

[文章编号] 1007-3949(2008)16-03-0201-04

• 实验研究 •

人载脂蛋白 A iv 重组腺病毒载体的构建及其在小鼠体内的表达

李悦, 董继斌, 吴满平

(复旦大学药学院生物化学与分子生物学教研室, 上海市 200032)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 A iv; 腺病毒载体; 基因表达; 脂多糖

[摘要] 目的 构建人载脂蛋白 A iv 基因的重组腺病毒载体, 探讨人载脂蛋白 A iv 在小鼠体内的表达, 建立人载脂蛋白 A iv 过表达小鼠模型。方法 采用基因工程技术从重组质粒 pDNR-LIB-apoA iv-PA 获得人载脂蛋白 A iv 基因, 插入穿梭质粒 pshuttle CMV 后, 在细菌内与 pAdEasy-1 进行同源重组, 经脂质体转染 HEK293 细胞, 在细胞内包装获得腺病毒颗粒 AdV-A iv, 并进行大量扩增和纯化。纯化的腺病毒经尾静脉注射入 BALB/c 小鼠体内, 通过双向琼脂免疫扩散反应、免疫比浊法及免疫印迹法检测人载脂蛋白 A iv 在小鼠体内的表达。结果 成功构建了重组腺病毒载体, 纯化后的病毒滴度达 4.0×10^{13} pfu/L。重组腺病毒载体能在小鼠体内高表达人载脂蛋白 A iv, 且在注射 1 天后表达高达 740 ± 110 mg/L。结论 成功构建了重组腺病毒载体, 并能介导外源基因人载脂蛋白 A iv 在小鼠体内的表达, 建立了人载脂蛋白 A iv 过表达小鼠模型, 为进一步研究载脂蛋白 A iv 的抗内毒素功能奠定了基础。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Construction and Expression of Recombinant Adenovirus Vector Containing Human Apolipoprotein A iv Gene

LI Yue, DONG Ji Bin, and WU Man Ping

(Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A iv; Adenovirus; Gene Expression; Lipopolysaccharide

[ABSTRACT] **Aim** To construct recombinant adenovirus vector containing human apolipoprotein A iv (apoA iv) gene and to explore the expression of human apoA iv in mice and establish human apoA iv overexpressing mice model. **Methods** Full length apoA iv cDNA was obtained from recombinant plasmid pDNR-LIB-apoA iv-PA via digestion with Sal I and Hind III and was subcloned into the pshuttle vector pshuttle CMV to construct a shuttle plasmid pshuttle CMV-A iv. Then it was co-transformed into E. coli BJ5183 with adenovirus genomic plasmid pAdEasy-1 to achieve homologous recombination pAd CMV-A iv. The DNA of identified recombinant plasmid was transfected into HEK293 cells via liposome mediation to package and amplify adenovirus AdV-A iv. BALB/c mice was administrated by purified adenovirus, then human apoA iv protein in the serum of mice was detected by double immunodiffusion, immunological turbidity kit and Western blotting. **Results** The titer of purified virus was 4.0×10^{13} pfu/L. The over-expression of human apoA iv was observed after administration of BALB/c mice with adenovirus particles. Human apoA iv concentration in mice serum reached 740 ± 110 mg/L at 1 day after administration of adenovirus particles.

Conclusion The recombinant adenovirus AdV-A iv was successfully constructed and human apoA iv was detected in the serum of mice. The mice model of overexpressing human apoA iv was established. This result lays the foundation for further study to investigate the beneficial effects of apoA iv on endotoxemia.

内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的主要毒性成分, 其化学本质为脂多糖。在革兰氏阴性菌感染时, 脂多糖可通过细胞因子介导诱发炎症反应^[1], 导致全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 和脓毒症, 并最终发展成多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome,

MODS) 和多器官衰竭 (multiple organ failure, MOF)。

载脂蛋白 A iv (apolipoprotein A iv, apoA iv) 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要载脂蛋白, 我们实验室的研究证明, HDL 的抗炎、抗内毒素功能主要是由载脂蛋白 A iv 执行的^[2,3]。为进一步探讨载脂蛋白 A iv 的抗炎作用, 我们利用腺病毒载体感染效率高、宿主范围广及安全性较好等特点, 构建了含载脂蛋白 A iv 基因的重组腺病毒载体, 建立了人载脂蛋白 A iv 过表达小鼠模型, 为研究载脂蛋白 A iv 抗内毒素功能奠定了基础。

[收稿日期] 2007-10-29 [修回日期] 2008-02-02

[作者简介] 李悦, 博士研究生, 研究方向为载脂蛋白 A iv 的抗炎功能, E-mail 为 reallilanger@gmail.com。通讯作者吴满平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为高密度脂蛋白代谢与动脉粥样硬化及载脂蛋白 A iv 的抗炎功能研究, E-mail 为 mpwu@shmu.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

含人载脂蛋白 A iv 全长 cDNA 的质粒 pDNR-LIB-apoA iv-PA 购自 Clontech 公司; pAAV-EF1 α -GFP-PA 质粒、AdEasy 重组腺病毒系统包括穿梭质粒 pShuttle 和腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 以及大肠杆菌 BJ5183 和人胚肾 HEK293 细胞由上海交通大学医学院叶迅博士馈赠; 大肠杆菌 DH5 α 为本教研室保存。T4 连接酶、核酸内切酶 Pac iv 和 Pme iv 购自 TaKaRa 大连宝生物有限公司, 其余限制性核酸内切酶 (Sal iv、Hind Ⅲ、EcoR iv、Kpn iv、Xba iv) 购自 Bio-Lab 公司; 琼脂糖、酵母抽提物和胰蛋白酶为 OXOID 公司产品; 质粒纯化和胶回收试剂盒购自博大泰克生物公司; DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、谷氨酰胺和青链霉素病毒及纯化用 CsCl 为 Gibco 公司产品; 胎牛血清为 Hyclone 公司产品; 脂质体转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品; 载脂蛋白 A iv 检测试剂盒购自上海捷门生物技术合作公司; 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 及甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司; 其他化学试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 含目的基因 pShuttle 质粒的制备

1.2.1 含载脂蛋白 A iv 表达框的 pShuttle CMV-A iv 质粒的制备 pDNR-LIB-apoA iv-PA 质粒经限制性内切酶 Sal iv 和 Hind Ⅲ 双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶回收试剂盒收集纯化含载脂蛋白 A iv 基因的片断。将 pShuttle CMV 用限制性内切酶 Sal iv 和 Hind Ⅲ 进行双酶切, 回收质粒载体片断, 与载脂蛋白 A iv 片断进行连接反应。连接产物转化至 DH5 α 感受态大肠杆菌中, 转化菌用卡那霉素筛选, 并进行 EcoR iv 酶切鉴定。对酶切鉴定正确的菌种进行保存, 并大量制备 pShuttle CMV-A iv 质粒。

1.2.2 含绿色荧光蛋白表达框的 pShuttle CMV-GFP 质粒的制备 pAAV-EF1 α -GFP-PA 质粒经限制性内切酶 Kpn iv 和 Xba iv 进行双酶切后, 纯化回收含绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因目的片断。将 pShuttle CMV 用限制性内切酶 Kpn iv 和 Xba iv 进行双酶切后, 纯化回收质粒载体片断, 与 GFP 片段进行连接反应。将连接产物转化入感受态 DH5 α 大肠杆菌中, 转化菌用卡那霉素筛选单克隆菌落, 小量培养提取质粒 DNA 用限制性内切酶 Hind Ⅲ 进行酶切鉴定。对酶切鉴定正确的菌种进行保存, 并大量制备 pShuttle CMV-GFP 质粒。

1.3 含目的基因 pAd 质粒的制备

pShuttle 质粒 (pShuttle CMV-A iv 和 pShuttle CMV-GFP) 经 Pme iv 酶切线性化后和 pAdEasy-1 质粒在感受态 BJ5183 大肠杆菌中进行重组, 得到对应的 pAd 质粒 (pAd CMV-AI 和 pAd CMV-GFP)。将酶切鉴定正确的质粒转入 DH5 α 细菌进行大量制备和储存。

1.4 含目的基因腺病毒毒种的制备

含目的基因的 pAd 质粒 (pAd CMV-AI 和 pAd CMV-GFP) 经 Pac iv 酶切线性化后, 转染入低代次的 HEK293 细胞中, 培养 8~12 天后, 出现明显的细胞病变效应后收集细胞及其上清, 得到对应含目的基因的腺病毒毒种 (AdV-AI 和 AdV-GFP)。

1.5 腺病毒大量制备及纯化

腺病毒在 30 个 15 cm² 培养皿培养的 HEK293 细胞中扩增, 48 h 后, 细胞毒性反应时, 收集细胞, 冻融 4 次以释放病毒, 经 CsCl 密度梯度离心纯化^[4], 获得实验用腺病毒, PFU 法检测腺病毒活性。

1.6 人载脂蛋白 A iv 过表达小鼠模型的建立

八周龄雄性 BALB/c 小鼠按体重 (25 \pm 2 g) 随机分为载脂蛋白 A iv 过表达组和 GFP 腺病毒对照组, 每组 3 只。载脂蛋白 A iv 过表达小鼠, 注射前禁食 8 h, 第一次尾静脉注射低剂量腺病毒载脂蛋白 A iv, MOI 约为 50; 24 h 后注射高剂量腺病毒载脂蛋白 A iv, MOI 约为 200。病毒注射后正常饲养小鼠 1 天后断尾采血, 分离血清, -70℃ 保存, 连续取血 10 天, 免疫比浊法测定及双向琼脂免疫扩散和 Western blotting 鉴定小鼠血清中的人载脂蛋白 A iv。检测病毒注射 3 天后小鼠血清中 TC、HDLC 及 TG 水平。

1.7 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用非配对双尾学生氏 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含载脂蛋白 A iv 基因的腺病毒载体的鉴定

从 pDNR-LIB-apoA iv-PA 质粒获得含有载脂蛋白 A iv 编码基因, 插入 pShuttle CMV 穿梭质粒, 获得 pShuttle CMV-AI。该质粒与 pAdEasy-1 质粒重组得到 pAd CMV-AI。利用质粒序列作图, 构建的 pShuttle CMV-AI 酶切后获得 4921 bp 和 3486 bp 两个目的片段, pAd CMV-AI 酶切后获得 8010 bp、5913 bp、5322 bp、4597 bp、3010 bp、2985 bp、2945 bp、2081 bp 和 75 bp 目的片段 (图 1)。

2.2 含绿色荧光蛋白基因的腺病毒载体的鉴定

从 pAAV-EF1 α -GFP-PA 质粒获得含有 GFP 编码

基因, 插入 pShuttle CMV 穿梭质粒, 获得 pShuttle CMV-GFP, 该质粒与 pAdeasy-1 质粒重组得到 pAd CMV-GFP。利用质粒序列作图, pShuttle CMV-GFP 酶切后获得 1 864 bp 和 747 bp 两个目的片段, pAd CMV-GFP 酶切后获得 8 010 bp、5 322 bp、4 932 bp、4 597 bp、3 010 bp、2 980 bp、2 945 bp、2 081 bp 和 1 864 bp 目的片段(图 2)。

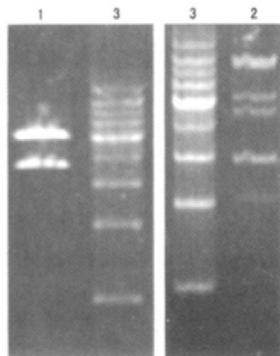


图 1. 酶切鉴定重组质粒 pShuttle CMV-AI 和 pAd CMV-AI

1 为 EcoRI 酶切鉴定 pShuttle CMV-AI, 2 为 HindIII 酶切鉴定 pAd CMV-AI, 3 为分子质量标准。

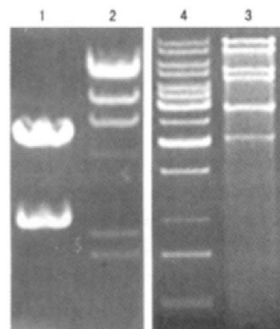


图 2. 酶切鉴定重组质粒 pShuttle CMV-GFP 和 pAd CMV-GFP

1 为 NotI 和 EcoRI 酶切鉴定 pShuttle CMV-GFP, 2 为 DL-2000 DNA Marker; 3 为 HindIII 酶切鉴定 pAd CMV-GFP, 4 为 1 kb Ladder DNA Marker。

2.3 重组腺病毒的鉴定

构建成功的重组腺病毒质粒 pAd CMV-AI 和 pAd CMV-GFP 分别用 Pac iv 酶切水解, 得到线性化双链核酸, 转染 HEK293 细胞即可包装成为腺病毒 AdV-AI 和 AdV-GFP。转染成功的 HEK293 细胞可出现 CPE, 证明病毒已在细胞内包装成功(图 3)。经扩大培养后, 收集病毒裂解液离心获得纯化的重组腺病毒。

2.4 人载脂蛋白 A iv 在小鼠体内的表达

纯化后的腺病毒 AdV-A iv 的病毒滴度为 4×10^{13} pfu/L。载脂蛋白 A iv 过表达小鼠注射腺病毒 1 天后, 血清中就能检测到人载脂蛋白 A iv, 且浓度高

达 740 ± 110 mg/L, 注射 3 天内表达持续在一个较高的水平, 10 天时表达基本消失, 而 GFP 腺病毒对照组未能检测到人载脂蛋白 A iv(图 4)。载脂蛋白 A iv 过表达小鼠血清与抗人载脂蛋白 A iv 抗体之间出现一条沉淀线, 而 GFP 腺病毒对照组小鼠血清与抗人载脂蛋白 A iv 抗体间没有沉淀线产生(图 5)。载脂蛋白 A iv 过表达小鼠血清中能检测到人载脂蛋白 A iv 蛋白, 而对照组不能检测到人载脂蛋白 A iv; 过表达小鼠和对照组小鼠中均能检测到小鼠载脂蛋白 A iv 蛋白, 且其含量没有发现明显改变(图 6)。

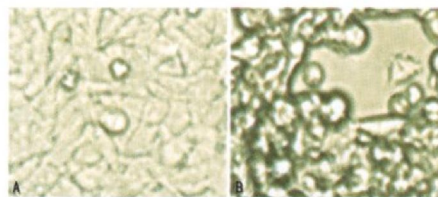


图 3. 重组腺病毒颗粒的包装 A 为正常 HEK293 细胞, B 为出现 CPE 的 HEK293 细胞。

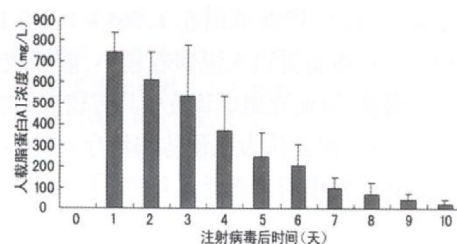


图 4. 载脂蛋白 AI 过表达小鼠血清中人载脂蛋白 AI 的含量 ($n = 3$)

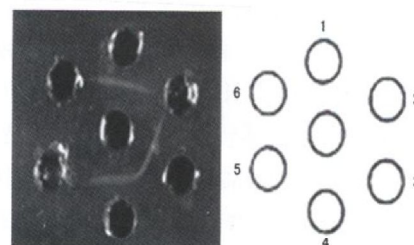


图 5. 双向琼脂免疫扩散反应 中间为抗人载脂蛋白 AI 抗体, 1 为人血清(阳性对照), 2 为空白对照, 3 为载脂蛋白 AI 过表达小鼠 4 天血清, 4 为载脂蛋白 AI 过表达小鼠 5 天血清, 5 为 GFP 腺病毒对照组小鼠 4 天血清, 6 为 GFP 腺病毒对照组小鼠 5 天血清。

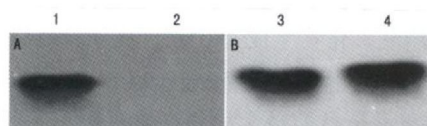


图 6. Western blotting 检测人和小鼠载脂蛋白 AI A 为检测人载脂蛋白 AI 蛋白, B 为检测小鼠载脂蛋白 AI 蛋白; 1 和 3 为载脂蛋白 AI 过表达小鼠血清, 2 和 4 为 GFP 腺病毒对照小鼠血清。

2.5 载脂蛋白 A iv 过表达小鼠血脂水平的变化

与对照组小鼠相比, 载脂蛋白 A iv 过表达小鼠

人载脂蛋白 A iv 显著增加, HDLC 增加了 51%, TC 增加了 84%, TG 增加了 69% (表 1)。

表 1. 载脂蛋白 A iv 过表达小鼠的血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, g/L)

分 组	人载脂蛋白 A iv	HDLC	TC	TG
载脂蛋白 A iv 过表达小鼠 ($n=4$)	0.53 ± 0.13^b	1.28 ± 0.10^b	1.58 ± 0.19^b	1.49 ± 0.22^a
对照组小鼠 ($n=5$)	0.01 ± 0.01	0.85 ± 0.06	0.86 ± 0.20	0.88 ± 0.06

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组小鼠比较。

3 讨论

多器官功能障碍综合征已成为导致临床非冠心病危重患者致病和致死的首要原因^[5]。尽管现在人们对内毒素结构、生物学活性及其致病机制、内毒素血症的病理生理过程等有了一定的认识,而且在抗生素治疗和重症监护技术方面取得了一定的进展,但是针对内毒素血症的抗内毒素治疗却一直困扰着医学界,其病死率仍然高达 45%~75%。

高密度脂蛋白(HDL)是一类具有较高密度的球形血浆脂蛋白,密度范围在 1.063~1.210 kg/L。HDL 相对于其他脂蛋白来说颗粒较小,能够较快地穿透内皮细胞,因此在组织浆液中具有较高的浓度。一直以来,HDL 被公认为在预防和治疗动脉粥样硬化方面具有重要作用。而近几年来,人们发现 HDL 还具有抗炎症的新功能^[6]。体外实验较早地证明了 HDL 能够结合并中和脂多糖^[7]。动物实验显示 HDL 不但能够抑制细胞因子的释放,而且可以降低动物的死亡率^[1,8,9]。此外,HDL 还能够抑制免疫性炎症(慢性炎症)的发生^[10]。载脂蛋白 A iv 作为 HDL 的主要结构蛋白,承担了 HDL 的大多数功能,如参与激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶,使游离胆固醇酯化以及参与胆固醇逆向转运过程。我们的前期研究已证实 HDL 的抗炎、抗内毒素的功能也主要是由载脂蛋白 A iv 执行的^[2,3]。载脂蛋白 A iv 体外能够直接或通过 LBP 间接结合脂多糖,中和脂多糖的毒性;载脂蛋白 A iv 对巨噬细胞和中性粒细胞的功能具有抑制作用,抑制此两种细胞释放各种炎症介质,还能够抑制激活中性粒细胞与纤连蛋白的粘附、抑制中性粒细胞超氧化物生成、减少中性粒细胞脱颗粒和抑制中性粒细胞释放炎症因子^[11]。

腺病毒是目前最常用的在体基因表达系统之一,具有转染效率高、宿主细胞范围广、可容纳外源基因长的特点^[12]。人类腺病毒基因组是一个线性的双链 DNA,已发现有 6 个亚型,即人腺病毒 A、B、C、D、E 及 F,共有 51 个血清型。本研究选用腺病毒基因组中至少有三个区域可以接受外援 DNA 的插

入或替代:E1 区、E3 区及 E4 区,选用 5 型腺病毒作为载体,去除其 E1 区,以便插入外源基因^[13,14]。携带人载脂蛋白 A iv 的腺病毒经尾静脉注入小鼠体内后,能够在小鼠肝脏富集,表达外源基因,帮助我们成功建立载脂蛋白 A iv 过表达小鼠模型。该模型小鼠可以在一定时间内稳定地高表达人载脂蛋白 A iv,并且使血浆脂质发生变化,而对小鼠体内原有小鼠载脂蛋白 A iv 表达无明显影响,为进一步研究人载脂蛋白 A iv 的抗炎症功能奠定基础。

[参考文献]

- [1] Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, et al. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 12 040-044.
- [2] Yan YJ, Li Y, Lou B, et al. Beneficial effects of ApoA iv on LPS-induced acute lung injury and endotoxemia in mice [J]. *Life Sci*, 2006, **79**: 210-215.
- [3] Ma J, Liao XL, Lou B, et al. Role of apolipoprotein A iv in protecting against endotoxin toxicity [J]. *Biochim Biophys*, 2004, **36** (6): 419-424.
- [4] Green M, Wold WSM. Human adenovirus: growth, purification, and transfection assay [J]. *Methods Enzymol*, 1979, **58**: 425-435.
- [5] Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990's [J]. *JAMA*, 1994, **271** (3): 226-233.
- [6] Van Leeuwen HJ, Van Beek AP, Dallinga-Thie GM, et al. The role of high density lipoprotein in sepsis [J]. *NED J Med*, 2001, **59**: 102-110.
- [7] Riedemann NC, Ward PA. Anti-inflammatory strategies for the treatment of sepsis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, **3**: 339-350.
- [8] McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, et al. Reconstituted high density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock [J]. *Shock*, 2003, **20** (6): 551-557.
- [9] Hubsch AP, Casas AT, Doran JE. Protective effects of reconstituted high density lipoprotein in rabbit gram-negative bacteremia models [J]. *J Lab Clin Med*, 1995, **126**: 548-558.
- [10] Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al. Apolipoprotein A iv inhibits the production of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes [J]. *Blood*, 2001, **97** (8): 2 381-389.
- [11] Liao XL, Lou B, Ma J, et al. Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A iv [J]. *Life Sci*, 2005, **77**: 325-335.
- [12] Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors [J]. *Mol Ther*, 2004, **10** (4): 616-629.
- [13] Carlson CA, Steinwaerder DS, Stecher H, et al. Rearrangements in adenoviral genomes mediated by inverted repeats [J]. *Methods Enzymol*, 2002, **346**: 277-292.
- [14] Steinwaerder DS, Carlson CA, Otto DL, et al. Tumor-specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector [J]. *Nat Med*, 2001, **7**: 240-243.

(此文编辑 文玉珊)