

# 同时表达活化型IGF1、EGF和FGF2的慢病毒载体的构建

郑丹丹<sup>1#</sup> 叶景佳<sup>2#</sup> 杨蓓蓓<sup>1\*</sup> 曹江<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学医学院附属第二医院耳鼻咽喉科, 杭州 310009;

<sup>2</sup>浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心, 杭州 310009)

**摘要** 共培养体系及添加外源性生长因子是诱导干细胞向内耳样细胞分化研究中的常用手段。为了将两种方法结合用于研究, 该实验设计了一种可同时表达三种活化型生长因子的慢病毒载体。活化型表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)编码序列采用RT-PCR方法从SW620人大肠癌细胞中克隆, 活化型胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)和成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)编码序列为人工合成。用PCR方法分别从pSecTag2A和pIRES2-EGFP质粒中克隆出引导分泌的免疫球蛋白Igκ链信号肽编码序列和引导翻译的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)序列。将Igκ链信号肽和三种因子的编码序列分别融合、由IRES间隔并克隆到带绿荧光蛋白报告基因的慢病毒表达质粒pLVX-IRES-ZsGreen1上并包装获得慢病毒。将慢病毒感染HEK293T细胞, 通过有限稀释法筛选出稳定表达绿荧光蛋白的单细胞克隆。用Western blot检测单细胞克隆的IGF1、EGF和FGF2的表达, 并通过促进肺癌A549细胞生长实验验证了分泌的生长因子的活性。该研究成功构建了导入细胞后可同时表达活化型IGF1、EGF和FGF2的慢病毒载体, 为今后设计可表达这三种因子的共培养工程细胞用于干细胞诱导分化提供了有力的工具。

**关键词** IGF1; EGF; FGF2; 慢病毒表达载体

## Construction of A Lentiviral Vector Simultaneously Expressing Active IGF1, EGF and FGF2

Zheng Dandan<sup>1#</sup>, Ye Jingjia<sup>2#</sup>, Yang Beibei<sup>1\*</sup>, Cao Jiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China;

<sup>2</sup>Clinical Research Center, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

**Abstract** Co-culture system and exogenous growth factors are commonly used in induction of directional differentiation of stem cells towards sensory hair cells. In order to combine these two strategies in further work, we designed a lentiviral vector which could simultaneously express active IGF1, EGF and FGF2. The coding sequence for active epidermal growth factor (EGF) was cloned by RT-PCR with RNA from human colorectal cancer SW620 cells, and the coding sequences for active insulin-like growth factor 1 (IGF1) and fibroblast growth factor 2

收稿日期: 2014-07-07 接受日期: 2014-08-28

浙江省医药卫生科技计划项目(批准号: 2011ZDA012)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 0571-87783525, E-mail: yangbb1959@sina.com; Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

Received: July 7, 2014 Accepted: August 28, 2014

This work was supported by the Medical Science and Technology Project of Zhejiang Province (Grant No.2011ZDA012)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding authors. Tel: +86-571-87783525, E-mail: yangbb1959@sina.com; Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

网络出版时间: 2014-10-28 16:02 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0229.html>

(FGF2) were artificially synthesized. The coding sequence for the signal peptide of human immunoglobulin (Igκ) responsible for protein secretion and sequence for internal ribosome entry site (IRES) responsible for translation initiation were cloned from plasmids pSecTag2A and pIRES2-EGFP, respectively. The coding sequences for Igκ and three growth factors were fused respectively with IRES spacers in between, cloned into a lentiviral expression plasmid with green fluorescent protein (GFP) reporter, pLVX-IRES-ZsGreen1, and packaged into recombinant lentiviruses. HEK293T cells were infected by the lentiviruses and screened for single cell clones with GFP expression by limited dilution. The expression of IGF1, EGF and FGF2 were examined by Western blot, and proliferation assay of human lung cancer A549 cells was used to evaluate the activity of the secreted growth factors. In conclusion, we successfully constructed a lentiviral vector which could simultaneously express functionally active IGF1, EGF and FGF2 when introduced into mammalian cells in this work, providing a powerful tool for designing engineered cells expressing these three growth factors used in co-culture system to induce directional differentiation of stem cells.

**Key words** IGF1; EGF; FGF2; lentiviral expression vector

感音神经性耳聋是一种常见的感觉障碍性疾病, 先天性严重耳聋的发生率为千分之一, 严重困扰着人类的健康、生活与交流。多种致病因素可引起毛细胞及相关的螺旋神经节神经元细胞损伤或死亡, 从而引起感音神经性聋。非哺乳类脊椎动物其毛细胞在损伤和死亡后可以再生, 但哺乳动物的毛细胞一旦损伤不能自然再生<sup>[1-2]</sup>。

近年来, 感音神经性聋的发病率呈明显上升趋势, 但现有的治疗手段却很有限, 主要是助听器和电子耳蜗植入, 但这些治疗手段却不能从根本上恢复耳蜗的生理结构, 逆转患者的听力水平。而干细胞在修复和再生受损的器官和细胞方面展现出了巨大的潜能, 这也为内耳细胞的修复带来了希望<sup>[3-5]</sup>。干细胞是一类未分化的具有无限自我更新与增殖分化能力的细胞, 在一系列调节因子参与下, 通过模拟内耳正常发育过程, 可被诱导分化为毛细胞、神经元和支持细胞等内耳细胞。其中, IGF1(insulin-like growth factor 1)、EGF(epidermal growth factor)和FGF2(fibroblast growth factor 2)三种生长因子参与内耳的发育成熟过程, 在内耳细胞中可检测到三种因子及其受体的表达<sup>[6-8]</sup>。它们是强有力的促有丝分裂原, 促进内耳细胞的分裂增殖, 诱导特定的细胞表型。研究表明, 干细胞在添加有三种生长因子的培养基中生长, 有助于其向内耳样细胞分化<sup>[9-11]</sup>。利用耳蜗相关组织与干细胞共培养也是诱导干细胞向内耳样细胞分化的重要手段<sup>[12-14]</sup>。共培养是采用具有半透膜的细胞培养池, 将两种或两种以上细胞共同培养于同一环境中, 细胞之间不相互接触, 但上室

细胞分泌的因子可透过半透膜, 从而诱导下室细胞向另一种细胞分化。成年老鼠的嗅觉干细胞在与耳蜗细胞共培养后表达了毛细胞的特异型标记<sup>[12]</sup>。骨髓间充质干细胞与胚胎3 d的鸡听囊细胞共培养21 d后, 其毛细胞相关标记的表达量增加<sup>[18]</sup>。因此, 我们可以通过结合共培养体系和添加生长因子的方法以达到诱导干细胞向内耳细胞分化的目的。但是, 由于细胞生长对生长因子的持续消耗, 人为添加生长因子不能稳定持续作用, 加之生长因子本身价格昂贵, 因此如果能够构建一种稳定表达IGF1、EGF和FGF2三种生长因子的慢病毒载体, 将其导入到合适的工程细胞中使其持续稳定地分泌生长因子而无需另外人为添加, 再利用工程细胞与干细胞进行共培养从而诱导干细胞向内耳细胞分化, 这对于研究生长因子对干细胞的诱导分化作用以及对于感音神经性聋的生物治疗都具有重要意义。

基于上述设想, 本工作设计构建了一种能够同时表达活化型IGF1、EGF和FGF2的慢病毒表达载体, 并用HEK293T细胞验证了该慢病毒载体能够成功表达活化型生长因子, 为今后在不同应用性研究中选择不同的细胞以建立相应的工程细胞、用于与干细胞进行共培养打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种和细胞株

pGEM-T Easy Vector System购自Promega公司, 慢病毒质粒系统pLVX-IRES-ZsGreen1、pMD2G和pSPAX2及pIRES2-EGFP质粒购自Clontech公司,

pSecTag2A质粒购自Invitrogen公司, 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 菌株由本实验室保存, 人大肠癌细胞SW620、人胚肾细胞HEK293T及人肺癌细胞A549购自ATCC公司。

## 1.2 试剂

中量质粒抽提试剂盒Plasmid Midi Kits、转染试剂Attractene Transfection Reagent及胶回收试剂盒QIAquick Gel Extraction Kit购自QIAGEN公司, 限制性内切酶、碱性磷酸酶(CIP)购自New England Biolabs公司, RNA提取试剂TRIZOL购自Life Technologies公司, 逆转录酶M-MLV Reverse Transcriptase、T4 DNA连接酶、GoTaq DNA聚合酶购自Promega公司, DMEM(高糖)、RPMI-1640培养液购自BOSTER公司, 胎牛血清购自Gibco公司, Polybrene购自Sigma公司, 蛋白酶抑制剂Complete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail Tablet、EGF抗体、IGF1抗体和FGF2抗体购自Santa Cruz公司, DC蛋白定量试剂盒购自Bio-Rad公司, 化学发光底物Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate购自Millipore公司, CCK-8试剂购自贝博生物公司。

## 1.3 引物合成

所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

## 1.4 方法

1.4.1 表达载体的设计及片段克隆 表达载体采用由CMV启动子启动表达的慢病毒载体pLVX-IRES-ZsGreen1, 插入的外源序列为分别编码活化型IGF1、EGF和FGF2的三个独立开放阅读框(opening reading frame, ORF)序列, 在三个生长因子编码序列前均引入Kozak序列(增强翻译)和免疫球蛋白Ig $\kappa$ 链的信号肽(引导因子分泌)编码序列, 同时为保证同一个RNA转录产物上的三个独立的编码框均能翻译, 在三个序列之间分别接入内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)。图1为插入的外

源序列设计示意图。

我们采用的Kozak序列为TAG CCA CC, 免疫球蛋白Ig $\kappa$ 链的信号肽编码序列克隆自pSecTag2A质粒, IRES序列克隆自pIRES2-EGFP质粒, 活化型EGF、IGF1和FGF2编码序列根据Genbank收录的全长编码区序列并参考各自活化型因子氨基酸序列进行确定。其中, 活化型EGF编码序列通过RT-PCR方法从大肠癌细胞SW620中克隆, 活化型IGF1和FGF2编码序列分别通过化学合成多个寡聚核苷酸片段后以PCR方法拼接获得。构建过程中各DNA片段之间通过Spe I和Xba I这一对同尾酶产生的黏性末端相互连接且不可再切开。

采用PCR方法从pIRES2-EGFP质粒中克隆出IRES。引物分别为IRES-F: 5'-ACT AGT GCC CCT CTC CCT CCC CCC-3', IRES-R: 5'-TCT AGA TGT GGC CAT ATT ATC ATC GTG-3'(下划线部分分别为引入的Spe I和Xba I酶切位点)。PCR扩增条件是94 °C变性5 min; 然后94 °C变性30 s、58 °C退火30 s、72 °C延伸30 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸7 min。扩增产物(597 bp)通过2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并按照QIAGEN的QIAquick Gel Extraction Kit说明书进行切胶回收。取3  $\mu$ L切胶回收产物与pGEM-T Easy Vector连接, 在T4 DNA连接酶作用下16 °C连接过夜。连接产物转化到DH5感受态细胞中, 氨苄青霉素抗性平板筛选培养, 挑取阳性克隆, 经EcoR I酶切鉴定正确后测序验证。

Ig $\kappa$ -EGF片段的克隆过程如下: 首先, 采用PCR方法从pSecTag2A质粒中克隆出Ig $\kappa$ 信号肽编码序列。引物分别为Ig $\kappa$ -F: 5'-ACT AGT TAG CCA CCA TGG AGA CAG AC-3'(下划线部分为引入的Spe I酶切位点, 斜体加粗部分为引入的Kozak序列); Ig $\kappa$ -R: 5'-GTC ACC AGT GGA ACC TGG AA-3'。PCR扩增条件同上, 扩增片段大小为77 bp, 同上方法克隆并测序验证。再以TRIZOL法提取大肠癌细胞SW620



Kz: Kozak序列; Ig $\kappa$ : 免疫球蛋白Ig $\kappa$ 链信号肽; IRES: 内部核糖体进入位点; IGF1: 胰岛素样生长因子1; EGF: 表皮生长因子; FGF2: 成纤维细胞生长因子2。

Kz: Kozak sequence; Ig $\kappa$ : signal peptide of immunoglobulin Ig $\kappa$  chain; IRES: internal ribosome entry site; IGF1: insulin-like growth factor 1; EGF: epidermal growth factor; FGF2: fibroblast growth factor 2.

图1 活化型IGF1、EGF、FGF2表达载体插入片段示意图

Fig.1 Illustration of inserted fragment for active forms of IGF1, EGF and FGF2 expression vector



的总RNA, 采用Promega公司的逆转录酶M-MLV Reverse Transcriptase逆转录合成cDNA, 再以此cDNA为模板, PCR扩增出EGF编码序列。引物分别为EGF-F: 5'-***TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACA*** ATA GTG ACT CTG AAT GTC CCC-3'(斜体加粗部分为引入的Igκ信号肽下游互补序列), EGF-R: 5'-***TCT AGA TTA*** GCG CAG TTC CCA CCA CTT CA-3'(下划线部分为引入的*Xba* I酶切位点, 斜体加粗部分为引入的终止密码), PCR扩增条件同上, EGF片段大小为188 bp, 同上方法克隆并测序验证。最后, 以Igκ信号肽和EGF编码序列片段为模板, 分别以Igκ-F和EGF-R为上下游引物进行overhang PCR扩增<sup>[15]</sup>, 扩增条件同上, 扩增获取245 bp Igκ-EGF目的片段, 同上方法克隆PCR产物并测序验证。

IGF1和FGF2编码序列通过如下方式合成。带有Kozak序列和Igκ信号肽编码序列的活化型IGF1和FGF2序列分别由上海英骏生物技术有限公司直接合成, 利用PCR将合成的Oligo拼接成完整的基因序列。将合成好的序列装入pMD19-T Simple载体并转化至感受态细胞DH5α。测序验证重组克隆中插入序列是否与要求相一致。IGF1序列: 5'-***ACT AGT TAG CCA CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC TAT GGG TAC TGC TGC TCT GGG TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACG*** GAC CGG AGA CGC TCT GCG GGG CTG AGC TGG TGG ATG CTC TTC AGT TCG TGT GTG GAG ACA GGG GCT TTT ATT TCA ACA AGC CCA CAG GGT ATG GCT CCA GCA GTC GGA GGG CGC CTC AGA CAG GCA TCG TGG ATG AGT GCT GCT TCC GGA GCT GTG ATC TAA GGA GGC TGG AGA TGT ATT GCG CAC CCC TCA AGC CTG CCA AGT CAG CTT AAT ***CTA GA***-3'(296 bp, 下划线部分分别为引入的*Spe* I和*Xba* I酶切位点, 斜体加粗部分为引入的Kozak序列, 斜体下划线部分为引入的Igκ信号肽编码序列); FGF2序列: 5'-***ACT AGT TAG CCA CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC TAT GGG TAC TGC TGC TCT GGG TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACG*** CAG CCG GGA GCA TCA CCA CGC TGC CCG CCT TGC CCG AGG ATG GCG GCA GCG GCG CCT TCC CGC CCG GCC ACT TCA AGG ACC CCA AGC GGC TGT ACT GCA AAA ACG GGG GCT TCT TCC TGC GCA TCC ACC CCG ACG GCC GAG TTG ACG

GGG TCC GGG AGA AGA GCG ACC CTC ACA TCA AGC TAC AAC TTC AAG CAG AAG AGA GAG GAG TTG TGT CTA TCA AAG GAG TGT GTG CTA ACC GTT ACC TGG CTA TGA AGG AAG ATG GAA GAT TAC TGG CTT CTA AAT GTG TTA CGG ATG AGT GTT TCT TTT TTG AAC GAT TGG AAT CTA ATA ACT ACA ATA CTT ACC GGT CAA GGA AAT ACA CCA GTT GGT ATG TGG CAC TGA AAC GAA CTG GGC AGT ATA AAC TTG GAT CCA AAA CAG GAC CTG GGC AGA AAG CTA TAC TTT TTC TTC CAA TGT CTG CTA AGA GCT GAT AAT ***CTA GA***-3'(551 bp, 下划线部分分别为引入的*Spe* I和*Xba* I酶切位点, 斜体加粗部分为引入的Kozak序列, 斜体下划线部分为引入的Igκ信号肽编码序列)。

1.4.2 慢病毒表达载体的构建 将上述片段分别与pGEM-T Easy Vector连接并测序验证正确后, 按照图1的设计顺序, 用内切酶*Spe* I和*Xba* I酶切将上述已获得的各个片段依次连接并克隆至pGEM-T Easy Vector上, 形成的载体命名为pGEM-T-3GF。pGEM-T-3GF用*Spe* I和*Xba* I双酶切, 慢病毒载体质粒pLVX-IRES-ZsGreen1用*Xba* I单酶切, 将整个目的片段克隆至慢病毒载体质粒pLVX-IRES-ZsGreen1中, 用内切酶*EcoR* I和*Xba* I双酶切鉴定插入片段的方向。正确插入的质粒命名为pLVX-3GF。

1.4.3 慢病毒包装 用QIAGEN Plasmid Midi Kits提取质粒pLVX-3GF、pMD2G和pSPAX2, 分别各取10 μg稀释于1 mL不含血清不含抗生素的高糖DMEM中, 轻柔混匀, 再加入30 μL Attractene Transfection Reagent于上述培养基中, 轻柔混匀后室温静置20 min以形成转染复合物。人胚肾HEK293T细胞常规培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养。将1 mL消化离心后的HEK293T细胞悬液和1 mL转染复合物轻轻混匀后加入到10 cm培养皿中, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养, 6 h后补足培养液至10 mL。分别在转染48 h及72 h后, 收集含病毒的培养液上清, 用0.45 μm滤器过滤, 4 °C保存备用。

1.4.4 慢病毒感染HEK293T细胞 接种HEK293T细胞于3.5 cm培养皿中(培养液不含抗生素), 24 h后(细胞达到70%汇合度)吸去培养液, 加入500 μL含病毒颗粒的上清和0.4 μL Polybrene(贮备液10 mg/mL,

终浓度8  $\mu\text{g/mL}$ ), 6 h后补足培养液, 24 h后更换新鲜培养液, 细胞继续培养48 h后, 荧光显微镜下观察感染情况, 并采用有限稀释法(1个细胞/孔接种到96孔板中)筛选可表达绿色荧光蛋白的稳定感染的细胞克隆, 将稳定感染的细胞克隆命名为HEK293T/3GF。

1.4.5 Western blot法检测感染后目的蛋白的表达  
细胞中因子检测: 收获HEK293T/3GF细胞及未感染的HEK293T对照细胞, PBS洗涤3次, 离心收集细胞, 加入冰预冷的裂解液(25 mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 含蛋白酶抑制剂Complete™ Protease Inhibitor Cocktail), 并置于冰上裂解30 min, 15 000 r/min、4 °C离心15 min收集上清, 用DC蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 取20  $\mu\text{g}$ 总蛋白进行20% SDS-PAGE凝胶电泳后转膜, 10%牛奶室温封闭1 h后, 分别加入EGF、FGF2和IGF1三种抗体(1:500), 4 °C孵育过夜。TBST(TBS加0.1% Tween20)洗膜3 $\times$ 10 min, 加过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h, 洗膜3 $\times$ 10 min, 化学发光法检测信号。

培养液中因子检测: 收集HEK293T/3GF细胞及未感染的HEK293T对照细胞的培养液各10 mL, 离心去除细胞碎片, -80 °C冷冻干燥, 溶于500  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 各取20  $\mu\text{L}$ 进行20% SDS-PAGE, 同上转膜后检测因子表达。

1.4.6 A549细胞增殖实验 HEK293T/3GF细胞及HEK293T对照细胞常规培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养。待细胞长至80%汇合度后再培养48 h

后收集上清, 作为条件培养液。人肺癌A549细胞以每孔 $1.5\times 10^4$ 细胞接种于96孔板, 实验组加入50  $\mu\text{L}$  HEK293T/3GF细胞的条件培养液和50  $\mu\text{L}$ 新鲜的含10%胎牛血清的1640培养液, 对照组加入50  $\mu\text{L}$  HEK293T细胞的条件培养液和50  $\mu\text{L}$ 新鲜的含10%胎牛血清的1640培养液。继续培养48 h后, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂, 在培养箱内孵育2 h后用酶标仪检测450 nm吸光度值。

## 1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计分析。计量数据以mean $\pm$ S.E.M.表示, 两组均数比较采用 $t$ 检验;  $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

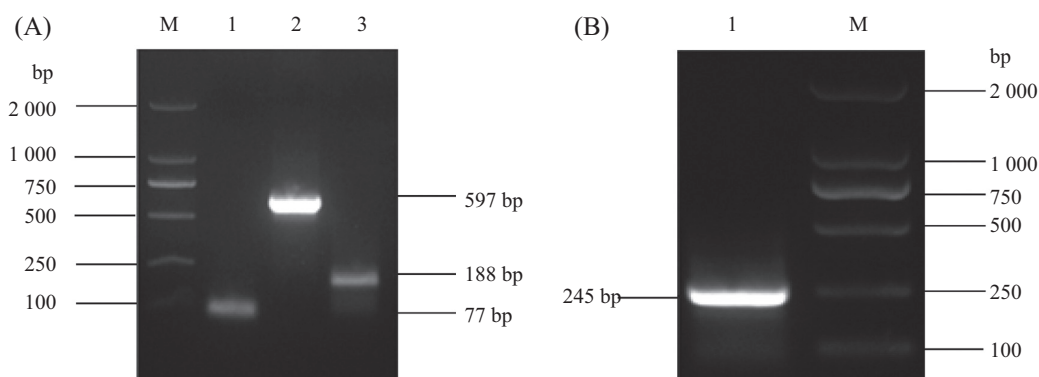
## 2 结果

### 2.1 IRES、Ig $\kappa$ 、EGF片段的克隆

以pIRES2-EGFP质粒为模板, 以IRES-F及IRES-R为上下游引物, 经PCR扩增出目的片段, 电泳结果与预期目的片段大小相符, 为597 bp(图2A)。以pSecTag2A质粒为模板, 以Ig $\kappa$ -F及Ig $\kappa$ -R为上下游引物, 经PCR扩增出目的片段, 电泳结果与预期目的片段大小相符, 为77 bp(图2A)。以大肠癌细胞SW620的总RNA为模板, 逆转录后以EGF-F和EGF-R为上下游引物, PCR扩增出目的片段, 电泳结果与预期目的片段大小相符, 为188 bp(图2A)。三段序列经测序验证均正确。

### 2.2 Ig $\kappa$ -EGF片段的克隆

以Ig $\kappa$ 信号肽和EGF片段为模板, 以Ig $\kappa$ -F和EGF-R为上下游引物进行PCR扩增, 扩增产物电泳



A: Ig $\kappa$ 信号肽、IRES和EGF片段的PCR产物。1: Ig $\kappa$ 信号肽片段; 2: IRES片段; 3: EGF片段; M: DL2000 marker。B: Ig $\kappa$ -EGF片段的PCR产物。1: Ig $\kappa$ -EGF片段; M: DL2000 marker。

A: PCR products of Ig $\kappa$  signal peptide, IRES and EGF. 1: the Ig $\kappa$  signal peptide fragment; 2: the IRES fragment; 3: the EGF fragment; M: DL2000 marker。B: PCR product of Ig $\kappa$ -EGF. 1: the Ig $\kappa$ -EGF fragment; M: DL2000 marker。

图2 Ig $\kappa$ 信号肽、IRES、EGF及Ig $\kappa$ -EGF序列的PCR克隆

Fig.2 Cloning of Ig $\kappa$  signal peptide, IRES, EGF and Ig $\kappa$ -EGF sequences by PCR

结果显示与Igκ-EGF预期大小相符,为245 bp(图2B),经测序验证正确。

### 2.3 慢病毒载体的构建

按照图1的设计,将以上各个片段依次连接并克隆至慢病毒载体中,构建成表达载体质粒pLVX-3GF。获得的质粒用内切酶*EcoR* I和*Xba* I双酶切鉴定插入片段方向,正向插入时片段大小为8.2 Kb和2 280 bp(图3),表明构建成功。

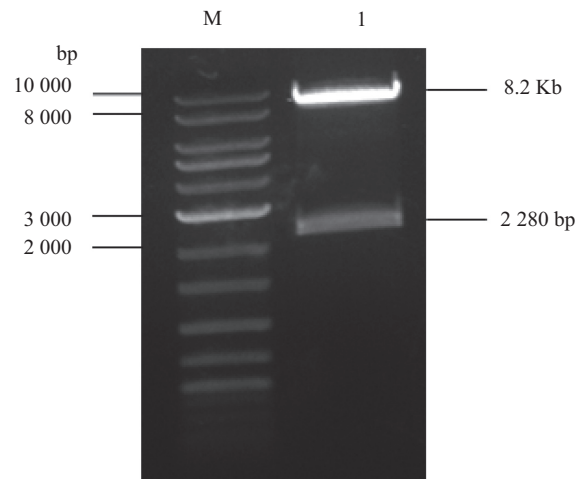
### 2.4 细胞感染及稳转细胞构建

慢病毒感染HEK293T细胞48 h后,荧光显微镜下观察感染后绿色荧光信号。图中较多细胞表达绿色荧光,表明慢病毒载体成功感染HEK293T细胞(图4A)。后通过有限稀释法筛选,获得稳定表达目的基因的细胞克隆,图中所有细胞均表达绿色荧光,细胞经传代培养后所有细胞仍全部表达荧光,说明成功获得了稳定感染的细胞(图4B)。

### 2.5 Western blot检测三种生长因子的表达

分别收集HEK293T/3GF细胞及其培养液进行Western blot检测EGF、IGF1和FGF2的表达,如图5所示,在6~18 kDa之间分别检测到了目的蛋白

EGF(6.2 kDa)、IGF1(6 kDa)和FGF2(17.2 kDa),表明HEK293T/3GF细胞成功表达三种生长因子并可将生长因子分泌到培养液上清中。

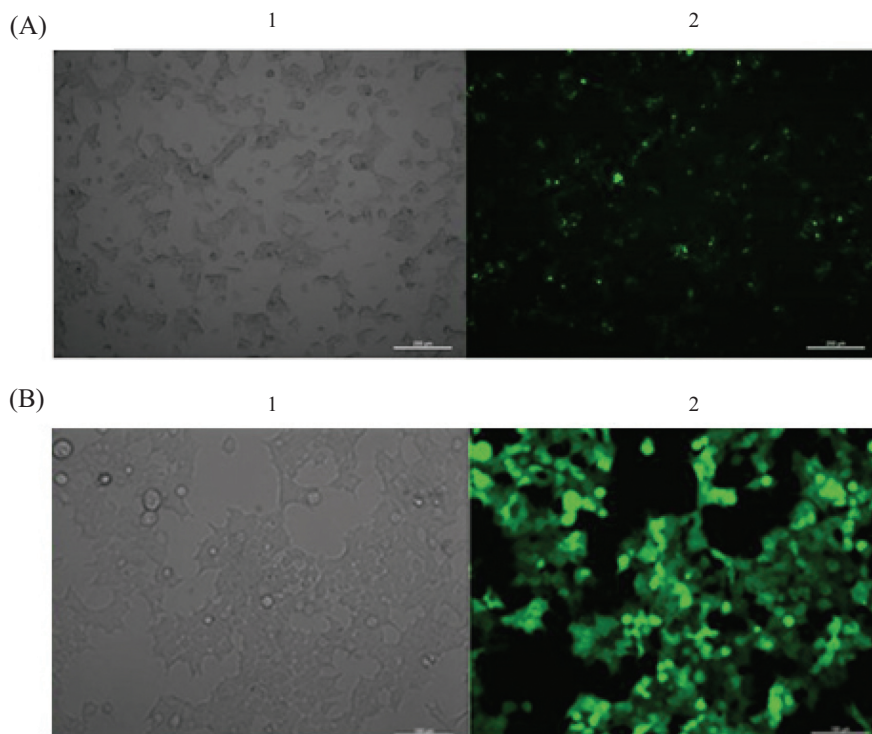


M: 10 Kb plus DNA ladder marker; 1: pLVX-3GF质粒, *EcoR* I和*Xba* I双酶切。

M: 10 Kb plus DNA ladder marker; 1: *EcoR* I and *Xba* I double digestion of pLVX-3GF plasmid.

图3 慢病毒载体的构建及鉴定

Fig.3 Construction and characterization of lentiviral vector



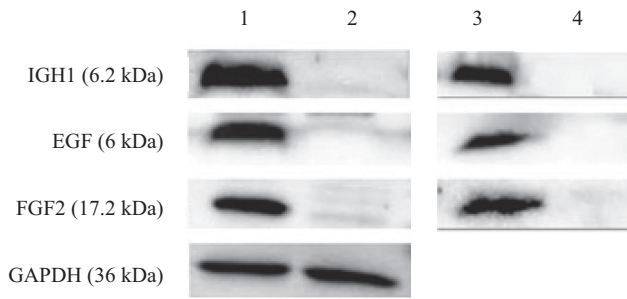
A: 慢病毒感染后HEK293T细胞(100×)。1: 明场下视野; 2: 荧光下视野; B: 稳定感染HEK293T/3GF细胞克隆(200×)。1: 明场下视野; 2: 荧光下视野。

A: HEK293T cells after lentivirus infection (100×). 1: microscopy under bright field; 2: microscopy under fluorescent field; B: stably infected HEK293T/3GF cells (200×). 1: microscopy under bright field; 2: microscopy under fluorescent field.

图4 慢病毒感染HEK293T细胞

Fig.4 Lentivirus infected HEK293T cells





1: HEK293T/3GF细胞裂解液; 2: HEK293T细胞裂解液; 3: HEK293T/3GF培养液上清; 4: HEK293T培养液上清。

1: lysate of HEK293T/3GF cells; 2: lysate of HEK293T cells; 3: culture medium of HEK293T/3GF cells; 4: culture medium of HEK293T cells.

图5 Western blot检测生长因子表达

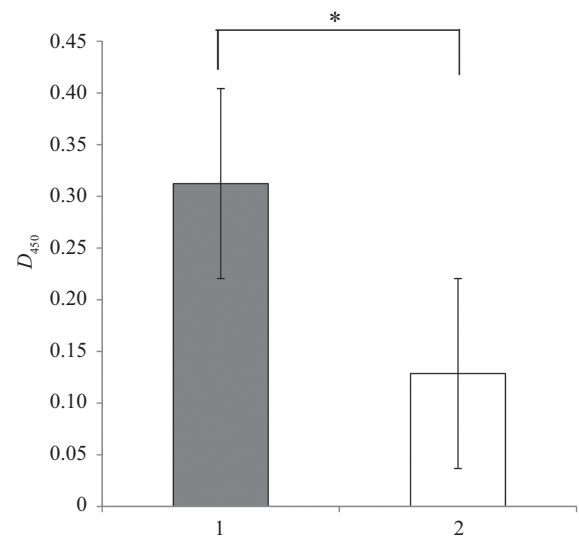
Fig.5 Expression of growth factors detected by Western blot

## 2.6 分泌的生长因子功能验证

IGF1、EGF和FGF2三种生长因子均促进人肺癌A549细胞的生长。CCK-8检测的实验结果表明, 和HEK293T对照条件培养液相比, HEK293T/3GF细胞条件培养液确实能够明显促进A549细胞的生长, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 说明HEK293T/3GF细胞分泌的生长因子确实是具有活性的、能够促进A549细胞生长的生长因子(图6)。

## 3 讨论

遗传突变、病毒细菌感染、耳毒性药物、噪音和衰老等多种致病因素可引起毛细胞及与之相联系的螺旋神经损伤或死亡, 而哺乳动物的毛细胞一旦损伤不能自然再生, 从而引起感音神经性聋。因此, 重建受损的听觉生理结构, 修复和再生内耳感觉细胞对于感音神经性聋的治疗至关重要。通过诱导干细胞产生内耳细胞在感音神经性聋的治疗方面显示出了巨大的优势。干细胞是一类能进行自我更新的多潜能细胞, 在一定条件下可诱导分化成为多种组织细胞类型。干细胞定向诱导分化为内耳样细胞已经在胚胎干细胞<sup>[10,16-17]</sup>、诱导多能干细胞<sup>[6]</sup>、骨髓间充质干细胞<sup>[18-20]</sup>、神经干细胞<sup>[21]</sup>和嗅觉干细胞<sup>[12,22]</sup>中得到应用。而相关研究表明, 胰岛素样生长因子1(IGF1)、表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因子2(FGF2)三种因子对于干细胞诱导分化为毛细胞样细胞是非常重要的。Saffer等<sup>[6]</sup>用RT-PCR的方法在大鼠椭圆囊的感觉表皮组织中检测到EGF受体(EGFR)、FGF2受体(FGF2R)和IGF1受体(IGF1R)在mRNA水平上的表达。而Malgrange等<sup>[7]</sup>和Pickles等<sup>[8]</sup>用同样的方法分别在大鼠和鸡的耳蜗组织中检测到三种因



1: HEK293T/3GF条件培养液组; 2: HEK293T条件培养液组。\* $P < 0.05$ 。  
1: HEK293T/3GF-conditioned medium group; 2: HEK293T-conditioned medium group. \* $P < 0.05$ .

图6 CCK-8检测A549细胞增殖

Fig.6 Proliferation of A549 cells by CCK-8 assay

子及其受体的表达。在内耳胚胎发育过程中, 三种生长因子与其表面受体结合, 促进内耳细胞有丝分裂, 诱导特定的细胞表型, 参与内耳的发生发展。Li等<sup>[9]</sup>研究发现, 胚胎干细胞在添加有三种因子的培养基生长一段时间后, 可表达毛细胞标志物, 并且可整合到发育的鸡胚胎内耳中, 分化成为毛细胞样细胞。EGF是由53个氨基酸残基组成的单链多肽, 能够有效促进内耳感觉上皮细胞分裂、增殖和分化。研究证明, EGF和TGF $\beta$ 1可诱导新生耳蜗产生额外的毛细胞<sup>[23]</sup>。Doetzlhofer等<sup>[18]</sup>发现, 在EGF和耳周间质细胞共同作用下, 内耳前体细胞被诱导分化成为成熟的内耳毛细胞, 若无EGF, 内耳毛细胞则不能生成。FGF2是一种促有丝分裂的肝素结合蛋白, 可诱导多种细胞增殖和分化, 在神经系统早期发育中起重要作用。FGF2和IGF1可以促进内耳支持细胞的增殖, 而支持细胞是再生毛细胞的一种重要的内源性细胞。椭圆囊中的毛细胞还可产生FGF2, FGF2是毛细胞生长、维持和再生的一种生理性生长因子<sup>[25]</sup>。Low等<sup>[26]</sup>发现, FGF2可以保护内耳感觉细胞, 使内耳细胞免受氨基糖苷类药物的损害。IGF1是一种在分子结构上与胰岛素类似的多肽蛋白质, 也是内耳一种强大的促有丝分裂原, 通过诱导DNA合成, 刺激有丝分裂, 从而促进听泡和耳蜗前庭螺旋神经元的生长<sup>[27-28]</sup>。在IGF1基因敲除的小鼠中, 其耳蜗及

耳蜗螺旋神经元的体积均缩小, 盖膜形态发生改变, 听觉神经元的大小和数量均明显减少, IGF1对于耳蜗的成熟和分化是必不可少的<sup>[29]</sup>。研究表明, 干细胞在向内耳样细胞分化过程中, 三种生长因子发挥着重要的作用, 但是, 由于培养过程中细胞对生长因子的持续消耗, 人为地添加因子不够稳定, 加之因子价格昂贵, 因此, 我们可通过构建稳定感染的工程细胞, 使其持续稳定地分泌三种因子, 再与干细胞共培养, 通过因子作用使干细胞向内耳样细胞诱导分化。

在真核细胞中, 目的基因表达主要受到转录、翻译两个水平的调控。慢病毒表达载体pLVX-IRES-ZsGreen1含有强大的CMV启动子, 可以有力启动基因转录, 但如何进一步提高翻译效率显得更加重要。真核生物蛋白翻译过程中, 起始密码子周边序列(Kozak序列)起到重要作用。Kozak序列是位于真核生物mRNA 5'端帽子结构后面的一段核酸序列, 如为GCC ACC ATG G时, 转录和翻译效率最高, 其中, -3A/G、+4G的作用尤为关键。核糖体可识别这段序列, 并借助它搜寻第一个起始密码子起始翻译。Kozak对胰岛素前体蛋白的基因点突变实验证实了在起始密码子前面的Kozak序列能够提高基因的表达水平<sup>[30]</sup>。我们在每段目的基因前都添加了Kozak序列以此增强外源基因的表达。

生长因子表达后需要分泌到细胞外才能发挥作用, 而Igk信号肽有较好的促进蛋白分泌作用。周淑萍等<sup>[31]</sup>用三种不同的信号肽引导蛋白分泌, 发现只有来自小鼠Igk链的信号肽能够高效引导HPO蛋白从细胞中分泌出来。因此, 我们将Igk信号肽序列与三种生长因子基因序列构成融合基因, 构建高效分泌型生长因子真核表达载体。

真核生物大多数蛋白质合成采用了依赖帽子结构的翻译起始方式。但微小RNA没有帽子位点, 其蛋白质合成起始是依赖其5'端非翻译区一段较短的RNA序列, 这类RNA序列能折叠成类似于起始tRNA的结构, 介导核糖体与RNA结合, 起始蛋白质翻译, 这段非翻译RNA被称为内部核糖体进入位点序列(IRES)。将IRES与外源cDNA融合, 发现IRES能独立地起始翻译。利用这一特性, IRES目前已被广泛应用于多元表达载体的构建, 由其连接的多个基因的表达率相同, 而翻译出来蛋白各具独立的空间结构和生理活性, 而不是融合蛋白。

IGF1、EGF和FGF2三种生长因子对于干细胞

向内耳细胞的诱导分化具有重要的作用, 为了使三种生长因子同时作用于干细胞并且分泌到胞外发挥作用, 我们设计构建了一种能同时表达三种生长因子的慢病毒载体, 并感染HEK293T细胞构建成稳转细胞。本研究将三个目的片段通过IRES连接以使其同时表达, 并在每个片段前添加Igk信号肽引导蛋白分泌, 由慢病毒载体导入到HEK293T细胞中, Western blot结果显示, IGF1、EGF和FGF2在HEK293T细胞中成功表达。为了进一步验证这些因子是否分泌到胞外, 我们选取了人肺癌A549细胞, 此细胞对三种生长因子都较为敏感, 在加入了HEK293T/3GF细胞条件培养液后, 与对照组相比生长明显增快, 说明我们构建的稳转细胞分泌的生长因子确实具有活性且能促进A549细胞的生长, 进一步说明慢病毒表达载体构建成功, 为后面选择更加合适的工程细胞与干细胞共培养打下了基础。这样, 我们就获得了同时稳定表达三种生长因子慢病毒表达载体及稳定转染的HEK293T/3GF细胞, 能够持续稳定分泌三种生长因子, 与人工添加生长因子相比更加持久稳定, 并且不需要反复添加因子, 节省了人力物力。在本工作基础上可以根据研究选择合适的细胞以建立相应的工程细胞, 利用ELISA方法定量检测分泌的生长因子的水平, 利用因子-受体结合实验和受体激酶活性检测分泌的生长因子的生物学活性, 从而筛选出可稳定分泌不同量的活化型生长因子的细胞用于不同需求的研究。本研究为后续的工程细胞与干细胞共培养进而向内耳细胞的诱导分化工作奠定了基础, 同时也为需要持续性添加多种其他种类的外源活化型因子的研究提供了思路。

## 参考文献 (References)

- 1 Corwin JT, Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 1988; 240(4860): 1772-4.
- 2 Stone JS, Cotanche DA. Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Int J Dev Biol* 2007; 51(6/7): 633-47.
- 3 Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature* 2011; 473(7347): 326-35.
- 4 Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 2008; 456(7223): 804-8.
- 5 Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; 407(6807): 963-70.
- 6 Saffer LD, Gu R, Corwin JT. An RT-PCR analysis of mRNA for growth factor receptors in damaged and control sensory epithelia of rat utricles. *Hear Res* 1996; 94(1/2): 14-23.
- 7 Malgrange B, Rogister B, Lefebvre PP, Mazg-Servais C, Welcher



- AA, Bonnet C, *et al.* Expression of growth factors and their receptors in the postnatal rat cochlea. *Neurochem Res* 1998; 23(8): 1133-8.
- 8 Pickles JO, van Heumen WR. The expression of messenger RNAs coding for growth factors, their receptors, and eph-class receptor tyrosine kinases in normal and ototoxicity damaged chick cochlea. *Dev Neurosci* 1997; 19(6): 476-87.
- 9 Li H, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(23): 13495-500.
- 10 Chen W, Johnson SL, Marcotti W, Andrews PW, Moore HD, Rivolta MN. Human fetal auditory stem cells can be expanded *in vitro* and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1196-204.
- 11 Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, Eshtan SJ, Johnson SL, Kuhn S, *et al.* Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 2012; 490(7419): 278-82.
- 12 Doyle KL, Kazda A, Hort Y, McKay SM, Oleskevich S. Differentiation of adult mouse olfactory precursor cells into hair cells *in vitro*. *Stem Cells* 2007; 25(3): 621-7.
- 13 Lin Z, Perez P, Sun Z, Liu JJ, Shin JH, Hyrc KL, *et al.* Reprogramming of single-cell-derived mesenchymal stem cells into hair cell-like cells. *Otol Neurotol* 2012; 33(9): 1648-55.
- 14 Coleman B, Fallon JB, Pettingill LN, de Silva MG, Shepherd RK. Auditory hair cell explant co-cultures promote the differentiation of stem cells into bipolar neurons. *Exp Cell Res* 2007; 313(2): 232-43.
- 15 贾振宇, 伏晓敏, 金爱华, 曹江. 人Leptin基因的cDNA的克隆和表达. *生物工程学报* (Jia Zhenyu, Fu Xiaomin, Jin Aihua, Cao Jiang. cDNA cloning of human leptin and its expression. *Chinese Journal of Biotechnology*) 2003; 19(4): 476-9.
- 16 Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng AW, Ricci AJ, Heller S. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 141(4): 704-16.
- 17 Koehler KR1, Mikosz AM, Molosh AI, Patel D, Hashino E. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 2013; 500(7461): 217-21.
- 18 Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge AS. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors *in vitro* for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci* 2007; 34(1): 59-68.
- 19 Boddy SL, Chen W, Romero-Guevara R, Kottam L, Bellantuono I, Rivolta MN. Inner ear progenitor cells can be generated *in vitro* from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2012; 7(6): 757-67.
- 20 Durán Alonso MB, Feijoo-Redondo A, Conde de Felipe M, Carnicero E, García AS, García-Sancho J, *et al.* Generation of inner ear sensory cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2012; 7(6): 769-83.
- 21 Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Kim TS, Endo T, Taniguchi Z, *et al.* Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 2003; 14(1): 77-80.
- 22 Pandit SR, Sullivan JM, Egger V, Borecki AA, Oleskevich S. Functional effects of adult human olfactory stem cells on early-onset sensorineural hearing loss. *Stem Cells* 2011; 29(4): 670-7.
- 23 Chardin S, Romand R. Factors modulating supernumerary hair cell production in the postnatal rat cochlea *in vitro*. *Int J Dev Neurosci* 1997; 15(4/5): 497-507.
- 24 Doetzlhofer A, White PM, Johnson JE, Segil N, Groves AK. *In vitro* growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: A requirement for EGF and periotic mesenchyme. *Dev Biol* 2004; 272(2): 432-47.
- 25 Zheng JL, Helbig C, Gao WQ. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci* 1997; 17(1): 216-26.
- 26 Low W, Dazert S, Baird A, Ryan AF. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J Cell Physiol* 1996; 167(3): 443-50.
- 27 León Y, Vazquez E, Sanz C, Vega JA, Mato JM, Giraldez F, *et al.* Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3494-503.
- 28 Oesterle EC, Tsue TT, Rubel EW. Induction of cell proliferation in avian inner ear sensory epithelia by insulin-like growth factor-I and insulin. *J Comp Neurol* 1997; 380(2): 262-74.
- 29 Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, *et al.* Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci* 2001; 21(19): 7630-41.
- 30 Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986; 44(2): 283-92.
- 31 周淑萍, 王清明, 吴祖泽. 有效引导肝细胞生成素分泌的外源信号肽的确定. *中国病理生理杂志* (Zhou Shuping, Wang Qingming, Wu Zuze. Selection of the exogenous signal peptide that conducts the secretion of Hepatopoietin. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2008; 24(7): 1390-3.