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^{2△} (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 adenoassociated 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× 10¹¹ 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-ru^{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-4 Δ C22 was constructed through gene clone technology, a recombinant virus vector rAAV5-mIL-4 Δ C22 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-4 Δ C22 was verified by DNA sequencing and the titer of virus vector rAAV5-mIL-4 Δ C22 is about 3× 10¹¹ vg/mL. 16HBE and BEAS-2B expressed GFP lastly and stably when 36 hours after receiving rAAV-GFP trensfection. **Conclusions:** Our study constructed recombinant vector rAAV5-mIL-4 Δ C22 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¹⁵⁹。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

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:<u>tianlch@126.com</u> △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:<u>huanggr2011@126.com</u> (收稿日期:2018-06-28 接受日期:2018-07-23)

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81300016,31500704)

中的 IL-4Rα 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-4Rα/IL-13Rα1)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^[4,11-13]。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-4Rα 结合且有很 高的亲和性,但并不能激活胞内的信号转导^[14,15],因此,可作为 IL-4Rα 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^[1618]。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-4ΔC22,制备重组的病毒载体 rAAV5-mIL-4ΔC22 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-4ΔC22 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-4ΔC22 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 Kpnl 和 Sall、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-4ΔC22 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:acggcacagagctattgatg,下游引物:aaagcatggtggctcagtactac),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 Kpnl 识别位点,在3'端引入限制 性内切酶 Sall 识别位点(上游引物:5'gggGGTACCatgggtctcaacccccagcta3', 下游引物:5' tctGTCGACctactcattcatggtgcagcttatcg 3'), PCR 扩增产物胶回收后通过 KpnI 和 Sall 位点 mIL-4ΔC22 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-4ΔC22 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-4ΔC22、 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: [FAMJCCTGGAGACGCCATCCACGCTG[TAMRA]。

1.3.3 重组病毒 AAV5-mIL-4ΔC22 基因组滴度测定 斑点杂 交(Dot-blot)法检测纯化的 AAV5-mIL-4ΔC22 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-4ΔC22 样品用 DNase I 和 RNase A 于 37℃ 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 混勾后煮沸 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× 10⁵ 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× 10⁹,1× 10¹⁰,2× 10¹⁰ 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 1×10⁵ 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 0.5×10¹⁰ v.g./mL,2×10¹⁰ v.g./mL 设梯度加入重组病毒 AAV5-mIL-4ΔC22,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±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



 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-4ΔC22 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-lengthen 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 promotor; 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

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 Sall 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 Sall 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 pSNAV2.0 的多克隆位点处,所得重组 AAV5 表达质粒 pSNAV-mIL-4ΔC22。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× 10¹² 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 2 A, 经换算重组病毒 rAAV5-mIL-4 Δ C22 滴度约为 3× 10¹¹ 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 2 B。



图 2 重组 AAV5 病毒颗粒滴度和纯度。

 A. 点杂交法检测 rAAV5-mIL-4ΔC22 病毒颗粒的滴度。1-7:起始滴度 为 4× 10¹² 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-4ΔC22 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-4ΔC22 by dot blot analysis. 1-7: Standard substitute with initial titer of 4× 10¹² vg/mLas double dilution. A, B, C: Sample rAAV5-mIL-4ΔC22 as double dilution. B. SDS-PAGE of rAAV5-mIL-4ΔC22, M: Protein marker, VP1, VP2, VP3 is specific AAV5 protein bands.

36 小时后在 16HBE 和 BEAS-2B 细胞中, 2.0×10⁹ vg/mL、1.0×10¹⁰ vg/mL、2.0×10¹⁰ 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)。



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¹⁷¹,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¹⁸³,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%^{19,33},AAV5 产生中和抗体的概率与 AAV8 相比则分别为 3.2%和 19%¹⁹⁹。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^{1223]}。

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-4Δ C22 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 16 HBE 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× 10¹⁰ vg/mL 重组病毒载体; rAAV5mIL-4ΔC22(2):2× 10¹⁰ vg/mL 重组病毒载体。*:P<0.001。 Fig.4 rAAV5mIL-4<u>Δ</u>C22 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× 10¹⁰ vg/mL of recombinant virus vector; rAAV5mIL-4ΔC22(2): 2× 10¹⁰ 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^[2]。 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^[4]。 IL-4 与 IL-4R α 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^[20]。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-4R α / γ C 或 IL-4R α / IL-13R α 1 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-4R α 但丢失了信号转导活性, 被认为是 IL-4R α 的拮抗 体,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¹³⁰。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-4R α链的拮抗体来有效阻断 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¹⁴。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-4∆C22 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 链的拮抗体。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 357 bp,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-4△C22 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-4∆C22,经荧光定量 PCR 鉴定后纯化。点杂交法测 定病毒的滴度为 3× 10¹¹ 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)

- 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 Immuno, 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] Hurdayal 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