

AAV 体外介导 hCTLA4-Ig 在新生猪胰岛细胞中的表达与生物学活性

莫朝晖^{1,2}, 王 维^{1,3}, 刘 涛¹, 曾秋华¹, 吴小兵⁴, 谢艳红²

(中南大学 1. 湘雅三医院细胞移植与基因治疗研究所, 长沙 410013; 2. 湘雅三医院内分泌科, 长沙 410013; 3. 湖南省生殖与干细胞工程研究所, 长沙 410078; 4. 中国预防医学科学研究所病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

[摘要] 目的: 探讨 AAV-hCTLA4-Ig 体外感染猪胰岛细胞后, *hCTLA4-Ig* 基因的表达能力及生物学活性。方法: 腺相关病毒载体(AAV)介导 hCTLA4-Ig 体外转染新生猪胰岛细胞(NIPs), 用 RT-PCR 和免疫细胞化学法检测胰岛细胞内 *hCTLA4-Ig* mRNA 及蛋白质水平的表达。转染后的新生猪胰岛细胞与人淋巴细胞共孵育, 通过 ELISA 法检测培养基中 IL-2, IFN- γ , TNF- α 细胞因子水平的变化。并观察转染组与对照组葡萄糖刺激后的胰岛素释放反应。结果: 转染组 NIPs 可检测到 *hCTLA4-Ig* 基因及蛋白表达; 与人淋巴细胞共孵育后 IL-2, TNF- α , IFN- γ 浓度明显低于对照组 ($P < 0.01$); 且葡萄糖刺激胰岛素释放反应与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。结论: AAV-CTLA4-Ig 体外转染的胰岛细胞能够表达具有生物学活性的 hCTLA4-Ig, 可抑制 T 细胞激活, 而胰岛细胞生理功能不受影响。

[关键词] CTLA4-Ig; 基因转染; 新生猪胰岛细胞

[中图分类号] R657.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)01-0036-09

Expression of hCTLA4-Ig mediated by adeno-associated virus in porcine islets and their biological activity

MO Zhao-hui^{1,2}, WANG Wei^{1,3}, LIU Tao¹, ZENG Qiu-hua¹, WU Xiao-bing⁴, XIE Yan-hong²

(1. Cell Transplantation & Gene Therapy Institute of the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013;
2. Department of Endocrinology, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013;
3. Institute of Hunan Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078;
4. National Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing 100052, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the expression of *hCTLA4-Ig* and their biological function in newborn porcine islets (NPIs) transfected with AAV-hCTLA4-Ig. **Methods** Cultured NPIs were transfected with AAV-hCTLA4-Ig. The expression of *CTLA4-Ig* in these NPIs was assayed by RT-PCR and immunocytochemistry. The levels of IL-2, IFN- γ , and TNF- α in the culture medium were assayed by ELISA after these cells the co-cultured with human. The response of glucose-stimulated insulin secretion was observed in the transgene group and the control group. **Results** The expressions of *CTLA4-Ig* mRNA and protein were detected in the transgene group. The levels of cytokines were obviously lower in the transgene group than those in the control group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the response of glucose-stimulated insulin release between the transgene

①收稿日期(Date of reception) 2006-09-05

作者简介(Biography) 莫朝晖(1964-), 女, 湖南邵阳人, 教授, 主要从事糖尿病与胰岛移植的研究。

通讯作者(Corresponding author) 王 维, E-mail: wawe01cn@yahoo.com.cn

基金项目(Foundation items) 国家自然科学基金(39994013); 中国卫生部临床重点项目(20012841) This project was supported by Natural Science Foundation of China (39994013) and Clinical Project Foundation of Ministry of Health of China (20012841)

group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** AAV mediated *hCTLA4-Ig* expression in NPIs could inhibit T lymphocyte to produce cytokines, while the endocrine functions of the NPIs were not significantly affected.

Key words: CTLA4-Ig; gene transfection; newborn porcine islets (NPIs)

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(1):0036-09]

新生猪胰岛细胞是人异种胰岛移植最有前途的供体,但其面临的主要障碍是免疫排斥问题。 $CD4^+$ T 淋巴细胞活化是免疫排斥反应启动的主要环节。T 细胞的活化及其效应有赖于 MHC-抗原复合体识别及协同刺激信号传递,封闭共刺激通路可诱导受者对供者抗原特异性 T 细胞无能而产生耐受。人细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 免疫球蛋白(hCTLA4-Ig)是 CTLA4 分子的胞外段与 Ig Fc 段的融合蛋白,可阻断 CD28 介导的 T 细胞协同刺激通路,抑制 T 细胞的活化,从而降低与移植排斥反应有直接关系的白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)等细胞因子的产生,对移植排斥反应有明显的抑制作用^[1-2]。许多研究显示^[3-5],CTLA4-Ig 作为一种新型免疫抑制物质,体内注射重组可溶性蛋白或基因转染对移植排斥反应有明显的抑制作用,可延长移植物的存活时间、改善胰岛移植的效果。但全身使用 CTLA4-Ig 或体内基因转染可干扰整体免疫功能并导致非特异性免疫抑制,甚至发生严重并发症,而且需要重复给予,价格昂贵^[5-6]。本实验利用重组 AAV 作为载体,在体外将 *CTLA4-Ig* 基因转染到猪胰岛细胞,以期得到一种通过局部表达 CTLA4-Ig 达到抗排斥治疗的新方法。

1 材料与方 法

1.1 新生猪胰岛细胞的制备 出生 3~5 d 新生猪 4 头(购自湘雅医学院动物实验部,体质量 1.2~1.4 kg)氯胺酮麻醉后,无菌状态下剖腹取胰,将胰腺剪成 0.5~1 mm³ 大小组织碎块;0.5 mg/mL 浓度的 V 型胶元酶(Sigma 公司)充分消化后;低温离心 1 min,加入含 20% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL、1% 谷氨酰氨、RPMI 1640 液,置于 37 °C,5% CO₂ 和 95% 空气的培养箱内培养,每个培养瓶内约 1 × 10⁵ 个细胞,纯度约为 80%。

1.2 AAV 介导 *CTLA4-Ig* 基因转染新生猪胰岛细胞 取 10 瓶新生猪胰岛细胞,分为实验组和

对照组。AAV-CTLA4-Ig 和 AAV 来自中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室。转染时,实验组和对照组分别加入滴度为 1.0 × 10¹³ vg/mL 的 AAV-CTLA4-Ig 混悬液(病毒颗粒为 5 × 10¹¹)和 AAV 悬液各 50 μL,使其重复感染度(MOI)约为 5 × 10⁶,于 5% CO₂ 培养箱内 37 °C 培养 48 h,去除病毒液后,加入新生猪胰岛细胞培养基进行培养。

1.3 RT-PCR 检测新生猪胰岛细胞中 *CTLA4-Ig* 基因表达 于转染后 0, 1, 1.5, 3, 4, 6, 9, 12, 15 d 分别收集实验组和对照组细胞,按照 Genra 公司 RNA 抽提试剂盒所述方法抽提细胞总 RNA,合成 cDNA(试剂盒购自 Fermenta 公司)。针对 *hCTLA4-Ig* 的不同片段设计了 2 组引物。*CTLA4* 上游引物:5'-CAATGCACGTGGCCCAGCC-3';下游引物:5'-GCAGATGGAATCATCTAGGAAGGTC-3';扩增片段长度为 200 bp。IgG Fc 上游引物:5'-CACACAGAGGACGCTGCTCA-3';下游引物:5'-CTGCCATTGCTCTCCCACT-3';扩增片段长度为 948 bp。20 μL 反应总体积中加入下列物质:双蒸水 13.6 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,10 × PCR 反应缓冲液 2 μL,Taq 聚合酶 0.4 μL,20 mmol/L 引物各 0.4 μL,cDNA 1.2 μL。在 PE9600 型 PCR 仪上进行 PCR 共扩增,条件如下:95 °C 预变性 2 min 后,94 °C 变性 40 s,58 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 40 s,完成 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min,置 4 °C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分离,EB 染色后照相。

1.4 免疫组化检测新生猪胰岛细胞中 CTLA4-Ig 蛋白表达 转染 48 h 后,分别收集转染组和对照组细胞爬片固定,进行免疫组化分析,所用一抗为小鼠抗人 IgG₁,二抗为生物素标记兔抗小鼠 IgG,按照常规的免疫组化方法进行检测,DAB 显色,苏木素复染,照相、分析。

1.5 AAV-CTLA4-Ig 转染后胰岛细胞电镜检查

将 2 瓶转染后胰岛细胞 PBS 洗涤后用戊二醛固定,收集于 Eppendorf 管,制作电镜标本。

1.6 AAV-CTLA4-Ig 转染后新生猪胰岛细胞功能

测定 葡萄糖刺激实验:转染 6~7 d 后,分别用含 5.6 mmol/L 及 16.5 mmol/L 葡萄糖的 *D*-Hank's 液培养实验组和对照组细胞 24 h,收集上清液,放射免疫法测定胰岛素的含量。每组平行操作 5 份。

1.7 新生猪胰岛细胞转染 *CTLA4-Ig* 的免疫学效应体外检测 取 16 孔培养板,转染组、对照组各 6 孔,空白对照组 4 孔,每孔加纯化的新生猪胰岛细胞均为 10^4 个。转染组、对照组每孔加人淋巴细胞 7×10^7 个;空白对照组未加淋巴细胞。胰岛细胞与人淋巴细胞分别共孵育 12, 24, 36, 48, 72 h 后分别吸取培养基上清液,用 EISLA 方法测定 3 组细胞培养液中 IL-2, IFN- γ , TNF- α (各细胞因子检测试剂盒购自晶美生物技术有限公司)浓度,并进行比较。

1.8 统计学处理 数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间比较采用方差分析,用 SPSS 10.0 软件进行数据处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 新生猪胰岛细胞 *AAV-CTLA4-Ig* 转染后 RT-PCR 检测结果 收集转染后 0~15 d 的新生猪胰岛细胞,RT-PCR 扩增,结果发现,转染 1 d 后,*CTLA4-Ig-Fc* 片段就已经在新生猪胰岛细胞中开始表达,随着时间的推移表达量逐渐达到最高(图 1),而对照组未检测到该片段表达。收集转染 6 d 的新生猪胰岛细胞 RT-PCR 扩增 *CTLA4* 基因片段,发现转染组有 *CTLA4* 表达,而对照组未检测到其表达(图 2)。

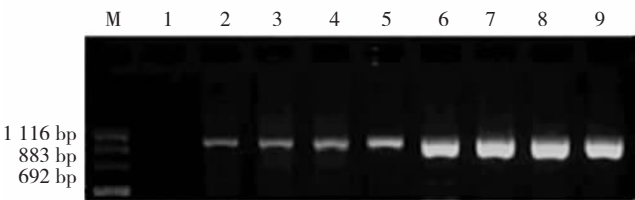


图 1 *AAV-CTLA4-Ig* 转染后 NPIs 中 *Ig-Fc* 基因的 RT-PCR 检测结果 M: PUC Mix 8 Marker; 1~9: 分别转染 0, 1, 1.5, 3, 4, 6, 9, 12, 15 d

Fig. 1 RT-PCR amplification of *Ig-Fc* gene in NPIs after transfection of *AAV-CTLA4-Ig* M: PUC Mix 8 Marker; 1~9: Represented 0, 1, 1.5, 3, 4, 6, 9, 12, 15 d after transfection

2.2 转染后 NPIs 生理功能测定 AAV 转染组

与未转染组高葡萄糖刺激后胰岛素释放量均较低,糖刺激明显增加 ($P < 0.01$);但两组间无明显差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

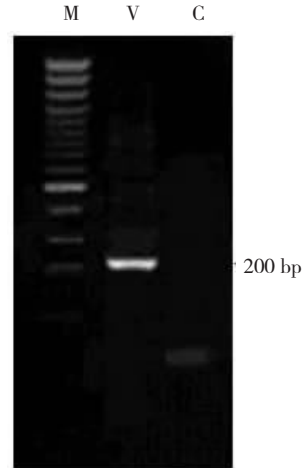


图 2 *AAV-CTLA4-Ig* 转染 6 d 后 NPIs 中 *CTLA4* 基因的 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 RT-PCR amplification of *CTLA4* gene in NPIs after transfection of *AAV-CTLA4-Ig* for 6 days M: PUC Mix 8 Marker; V: Transgene group; C: Control group

表 1 胰岛素释放两组结果比较 (mU/L)

	AAV 转染组	非 AAV 转染组
低糖(LG)	115.8 \pm 10.4	117.4 \pm 12.0
高糖(HG)	261.7 \pm 23.2 **	263.6 \pm 17.6 *

与低糖刺激比较, ** $P < 0.01$

2.3 新生猪胰岛细胞表达 *CTLA4-Ig* 对抑制 T 细胞活化的免疫学特性 NPIs 与人淋巴细胞共孵育后,测定培养基中的细胞因子浓度,结果发现,转染组 IL-2, TNF- α , IFN- γ 浓度明显低于对照组 ($P < 0.01$),而转染组与空白对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 NPIs 与人淋巴细胞共孵育后培养基中细胞因子测定结果

	TNF- α (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
转染组	10.8 \pm 1.4 **	20.7 \pm 3.1 **	50.5 \pm 7.2 **
对照组	178.4 \pm 16.8	220.6 \pm 20.1	400.7 \pm 34.8
空白对照组	8.7 \pm 1.1	10.4 \pm 1.6	40.4 \pm 5.1

与对照组比较, ** $P < 0.01$

2.4 胰岛细胞免疫化学染色与电镜下形态结构

免疫荧光染色显示转染组胰岛细胞胞浆有大量 *CTLA4-Ig* 阳性荧光染色(图 3A),而对照组荧光染色阴性。免疫细胞染色也显示转染组有大量深棕褐色 *CTLA4-Ig* 阳性的胰岛细胞及少量浅兰色未转染的胰岛细胞(图 3B),转染率约为 70%;对照组全部为浅兰色未转染的胰岛细胞,未见深棕褐色的胰岛细胞(图 3C)。提示胰岛细胞转染

后 CTLA4-Ig 能在 NPIs 中有效表达。电镜观察显示转染组胰岛细胞细胞浆内可见较多分泌颗粒,

其内未见病毒颗粒(图 4D)。

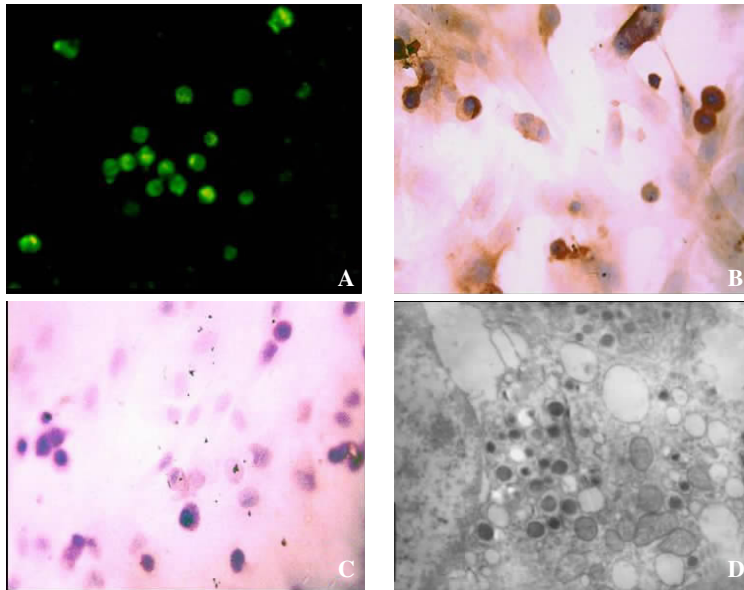


图 3 胰岛细胞免疫化学染色与电镜下形态结构体 A:转染组胰岛细胞 CTLA4-Ig 免疫荧光染色; B:转染组胰岛细胞 CTLA4-Ig 免疫组化染色($\times 40$); C:对照组胰岛细胞 CTLA4-Ig 免疫组化染色($\times 40$); D:转染组胰岛细胞电镜下形态($\times 12\ 500$)

Fig. 3 Immunocytochemistry analysis of CTLA4-Ig in NPIs and Morphosis in Electron microscope A: Fluorescein stain in in the transgene group; B: CTLA4-Ig immunocytochemistry of the transgene group; C: Not detected in the control group; D: Morphosis in Electron microscope in the transgene group ($\times 12\ 500$)

3 讨 论

由于腺相关病毒无致病性、宿主范围广、转染和表达率高、可使目的基因长期表达等优点成为当前基因治疗中最有潜力的基因转移系统^[7]。本研究应用腺相关病毒载体(AAV)将 *hCTLA4-Ig* 基因在体外转染新生猪胰岛细胞(NPIs),实验结果显示,转染组胰岛细胞 RT-PCR 可检测到 *CTLA4-Ig* mRNA,免疫细胞化学染色显示胞浆内明显棕黄色 CTLA4-Ig 阳性染色,说明外源性的 *CTLA4-Ig* 基因在腺相关病毒载体的携带下,成功地整合到胰岛细胞内,并有相应的 mRNA 和蛋白质表达。电镜下转染组胰岛细胞内未见病毒颗粒存在,说明病毒载体已整合到细胞染色体中,而不是以附加体的形式存在,因而可以使目的基因不至于丢失。转染组和非转染组胰岛细胞的葡萄糖刺激试验胰岛素分泌量无明显差别,说明 AAV-CTLA4-Ig 转染后胰岛细胞的生理功能没有受到明显影响,经过基因修饰的胰岛细胞仍然可以接受有效生理刺激信号。

将转染组和非转染组的新生猪胰岛细胞,分别与人淋巴细胞共孵育,通过 ELISA 的方法检测培养基中 IL-2, IFN- γ , TNF- α 3 种与免疫排斥关系较密切的细胞因子浓度来观察外源性 *CTLA4-Ig* 基因表达产物的生物学活性及其对免疫反应过程的影响,结果转染组培养基中 3 种细胞因子的浓度明显低于非转染组,与空白对照组无明显差别,表明 AAV-CTLA4-Ig 转染的胰岛细胞能够表达具有生物学活性的 CTLA4-Ig,可发挥抑制排斥反应的作用。免疫应答是在遗传基因的调控下,由多种细胞和免疫分子的参与下发生的。常把它分为感应(或识别)阶段、增殖和分化阶段以及效应阶段。对 T 细胞共刺激信号的研究认为,对 T 细胞的完全活化及活化之后有效的免疫应答必须有两个信号的存在^[1]。第一信号由抗原提供即 MHC-抗原复合体;第二信号即协同刺激信号,由抗原提呈细胞(APC 细胞)的协同刺激分子提供,最具代表性的协同刺激分子是 APC 上表达的 B7 分子及其 T 细胞上的受体 CD28 和 CTLA4。*hCTLA4-Ig* 是人 CTLA4 的胞外段与人 Ig Fc 段融合形成的融合蛋白,它与 APC 上表达的 B7-1 (CD80) 和 B7-2

(CD86)的亲和力高于T细胞上表达的CD28与B7-1和B7-2的亲和力^[2]。CTLA4-Ig阻断了CD28介导的T细胞协同刺激通路,从而抑制T细胞的活化,降低与移植排斥反应有直接关系的IL-2, TNF- α , IFN- γ 等细胞因子的产生;而且能使Th细胞保持静止状态,避免其辅助B细胞产生抗体,抑制体液免疫^[1-3]。已有动物实验证实^[3-5],体内注射CTLA4-Ig重组可溶性蛋白或CTLA4-Ig基因转染对移植排斥反应有明显的抑制作用,可延长胰岛等移植物的生存时间^[8,9]。

本实验采用体外转染的方法只对供体胰岛细胞进行转染并产生靶基因的有效表达,表达的CTLA4-Ig具有抑制T细胞活化,制止免疫排斥反应的作用,同时不影响胰岛的生理功能;由于体外转染的方法不影响机体其他组织细胞,对移植受体全身免疫系统干扰小。因此,胰岛细胞体外转染后移植可能是一种安全、有效的方法,但需体内动物实验进一步证实。

参考文献:

[1] Alegre M L, Fallarino F. Mechanisms of CTLA4-Ig in tolerance induction [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12 (2): 149-160.

[2] Ravetch J V, Lanier L L. Immune inhibitory receptors [J]. *Science*, 2000, 290 (5489): 84-89.

[3] Nabeyama K, Yasunami Y, Toyofuku A, et al. Beneficial effects of costimulatory blockade with an inducible costimulator

antibody in conjunction with CTLA4 Ig on prevention of islet xenograft rejection from rat to mouse [J]. *Transplantation*, 2004, 78 (11): 1590-1596.

- [4] Anita L G, Gregory S K, Ray V R, et al. Expression of CTLA4-Ig by biolistically transfected mouse islets promotes islets allografts survival [J]. *Transplantation*, 1997, 63 (7): 1017-1021.
- [5] Hirakawa E, Yasunami Y, Nakano M, et al. Amelioration of hyperglycemia in streptozotocin induced diabetic mice with fetal pancreatic allografts; prevention of rejection by donor specific transfusion in conjunction with CTLA4 Ig [J]. *Pancreas*, 2004, 28 (2): 146-152.
- [6] Perrin P J, June C H, Maldonado J H, et al. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (3): 1704-1710.
- [7] Yang Z F, Wu X B, Tsui T Y, et al. Recombinant adeno-associated virus vector: Is it ideal for gene delivery in liver transplantation? [J]. *Liver Transpl*, 2003, 9 (4): 411-420.
- [8] Miao G, Ito T, Uchikoshi F, et al. Development of donor specific immunoregulatory T-cells after local CTLA4 Ig gene transfer to pancreatic allograft [J]. *Transplantation*, 2004, 78 (1): 59-64.
- [9] Luo G, Wu J, Chen X, et al. CTLA4 Ig introduced by adenovirus vector locally to prolong the survival of xenogeneic skin grafts on rat burn wounds [J]. *J Trauma*, 2005, 59 (5): 1209-1215.

(本文编辑 彭敏宁)