2~4 号, TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 2~4 号在预期位置看到实验设想的条带,表明成功建立了 uPA 诱导表达系统。

3 讨论

病毒性肝炎及相关脏器疾病是危害人类生命和健康的重大公共卫生问题。以乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染为例,目前全球约有

HBV 携带者 3.5 亿人,中国约有 1.2 亿人。丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染也是一个世界范围的严重问题。HBV 或 HCV 的感染是导致慢性肝病和肝癌的重要病因,然而相关机制仍未完全阐明^[5-6]。为了有效进行病毒性肝炎研究,需要建立可以模拟人类自然感染过程的合适的小动物模型。现有的转病毒基因小鼠、病毒基因高压水动力法转染小鼠模型等,均非自然感染模型^[7-17]。

鉴于 HBV 或 HCV 对人肝细胞受体的特殊嗜性,比较理想的小动物模型是肝脏人源化的小鼠模

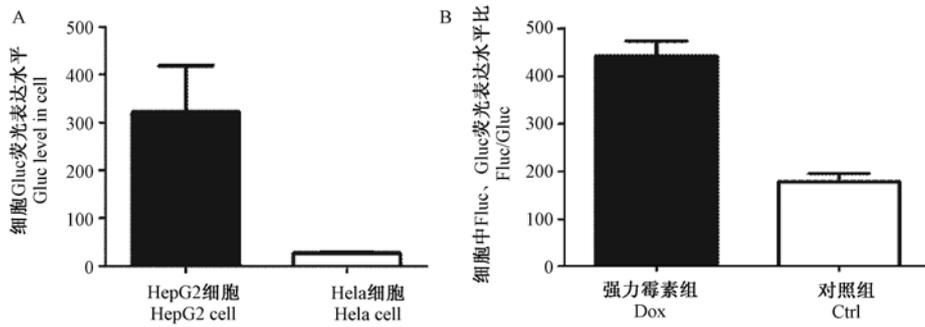


图 3 重组质粒 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 功能鉴定

Fig.3 Functional identification of pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA

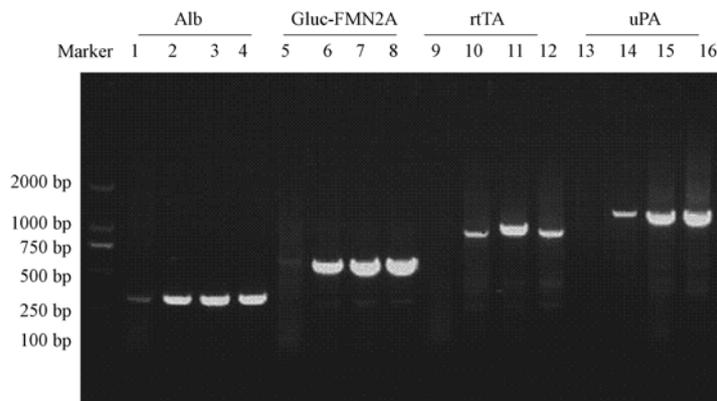


图 4 阳性细胞 NIH/3T3 中目的基因的表达

Fig.4 Expressing of target gene in NIH/3T3

型, uPA/SCID 小鼠模型即属于其中应用较多的一类。然而由于原有的 uPA/SCID 小鼠模型仍然存在诸多缺陷, 对其更广泛的应用形成了限制。国际上病毒性肝炎著名学者 Charles M. Rice 和 Alexander Ploss^[18] 提出, 可诱导型肝损基础上的人肝/免疫双嵌合小鼠模型是代表人类肝脏病研究领域中新希望的地平线 (new horizon)。可诱导型肝损伤模型无建模手术窗口期限制, 而且由于毒性基因的可控表达也解决了种群繁育方面的困难, 因此可克服原有 uPA 小鼠诸多缺点。

北京大学邓宏魁等^[2] 曾报道: 利用 tet-on 调控系统以及腺病毒感染转入 uPA 基因的方法来实现 uPA 可调控表达和定时肝损的发生。然而, 由于维持 uPA 表达需反复进行腺病毒接种感染, 宿主小鼠产生针对前次腺病毒感染产生的抗体可影响后续腺病毒感染的效率, 从而降低 uPA 表达水平。而且, 由于腺病毒感染本身可激活天然免疫, 必然会干扰后续作为研究对象的 HBV 或 HCV 等病毒的感染过程, 因此该模型只适用于肝移植和再生的研究, 并不适合用于 HBV、HCV 等的感染研究。

构建 tet-on 系统调控的 uPA 转基因/免疫缺陷小鼠模型是一个可完全避开上述通过腺病毒感染转入 uPA 基因的模型缺陷的策略^[19-20]。本研究建立了基于 tet-on 的可调控性 uPA 诱导表达系统。通过 PCR 扩增成功获得目的基因 Alb、GLUC、rtTA、TRE2、uPA、IRES-ZsGreen (图 1), 并将其插入改造后的 pUC19、pLNHX 载体中, 酶切鉴定结果 (图 2) 表明: 已成功构建 pLNHX0102-Alb-GLUC-FMN2A-rtTA 和 pLNHX0506-TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 重组质粒。后期我们对重组质粒功能进行检测, 结果初步确定了 Alb 启动子、rtTA、TRE2 具有表达活性 (图 3)。实验组 Dox 诱导后细胞有绿色荧光表达, 可确定 TRE2-uPA-IRES-ZsGreen 表达的可调控性。

本研究所构建的可调控性 uPA 诱导表达系统将进一步用于构建可调控性 uPA/SCID 小鼠模型, 所建立的小鼠作为肝脏人源化小鼠模型, 可解决以往各种转病毒基因小鼠、病毒基因高压水动力法转染小鼠模型等的非自然感染过程的问题, 同时由于实现了毒性基因 uPA 的可控表达, 还可以克服原有 uPA/SCID 小鼠的品系繁育困难, 手术窗口期限制

等缺陷,从而为病毒性肝炎的研究提供一个更加有力的模型。

参考文献:

- [1] Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, *et al.* Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera [J]. *Hepatology*, 2005, 41(4):847-856.
- [2] Song X, Guo Y, Duo S, *et al.* A mouse model of inducible liver injury caused by tet-on regulated urokinase for studies of hepatocyte transplantation [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):1975-1983.
- [3] Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, *et al.* Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator [J]. *Cell*, 1990, 62(3):447-456.
- [4] Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, *et al.* Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an Albumin-plasminogen activator transgene [J]. *Cell*, 1991, 66(2):245-256.
- [5] Philip Meuleman, Geert Leroux-Roels. The human liver-uPA-SCID mouse; A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV [J]. *Antiviral Research*, 2008, 80(3):231-238.
- [6] Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection [J]. *Lancet*, 2014, Jun 18. (14)60220-60228.
- [7] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, *et al.* Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. *Science*, 1999, 284(5415):825-829.
- [8] Baumert TF, Yang C, Schürmann P, *et al.* Hepatitis B virus mutations associated with fulminant hepatitis induce apoptosis in primary Tupaia hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2005, 41(2):247-256.
- [9] Lin E, Luscombe C, Colledge D, *et al.* Long-term therapy with the guanine nucleoside analog penciclovir controls chronic duck hepatitis B virus infection in vivo [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(8):2132-2137.
- [10] Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, *et al.* Small Animal Model Systems for Studying Hepatitis B Virus Replication and Pathogenesis [J]. *Seminars in liver disease*, 2006, 26(2):181-191.
- [11] Kimura K, Kakimi K, Wieland S, *et al.* Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice [J]. *J Virol*, 2002, 76(21):10702-10707.
- [12] Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, *et al.* Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(6):1743-1747.
- [13] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, *et al.* High-Level Hepatitis B Virus Replication in Transgenic Mice [J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(10):6158-6169.
- [14] Liu F, Song Y, Liu D, *et al.* Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. *Gene Therapy*, 1999, 6(7):1258-1266.
- [15] Yang PL, Althage A, Chung J, *et al.* Hydrodynamic injection of viral DNA: A mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(21):13825-13830.
- [16] Konishi M, Tanaka H, Kaito M, *et al.* Ultrastructural demonstration of hepatitis B virus production in a mouse model produced by hydrodynamic transfection [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(1):31-36.
- [17] Huang LR, Wu HL, Chen PJ, *et al.* An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47):17862-17867.
- [18] De Jong YP, Rice CM, Ploss A. New horizons for studying human hepatotropic infections [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(3):650-653.
- [19] 张一, 黎晓敏, 吕凤林, 等. Cre/Loxp 和四环素系统在基因可控表达中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, (1):76-80.
- [20] 杨丽华, 周常文. Tet-on 调控的基因表达载体的构建与体外表达研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2011, (2):81-83.

[修回日期] 2014-11-20