论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0806-04

重组VIP腺病毒载体的构建及其在293细胞的表达

宋 敏,白 云,段文元,章 波,杨晓亚,许雪青 (第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建血管活性肠肽重组腺病毒载体,以期用于体内实验研究。**方法** 利用RT-PCR扩增小鼠大脑VIP mRNA,亚克隆到穿梭质粒pAdTrack-CMV,在pAdeasy内同源重组,筛选阳性克隆,酶切、测序鉴定正确,线性化后脂质体法转染293细胞进行包装、扩增,利用报告基因EGFP对病毒滴度进行监测。PCR、免疫荧光鉴定pAdeasy-VIP感染293细胞后VIP基因的表达,ELISA检测重组病毒转染后293细胞上清中的表达。**结果** 测序、酶切证实VIP基因重组腺病毒载体构建成功。RT-PCR,免疫荧光检测pAdeasy-VIP病毒感染的293细胞,均有VIP的表达。与对照组相比,重组病毒转染后293细胞上清中VIP多肽的表达明显增高。**结论** 成功构建了含小鼠VIP基因的重组腺病毒载体,并成功表达VIP多肽。

关键词: 血管活性肠肽;腺病毒;基因治疗

中图法分类号: R392.11; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Construction, expression and identification of recombinant adenovirus Ad-VIP in 293 cells

SONG Min, BAI Yun, DUAN Wen-yuan, ZHANG Bo, YANG Xiao-ya, XU Xue-qing (Department of Medical Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant adenovirus encoding vasoactive intestinal peptide (VIP) for future gene therapy *in vivo*. **Methods** Full length mouse VIP cDNA linked with an internal ribosome entry site (IRES)-EGFP cassette was subcloned into pAdTrack-CMV shuttle plasmid. The product was linearized to mediate homologous recombination with pAdeasy-1 vector in BJ5183 host bacteria. The positive clone was identified by restriction endonuclease digestion and further confirmed by sequencing. The recombinant adenovirus DNA was transfected into 293 cells for packaging and amplification of pAdeasy-VIP virus, which was purified by SARTOBIND Membrane Adsorbers. The expression of VIP was monitored by EGFP fluorescence in infected cells. VIP peptide expression on 293 cells was detected by PCR, immunofluorescent method and ELISA. **Results** After transfected with adenovirus DNA, infectious virus was only produced to cause cytopathic effect in the permissive cell line 293 but not in the non-permissive cell line HeLa, confirming only replication defective but not wild type virus was generated. The specific expression of mouse pAdeasy-VIP was verified by RT-PCR and immunofluorescent method in 293 cells after infection with pAdeasy-VIP, but not Ad-EGFP, a similarly constructed control virus. pAdeasy-VIP, but not pAd-EGFP, significantly secretes VIP peptide in supernatant. **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant adenovirus pAdeasy-VIP that expresses VIP peptide *in vitro*.

Key words: vasoactive intestinal peptide; adenovirus; gene therapy

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)主要由肽类神经元分泌,是由28个氨基酸组成的神经多肽。目前发现T、B淋巴细胞亦可分泌,主要分布于中枢神经系统、周围神经系统以及免疫系统。研究证实VIP可以通过巨噬细胞上的受体介导的cAMP/MEKK/c-JUN途径以及非cAMP依赖的IKK/IKB途径抑制LPS诱导表达IL-12、TNF-α和iNOS,促进抗炎因子IL-4、IL-10的产生[1]。而且VIP还可以抑制活化的

基金项目: 国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金(30228018)
Supported by the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars(30228018)

作者简介: 宋 敏(1979-),男,江西省九江市人,博士研究生,助教,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023)68753670

通讯作者: 白 云,电话:(023)68752258,E-mail:geneby@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-25;**修回日期:** 2006-11-08

巨噬细胞表达CXC化学因子,巨噬细胞炎症蛋白2(MIP-2)和IL-8,抑制CC化学因子MIP-1α、MIP-1β、单核细胞化学趋化蛋白1和RANTES的表达,从而调节局部的细胞因子间的平衡,发挥其免疫调节作用,进一步的实验证实其望在在类风湿性关节炎[2]、细菌性休克[3]等疾病中发挥保护作用。

然而,由于VIP的降解和失活速度很快从而严重限制了其有效的生物利用。如何提高VIP的有效利用成为研究者的关注焦点。腺病毒(adenovirus,Ad)是一类无包膜的双链DNA病毒,具有高效率感染细胞、不整合到宿主细胞染色体及易制备出高滴度病毒等特点,已成为目前比较成熟的重组蛋白质系统。鉴于此,我们通过本实验利用体外扩增VIP基因片段构建含有绿色荧光蛋白的腺病毒载体,为下一步的研究工作提供了有效的分子工具,并且为将来能在体内局部应用基因表达的VIP治疗类风湿性关节炎、多发性硬化等炎性疾病奠定基础,为开辟抗炎症治疗的新途径和寻找新的抗炎药物提供新思路。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

XL1-Blue、DH10B、pAdeasy细菌由本室保存,293包装细胞由本室保存。RT-PCR试剂盒(TaKaRa),*Taq*酶(Promega),T_4 DNA连接酶购自Invitrogen公司。*Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ购自NEB公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DOTAP转染试剂盒、Tripure试剂均购自Roche公司。SARTOBIND微孔膜(美国赛多利斯),兔抗小鼠VIP多肽多抗(Biomol)、Cy3标记山羊抗兔抗体(北京中山)、VIP多肽ELISA检测试剂盒(上海贝西)。

1.2　腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV-VIP的构建

1.2.1　RT-PCR扩增VIP基因　　设计1对针对VIP的特异性引物并加入酶切位点(5′端加入*Sal* Ⅰ,3′端加入*Xba* Ⅰ)以小鼠大脑皮层组织总mRNA逆转录后的cDNA为模板扩增VIP全长。引物序列:上游引物:5′-GCGTCGACCCTGAAGGAAA-CAGC-3′,下游引物:5′-GCTCTAGATCTGATTTCAGCTCTGCC-3′,反应参数为:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,3步组成35个循环,最后72 ℃延伸10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,而后采用上海生工胶回收试剂盒回收PCR产物,紫外测定浓度。

1.2.2　产物定向连接到pAdTrack-CMV载体鉴定　　*Sal* Ⅰ和*Xba* Ⅰ分别双酶切VIP-PCR产物和pAdTrack-CMV,凝胶回收片段和线性化的pAdTrack-CMV,紫外测定浓度后,以载体:片段=1:3(物质的量比)4 ℃过夜连接,转化XL1-blue感受态细菌,卡那霉素抗性LB平板上培养过夜,挑选菌落,提取质粒,*Sal* Ⅰ和*Xba* Ⅰ双酶切筛选并鉴定阳性克隆,同时送检上海英骏生物公司测序。

1.3　*E. coli.* 内同源重组构建腺病毒载体pAdeasy-VIP及扩增

将pAdTrack-CMV-VIP质粒*Pme* Ⅰ酶切线性化,将酶切产物胶回收纯化。取1 μg转化感受态大肠杆菌pAdEasier中,卡那霉素抗性筛选,37 ℃培养24~30 h,挑选10~24个约针尖样小菌落,碱裂解法小提质粒,0.6%琼脂糖凝胶电泳初步筛选重组子,挑选质粒大小与pAdeasy-1相似的质粒用*Pac* Ⅰ酶切鉴定阳性克隆,再次送检上海英骏生物公司测序。选择正确的克隆重新转入DH10B细菌中扩增,再次酶切鉴定。

1.4　重组腺病毒pAdeasy-VIP在293细胞内的包装、扩增和纯化

Pac Ⅰ线性化pAdeasy-VIP,醋酸铵沉淀,乙醇漂洗后重新溶解在20 μl的消毒去离子水中。用700 μl无抗生素,无血清的OPTI-DMEM溶解3 μg左右的DNA,室温放置5 min。用700 μl无抗生素,无血清的OPTI-DMEM溶解6 μl的脂质体,室温放置5 min。而后混合放置15~30 min即成为转染液。用无抗生素,无血清的OPTI-DMEM清洗约75%融合293细胞2次后,将上述准备的转染液加入,37 ℃培养6 h后换成DMEM完全培养基。转染后在不同时间于荧光显微镜下观察GFP表达状况,了解腺病毒包装进程。直至90%以上293细胞出现细胞病变(cytopathic effect,CPE)。裂解细胞,收集上清继续感染293细胞以扩增病毒。反复扩增3~4代后收集病毒层,0.22 μm无菌过滤后重组腺病毒pAdeasy-VIP,利用SARTOBIND Q75微孔膜纯化病毒[4],小份分装,-80 ℃保存。

1.5　重组腺病毒pAdeasy-VIP的病毒滴度测定

参照Kaneto和江千里的方法进行:在96孔细胞培养板中用排枪以4×10^4~2×10^5/ml浓度接种293细胞,90 μl/孔,20孔为1组,并设复孔1排,混匀后培养24 h;第1孔内加入10 μl待测的病毒纯化液,10:1倍比稀释,最后1孔用作阴性对照;18 h后,以浓度自高到低的方向,在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光细胞的数量,以<5个阳性细胞孔为计量孔(计为1 U),病毒滴度=1 U×10^{n-1}/0.01 ml。

1.6　目的基因VIP表达检测

1.6.1　RT-PCR检测VIP mRNA在重组病毒转染后293细胞内的表达　　收集pAdeasy-VIP感染后的293细胞,按照Tripure试剂说明书抽提总RNA,进行反转录。所得cDNA取5 μl进行PCR,引物序列同前。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,以未转染293细胞作为对照。

1.6.2　免疫组化检测VIP蛋白在重组病毒转染后293细胞内的表达　　将转染pAdeasy-VIP病毒的293细胞调整密度为10^6/ml后,取20~40 μl涂于多聚赖氨酸处理盖玻片的表面,显微镜下观察密度,风干。0.01 mol/L PBS小心漂洗细胞,而后4%多聚甲醛固定20 min,漂洗,1% Triton通透10 min,漂洗。加入兔抗小鼠VIP多克隆抗体,室温孵育1 h,漂洗后加Cy3标记的山羊抗兔二抗。75%甘油封片观察。转染空病毒的293细胞为阴性对照,同时以兔抗小鼠IgG为一抗同型对照。

1.6.3　ELISA检测重组病毒转染后293细胞上清中的表达

以10^6种植293细胞于96孔板中,转染pAdeasy-VIP以及空病毒,感染复数(MOI)为100,转染24 h后见感染细胞约50%出现脱落,离心后转移上清至已加入VIP抗体的ELISA测定之酶标板,而后按照ELISA试剂说明书测定(检测敏感度为0.025 ng/ml)。设8个标准品孔,每实验组设2复孔。

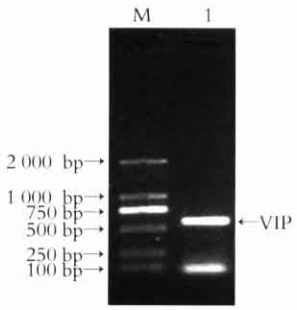
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 VIP 基因的获得

Tripure 提取 C57/BL6 小鼠脑组织总 mRNA，经变性甲醛凝胶电泳检测：5.8S、18S、28S 3 条主带清楚。进一步以设计的引物扩增 VIP 基因，获得 600 bp 大小条带（目的条带大小为 595 bp）。如图 1 所示，初步认为得到目的条带。



M：标准（DL 2000）；1：VIP 基因扩增产物

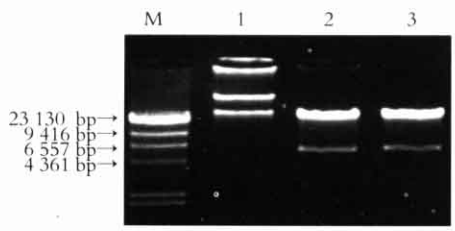
图 1 琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 扩增产物

2.2 pAdTrack-CMV-VIP 穿梭质粒的构建和鉴定

将 VIPPCR 产物定向插入 pAdTrack-CMV 载体中，选择 12 个阳性转化菌落质粒，经 *Sal* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 双酶切鉴定，有 5 个克隆得到 9.2 kb 和 595 bp 2 个片段，证明插入片段基本正确，将阳性质粒命名为 pAdTrack-CMV-VIP。测序证明，与 NCBI 中的 VIP cDNA 序列一致，表明构建成功穿梭载体。

2.3 大肠杆菌内同源重组腺病毒

经测序后的正确克隆进行扩增，纯化后经 *Pme*Ⅰ 37 ℃酶切 16 h 后，经电泳检测确保已经完全切开，乙醇沉淀。取 1 μg 转入预先制备的 pAdeasy 感受态细菌中，于其内的 AdEasy 进行重组。卡那抗性平板过夜培养 20 h 左右，可见培养板中生长出大小不等的克隆，挑选较小的克隆扩增，*Pac*Ⅰ 酶切鉴定。可见 4.5 kb 和 23 kb 的电泳带各 1 条（图 2），证明同源重组成功。再次测序证实重组后的 VIP 序列与文献报道的 VIP cDNA 序列一致，将重组后得到最终所需要的腺病毒重组质粒将其命名为 pAdeasy-VIP。



M：λDNA/*Hind*Ⅲ 标准；1：重组 pAdeasy-VIP 质粒；2，3：重组 pAdeasy-VIP 质粒经 *Pac*Ⅰ 酶切后

图 2 重组 pAdeasy-VIP 质粒 *Pac* Ⅰ 酶切分析

2.4 重组腺病毒 pAdeasy-VIP 在 293 细胞内的包装、扩增及滴度测定

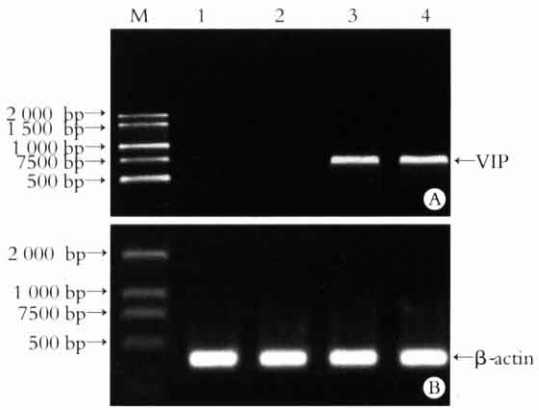
2.4.1 病毒包装 脂质体转染 pAdeasy-VIP 质粒转染 293 包装细胞 1～2 d 后，光镜下可见细胞变圆、肿胀、脱壁，细胞核变大等细胞病变。荧光显微镜绿色荧光激发通道下观察可见：18 h 后，出现少量发出明亮的绿色荧光的细胞，并逐渐增多，到 2～3 d 达到高峰。继续培养可见葡萄串状细胞病灶逐渐增多，至 6～7 d，整瓶细胞均发出绿色荧光。

2.4.2 滴度测定 实验显示，可见 pAdeasy-VIP 病毒感染组第 9 孔绿色荧光阳性细胞为 5 个，即为计量孔，故其滴度为 10^{11} U/ml，与文献[6]报道腺病毒的滴度基本一致，能够满足实验要求。

2.4.3 病毒纯化 所得病毒约为 6 ml，原滴度为 10^{11} U/ml 经 SARTOBIND 微孔膜吸附分离后溶于 3 ml 洗脱液，重新测定滴度，保持为 10^{11} U/ml，可以进行下一步的功能实验。

2.5 目的基因 VIP 表达检测

2.5.1 RT-PCR 检测 以 β-actin 为内参，转染空病毒的 293 细胞为对照，RT-PCR 检测显示 pAdeasy-VIP 病毒转染的 293 细胞扩增出 1 条 595 bp 大小条带，而 pAd-EGFP 感染的 293 细胞的相应位置无特异条带，表明该条带系 pAdeasy-VIP 重组腺病毒感染 293 细胞后产生的特异性的 VIP mRNA 全长（图 3）。



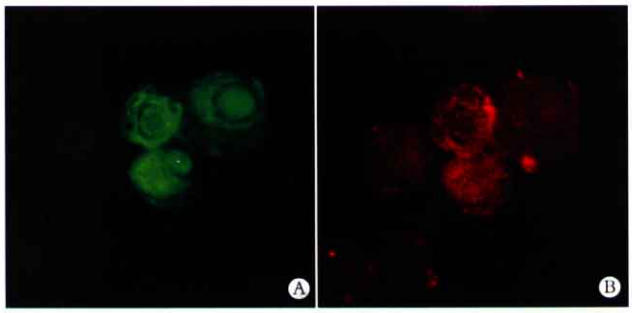
A：RT-PCR 扩增 VIP mRNA 全长；B：RT-PCR 扩增 β-actin

M：DNA 标准；1，2：空白病毒；3，4：pAdeasy-VIP 重组腺病毒

图 3 琼脂糖凝胶电泳检测空白病毒及 pAdeasy-VIP 重组腺病毒转染 293 细胞 VIP 基因及 β-actin 的扩增产物

2.5.2 免疫组化检测 免疫荧光检测 VIP 蛋白在重组病毒转染后 293 细胞内的表达结果显示：转染 pAdeasy-VIP 病毒的 293 细胞除了表达绿色荧光以外，Cy3 染色细胞质呈红色，表明 VIP 多肽亦表达。经图片整合可见位于同一细胞中。证明在 293 细胞质中同时表达 EGFP 和 VIP 多肽（图 4）。空白及同型对照仅见绿色荧光。

2.5.3 ELISA 检测 按照试剂说明书进行检测，经与标准曲线对比得可得：pAdeasy-VIP 为 2.86 ng，对照空白病毒组约为 0.126 ng，感染 VIP 组较空白病毒组明显增高（$P<0.01$）。



A：293 细胞转染 pAdeasy-VIP 病毒后绿色荧光蛋白检测；
B：293 细胞转染 pAdeasy-VIP 病毒后 VIP 多肽检测

图 4　免疫荧光法检测绿色荧光蛋白（绿色）和 VIP 多肽（红色）共表达于 293 细胞细胞质　（免疫荧光 ×200）

3　讨论

20 世纪 70 年代初，Said 和 Mutt 从猪的小肠组织中分离出一种具有强的血管扩张作用的肽类物质，命名为血管活性肠肽。近年来 VIP 在免疫系统中的研究进一步把 VIP 扩展为一种神经-内分泌-免疫网络调节性多肽。目前的研究证实 VIP 主要通过表达于免疫细胞上的受体发挥作用，目前发现其受体有 3 种：①VPAC1：表达于淋巴细胞、单核巨噬细胞、胸腺细胞等。②VPAC2：在淋巴细胞和巨噬细胞上的表达为诱导性，VPAC1/VPAC2 与腺苷酸环化酶途径相偶联。③PAC1：主要表达于巨噬细胞，而不表达于淋巴细胞，与 IP/PLC 相偶联[5]。VIP 可以发挥诱导未成熟 DC 上调表达 CD86 表达，刺激 T 细胞增殖，促进 TH2 型反应。在成熟的 DC，VIP 发挥的是下调 CD80/CD86 的表达，抑制对同种异体 T 淋巴细胞的反应[6]。最近的研究进一步的证实：VIP 可以诱导分化未成熟 DC 成为 tolerogenic DCs 进而诱导产生 $CD4^+$ 以及 $CD8^+$ 的调节性 T 细胞的产生[7,8]，这一机制的阐明促进了神经小肽分子对免疫调节的研究，也为自身免疫性疾病的治疗提供了一些新的思路[9]。Delgado 等[2]证实在类风湿性关节炎疾病模型中应用 VIP 可以明显降低类风湿性关节炎的发病率以及严重程度，关节肿胀以及软骨和骨组织的损害也明显好转，提示我们 VIP 将是一个很有应用前景的抗炎分子。但是由于 VIP 自身极其不稳定，在循环中半衰期只有 3 min，严重限制了它的应用。有鉴于此：通过基因表达的方式来释放 VIP 进行自身免疫性疾病的治疗将是一条比较可行而且廉价的途径。而且我们还可以通过载体细胞的选择充分发挥载体细胞的功能，如选择骨干细胞补充在类风湿性关节炎中破坏的成骨细胞，从而发挥“一箭双雕”的作用。所以我们首先进行了 VIP 分泌型载体的构建，并选择了腺病毒作为释放 VIP 的载体。之所以选择腺病毒作为表达载体，除了考虑在后期应用中可以方便的转染静止期细胞以外，而且由于缺陷型重组腺病毒载体不整合入细胞染色体基因组，从而具有毒性低和安全性高的优点，此外，与慢病毒、逆转录病毒比较还具有病毒滴度高、易于操作等特点。在上述实验中，我们首先通过 RT-PCR 技术从 C57/BL6 小鼠的大脑总 RNA 中扩增出了 VIP mRNA 的全长，进一步构建了腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-VIP，而后在 *E. coli.* 内成功同源重组构建出了腺病毒载体 pAdeasy-VIP 并在 293 细胞中获得了包装、扩增，并通过 RT-PCR 和免疫组化技术水平分别从 mRNA 和蛋白质水平证明了我们所需要的 VIP 多肽成功的进行了表达，ELISA 检测证实与对照组相比，重组病毒转染后 293 细胞上清中 VIP 多肽的表达明显增高，从而为下一步进行基因转移提供了有效的分子工具，并且为将来能在体内应用 VIP 进行自身免疫疾病的治疗打下了基础，具有重要的实用意义。

参考文献：

[1] Gomariz R P, Martinez C, Abad C, *et al*. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives[J]. Curr Pharm Des, 2001, 7(2): 89-111.

[2] Delgado M, Abad C, Martinez C, *et al*. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease[J]. Nat Med, 2001, 7(5): 563-568.

[3] Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *in vitro* and *in vivo*[J]. J Immunol, 2001, 167(2): 966-975.

[4] Karger A, Bettin B, Granzow H, *et al*. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane[J]. J Virol Methods, 1998, 70(2): 219-224.

[5] Delgado M, Abad C, Martinez C, *et al*. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases[J]. J Mol Med, 2002, 80(1): 16-24.

[6] Delgado M, Reduta A, Sharma V, *et al*. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for $CD4^+$ T cells[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(6): 1122-1130.

[7] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, *et al*. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells[J]. Blood, 2006, 107(9): 3632-3638.

[8] Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, *et al*. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(38): 13562-13567.

[9] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 249-290.

（编辑　陈聪连）