

·论 著·

重组病毒 rAAV2-PD-L1 的构建及其转染小鼠血管内皮细胞的生物学效应

康晓燕¹,王孟龙^{2*},董刚¹,李瑾¹,钱海华¹,殷正丰¹

(1.第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438;2.南方医科大学南方医院肝胆外科,广州 510515)

[摘要] 目的:构建腺相关病毒 rAAV2 介导的 PD-L1 表达系统,检测感染 rAAV2-PD-L1 的血管内皮细胞共刺激 T 细胞分泌细胞因子的作用。方法:以鼠肝脏组织来源的总 RNA 为模板,应用 RT-PCR 扩增 PD-L1 cDNA,克隆入穿梭质粒 pSNAV1,脂质体法转染包装细胞 BHK21,筛选获得重组病毒 rAAV2-PD-L1。以 rAAV2-PD-L1 感染小鼠血管内皮细胞株 2F-2B 后,与活化的小鼠 T 细胞共培养,ELISA 法检测培养上清 IFN 浓度。结果:测序结果表明,克隆的小鼠 PD-L1 cDNA 和重组质粒 pSNAV-PD-L1 序列正确。重组病毒 rAAV2-PD-L1 经 PCR 扩增出目的基因片段,在 SDS-PAGE 电泳上显示 AAV2 三条特征带,纯度大于 98%。病毒物理滴度为 4×10^{12} virus genome/ml;蛋白浓度为 0.355 mg/ml。感染 rAAV2-PD-L1 的血管内皮细胞高表达 PD-L1。活化 T 细胞与其共培养后,培养上清 IFN 浓度显著降低。结论:构建的重组病毒 rAAV2-PD-L1 可感染血管内皮细胞,并且共刺激可抑制活化 T 细胞分泌 IFN。

[关键词] PD-L1;腺相关病毒;内皮细胞;T 淋巴细胞

[中图分类号] Q 784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1186-04

Construction of recombinant adeno-associated virus vector rAAV2-PD-L1 and its biological efficiency in transfecting mouse vascular endothelial cells

KANG Xiao-yan¹, WANG Meng-long^{2*}, DONG Gang¹, LI Jin¹, QIAN Hai-hua¹, YIN Zheng-feng¹ (1. Laboratory of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Southern Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant adeno-associated virus vector rAAV2-PD-L1 and to investigate the biological efficiency of rAAV2-PD-L1-transfected vascular endothelial cells in co-stimulating secretion of cytokines by T cells. **Methods:** Mouse PD-L1 cDNA was amplified by RT-PCR from total RNA of mouse liver tissues and was cloned into shuttle vector pSNAV1; the products were then transferred into BHK21 cells by lipofectamine and rAAV2-PD-L1 was screened out. Mouse vascular endothelial cell line 2F-2B was infected with rAAV2-PD-L1 and were co-cultured with activated mouse T cells, and the IFN content was identified by ELISA in the supernatant. **Results:** The sequences of PD-L1 cDNA and pSNAV-PD-L1 were confirmed to be correct. The recombinant rAAV2-PD-L1 was verified by PCR and SDS-PAGE analysis. The virus physical titer was 4×10^{12} virus genome/ml and the protein concentration was 0.355 mg/ml. There was a high expression of PD-L1 in mouse vascular endothelial cells infected with rAAV2-PD-L1. The content of IFN in the culture supernatant was significantly decreased 48 hours after co-culture. **Conclusion:** The recombinant rAAV2-PD-L1 can infect vascular endothelial cells and inhibit secretion of IFN by activated T cells through co-stimulation.

[KEY WORDS] programmed death ligand 1; adeno-associated virus; endothelial cells; T lymphocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1186-1189]

PD-L1 (programmed death-1 ligand 1) 是一个新近发现的 B7 家族分子,广泛表达在多种非淋巴组织,与活化 T 细胞表面的 PD-1 受体相互作用,下调 T 细胞抗原抗体信号转导,在调节免疫反应,维持自我耐受方面可能具有重要作用^[1,2]。为了建立表达 PD-L1 的血管内皮细胞共刺激活化 T 细胞的试验模型,进一步研究 PD-L1 基因表达的生物学效应,本研究克隆了小鼠 PD-L1 cDNA,构建、包装了以新型腺相关病毒介导的 PD-L1 重组病毒(rAAV2-PD-L1),并体外转染小鼠血管内皮细胞株 2F-2B,初步分析过表达 PD-L1 的血管内皮细胞对活化 T 细胞

分泌细胞因子 IFN 的影响。

1 材料和方法

1.1 质粒、宿主菌、病毒载体及细胞株 pUCmT (上海申能博彩生物科技有限公司); AAV2 穿梭质粒 pSNAV1、BHK21 细胞和具有 AAV2 重组、包装

[基金项目] 国家自然科学基金(30371356)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30371356)。

[作者简介] 康晓燕,硕士生。

*Corresponding author. E-mail: mlwangwangml2000@yahoo.com

功能的重组 1 型单纯疱疹病毒 HSV1-RC 以及介导绿色荧光蛋白基因表达的重组病毒 rAAV2-EGFP (本元正阳基因技术股份有限公司)。质粒在大肠杆菌 JM109 (本实验室保存) 中扩增。BHK21 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养。小鼠血管内皮细胞株 2F-2B (ATCC) 在含 10% 胎牛血清、4.5 g/L 葡萄糖的 DMEM 液中培养。

1.2 工具酶和其他试剂 T4 DNA 连接酶、*Pfu* 酶 (上海申能博彩生物科技有限公司); 各种限制性内切酶 (生物晶美工程上海分公司); TRIzol (MBI); AMV 逆转录酶 (Sangon); DL2000 marker、DL15000 marker (TaKaRa 公司); 脂质体 Lipofectamine (Invitrogen); PD-L1 抗体 (Santa Cruz); CD3 抗体 (R & D Systems); Percoll™ (Amersham Pharmacia Biotech); IFN 检测试剂盒 (Pharmin-gen)。

1.3 鼠 PD-L1 cDNA 的克隆 应用 TRIzol 试剂从新鲜鼠肝脏组织中提取总 RNA, 以 AMV 逆转录酶、随机六聚体引物进行逆转录, 并以逆转录产物作模板进行 PCR。上游引物 (引入 KOZA K 序列): 5'-ACT CAC CAT GAG GAT ATT TGC TGG CAT T-3; 下游引物: 5'-ATT ACG TCT CCT CGA ATT GTG TAT C-3。目的扩增片段长度为 879 bp。反应条件如下: 94 5 min, 94 45 s, 55 1 min, 72 1 min 进行 30 个循环后于 72 延伸 10 min。所得 PCR 产物连接入载体 pUCmT, 转化、筛选, 得到质粒 pUCmT-PD-L1, 经酶切、测序鉴定。

1.4 重组病毒 rAAV2-PD-L1 的构建、包装与制备 用 *EcoR* + *Sal* 双酶切 pUCmT-PD-L1, 回收 900 bp 左右大小的目的基因片段, 连接入相同切点的穿梭质粒 pSNAV1, 转化, 筛选, 获得重组质粒 pSNAV-PD-L1, 经酶切、PCR 和测序鉴定。大量抽提质粒 pSNAV-PD-L1, 以脂质体转染 BHK21 细胞, 在 G418 压力下筛选, 得到稳定携带目的质粒的细胞系。转瓶扩大培养细胞, 在辅助病毒 HSV1-RC (含有编码病毒复制、包装必需蛋白的 rep、cap 基因) 感染参与下包装病毒 48 h, 细胞完全病变后, 将细胞洗脱至培养液中, 采用“氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提”纯化重组 AAV, 最后得到具有感染性的重组病毒 rAAV2-PD-L1。对重组病毒 rAAV2-PD-L1 进行理化分析, 包括 PCR 扩增目的基因片段、SDS-PAGE 鉴定纯度、BCA 法测定病毒

蛋白浓度检测、点杂交法测定病毒滴度。

1.5 rAAV2-PD-L1 体外感染小鼠血管内皮细胞株 2F-2B 2F-2B 细胞贴壁培养后 12 h, 加入病毒, 继续培养 1 h。吸去液体, 补给新鲜培养液, 并加入丁酸钠, 终浓度为 20 mmol/L。48 h 后收集感染 rAAV2-PD-L1 的细胞, 用 Western 印迹检测 PD-L1 的表达情况。而感染 rAAV2-EGFP 的细胞则在荧光显微镜下直接观察 EGFP 表达情况。

1.6 感染 rAAV2-PD-L1 的小鼠血管内皮细胞共刺激活化 T 细胞 用 Percoll™ 细胞分离液通过不连续密度离心法分离 BALB/c 小鼠外周血单核细胞, 通过尼龙-毛柱纯化 T 细胞 (> 75% CD3⁺ 细胞), 以 22 × 10⁶ 细胞/ml 在含有 Con A (3 μg/ml) 和 CD3 抗体 (5 μg/ml) 的培养液中与感染重组病毒的 2F-2B 细胞共培养, 分别在 0、24 和 48 h 后收集上清, 用 ELISA 检测 IFN 浓度。每个试验重复 3 次, 结果取平均值。

2 结果

2.1 鼠 PD-L1 cDNA 的鉴定 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳显示单一条带, 大小与理论预期值一致 (图 1A)。pUCmT-PD-L1 经 *EcoR* / *Sal* 双酶切后释放出的条带大于 PCR 产物长度, 约 1 kb 左右, 中间一条较亮的条带是没有切开的原始质粒 (图 1B)。测序结果与 GenBank 数据库资料比对, 全部序列和阅读框架正确。

2.2 重组质粒 pSNAV-PD-L1 的鉴定 pSNAV-PD-L1 经 PCR 和 *EcoR* / *Sal* 双酶切鉴定, 均得到比 1 kb 略小的片段 (图 2A、图 2B)。测序结果也证实构建正确。

2.3 重组病毒 rAAV2-PD-L1 质量鉴定 rAAV2-PD-L1 经 PCR 扩增, 结果与图 1A 类似 (未显示)。经 SDS-PAGE 电泳, rAAV2-PD-L1 可显示 AAV2 三条特征带, 纯度大于 98%。rAAV2/11TNFR:Fc 病毒颗粒经点杂交方法测定, 病毒物理滴度为 4 × 10¹² virus genome/ml。BCA 法测得的病毒蛋白浓度为 0.355 mg/ml。

2.4 感染 rAAV2-PD-L1 的血管内皮细胞表达产物和生物学活性鉴定 感染 rAAV2-EGFP 的血管内皮细胞在荧光显微镜下可观察到大量荧光; 与亲本细胞和感染 rAAV2-EGFP 的细胞相比, 感染 rAAV2-PD-L1 的细胞明显表达 PD-L1 (图 3)。ELISA 检测结果显示, 与感染 rAAV2-EGFP 的血

管内皮细胞相比,感染 rAAV2-PD-L1 的细胞可抑制活化 T 细胞分泌 IFN 水平(图 4, $P < 0.01$)。

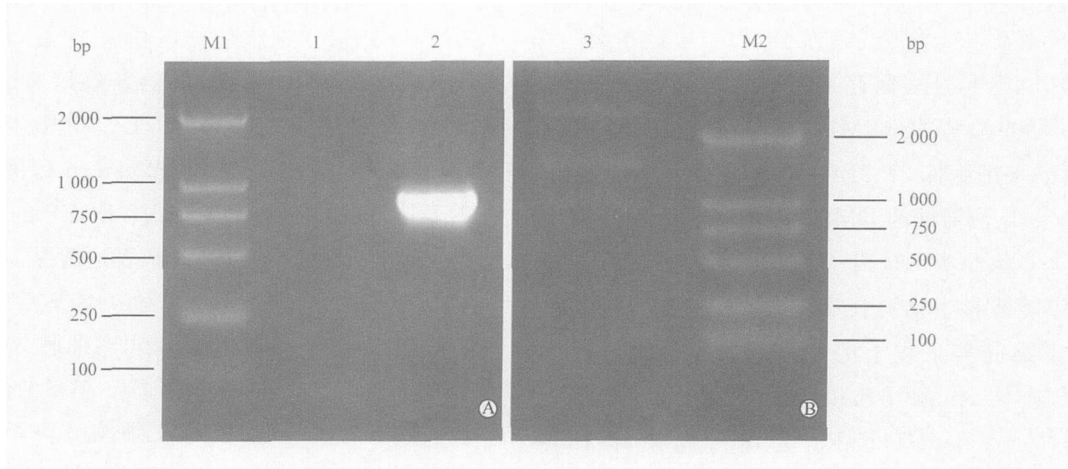


图 1 RT-PCR 扩增鼠 PD-L1 cDNA(A) 及质粒 pUCmr T-PD-L1 酶切鉴定(B) 结果

Fig 1 RT-PCR amplification of mouse PD-L1 cDNA(A) and endonuclease digestion of plasmid pUCmr T-PD-L1(B)
M1, M2: DL 2 000 marker; 1: Negative control; 2: RT-PCR product; 3: pUCmr T-PD-L1/ *EcoR* + *Hind*

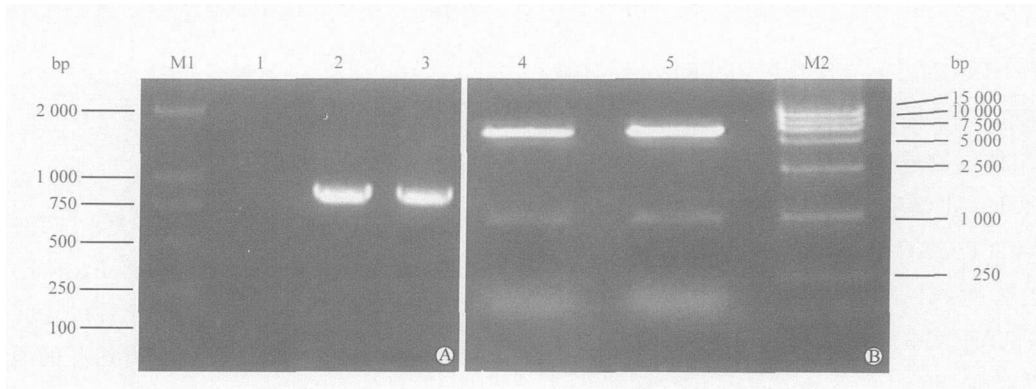


图 2 质粒 pSNAV-PD-L1 PCR(A) 及酶切(B) 鉴定结果

Fig 2 Analysis of plasmid pSNAV-PD-L1 by PCR(A) and endonuclease digestion(B)

M1:DL 2 000 marker; M2:DL 15 000 marker; 1: Negative control; 2: Template of pSNAV-PD-L1; 3: Template of pUCmr T-PD-L1; 4, 5: pSNAV-PD-L1/ *EcoR* + *Sal*

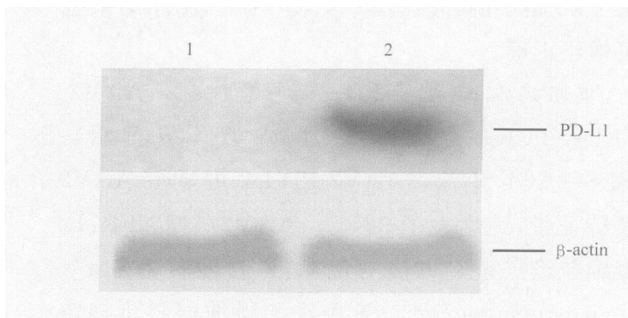


图 3 Western 印迹检测病毒感染细胞表达 PD-L1

Fig 3 Expression of PD-L1 in cells after infected with virus by Western blot

1: Infected with rAAV2-EGFP; 2: Infected with rAAV2-PD-L1

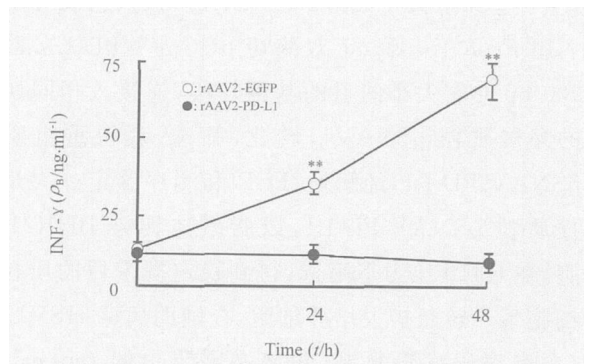


图 4 表达 PD-L1 的 2F2B 细胞抑制 T 细胞分泌 IFN

Fig 4 IFN levels secreted by T cells after treated with PD-L1 expressed in 2F2B cells

$n = 3, \bar{x} \pm s; ** P < 0.01$ vs rAAV2-PD-L1

3 讨论

T 细胞活化除需要 TCR 转导的第一信号外,还需要共刺激分子转导的第二信号的参与。B7-1 和 B7-2 分子是人们熟知的共刺激分子,与其相应受体 CD28 分子或 CTLA-4 分子相互作用,在 T 细胞分化、生长和死亡中发挥重要作用^[3,4]。PD-L1 又称 B7-H1 (B7 homolog 1),是近来发现的一个细胞表面糖蛋白,属于共刺激分子 B7 家族的新成员。初步研究显示,PD-L1 与相应受体结合,参与细胞免疫和体液免疫应答的调节^[1,2,5]。小鼠 PD-L1 基因于 2000 年被克隆,与人 PD-L1 具有 69% 氨基酸同源性^[6]。

已有的研究报道提示,血管内皮细胞具有潜在的直接调节淋巴细胞激活和消除免疫反应,抑制免疫疾病发生的双重作用,而 PD-L1 可能是其涉及的重要分子^[7-9]。为了研究表达 PD-L1 的血管内皮细胞共刺激活化 T 细胞在体内外产生的生物学效应,本研究通过 RT-PCR 克隆了小鼠 PD-L1 基因,并将 PD-L1 基因重组入腺相关病毒载体,通过包装,获得具有感染能力的 rAAV2-PD-L1 重组病毒颗粒,然后感染小鼠血管内皮细胞株 2F-2B,使其高表达 PD-L1。已有研究表明,固定化的 PD-L1 共刺激 T 细胞,使其分泌细胞因子减少。因此,本研究初步检测了 T 细胞与感染不同重组病毒的血管内皮细胞共培养后培养上清 IFN 的浓度。将感染 rAAV2-PD-L1 的血管内皮细胞与活化 T 细胞共培养,连续检测培养液中细胞因子含量。为了排除感染腺相关病毒本身可能影响实验结果真实性,我们设置了感染 rAAV2-EGFP 的血管内皮细胞作为对照。实验结果显示,高表达 PD-L1 的血管内皮细胞可导致 T 细

胞分泌 IFN 降低。这一结果表明本研究建立的表达 PD-L1 的血管内皮细胞共刺激活化 T 细胞的试验模型具有可用性,为进一步研究 T 细胞在不同条件下对不同基因型血管内皮细胞的应答,以及这些应答引起的病理过程奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Zha Y, Blank C, Gajewski TF. Negative regulation of T-cell function by PD-1[J]. *Crit Rev Immunol*, 2004, 24:229-237.
- [2] Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance[J]. *J Exp Med*, 2006, 203:883-895.
- [3] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23:515-548.
- [4] Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands[J]. *Genome Biol*, 2005, 6:223.
- [5] Tamura H, Dong H, Zhu G, et al. B7-1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function[J]. *Blood*, 2001, 97:1809-1816.
- [6] Carter L, Ling V, Bowman MR, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192:1027-1034.
- [7] Rodig N, Ryan T, Allen JA, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytotoxicity[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33:3117-3126.
- [8] Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells[J]. *Microcirculation*, 2002, 9:133-145.
- [9] Mazanet MM, Hughes CC. B7-1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis[J]. *J Immunol*, 2002, 169:3581-3588.

[收稿日期] 2006-05-16

[修回日期] 2006-09-19

[本文编辑] 尹 茶

《康复护理高级教程》已出版

本书涵盖了康复护理的理论基础、康复评估的判断标准、临床康复护理的共性问题以及常见疾病的康复护理等内容,适合护理、康复专业学生及临床医生、护士阅读参考。

由第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 7-81060-609-3/R. 471,定价:52.00 元。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮编:200433