论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1042-04

天然抗菌多肽 elafin 重组腺病毒载体构建及气道上皮细胞表达

杜先智,周向东 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

提 要:目的 构建天然抗菌多肽 elafin 基因高效表达载体——重组腺病毒载体,并探讨其在肺上皮细胞中的初步表达。**方法** 提取人肺总 RNA,进行 elafin 基因逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增,PCR 产物双酶切后亚克隆至穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上;在 BJ5183 细菌内和 pAdEasy-1 同源重组,筛选阳性克隆,酶切、PCR 及测序鉴定,*Pac* Ⅰ酶切线性化后脂质体法转染 293 细胞进行包装,获得腺病毒载体 Ad-elafin;继之在 293 细胞内扩增,利用报告基因荧光蛋白(GFP)监测病毒滴度和感染效率;重组腺病毒 Ad-elafin 转染原代培养的气道上皮细胞,24 h 后荧光显微镜观察 GFP 表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测培养上清液中 elafin 的含量。**结果** 测序、酶切及 PCR 证实天然抗菌多肽 elafin 基因重组腺病毒载体 Ad-elafin 构建成功,同时转染气道上皮细胞 24 h 后荧光显微镜可见 GFP 的表达,且转染组细胞上清液中 elafin 测定值为(2.4±0.4)ng/ml 与对照组(1.9±0.3)ng/ml 相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** elafin 基因重组腺病毒载体成功构建,有利于 elafin 生物特性的研究。

关键词:elafin;腺病毒;气道上皮细胞

中图法分类号:R322.35;R341.6;R394-33 **文献标识码**:A

Construction of recombinant adenovirus vector Ad-elafin for nature antibiotic elafin gene and its expression in primary airway epithelium

DU Xian-zhi, ZHOU Xiang-dong (Department of Respiratory Diseases, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant adenovirus for nature antibiotic elafin protein and observe its expression in primary airway epithelia. **Methods** The elafin gene was amplified by RT-PCR from lung tissues, then the fragment was inserted into the multiple clone site of pAdTrack-CMV. The linearized shuttle plasmid was homogenously recombined with AdEasy-1 in BJ5183. The candidate clone was further analyzed by restriction endonuclease digestion, PCR, and sequencing. Then the recombinant adenovirus plasmid was digested with *Pac* Ⅰ and transfected into 293 cells for packaging and amplification. Infection titer and rate were monitored by green fluorescent protein (GFP) expression. Finally the primary airway epithelium was infected with Ad-elafin, and the GFP expression was observed by fluorescence microscope in epithelial cells 24 h after transfection. The elafin protein was detected by ELISA in the supernatant. **Results** Restriction endonuclease and PCR confirmed that elafin gene was cloned into the adenovirus vector successfully. Twenty-four hours after transfection, the GFP expression was seen by fluorescence microscopy. The concentration of elafin protein was (2.2±0.4) ng/ml in supernatant of transfected group, while that of control group was (1.9±0.3) ng/ml, $P<0.05$. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector Ad-elafin was constructed successfully and can be helpful to research the characteristic of elafin.

Key words: elafin; adenovirus; airway epithelium

在慢性气道炎症性疾病的病理过程中,病原微生物和环境污染的理化因子首先对气道上皮直接或间接破坏,造成气道上皮完整性的丧失,小气道结构的重塑以及间质的破坏和损失[1],而后续发生的重要病理改变——气道黏液高分泌,是这类疾病慢性化、反复性的重要原因[2]。过多的气道黏液潴留有利于病原微生物在气道中长期定植和繁殖,导致气道微环境的恶化,使感染不易控制[3]。因此要阻止气道慢性炎症性疾病进行性发展,理想的方法是从抗菌和保护气道两方面着手,近年来国外研究表明支气管肺组织中存在一种小分子多肽 elafin,它具有双重作用,既有天然的抗

基金项目:重庆市应用基础研究(200332)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (200332)

作者简介:杜先智(1964-),男,四川省广安市人,博士,副教授,主要从事气道损伤与免疫方面的研究,发表论文 15 篇。电话:(023)63704597,E-mail:dxzdjy868@sina.com.cn

通讯作者:周向东,E-mail:ZXD999@263.net

收稿日期:2006-07-12;修回日期:2006-10-16

菌作用，又有保护气道上皮免受损伤因子破坏溶解的作用。本研究旨在构建天然抗菌多肽 elafin 重组腺病毒表达载体，并转染原代培养的气道上皮细胞，为进一步探讨 elafin 的生物学效应奠定技术基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　组织标本　肺组织源于重庆医科大学第一附属医院胸外科男性肺癌患者，年龄 50～70 岁，因肺癌而行肺组织切除的正常肺组织，置液氮保存，取部分组织经常规石蜡切片 HE 染色诊断为非癌组织。

1.1.2　质粒、菌株及细胞　AdEasy 腺病毒系统由美国芝加哥大学分子肿瘤中心 Tong-Chuan HE 教授惠赠；大肠杆菌 DH5α、人胚肾细胞 293，为重庆医科大学肝炎研究所保存。

1.1.3　主要试剂及工具酶　逆转录酶 MMLV 第 1 链合成试剂盒（上海生工生物工程公司），Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶、*Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、T_4 DNA 连接酶、DNA marker（TaKaRa 公司），*Pac* Ⅰ、*Pme* Ⅰ（NewEngland 公司），PCR 产物纯化试剂盒（Omega 公司），质粒抽提试剂盒（上海搏光生物科技有限公司），脂质体 Lipofectamine 2000（Invitrogen 公司），胎牛血清（Hyclone 公司），ELISA 试剂盒（武汉博士德生物公司），RPMI1640 为美国 Gibco 公司产品，由本所配制。DMEM-F12、胰蛋白酶（Sigma 公司），抗角蛋白免疫组化试剂盒（华美公司）。

1.2　方法

1.2.1　肺组织总 RNA 提取及浓度和纯度测定　肺组织置匀浆器，加入 Tripure 混匀后，静置 5 min；先后加入氯仿，异丙醇，室温下静置 5～10 min，4 ℃ 12 000 × *g* 离心 10 min；加入 75% 乙醇 1 ml 吹打洗涤沉淀物，4 ℃ 7 500 × *g* 离心 5 min，加入 DEPC 水 40 μl 溶解沉淀，60℃水浴箱中孵育 10～15 min；12% 琼脂糖加电泳缓冲液 1 × TAE，电压 85V，30 min。紫外分光光度计测定波长 λ = 260 nm 和 λ = 280 nm 的吸光度值；浓度值为 *D*(260) × 40 μg/100 μl；纯度由 *D*(260)/*D*(280) 值表示。

1.2.2　逆转录多聚酶链反应（RT-PCR）　将提取的肺组织总 RNA 按 MMLV 第 1 链合成试剂盒说明书操作合成 elafin 第 1 条链；根据 GenBank 所提供序列（67～420 bp），应用 Primer Premier5.0 软件设计上、下游引物：P1（上游）：5′-CGGTCGACATGAGGGCCAGCAGCTTCTTGAT-3′（下划线部分为 *Sal* Ⅰ酶切位点）；P2（下游）：5′-CGGATATCTCACTGGGGAACGAAACAGG-3′（下划线部分为 *Eco*RⅤ酶切位点）。引物序列由上海生工合成。PCR 反应条件为：50 μl 反应体系中引物终浓度为 10 pmol/L，10 mmol/L dNTP 4 μl，$MgCl_2$（25 mmol/L）4 μl，10 × PCR 缓冲液 5 μl，*Taq* DNA 合成酶（5 U/μl）0.5 μl，取反转录反应体系 2 μl 加入 PCR 反应体系中，轻轻混匀。94 ℃ 变性 45 s，61 ℃ 退火 45 s，72 ℃ 延伸 1 min，30 个循环，最后 72 ℃ 总延伸 10 min，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

1.2.3　PCR 产物的回收和纯化　参照 DNA 分子量 Marker 割取含目的 DNA 片段的琼脂糖块，放入 1.5 ml 的离心管中；按小量胶回收试剂盒说明书回收纯化目的 DNA，紫外分光光度仪按说明测定浓度（μg/ml）。

1.2.4　穿梭质粒 pAdTrack-CMV-elafin 的构建　以 *Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ分别酶切 pAdTrack-CMV 穿梭质粒及经纯化的 elafin 基因 PCR 产物，酶切产物经 T_4 DNA 连接酶连接后常规氯化钙法转化 DH5α 感受态菌，铺卡那霉素抗性 LB 平板，挑取阳性克隆，接种于卡那霉素抗性 LB 液体培养基中，37 ℃振摇过夜，次晨以快速法（酚/氯仿）提取质粒进行初步检测，选取可疑菌落应用小量质粒提取试剂盒提取质粒，从而得到 elafin 基因腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-elafin。

1.2.5　穿梭质粒的鉴定　①双酶切鉴定：用 *Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ对已构建的质粒进行双酶切鉴定，酶切反应体系：超纯水 6 μl、10 × H buffer 2 μl、质粒 DNA 10 μl、*Sal* Ⅰ 1 μl、*Eco*R Ⅴ 1 μl，总体积 20 μl，37 ℃ 水浴 3 h。②PCR 鉴定：以 pAdTrack-CMV-elafin 为模板，以 P1、P2 为引物行 PCR 扩增，扩增条件同 2。③测序鉴定：由上海生工对插入穿梭质粒的 elafin 基因片段进行测序鉴定。

1.2.6　BJ5183 菌内同源重组产生重组腺病毒质粒 pAd-elafin　参照文献[4]的方法进行。

1.2.7　将重组腺病毒质粒 pAd-elafin 转入 DH5α 细菌　由于重组质粒在 BJ5183 菌中拷贝数较低且不稳定，故需转入 DH5α 中进行扩增。

1.2.8　重组腺病毒质粒 pAd-elafin 酶切鉴定　BJ5183 细菌内同源重组后挑选可疑重组腺病毒质粒转化 DH5α 后，抽提质粒，进行 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，酶切反应体系：超纯水 12.3 μl、10 × NEB buffer 2 μl、质粒 DNA 5 μl、100BSA 0.2 μl、*Pac* Ⅰ 0.5 μl，总体积 20 μl，37 ℃ 水浴 3 h。

1.2.9　重组腺病毒 Ad-elafin 的包装　在含有 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 中培养 293 细胞。转染前 6 h 将 293 细胞接种于 25 ml 培养瓶中，使其于转染时融合度约为 50%；转染当天 *Pac* Ⅰ酶切重组腺病毒质粒 pAd-elafin 4 μg，乙醇沉淀后溶解于 30 μl 灭菌去离子水中；转染过程参照 Lipofectamine 2000 说明书，转染后将培养瓶重置于 37 ℃孵箱内孵育 4～6 h，于 4～6 h 后吸出含脂质体-重组腺病毒质粒混合物的培养基，加入 4 ml 新的 RPMI1640（100 ml/L FBS）培养基；应用 GFP 观察腺病毒生成情况，待细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）完全形成后，用细胞刮刮下细胞，加入 100 μl PBS 反复冻融细胞（共 4 次），离心留上清为粗制病毒液（crude virus liquid，CVL），－20 ℃ 保存；取 30～50 μl CVL 感染 293 细胞，以进一步扩增腺病毒。

1.2.10　重组腺病毒 Ad-elafin 的 PCR 鉴定　取 5 μl CVL，加 10 μl 蛋白酶 K，55 ℃ 1 h，煮沸 5 min，以 2 μl 为模板，分别以 P1、P2 为引物对 CVL 行目的基因 elafin 的 PCR 鉴定，同时对 pAdEasy-1 质粒鉴定[5]，引物设计序列为 P3：5′-CTGTGGACCGTGAGGATA-3′，P4：5′-TGTTGGGCATAGATTGTT-3′，扩增产物长度 759 bp，PCR 扩增条件：94 ℃ 预变性 3 min，94 ℃ 变性 30 s，51 ℃ 退火 40 s，72 ℃ 延伸 40 s，34 个循环，72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.11　重组腺病毒 Ad-elafin 的扩增、收集　参照文献[4]的方法进行。

1.2.12　重组腺病毒 Ad-elafin 的病毒滴度测定　将多次感染制备的病毒液作不同比例（$1:10^3$～$1:10^{11}$）稀释，将 100 μl 稀释液加至预先接种 293 细胞的 96 孔培养板中，37 ℃ 5% CO_2 孵箱中吸附 4～6 h，换新鲜培养基，继续培养 18～24 h 后于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数，选择 70%～80% 细胞被感染的孔，按下列公式计算病毒滴度：病毒滴度（pfu/ml）= GFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数/0.1 ml。

1.2.13 分离、培养人气道原代上皮细胞 参考秦晓群等[6]方法。

1.2.14 重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞，细胞上清液 elafin 相对含量的检测 气道上皮细胞按 2×10^3/孔接种 96 孔培养中，24 h 后用感染复数 250 的 Ad-elafin 感染，感染 24 h 荧光显微镜下观察 GFP 的表达。采用 ELISA 法检测孕育 24 h 后的细胞上清液 elafin 水平，抗 elafin IgG(1∶500)包被及后续步骤按 ELISA 试剂盒说明书操作，在 ELISA 检测仪上，于 450 nm 处，以空白对照孔调零后测各孔吸光度 $D(450)$ 值表示。与标准品制得的标准曲线比较而得到 elafin 蛋白的含量。

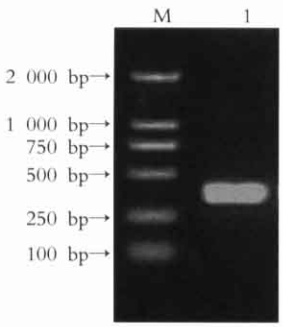
1.3 统计学处理

测定值均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 目的基因 elafin 的克隆

提取肺组织总 RNA 后，RT-PCR 扩增出片段约为 400 bp 的条带(图 1)，经测序为 377 bp 的基因 elafin。

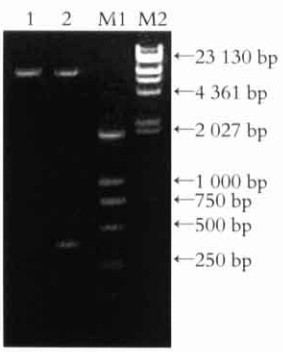


M：DNA 标准(DL 2000)；1：elafin 基因 RT-PCR 产物

图 1 elafin RT-PCR 电泳图

2.2 穿梭质粒的鉴定

2.2.1 重组穿梭质粒的双酶切鉴定 插入的 elafin 基因片段的理论长度为 377 bp，pAdTrack- CMV-elafin 经 *Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ双酶切后，电泳酶切片段，为一 9 kb 条带和约 400 bp 条带。表明重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-elafin 构建成功(图 2)。



M1：DNA 标准(DL 2000)；M2：DNA 标准(λDNA/*Hind* Ⅲ)；1：pAdTrack-CMV 双酶切产物；2：pAdTrack-CMV-elafin 双酶切产物

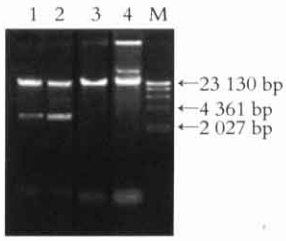
图 2 重组质粒 pAdTrack-CMV-elafin 的双酶切鉴定

2.2.2 PCR 鉴定重组穿梭质粒 以 P1、P2 为引物，以穿梭质粒 pAdTrack-CMV-elafin 为模板行 PCR，扩增出大小约为 400 bp 的目的片段，以空载体质粒 pAdTrack-CMV 为模板进行 PCR，未扩增出目的条带，表明重组质粒中成功插入了 elafin 基因。

2.2.3 测序鉴定重组穿梭质粒 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-elafin 由上海生工测序，证明插入片段为 elafin 基因，重组穿梭质粒构建成功。

2.3 重组腺病毒质粒 pAd-elafin 鉴定

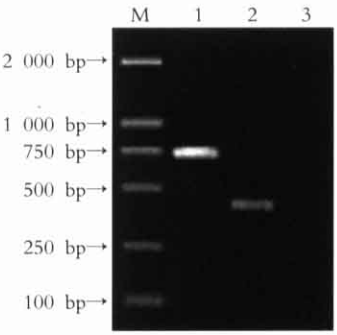
2.3.1 *Pac* Ⅰ酶切鉴定重组腺病毒质粒 pAd-elafin BJ5183 细菌内同源重组后挑选可疑重组腺病毒质粒转化 DH5α 后进行 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，0.8% 琼脂糖凝胶电泳出现 30 kb 和 3.0 kb 的 2 个片段，完全符合该同源重组的特点，表明腺病毒质粒同源重组成功(图 3)。



M：DNA 标准(λDNA/*Hind* Ⅲ)；1：*Pac* Ⅰ酶切重组腺病毒质粒 pAd-elafin；2：*Pac* Ⅰ酶切质粒 PAdTrack-CMV；3：*Pac* Ⅰ酶切质粒 pAdEasy-1；4：重组腺病毒质粒 pAd-elafin

图 3 重组腺病毒质粒酶切鉴定

2.3.2 PCR 鉴定重组腺病毒质粒 pAd-elafin 以 pAd-elafin 为模板，P1、P2 为引物扩增出约 400 bp 大小的目的基因 elafin 条带，P3、P4 对 pAdEasy-1 质粒为模板扩增产物长度 759 bp 的条带；而以空载体质粒 pAdTrack-CMV 为模板进行 PCR，未扩增出目的 elafin 条带，测序结果表明其为 elafin 基因(图 4)。



M：DNA 标准(DL 2000)；1：PCR 扩增 AdEasy-1 片段；2：elafin 基因；3：阴性对照

图 4 重组腺病毒质粒 pAd-elafin 的 elafin 和 AdEasy-1 PCR 鉴定

2.4 293 细胞内腺病毒产生 Ad-elafin

2.4.1 pAd-elafin 转染 293 细胞 GFP 的表达 *Pac* Ⅰ酶切重

组腺病毒质粒 pAd-elafin 使其线性化后脂质体转染 293 细胞，24 h 后在荧光显微镜下可见 GFP 的表达，随着时间的延长，GFP 逐渐增强，96 h 后，几乎 80% 的细胞呈 GFP 阳性。

2.4.2　重组腺病毒 Ad-elafin 病毒滴度　　转染 Ad-elafin 的 293 细胞在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数，选择 70% ~ 80% 细胞被感染的孔，根据 GFP 计数法得出腺病毒的滴度 2.2×10^{11} pfu/ml。

2.5　气道上皮细胞原代培养、转染 Ad-elafin 及上清液 elafin 相对含量

气道上皮细胞原代培养 5 d，见培养的上皮细胞呈单层生长、多边形，长满后呈“铺路石”样分布，经角蛋白抗体免疫组化证实为上皮细胞；Ad-elafin 转染 24 h 后，荧光显微镜下有 GFP 的表达，ELASA 检测细胞上清液 elafin 的含量为（2.4 ± 0.4）ng/ml，而对照组（未感染）为（1.9 ± 0.3）ng/ml，两者差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

3　讨论

elafin 具有抗炎、抗菌、抑制气道黏液高分泌、维护气道上皮完整性等方面的作用，既往对其 C 末端抗弹性蛋白酶（NE）的结合作用，N 末端通过共价铰连与细胞外基质（ECM）中的蛋白组分以及上皮细胞膜覆盖性连接，使 ECM 及上皮细胞免受 NE 的破坏溶解作用[7]研究较多。近年国外对其抗菌作用研究表明，elafin 在体外已显示出积极的抗革兰阴性、革兰阳性细菌、真菌[8]的特性，并有潜在的抗病毒 HIV-1 的抗微生物活性。Simpson 等[9]用腺病毒为载体的 elafin 基因转移到 C57/B16 小鼠，5 d 后气管内给予铜绿假单胞菌，给细菌后 24 h 处死动物，结果显示用 elafin 重组腺病毒处理，能够保护小鼠免受肺炎样损害。这一研究结果仅用 elafin 的抗蛋白酶活性保护机制来解释是不够的，因为 elafin 供给的抗蛋白酶活性低于 0.1%，而 elafin 的抗菌作用则部分解释了上述现象。目前 elafin 其抗菌作用主要针对铜绿假单胞菌的研究较多。

本研究以人肺总 RNA 为模板，用 RT-PCR 方法，成功扩增出了天然抗菌多肽 elafin 基因，DNA 序列测定表明，所扩增的片段的确是 elafin 基因片段，与 GenBank 所提供的基因序列完全一致。随后将 elafin 基因插入到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中，构建了能表达 elafin 基因的腺病毒穿梭质粒，经双酶切、PCR 扩增和测序鉴定，证实其插入片段为 elafin；再进一步成功构建了含有 elafin 基因的重组腺病毒载体 Ad-elafin，回收的病毒可重复感染 293 细胞，酶切、PCR 都证实了腺病毒载体 Ad-elafin 构建成功；同时将重组腺病毒 Ad-elafin 转染原代培养的气道上皮细胞，24 h 后在荧光显微镜下可见 GFP 的表达，同时细胞上清液中 elafin 测定结果显示转染组高于未转染组。这表明构建的天然抗菌多肽 elafin 重组腺病毒表达载体不仅能转染气道上皮细胞，而且 elafin 能在上皮细胞中表达并分泌到胞外。天然抗菌多肽 elafin 重组腺病毒表达载体 Ad-elafin 的成功构建和在靶细胞中实现目的基因 elafin 的表达和其蛋白的外分泌特性，为进一步研究 elafin 的生物学作用，如抗菌、抗炎、调控气道黏蛋白的分泌等具有积极的意义，特别是为控制慢性气道炎症性疾病的病原微生物感染奠定了一定的技术基础。

参考文献：

[1] Szilasi M, Dolinay T, Nemes Z, *et al*. Pathology of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Pathol Oncol Res, 2006, 12 (1): 52 - 60.

[2] Nadel J A. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies[J]. Chest, 2000, 117(5 Suppl 2): S386 - S389.

[3] Dwyer T M, Farley J M. Human neutrophil elastase releases two pools of mucinlike glycoconjugate from tracheal submucosal gland cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(4): L675 - L682.

[4] 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.

[5] 郭国宁，周　跃，张正丰. 成骨细胞特异性转录因子 Cbfa1 重组腺病毒的构建、纯化及表达[J]. 免疫学杂志，2005，21(2)：150 - 154.

[6] 秦晓群，孙秀泓，张长青. 联合应用酶消化和机械刷洗提取气道上皮细胞的实验技术[J]. 湖南医科大学学报，1999，24(1)：74 - 76.

[7] Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S. The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core[J]. Biochem J, 1999, 340 (Pt 3): 569 - 577.

[8] McMichael J W, Roghanian A, Jiang L, *et al*. The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(5): 443 - 452.

[9] Simpson A J, Wallace W A, Marsden M E, *et al*. Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection[J]. J Immunol, 2001, 167 (3): 1778 - 1786.

（编辑　陈聪连）