

载脂蛋白 AI 在骨骼肌系统的表达

张 慧 范乐明 蔡海江

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

主题词 动脉粥样硬化; 基因治疗; 载脂蛋白 AI; 基因表达; 肌、骨骼; 腺病毒载体; 成肌细胞; 胆固醇; 生物转运

摘 要 载脂蛋白 AI 在胆固醇逆转运过程中起关键作用, 已成为防治动脉粥样硬化的重要首选基因之一。为探讨借用骨骼肌异源表达进而发展一种简易安全的基因治疗方法, 将人载脂蛋白 AI 基因构建成腺病毒载体(Ad- RSV- 载脂蛋白 AI), 导入小鼠骨骼肌。体外细胞实验发现, 载脂蛋白 AI 可以在肌源性细胞中表达并分泌至培养基中, 表达量与病毒滴度及转染时间相关。在体动物实验中, 将 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 直接注入小鼠骨骼肌 5 日后, 肌肉和血清中载脂蛋白 AI 的表达达到高峰, 前者每条为 9.75 ± 0.25 ng, 后者为 7.25 ± 0.75 μ g/L。以后随时间延长逐渐减少, 第 30 日血清中载脂蛋白 AI 消失, 第 40 日仍可在肌肉中检测到一定量的载脂蛋白 AI 表达。此结果提示, 利用骨骼肌细胞的异位表达可提高体内载脂蛋白 AI 的水平, 为动脉粥样硬化的基因治疗提供新的途径。

Gene Expression of Apolipoprotein AI in Skeletal Muscle

ZHANG Hui, FAN Le- Ming and CAI Hai- Jiang

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

MeSH Atherosclerosis; Gene Therapy; Apolipoprotein AI; Gene Expression; Muscle, Skeletal; Denoviral Vector; Myoblast; Cholesterol; Biological Transport

ABSTRACT **Aim** Plasma apolipoprotein AI (apo AI) play an important role in reverse cholesterol transport and have becoming attractive target for prevention or treatment of atherosclerosis. The present study was undertaken to search for the possibility of human apo AI gene expression and secretion to blood by transferred Ad- RSV- apo AI into mouse skeletal muscles and developing method of atherosclerotic gene therapy. **Methods** An E1- /E3- adenoviral vector, with an RSV- driven human apo AI cDNA expression vector (Ad- RSV- apo AI) was constructed. Transfected myogenic cells in vitro or directly injected into mouse skeletal muscle with the vector. The result was examined by ELISA and immunocytochemistry. **Results** In the primary cultured myoblasts, the expression level of apo AI in the culture medium increased with the increasing MOI of Ad- RSV- apo AI (from 10^5 pfu to 10^8 pfu). The expression of apo AI was also increased with time. It peaked on the 6th day. After direct injection of Ad- RSV- apo AI into muscle, apo AI mass could be detected, which peaked on day 5 both in the muscle and plasma. On day 30, apo AI was disappeared in the plasma, but the expression in the muscle existed till day 40. **Conclusions** Apo AI gene can be expressed in the skeletal muscle and secreted to the circulation. It might be an approach for the atherosclerotic gene therapy.

在动脉粥样硬化发生发展过程中, 胆固醇起着重要作用。正常情况下, 血液内胆固醇通过低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体途径进入外周组织供细胞代谢, 多余部分则借助胆固醇逆转运机制返回肝脏。血胆固醇水平过高和/或胆固醇逆转运机能减退, 都可导致过量胆固醇在动脉壁积聚, 是动脉粥样硬化发生的重要原因。因此增强胆固醇逆转运, 减少或消除动脉壁内蓄积的胆固醇, 有可能防止或减轻动脉粥样硬化的发生发展。高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的主要生理功能是参与胆固醇逆转运, 分为 α -HDL 和前 β -HDL, 其

中前 β_1 -HDL 是细胞源性胆固醇的最初接受体^[1]。载脂蛋白 AI 是前 β_1 -HDL 中的主要蛋白质, 所以增加载脂蛋白 AI 的表达, 可以促进胆固醇的接受体前 β_1 -HDL 的形成。Miyazaki 等^[2]将同源载脂蛋白 AI 注入高胆固醇血症兔的静脉血中, 发现能明显抑制动脉粥样硬化斑块的形成。已知前 β_1 -HDL 只占 HDL 总量的 5%, 但约 50% 的胆固醇逆转运与它有关^[3]。因此, 持续小剂量注射载脂蛋白 AI, 可通过增加前 β_1 -HDL 的形成, 促进胆固醇逆转运, 从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。基于以上原理, 我们将人载脂蛋白 AI 基因导入小鼠骨骼肌, 表达的载脂蛋白 AI 不断分泌入血, 应能发挥与静脉内注射载脂

蛋白 AI 相同的作用。

1 材料与方法

1.1 载脂蛋白 AI 重组腺病毒载体的构建

质粒 pAdRSV 载脂蛋白 AI 由 Dr. Liu G (University of British Columbia, Canada) 赠送, 系含 RSV-LTR 启动子、SV40 内含子和 poly A 信号以及全长 LacZ 基因的穿梭质粒, 是以 pAdRSV β -gal 为母体, 将载脂蛋白 AI cDNA 替代其中的 LacZ 基因而构成。将此穿梭质粒与 E3 区缺陷 5 型腺病毒基因通过钙沉淀共同转入 293 细胞, 经过同源重组及包装, 即获得 E1+ E3 区联合缺失的、由 RSV 启动子驱动的载脂蛋白 AI 重组腺病毒 Ad-RSV- 载脂蛋白 AI。

1.2 重组腺病毒的制备、纯化及滴度测定

Ad-RSV- 载脂蛋白 AI 转染 293 细胞 40 h 后, 收集细胞并反复冻融。4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 再加入 0.5 体积 20% PEG 8000, 2.5 mol/L 氯化钠, 冰上孵育 1 h 后, 4℃、11 000 r/min 离心 20 min, 将病毒沉淀以 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 溶解。然后进行超速离心纯化: 首先在 SW65 离心管中慢慢加入密度为 1.4 和 1.2 的氯化铯溶液各 1 mL, 再加入 2 mL 稀释的病毒原液。用 SW40 转头、4℃、48 700 r/min 离心 100 min 后, 用注射器穿孔吸取病毒带, 再用 Sephadex 柱层析除盐。收获的病毒通过 Lowry 氏酚试剂法检测病毒蛋白以推算病毒滴度, 计算公式为 $1 \text{ g/L 病毒蛋白} = 3.4 \times 10^{15} \text{ 病毒颗粒/L} = 3.4 \times 10^{13} \text{ pfu/L}$ (pfu, plaque forming unit, 空斑形成单位)。

1.3 培养细胞的重组腺病毒转染

原代成肌细胞(取材于出生 2~3 日的昆明种小鼠四肢), 以含 20% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 Ham's F-10 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。生长至 80% 融合时, 换以含 2% 小牛血清的 F-10 培养基。Ad-RSV- 载脂蛋白 AI、Ad-CMV-LacZ 以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ pfu 的不同浓度, 转染细胞 6 h, 洗净后换成含 20% 小牛血清的 F-10 培养基, 使细胞恢复 24 h, 再换成无血清的 F-10 培养基, 在不同时间收集培养基检测表达产物, 细胞进行免疫组织化学染色。

1.4 重组腺病毒的转染

重组腺病毒的小鼠胫前肌注射 2×10^7 pfu 的 Ad-RSV- 载脂蛋白 AI 或 Ad-CMV-LacZ 稀释于 100 μ L 灭菌生理盐水, 选用 4 号针头, 从胫前肌下端, 以平行于肌肉纵轴的方向进针, 缓慢注射, 每条肌肉注射量一般不超过 100 μ L。

1.5 血清的收集和肌肉表达蛋白的抽提

实验小鼠摘眼球取血, 室温下放置 30 min, 离心分离血清。胫前肌剪碎后加入 0.5 mL 组织裂解液 [此液的配方为: 150 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 和 50 mmol/L EDTA, 临用前加 1 mmol/L PMSF], 置于 1.5 mL 匀浆器中研磨成糊状, 转移至 1.5 mL 离心管中, 不断漩涡震荡, 4℃过夜。次日于 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清, -70℃保存。

1.6 载脂蛋白 AI 的酶联免疫吸附法检测

采用标准双抗体夹心法。包被抗体为鼠抗人载脂蛋白 AI 单克隆抗体, 检测抗体为羊抗人载脂蛋白 AI 多克隆抗体(两者获自 Perlimmune Inc, Rockville, USA), 发色用辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 和 O-phenylenediamine(两者获自 Sigma, Poole, UK)。

1.7 免疫组织化学染色

1.7.1 细胞免疫组织化学染色 事先在六孔培养板内放置盖玻片, 将细胞接种于其表面, 经过转染实验后, 将盖玻片取出, 中性福尔马林固定 30 min 后, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗涤三次, 加入 1% 过氧化氢 10 min, 洗涤后加入系列稀释的酶标羊抗人载脂蛋白 AI 抗体, 37℃孵育 1 h, 最后以 DAB/H₂O₂ 显色 10~20 min, 苏木素复染。

1.7.2 组织免疫组织化学染色 取下已注射病毒载体的小鼠胫前肌, 用中性福尔马林固定 24 h 后, 进行石蜡包埋及切片。切片染色前先在 60℃孵箱中加温 1 h, 再用二甲苯脱蜡三次, 无水乙醇洗两次, 置 3% 过氧化氢溶液处理 10 min 后, 再依次置 100%、95% 和 70% 酒精中各 5 min。磷酸盐缓冲液洗三次, 滴加系列稀释的酶标羊抗人载脂蛋白 AI 抗体, 37℃孵育 1 h, 最后以 DAB/H₂O₂ 显色 10~20 min, 苏木素对比核染色。

2 结果

2.1 人载脂蛋白 AI 与鼠载脂蛋白 AI 的交叉反应性检测

1 600 倍、3 200 倍和 6 400 倍稀释的人血清在 492 nm 处的吸光度分别为 1.76、1.52 和 1.21, 而小鼠血清原液、40 倍稀释液检测的在 492 nm 处的吸光度均为 0, 说明人、鼠载脂蛋白 AI 之间无或仅有微弱交叉反应, 实验小鼠肌肉中含有的血液不会影响 Ad-RSV- 载脂蛋白 AI 表达的人载脂蛋白 AI 的酶联免疫吸附法检测结果。

2.2 Ad-RSV- 载脂蛋白 AI 转染的细胞表达人载脂蛋白 A

2.2.1 酶联免疫吸附法检测结果 原代培养的骨

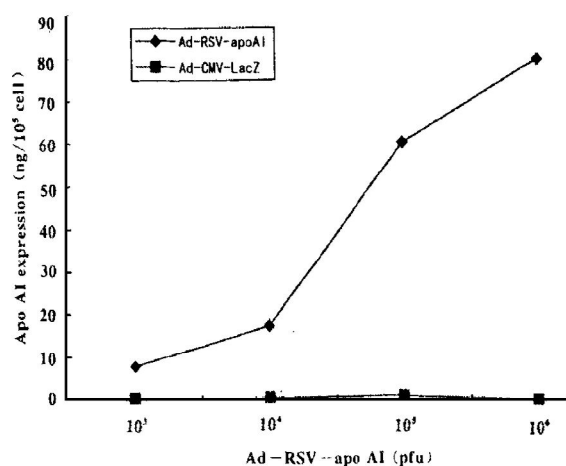


图 1. 在原代培养成肌细胞的培养基中, 腺病毒载体转染与载脂蛋白 AI 表达的浓度曲线

Figure 1. Concentration curve of apo AI in culture medium after primary cultured myoblasts were transfected with different MOI of adenoviral vector

骨骼肌细胞经过 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 和作为对照的 Ad-CMV-LacZ 转染后, 载脂蛋白 AI 的表达结果见图 1 (Figure 1)。显示随着转染的 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 滴度逐渐增加, 载脂蛋白 AI 表达亦逐渐升高, 呈浓度依赖关系, 而 Ad-CMV-LacZ 在各种浓度时均无载脂蛋白 AI 表达, 说明 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 可在原代成肌细胞中表达, 且有明显的量效关系。用相同量 (10^7 pfu) 的 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 转染原代骨骼肌成肌细胞, 在转染后第 2、4、6 和第 8 日取细胞培养基检测载脂蛋白 AI 含量, 发现随着转染时间的延长, 表达的载脂蛋白 AI 含量也逐渐增加, 第 6 日以后增加缓慢, 曲线渐趋平坦 (图 2, Figure 2)。

2.2.2 免疫组织化学检测结果 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 转染的原代培养的骨骼肌成肌细胞中有细小棕色颗粒, 而对照组细胞则无棕色颗粒出现, 但两者细胞形态均有变圆, 体积增大, 细胞核呈空泡状, 淡染等变化 (图 3, Figure 3)。

2.3 小鼠胫前肌注射 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 表达人载脂蛋白 AI

实验组和对照组小鼠注射病毒载体后第 5、10、20、30 和第 40 日被处死, 酶联免疫吸附法检测血清和肌肉抽提液中载脂蛋白 AI 含量, 结果见图 4 (Figure 4)。可见 Ad-RSV-载脂蛋白 AI 注射后第 5 日, 肌肉中载脂蛋白 AI 的表达达最高峰, 为 9.75 ± 0.25 ng (四条肌肉载脂蛋白 AI 表达平均值), 以后随着时间的延长逐渐减少, 但在注射后第 30 日仍能检

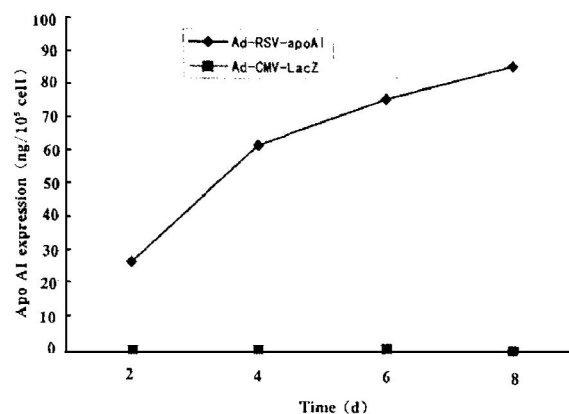


图 2. 在原代培养成肌细胞的培养基中, 腺病毒载体转染与载脂蛋白 AI 表达的时间曲线

Figure 2. Time curve of apo AI in culture medium after primary cultured myoblasts were transfected with adenoviral vector

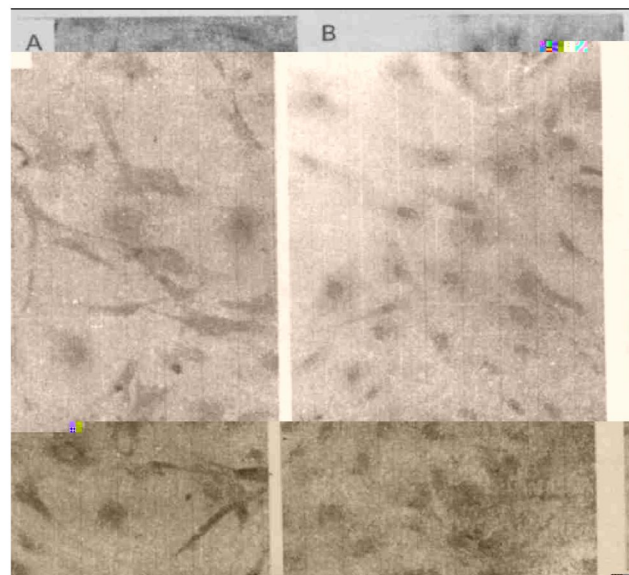


图 3. 用腺病毒载体转染的原代培养成肌细胞的免疫组织化学检测结果

Figure 3. Immunohistochemistry stain of primay cultured myoblasts transfected with adenoviral vectors ($\times 40$). A: transfected with Ad-CMV-LacZ; B: transfected with Ad-RSV-apo AI

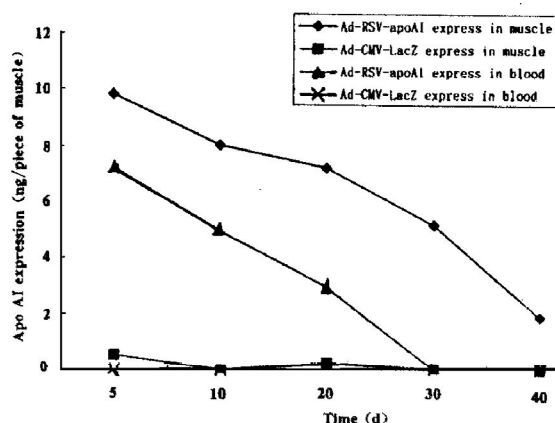


图 4. 载脂蛋白 AI 表达的时间曲线

Figure 4. Time curve of apo AI expression

测到一定量的表达。血清中载脂蛋白 AI 的含量亦在注射后第 5 日达到最高, 为 $7.25 \pm 0.75 \mu\text{g/L}$, 以后随着时间延长迅速下降, 注射后第 30 日已检测不到载脂蛋白 AI。对照组小鼠 Ad- CMV- LacZ 注射后第 5、10、20、30 和第 40 日肌肉和血液中均无载脂蛋白 AI 的表达。

3 讨论

腺病毒载体是目前最具有应用潜力的载体之一, 广泛应用于体内基因转移。本实验使用的是一种 E1+ E2 联合缺失的, 带有载脂蛋白 AI cDNA 的, 由 RSV 启动子驱动的腺病毒载体(Ad- RSV- 载脂蛋白 AI), 体外转染原代成肌细胞。检测结果发现载脂蛋白 AI 的表达量与病毒滴度及转染时间相关; 动物实验将 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 直接注入小鼠骨骼肌, 载脂蛋白 AI 在骨骼肌表达并分泌进入血液循环, 持续 30 日。但载脂蛋白 AI 的表达量和在血液中维持的时间尚不理想, 分析其原因, 可能有几个方面。首先, 已有研究证明骨骼肌中不存在阻碍目的基因产物分泌入血的结构, 血液中基因产物浓度较低和维持时间不长的关键在于外源基因的表达水平过低^[4]。本实验小鼠骨骼肌注射 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 30 日后血液中检测不到载脂蛋白 AI, 而注射部位肌肉中的载脂蛋白 AI 表达可持续较长时间。细胞实验结果显示, Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 的转染滴度与其表达量之间呈明显的量效关系, 所以动物实验中如果增加 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 的注射滴度, 不仅可增加肌肉中载脂蛋白 AI 的表达量, 同时较大的载脂蛋白 AI 不断分泌入血, 使其在血液中浓度增加, 维持时间也将延长。

其次, 本实验选用的是成年 Balb/c 小鼠。有资料表明成年小鼠的骨骼肌细胞在腺病毒载体转染和表达效率上明显低于幼年小鼠骨骼肌细胞^[5]。这一现象的原因尚不清楚, 可能是与腺病毒载体相关的同源 $\alpha\text{v}\beta_3/\beta_5$ 受体在成熟肌纤维中被配基所占领, 而未成熟的成肌细胞则存在较多病毒受体的缘故^[6]。

另外有研究资料表明腺病毒载体诱导机体产生免疫反应的抗原主要来自 E4 区所协助表达的晚期蛋白^[7]。本实验中使用的 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 是一类 E1+ E3 联合缺失的腺病毒载体, 保留了 E4 区, 注入机体后不可避免会诱导机体产生免疫反应, 使转基因细胞数量减少, 缩短外源基因表达的时间。因此目前许多学者正致力于发展“第二代”腺病毒载体, 以减少病毒蛋白的产生以及增加载体的靶向性^[8]。将腺病毒载体导入机体可以采用不同的途

径, 对机体造成的损伤范围也有差别。静脉内注射会造成肝、肺组织的炎症反应^[9]; 采用骨骼肌直接注射的方法, 仅在早期骨骼肌切片中发现有明显炎症细胞浸润, 肝脏则无此现象。增加 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 的注射量是否会造成其它组织或器官的损伤还有待于进一步研究。

以上研究结果表明, 通过腺病毒载体直接注射的方式, 载脂蛋白 AI 可以在骨骼肌细胞表达并分泌入血液循环, 提示可以通过增加 Ad- RSV- 载脂蛋白 AI 的注射量, 诱导肌细胞再生, 改造腺病毒载体, 抑制调节机体免疫反应等方法, 提高腺病毒载体的表达效率, 延长载脂蛋白 AI 的表达时间。尽管这一方面的研究才刚刚起步, 但我们相信, 随着分子生物学技术的发展, 利用骨骼肌细胞的异位表达来提高体内载脂蛋白 AI 的水平, 将成为动脉粥样硬化基因治疗的一个重要组成部分。

参考文献

- Fielding PE, Kawano M, Cutapano AL. Unique epitope of apolipoprotein expressed in pre- β_1 high- density- lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol. *Biochemistry*, 1994, **33**: 6 981- 985
- Miyazaki A, Sankuma S, Morikawa W, et al. Intravenous injection of rabbit apolipoprotein AI inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol- fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vas biol*, 1995, **15**: 1 882- 888
- Kawano M, Miida T, Fielding CT. Quantitation of pre β - HDL dependent and nonspecific component of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipids. *Biochemistry*, 1993, **32**: 5 025- 028
- Fazio VM, Fazio S, Rinaldi M, et al. Accumulation of human apolipoprotein- E in rat plasma after in vivo intramuscular injection of naked DNA. *Biochem Biophys Res Com*, 1994, **200**: 298- 305
- Descamps V, Blumenfeld N, Villeval JL, et al. Erythropoietin gene transfer and expression in adult normal mice: use of an adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 1994, **5**: 979- 985
- Acsadi G, Massie B, Huard J, et al. Cultured human myoblasts and myotubes show markedly different transducibility by replication defective adenovirus recombinant. *Gene Ther*, 1994, **1**: 395- 402
- 程金科, 林晨, 吴雯. 腺病毒载体的应用及进展. 国外医学分子生物学分册, 1996, **4**: 145- 149
- Douglas JT, Curiel DJ. Strategies to accomplish targeted gene delivery to muscle cells employing tropism- modified adenoviral vectors. *Neuromuscul Disord*, 1997, **7**: 284- 298
- Kopfler WP, Willard M, Betz T. Adenovirus- mediated transfer of a gene encoding human apolipoprotein AI into normal mice increases circulating high- density- lipoprotein cholesterol. *Circulation*. 1994, **90**: 1 319- 327

(此文 1999- 01- 15 收到, 1999- 07- 23 修回)

(此文编辑 胡必利)