文章编号:1000-5404(2005)09-0821-04

论著

人 survivin 基因重组腺病毒载体的构建及其在 DCs 中的表达

李 红,刘友生,王长松,葛晓东 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要: 目的 构建含有人 survivin 基因的重组腺病毒载体,为转染树突状细胞构建 DC 疫苗和基因治疗奠定基础。**方法** 自行设计一对分别含有 *Kpn* Ⅰ和 *Xhol* Ⅰ酶切位点的 survivin 基因上下游引物,以质粒 pCITE/survivin 为模板,通过 PCR 扩增获得 survivin 基因全部序列。片段回收后经酶切,定向插入腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV,获得重组质粒 pAdTrack-CMV-survivin。通过 *Kpn* Ⅰ和 *Xhol* Ⅰ双酶切、PCR 及插入片段测序鉴定后,将正确重组体 pAdTrack-survivin 转化包含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌。同源重组后用选择性培养基筛选阳性克隆,提取质粒用脂质体介导转染 293 细胞,通过观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达及 PCR 扩增目的基因等方法鉴定重组的腺病毒。同时将病毒上清转染树突状细胞,通过观察绿色荧光蛋白的表达以及 Western blot 分析观察 survivin 蛋白表达。**结果** 成功构建了含有人 survivin 基因的重组腺病毒,病毒滴度为 1.65×10^8 PFU/ml。在 19×10^3 频段附近可见 survivin 蛋白表达为 16.5×10^3。**结论** 该重组腺病毒载体的构建及成功转染到树突状细胞内表达,为下一步研究人 survivin 作为靶抗原及基因治疗奠定了基础。

关键词: 腺病毒载体;基因疗法;survivin 基因;树突状细胞
中图法分类号: R373.1; R394.33; R394.2 **文献标识码**: A

Construction of recombinant adenovirus vector containing human survivin gene and expression in dentritic cells

LI Hong, LIU You-sheng, WANG Chang-song, GE Xiao-dong (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant adenovirus vector containing human survivin, and transfect it into dendritic cells. **Methods** Full length survivin cDNA was obtained from recombinant plasmid pCITE-survivin by PCR. The PCR product was double-digested with restriction endonucleases *Kpn* Ⅰ and *Xhol* Ⅰ, and inserted orientationally into pAdTrack-CMV. The plasmid of pAdTrack-survivin was lined with *Pme* Ⅰ, and the fragment containing survivin was reclaimed and transfected into *E. coli*. BJ5183. After having been screened, the extracted plasmid of positive bacteria was transfected into HEK293 cells with liposome and was identified by the green fluorescence protein (GFP) expression and by PCR method. The virus was transfected into dentritic cells, and the expression of survivin was proved by the GFP expression and Western blot analysis. **Results** The recombined adenovirus-survivin was constructed successfully and the titer was about 1.65×10^8 pfu/ml. A band was observed by Western boltting and its relative molecular mass was about 16.5×10^3. **Conclusion** A recombinant adenovirus vector containing human survivin was constructed successfully, and the survivin protein was expressed by dendritic cells.

Key words: adenovirus vector; gene therapy; survivin; dendritic cells

survivin 基因是一种新的抗凋亡基因,是凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员。由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织,在正常成人组织几乎不表达,使得应用 survivin 抗原作基因治疗具有良好的抗原靶向性。近年来研究显示树突状细胞(dendritic cells, DCs)是已知的体内抗原呈递功能最强的抗原呈递细胞,随着体外分离培养 DC 方法的成熟,以肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAA)等基因转染 DC 制成 DC 疫苗进行肿瘤基因免疫治疗的研究备受瞩目[1~5],而基因转移是以 DC 为基础的基因治疗的关键和基础。利用腺病毒载体介导基因转移,以其高效和良好的靶向性成为基因治疗中常用的方法。该研究利用腺病毒 AdEasyXL™表达系统成功构建携带人 survivin 基因的重组腺病毒 pAd-survivin,为感染树突状细胞及表达奠定基础。

作者简介:李 红(1968-),男,四川省西充县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤分子病理诊断及治疗方面的研究。电话:(023)68752246,E-mail:leehong7118@yahoo.com.cn
通讯作者:刘友生,电话:(023)68754431
收稿日期:2004-12-02;修回日期:2005-02-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 pCITE-2a(+)/survivin质粒由德国汉堡斯德哥尔摩大学Sandra Siegel教授惠赠(含有survivin基因的cDNA,全长425 bp)。pAdTrack-CMV及pAdEasy-1由西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士转赠。各种限制性内切酶、T4DNA聚合酶、*ExTaq*酶分别购自NEB、Promega和TaKaRa公司。脂质体Lipofectamine™ 2000购自Roche公司。小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。PCR引物由上海申友生物工程有限公司合成。

1.1.2 菌株与细胞株 HEK293细胞、*E. coli* BJ5183、大肠杆菌DH5α、超级感受态XL10-GOLD由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR引物设计 参照已在GenBank上发表的survivin序列设计一对引物,根据克隆所需,在每条引物的5′端引入相应的限制酶切位点及保护性碱基,采用Oligo核酸分析软件进行分析,引物序列:P1(survivin基因上游引物,5′端含有*Kpn* Ⅰ位点):5′-GCCGGTACCATGGGTGCCCCGACG-3′;P2(survivin基因下游引物,5′端含有*Xhol* Ⅰ位点):5′-GCCCTCGAGTCAATCCATGGCAGC-3′。

1.2.2 pAdTrack-survivin穿梭质粒的构建 以pCITE-2a(+)/survivin为模板,用合成的分别含有*Kpn* Ⅰ和*Xhol* Ⅰ酶切位点的survivin基因上下游引物进行PCR扩增。反应体系为50 μl,其中含10×buffer 5 μl,dNTP(2.5 μmol/L)4 μl,模板质粒(0.1 mg/ml)1 μl,上下游引物(25 μmol/L)各1 μl,*Taq*酶25 U。热循环程序为:预变性96 ℃ 2 min,变性96 ℃ 40 s,退火55 ℃ 40 s,延伸72 ℃ 2 min,30个循环后,72 ℃再延伸6 min。PCR产物回收(按试剂盒说明书操作)后,用*Kpn* Ⅰ和*Xhol* Ⅰ双酶切,获得425 bp的survivin基因片段。腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV亦用*Kpn* Ⅰ和*Xhol* Ⅰ双酶切,琼脂糖电泳胶回收获得约9 100 bp的载体DNA(0.08 g/L)。目的基因与载体DNA在16 ℃保温下经T4DNA连接酶连接17 h,连接产物转化新鲜感受态大肠杆菌DH5α,接种卡那霉素平板培养16 h,挑取阳性克隆扩增培养,碱裂解法提取并纯化质粒,获得重组穿梭质粒pAdTrack-survivin。

1.2.3 pAdTrack-survivin穿梭质粒的鉴定 酶切鉴定:分别对重组pAdTrack-survivin穿梭质粒和空载体pAdTrack-CMV进行*Kpn* Ⅰ和*Xhol* Ⅰ双酶切,1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR鉴定:分别以重组质粒和空载体为模板,用前面合成的上下游引物进行PCR扩增,产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。测序鉴定:为确保重组质粒pAdTrack-survivin中插入序列及读码框架的正确性,送交上海申友公司进行测序鉴定。

1.2.4 pAdTrack-pAdeasy-1-survivin同源重组 将正确重组的pAdTrack-survivin穿梭质粒用*Pme* Ⅰ酶切线性化,转化包含腺病毒骨架质粒pAdeasy-1的感受态BJ5183菌。卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆,扩增培养,提纯质粒。鉴定成功的重组子再次转化超级感受态XL10-GOLD,筛选阳性克隆并提取纯化,得到survivin的重组腺病毒质粒。设置阴性对照组为空载体pAdTrack用*Pme* Ⅰ酶切线性化后与pAdeasy-1同源重组。

1.2.5 pAd-survivin的鉴定 酶切鉴定:用*Pac* Ⅰ分别酶切腺病毒骨架质粒pAdeasy-1及pAd-survivin;0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR鉴定:分别以pAdeasy-1和pAd-survivin为模板,用前面合成的上下游引物进行PCR扩增,产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 重组人survivin腺病毒的包装 ①293细胞的培养:含10%胎牛血清的L-DMEM培养基,37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养。转染时细胞应融合至70%~80%。②重组腺病毒转染293细胞:重组质粒pAd-survivin用*Pac* Ⅰ酶切线性化,经Lipofectamine™ 2000介导转染6孔培养板中的293包装细胞,37 ℃,5% CO_2 培养箱中孵育,7~12 d后可观察到细胞病变效应(cytopathieffect, CPE),并可在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。上清加入293细胞中继续感染。③重组腺病毒的提取鉴定:收集病变的293细胞及培养液,按上述方法反复冻融3次,离心,上清加入1 mg蛋白酶K、2 ml 1%SDS、10 mmol/L EDTA和20 mol/L Tris HCl消化2 h。离心取上清,酚氯仿抽提无水乙醇沉淀,获得的病毒DNA加入survivin上下游引物进行PCR鉴定。④重组腺病毒的滴度测定[6]:将鉴定为正确重组的病毒扩增,收集细胞裂解上清,滴度检测采用流式细胞法:在感染培养出现荧光后2 d,通过绿色荧光蛋白表达送流式细胞检测。

1.2.7 survivin蛋白的表达 按Sallusto等[7]提供方法,培养树突状细胞,通过光镜、扫描电镜以及流式细胞检测DCs表面标记物,判断DCs诱导培养情况。在培养第6天将重组人survivin腺病毒转染未成熟树突状细胞,通过绿色荧光蛋白的表达,以及Western blot分析鉴定人survivin蛋白有表达,说明survivin重组腺病毒构建成功,能够成功转染靶细胞。

2 结果

2.1 pAdTrack-survivin穿梭质粒的鉴定

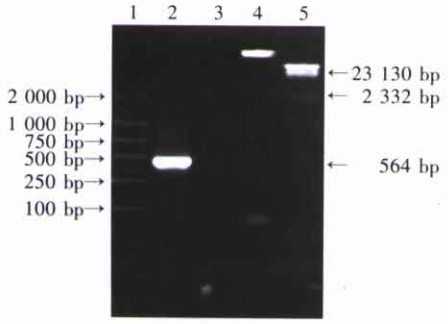
酶切鉴定:分别对重组pAdTrack-survivin穿梭质粒和空载体pAdTrack进行*Kpn* Ⅰ和*Xhol* Ⅰ双酶切,前者得到约425 bp和8.0×10^3的两个片段,与插入的目的片段大小一致;PCR鉴定:分别以重组质粒和空载体为模板,用合成的上下游引物进行PCR扩增,得到大约425 bp的目的片段,产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。测序鉴定:为确保重组质粒pAdTrack-survivin中插入序列及读码框架的正确性,送交上海申友公司进行测序鉴定。所得测序结果与GenBank文献报道一致。

2.2 pAd-survivin的鉴定

酶切鉴定:用*Pac* Ⅰ分别酶切腺病毒骨架质粒pAdeasy-1及pAd-survivin;后者得到30×10^3和4.5×10^3两个片段;PCR鉴定:分别以pAdeasy-1和pAd-survivin为模板,用前面合成的上下游引物进行PCR扩增,产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳观察大约425 bp左右(图1)。

2.3 重组人survivin腺病毒的包装

用*Pac* Ⅰ线性化pAd-survivinDNA转染HEK293细胞,培养1周后出现细胞呈空泡样病变,并逐渐呈悬浮生长(cytopathieffect, CPE)。并可见绿色荧光蛋白GFP的表达,将出现CPE的病毒上清再次感染HEK293细胞,收集细胞沉积物经PCR扩增,出现1条425 bp的特异性带(为插入的survivincDNA片段),与阳性对照一致,故确定为阳性克隆。将重组腺病毒在HEK293细胞中大量扩增后,收集含病毒的培养上清,反复冻融后分装,贮存于-80 ℃备用。



1: DNA Marker DL2000; 2: Product of PCR; 3: Control product of PCR; 4: Plasmid of recombinant pAd-survivin; 5: λ/*Hind* Ⅲ DNA Marker

图 1　重组 pAd-survivin 质粒，AdTrack-空载体及其 PCR 产物

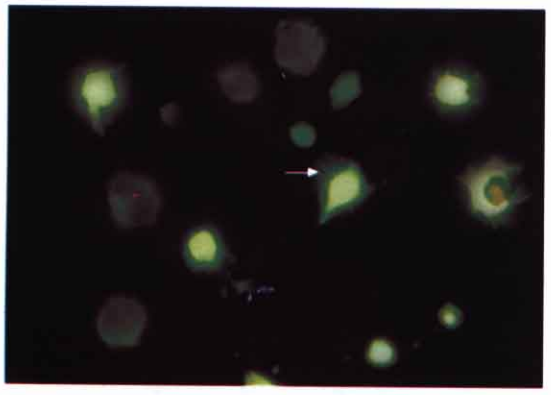
Fig 1　Electrophoretic results of recombinant pAd-survivin plasmid, control and product of PCR

2.4　重组腺病毒的滴度测定

计算公式：病毒滴度(PFU/ml) = 绿色荧光蛋白阳性细胞数(感染后 24 h) × 稀释倍数/感染用体积数(ml)[7]。本次实验单孔细胞计数为 8.25×10^5，根据 FCM 的检测结果，计算病毒滴度为：$8.25 \times 10^5 \times 100 \div 0.5 = 1.65 \times 10^8$ PFU/ml。

2.5　树突状细胞培养及鉴定

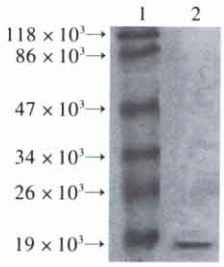
在诱导培养树突状细胞过程中，第 5 天在光镜下即可见细胞呈半悬浮生长，胞膜向外延伸出树枝状突起。第 10 天，此类细胞明显增多。诱导 DCs 到第 10 天，表型检测 $CD1a^+$ 细胞占(25 ± 2.31)%，CD83 细胞占(63 ± 3.31)%，CD80 细胞占(56 ± 1.86)%，HLA-DR 表达占(89 ± 3.25)%，均较各自对照组明显增多。CD1a 为人 DCs 的主要特征性标志；成熟的 DCs 表面 HLA-DR 分子表达上调；扫描电镜观察，胞浆突起形成典型的树枝状，并可见 DCs 的粗糙表面和层叠状的皱襞。重组腺病毒感染树突状细胞，在感染后第 3 天可见绿色荧光蛋白表达，并可见典型的树枝状突起(图 2)；通过 Western bolt 检测 survivin 蛋白表达，在 19×10^3 附近可见明显条带约 16.5×10^3，与 survivin 蛋白分子量吻合(图 3)。



↑: Processes around dendritic cells

图 2　重组腺病毒转染 DCs 绿色荧光蛋白的表达　(倒置荧光显微镜 × 200)

Fig 2　Expression of GFP in the dendritic cells　(Invert fluorescence microscope × 200)



1: Marker; 2: survivin protein

图 3　survivin 蛋白表达

Fig 3　Expression of survivin protein

3　讨论

survivin 基因是一种新的抗凋亡基因，是凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员，它表达于许多人类常见肿瘤组织，成人正常组织几乎不表达，在抑制细胞凋亡及肿瘤的发生、发展中起关键性作用，靶向 survivin 治疗可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖，对正常组织几乎没有不良影响因而成为备受关注的抗肿瘤治疗的新靶点[4,5,8]。本研究通过对 pCITE-2a(+)/ survivin 质粒的扩增，用 PCR 技术成功获得正确序列的人 survivin 基因片段。对研究人 survivin 基因作为肿瘤靶抗原转入 DC 细胞构建 DC 疫苗奠定基础。

将 survivin 抗原基因通过腺病毒载体成功导入 DC，可使抗原高表达并刺激机体产生有效的免疫应答，这将更有利于诱导有效的抗肿瘤免疫反应，能在 DC 内高表达肿瘤抗原，由 MHC Ⅰ类途径得到充分递呈，从而产生极强的免疫激发能力；它能克服抗原直接刺激的 DC 由于抗原 MHC 复合物解离或细胞 MHC 分子降解对其诱导 T 细胞免疫应答所产生的不利影响。采用基因转染的疫苗不需预先知道反应细胞的 MHC 单倍型或相关 MHC 限制性肽表位，单一抗原基因转染的 DC 可刺激多个宿主 MHC 位点限制的抗原特异性 CTL 反应，使机体抗肿瘤作用增强。

实验所使用腺病毒 AdEasyXL™ 系统，其骨架质粒 pAd-Easy1 (氨苄青霉素抗性)带有病毒的大部分基因组，已经被转化到 BJ5183 细胞即 BJ5183-AD-1 中，该特性显著降低了由于非重组穿梭质粒所引起的背景，使其更容易获得含有重组腺病毒质粒的克隆。另外，穿梭质粒 pAdTrack(卡那霉素抗性)具有左右臂同源区，借助 *E. coli* BJ5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选，可以在很短的时间内得到重组腺病毒质粒。再用人工创建的 *Pac* Ⅰ酶切去此质粒上的 ori 和卡那霉素抗性基因，暴露其反省末端重复 ITRs 序

列，即可用来转染适当的包装细胞如293或911细胞，得到表达外源基因的重组腺病毒，该方法简化了实验步骤，缩短了载体构建周期。

实验成功构建了携带人survivin基因的重组腺病毒载体，并获得了较高的病毒滴度，这对利用构建的重组腺病毒转染树突状细胞，希望能在靶部位获得长期而高效的表达，达到携带肿瘤抗原基因的目的奠定了基础。

参考文献：

[1] Zeis M, Siegel S, Wagner A, *et al*. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells[J]. J Immunol, 2003, 170(11): 5391－5397.

[2] Heiser A, Maurice M A, Yancey D R, *et al*. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-Cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3388－3393.

[3] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917－921.

[4] Altieri D C. Validating survivin as a cancer therapeutic target[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(1): 46－54.

[5] Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, *et al*. Generation of survivin specific CD8-T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides[J]. Cancer Res, 2000, 60(17): 4845－4849.

[6] 张 华，寿成超. 人源分泌型血管内皮细胞生长因子受体flt-1(Ⅰ～Ⅳ区)的基因克隆及其腺病毒载体的构建和表达[J]. 生物化学与生物物理进展，2002，29(4)：625－630.

[7] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. Exp Med Volume, 1994, 179(4): 1109－1118.

[8] Olie R A, Simoes Wust A P, Baumann B, *et al*. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2805－2809.

(编辑 薛国文)

(上接820页)

表1 对肝匀浆MDA、GSH、TG含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别($n=12$)	MDA (nmol/g)	TG (mmol/g)	GSH (μmol/g)
阴性对照组	0.99±0.22	1.55±0.33	1.92±0.30
模型对照组	2.31±0.29##	1.95±0.33##	0.95±0.31##
88 (mg/kg)	1.63±0.39**	1.69±0.21*	1.64±0.32**
175 (mg/kg)	1.49±0.21**	1.54±0.33**	1.75±0.32**
350 (mg/kg)	1.36±0.27**	1.50±0.19**	1.86±0.52**

与阴性对照组比较，##：$P<0.01$；与模型组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

2.2 肝脏组织脂肪染色评分结果

表2 大鼠肝脏组织病理学检查结果($\bar{x} \pm s$)

组别($n=12$)	阴性对照组	模型对照组	88 (mg/kg)	175 (mg/kg)	350 (mg/kg)
脂肪染色得分	0.42±0.51	3.00±0.74##	2.13±1.11*	2.11±0.83*	2.08±0.72*

与阴性对照组比较，##：$P<0.01$；与模型组比较，*：$P<0.05$

由表2可见：受试物各剂量组肝细胞脂肪变性评分较模型对照组显著性降低($P<0.05$)，说明能减轻急性乙醇中毒导致的肝细胞脂肪变性和细胞内的脂滴沉积。

3 讨论

乙醇是一种典型的肝毒物质，短时和长期大量摄入都会导致肝损伤作用。乙醇大量进入机体后可被脱氢氧化为乙醛和乙酸盐，导致三羧酸循环障碍和脂肪酸氧化减弱，使脂肪在肝细胞中沉积，同时血清中TG也明显升高。乙醛和乙醇代谢过程能导致氧化应激和脂质过氧化，同时消耗肝细胞的GSH和维生素E等抗氧化剂。此外，还有报道在乙醇性肝损伤动物模型和人类乙醇性肝病中发现其肝组织和血清肿瘤坏死因子-α等细胞因子明显增加[2]。不少研究表明，乙醇诱发急性肝损伤模型以肝和血中的某些化学指标改变为其主要特征，如MDA和TG显著升高、GSH明显降低、肝组织脂滴显著增加等，而血清转氨酶和肝组织结构改变却不明显[3]。

研究对乙醇性肝损伤有保护作用的药剂和保健食品是近年来备受关注。葛根是我国传统的解酒中药之一，研究认为其主要有效成分是葛根素的主要作用方式是清除自由基和抗氧化[4]。哺乳动物胚胎及幼仔肝脏用物理方法分离的低分子提取物能促进肝细胞DNA合成，加快肝细胞再生，文献[5]报道牛肝提取物对四氯化碳诱发小鼠急性肝损伤有保护作用。而羊肝提取物和葛根素对大鼠乙醇急性肝损伤的保护作用少见报道。我们选取了两者的混合物为主要原料，开发成胶囊剂以期作为一种对乙醇性肝损伤有保护作用的保健食品。实验结果表明该护肝胶囊能使乙醇诱发的急性肝损伤大鼠的脂肪代谢异常明显减轻并缓解乙醇造成的过氧化作用。而各项相关毒理实验也表明其安全性良好，具有深入开发应用的价值，其对慢性乙醇性肝损伤的保护作用也值得研究。

关键词：乙醇；急性肝损伤；护肝胶囊

中图法分类号：R975.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张会香，刘邻渭，杨世军. 解酒药剂及保健食品的研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2002，14(2)：83－86.

[2] Kishore R, Hill J R, McMullen M R, *et al*. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-α production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(1): G6－G15.

[3] 唐云安，刘玉清，王国钦. 肝损伤动物模型研究进展[J]. 卫生毒理学杂志，2002，16(4)：236－238.

[4] 宋浩亮，陈上林，黄梦雨，等. 葛根素对酒醉小鼠行为学及抗氧化作用的研究[J]. 现代中药研究与实践，2003，17(3)：36－37.

[5] 陈冠敏，黄宗锈，何 聆，等. 牛肝提取物对四氯化碳诱发小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 卫生毒理学杂志，2001，15(3)：189－190.

(编辑 栾 嘉)