

人 SPRED2 基因重组腺病毒载体的制备及其对 K562 细胞 ERK 通路的影响

刘小云¹ 罗芳¹ 王华² 杨月峰² 张群伟² 王立生^{2△}

(1 兰州军区疾病预防控制中心 甘肃 兰州 730020 ;

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验血液学实验室 北京 100850)

摘要 目的：构建携带 SPRED2 的质粒载体与重组腺病毒载体，并观察其在 K562 细胞的表达及对 ERK 信号通路的作用，为 Spred2 在造血细胞中的作用的研究奠定基础。方法：以 HepG2 细胞 cDNA 为模板，RT-PCR 克隆 SPRED2 全长 CDS 序列，并亚克隆到 pCDNA3.0 和 pshuttle-CMV 质粒载体，构建携带 SPRED2 的真核表达载体 pCDNA3.0-Spred2 与穿梭载体 pshuttle-CMV-Spred2；将线性化 pshuttle-CMV-Spred2 与腺病毒骨架质粒 Adf11p 在感受态细胞 BJ5183 中进行同源重组，产生重组质粒 Adf11p-Spred2；后者经线性化后转染至 HEK293 细胞进行病毒包装，在 HEK293 细胞扩增病毒颗粒，以 CsCl 密度梯度离心法进行纯化，TCID₅₀ 法测定病毒滴度，将病毒颗粒以 100MOI 感染 K562 细胞，Western blot 检测 Spred2 过表达情况及 Spred2 对细胞 ERK 的影响。结果：经酶切、DNA 测序、Western blot 检测等方法鉴定，证明 pCDNA3.0-Spred2 与 Adf11p-Spred2 携带 Spred2 序列正确，能够在 HEK293 细胞、K562 细胞正确表达，Spred2 过表达能够显著抑制 K562 细胞 ERK 活性。结论：成功构建对 K562 细胞有高感染效率的 SPRED2 重组腺病毒载体，且 Spred2 对 K562 细胞 ERK 信号通路有显著抑制作用。

关键词 Spred2 重组腺病毒载体 ERK 通路 K562 细胞

中图分类号 R733.7 Q75 Q78 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-221-05

Preparation of Recombinant Adenovirus Vectors Harboring the Human SPRED2 Gene and its Effects on ERK Pathway in K562 Cells

LIU Xiao-yun¹, LUO Fang¹, WANG Hua², YANG Yue-feng², ZHANG Qun-wei², WANG Li-sheng^{2△}

(1 Center for Disease Control and Prevention of Lanzhou military region, Lanzhou 730020, China;

2 Department of Experimental Hematology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

ABSTRACT Objective: To establish plasmids and recombinant adenovirus vectors harbouring the human SPRED2 gene, investigate the effects of Spred2 over-expression on ERK signalling pathway in K562 cells, and provide basis for future researches on the effects of Spred2 in hematopoietic cells. **Methods:** cDNA from HepG2 cells were used as templates for Spred2 full-length CDS cloning by RT-PCR, the Spred2 full-length CDS were subcloned to pCDNA3.0 and pshuttle-CMV vectors to establish pCDNA3.0-Spred2 and pshuttle-CMV-Spred2 recombinant plasmids, linearized pshuttle-CMV-Spred2 and adenovirus backbone plasmids Adf11p were transferred to BJ5183 competent cells for homologous recombination and produced recombinant plasmids Adf11p-Spred2. Adf11p-Spred2 plasmids were linearized and transferred to HEK293 cells for virus packaging. Virus particles were amplified in HEK293 cells and purified by CsCl density gradient centrifugation. TCID₅₀ methods were used for virus titer detection. K562 cells were infected with Adf11p-Spred2 and control virus at 100 MOI (multiplicity of infection). Spred2 expression and ERK activity were determined by Western blot assays. **Results:** The results of enzymatic digestion, DNA sequencing and Western blot assays showed that, the vectors were successfully established and over-expressed in K562 cells; Spred2 over-expression intensively inhibited the ERK activity. **Conclusion:** Recombinant adenovirus harbouring human SPRED2 gene with high infection efficiency in K562 cells were successfully established, adenovirus mediated Spred2 over-expression significantly inhibited the ERK signaling pathway.

Key words: SPRED2; Recombinant adenovirus vectors; K562 cells; ERK signal pathway

Chinese Library Classification (CLC): R733.7, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-221-05

前言

Spreds(Sprouty related with EVH1 domain)是近年发现的

一类与 Sprouty 相关的细胞膜蛋白，Spreds 对 Ras-ERK 信号通路的负调控作用极为显著^[1]。目前为止，在哺乳动物已发现有 Spred1、Spred2 和 Spred3 三个成员^[2]。研究证实 Spreds 对胚胎 AGM 区(Aorta-Gonad-Mesonephros region)造血、细胞增殖、血管与淋巴管的生成具有重要调节作用，在肝病、变应反应性疾病和 I 型神经纤维瘤样疾病的发病中可能有重要意义^[2-10]。然而，Spreds 在慢性粒细胞性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)病理过程中的作用并不清楚。为此，本研究构建了携带

作者简介：刘小云(1977-)，男，医学博士，主治医师，主要研究方向：实验血液学。电话：0931-8972031，

E-mail: lxy_tmmu2002@hotmail.com

△通讯作者：王立生 E-mail: towangls@gmail.com

(收稿日期：2011-06-26 接受日期：2011-06-23)

Spred2 的重组腺病毒载体,并初步观察 Spred2 对 K562 细胞 ERK 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌细胞系 HepG2 细胞、人胚肾细胞系 HEK293、慢性粒细胞性白血病 K562 细胞系均为本室保存。

1.1.2 质粒、重组腺病毒载体及重组腺病毒 质粒 pCDNA3.0、穿梭质粒 pshuttle-CMV、腺病毒骨架质粒 Ad5fl1p 为本实验室保存,重组腺病毒 Ad5fl1p-GFP 为本实验室制备冻存。

1.1.3 菌种 DH5 α 感受态细胞购自北京天根公司, BJ5183 感受态细胞为实验室保存。

1.1.4 PCR 引物 Spred2 基因全长 CDS 扩增引物(北京奥科生物技术有限公司合成)。

Sense: 5'-GAAGGTACCCGGACAGGAAGATGAAGGG-3'

Antisense: 5'-GAACTCGAGAGGGAGAAGGGAGGGAA-ACT-3'

1.1.5 主要试剂 DNA 聚合酶 KOD Plus(TOYOBO, 日本); 限制性内切酶 *KpnI*、*XhoI*、*PmeI*、*PacI* (Biolab 公司); T4 DNA 连接酶、dNTP(Biolab 公司); ExTaqDNA 聚合酶(TaKaRa 公司); 卡那霉素、链霉素、氨苄青霉素(原平皓公司); DMEM(Gibco 公司); 胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究); TRIzol[®] RNA 提取试剂(Invitrogen); 阳离子脂质体(Invitrogen); DNA 胶回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒(TianGen); anti-Spred2 (Sigma 公司)。

1.1.6 主要仪器设备 水平电泳系统(北京六一仪器厂); 高速冷冻离心机(军事医学科学院仪器厂); 洁净工作台(北京半导体设备一厂); GNP-9050 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓市实验仪器厂); Mastercycler PCR 仪(Eppendorf, 德国); β 111 型 CO₂ 气体培养箱(Thermo electron, 德国); -80℃超低温冰箱(SanYo, 日本); 紫外凝胶成像仪(UVP, 美国); 电转仪(BIO-RAD, 美国)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK293、HepG2 细胞均培养在含 10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基中, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 细胞长至 70-80%汇合状态时, 0.25%胰酶-0.02%EDTA 消化, 传代培养。

1.2.2 RT-PCR 收集 1 $\times$ 10⁶ HepG2 细胞, 参考 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, 反转录操作参考 RT-PCR 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书, 反转录后取 1 μ l cDNA 为模板, 以 Spred2 全长 cDNA 扩增引物进行 PCR 扩增。反应条件: 95℃预变性 5min, 95℃变性 45s, 62℃退火 30s, 68℃延伸 45s, 共 35 个循环, 68℃延伸 10min。

1.2.3 真核细胞表达载体 pCDNA3.0-Spred2 与穿梭载体 pshuttle-CMV-Spred2 的构建与鉴定 灭菌 Ep 管中加入适量 PCR 产物 DNA, 加入限制性内切酶 *XhoI* 和 *KpnI* 各 2.5 μ l, 10 $\times$ M Buffer 5 μ l, BSA 5 μ l, 混匀, 瞬时离心, 37℃水浴 1-2h。琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物, 并回收纯化所需片段。目的基因片段 0.5 μ g, 线性化载体 0.1 μ g, 10 $\times$ M Buffer 2 μ l, T4 DNA Ligase

1 μ l(3U), 补充双蒸水至总体积 20 μ l。16℃连接过夜。连接产物转化 DH5 感受态细胞参照 DH5 感受态细胞说明书操作。随机挑取 10 个重组子, 接种于 5ml 含氨苄青霉素(pCDNA3.0-Spred2)或含卡那霉素(pshuttle-CMV-Spred2)的 LB 培养基中, 37℃过夜培养, 取 1ml 新鲜菌液保存菌种, 剩余菌液用于提取质粒。分别采用 *XhoI* 和 *KpnI* 双酶切、目的序列 PCR 和测序等方法鉴定重组质粒。将酶切和 PCR 鉴定均正确的质粒克隆送往北京奥科生物技术有限公司, 在 Spred2 基因的上、下游设计引物, 进行测序鉴定。测序结果通过 NCBI 的 Blast 进行在线比对分析, 判定序列是否正确。

1.2.4 pCDNA3.0-Spred2 在真核细胞的表达 质粒 pCDNA3.0-Spred2 与对照质粒 pCDNA3.0 参照 Lipofectamine2000 说明书瞬时转染 HEK293 细胞, 48 h 后参照 Molecular Clong:A Laboratory Manual, 3rd ed (Sambrook et al. 2001) 提取蛋白、进行 SDS/PAGE 电泳, Western blot 检测 Spred2 表达水平。

1.2.5 病毒载体 pAd5fl1p-Spred2 的构建 BJ5183 电转化感受态细胞的制备, 具体步骤见 Molecular Clong:A Laboratory Manual, 3rd ed(Sambrook et al. 2001)。pshuttle-CMV-Spred2 质粒经 *PmeI* 酶切线性化, 去磷酸化, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 去除蛋白和缓冲液的盐份, 重悬于 10 μ l 双蒸水, 分别取 100-200ng 线性化的 pshuttle-CMV 和 pshuttle-CMV-Spred2, 与 40 μ l BJ-Adfl1p 感受态细胞混匀后, 电击转化 (BioRad 2.5Kv、200 Ω 、25 μ F, 0.2cm gap)。迅即加入 1ml SOC 培养基重悬细菌, 37℃、250rpm, 振荡 1h。将菌液涂布在含卡那霉素的 LB 培养板, 37℃过夜孵育; 于转化平板挑取 5-10 个最小的单克隆, 接种于含相应抗生素的 5ml LB 培养基中, 37℃、250rpm 培养过夜。碱裂解法提取质粒, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀后, 以 0.6%琼脂糖凝胶电泳进行分离, 判断质粒大小。选择质粒大小在 33Kb 左右的克隆, 以 *PacI* 酶切鉴定, 出现 30Kb 和 4.5Kb 条带为重组正确的质粒。鉴定正确的质粒热激转化 DH5 感受态细胞, 菌种 -70℃保存待用。

1.2.6 病毒的包装与鉴定 大量扩增并提取质粒 pAd5fl1p-Spred2, *PacI* 酶切线性化。取 5.0 μ g 线性化产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳, 确定质粒已完全线性化后, 将剩余产物进行酚氯仿抽提去除酶等杂质, 乙醇沉淀回收 DNA, 紫外分光光度计法测定 DNA 含量和纯度。将对数生长期的 HEK293 细胞以 1 $\times$ 10⁵ 细胞 / 孔接种 24 孔培养板, 于 5% CO₂、37℃饱和湿度条件下培养。24h 后待细胞长至 70%-80%汇合时, 用脂质体 Lipofectamine2000 将 0.8 μ g 线性化 pAd5fl1p-Spred2 转染至细胞, 6 h 后补充新鲜细胞培养基(至 FBS 终浓度为 10%), 次日换为含 3%FBS 的新鲜细胞培养基。于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下继续培养 7-10 天, 每 3-4 天更换一次培养液, 出现明显细胞病变时收获病毒。具体方法: 轻轻吹打使细胞脱壁, 将细胞和培养上清收集于 Ep 管, -80℃和 37℃之间反复冻融三次, 混匀后 10000rpm 离心 5min 以去除细胞碎片和杂质, 将上清转移到新的 Ep 管中, 得到的种子病毒上清 -80℃冻存备用。按照以下程序, 提取并鉴定重组腺病毒基因组 DNA: 将 HEK293 细胞按照 1 $\times$ 10⁶ 细胞 / 孔接种 6 孔板, 次日, 待细胞达到 90%左右融合度时, 取 10 μ l 病毒原液感染细胞, 具体为:

①将细胞培养上清弃去,用 PBS 洗涤一次;②加入 500 μ l 无血清的 DMEM 培养基,再加入 10 μ l 病毒原液;③于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱孵育 2h;④弃去培养基,加入 1ml 含 5%FBS 的 DMEM 培养基,继续培养;⑤待细胞出现病变时,收集细胞,并用 PBS 洗涤一次;⑥将细胞重悬于 100 μ l PBS,在 -80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 之间反复冻融三次;⑦混匀后 10000rpm 离心 5min,将病毒上清 100 μ l 转移到新的 Ep 管中;⑧加入 10%SDS 10 μ l、0.5M EDTA 4 μ l、20mg/ml 蛋白酶 K 10 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4-18h;⑨用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次;⑩将沉淀用 20 μ l 含 100 μ g/ml RNaseA 的无菌水溶解,37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h,即得到腺病毒基因组 DNA。以重组腺病毒基因组 DNA 为模板,Spred2 上游引物和下游引物扩增 Spred2 全长 CDS (采用 Blend-Taq 聚合酶)。反应条件同前。

Western blot 鉴定 Ad5fl1p-Spred2 真核细胞表达:分别用腺病毒 Ad5fl1p-GFP 和 Ad5fl1p-Spred2 感染 HepG2 细胞,48h 后收集细胞,Western blot 方法检测 Ad5fl1p-Spred2 在 HepG2 细胞中的表达。

1.2.7 重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 的扩增、纯化及滴度测定 重组病毒载体的扩增、纯化与滴度测定,均参考本室鲁茁壮等述方法进行^[11]。

1.2.8 重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 感染 K562 细胞 将纯化好的病毒与对照病毒以 100 感染复数 (multiplicity of infection, MOI)感染 1×10^6 K562 细胞,48 h 后收集细胞,提取蛋白,用于 Western blot 检测。

1.2.9 Western blot 检测 蛋白提取、蛋白定量及 Western blot 检测详细步骤参考李庆芳等述方法进行^[12],本研究利用 Western blot 检测 Spred2、ERK 和磷酸化 ERK 蛋白表达水平。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

RT-PCR 扩增产物大小为 1300bp 左右,与 Pubmed 查询的 Spred2 全长 CDS 大小一致。RT-PCR 扩增产物 0.8%琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。对片段进行凝胶回收和纯化备用。

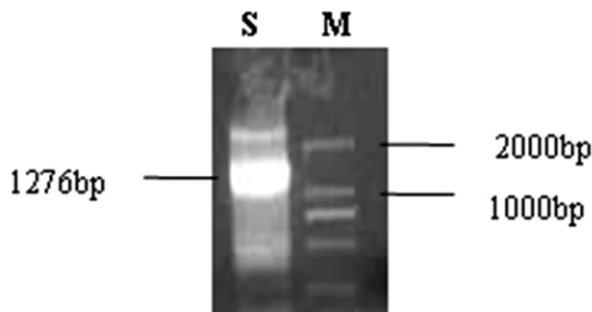


图 1 Spred2 CDS 的 RT-PCR 扩增电泳图 S:Spred2 M:DL2000
Fig.1 Amplification of Spred2 CDS by RT-PCR S: Spred2, M: DL2000

2.2 pshuttle-CMV-Spred2 与 pCDNA3.0-Spred2 的构建与鉴定

分别随机选 4 个和 6 个 pshuttle-CMV-Spred2 与 pCDNA3.0-Spred2 转化子,提取质粒,经 XhoI 和 Kpn I 酶切后,0.8%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定,鉴定结果(图 2)表明,Spred2 CDS 成

功克隆到两个载体。为确定克隆到的 Spred2 全长 CDS 序列的正确性,将 pCDNA3.0-Spred2 与 pshuttle-CMV-Spred2 质粒送公司测序,并 Blast 在线比对分析。比对结果表明,Spred2 全长 CDS 序列正确,可用于后续实验。

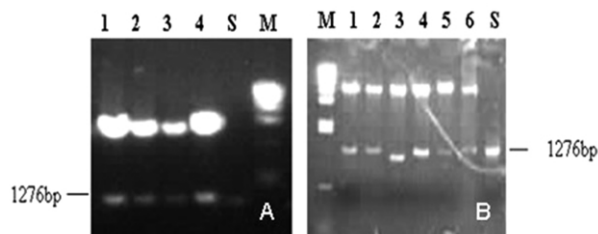


图 2 (A)pCDNA3.0-Spred2 与(B)pshuttle-CMV-Spred2 XhoI / Kpn I 酶切鉴定图谱 S:Spred2 M:λ-DNA/Hind
Fig.2 Digestion of pCDNA3.0-Spred2 (A) and pshuttle-CMV-Spred2 (B) by XhoI and Kpn I S:Spred2, M:λ-DNA/Hind

2.3 pCDNA3.0-Spred2 真核表达

为进一步确定所得基因的准确性,将 pCDNA3.0-Spred2 真核表达载体经阳离子脂质体转染 HEK293 细胞,提取蛋白进行 Western blot 鉴定其表达情况,结果(图 3)显示,在转染 pCDNA3.0-Spred2 的 HEK293 细胞,有大小约为 48KDa 的特异性条带,而转染空载体的 pCDNA3.0 未见条带,表明 Spred2 在 HEK293 细胞成功高表达,载体构建成功。

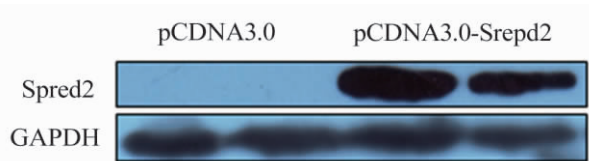


图 3 WB 检测 pCDNA3.0-Spred2 在 HEK293 细胞的表达
Fig.3 Detection of pCDNA3.0-Spred2 expression in HEK293 cells by Western blot assays

2.4 重组质粒 pAd5fl1p-Spred2 的构建与鉴定

鉴定正确的 pshuttle-CMV-Spred2 经 PmeI 酶切线性化并转化 BJ5183-Ad5fl1p 感受态细胞,与 Ad5fl1p 骨架质粒同源重组,在含卡那霉素的 LB 培养板上涂板,18 h 后获得 2 个具有抗性的、生长缓慢的克隆,疑似为正确重组子。扩增克隆,提取质粒,以质粒 pshuttle-CMV-Spred2 为对照排除自连反应,用 PacI 酶切鉴定。结果显示,酶切产物为 30Kbp 与 4.5Kbp 两段(图 4),表明所得两个克隆均为正确重组子。为进一步鉴定重组子,以 pAd5fl1p-Spred2 为模板,对目的片段 Spred2 进行扩增,以 Spred2 CDS 为对照,电泳结果(图 5)显示,骨架质粒中包含 Spred2 序列,可用于病毒包装。

2.5 重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 的包装与鉴定

鉴定正确的 pAd5fl1p-Spred2 经 PacI 线性化后,转染 HEK293 细胞第 10d 细胞出现噬斑,随后噬斑不断扩大,第 12 天出现完全 CPE。提示病毒包装成功,此时收集细胞和培养液,

反复冻融 3 次后，离心收集上清即为 Ad5fl1p-Spred2 病毒原液。为保证病毒的准确性，对病毒载体在真核细胞的表达进行蛋白水平鉴定。Ad5fl1p-Spred2 和 Ad5fl1p-GFP 病毒液分别感染 HEK293 细胞，48h 后提取蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒蛋白定量后 Western Blot 检测 Spred2 表达水平。结果显示，Ad5fl1p-Spred2 感染 HEK293 细胞有 48KDa 左右的蛋白表达，而 Ad5fl1p-GFP 感染细胞与空白对照细胞很难检测到该蛋白表达(图 6)。该结果表明，Ad5fl1p-Spred2 在 HEK293 细胞能够成功高水平表达 Spred2，重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 构建成功。可以开展后续的疾病扩增、纯化试验。

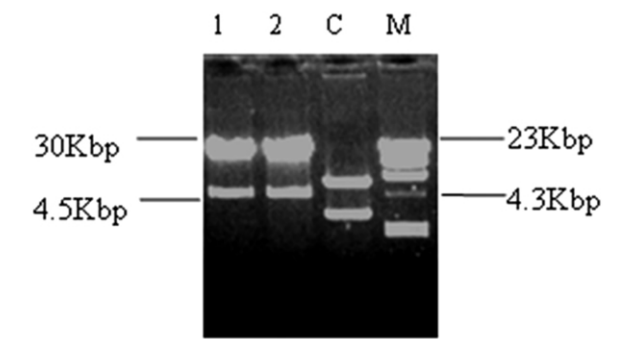


图 4 重组质粒 pAd5fl1p-Spred2 PacI 酶切鉴定 :1,2 2 个重组子质粒 ; C pshuttle-Spred2 ; M λ -DNA/Hind marker
Fig.4 Digestion of pAd5fl1p-Spred2 by PacI enzyme :1,2: Plasmids of two recons; C:pshuttle-Spred2; M: λ -DNA/Hind marker

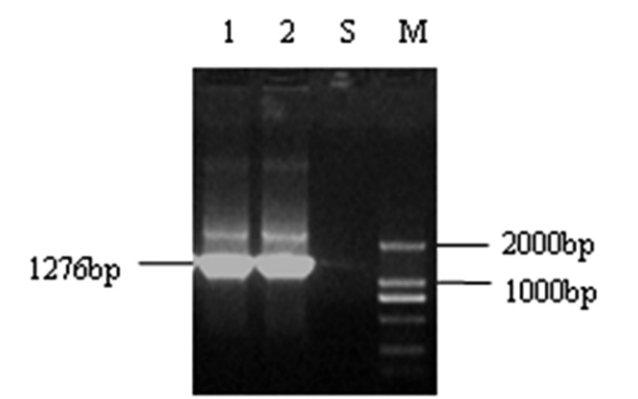


图 5 重组质粒 pAd5fl1p-Spred2 的 PCR 鉴定 :1,2 2 个克隆的质粒 PCR 产物 ; S Spred2 CDS M :DL2000
Fig.5 Identification of pAd5fl1p-Spred2 by PCR :1, 2: PCR products of the recons plasmids; S: Spred2 CDS M: DL2000



图 6 WB 检测感染 Ad5fl1p-Spred2 病毒 HEK293 细胞 Spred2 的表达 ,Mock 空白对照
Fig.6 Detection of Spred2 in HEK293 cells infected by Ad5fl1p-Spred2 using western blot assays

2.6 腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 的扩增纯化

鉴定正确的 Ad5fl1p-Spred2 大量扩增后 ,CsCl 密度梯度离心法纯化病毒(如图 1-10)。紫外分光光度法检测 OD260nm 和 OD280nm，根据 OD260nm/OD280nm 评价病毒纯度，为 1.252 ;根据 OD260nm 计算病毒的颗粒滴度(vp/ml)，为 1.5×10^{12} vp/ml。最后，采用 TCID50 法检测病毒感染滴度(IU/ml)，为 2.2×10^{10} IU/ml。结果显示，Ad5fl1p-Spred2 的颗粒滴度大于 10^{12} vp/ml，而纯度位于 1.2-1.4 之间，符合病毒纯度要求。TCID50 检测其感染滴度为 2.2×10^{10} IU/ml，与颗粒滴度的比值大于 1/100，符合要求。该结果表明已成功制备重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2，能够满足后续功能实验需求。

2.7 Spred2 过表达抑制 K562 细胞 Ras-ERK 活性

Spred2 在多种细胞中均对 Ras-ERK 信号通路具有负调控作用，而对 CML 细胞的作用尚未见报道。为此，我们首先以过表达 Spred2 的 K562 细胞为研究模型，观察 Spred2 对 K562 细胞 ERK 信号通路的影响。如图(图 7)所示，在常规培养条件下，分别用重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 与对照病毒 Ad5fl1p-GFP 以 100MOI 感染 K562 细胞，Spred2 得到高水平表达，而 K562 细胞的内源性 Spred2 表达水平较低。同时，与空白对照和对照病毒相比，过表达 Spred2 的 K562 细胞 ERK 活性被强烈抑制。这表明，Spred2 对 K562 细胞 Ras-ERK 信号通路有较强抑制作用。

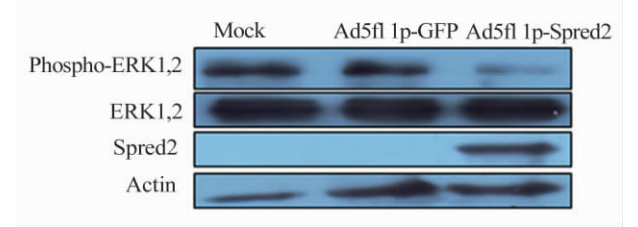


图 7 重组腺病毒介导的 Spred2 过表达抑制 K562 细胞 ERK 活性
Fig.7 Recombinant adenovirus mediated Spred2 over-expression inhibits ERK activity in K562 cells

3 讨论

重组腺病毒载体因其安全性好、宿主范围广、稳定性高、易于制备和装载容量大等诸多优点，被广泛应用于基因治疗和基因功能研究。其中应用最为普遍的是 5 型腺病毒载体(Ad5)。然而，因造血细胞表面缺乏相应病毒受体，Ad5 病毒载体对其感染效率很低。这大大限制了 Ad5 腺病毒载体在造血细胞的应用。本室鲁茁壮博士将传统的 Ad5 病毒骨架 pAdEasy-1 的纤维顶球用 Ad11p 的纤维顶球置换，获得带嵌合纤维的病毒 Ad5fl1p。研究表明，50MOI 感染条件下，Ad5fl1p 对 K562 细胞和 CD34+ 细胞感染效率能分别达到 90%与 50%，而同等条件下 AdEasy-1 对它们的感染效率都低于 10%^[1]。因此，本研究选用了 Ad5fl1p 重组腺病毒系统作为基因转移载体。

本研究以 HepG2 cDNA 作为模板，经 RT-PCR 扩增，成功获得 Spred2 全长 CDS，并将其成功克隆到真核表达载体 pCD-NA3.0-Spred2，经 Western blot 鉴定证明其在真核细胞能够成功表达 Spred2 蛋白。同时，利用 Ad5fl1p 重组腺病毒系统制备

了可以高效感染造血细胞的重组腺病毒 Ad5fl1p-Spred2 经鉴定在 HEK293 细胞能够高水平表达所携带的外源基因。最后, 重组腺病毒载体 Ad5fl1p-Spred2 在 K562 细胞能够得到高表达, 且其 ERK 活性水平被强烈抑制, 与在其它细胞中的研究报道一致^[1,4,7]。ERK 信号通路在细胞增殖、分化与凋亡的调控中发挥重要作用, Spred2 是否能够通过负调控 ERK 信号通路, 影响造血细胞的增殖、分化与凋亡, 是下一步的研究重点。

总之, 本研究成功构建制备了重组腺病毒载体 Ad5fl1p-Spred2 和质粒载体 pCDNA3.0-Spred2, 为研究 Spred2 过表达对 CML 细胞的生物学特性影响提供了有效的工具, 同时还发现 Spred2 能够强烈抑制 K562 细胞 ERK 活性水平, 为 Spred2 在造血细胞中的作用研究奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling[J]. 2001, Nature, 412 :647-651
- [2] Bundschu K, Walter U, Schuh K. Getting a first clue about SPRED functions[J]. BioEssays, 2007, 29:897-907
- [3] Nonami A, Kato R, Taniguchi K, et al. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/Mitogen- activated Protein (MAP) Kinase activation in hematopoietic cells [J]. J. Biol. Chem, 2004, 279: 52543-52551
- [4] Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, et al. Spred-2 suppresses Aorta-Gonad-Mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP Kinase activation [J]. J. Exp. Med, 2004,199:737-742
- [5] Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, et al. Are Essential for Embryonic

Lymphangiogenesis by Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Signaling[J]. Mol. Cell. Bio, 2007,27:4541-4550

- [6] Wang SS, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific MicroRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev. Cell, 2008,15:261-271
- [7] Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, et al. Spreds, inhibitors of the Ras-ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors[J]. Oncogene, 2006, 25: 6056-6066
- [8] Momeny M, Mohammad RK, Ghaffari SH, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase[J]. Eur. J. Pharmacol, 2008,591:13-20
- [9] Pasmant E, Sabbagh A, Hanna N, et al. SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype [J]. J Med Genet, 2009, 46:425-430
- [10] Brems H, Chmara M, Sahbatou M, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype[J]. Nat Genet, 2007,39:1120-1126
- [11] Lu ZZ, Ni F, Hu ZB, et al. Efficient gene transfer into hematopoietic cells by a retargeting adenoviral vector system with a chimeric fiber of adenovirus serotype 5 and 11p, Exp [J]. Hematol,2006,34 : 1170-1181
- [12] Li QF, Huang WR, Duan HF, et al. Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells[J]. Oncogene, 2007, 26:7904-7908

(上接第 249 页)

- [2] Luciano CP, Marcelo AP, Liliete C, et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury The redox hypothesis of restenosis[J]. Cardiovascular Research, 2000,47(3):436-445
- [3] Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidor eductase activity[J]. Free Radic Biol Med, 2000,28:1232-1242
- [4] Tulis DA. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model[J].Methods Mol Med, 2007,139:31-66
- [5] Azevedo LC, Pedro MA. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis[J]. Cardiovasc Res, 2002, 47(3): 436-445
- [6] McCully KS. Homocysteine, vitamins, and prevention of vascular disease[J]. Mil Med,2004,169(4): 325-329
- [7] Muscoli CI. The protective effect of superoxide dismutase mimetic M40401 on balloon injury-related neointima formation: role of the

lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1[J]. J Pharmacol Exp Ther 2004,311(1): 44-50

- [8] Nunes GL, Abizaid AC. Role of probucol in inhibiting intimal hyperplasia after coronary stent implantation: a randomized study [J]. Am Heart J, 2006,152(5): 914 e1-7
- [9] Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidor eductase activity[J]. Free Radic Biol Med,2000, 28:1232-1242
- [10] Szöcs K, Lassegue B, Sorescu D, et al. Upregulation of Nox-based NAD (P)H oxidases in restenosis after carotid injury [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002,22:21-27
- [11] Shin HK, Kim YK, Lee JH, et al. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD (P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol [J]. Circulation, 2004,109(8): 1022-1028