

鼠重组磷脂酶 D2 腺病毒的构建及功能的初步研究

韩 黎^{1*} 吴桂芝² 徐振彪¹ 邢玉斌¹ 贾 宁¹

(中国解放军总医院 医院感染管理研究科 北京 100853)¹

(德国埃森医科大学肿瘤医学研究所 埃森 45122)²

摘要: 将磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D2 基因及其功能缺陷点突变基因 (K758R) 从真核表达载体 pCGN 中克隆至带有绿色荧光标记蛋白的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中; 再与腺病毒骨架载体一起在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组, 成功构建磷脂酶 D2 重组腺病毒。该病毒颗粒感染人胚肾 293 细胞, 高效表达磷脂酶 D2 及其功能缺陷蛋白。这种表达对 M₃ 乙酰胆碱受体介导的细胞内磷脂酶 D 激活无影响。但磷脂酶 D2 功能缺陷蛋白对蛋白激酶 C 介导的胞内磷脂酶 D 激活有显著抑制作用; 相反, 磷脂酶 D2 蛋白有显著增强作用。结果表明, 磷脂酶 D2 基因的同源重组腺病毒的表达构建是研究其在细胞内的生理功能的有力工具, 细胞内磷脂酶 D2 激活与蛋白激酶 C 调控的效应特异性。

关键词: 磷脂酶 D2, 腺病毒, 蛋白激酶 C

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0086-06

CONSTRUCTION AND PRELIMINARY FUNCTION STUDY OF MURINE RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE D2 ADENOVIRUS

HAN Li¹ WU Gui-Zhi² XU Zhen-Biao¹ XING Xu-Bing¹ JIA Ning¹
WEI Hua¹ SUO Ji-Jiang¹ CHEN Shi-Ping¹

(Institute of Hospital Infection Control & Research, PLA General Hospital, Beijing 100853)¹

(Institut fuer Tumor Forschung, Essen Uniklinikum, Essen 45122, Germany)²

Abstract: To construct the murine recombinant phospholipase D2 adenovirus and study preliminarily its function in mammalian cells, Murine phosphatidylcholine-specific phospholipase D2 gene and its catalytically inactive mutant (K758R) was firstly subcloned from the eukaryotic expression vector pCGN into the shuttle vector pAdTrack-CMV encoding GFP (green fluorescent protein). The PmeI-linearized pAdTrack-mPLD2 was cotransformed with supercoiled adenoviral backbone pAdEasy-1 vector into BJ5183 *E. coli* for homologous recombination. Subsequently the recombinant mPLD2 adenoviral particles was successfully constructed. These particles infected human embryonic kidney 293 cells stably expressing M₃ muscarinic acetylcholine receptor (M₃ mAChR) with high efficiency detected by GFP. Meantime, significant PLD2 protein expression in 293 cells examined by immunoblotting has no effect on M₃ mAChR-mediated PLD stimulation. However, infection by recombinant mPLD2 K758R adenoviruses inhibited the PLD stimulation induced by PMA, which was increased by its counterpart of wild-type mPLD2 adenoviruses. Our results demonstrated that homologous recombinant mPLD2 adenoviruses may be a powerful tool for studying further the important physiological role of PLD2 and protein kinase C might be involved specifically in PLD2 stimulation pathway.

Key words: Phospholipase D2, Adenovirus, Protein kinase C

细胞膜重要组成成份-磷脂酰胆碱经磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 催化, 生成磷脂酸和胆碱基。磷脂酸是细胞中重要的第二信使因子, 参与多项重要生理功能。细胞

* 联系人 Tel: (010) 66937144

作者还有: 魏 华, 索继江, 陈世平

收稿日期: 2003-01-20, 修回日期: 2003-05-08

中, 磷脂酶 D 激活多由 G 蛋白受体及酪氨酸激酶受体介导, 由小 G 蛋白, 酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 等细胞内重要信号调节蛋白调控, 但其确切的激活机制尚不清楚^[1]。目前, 对细胞, 尤其是原代培养细胞, 如 PC12 (Pheochromocytoma 嗜铬细胞瘤) 细胞及大部分的免疫细胞 (T 细胞、B 细胞、抗原提呈细胞等) 中磷脂酶 D 的激活及功能研究受到外源基因转入效率的限制。重组腺病毒技术被广泛应用于基因转移、疫苗研制和基因治疗等方面。其具有感染效率高、可转移细胞谱系宽、基因转移效率高 (不取决于细胞分裂状态) 等优点^[2]。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、试剂、酶

人胚肾 HEK293 细胞购自 Microbix Biosystems 或 ATCC。细胞传代培养条件为: 含 10% 小牛血清 (Invitrogen), 10^5 units/L 青霉素, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DMEM/F12 培养基 (Gibco), 37°C , 5% CO_2 孵箱 (Hereaus)。限制性内切酶 *Sma*I, *Nde*I, *Bgl*II, *Xba*I, *Eco*RV, *Pac*I, *Pme*I 等均购于 New England BioLabs。

1.2 质粒

鼠磷脂酶 D2 真核表达质粒 pCGN-mPLD2 及其功能缺陷点突变株 mPLD2 (K758R) 由 Morris 博士和 Frohman 博士赠送; 腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 和腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 由德国海德堡大学医学院药理研究所 Wieland 博士赠送。pAdEasy-1 包含除早期 E1, E3 基因外的所有腺病毒血清型 5 (Ad5) 基因序列; pAdTrack-CMV 带有绿色荧光蛋白 (GFP)、CMV 启动子及多聚腺嘌呤 (poly A) 位点。

1.3 电感受态细菌准备及电转化

大肠杆菌 DH10B 或 BJ5183 在 LB 培养基 (Sigma) 中振荡生长至 OD_{600} 值 0.8; 菌体经冰浴 1h、用冰冷 10% (体积比) 甘油洗涤两次, 悬浮于 5mL 冰冷 10% (体积比) 甘油中, 分装贮存于液氮中 (每管 $20\mu\text{L}$)。电转化过程: $40\mu\text{L}$ 电转化感受态细菌与 50 ~ 300ng 待转化 DNA 冰浴条件下混合于电转化器 (Bio-Rad Gene Pulser Electroporator, $200\Omega/25\mu\text{F}/2.5\text{kV}$) 进行电转化。然后向小杯中加入 1mL SOC 培养基 (Invitrogen), 37°C 振荡培养 1h 后涂布抗生素琼脂平板, 筛选阳性克隆。

1.4 克隆 pAdTrack-mPLD2

将 7.5 ~ 10 μg pCGN-mPLD2 质粒用 *Sma*I, *Xba*I 逐一酶解消化 (3 U 酶/ μg DNA, $20\mu\text{L}$ 酶反应体系)。mPLD2 基因片段经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 酚/氯仿抽提、3M 乙酸钠及异丙醇沉淀提纯后, 260nm 紫外分光光度测定浓度。同时, 将 pAdTrack-CMV 穿梭质粒用 *Eco*RV, *Xba*I 逐一酶解消化, 分离回收 (条件同上)。线性化的 pAdTrack-CMV 穿梭质粒经去磷酸化处理 (碱性磷酸酶 Roche Molecular Biochemicals, 1 U/ μmol 5' 末端) 后, 与 mPLD2 基因片段以摩尔比 1: 3 混合, 加水补至 $8.5\mu\text{L}$ 后 45°C 温育 5min。加入 5 U T4 DNA 连接酶及缓冲液于 4°C 连接过夜。50 ~ 300ng 的连接混合物电转化入 DH10B 大肠杆菌中, 涂布于 10^5 units/L 青霉素琼脂平板上。

以碱性裂解法小提质粒 DNA。小量纯化的质粒经 *Bgl*II 限制性内切酶消化后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。阳性克隆直接接种培养, 用 Qiagen Maxi-prep 试剂盒大量纯化 pAdTrack-mPLD2。

1.5 同源重组^[3]

1 (g pAdTrack-mPLD2 质粒经限制性内切酶 *PmeI* 消化。经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀线性化的质粒与 500ng 超螺旋腺病毒骨架载体 pAdEasy-1, 40 (1 BJ5183 大肠杆菌混合, 进行电转化。然后立即加入 1mL SOC 培养基, 37℃ 孵育 45min, 涂布于含卡那霉素 50mg/L 琼脂平板上, 培养过夜。次日, 挑取小克隆, 接种于含卡那霉素 50mg/L 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡过夜, 以碱性裂解法小提质粒 DNA (见 1.3)。质粒 DNA 经 *NdeI* 酶切电泳, 阳性克隆直接接种培养, 用 Qiagen Maxi-prep 试剂盒大量纯化质粒。

1.6 鼠磷脂酶 D2 腺病毒颗粒的产生

30μg pAdEasy-mPLD2 质粒经 *PacI* 消化后, 暴露其倒置终端重复序列。线性化的质粒经苯酚氯仿抽提、乙醇沉淀纯化后与 20μL Lipofectamine 试剂 (Promega Lipofectamine 试剂盒, 见说明) 混合溶于 1mL 不含小牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 置于室温 15min。将混合物转移至 145mm 培养皿中的 293 细胞单层 (2×10^6 细胞) 上, 另补加 4 mL 不含小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 37℃ CO₂ 孵箱温育 4h; 然后, 给细胞更换含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 继续培养。每天在荧光显微镜 (Zeiss Axiovert S100) 下观察绿色荧光蛋白的产生情况。7d 后, 刮取收集并离心沉淀细胞, 悬浮于 3mL 含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中。将细胞悬浮液置于液氮中迅冻, 然后置于 37℃ 水浴融化, 此循环连续 3 次。4℃ 2,200 r/min 离心 10min, 取病毒上清分装贮存或继续感染更多 293 细胞以获得高滴病毒。

1.7 鼠磷脂酶 D2 腺病毒感染 HEK293 细胞及 mPLD2 蛋白的表达

取上一步中的病毒上清 2mL, 分别感染两个 HEK293 细胞单层 (60mm 培养皿, 每个平皿约 2×10^7 细胞), 每天观察绿色荧光蛋白的产生情况并拍照。5d 后, 加入 1mL 10% SDS 裂解液, 刮取细胞并移至 1.5mL Eppendorf 管中, 置于 95℃ 温度槽内 10min, 其间将细胞悬浮液打匀, 进行 Pierce 蛋白浓度测定 (见 Pierce 试剂盒说明)。进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳及 Western-Blot 分析。一抗为免抗 mPLD2 血清; 二抗为羊抗免 IgG/过氧化物酶嵌合蛋白。抗体标记蛋白通过化学荧光反应 (Western Lightning™, PerkinElmer Life Sciences) 由 Kodak 胶片捕获。

1.8 细胞内 PLD 活性的测定^[4]

取高滴度的重组鼠磷脂酶 D2 腺病毒上清液, 感染 HEK293 细胞单层 (145mm 培养皿, MOI 值为 5~10)。约 48h 后传代一次并加入放射性 [³H] 油酸 (2 μCi/mL), 孵育过夜以标记细胞内磷脂类化合物。PLD 活性测定体系包括经缓冲液平衡的细胞悬液、乙醇和相应的刺激因子 (如 1m mol/L 碳酸胆碱或 100n mol/L 佛波醇-12-肉豆蔻酸-13-乙酸)。放射性 [³H] 标记的总磷脂类化合物和 PLD 酶催化的特异产物磷脂酰乙醇, 经甲醇、氯仿及水抽提后, 上有机薄层层析分离。用放射性液闪仪测定分离的各部分产物放射性强度。其中, PLD 活性指标为磷脂酰乙醇的形成率, 表示为其占放射性标记的磷脂类化合物总量的百分比。

2 实验结果

2.1 pAdTrack-mPLD2 的克隆

mPLD 2 基因约 3.0kb, 含一个 *Bgl* II 位点, 但不含 *Nde* I、*Pme* I、*Pac* I 位点 (图 1)。

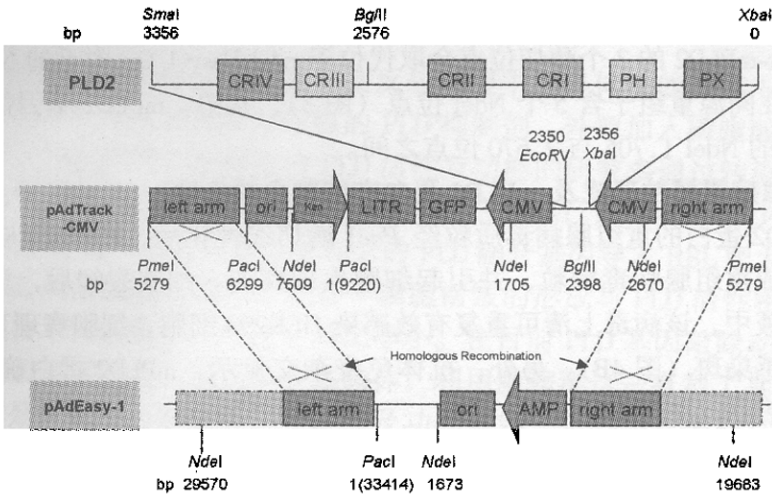


图 1 mPLD2 腺病毒克隆及同源重组示意图

CRIV, 序列保守区 I 至 IV; PH, pleckstrin 同源序列; PX, phox 同源序列; ori, 起点; Kan, 卡那霉素抗性基因; Left-arm, 左倒置终端重复序列区; Right-arm, 右倒置终端重复序列区; GFP, 绿色荧光蛋白; CMV, 巨噬病毒启动子; AMP, 氨苄西林抗性基因

实验中, 尽管经 *Xba*I 和 *Eco*RV 线性化的腺病毒穿梭载体已经去磷酸化处理, 但 *Eco*RV 产生的载体平端切口及 *Sma*I 产生的 mPLD2 基因平端切口, 加上 mPLD2 基因较大, 导致连接效率较低。阳性克隆的 *Bgl*II 酶切图谱含一条约 2,600bp 的标志性条带, 位于 mPLD2 基因的 2576 *Bgl*II 位点与 pAdTrack-CMV 2398 *Bgl*II 位点之间。

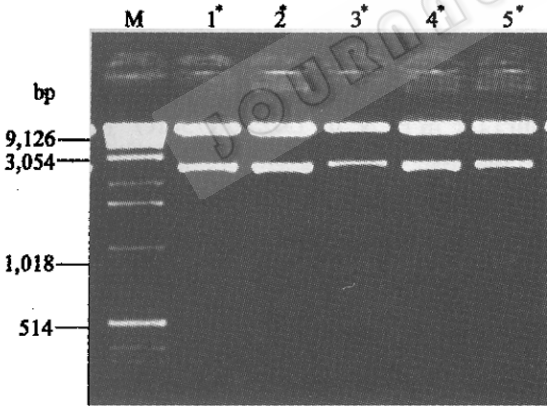


图 2 mPLD2 基因克隆入 pAdTrack-CMV (*Bgl*II 限制性内切酶酶切图谱)

M 分子量标记, 1kb DNA ladder marker, 1~2 含有 mPLD2 基因的 pAdTrack-CMV-mPLD2 转移质粒, 3~5 含有 mPLD2 (K758R) 的 pAdTrack-CMV-mPLD2 (K758R) 转移质粒

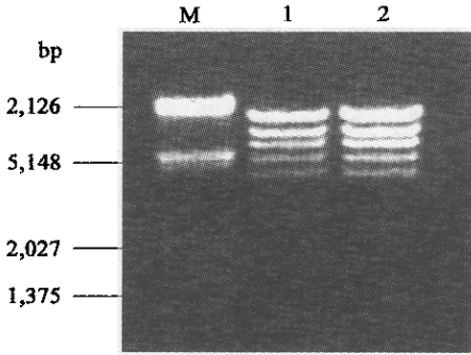


图 3 mPLD2 同源重组腺病毒的 *Nde*I 限制性酶酶切图谱

M 分子量标记, DNA/ *Eco*RI and *Hind*III; 1 含 mPLD2 基因 pAdEasy-mPLD2 重组质粒, 2 含 mPLD2 (K758R) 基因的 pAdEasy-mPLD2 (K758R) 重组质粒

2.2 同源重组 mPLD2 腺病毒 (pAdEasy-mPLD2)

用 *Nde*I 来筛选阳性 pAdEasy-mPLD2 同源重组子, 因为它在巨大腺病毒骨架载体中的酶切位点较少 (仅有 3 个); 在含 mPLD2 基因的穿梭质粒 pAdTrack-mPLD2 中有 3 个切点, 均位于 pAdTrack-CMV 穿梭质粒自身内 (图 1)。如果 *Pme*I 线性化的 pAdTrack-

mPLD2 与腺病毒超螺旋骨架载体 pAdEasy-1 在左右臂同源区 (图 1) 发生了正确的同源重组, pAdTrack-mPLD2 的 3 个酶切位点会取代位于 pAd Easy-1 Ori 附近的 NdeI 1673 酶切位点, 因此阳性同源重组子含 5 个 NdeI 位点 (图 3)。其中, mPLD2 基因位于 pAdTrack-CMV 穿梭质粒的 NdeI 1,705 与 2,670 位点之间。

2.3 mPLD2 腺病毒颗粒形成及 mPLD2 蛋白在细胞中的表达

编码 mPLD2 蛋白的重组腺病毒质粒经 *PacI* 酶切线性化后, 转染 HEK293 细胞, 在细胞内包装形成重组腺病毒颗粒, 并引起细胞生理病变。细胞裂解后, 重组腺病毒颗粒释放于上清液中, 该病毒上清可重复有效感染 HEK293 细胞, 细胞病理现象显著, 形成星状的病毒感染斑 (图 4B)。另外, 抗体免疫杂交显示, mPLD2 蛋白确实在 HEK293 细胞中有大量表达 (图 4C)。

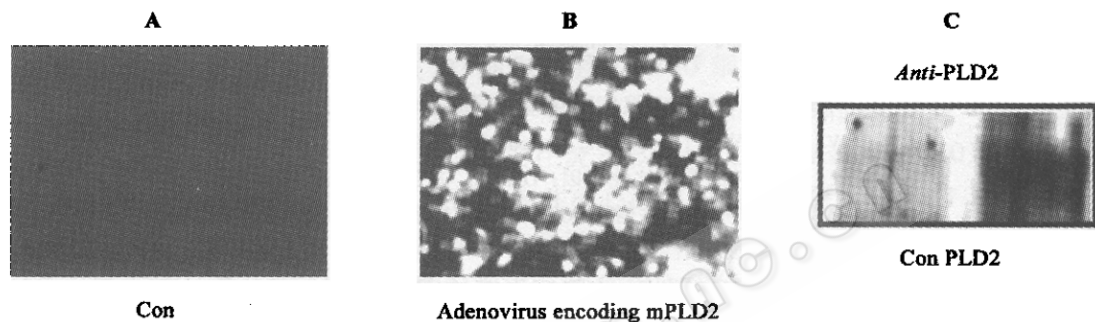


图 4 mPLD2 重组腺病毒颗粒感染 HEK293 细胞及 mPLD2 蛋白的表达

A 空白对照 (没有加入含有病毒的上清液, 4d 内无病毒产生), B 编码 mPLD2 的重组腺病毒感染 HEK293 细胞 4d 后荧光显微镜下监测到大量含绿色荧光蛋白的细胞, C PLD2 蛋白在感染细胞内的明显表达与对照细胞相比

2.4 mPLD2 重组腺病毒感染对细胞内 PLD 活性的影响

用空白 pAdEasy-1 腺病毒 (对照)、编码 mPLD2 蛋白及 mPLD2 (K758R) 蛋白的重组腺病毒, 感染稳定表达 M_3 乙酰胆碱受 HEK293 细胞单层约 48h。细胞经 1mmol/L Carbachol (carb) 或 100nmol/L PMA (PMA) 的预处理后, 测定细胞内 PLD 活性。对照组细胞无任何刺激因子 (basal)。图中数据为 4 次实验的平均值。结果表明, pAdEasy-1 空白腺病毒及 mPLD2 蛋白、mPLD2 (K758R) 蛋白的过度表达对 HEK293 细胞的 PLD 基础活性及 Carbachol 诱导的 PLD 激活无影响。相比之下, mPLD2 蛋白使细胞内 PMA 诱导的 PLD 激活增强约 45% ($p < 0.01$), 而 mPLD2 (K758R) 蛋白对 PMA 诱导的 PLD 激活有显著抑制作用, 使其降低约 40% ($p < 0.01$) (图 5)。

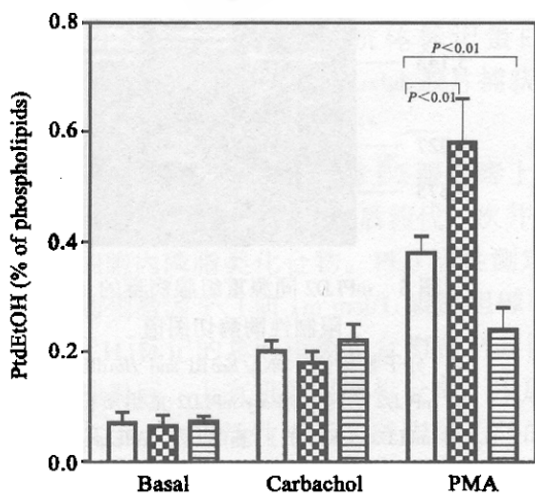


图 5 重组 mPLD2 腺病毒感染对 HEK293 细胞 PLD 活性的影响

□ 空白 pAdEasy 骨架载体腺病毒, ■ 编码 mPLD2 蛋白的重组腺病毒, ▨ 编码 mPLD2 (K758R) 蛋白的重组腺病毒

3 讨论

目前, PLD在细胞生理表征, 如炎症反应过程中的具体功能及其下游目标蛋白的效应机制仍不清楚。由于尚无特异性强的 PLD 抑制剂, 外源加入磷脂酸或细菌 PLD 蛋白仅较适用于无细胞系统, 对细胞内 PLD 活性及功能的研究多通过转染方式向培养细胞导入外源基因, 因而高效的基因转入手段和蛋白表达已成为必不可少的重要研究基础。O'Luanaigh 等利用电转化法将带 GFP 的 PLD 融合基因导入 RBL 肥大细胞中, 用抗二硝基苯酚-IgE 刺激细胞发现免疫应答中细胞褶皱的形成与 PLD 活性密切相关^[5]。但电转染及转化技术转染量小, 细胞存活比率小。在目前 PLD 基因敲除动物模型难以成功之时, 将 PLD 基因重组入腺病毒表达载体, 利用腺病毒这一有利工具研究 PLD 在不同细胞, 尤其是在免疫细胞内的信号激活及功能机制, 是一条效率高且切实可行的技术路线。

He 等建立起来的新重组腺病毒技术简化方法的基本策略, 是将目的基因克隆入转移载体, 直接使用腺病毒骨架载体与带有目的基因的转移载体在细菌内进行同源重组, 产生含目的基因的重组腺病毒^[3]。Rümenapp 等利用该策略构建重组了 RGS 蛋白(终止 G 蛋白信号的蛋白家族)腺病毒, 阐明了 $G\alpha_{12}$, 而不是 $G\alpha_q$ 族 G 蛋白调节了 M_3 乙酰胆碱受体介导的 PLD 激活^[4]。Wang 等则重组构建了不含 GFP 的 PLD 重组腺病毒^[6]。但该重组腺病毒不含 GFP, 无法实时监测细胞的病毒感染度, 也不易选择 PLD 蛋白高表达的细胞进行研究而使实验在准确性和说服力上尚有不足。

本实验中, 我们应用了带有 GFP 蛋白的 pAdTrack-CMV 转移质粒, 大大方便了重组病毒颗粒及其对细胞的感染度的监测, 使实验结果更为准确、可靠。另外, 假阳性克隆主要来自于 *PmeI* 消化后的 pAdTrack-mPLD2 质粒的自我连接。重组 mPLD2 腺病毒不仅可有效感染其包装细胞系 293 细胞, 而且对不易于转染的 PC12 细胞系的感染效率也很高, 约 90% (结果未示)^[7]。这为进一步研究 PLD2 蛋白在其他细胞中的功能打下了坚实基础。

哺乳动物 PLD 两亚型, PLD1 和 PLD2 基因享有 50% 的序列同源性, 它们不仅在亚细胞定位上有差别, 其在细胞内的激活调控途径也不同^[8,9]。由实验结果可见, PLD2 亚型蛋白似乎仅与细胞内 PMA 诱导, 蛋白激酶 C 相关的 PLD 激活途径密切相关, 而与 M_3 乙酰胆碱受体(G 蛋白受体)介导的 PLD 激活无关。这一结果与许多研究的假设基本相符: PLD1 多由 G 蛋白受体介导激活, 而 PLD2 的激活多由酪蛋白激酶及其胞内蛋白激酶介导^[10,11]。当然, 重组 PLD 腺病毒将为进一步阐明 PLD 的生理功能提供有力武器。

参考文献

- [1] Exton J H. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2002, **144**: 1 ~ 94.
- [2] Miller A D. *Nature*, 1992, **357**: 455 ~ 60.
- [3] He T C, Zhou S, Da Costa, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2509 ~ 2514.
- [4] Rümenapp U, Asmus M, Schabowski H, *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 2474 ~ 2479.
- [5] O'Luanaigh N, Pardo R, Fensome A, *et al.* *Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 3730 ~ 3746.
- [6] Wang L, Cummings R, Usatuk P, *et al.* *Biochem J*, 2002, **367**: 751 ~ 760.
- [7] Han J M, Kim J H, Lee B D, *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 8290 ~ 7.
- [8] Lee S, Kim J H, Lee C S, *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 6542 ~ 6549.
- [9] Schmidt M, Voß M, Oude Weernink P A, *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 14648 ~ 14654.
- [10] Du G W, Altshuller Y M, Kim Y, *et al.* *Mol Biol Cell*, 2000, **11**: 4359 ~ 4368.
- [11] Parmentier J H, Muthalif M M, Saeed A E, *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 15704 ~ 15711.