文章编号:1000-5404(2006)21-2135-03

论著

鼠ICOSIg融合蛋白腺病毒的制备及其对胰岛细胞系NIT-1的感染

许雪青[1],王 丰[2],陈雪丹[1],熊加祥[1],段文元[1],白 云[1] (第三军医大学:[1]医学遗传学教研室,[2]西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 制备mICOSIg腺病毒,研究其对胰岛细胞系NIT-1的感染情况,及可否使后者正确表达分泌mICOSIg。**方法** 从pMIG-ICOSIg质粒上切下ICOSIg融合蛋白的表达框,插入pAdtrack-CMV中构建腺病毒穿梭质粒pAdmICOSIg,在Adeasy-1大肠杆菌中进行同源重组,随后转染293细胞进行病毒颗粒包装。收集病毒后感染NIT-1细胞,用免疫印迹证实mICOSIg在NIT-1细胞中的正确分泌表达。**结果** ICOSIg编码框被正确构建到pAdtrack-CMV中,并经测序证实无误。目的病毒成功包装出来,并能有效感染胰岛细胞系NIT-1,免疫印迹证实培养上清中存在正确大小的mICOSIg融合蛋白。**结论** 成功制备了mICOSIg腺病毒,该病毒能有效将mICOSIg转入胰岛细胞系NIT-1,并能准确分泌mICOSIg蛋白。为研究1型糖尿病中ICOS信号通路在T细胞破坏胰岛细胞中的作用提供了有效的研究手段。

关键词:ICOS;腺病毒;胰岛细胞
中图法分类号:R322.57;R373;R394-33 **文献标识码**:A

Construction of recombinant adenovirus expressing mouse ICOSIg and its infection to NIT-1 islet cells

XU Xue-qing[1], WANG Feng[2], CHEN Xue-dan[1], XIONG Jia-xiang[1], DUAN Wen-yuan[1], BAI Yun[1] ([1]Department of Medical Genetics, College of Medicine, [2]Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the adenovirus that expresses mouse ICOSIg (mICOSIg, mouse ICOS mouse IgG fusion protein) and study its ability to infect NIT-1 cells to secret mICOSIg. **Methods** The ICOSIg fragment was cut off from pMIG-ICOSIg and cloned into pAdtrack-CMV. After homologous recombination in Adeasy-1 cells, the adenovirus vector was transfected into 293 packing cells. The packed virus was harvested and used to infect NIT-1 islet cells. The secretion of mICOSIg was identified with Western blotting. **Results** The mICOSIg fragment was correctly inserted into pAdtrack-CMV, and the virus titer was 2.3×10^{10}. The AdmICOS virus infected NIT-1 cells well with MOI = 50, and mICOSIg was successfully secreted in infected NIT-1 cells. **Conclusion** The AdmICOS adenovirus was successfully constructed and infected NIT-1 islet cells well. mICOSIg could be secreted successfully by infected NIT-1 islet cells.

Key words: ICOS; adenovirus; islet cells

T淋巴细胞活化及特异性细胞免疫应答的产生及维持不仅需要MHC-肽复合物提供的特异性信号,还必须有APC表面分子提供的共刺激信号。这些共刺激信号在动态的T细胞应答的不同阶段,通过刺激或抑制的方式调节T细胞的功能和效应,ICOS(inducible costimulate,诱导共刺激分子)是CD28家族的1个成员,被TCR信号诱导后局限表达于活化的T细胞膜上。ICOS作用于免疫应答的效应和记忆阶段,对已经受到抗原刺激的免疫细胞扩增、迁移、释放效应性细胞因子都具有重要的影响[1]。效应T细胞和记忆T细胞的功能发挥和维持依赖于ICOS的共刺激信号,以ICOS途径为靶点的免疫调节对自身免疫性疾病和移植免疫的长期耐受形成均有着重要的临床治疗意义[2]。

1型糖尿病(type 1 diabetes,T1D)是1种自身免疫性疾病,T细胞对β细胞的特异性杀伤是T1DM发生的直接原因[3]。而鉴于ICOS信号对T细胞功能的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300170)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300170)
作者简介:许雪青(1979-),男,湖北省荆门市人,博士研究生,主要从事细胞免疫以及免疫耐受方面的研究。电话:(023)68753670,E-mail:buyi.chu@gmail.com
通讯作者:白 云,电话:(023)68753670,E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-12-28;**修回日期**:2006-01-19

重要意义，调控 ICOS 信号通路可能可以缓解 T 细胞对 β 细胞的杀伤。为了调控 ICOS 信号通路，我们构建、制备了 mICOSIg 腺病毒，研究其对胰岛细胞系 NIT-1 的感染进而 NIT-1 分泌 ICOSIg 的情况，以期为调控 ICOS 信号通路提供良好的干预手段。

1 材料与方法

1.1 酶、细胞株、质粒

pAdEasy 系统（美国 Howard Hughes 医学研究所 TongChuan He 教授惠赠），pMIG-mICOSIg 质粒为本室构建，*Bgl* Ⅱ、*Xba* Ⅱ、*Bam*H Ⅰ、*Pac* Ⅰ和 *Pme* Ⅰ为 NEB 公司产品，T_4 连接酶购自 MBI 公司。DMEM 培养基、Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司。鼠 ICOS 单克隆抗体（clone 7E. 17EG，为 eBioscience 公司产品）。质粒抽提、胶纯化回收试剂盒及相关 DNA 分子标准为北京天为时代公司产品。胰岛细胞系 NIT-1 为武汉华中科技大学同济医学院沈关心教授馈赠，293 细胞为本室保种。

1.2 mICOSIg 穿梭质粒的构建以及鉴定

质粒小量抽提试剂盒抽提 pMIG-mICOSIg 质粒，*Bam*H Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切质粒，胶纯化回收试剂盒回收纯化约 1 300 bp 的目的片段。然后将其利用 T4DNA 连接酶连入 *Bgl* Ⅱ 和 *Xba* Ⅰ双酶切后的 pAdtrack-CMV 载体，转化 XL1-Blue 感受态菌，利用卡那霉素和四环素平板筛选。挑取单个菌落用 LB 培养基扩增，抽提质粒后用 *Bgl* Ⅱ 和 *Xba* Ⅰ双酶切验证。鉴定正确的菌送上海英骏公司测序验证。

1.3 mICOSIg 穿梭质粒在 Adeasy-1 细菌内同源重组以及鉴定

*Pme*I 酶切测序正确的 mICOSIg 穿梭质粒，将其转化到常规氯化钙法制备新鲜的 Adeasy-1 感受态细菌中，进行细菌内同源重组，利用氨卞青霉素和卡那霉素筛选，抽提质粒后用 *Bgl* Ⅱ酶切鉴定，挑取初步正确的克隆送上海英骏公司测序。

1.4 重组 mICOSIg 腺病毒的包装及滴度测定

将测序正确的同源重组子用 *Pac* Ⅰ酶切后，胶回收。参照试剂说明书，利用 Lipofectamine™2000 将酶切回收后的同源重组子转染到培养于 10% 小牛血清的 DMEM 中的 293 细胞中。10 d后，约 90% 细胞均发绿色荧光，收集细胞，PBS 洗 1 遍后，-20 ℃和 37 ℃反复冻融 4 次裂解细胞。收集上清，并继续感染 293 细胞以大量扩增病毒。经过 8 次扩增后，加入 10% 的甘油，分装保存于 -80 ℃。病毒的滴度测定按照文献用 GFP 阳性细胞计数法进行。

1.5 病毒感染效率的测定

将 NIT-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中，按 1×10^6 浓度接种于 24 孔板中。37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养 6 h 后，分别加入感染复数（MOI）为 10、50、100、200 的病毒上清，24 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞比例。

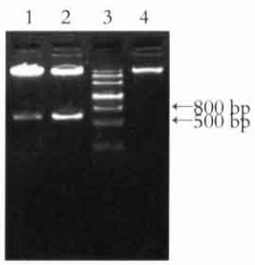
1.6 NIT-1 感染 mICOSIg 病毒后 ICOSIg 的表达分泌情况

将制备好了的 AdmICOSIg 病毒按 50 的感染复数加入培养中的 NIT-1 细胞，72 h 后收集上清。利用 PEG8000 透析、浓缩 50 倍。利用抗鼠 ICOS 特异性单抗通过 Western blot 检测上清中 mICOSIg 的分泌表达。

2 结果

2.1 pAdtrack-CMV/mICOSIg 穿梭质粒的构建和鉴定

利用 *Bgl* Ⅱ和 *Bam*H Ⅰ是同尾酶，将约 1 300 bp 大小的 mICOSIg 阅读框利用酶切连接的方法克隆到 pAdtrack-CMV 穿梭质粒中。利用 mICOSIg 阅读框中存在的 1 个 *Bgl* Ⅱ位点，通过 *Bgl* Ⅱ和 *Xba*I 双酶切切下一条 700 bp 左右的片断来鉴定克隆后的可疑重组子。酶切结果如图 1，与预期符合。进一步测序分析，结果与预期序列一致（测序图略）。

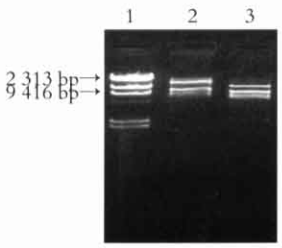


1，2：*Bgl* Ⅱ和 *Xba* Ⅰ双酶切 pAdTrack-CMV/mICOSIg；3：DNA 分子量标准 Ⅲ；4：*Bgl* Ⅱ和 *Xba* Ⅰ酶切空的 pAdtrack-CMV 载体

图 1 pAdTrack-CMV/mICOSIg 的 *Xba* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切鉴定

2.2 pAdtrack-CMV/mICOSIg 穿梭质粒在 Adeasy-1 细菌内与 Adeasy-1 重组后的酶切鉴定结果

利用 mICOSIg 阅读框中存在的一个 *Bgl* Ⅱ位点，通过 *Bgl* Ⅱ单酶切，重组后的载体切出的最大片段为 7 466 bp 左右，而重组前的应为 10 625 bp 左右，从而将原始 Adeasy-1 和重组后的 Adeasy-1 质粒区分开来，见图 2。

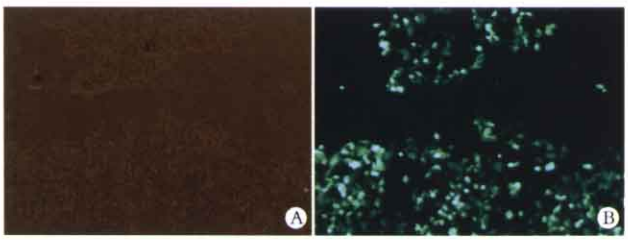


1：λDNA/*Hind* Ⅲ DNA 标准；2：*Bgl* Ⅱ酶切后的 Adeasy-1 质粒；3：*Bgl* Ⅱ酶切后的重组 pAdtrack-CMV/mICOSIg 载体

图 2 pAdtrack-CMV/mICOSIg 在 Adeasy-1 细菌中重组后的酶切鉴定

2.3 重组腺病毒的包装和滴度测定

将 *Pac* Ⅰ线性化后的同源重组病毒载体转染 293 包装细胞后，24 h 即可观察到少量细胞有绿色荧光蛋白的表达，10 d 后细胞间出现裂隙，变圆，变大，在荧光显微镜下约有 90% 细胞表达绿色荧光蛋白，提示出现细胞病变效应。将第 3 代细胞裂解后的上清加入扩大培养的 293 细胞中，24 h 后即可看到大量细胞发绿色荧光（图 3）。提示细胞裂解上清中存在具有感染能力的病毒颗粒。利用 GFP 计数的方法，测定病毒滴度为 2.3×10^{10} pfu/ml。



A：可见光显微镜；B：荧光显微镜

图 3　绿色荧光显微镜观察 24 h 后病毒感染 293 细胞结果　（×200）

2.4　AdmICOS 腺病毒对 NIT-1 感染效率的测定

分别加入感染复数（MOI）为 10、50、100、200 的病毒上清，24 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞比例。MOI 为 10 的 GFP 阳性细胞较少约为 10%，而 MOI 为 50 的 GFP 阳性细胞约为 80%。

2.5　被 AdmICOS 腺病毒感染后的 NIT-1 细胞表达分泌 mICOSIg

用 MOI 为 50 的病毒感染 NIT-1 细胞后，上清浓缩 50 倍后，利用 ICOS 特异性抗体进行免疫印迹分析（图 4）。



1，2：感染 AdmICOSIg 后的 NIT-1 培养上清；3：感染 AdEGFP 对照后的 NIT-1 培养上清

图 4　WB 检测病毒感染后 NIT-1 分泌的 mICOSIg

3　讨论

TIDM 是由自身免疫紊乱引起的糖尿病，其发病过程表现为两个阶段：首先是多种因素引起炎症因子的分泌，导致局部淋巴细胞浸润，引起胰腺炎；随后发展为自身耐受被打破，活化后的 CD4T 和 CD8T 细胞攻击自身 β 细胞，引起 β 细胞大部分死亡，导致胰岛素分泌不足，血糖浓度过高而引起糖尿病。T 细胞对 β 细胞的特异性杀伤是 TIDM 发生的直接原因[3]。通过调节 1 型糖尿病中的免疫反应来缓解胰岛细胞的死亡一直是治疗 1 型糖尿病的 1 个研究热点[4]。

ICOS 是 CD28 家族的第 3 个成员，诱导性表达于活化的 T 细胞和记忆性 T 细胞。ICOS 作用于免疫应答的效应和记忆阶段，对已经受到抗原刺激的细胞的扩增、迁移到炎症部位、释放效应性细胞因子都具有重要的影响[5]。此外 ICOS 途径能上调 T 细胞表面多种趋化因子受体的表达，并且能促进 CD40L 的表达，间接增强 CD40-CD40L 途径的免疫活化效应[6]。这些研究提示效应 T 细胞和记忆 T 细胞的功能发挥和维持依赖于 ICOS 的共刺激信号。

在 1 型糖尿病的动物模型中，胰腺组织有大量的淋巴细胞浸润，大量的活化后 T 细胞持续破坏胰岛细胞。基于 ICOS 的功能特点和 1 型糖尿病的病理特点，ICOS 信号可能参与了 1 型糖尿病的病程。为了深入研究 ICOS 共刺激通路在 1 型糖尿病中的作用，要求我们能有效干扰 ICOS 途径。目前干扰配受体之间相互作用的手段主要有抗体、反义 RNA、可溶性融合蛋白和最近出现的 RNAi 技术。可溶性融合蛋白是一种在蛋白质水平上发挥作用的可靠、有效的干预手段[7]。NIT-1 是来源于 NOD 小鼠胰岛细胞的永生细胞系，由于 NOD 小鼠是研究 1 型糖尿病的良好动物模型，NIT-1 细胞亦被认为是体外研究胰岛细胞和免疫细胞相互作用的难得细胞模型。在本实验中，我们构建了 ICOSIg 融合蛋白的腺病毒表达载体并制备了 ICOSIg 融合蛋白腺病毒，研究了其对胰岛细胞系 NIT-1 的感染效率，并证实其能有效的促使 NIT-1 细胞表达分泌 mICOSIg，为进一步深入研究其在 T 细胞杀伤胰岛细胞过程中的作用打下基础。

pAdEasy 系统是一种有效的细菌内高效同源重组载体系统，与传统的重组腺病毒载体相比克服了周期长、步骤繁杂、效率低等不足，不再进行真核细胞内同源重组和噬斑筛选，使操作过程大大简化[8]。为此我们将 mICOSIg 的表达框引入 pAdeasy 系统，制备 mICOSIg 的腺病毒，既可以直接用病毒感染 NIT-1 等目的细胞来发挥 mICOSIg 的作用，又可以用病毒感染 CHO 等工程细胞，通过纯化工程细胞表达分泌的 mICOSIg 蛋白，用蛋白来发挥阻断 ICOS 信号通路的作用。我们的研究为调节 ICOS 信号通路进而研究 ICOS 功能提供了有效、灵活的手段。

参考文献：

[1] GREENWALD R J, FREEMAN G J, SHARPE A H. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 515 - 548.

[2] ZHENG Y, JOST M, GAUGHAN J P, *et al*. ICOS-B7 homologous protein interactions are necessary for mercury-induced autoimmunity [J]. J Immunol, 2005, 174(5): 3117 - 3121.

[3] MATHIS D, VENCE L, BENOIST C. beta-Cell death during progression to diabetes[J]. Nature, 2001, 414(6865): 792 - 798.

[4] SERREZE D V, CHEN Y G. Of mice and men: use of animal models to identify possible interventions for the prevention of autoimmune type 1 diabetes in humans[J]. Trends Immunol, 2005, 26(11): 603 - 607.

[5] DONG C, JUEDES A E, TEMANN U A, *et al*. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function[J]. Nature, 2001, 409(6816): 97 - 101.

[6] KHAYYAMIAN S, HUTLOFF A, BUCHNER K, *et al*. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4 + T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(9): 6198 - 6203.

[7] CHAPOVAL A I, ZHU G, CHEN L. Immunoglobulin fusion proteins as a tool for evaluation of T-cell costimulatory molecules[J]. Mol Biotechnol, 2002, 21(3): 259 - 264.

[8] HE T C, ZHOU S, DA-COSTA L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

（编辑　周　芳）