论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0102-04

人 CTLA4Ig,IκBα 双基因共表达腺病毒载体的构建

李 宁[1],袁育康[1],吴 军[2] ([1]西安交通大学医学院免疫学教研室,西安 710061;[2]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 制备细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4融合蛋白(cytotoxic T lymphocytic associated antigen 4, CTLA4Ig)和核因子的抑制蛋白(inhibition of NF-κB, IκBα)双基因共表达腺病毒载体。**方法** 将IκBα和CTLA4Ig通过内部核糖体进入部位(internal ribosome entry site, $IRES_2$)连接,并以基因重组的形式插入腺病毒表达载体,以同源重组的形式转染293细胞,构建重组腺病毒。**结果** ①成功构建Padtrack-CMV-CTLA4Ig-$IRES_2$表达质粒;②与BJ5183重组后转染293,获得重组腺病毒;③PCR鉴定重组腺病毒正确。**结论** 构建了人CTLA4IGg,IκBα双基因共表达腺病毒载体,为进一步研究其在免疫耐受中的作用提供研究基础。

关键词: CTLA4Ig;IκBα;腺病毒;重组

中图法分类号: Q782; Q784; R392.11 **文献标识码:** A

Construction and identification of adenovirus-recombined vector of CTLA4Ig-IRES2-IκBα

LI Ning[1], YUAN Yu-kang[1], WU Jun[2] ([1]Department of Immunology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct adenovirus vector harboring CTLA4Ig-IRES2-IκBα gene for the study of enhancement blockade of T cell costimulatory pathway. **Methods** The IRES2 fragment was cloned in to the shuttle plasmid pAdtrack-CMV-CTLA4Ig, and then the human IκBα fragment was constructed with the link of the IRES2 to the pAdtrack-CMV-CTLA4Ig. Subsequently, adenovirus vector harboring CTLA4Ig-IRES2-IκBα was constructed by homologous recombination in *E. coli* BJ5183, and recombinant vector was packaged and propagated in 293 cells. **Results** The recombinant CTLA4Ig-IRES2-IκBα adenovirus was constructed by homologous recombination and identified by PCR and restrictive enzyme digestion methods. **Conclusion** The recombinant CTLA4Ig-IRES2-IκBα adenovirus may be used as a novel immunosuppressive agent for gene therapy in organ transplantation.

Key words: CTLA4Ig; IκBα; adenovirus; recombinant

B7-CD28/CTLA4Ig是T细胞识别活化中最重要的共刺激分子,具有诱导特异性免疫耐受的特性,在部分临床实验中取得了成功。但其临床应用的主要障碍为免疫耐受的逆转,当实验动物发生严重炎症反应时,出现了移植物的被排斥或移植物抗宿主反应(graft versus host reaction, GVHR)的加重。而目前研究认为炎症反应产生的中心环节是核因子κB(nuclear factor κB, NF-κB)的上调,因此抑制免疫病理状态下NF-κB的过度活化,可协同细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4融合蛋白(cytotoxic T lymphocytic associated antigen 4, CTLA4Ig)的生物学效应。

NF-κB主要是与核因子的抑制蛋白(inhibition of NF-κB, IκBα)结构形成三聚体以无活性方式存在于细胞质中,当细胞受到多种外界信号的刺激进而启动第二信使系统,IκB在IκB激酶的作用下发生磷酸化并降解,NF-κB被激活并移位进入细胞核内发生一系列的基因转录。因此本研究通过以腺病毒为载体,采用DNA重组技术,构建IκB-$IRES_2$-CTLA4Ig双基因重组腺病毒,为进一步研究其感染靶细胞和的生物学活性和效应转染移植肾的免疫基因治疗打下坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒p $IRES_2$-EGFP、Padtrack-CMV-CTLA4Ig由第三军医大学西南医院烧伤研究所贺伟峰博士提供,质粒PODB7 IκB购自美国ATCC公司,质粒Adeasy-1、菌种BJ5183购自Stratagene公司,大肠杆菌DH5α由第三军医大学西南医院烧伤研究所保存,293细胞购自美国ATCC公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Bam*HⅠ、*Xho* Ⅰ、*Hind*Ⅲ购自MBI公

作者简介:李 宁(1973-),女,山东省济南市人,博士研究生,主治医师,主要从事免疫耐受方面的研究,电话:13991225758

通讯作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail: junwupro@cta.cq.cn

收稿日期:2004-05-15;修回日期:2004-11-20

司，T4 多核甘酸激酶购自 Takara 公司，高效质粒回收试剂盒，凝胶 DNA 片断回收试剂盒，DNA 快速连接试剂盒购自 Takara 公司，低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司，培养基 LB 按常规配置。培养基 DMEM 购自美国 GIBCO 公司。

1.3　Padtrack-CMV-CTLA4Ig-IRES$_2$ 质粒的构建

IRES$_2$-EGFP 质粒用自行设计的 IRES$_2$ 引物（上海生物化学工程公司合成），引物为 5′-TTTGTCGACCGCCCCTCTCCCTCCC-CCCCCCCTA-3′ 及 5′-TTTCTCGTATTATCAT -3′，PCR 扩增后与 PTZ57R 载体连接，氯化钙法转入 DH5α 大肠杆菌，x-gal IPTG LB 平板蓝白板筛选，PCR 筛取正确的克隆测序鉴定正确后，以 *Sal* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ 酶切回收 600 bp 片断待用。

Padtrack-CMV-CTLA4Ig 用 *Sal* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶切，填平小牛肠碱性磷酸酶（Calf Intestine Alkaline Phosphatase，CIAP）去磷酸化后回收片断，与 PT-IRES$_2$ 酶切后片断以 T4 Polymerase 连接，氯化钙法转入 DH5α 大肠杆菌，以 kanar 的 LB 平板 PCR 筛取克隆，鉴定正确待用。

1.4　Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig 双基因构建

PODB7-IκBα 质粒用自设计的引物 PCR 扩增，（一对引物序列：5′-CAAAGATCTTCCAGGCG-3′ 和 5′-CAAGTCGACGTTTTGGG-CTAGGCA-3′）鉴定回收 1 100 bp 与 PTZ57R 载体连接，氯化钙法转入 DH5α，涂 x-gal IPTG LB 平板筛取克隆正确后待用，*Bgl* Ⅱ和 *Sal* Ⅰ酶切回收片断，与 Padtrack-IRES$_2$-CTLA4Ig 质粒酶切后产物连接，氯化钙法转入 DH5α，涂 Kana LB 平板，PCR 筛取克隆正确以 *Bgl* Ⅱ和 *Sal* Ⅰ酶切鉴定 1 100 bp 为正向克隆，保存菌种。

1.5　腺病毒重组

重组质粒 Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig 以 *Pme* Ⅰ酶线性化质粒，CIAP 去磷酸化回收后与 BJ-5183-AD 一起电转法（2.2 kV，200 Ω，20 μF）同源重组，以 Kanar SOB 平板筛选克隆，提质粒后氯化钙法转入大肠杆菌 XL-10-gold，提取质粒，大量制备重组质粒的 DNA Padeasy-adtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig（简称 Pac-Ⅱ C），以 *Pac* Ⅰ线性化，胶回收待用。

1.6　重组质粒和 293 细胞同源重组

按 Invitrogen 公司的试剂说明，用 lipofectamine 脂质体介导将 Pac-Ⅱ C 转染 293 单层细胞，由于 adtrack-CMV 系统在细胞内可以表达绿色荧光蛋白，因此转染 24 h 后即可见到镜下有绿色荧光出现。培养 10～14 d 后收集病毒。

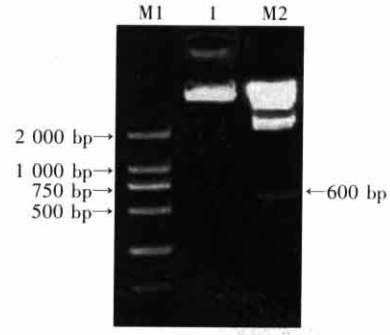
1.7　腺病毒的鉴定

用饱和酚/氯仿法提取腺病毒的 DNA，PCR 鉴定，一对引物为腺病毒特有：即位于 E2B 区的 5′-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3′ 和 5′-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3′其扩增长度为 860 bp 的 E2B 特异条带。一对引物为 IκBα，序列为一对引物序列：5′-CAA-AGATCTTCCAGGCG-3′，和 5′-CAAGTCGACGTTTTGGGCTAGGCA-3′ 长度为 1 100 bp 的条带。

2　结果

2.1　Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig 的构建与鉴定

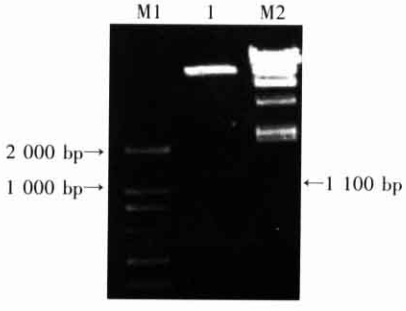
用 *Sal* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ 酶切 Padtrack-CMV-CTLA4Ig-IRES$_2$，结果得到 600 bp 的 IRES$_2$ 片断，与理论设计相符，PCR 结果证实（图 1）。以 *Bgl* Ⅱ和 *Sal* Ⅰ酶切 Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig 结果产生 1 100 bp 的 IκBα 片断，结果与理论设计一致（图 2）。



M1：DL2000 marker；M2：λDNA *Hind* Ⅲ marker；1：*Sal* Ⅰ and *Xho* Ⅰ enzyme digestion

图 1　Padtrack-CMV-CTLA4Ig-IRES$_2$ 鉴定

Fig 1　Identification of expression of Padtrack-CMV-CTLA4Ig-IRES$_2$



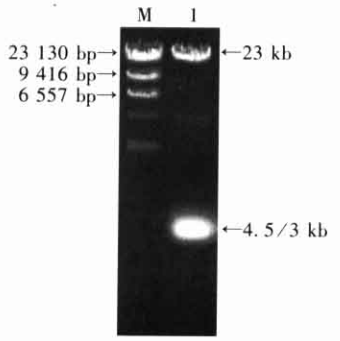
M1：DL2000 marker；M2：λDNA *Hind* Ⅲ marker；1：*Bgl* Ⅱ and *Sal* Ⅰ enzyme digestion：1 100 bp fragment

图 2　*Bgl* Ⅱ和 *Sal* Ⅰ酶切出 1 100 bp 的片断

Fig 2　Detection of Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig

2.2　腺病毒的同源重组及 PCR 的鉴定

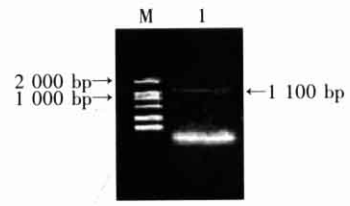
与 BJ5183 重组后经 *Pac* Ⅰ酶切，0.8% 琼脂糖电泳鉴定有 23 kb 和 4.5/3 kb 的条带（图 3）。转染 293 后提取病毒上清 DNA，PCR 结果分别有 860 bp 的腺病毒 E2B 的特异条带，1 100 bp的 IκBα 的特异性条带证实重组成功（图 4）。



M：λDNA *Hind* Ⅲ marker；1：Padtrack-CMV-CTLA4Ig-IRES$_2$-IκBα/*Pac* Ⅰ

图 3　*Pac* Ⅰ酶切后的初步鉴定（可见质粒酶切为 23 kb 和一个小的片断）

Fig 3　Identification of Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig with *Pac* Ⅰ restrictive enzyme digestion (23 kb and 4.5/3 kb)



M: DL2000 marker; 1: Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig PCR product using IκBα as primers

图4 Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig 的鉴定(PCR 可见 IκBα 的 1 100 bp 的片断)

Fig 4 PCR identification of Padtrack-CMV-IκBα-IRES$_2$-CTLA4Ig (1 100 bp)

3 讨论

3.1 基因重组 CTLA4Ig 腺病毒的意义

CTLA4Ig 在免疫耐受中的作用抗原呈递过程中，细胞之间的信号转导是启动和维持免疫反应的关键。同种反应性 T 细胞的完全活化除需 CD3-TCR/MHC-Ag 提供的抗原特异性信号激活外外，还需协同刺激分子提供协同刺激信号即共刺激信号(costimulative signal)才能发挥免疫效应，CTLA4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4, CTLA4)是在 CTL 细胞中可竞争性抑制 APC 膜上的 B7 分子与 T 细胞膜上的 CD28 结合，从而阻断 T 细胞的完全活化。CTLA4Ig 是由 CTLA4 胞外区与 IgG Fc 段融合而成，具有与 CTLA4 完全相同的生物学功能。大量研究 CTLA4Ig 通过阻断共刺激通路而使同种反应性 T 细胞凋亡或处于无反应状态，诱导特异性免疫耐受[1]，研究表明：体内注射 CTLA4Ig 阻断 B7/CD28 通路可以延长器官植入时间，减轻或预防移植物抗宿主反应(graft versus host reaction, GVHR)的发生[2]，并在部分临床实验中取得了成功[3]。但其临床应用的主要障碍为免疫耐受的逆转，当实验动物发生严重炎症反应时，出现了移植物的被排斥或 GVHD 的加重。因此，深入探讨 B7/CD28 介导免疫耐受的作用机制是克服这一障碍的关键。

3.2 NF-κB 在免疫耐受中的作用

近年的进展多集中在抑制受体抗移植物的免疫反应及增强对移植物的保护，显然在当今非特异性免疫抑制剂的应用之下，对 GVHD 有了更好的治疗方法，但后者对于慢性的移植物功能丧失更为重要，慢性的移植物功能丧失被认为是由同种抗原依赖性和同种抗原非依赖性(如缺氧和缺血-再灌注损伤所引起的炎性反应)两种因素同时介导的，通过基因治疗增强对移植物的保护可以移植这种同种抗原非依赖性因素，从而促进移植物的存活。而目前研究认为炎症反应产生的中心环节是 NF-κB 的上调[4]。NF-κB 主要是与 IκBα 结构形成三聚体以无活性方式存在于细胞质中，当细胞受到多种外界信号的刺激进而启动第二信使系统，IκBα 在 IκBα 激酶的作用下发生磷酸化并降解，NF-κB 被激活并移位进入细胞核内发生一系列的基因转录，已经证实 NF-κB 可高效诱导多种细胞因子(如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)、粘附分子(如 ICAM 1、VCAM 1、ELAM 1)、趋化因子和急性期反应蛋白的基因表达[4]，同时对参与炎症反应放大与延续(即级联瀑布效应)的多种酶的基因表达也具有重要的调控作用。NF-κB 基因剔除(p50 或 p65)小鼠对细菌、真菌感染及内毒素攻击后的炎症反应缺失、特异或非特异免疫应答受抑，表现为 T、B 淋巴细胞对丝裂原的增殖反应显著受抑；B 淋巴细胞产生特异性抗体的能力丧失；体内 IL-1、IL-6、TNF-α 等炎症介质水平低而迟缓。对于过度炎症反应动物模型，如应用蛋白酶抑制剂(N alpha-p-tosyl1-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK)，则可抑制 IκBα 降解，阻止 NF-κB 活化及其介导的多种炎症介质生成。基于上述研究，多数学者最近提出 NF-κB 是极具潜力的新型抗炎靶点，目前在移植免疫耐受的领域国外的研究多集中在以下两个方面：①抑制内皮细胞激活和炎性反应 IκBα 的腺病毒表达载体，使 IκBα 显性失活突变体过量表达，可明显抑制 NF-κB 的核移位及后续效应。将可以特异性结合 NF-κB 的圈套核因子 NFκB 结合位点诱捕物寡核苷酸(oligodeoxyribonucleotide, ODN)转染长时间保存的大鼠心脏，可以明显减轻保存心脏的缺血再灌注的损伤，主要即是通过抑制 NF-κB 诱导激活的转录激活因子，从而阻止内皮细胞的激活，从而保护移植物免受炎性反应的损伤[5]。②抑制体内的树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟：多项研究表明，抑制体内的 DC 成熟可以诱导激活的 T 细胞发生凋亡或是 T 细胞无能，输入体外培养的非成熟 DC 虽可以诱导免疫耐受和延长同种异体器官的存活[6]，但从理论上来说，当受体接受移植后，受体体内的非成熟 DC 会在炎症介质如 LPS 的刺激之下被激活从而成熟，而 DC 这种在抗原提呈过程中成熟的机制也是依赖 NF-κB 的核内移的过程[7,8]。因此抑制特异性结合 NF-κB 的途径对体内的 DC 维持非成熟状态也是意义重大[9]。另外，目前国内用于诱导免疫耐受的基因治疗多采取目的基因转染腺病毒的方法，但这样的方法用于体内就存在一定的缺陷，问题在于腺病毒可以激活 NF-κB 从而激活 DC 成熟，诱导

了对移植物的杀伤，有效的抑制 NF-κB 的途径可以大大的加强对其他基因治疗的效果，并对 CTLA4Ig 在体内的表达无明显影响，目前国内尚无类似报道出现，这也是我们选用双基因构建来协同基因治疗的目的所在。

参考文献：

[1] Uchikoshi F, Yang Z D, Rostami S, *et al*. Prevention of autoimmune recurrence and rejection by adenovirus-mediated CTLA4Ig gene transfer to the pancreatic graft in BB rat[J]. Diabetes, 1999, 48(3): 652 - 657.

[2] Hayashi S, Guang-Lin M, Yokoyama I, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene results in prolonged survival of heart allograft[J]. Transpl Int, 2000, 13(Suppl 1): S329 - S332.

[3] Takehara M, Murakami M, Inobe M, *et al*. Long-term acceptance of allografts by *in vivo* gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and loxP[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(4): 415 - 426.

[4] Sakaguchi T, Sawa Y, Fukushima N, *et al*. A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor-kappaB in myocardial preservation[J]. Ann Thorac Surg, 2001, 71(2): 624 - 630.

[5] Tomita N, Morishta R, Lan H Y, *et al*. *In vivo* administration of a nucleartranscription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(7): 1244 - 1252.

[6] 黄赤兵，吴　军，张艮甫，等 用负载供体抗原的致耐受性树突状细胞延长大鼠移植肾存活[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1906 - 1908.

[7] Bonham C A, Peng L, Liang X, *et al*. Marked prolongation of cardiac allograft survival by dendritic cells genetically engineered with NF-kappa B oligodeoxyribonucleotide decoys and adenoviral vectors encoding CTLA4Ig [J]. J Immunol, 2002, 169(6): 3382 - 3391.

[8] 罗高兴，吴　军，易绍萱，等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(1)：37 - 39.

[9] Giannoukakis N, Bonham C A, Qian S, *et al*. Prolongation of cardiac allograft survival using dendritic cells treated with NF-κB decoy oligodeoxyribonucleotides[J]. Mol Ther, 2000, 1(5 Pt 1): 430 - 437.

（编辑　刘洪娥）

（上接 101 页）

结果显示，除因素 N（世故性）两组比较无显著性差异外，其余各因素两组相比均呈非常显著性差异

2.2　相关分析

把焦虑症组 SAS 评分作为因变量，把性别、年龄、文化程度及卡特尔各因素评分作为自变量，进行相关分析，除 SAS 评分与因素 G（$r = -0.273$，$P < 0.01$）、因素 E（$r = -0.217$，$P < 0.05$）、因素 F（$r = -0.208$，$P < 0.05$），呈显著负相关，与因素 Q4（$r = 0.248$，$P < 0.05$），呈显著正相关外，与 PF16 其余各项、性别、年龄及文化程度无关

3　讨论

卡特尔的特质理论认为，人格特质（Trait）是个体行为的一种倾向，是个体在多数情景下的行为表现[1]。本研究显示，焦虑症组患者与正常人常模卡特尔 16PF 各因素相比较，除因素 N（世故性）无显著性差异外，其余各因素两组比较均有显著性差异，尤其是因素 H（敏感性）、因素 L（怀疑性）、因素 M（幻想性）、因素 O（忧虑性）及因素 Q4（紧张性）很显著高于正常人常模，而因素 C（稳定性）却非常显著低于常模组，说明焦虑症组患者具有易多疑，敏感、忧虑，紧张及情绪不稳定的人格特点，这与国内外相关文献[5,6]报道一致。但有趣的是因素 A（乐群性）及因素 B（聪慧性）得分也显著高于正常人常模，说明即使性格外向而且比较聪明的个体，如果同时具备了情绪不稳定、多疑、敏感、好幻想、忧虑及紧张的个性特点，同样使得他易罹患焦虑症

此外，结果还显示，焦虑症组 SAS 得分与因素 C（稳定性）、因素 E（持强性）及因素 F（兴奋性）呈显著负相关，说明情绪不稳定、过于严肃、审慎会给个体造成持久的紧张不安，而低持强性显示患者倾向于服从，谦逊及恭顺，这种处事态度或方式，虽然一方面有利于维持人际关系的和谐，但另一方面可能对个体本身的需要形成压抑，长期压抑则会导致个体内心的冲突与不安。而因素 Q4（紧张性）则与 SAS 评分呈显著正相关，说明焦虑症患者本身具有易紧张的人格特征。

综上所述，三低（稳定性、持强性、兴奋性低分特征）一高（紧张性高分特征），可能构成罹患焦虑症的易感人格特征，同时还直接影响着焦虑症的严重程度。此外，因素 H（敏感性）、因素 O（忧虑性）、临床印象与 SAS 评分正相关，但本研究却与临床印象不一致，尚待临床进一步的探索

关键词：焦虑症；人格特质

中图法分类号：R749.72　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 中华医学会精神科分会编. 中国精神障碍分类与诊断标准（CCMD-3）[M]. 第 3 版（CCMD-3）. 济南：山东科学技术出版社，2001. 105 - 107.

[2] 戴忠恒，祝蓓里. 卡特尔十六种人格因素量表手册[M]. 上海：华东师范大学出版社，1987. 1 - 32.

[3] 北京大学 Insight Group. 心理测评工具箱标准版 V2.3 使用手册[M]. 北京：北京大学出版社，2002. 49 - 50.

[4] 伯文 L A 著，周　榕，陈　红，杨炳钧 译. 人格科学[M]. 上海：华东师范大学出版社，2001. 34 - 45.

[5] Gelder M. Psychiatry[M]. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 104 - 111.

[6] 胡　健，吴爱勤. 焦虑症患者的个性特点和行为类型[J]. 中国心理卫生，2003，7(5)：327 - 328.

（编辑　陈聪连）