

慢病毒介导 Klotho 基因在螺旋神经节细胞中的表达分析

董燕粉¹ 时 晰² 乔月华² 李 广¹ 张 岩³

1. 扬州大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 扬州大学附属医院, 江苏 扬州 225000;

2. 徐州医科大学附属医院临床听力中心, 徐州医科大学, 江苏 徐州 221000;

3. 吉林大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 吉林大学, 吉林 长春 130021

【摘要】 目的 构建 Klotho-pWPXLd 重组质粒包装慢病毒并检测目的基因的表达。方法 采用 BamHI 和 EcoRI 双酶将 pcDNA3 中的目的基因片断切除, 并构建慢病毒载体 Klotho-pWPXLd。包装 Klotho 慢病毒并感染小鼠螺旋神经节细胞(SGCs), RT-PCR 和 WB 方法检测 Klotho 基因及蛋白表达情况。结果 成功地构建 Klotho 基因的慢病毒载体, 并可在 SGC 细胞中表达 Klotho 蛋白。结论 成功实现慢病毒介导 SGN 细胞外源表达 Klotho 蛋白。

【关键词】 Klotho; 慢病毒; 基因转导; 螺旋神经节细胞; 基因治疗

听力障碍目前尚无精确治疗方法^[1-3]。Klotho 是中枢系统重要衰老保护因子^[4], 已有研究发现其同样具备听觉保护功能^[5]。但受制于内耳解剖结构及细胞类群复杂, 常规转染方法难以实现理想的外源表达效果, 故本研究拟开发慢病毒(lentivirus)介导 SGN 细胞外源表达 Klotho 蛋白的实验体系, 为 SNHL 潜在基因治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 Lentivirus Helper Free System (lentivirus-pWPXLd vector、lentivirus-PAX plasmid、PMD-2a plasmid) 和 pcDNA3-Klotho 质粒, 由徐州医科大学人工听觉工程重点实验室提供。限制性核酸内切酶 BamH I、EcoR I 及 T4 连接酶, 均购自 NEB 公司。含全长 Klotho 融合基因表达质粒(Klotho-pcDNA), 由徐州医科大学时晰副教授提供。HEK 293、SGN 细胞为徐州医科大学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 Klotho 基因质粒的提取和片断回收 以 Klotho-pcDNA3 质粒为模板, PCR 扩增获得携带 BamH I/EcoR I 识别序列的 Klotho 基因片段, 产物经 8g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收(3075bp), 置 TE 缓冲液中, 同时将 pWPXLd 载

体用 BamH I/EcoR I 酶切消化后, 胶回收酶切产物。将上述 Klotho 基因片断用 T4 连接酶连接到 pWPXLd 质粒的多克隆位点, 并转染到 DH5- α 感受态细菌。12h 后进行单克隆培养及酶切, 测序鉴定 Klotho-pWPXLd 阳性克隆。

1.2.2 HEK293 细胞和小鼠螺旋神经节细胞(SGCs)的培养 HEK293 细胞培养于含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长。SGN 细胞在含 100mL/L 胎牛血清的 DME/F-12 培养基中生长, 用 2.5g/L 的胰酶消化传代。

1.2.3 Klotho-慢病毒包装 参见 lentivirus-pWPXLd 质粒、lentivirus-PAX、PMD-2G 三质粒系统慢病毒包装方法进行操作^[6]。

1.2.4 重组浓缩病毒感染 SGN 细胞 待 SGN 细胞长至 80% 汇合度时, 以 MOI100 病毒量感染细胞, 后加入完全培养基, 放入 37℃ 培养箱中, 48 ~ 72h 后收获细胞, 用半定量 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测病毒感染后 Klotho 的表达水平。

2 结 果

2.1 pcDNA3-Klotho 经携带 BamH I / EcoR I 识别序列的特异引物, 进行 PCR 扩增反应鉴定结果 以 pcDNA3-Klotho 质粒为模板, 用携

基金项目:《新型皮肤支架结合自体间充质干细胞移植治疗重度烧伤猪皮肤再生研究》(20200404183YY); 吉林省科技厅, 2020 徐州市推动科技创新专项资金(KC20177); 2019 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(19KJA560002); 徐州科技局重点研发计划项目(KC21249)。

通信作者: 张岩, E-mail: zhangyan99@jlu.edu.cn

带 BamH I / EcoR I 识别序列的特异引物, 进行 PCR 扩增反应, 得到 3075 bp Klotho 特异性片段 (见图 1A)。

2.2 慢病毒载体质粒的酶切鉴定 慢病毒载体 pWPXLd 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到 10kbp 慢病毒特异性片段 (见图 1B)。

2.3 Klotho-pWPXLd 的重组子酶切鉴定 Klotho-pWPXLd 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 同样得到 3075 bp Klotho 特异性片段 (见图 1C)。

2.4 序列分析 所获 lentivirus-pWPXLd-Klotho 重组子进行测序分析, Klotho 基因与 lentivirus-pWPXLd 序列连接处序列与预测序列相同。部分序

列比对结果见图 1D。

2.5 RT-PCR 检测病毒感染 SGN 细胞后 Klotho 基因表达情况 重组病毒 Klotho-pWPXLd 感染 SGN 细胞 72h 后, 结果显示未感染 SGN 细胞及 GFP-pWPXLd 感染的 SGN 细胞均表现为 Klotho 低表达, 以重组病毒 Klotho-pWPXLd 感染的 SGN 细胞有明显的 Klotho 基因表达 (见图 2A)。

2.6 Western Blot 方法检测病毒感染 SGN 细胞后 Klotho 基因表达情况 重组病毒 Klotho-pWPXLd 感染 SGN 细胞 72h 后, 结果显示未以重组病毒 Klotho-pWPXLd 感染的 SGN 细胞没有 Klotho 表达, 以重组病毒 Klotho-pWPXLd 感染的 SGN 细胞有明显的 Klotho 蛋白表达。(见图 2B)

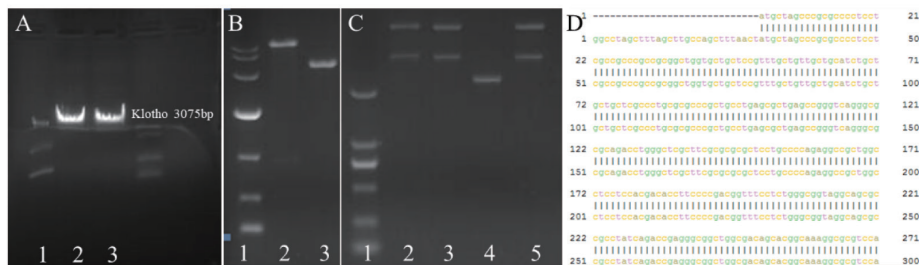


图 1 pcDNA3-Klotho 质粒构建

A. Klotho 目的基因片段扩增: 1. marker DNA; 2-3. 以 pcDNA3-Klotho 质粒为模板经特异引物 PCR 扩增 (引物携带 BamH I/EcoR I 识别序列) 获得 3075bp 特异目的基因片段; B. 慢病毒载体质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后鉴定结果: 1. 分子量 marker; pWPXLd 载体质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后出现 10kbp 特异性片段; 3. 未经酶切处理的 pWPXLd 载体; C. 重组质粒 Klotho-pWPXLd 经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后鉴定结果: 1. 分子量 marker; 2, 3, 5. 重组质粒 Klotho-pWPXLd 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后出现 10k bp pWPXLd 片段以及 3075 bp Klotho 特异性片段, 表明重组质粒 Klotho-pWPXLd 的构建正确; 4. 异常克隆; D: 重组 pWPXLd-Klotho 质粒部分测序结果与正常 Klotho 序列比对。

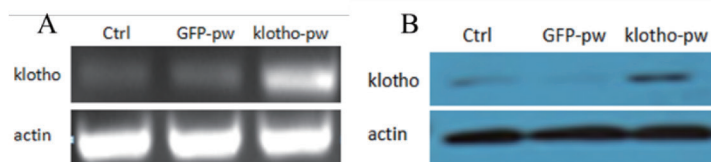


图 2 Klotho 基因表达情况鉴定

A. R-PCR 检测病毒感染 SGN 细胞后 Klotho 基因表达结果

B. Western Blot 方法检测病毒感染 SGN 细胞后 Klotho 基因表达结果

3 讨 论

听觉形成的过程中, 毛细胞感受声波的震动, 将机械震动转换为电信号, 此信号经 SGN 传入中枢神经系统。因此 SGN 的破坏程度与听功能受损具有相关性。维持 SGN 数目及功能是治疗听觉基础的基础。衰老抑制因子 (Klotho) 广泛分

布于各级神经系统, 是维持听觉上皮和听觉神经元生存的重要物质^[7], 其受体 FGF 表达在耳蜗螺旋神经节和前庭神经节上^[8]。为实现听神经保护效果, 基因转导是一种较为理想的途径。

KI 基因 (称为 α -Klotho 或 Klotho) 已被 Kuro-o, M. 等人 (1997) 首次确定为鼠类抗衰老基因。人类 KI 位于 13q12 染色体上, 它由 5 万

个碱基对组成,包含五个外显子。它在一些器官和组织中表达:KI 及其产物在肾脏中的水平最高,在前列腺、肺、肝脏、骨骼肌、主动脉、胰岛和大脑中的水平低得多。其类似物 KIB 位于第 4 条染色体上,其大小和结构与 KI 非常相似。人类 β -Klotho 的主要来源是脂肪组织。它也在肺和胰腺中合成,但它的 mRNA 在许多组织中发现,包括骨骼肌、主动脉和心脏。这两个基因都编码为膜结合和可分泌的蛋白质。Klotho 家族的第三个成员是由 LctI (类似乳酶的基因) 编码的。它的产物是一种跨膜的乳酶样蛋白,替代名称为 Klotho/乳酶-盐酸水解物相关蛋白, KLPH 或 LCTL, 或 γ -Klotho。该人类基因位于 15 号染色体上。它被大多数器官以同样低的水平表达。睾丸表达这种蛋白的水平最高。KI 的表达水平最高, LctI 的表达水平最低。因此,哺乳动物的基因组编码了 Klotho 家族的两个成员。它们是不同的跨膜蛋白。 α -Klotho 直接与 FGFR1c 和 FGFR4、IGF1/胰岛素受体和 TGF β RII 以及 Wnt 结合。与 FGFR1c 和 FGFR4 结合后, Klotho 作为一个共同受体,转换受体的特异性,并将其对内分泌 FGF23 的亲合力提高数倍,同时降低其对典型激动剂 FGF1-20 的亲合力,后者需要肝素来与受体结合。结构分析显示, α -Klotho 与 FGF23 的 C-末端和 FGFR1c 的 D3 结构域都有相互作用,作为一种伴侣,稳定三级复合物。FGF23 的 C 端含有 RXXR 结构,与 FGFR1c- α -Klotho 二聚体结合。三级复合物的活性取决于肝素-硫酸盐,这是 FGF 旁分泌信号的一个强制性辅助因子。Klotho 分子中的三个天冬氨酸和一个半胱氨酸残基与锌离子协调。Klotho 在这种复合物中的构象使其不可能具有酶的活性。与 α -Klotho 的相互作用从根本上改变了 FGFR1 刺激的生理结果。在没有 α -Klotho 的情况下,由 FGF 结合激活的典型途径导致受体的二聚化和自磷酸化,激活其底物、ERK1/2、Akt、Ras/MAPK。它参与器官形成、细胞分化,诱导细胞增殖和迁移,与 TGF β 1、Notch 和非典范 Wnt 途径合作。本研究为 Klotho 基因转导治疗 SNHL 提供了理想的策略。临床前、转化和临床研究推进了我们对 Klotho 生物学、病理生物学和潜在临床应用的理解决。尽管取得了这一成就,但向临床应用的转化却很缓慢。

Klotho 是一种进化保守的管家蛋白,在许多器官上有无数的功能,它可以作为一种生物标志物,用于早期诊断和/或对急性肾脏病进行风险分层。由于它的普遍存在和广泛的功能,特异性

仍然是一个问题(例如,循环的 Klotho 水平可能在许多疾病中发生变化,无论是否涉及肾脏)。我们相信 Klotho 对于耳聋的治疗在不久的将来,完善相关研究后能够应用于临床,能够为耳聋患者带来希望。

参考文献

- [1] YUAN Y, LIQ, SU Y, et al. Comprehensive genetic testing of Chinese SNHL patients and variants interpretation using ACMG guidelines and ethnically matched normal controls [J]. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28(2): 231-243.
- [2] BATSON S, KELLY K, MORRISON D, et al. Ophthalmologic Abnormalities in Children with Congenital Sensorineural Hearing Loss [J]. *J Binocul Vis Ocul Motil*, 2019, 69(3): 126-130.
- [3] ZHANG W, XUE D, HU D, et al. Secreted klotho protein attenuates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro via inactivation of the FGFR1/ERK signaling pathway [J]. *Growth Factors*, 2015, 33(5): 356-365.
- [4] JAVIER A, NEYRA, HU M C, et al. Klotho in Clinical Nephrology [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2021, 16(1): 162-176.
- [5] CHEN K, WANG S, SUN Q W, et al. Klotho Deficiency Causes Heart Aging via Impairing the Nrf2-GR Pathway [J]. *Circ Res*, 2021, 128(4): 492-507.
- [6] ZHOU H J, ZENG C Y, YANG T T, et al. Lentivirus-mediated klotho up-regulation improves aging-related memory deficits and oxidative stress in senescence-accelerated mouse prone-8 mice [J]. *Life Sci*, 2018(200): 56-62.
- [7] KURO-O M. The Klotho proteins in health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1): 27-44.
- [8] MEMMOS E, PAPAGIANNI A. New Insights into the Role of FGF-23 and Klotho in Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease Patients [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2021, 19(1): 55-62.