论著

文章编号:1000-5404(2008)21-2044-03

抗菌肽PR39真核表达载体的构建及其在巨噬细胞中的表达和抗菌作用

文阳安[1],郭金英[1],余晓林[1],岑 东[1],陈 彦[2],张 键[3],罗 森[1],涂植光[1] (重庆医科大学:[1]医学检验系生物化学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,[3]附属第一医院骨科,重庆 400016;[2]西南大学医院,重庆 400715)

摘 要:目的 构建抗菌肽PR39的真核表达载体,转染后观察PR39在小鼠巨噬细胞RAW264.7中的表达及抗菌作用。**方法** 采用拼接PCR法合成抗菌肽PR39基因,克隆到真核表达载体pIRES2-GFP中,经鉴定后用阳离子脂质体转染小鼠巨噬细胞RAW264.7,通过RT-PCR和免疫荧光法检测目的基因的表达,并对其抗菌活性进行初步检测。**结果** 成功构建了抗菌肽PR39的真核表达载体pIRES2-GFP/PR39,并能在小鼠巨噬细胞RAW264.7中表达抗菌肽PR39。表达抗菌肽PR39的巨噬细胞杀灭和清除胞内菌的能力明显增强。**结论** 抗菌肽PR39基因能够在小鼠巨噬细胞RAW264.7中表达并发挥抗菌作用。

关键词: 抗菌肽;PR39;真核表达载体;巨噬细胞;胞内菌

中图法分类号: R392.11; R394-33; R978.16 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector encoding antimicrobial peptides PR39 and its expression and antimicrobial function in RAW264.7 cells

WEN Yang-an[1], GUO Jin-ying[1], YU Xiao-lin[1], CEN Dong[1], CHEN Yan[2], ZHANG Jian[3], LUO Miao[1], TU Zhi-guang[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Infirmary of Southwest University, Chongqing 400715; [3]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector encoding antimicrobial peptide PR39, and observe its expression and antimicrobial function in mouse macrophage RAW264.7 cells. **Methods** PR39 gene sequence was synthesized with PCR amplification and inserted into an eukaryotic expression vector pIRES2-GFP. After identification, pIRES2-GFP/PR39 vector was transfected into RAW264.7 cells with cationic liposome. The expression of PR39 was detected by RT-PCR and immunofluorescence method, and its antibacterial activity was also detected. **Results** The pIRES2-GFP/PR39 vector was successfully constructed, and PR39 was expressed in RAW 264.7 cells with antimicrobial activity. RAW 264.7 cells expressing PR39 showed stronger antibacterial ability. **Conclusion** Antimicrobial peptide PR39 is expressed and shows antimicrobial function in RAW264.7 cells. The successful construction of the PR39 expressing vector have established a foundation for the gene therapy of antimicrobial peptides against intracellular bacterial infection.

Key words: antimicrobial peptide; PR39; eukaryotic expression vector; macrophage; intracellular bacteria

常见的胞内菌(如结核杆菌和伤寒杆菌等)被体内的巨噬细胞吞噬后,往往能逃避巨噬细胞的杀灭,并能在巨噬细胞内生存甚至繁殖,并得以逃避体液免疫和抗菌药物的杀伤作用,把巨噬细胞变成庇护所,使临床治疗困难[1,2]。作为一种肽类抗生素,抗菌肽PR39具有广谱高效的抗菌作用,而且不易诱导细菌耐药[3],因此在细菌感染的治疗中,PR39具有多方面优势,有望成为治疗胞内菌感染的新一代抗菌药物。为此本研究构建了抗菌肽PR39的真核表达载体,观察其在小鼠巨噬细胞RAW264.7中的表达及对胞内菌的抗菌作用。

基金项目: 国家自然科学基金(30600790)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600790)
作者简介: 文阳安,男,湖南省祁阳县人,博士,主要从事抗菌肽抗菌机制及其应用方面的研究。电话:(023)68485759
通信作者: 涂植光,电话:(023)68485759
收稿日期: 2007-09-30;**修回日期:** 2007-11-07

1　材料与方法

1.1　材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7、真核表达质粒 pIRES2-GFP、*E. coli* DH5α、伤寒杆菌标准菌株均由本室保存;高保真酶 PrimerStar、逆转录酶、限制性内切酶、连接酶、DNA 标准等购自大连 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、质粒提取和 RNA 提取试剂盒购自上海华舜公司;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;Cy3 标记的羊抗兔二抗购自碧云天公司。

1.2　方法

1.2.1　PR39 基因的合成、克隆和鉴定　　根据 GenBank(登录号:NP 999615)中抗菌肽 PR39 成熟肽的氨基酸序列设计并合成其 DNA 拼接引物:PR39-1:5′-AGAAGGAGACCCAGGCCACCATATCTTCCTAGACCTAGACCTCCCCCATTC-3′;PR39-2:5′-GTATTCTAGGGGGGAGTCTAGGGGGAAAGAATGGGGGAGGTCTAGGTC-3′;PR39-3:5′-CTAGACTCCCCCCTAGAATACCACCCGGTTTCCCTCCAAGGTTTCCT-3′;PR39-4:5′-TCATTAGGGGAATCTGGGAGGAAACCTTGGAGGGAAAC-3′,并以之为模板,以 PR39 上游 5′-CTAGCTAGCGCCACCATGAGAAGGAGACCCAGGCCACC-3′和 PR39 下游 5′-GATCTGTCGACTCATTAGGGGAATCTGGGAGG-3′为引物,通过 PCR 扩增合成 PR39 DNA 序列。PCR 反应体系如下:5×PS buffer 10 μl,dNTP 4 μl,模板1 μl,引物各 1 μl,高保真酶 PrimerStar 0.5 μl,补水至 50 μl。反应条件:98 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 2 min。扩增产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物和质粒 pIRES2-GFP 经 *Nhe* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后连接,转化感受态 DH5α,涂布于含 30 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板 37 ℃培养。次日挑取单菌落增菌,提取质粒进行 *Nhe* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定,并进一步测序鉴定。

1.2.2　抗菌肽 PR39 多克隆抗体的制备及效价测定　　利用 DNAStar 软件设计并化学合成抗菌肽 PR39 的抗原决定簇序列(CRRRPRPPYLPRPRPPPFFP)。合成的多肽与 KLH 偶联后免疫家兔(初次免疫 1 次,加强免疫 3 次),用 ELISA 方法测定抗体效价达到要求后心脏放血,分离血清,经硫酸氨盐析纯化、超滤脱盐后 -80 ℃保存。

1.2.3　RAW264.7 细胞的转染、筛选和目的基因表达　　小鼠巨噬细胞 RAW264.7 用含有 100 ml/L 小牛血清的 1640 培养基,于 37 ℃、50 ml/L CO_2 常规培养。转染前 1 d 细胞铺 24 孔板,按转染试剂盒操作说明用重组质粒和空载体进行转染。转染 48 h 后加入终浓度为 600 μg/ml 的 G418 进行筛选,10 d 后未转染质粒的细胞全部死亡,转染了质粒的细胞继续用含 300 μg/ml G418 的培养基进行维持培养。转染了空载体和重组载体的细胞进行检测:①RT-PCR 检测 PR39 基因转录水平的表达情况:提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,以 PR39 上游和 PR39 下游为引物,进行 PCR。②PR39 基因表达产物免疫学检测:制作细胞爬片;次日,细胞爬片用 PBS 清洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 10 min;PBS 清洗 3 次;5 mg/L Triton-X 100 穿透 10 min,PBS 清洗 3 次;加一抗,4 ℃孵育过夜,PBS 清洗 3 次;加二抗,37 ℃孵育 45 min,PBS 清洗 3 次;95% 甘油封片。用荧光显微镜观察并成像。

1.2.4　RAW264.7 细胞杀灭胞内菌能力的检测　　24 孔板各取 10 孔分别编号为 R0 和 R39,分别接种 1×10^5 个转染空载体(R0)和转染重组载体(R39)的 RAW264.7 细胞。待细胞贴壁后,按 10∶1(细菌/细胞数)的比例加入伤寒杆菌,吞噬 2 h 后用 PBS 清洗 3 次,加 100 μg/ml 的庆大霉素作用 2 h,杀灭未被吞噬的细菌,然后换成含 10 μg/ml 庆大霉素的培养基培养。48 h 后每孔加入 1 ml 含 1 g/L Triton-X 100 的 PBS 裂解细胞,裂解液按 1∶1 000 稀释后取 100 μl 铺 LB 平板,37 ℃培养过夜后计数菌落数,按公式计算每个细胞中的活菌数。

活菌数(CFU) = 菌落数 $\times10^4/10^5$。

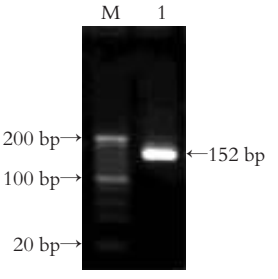
1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件对细菌计数结果行方差分析和 *t* 检验。

2　结果

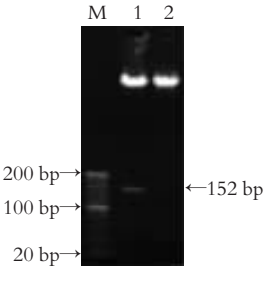
2.1　PR39 基因的合成及重组质粒的构建

通过拼接 PCR 合成了 PR39 基因,琼脂糖电泳显示大小约为 152 bp(图 1)。扩增的 PCR 产物经双酶切后插入真核表达载体 pIRES2-GFP,并对重组载体进行双酶切鉴定,得到 1 条 152 bp 的 DNA 片段(图2),与理论预测值一致。经测序鉴定与 GenBank 公布的序列一致,重组载体命名为 pIRES2-GFP/PR39。



M:DNA 20 bp 梯度标准;1:PCR 产物

图 1　PR39 基因 PCR 产物电泳图



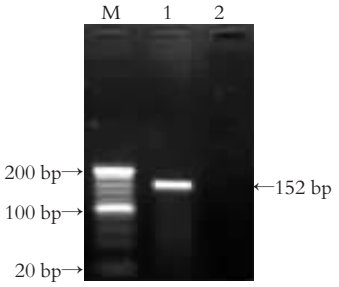
M:DNA 20 bp 梯度标准;1:pIRES2-GFP/PR39 经 *Nhe* Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切;2:pIRES2-GFP 经 *Nhe* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切

图 2　重组质粒 pIRES2-GFP/PR39 双酶切鉴定结果

2.2　RT-PCR 检测 PR39 基因在 RAW264.7 细胞中的表达

提取转染了重组载体和空载体的 RAW264.7 细胞总 RNA,

逆转录后以 PR39 上游和 PR39 下游为引物进行 PCR,结果显示转染了重组载体的 RAW264.7 细胞中扩增出了 PR39 基因片段(图 3)。



M:DNA 20 bp 梯度标准;1:PR39 基因;2:空载体对照

图 3 转染重组载体后的 RAW264.7 细胞 RT-PCR 结果

2.3 PR39 多抗滴度测定及 PR39 基因免疫荧光检测

经 ELISA 方法测定,PR39 多克隆抗体的滴度高达 $1:10^5$。以该抗体作为一抗,Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗进行免疫荧光检测。利用荧光显微镜进行成像,结果表明转染 pIRES2-GFP/PR39 的 RAW264.7 细胞能有效表达目的基因(图 4),而转染空载体的细胞未观察到荧光。

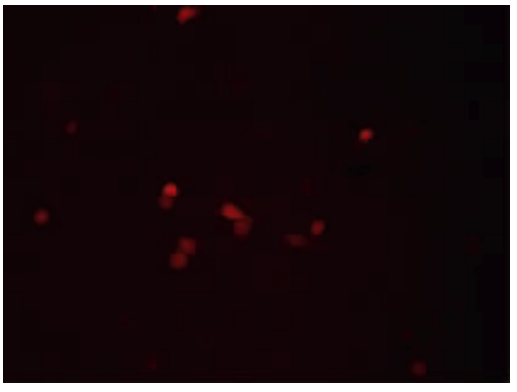


图 4 转染 pIRES2-GFP/PR39 的 RAW264.7 细胞 PR39 基因的表达 (荧光显微镜×200)

2.4 表达抗菌肽 PR39 的 RAW264.7 细胞对伤寒杆菌杀伤作用检测结果

与转染空载体(R0 组)的 RAW264.7 细胞内伤寒杆菌活菌数[(10.1±1.2)CFU]相比,转染重组载体(R39 组)的 RAW264.7 细胞活菌数[(5.2±0.8)CFU]明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

抗菌肽是一类具有抗菌活性的多肽,是动物和植物免疫防御系统产生的对抗外源性病原体致病作用的防御性肽类活性物质,在生物体的天然免疫中起着重要的作用[4]。PR39 是从猪的中性粒细胞中分离纯化出的一种富含脯氨酸的抗菌肽,是抗菌肽 cathelicidin 家族中的一员,对细菌(如结核分枝杆菌、伤寒沙门菌等)具有广谱的抗菌作用。除了抗菌作用以外,PR39 还具有中和内毒素、抗炎、免疫诱导、组织修复、抑制凋亡等功能[3,5]。Lee 等[6]的研究证明表达抗菌肽 PR39 的转基因小鼠对皮肤细菌感染具有抵抗作用。

巨噬细胞作为机体抗胞内菌感染的重要防线,在机体对抗胞内菌感染的过程中发挥了双重作用。一方面,活化的巨噬细胞可以通过吞噬作用和启动炎症反应杀灭细菌,起到保护作用;另一方面,静止的巨噬细胞则是胞内菌的主要宿主细胞和繁殖场所[1]。通过将抗菌基因导入巨噬细胞,提高巨噬细胞的杀菌能力是增强机体抗胞内菌感染的有效途径。伊正君等[7,8]成功构建了人颗粒溶素基因的真核表达载体,并在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中成功表达,发挥了杀灭胞内结核杆菌的作用。但是利用抗菌肽 PR39 对胞内菌进行基因治疗的研究尚少见报道。

我们采用基因治疗的策略,成功构建了抗菌肽 PR39 的真核表达载体,转染小鼠巨噬细胞并筛选出 PR39 基因稳定表达株,通过 RT-PCR 和免疫荧光技术在体外巨噬细胞 RAW264.7 中检测到了目的基因转录水平和蛋白水平的表达。表达抗菌肽 PR39 的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 杀灭胞内伤寒杆菌的能力明显增强。本研究为抗菌肽 PR39 在其他多种胞内菌感染的基因治疗中的应用以及后续的动物实验研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Leemans J C, Thepen T, Weijer S, *et al*. Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice[J]. J Infect Dis, 2005, 191(1): 65-74.

[2] 罗家琴,李富祥,张以芳. 抗胞内菌感染免疫及其治疗[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 46-49.

[3] Gennaro R, Zanetti M, Beaincasa M, *et al*. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action[J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(9): 763-778.

[4] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E. Peptide antimicrobial agents[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 491-511.

[5] Wu J, Parungo C, Wu G, *et al*. PR39 inhibits apoptosis in hypoxic endothelial cells: role of inhibitor apoptosis protein-2[J]. Circulation, 2004, 109(13): 1660-1667.

[6] Lee P H, Ohtake T, Zaiou M, *et al*. Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(10): 3750-3755.

[7] 伊正君,朱道银,李俊明,等. 人颗粒溶素与 EGFP 基因融合表达载体的构建及其在鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(23): 2125-2128.

[8] Yi Z, Fu Y, Yang C, *et al*. Recombinant M. smegmatis vaccine targeted delivering IL12/GLS into macrophages can induce specific cellular immunity against M. tuberculosis in BALB/c mice[J]. Vaccine, 2007, 25(4): 638-648.

(编辑 薛国文)