

TLR4 全长及其截断体重组腺病毒 对 Rf-6A 细胞骨架的影响

宋 革, 孙学刚, 姜 勇

(第一军医大学病理生理学教研室, 全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

摘要: 为了研究 LPS 受体 TLR4 全长及其胞内段缺失的 TLR4 截断体 (Δ TLR4) 的绿色荧光蛋白重组腺病毒对内皮细胞系 Rf-6A 骨架蛋白的影响, 采用 PCR 方法扩增目的基因片段, 亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack 中, 用 BJ5183 细菌同源重组法将目的基因重组于腺病毒骨架载体, 重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切线性化后, 用脂质体法转染 293 细胞进行腺病毒的包装扩增, 用重组腺病毒感染 Rf-6A 细胞, 采用免疫荧光标记方法观察结果。免疫荧光标记结果表明 Ad- Δ TLR4 明显抑制了 LPS 引起的细胞骨架 F-actin 的解聚与重排, Ad-TLR4 则使 LPS 引起的 F-actin 应力纤维产生增强。以上结果说明 TLR4 全长及其截断体的重组腺病毒感染内皮细胞对 LPS 诱导的细胞骨架变化具有不同的影响, Ad- Δ TLR4 对 LPS 引起的内皮细胞骨架变化具有抑制作用。

关键词: 腺病毒; 细胞骨架; toll 样受体 4; 脂多糖

中图分类号: Q78; R363

1 引 言

细菌内毒素, 即脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌 (gram-negative bacteria, G^-) 细胞外膜的主要成分, 是引起人和动物内毒素性休克的主要因素^[1,2]。LPS 通过直接识别内皮细胞相应跨膜受体 —— toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4), 从而激活细胞内相应的蛋白激酶, 启动细胞内信号转导, 磷酸化有关蛋白, 引起 NF- κ B、ATF2 等核转录因子的激活, 最终导致各种靶基因, 如细胞因子、受体分子和离子通道的转录, 完成信息从细胞外向细胞内的传递。LPS 刺激还会导致内皮细胞骨架蛋白收缩重组, 细胞与细胞及细胞与基底膜间的黏附连接松解, 细胞间隙形成, 最后导致血管通透性升高, 其中内皮细胞骨架蛋白中的肌动蛋白 F-actin, 在血管通透性调节中发挥了重要作用^[3,4]。有关 LPS 诱导炎症基因的表达已有较多研究, 然而 LPS 对内皮细胞骨架的影响尚有多个环节未得到充分认识。为了研究 TLR4 在 LPS 介导的内皮细胞骨架调整反应中的作用, 探讨 LPS 诱导的内皮细胞骨架异常变化的有效治疗途径, 本实验构建了携带全长 TLR4 基因的腺病毒载体和失去了胞内功能区的 TLR4 (Δ TLR4) 基

因腺病毒载体, 研究 TLR4 全长及其截断体 Δ TLR4 的重组腺病毒对内皮细胞系 Rf-6A 细胞骨架的影响。

2 材料和方法

2.1 主要试剂与设备

各种限制性内切酶、 T_4 连接酶和碱性磷酸酶分别为 Takara 公司和 New England Biolab 公司产品; 质粒抽提试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 脂质体转染试剂 LipofectamineTM2000 为 Gibco 公司产品; LPS (*E. coli* 0111:B4)、Triton X-100 购自 Sigma 公司; 罗丹明 - 鬼笔环肽 (rhodamine-phalloidin) 购自 Molecular Probes 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。荧光倒置显微镜为日本的 Nikon TE300。

收稿日期: 2003-10-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (39925014), 国家自然科学基金重点项目 (39830400) 和 973 计划项目 (2002CB513000)

通讯作者: 姜勇, 电话: (020) 61648231,

传真: (020) 61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

2.2 菌株、质粒和细胞株

细菌同源重组系统包括大肠杆菌 BJ5183、DH10B、穿梭质粒 pAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 (由美国 TC He 博士惠赠); pcDNA3-TLR4 由美国 The Scripps Research Institute 韩家淮 (J Han) 博士馈赠; 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。视网膜脉络膜微血管内皮细胞系 Rf-6A 和 HEK-293 细胞为本室保存。

2.3 方法

2.3.1 重组腺病毒质粒的构建

根据 swiss-prot 网站 (<http://us.expasy.org>) 上提供的关于 TLR4 的资料, 其跨膜区为第 632~652 位氨基酸, 胞质区为 653~839 位氨基酸。根据上述信息, 我们设计了扩增 TLR4 全长和缺失胞浆内段的 TLR4 (Δ TLR4) 的两对引物, 用以克隆扩增片段到腺病毒穿梭载体 pAdTrack。构建 pAdTrack-TLR4 和 pAdTrack- Δ TLR4 的上游引物: 5'-AA GGTACC ACC ATG ATG TCT GCC TCG CGC C-3'; 构建 pAdTrack-TLR4 下游引物: 5'-ATC AAGCTT TCA GAT AGA TGT TGC TTC-3'; 构建 pAdTrack- Δ TLR4 的下游引物: 5'-CCG AAGCTT AAT AGA CCA GAA CTG CTA CAA C-3'; 以 pcDNA3-TLR4 质粒载体为模板, 进行 PCR 反应: TLR4 (95 $^{\circ}$ C、30 s, 50 $^{\circ}$ C、20 s, 72 $^{\circ}$ C、3 min, 30 循环); Δ TLR4 (95 $^{\circ}$ C、30 s, 52 $^{\circ}$ C、20 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 30 循环)。回收 PCR 产物, 做 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切, 将 TLR4 和 Δ TLR4 基因亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-GFP-CMV 载体中, 形成重组穿梭质粒 pAdTrack-TLR4 和 pAdTrack- Δ TLR4。

双酶切鉴定后的穿梭质粒, 经 *Pme* I 线性化后, 转化 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌^[9], 卡那霉素平板筛选, 进行细菌内同源重组。16~20 h 后, 挑取克隆, *Pac* I 酶切后产生特征性片段鉴定重组成功。为获得高拷贝的重组质粒, 再转化入大肠杆菌 DH-5 α 中。提取重组病毒质粒 5~10 μ g, 用 *Pac* I 酶切使之线性化, 酶切产物经乙醇沉淀处理后, 溶于 10 μ l TE (pH 8.0) 备用。

2.3.2 重组腺病毒的包装与鉴定

转染前 1 d, 将 HEK-293 细胞 5×10^5 个铺到 6 孔板中, 转染时细胞融合率 50%~70%, 将 *Pac* I 酶切后乙醇沉淀的重组腺病毒质粒转染 HEK-293 细胞, 继续培养, 用荧光显微镜观察绿

色荧光蛋白 (GFP) 的表达, 7~10 d 后收获病毒, 在 37 $^{\circ}$ C/-80 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融 4 次。重复以上步骤 3 次, 可得到高滴度的病毒。取重组病毒上清, 煮沸 5 min, 离心, 取 2 μ l 为模板, 依照前述 PCR 条件, 扩增目的基因 TLR4 和 Δ TLR4, 鉴定重组病毒。使用倍比稀释方法用重组腺病毒上清感染 293 细胞, 通过计数表达 GFP 的细胞数判定病毒滴度。

2.3.3 血管内皮细胞系 Rf-6A 的培养与实验分组

将 Rf-6A 细胞以 1.0×10^5 cells/L 接种于微孔小皿上, 培养至单层细胞融合率达到 70%~80% 时开始实验。实验分为 8 组: (1) 正常细胞组; (2) 不含目的基因的空病毒感染细胞阴性对照组; (3) LPS (100 μ g/L, 6 h) 刺激正常细胞组; (4) LPS (100 μ g/L, 6 h) 刺激空病毒感染细胞组; (5) 全长 TLR4 重组腺病毒感染细胞 4 h 组; (6) 全长 TLR4 重组腺病毒感染细胞 4 h 后, LPS (100 μ g/L, 6 h) 刺激组; (7) 截断体 Δ TLR4 重组腺病毒感染细胞 4 h 组; (8) 截断体 Δ TLR4 重组腺病毒感染细胞 4 h 后, LPS (100 μ g/L, 6 h) 刺激组。各重组腺病毒感染组均以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 400 感染细胞。每组重复 6 孔。

2.3.4 免疫荧光标记和观察

各组细胞用 PBS 漂洗 3 次, 2% 多聚甲醛固定 20 min, 用 0.5% Triton X-100 进行细胞膜打孔 20 min, 然后用 PBS 漂洗 3 次, 加入 4 U/ml 浓度的罗丹明 - 鬼笔环肽标记纤维状肌动蛋白 (filamentous actin, F-actin), 染色 40 min, PBS 漂洗 3 次。最后用 Nikon TE300 倒置荧光显微镜观察, Kodak200 胶卷拍照。

3 结 果

3.1 LPS 对 Rf-6A 细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

猴视网膜脉络膜内皮细胞系 Rf-6A 的 F-actin 正常情况下主要分布在细胞周边膜皮质区和核周, 细胞浆内有少许不规则的较细的纤维丝分布, 呈不规则排列 (图 1A)。100 μ g/L 的 LPS 作用内皮 6 h 后, 内皮细胞皮质区的 F-actin 纤维致密斑减少或消失, 周边的纤维致密带向胞浆区域移位, 胞浆内出现极性分布的应力纤维 (stress fibers), 表现为纤维变粗、变短、排列整齐 (图 1B)。

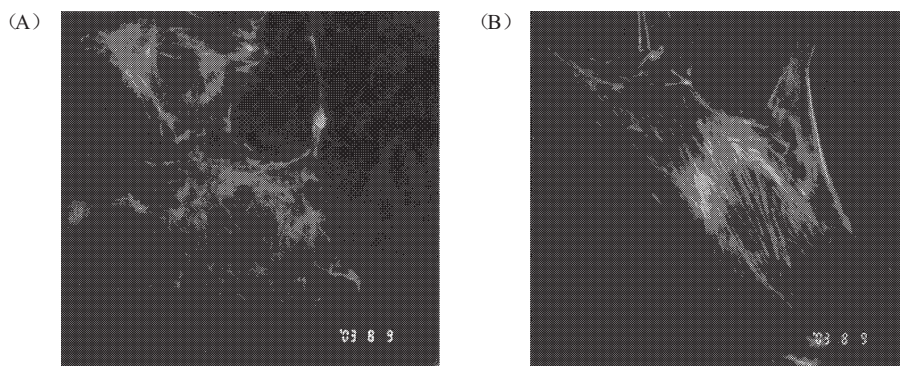


Fig.1 Intracellular F-actin distribution in endothelial cells treated without or with LPS for 6 h ($\times 1000$). (A) Treated without LPS; (B) Treated with LPS for 6 h

3.2 Ad-TLR4 和 Ad- Δ TLR4 重组腺病毒感染 Rf-6A 对细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

不含目的基因的空病毒 Ad-Easy 与包含 LPS 受体 TLR4 全长基因及其截断体的重组腺病毒 Ad-TLR4 和 Ad- Δ TLR4 感染内皮细胞系 Rf-6A 4 h, 观察到 Ad-TLR4 和 Ad- Δ TLR4 对内皮细胞 F-actin 的分布没有影响: 细胞骨架蛋白 F-actin 不发生重组, F-actin 主要分布在细胞周边膜皮质区和核周, 细胞浆内有少许不规则排列的较细的纤维丝分布, 与正常对照组细胞没有差别, 见图 2。

3.3 Ad-TLR4 和 Ad- Δ TLR4 重组腺病毒对 LPS 作用引起细胞骨架蛋白 F-actin 改变的影响

不含目的基因的空病毒感染细胞后, 细胞骨架蛋白对 LPS 的反应性与无病毒作用的细胞一致: 细胞边界不清或消失, 周边的纤维致密带向胞浆区域移位, 胞浆内出现粗短整齐、极性分布的应力纤维 (图 3A、B)。包含 LPS 受体 TLR4 全长基因的重组腺病毒 Ad-TLR4 感染内皮细胞系 Rf-6A 4 h, 100 μ g/L 的 LPS 作用内皮 6 h 后, 观察到发生肌动蛋白重组的细胞数量较单独 LPS 刺激者增多,

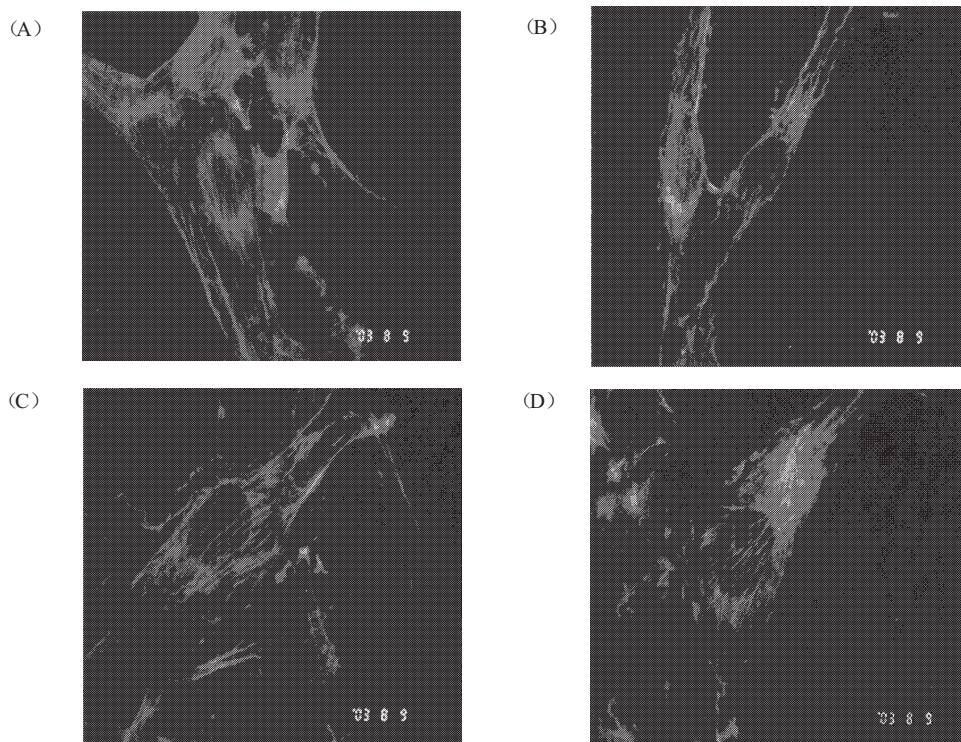


Fig.2 Effects of Ad-TLR4 and Ad- Δ TLR4 infection on the organization and localization of F-actin in cultured endothelial cell line Rf-6A ($\times 1000$). (A) Control cells without infection; (B) Infected by Ad-Easy for 4 h; (C) Infected by Ad-TLR4 for 4 h; (D) Infected by Ad- Δ TLR4 for 4 h

F-actin呈明显的极性分布, 内皮细胞皮质区的F-actin染色变弱, 部分细胞边界消失, 细胞变圆, 网络结构消失(图3C)。TLR4截断体形式的重组

腺病毒 Ad- Δ TLR4 感染内皮细胞系 Rf-6A 后, 给予 100 μ g/L 的 LPS 刺激 6 h, 内皮细胞 F-actin 的分布没有影响, 不发生肌动蛋白的重组(图3D)。

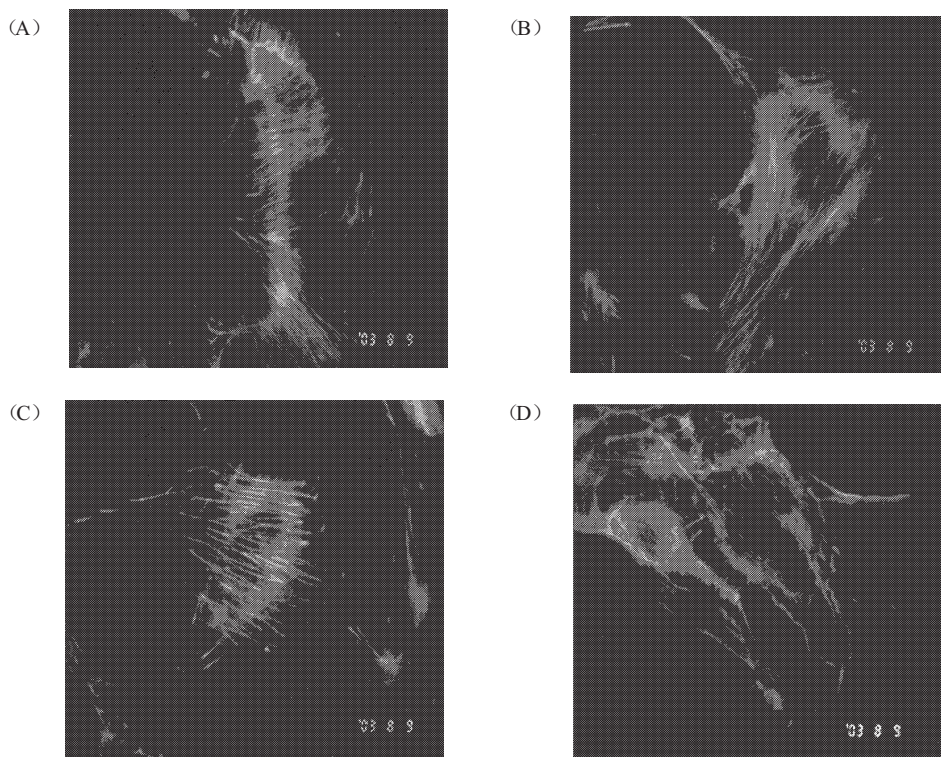


Fig.3 Effects of Ad-TLR4 and Ad- Δ TLR4 infection on LPS-induced F-actin depolymerization and reorganization in cultured endothelial cell line Rf-6A ($\times 1000$). (A) Non-infected cells treated with LPS for 6 h; (B) Ad-Easy infected cells treated with LPS for 6 h; (C) Ad-TLR4 infected cells treated with LPS for 6 h; (D) Ad- Δ TLR4 infected cells treated with LPS for 6 h

4 讨 论

LPS 在感染、炎症和中毒性休克中起着关键作用。LPS 介导细胞, 特别是单核巨噬细胞激活, 合成和释放各种细胞因子, 作用于靶细胞如内皮细胞等, 引起全身炎症反应综合征, 导致休克、多器官功能衰竭 (multiple system organ failure, MSOF) 和死亡。在这一病理过程中, 内皮细胞是内毒素作用的早期主要靶细胞, 内毒素对血管内皮的损伤与内毒素休克以及 MSOF 的发生关系密切。LPS 通过受体 TLR4 激活而损伤内皮细胞, 引起黏附分子表达、细胞因子释放, 最终导致内皮细胞骨架蛋白解聚和重组, 细胞与细胞及细胞与基底膜间的黏附连接松解, 细胞屏障功能损伤^[3,4]。肌动蛋白 (actin) 是细胞内主要的骨架蛋白, 介导了真核细胞许多重要的生理功能, 并作为网络结构为细胞提供必要的形态和极性, actin 以球状肌动蛋白

(globe actin, G-actin) 和纤维状肌动蛋白 (fibrous actin, F-actin) 两种形式存在于细胞内, 而 F-actin 由分子量为 42 kD 的 G-actin 聚合而成, 因而 F-actin 肌动蛋白解聚程度的变化反应了细胞的功能状态, 探讨它的生物学功能对认识临床上许多疾病的发展有重要意义^[7]。我们应用罗丹明 - 鬼笔环肽荧光标记观察细胞内 F-actin 肌动蛋白解聚变化, 正常内皮细胞以及静态培养的融合单层内皮细胞的肌动蛋白微丝主要分布在细胞的周边和核周部位, 形成致密周围束, 这与以往的研究一致。当受到外界刺激作用时, 细胞通过多种信号转导的途径介导肌动蛋白微丝发生重组, 致密周围束消失, 应力纤维形成, 细胞形态也随之改变, 导致细胞间缝隙增大, 通透性升高^[8-10]。本实验结果证明, LPS (100 μ g/L) 直接刺激 6 h 后 F-actin 就可以发生重组, 部分细胞出现应力纤维, 细胞网络结构消失。

TLR4 是 LPS 介导的天然免疫的一个重要受

体,在革兰氏阳性菌引起的感染炎症反应中起重要作用。TLR4 识别 LPS 是内皮细胞对 LPS 产生反应性的起始步骤,TLR4 分子全长为 839 个氨基酸残基,由胞外区、跨膜区及胞内区三部分组成。胞质区存在一段保守序列区,与 IL-1 受体的胞内功能域的保守序列有高度同源性,被称为 Toll/IL-1 受体同源区(toll/IL-1 receptor homologous domain, TIR),TIR 是 TLR4 将信号转导进入细胞的关键结构^[6]。如果去除了 TLR4 的胞内区,LPS 将无法通过截断形式的 TLR4 将信号传导进入细胞,从而保护内皮细胞免受损伤。因此,我们采用细菌同源重组法制备了全长形式 TLR4 和截断形式 TLR4 的腺病毒,研究它们对内皮细胞系 Rf-6A 细胞骨架蛋白的影响,探讨可能的治疗途径。结果表明,TLR4 重组腺病毒载体增强了 LPS 诱导的细胞骨架蛋白 F-actin 的重组,应力纤维产生显著增强,这是由于 TLR4 重组腺病毒载体表达 TLR4 受体基因,使细胞膜表面受体功能加强; Δ TLR4 重组腺病毒感染细胞后抑制了 LPS 对细胞骨架的重组作用,F-actin 定位和形态不发生改变,显示去除了胞内区的 Δ TLR4,细胞无法将 LPS 刺激信号传导到细胞内,从而丧失了对 LPS 的反应能力,使细胞骨架免于受到 LPS 的损伤,保护内皮细胞维持正常形态和功能。

构建携带有目的基因的重组病毒载体是重要的转基因途径,由于重组腺病毒具有转染效率高、感染细胞范围广等优点,使得腺病毒携带的目的基因更容易表达并发挥功能,因而被越来越多地用于基因治疗和基因功能的研究^[11]。TLR4 是哺乳动物 LPS 跨膜信号转导的主要介导者,大部分的哺乳动物细胞都具有 TLR4 受体,我们构建的 TLR4 和 Δ TLR4 的重组腺病毒对细胞无损伤作用,单独 Ad-TLR4 或 Ad- Δ TLR4 重组腺病毒感染细胞,Rf-6A 的 F-actin 分布均没有影响。TLR4 可以排除细胞膜上本身带有的 TLR4 受体介导 LPS 功能的作用,利用腺病毒较高的感染效率使细胞高水平表达 TLR4 以竞争屏蔽细胞本身 TLR4 的影响,我们制备的 Ad- Δ TLR4 不含 TLR4 跨膜区和胞质区,失去向细胞内转导信号的功能,在受体水平阻断细菌等病原体介导的炎症反应,保护细胞免于受到 LPS 刺激损伤,是抗炎治疗策略中基因治疗的可能有效途径,具有潜在的临床应用前景,也为今后研究 LPS 信号通路提供了一个重要的工具。

参考文献:

- [1] Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*, 1999,340:207~214
- [2] Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet*, 1998,351: 1501~1505
- [3] de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. Effect of endotoxin on permeability of bovin cerebral endothelial cell layers *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996,277(3):1418~1423
- [4] Louise CB, Tram MC, Obrig TG. Sensitization of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin: involvement of protein kinase C and NF-Kb. *Infect Immun*, 1997,65(8): 3337~3344
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 25~60
- [6] Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 2000,173:89~97
- [7] Alan Hall. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998,279:509~514
- [8] Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, Schulman C, Yin HL, Turnage RH. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor- α alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. *Surgery*, 2000,128(2):259~265
- [9] Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery*, 1995,118:358~365
- [10] Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC. Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and trans-endothelial migration. *J Clin Invest*, 1998,82(5):1746~1752
- [11] Zhao H, Helen PW. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*, 2001,21(13):4129~4139

**EFFECTS OF RECOMBINANT ADENOVIRUS OF FULL-LENGTH
AND TRANCATED FORM OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 ON THE ORGANIZATION
OF F-ACTIN IN Rf-6A ENDOTHELIAL CELLS**

SONG Ge, SUN Xue-gang, JIANG Yong

(Key laboratory for Shock and Microcirculation of PLA, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To investigate the effects of recombinant adenovirus that express full-length and truncated form of toll-like receptor 4 (TLR4 and Δ TLR4) on the organization of F-actin in cultured endothelial cell line Rf-6A, the sequences of TLR4 and Δ TLR4 were amplified by PCR from a TLR4 containing plasmid pcDNA3-TLR4 followed by subcloning of the fragments into a adenovirus shuttle vector pAdTrack to form transfer plasmids, pAdTrack-TLR4 and pAdTrack- Δ TLR4. After linearization with *pme* I, pAdTrack-TLR4 and pAdTrack- Δ TLR4 were cotransformed into BJ5183 bacteria that was pretransformed with adenovirus genomic plasmid of pAdEasy-1. The positive recombinant adenovirus plasmid were digested with *Pac* I and transfected into HEK293 cells for the packaging of recombinant adenovirus particles. After infections of the resultant viruses in Rf-6A cells, LPS-induced F-actin depolymerization and reorganization was detected with fluorescence staining with rodamine-phalloidin. The results indicated that LPS stimulation induced F-actin depolymerization and formation of stress fibers. Recombinant adenoviral vectors containing full-length TLR4 intensified LPS-induced F-actin depolymerization, while Δ TLR4 recombinant adenovirus inhibited the depolymerization of F-actin induced by LPS in Rf-6A cells significantly. These results revealed that the infection of recombinant adenovirus of full-length and truncated form of TLR4 in cells showed different effects on LPS-induced cellular response. Ad- Δ TLR4 showed the protection of cultured endothelial cells from injury of LPS-induced depolymerization and reorganization of F-actin.

Key Words: Adenovirus; Cytoskeleton; Toll-like receptor 4; Lipopolysaccharide