

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.003

携带小鼠白介素 -4 截短型突变体基因的 5 型腺相关病毒载体的构建及外源蛋白的体外表达 *

田丽春¹ 朱情情² 刘艾洁² 王青青³ 黄光瑞^{2Δ}

(1 北京中医药大学东方医院 北京 100078; 2 北京中医药大学生命科学院 北京 100029;

3 北京中医药大学中医学院 北京 100029)

摘要 目的:制备携带碳端结构域缺失的小鼠白介素 -4(Interleukin-4, IL-4)基因突变体的 5 型重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)并在细胞水平检测其介导的外源蛋白表达情况。**方法:**通过分子克隆技术构建携带小鼠 IL-4 碳端 22 个氨基酸缺失的突变体的表达质粒 pSNAV-mIL-4ΔC22, 三质粒共转染法制备重组的 5 型 AAV 病毒, 体外感染人支气管上皮样细胞系 16HBE 和 BEAS-2B, 并通过 Western blot 和 ELISA 检测外源蛋白表达。**结果:**DNA 测序表明构建的小鼠 IL-4 碳端第 118 位氨基酸位点处截短的突变体基因表达序列正确无误, 制备的重组病毒载体 rAAV5-mIL-4ΔC22 滴度约为 3×10^{11} vg/mL。rAAV5-GFP 感染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞后 36 小时开始可见持续稳定的荧光蛋白表达, 重组病毒 rAAV5-mIL-4ΔC22 感染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞后外源蛋白在培养上清中呈分泌型表达。**结论:**本研究成功构建了携带小鼠 IL-4 碳端结构域缺失型突变体的 AAV 表达质粒并制备了重组病毒 rAAV5-mIL-4ΔC22, 该病毒可有效转染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞并介导外源基因分泌表达截短型小鼠 IL-4 突变体蛋白。

关键词:白介素 -4; 突变体; 腺相关病毒; 基因治疗

中图分类号: R-33; Q78; R562.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)02-211-06

Construction of Recombinant Adeno-associated Virus Encoding Interleukin-4 Antagonistic Mutant and Exogenous Protein Expression *in vitro**

TIAN Li-chun¹, ZHU Qing-qing², LIU Ai-jie², WANG Qing-qing³, HUANG Guang-rui^{2Δ}

(1 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China; 2 School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 3 School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To prepare recombinant adeno-associated virus harboring truncated murine interleukin-4 mutant gene and detect the exogenous protein expression *in vitro*. **Methods:** An mIL-4 antagonistic mutant DNA expression plasmid pSNAV-mIL-4ΔC22 was constructed through gene clone technology, a recombinant virus vector rAAV5-mIL-4ΔC22 was prepared by three plasmids co-transfection, human bronchoid epithelioid cell line 16HBE and BEAS-2B were transfected with recombinant AAV5 vectors, then the expression of foreign protein was detected by Western blot and ELISA. **Results:** The mutant gene mIL-4ΔC22 was verified by DNA sequencing and the titer of virus vector rAAV5-mIL-4ΔC22 is about 3×10^{11} vg/mL. 16HBE and BEAS-2B expressed GFP lastly and stably when 36 hours after receiving rAAV-GFP transfection. **Conclusions:** Our study constructed recombinant vector rAAV5-mIL-4ΔC22 encoding murine IL-4 antagonistic mutant protein deleting the C-terminus region, the virus vector effectively transfected 16HBE and BEAS-2B, and mediated exogenous protein secretory expression *in vitro*.

Key words: Interleukin-4; Mutant; AAV; Gene therapy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)02-211-06

前言

哮喘是一种以慢性气道炎症为特征的异质性疾病,常导致气道高反应性和不可逆的气道阻塞^[1,2]。研究表明,CD4⁺ Th2 细胞及其相关细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 所诱导的免疫反应在

哮喘的发生、发展及转归中均起着十分重要的作用,其中 IL-4 和 IL-13 与支气管哮喘发病过程中嗜酸性粒细胞聚集和 IgE 合成密切相关,是哮喘治疗的重要靶点^[3-9]。IL-4 和 IL-13 结构相近,通过与细胞表面受体结合传递生物学信号,IL-4 的受体(IL-4 receptor, IL-4R)是由 IL-4Rα 链和 γC 链组成的二聚体,其

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81300016, 31500704)

作者简介:田丽春(1983-),博士,主管技师,主要研究方向:分子医学,电话:010-67689614, E-mail: tianlch@126.com

Δ 通讯作者:黄光瑞,博士,副教授,主要研究方向:分子免疫学, E-mail: huanggr2011@126.com

(收稿日期:2018-06-28 接受日期:2018-07-23)

中的 IL-4R α 链也是 IL-13 受体的一个亚基^[10]。IL-4 既可与其自身的受体结合又可与 IL-13 受体(IL-4R α / IL-13R α 1)结合并将其激活,被激活的受体复合物通过胞内结构域活化转录因子 STAT-6,进而激活下游基因的转录^[41-43]。小鼠 IL-4 碳端结构域是信号传导的必需结构域,该区域缺失或者诱导突变所产生的突变体仍可与 IL-4 和 IL-13 的共用受体链 IL-4R α 结合且有很高的亲和性,但并不能激活胞内的信号转导^[44,45],因此,可作为 IL-4R α 链的拮抗体竞争性地抑制 IL-4 和 IL-13 的信号传递从而缓解哮喘症状^[11]。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一类非致病性的人细小病毒,因其免疫原性弱,感染宿主后有助于外源基因的长期存在并稳定表达,被公认是目前最有前景的基因治疗病毒载体之一^[16-18]。5 型 AAV 的受体为 2,3- 交联唾液酸(2,3-linked sialic acid)在气道顶膜上的表达丰富(23),这使得 AAV5 病毒载体有效转染气道上皮细胞并介导外源基因在局部持续表达成为可能。研究表明,AAV5 病毒载体在 BALB/C 小鼠气道反复给药保证外源基因在局部持续有效表达的同时,既未引起受试小鼠给药部位功能和形态学的改变,也未导致局部炎症反应和细胞凋亡(26),有很好的安全性。本研究以 5 型腺相关病毒作为载体,通过分子克隆技术构建携带小鼠 IL-4 碳端 118 个氨基酸位点处截短的突变体的表达质粒 pSNAV-mIL-4 Δ C22,制备重组的病毒载体 rAAV5-mIL-4 Δ C22 并检测外源突变体蛋白在体外细胞水平的表达情况,发现重组的病毒载体 rAAV5-mIL-4 Δ C22 可以有效介导小鼠 IL-4 碳端缺失突变体在人支气管上皮样细胞系 16HBE 和 BEAS-2B 中正常表达和分泌,为 5 型腺相关病毒介导 IL-4 截短型突变体基因治疗哮喘提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司,AAV 原始表达质粒 pSNAV2.0,辅助质粒 pADHelper 和 pR2C2 以及对照质粒 SNAV-GFP 购自本元正阳基因技术有限公司,携带小鼠野生型 IL-4 的重组克隆载体 pGEM-T-mIL-4 由本研究构建并保存,携带小鼠白介素 4 基因突变体的 AAV 表达质粒 pSNAV-mIL-4 Δ C22 由本研究构建并保存。HEK293T 细胞株购自 ATCC,用添加了 10%FBS 的 DMEN 培养基培养;细胞株 16HBE 和 BEAS-2B 由中国医学科学院药物研究所分子免疫和肿瘤药理实验室提供。

1.2 试剂

DMEM 培养基、青霉素 + 链霉素、胰酶购自 GIBCO 公司;胎牛血清(FBS)购自 PAN Biotech 公司;10 cm 细胞培养皿、6 孔细胞培养板购自 Corning 公司;细胞转染试剂 PEI、总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;小鼠 IL-4 抗体、小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒购自 Abcam 公司;反转录试剂盒、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司; β 肌动蛋白(β -actin)抗体购自 CST 公司;蛋白裂解液(RIPA)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;高灵敏度化学发光检测试剂盒购自北京康为世纪有限公司;核酸染料 DAPI 购自 Sigma 公司;限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Sal*I、DNA 连接酶 I、DNase I、RNase

A 购自 Takara 公司;胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠 IL-4 截短型突变体基因 mIL-4 Δ C22 的克隆和重组表达质粒的构建 分离 C57BL/6 小鼠的脾脏,提取总 RNA,反转录合成 cDNA 一链备用。登录 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Genbank accession number NM_021283)检索野生型小鼠 IL-4 基因的 cDNA 序列并设计引物(上游引物:acggcagagctattgatg,下游引物:aaagcatgggtgctcactactac),以 cDNA 一链为模板,扩增得到小鼠野生型 IL-4 基因片段并克隆到 pGEM-Teasy 载体(Promega)上得到 pGEM-T-mIL-4。测序无误后设计突变引物在野生型小鼠 IL-4 肽链第 119 位氨基酸对应的 cDNA 位点处引入终止密码子,同时在 5' 端引入限制性内切酶 *Kpn*I 识别位点,在 3' 端引入限制性内切酶 *Sal*I 识别位点(上游引物:5'gggGGTACCatgggtctcaacccccagctag3',下游引物:5' tctGTCGACtactcattcatgggtgcagcttatcg3'),PCR 扩增产物胶回收后通过 *Kpn*I 和 *Sal*I 位点 mIL-4 Δ C22 克隆到 AAV 表达质粒,得到重组表达质粒 pSNAV-mIL-4 Δ C22,重组质粒交由上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.3.2 重组腺相关病毒载体 AAV5-mIL-4 Δ C22 的制备 将生长状态良好的 HEK293T 细胞扩传培养瓶。24 小时后细胞生长至 80%融合时,用聚乙烯亚胺(PEI)法将 pSNAV-mIL-4 Δ C22、pADHelper 和 pR2C2 三种质粒共转染 HEK293T 细胞,24 小时后去除含有转染液的培养基,换新鲜 DMEM 培养基,培养 72 小时后收集细胞,冻融、离心后获取上清,以 PEG8000 沉淀、Benzonase 处理、氯仿抽提后离子交换柱层析,超滤及微滤,回收的病毒产物通过荧光定量 PCR 鉴定无误。引物和探针:Q-CMV- 上游:GTACGGTGGGAGGTCTAT- ATAAGCA, Q-CMV- 下游:GGTCCCGGTGTCTTCTATG GA, Q-CMV-P: [FAM]CCTGGAGACGCCATCCACGCTG[TAMRA]。

1.3.3 重组病毒 AAV5-mIL-4 Δ C22 基因组滴度测定 斑点杂交(Dot-blot)法检测纯化的 AAV5-mIL-4 Δ C22 病毒滴度,将标准质粒 SNAV-GFP 准确定量,用稀释缓冲液倍比稀释后分别依次点于尼龙膜(正电荷标记,Roche)上,设三个复孔。待测病毒 AAV5-mIL-4 Δ C22 样品用 DNase I 和 RNase A 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时,提取病毒 DNA,沸水浴 5 分钟变性后置于冰浴中。稀释后依次点膜。用地高辛标记的 CMV 序列作为探针,经预杂交、杂交、洗膜、显色、终止后,根据与待测样本杂交信号强度一致的标准品拷贝数乘以稀释倍数换算出待检测病毒的滴度,即每毫升病毒液的病毒颗粒中含有的基因组拷贝数,单位是 v.g./mL。

1.3.4 重组病毒纯度测定 制备 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶,分离胶浓度为 12%,积层胶浓度为 5%,取纯化后的病毒样本与凝胶加样缓冲液 1:1 混匀后煮沸 5 min 预处理,上样后以积层胶 120 V,分离胶 200 V 电压电泳,电泳完毕后考马斯亮兰染色、洗脱后出现背景清晰的 AAV5 特征性条带。

1.3.5 AAV5 病毒体外转染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞系 将生长状态良好的 16HBE 和 BEAS-2B 细胞以 1×10^5 接种于 35 mm 培养皿,培养 12 小时细胞贴壁后弃上清,加入无血清培养基,分别按 2×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} v.g./mL 设梯度加入带有绿

色荧光蛋白基因的对照病毒 AAV5-GFP, 培养 10 小时后弃上清更换培养基, 分别在 24 小时、48 小时、72 小时在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 随机选取视野计数表达荧光的细胞数, 观察体外感染效率。

1.3.6 小鼠 IL-4 突变体在病毒介导的 16HBE 和 BEAS-2B 细胞系中的表达 将生长状态良好的 16HBE 和 BEAS-2B 细胞以 1×10^5 接种于 35 mm 培养皿, 培养 12 小时细胞贴壁后弃上清, 加入无血清培养基, 分别按 0.5×10^{10} v.g./mL, 2×10^{10} v.g./mL 设梯度加入重组病毒 AAV5-mIL-4 Δ C22, 培养 10 小时后弃去上清更换培养基, 培养 72 小时后分别收集细胞和培养上清。培养上清用 ELISA 试剂盒测定 IL-4 的浓度。细胞裂解后加入上样缓冲液混匀, 煮沸 5 分钟后上样, 积层胶用 60 V 电压分离胶用 120 V 电压进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜、脱脂牛奶封闭, 依次加一抗杂交、二抗孵育、显色后分析结果。

1.4 统计学分析

数据以 SPSS12.0 统计学软件处理。外源蛋白表达情况的检测结果以均值 $\pm$ 标准差表示。比较方法采用方差分析和 t 检验。P 值以 0.05 为统计学差异标准。

2 结果

2.1 小鼠 IL-4 截短型突变体表达质粒的构建

以小鼠脾脏 cDNA 一链为模板, 用 IL-4 基因特异性引物 PCR 扩增得到小鼠 IL-4 基因全长序列, 将扩增产物连接到

pGEM-Teasy 载体上, 经 DNA 测序验证无误得到重组质粒 pGEM-T-mIL-4。原始表达质粒 pSNAV2.0 分别用限制性内切酶 *KpnI* 和 *SaII* 处理后回收大片段得到带有粘性末端的载体骨架备用, 设计小鼠 IL-4 截短型突变体引物, 在小鼠 IL-4 多肽链第 118 位氨基酸对应的密码子后引入终止密码子, 同时在上下游分别引入限制性内切酶识别位点, 通过 PCR 法得到小鼠 IL-4 截短型突变体, *KpnI* 和 *SaII* 消化后克隆到表达质粒 pSNAV2.0 的多克隆位点处, 所得重组 AAV5 表达质粒 pSNAV-mIL-4 Δ C22。小鼠 IL-4 全长及缺失突变体结构如图 1A 所示。质粒上完整的表达盒结构如图 1B: 外源基因的上游为 CMV 即早期启动子, 下游带有 hGH polyA 加尾信号, 表达盒的两侧为 AAV5 反向末端重复序列(L-ITR 和 R-ITR)。

2.2 重组 5 型腺相关病毒载体纯度和滴度

以 SNAV-GFP 为标准质粒, 以 4×10^{12} vg/mL 为起始浓度倍比稀释后在尼龙膜上依次点样, 纯化的待测重组病毒颗粒 rAAV5-mIL-4 Δ C22 同样做倍比稀释后点样, 标准品和待测样本均设三个复孔。以标记的 CMV 序列探针杂交, 显色后如图 2A, 经换算重组病毒 rAAV5-mIL-4 Δ C22 滴度约为 3×10^{11} vg/mL。

AAV5 病毒衣壳由 VP1、VP2、VP3 三种蛋白组成, 分子量分别为 87 kDa, 72 kDa 和 62 kDa, 三种蛋白在病毒中的比例约为 1:1:10, SDS-PAGE 电泳后可见代表 VP1、VP2、VP3 的三条特征条带, 背景清晰, 见图 2B。

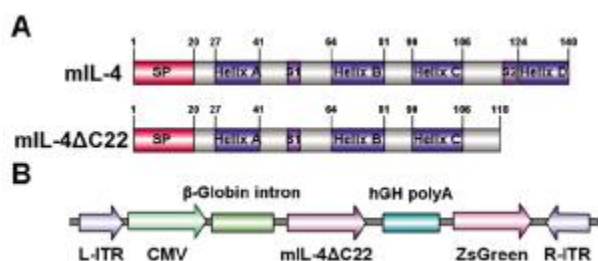


图 1 pSNAV-mIL-4 Δ C22 重组载体的构建

A. 小鼠 IL-4 全长及缺失突变体示意图。SP: 信号肽; Helix: α 螺旋; S: β 折叠。B. pSNAV-mIL-4 Δ C22 表达盒结构示意图。L-ITR: 左侧反向重复序列; CMV: CMV 启动子; β -Globin intron: β 球蛋白内含子; hGH polyA: 人生长激素 polyA 信号; ZsGreen: 造礁珊瑚绿色荧光蛋白; R-ITR: 右侧反向重复序列。

Fig.1 Construction of pSNAV-mIL-4 Δ C22 recombinant plasmid

A. Full-length mouse IL-4 and its truncated mutant. SP: Signal peptide; Helix: α -Helix; S: β -sheet. B. pSNAV-mIL-4 Δ C22 expression cassette.

L-ITR: Left inverse terminal repeat; CMV: immediate early CMV promoter; hGH polyA: human growth hormone polyA signal; ZsGreen: Reef coral *Zoanthus* sp. green fluorescent protein; R-ITR: Right inverse terminal repeat.

2.3 5 型腺相关病毒介导的绿色荧光蛋白 GFP 在 16HBE 和 BEAS-2B 细胞系中的表达

我们将对照病毒 AAV5-GFP 瞬时感染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞, 分别在感染后 36 小时、72 小时通过荧光显微镜观察 GFP 在 16HBE 和 BEAS-2B 细胞中的表达情况, 感染

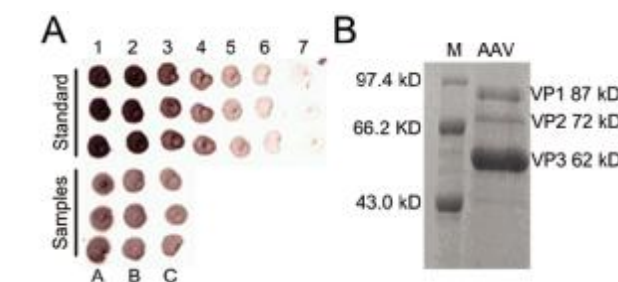


图 2 重组 AAV5 病毒颗粒滴度和纯度。

A. 点杂交法检测 rAAV5-mIL-4 Δ C22 病毒颗粒的滴度。1-7: 起始滴度为 4×10^{12} vg/mL 的标准品经 1:2 倍比稀释。A、B、C: 待测重组 AAV5 样本 1:2 倍比稀释。B. SDS-PAGE 电泳分析重组载体 rAAV5-mIL-4 Δ C22 的纯度, M: 低分子量蛋白标记物, VP1, VP2, VP3 分别为特征性 AAV5 蛋白质条带。

Fig.2 Recombinant AAV5 vector titer and purity

A. The titer of rAAV5-mIL-4 Δ C22 by dot blot analysis. 1-7: Standard substitute with initial titer of 4×10^{12} vg/mL as double dilution. A, B, C: Sample rAAV5-mIL-4 Δ C22 as double dilution. B. SDS-PAGE of rAAV5-mIL-4 Δ C22, M: Protein marker, VP1, VP2, VP3 is specific AAV5 protein bands.

36 小时后在 16HBE 和 BEAS-2B 细胞中, 2.0×10^9 vg/mL、 1.0×10^{10} vg/mL、 2.0×10^{10} vg/mL AAV5-GFP 病毒感染后的细胞均可清晰看到绿色荧光蛋白的表达, 感染 72 小时后可见各滴度病毒感染后的 16HBE 和 BEAS-2B 细胞中绿色荧光蛋白的表达均明显增强(见图 3)。

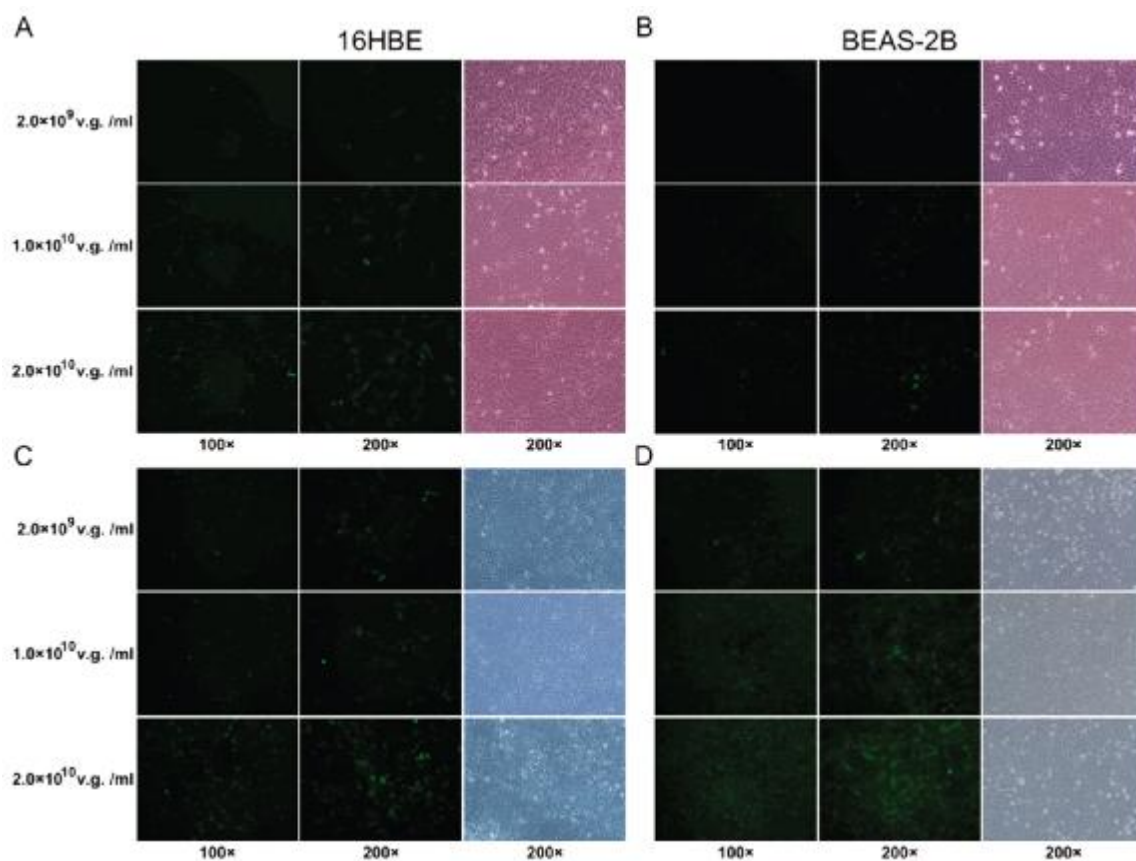


图3 重组病毒载体 AAV5-GFP 感染 16HBE 细胞和 BEAS-2B 细胞后荧光蛋白的表达

A. AAV5-GFP 感染 16HBE 细胞 36 小时后荧光蛋白表达情况。B. AAV5-GFP 感染 BEAS-2B 细胞 36 小时后荧光蛋白表达情况。C. AAV5-GFP 感染 16HBE 细胞 72 小时后荧光蛋白表达情况。D. AAV5-GFP 感染 BEAS-2B 细胞 72 小时后荧光蛋白表达。

Fig.3 GFP expression in 16HBE and BEAS-2B cells following AAV5-GFP transfection

A. GFP expression in 16HBE cells 36 hours after AAV5-GFP transfection. B. GFP in BEAS-2B cells 36 hours after AAV5-GFP transfection. C. GFP in 16HBE cells 72 hours after AAV5-GFP transfection. D. GFP in BEAS-2B cells 72 hours after transfection.

2.4 AAV5 介导白介素-4 突变体在 16HBE 和 BEAS-2B 细胞系中的表达

为了验证本研究构建的重组病毒 AAV5mIL-4ΔC22 感染呼吸道细胞系以后能否正常分泌表达小鼠拮抗型 IL-4 突变体蛋白产物, 我们用 rAAV5mIL-4ΔC22 分别感染 16HBE 和 BEAS-2B 细胞, 在感染后 72 小时后收集细胞和培养上清进行检测。Western-blot 实验结果表明, 重组病毒感染后的 16HBE 和 BEAS-2B 细胞 IL-4 突变体蛋白明显表达(图 4A, B)。ELISA 检测结果表明重组病毒感染后的细胞培养上清中有 IL-4 突变体蛋白的分泌(图 4C)。

3 讨论

腺相关病毒(AAV)作为基因治疗载体免疫原性弱、宿主范围广, 目前有 9 种血清型的 AAV 已被分离, 不同血清型的主要差别在于病毒外壳蛋白序列的差异以及该差异所导致的各血清型 AAV 在不同组织感染效率和表达量的差异。2 型 AAV 是研究最早且生物学特征最为清楚的一种 AAV 载体, 迄今应用于临床试验的有 AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9 以及 AAV5。有学者在小鼠鼻内滴注 5 型 AAV 后发现其转染转染呼吸道上皮细胞并在呼吸道持续表达外源蛋白的能力显著强于 AAV2, 表达高于 AAV2 近 50 倍^[16], 且局部给药后

AAV5 介导的外源基因在呼吸道的表达时间至少可以持续 12 个月^[17], 有报道称 5 型 AAV 感染效率低于 AAV1, 但是介导外源基因对疾病的治疗效果并没有相应的减低, 机体对 AAV5 的免疫清除明显较 AAV1 缓慢^[18], 这可能与 5 型 AAV 比其他血清型免疫原性更弱有关, 在先前的两项体内实验的研究中发现 5 型 AAV 产生中和抗体的概率与 2 型 AAV 相比分别是 3.2% 和 59%, 18% 和 30%^[19,20], AAV5 产生中和抗体的概率与 AAV8 相比则分别为 3.2% 和 19%^[19]。另有报道证实, AAV5 病毒载体在小鼠气道反复给药确保外源基因在局部持续表达的同时, 既未引起受试小鼠给药部位功能和形态学的改变, 也未导致局部炎症反应和细胞凋亡^[21], 作为基因治疗载体有很好的安全性和有效性^[22,23]。

支气管哮喘是以慢性气道炎症为特征的异质性疾病, 表现为气道高反应性。临床治疗非常棘手, 反复发作的喘息、气急、胸闷、咳嗽等症状严重影响患者工作、生活, 甚至威胁到患者生命。免疫病理学机制将哮喘发生分为三个阶段: 第一个阶段是初级致敏阶段, 包括过敏原刺激、诱导 T 淋巴细胞活化、IL-4 产生、IgE 合成和效应细胞释放介质; 第二个阶段为慢性过敏性炎症阶段, 以 Th1/Th2 细胞比例降低、嗜酸性粒细胞活化、聚集为特征; 第三个阶段是由慢性炎症引起的气道重塑^[24]。Th2 类细胞因子 IL-4 和 IL-13 是支气管哮喘发病机制中两类非常重要的

细胞因子,通过与细胞表面的特异性受体结合来发挥其生物学作用,在维持慢性气道炎症及气道高反应性等众多病理过程中均起着至关重要的作用。

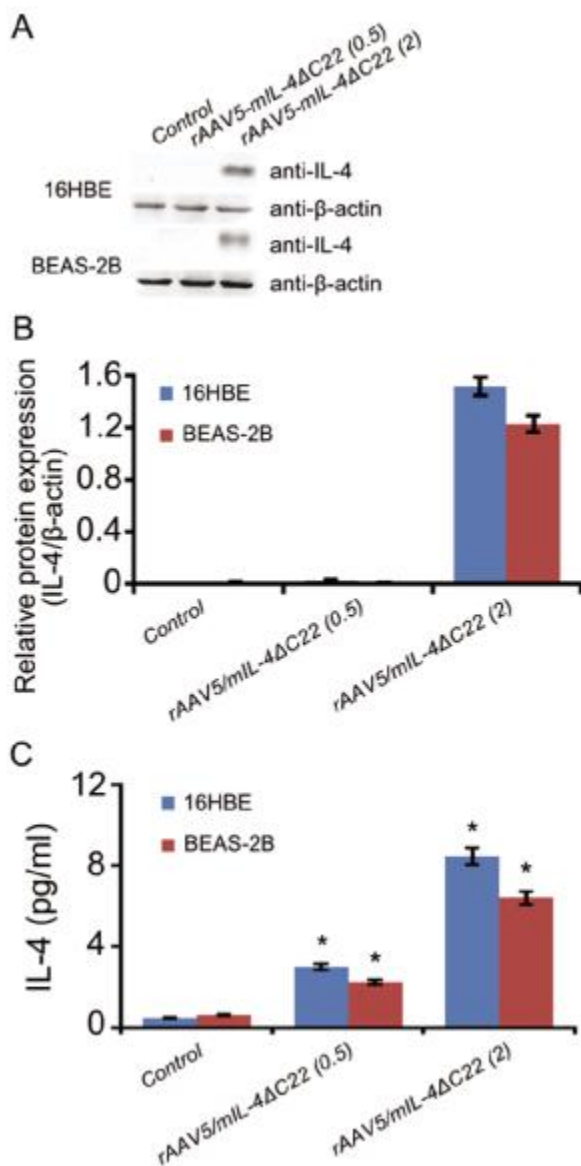


图4 重组病毒rAAV5mIL-4ΔC22介导外源蛋白在16HBE和BEAS-2B中的表达

A, B. western blot 检测外源蛋白在16HBE和BEAS-2B中的表达。
C. ELISA 检测外源蛋白在16HBE和BEAS-2B细胞培养上清中的表达情况。rAAV5mIL-4ΔC22(0.5): 0.5×10^{10} vg/mL 重组病毒载体; rAAV5mIL-4ΔC22(2): 2×10^{10} vg/mL 重组病毒载体。*: $P < 0.001$ 。

Fig.4 rAAV5mIL-4ΔC22 mediated exogenous protein expression in 16HBE and BEAS-2B cells

A, B. Western blot detection of exogenous protein expression in rAAV5mIL-4ΔC22 transfected 16HBE and BEAS-2B. C. ELISA assay of exogenous protein expression in rAAV5mIL-4ΔC22 transfected 16HBE and BEAS-2B cell culture supernatant. rAAV5mIL-4ΔC22(0.5): 0.5×10^{10} vg/mL of recombinant virus vector; rAAV5mIL-4ΔC22(2): 2×10^{10} vg/mL of recombinant virus vector. *: $P < 0.001$.

IL-4和IL-13都是含有四个α螺旋的短肽链细胞因子^[29]。结构生物学研究表明,细胞因子IL-4与细胞表面受体结合时,

先与IL-4Rα链结合形成二元复合物,然后再募集γC链或IL-13Rα1链形成三元复合物;IL-13则先与IL-13Rα1链结合形成二元复合物,然后再募集IL-4Rα链形成三元复合物^[14]。IL-4与IL-4Rα链的特异性结合主要依赖于IL-4肽链第一个α螺旋中的Glu9和第三个α螺旋中的Arg88与IL-4Rα链的Tyr13, Tyr183, Ser70和Asp72位点之间的相互作用^[14]。IL-4、IL-13与其细胞表面受体结合后激活胞内Jak/STAT信号通路,其中IL-4Rα链激活Jak1, γC链激活Jak3, IL-13Rα1链激活Tyk2^[26]。IL-4第四个α螺旋结构以及邻近序列的缺失或突变不影响其与受体IL-4Rα/γC或IL-4Rα/IL-13Rα1的结合,但是不能够激活胞内的Jak/STAT信号通路^[14,15]。研究发现,Arg121、Tyr124和Ser125C三个位点突变的人IL-4突变体可以正常结合IL-4Rα但丢失了信号转导活性,被认为是IL-4Rα的拮抗剂,可对正常IL-4和IL-13的信号传递产生竞争性抑制^[27,28]。Q116或者Y119位点缺失的小鼠IL-4突变体也能够与IL-4Rα正常结合但不能传导信号,可中断IL-4诱导的细胞增殖、分化及IgE的产生^[29]。上述信号传递所必需的位点均位于IL-4肽链的碳端结构域,有学者将小鼠IL-4碳端的22个氨基酸缺失后,发现该突变体在体外能够抑制IL-4和IL-13诱导的STAT6磷酸化和IgE的产生,在抗原诱导的气道高反应小鼠中可抑制肺部嗜酸性粒细胞的聚集、气道高反应和IgE的产生^[30]。作为信号转导的必需结构域,IL-4碳末端区域突变或缺失后不能激活胞内的信号转导,但仍可与细胞表面受体特异性结合并有很好的亲和力,可作为IL-4Rα链的拮抗剂来有效阻断IL-4和IL-13介导的下游信号通路从而缓解气道高反应性和IgE的大量分泌^[4]。因此,将碳端22个氨基酸缺失的IL-4突变基因序列导入体内,使其持续稳定的表达并分泌丢失信号传导功能的截短型IL-4,靶向地阻断IL-4和IL-13介导的下游信号,将是哮喘基因治疗的一种新策略^[4,11-13]。

本研究制备的重组腺相关病毒载体rAAV5mIL-4ΔC22携带的外源基因所表达得小鼠IL-4截短型突变体蛋白,就是这样一种IL-4Rα链的拮抗剂。我们通过PCR诱导缺失突变成功构建了小鼠IL-4截短型突变体表达序列mIL-4ΔC22,长度357bp,表达产物仅118个氨基酸,有助于制备理想滴度的重组病毒载体,确保治疗基因的高效表达。构建的表达质粒pSNAV-mIL-4ΔC22通过聚乙烯亚胺(PEI)法将和辅助质粒pADHelper和pR2C2共转染HEK293细胞制备重组病毒rAAV5mIL-4ΔC22,经荧光定量PCR鉴定后纯化。点杂交法测定病毒的滴度为 3×10^{11} vg/mL,蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳及染色后显示明显的VP1、VP2、VP3特异性蛋白条带,扫描计算VP1、VP2、VP3蛋白总量占总蛋白量的百分比,表明病毒产物具有高的滴度和纯度。制备重组AAV5病毒载体在体外转染细胞后培养上清中有外源蛋白产物,证明所构建的mIL-4ΔC22突变体DNA编码序列和重组病毒载体rAAV5mIL-4ΔC22有很好的结构完整性和功能活性,能够正确表达碳端信号传导结构域缺失的小鼠IL-4蛋白突变体并分泌到细胞外,为下一步基因治疗提供了很好的生物学工具和前提。

本研究成功构建了含有小鼠IL-4拮抗型突变体蛋白DNA序列的表达质粒,制备的重组的5型腺相关病毒载体可有效感染人支气管上皮来源的细胞系,经重组AAV5病毒载体感染的

细胞可有效表达小鼠 IL-4 拮抗型突变体并将蛋白产物分泌到细胞外, 为以 IL-4 受体 α 链为靶向的哮喘基因治疗奠定了生物学基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Lui JK, Lutchen KR. The role of heterogeneity in asthma: a structure-to-function perspective[J]. Clin Transl Med, 2017, 6(1): 29
- [2] Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, et al. Asthma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15025
- [3] Bollmeier S: Clinical updates on the management of asthma [J]. Am J Manag Care, 2017, 23(1 Suppl): S3-S11
- [4] Walsh GM. Anti-IL-4/-13 based therapy in asthma [J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(3): 349-352
- [5] Tabatabaian F, Ledford DK. Omalizumab for severe asthma: toward personalized treatment based on biomarker profile and clinical history [J]. J Asthma Allergy, 2018, 11: 53-61
- [6] Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140(6): 1485-1498
- [7] Darveaux J, Busse WW. Biologics in asthma--the next step toward personalized treatment [J]. J Allergy Clin Immunol Prac 2015, 3(2): 152-160; quiz 161
- [8] Walsh GM. Biologics targeting IL-5, IL-4 or IL-13 for the treatment of asthma - an update [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2017, 13(2): 143-149
- [9] Doran E, Cai F, Holweg CTJ, et al. Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders[J]. Front Med (Lausanne) 2017, 4: 139
- [10] Wang T, Secombes CJ. The evolution of IL-4 and IL-13 and their receptor subunits[J]. Cytokine, 2015, 75(1): 8-13
- [11] Ranasinghe C, Trivedi S, Wijesundara DK, et al. IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(4): 437-442
- [12] Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NMH. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2017, 13(5): 425-437
- [13] Karo-Atar D, Bitton A, Benhar I, et al. Therapeutic Targeting of the Interleukin-4/Interleukin-13 Signaling Pathway[J]. In Allergy and Beyond. BioDrugs, 2018
- [14] LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system [J]. Cell, 2008, 132(2): 259-272
- [15] Walter MR, Cook WJ, Zhao BG, et al. Crystal structure of recombinant human interleukin-4 [J]. J Biol Chem, 1992, 267(28): 20371-20376
- [16] Zabner J, Seiler M, Walters R, et al. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer[J]. J Virol, 2000, 74(8): 3852-3858
- [17] Sumner-Jones SG, Davies LA, Varathalingam A, et al. Long-term persistence of gene expression from adeno-associated virus serotype 5 in the mouse airways[J]. Gene Ther, 2006, 13(24): 1703-1713
- [18] Guggino WB, Benson J, Seagrave J, et al. A Preclinical Study in Rhesus Macaques for Cystic Fibrosis to Assess Gene Transfer and Transduction by AAV1 and AAV5 with a Dual-Luciferase Reporter System [J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2017, 28(3): 145-156
- [19] Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(6): 704-712
- [20] Halbert CL, Miller AD, McNamara S, et al. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(4): 440-447
- [21] Martini SV, Fagundes SS, Schmidt AC, et al. Does the use of recombinant AAV5 in pulmonary gene therapy lead to lung damage? [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2009, 168(3): 203-209
- [22] Bevaart L, Aalbers CJ, Vierboom MP, et al. Safety, Biodistribution, and Efficacy of an AAV-5 Vector Encoding Human Interferon-Beta (ART-I02) Delivered via Intra-Articular Injection in Rhesus Monkeys with Collagen-Induced Arthritis [J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2015, 26(2): 103-112
- [23] Srivastava A, Carter BJ. AAV Infection: Protection from Cancer[J]. Hum Gene Ther, 2017, 28(4): 323-327
- [24] Loo SL, Wark PAB. Recent advances in understanding and managing asthma[version 1; referees: 2 approved] F1000Research[M]. 2016, 5 (F1000 Faculty Rev): 2052
- [25] Walter MR, Cook WJ, Zhao BG, et al. Crystal Structure of Recombinant Human Interleukin-4 [J]. J Biol Chem, 1992, 267(28): 20371-20376
- [26] Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps [J]. Science, 2003, 300(5625): 1527-1528
- [27] David Richter, Ignacio Moraga, Hauke Winkelmann, et al. Ligand-induced type II interleukin-4 receptor dimers are sustained by rapid re-association within plasma membrane microcompartments [J]. Nat Commun, 2017, 14(8): 15976
- [28] Hurdal R, Brombacher F. Interleukin-4 Receptor Alpha: From Innate to Adaptive Immunity in Murine Models of Cutaneous Leishmaniasis Front[J]. Immunol, 2017, (8): 1354
- [29] Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes [J]. Front Immunol, 2018, 7(9): 888
- [30] Binita Kane, Stephen J Fowler, Rob Niven. Refractory asthma - beyond step 5, the role of new and emerging adjuvant therapies [J]. Chron Respir Dis, 2015, 12(1): 69-77