

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0380-05

逆转录病毒载体介导人载脂蛋白与卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因在骨骼肌的异源性共表达

于书真, 范乐明, 陈琪, 王南, 陈秀英, 魏恩会

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[主题词] 逆转录病毒; 载脂蛋白 AI; 卵磷脂胆固醇酰基转移酶; 基因治疗

[摘要] 为探讨人载脂蛋白 AI 和卵磷脂胆固醇酰基转移酶基因在肌源性细胞中异源共表达的可能性, 构建含上述基因和新霉素磷酸转移酶基因的多顺反子重组逆转录病毒载体, 以此制备重组病毒颗粒并转染小鼠原代肌母细胞及 C2C12 肌源性细胞株。酶联免疫吸附法和免疫组织化学检测证实转染后的细胞均具有异源共表达人载脂蛋白 AI 与卵磷脂胆固醇酰基转移酶的能力。经 G418 筛选则获得稳定转化的 C2C12 细胞株, 60 天后仍能有效共表达人载脂蛋白 AI 与卵磷脂胆固醇酰基转移酶。聚合酶链反应法检测显示人载脂蛋白 AI cDNA 与 IRES 序列均有效整合于靶细胞基因组中。提示以重组逆转录病毒为载体在体外对肌源性细胞进行遗传修饰, 再移植回骨骼肌使之在体内长期高效表达载脂蛋白 AI 和卵磷脂胆固醇酰基转移酶, 可能是一种值得探讨的通过促进胆固醇逆转运途径来防止或减轻高脂血症和动脉粥样硬化的方法。

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

Ectopic Co-Expression of Human Apolipoprotein AI and Lecithin Cholesterol Acyltransferase in Mice Skeletal Muscle Cells Introduced by Retroviral Vectors

YU Shu Zhen, FAN Le-Ming, CHEN Qi, WANG Nan, CHEN Xiu-Ying, and WEI En-Hui

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

MeSH Retroviridae; Apolipoprotein AI; Lecithin Acyltransferase; Gene Therapy

ABSTRACT **Aim** To investigate the possibility of ectopic expression of apolipoprotein AI (apo AI) and lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) by myogenic cells and developing a new approach of gene therapy for atherosclerosis (As). **Methods** Recombinant replication-deficient viral particles were prepared with polycistronic retrovirus vectors containing apoAI cDNA, LCAT cDNA and the neomycin phosphotransferase gene (NEO). Mice primary cultured myoblasts and myogenic cell line C2C12 were transfected by these viruses. The efficiency of transfection and the state of integration were detected by PCR, while the expression of apo AI and LCAT were measured by ELISA and immunohistochemical method. **Results** All transfected mice myoblasts and C2C12 cells gained the ability of co-expressing human apo AI and LCAT. Stable transfected C2C12 cell line selected by G418 maintained the ability of co-expressing apo AI and LCAT for 60 days. PCR shown the apo AI cDNA and IRES sequence were integrated into genomes of target cells effectively. **Conclusions** These finds indicated mouse primary myoblasts and C2C12 myoblasts transduced with recombinant retroviral vectors could efficiently express and secrete human apo AI and LCAT. It suggested that the use of polycistronic retrovirus vectors containing human apo AI and LCAT cDNA to genetically modify myoblasts in vitro and then implantation back to skeletal muscle to high efficiently, long-term express apo AI and LCAT in vivo, might be a strategy to prevent or treat hypercholesterolemia and As by promoting the "reverse cholesterol transport" pathway.

大量研究表明, 载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, apo AI) 与卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) 已成为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 基因治疗中较有希望的目的基

因^[1]。鉴于载脂蛋白 AI 和 LCAT 在胆固醇逆转运机制中的协同作用, 选用能同时表达这两种蛋白质的载体显然更为理想。由于腺病毒载体所携带的外源基因并不整合至宿主细胞的染色体基因组, 表达时间较短, 且易引起宿主的免疫应答反应。以肝脏为靶器官对机体造成的损害较大, 其实际应用受到一定的限制。因此, 我们构建了以细小病毒内部核糖体入口片段 (internal ribosomal entry site, IRES) 连

[基金项目] 江苏省教委自然科学基金(96031)资助。

[作者简介] 于书真, 女, 1971 年 8 月出生, 硕士, 现在美国 Maryland 大学医学院进修。范乐明, 男, 1940 年 7 月出生, 病理生理学教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者。

接载脂蛋白 AI 与 LCAT 等基因的重组多顺反子逆转录病毒特异性表达载体, 选用骨骼肌为靶器官, 对其表达效率进行体外研究。

1 材料与方法

1.1 质粒的构建

质粒 pLNEPN 和 pHENA 由英国伦敦大学 Dickson 教授惠赠。以一个多接点片段和一个 FMCV/IRES-NEO 编码框替代 pLNEPN 载体的 NEO-EMCV/IRES-PNP 编码框, 构成穿梭质粒 pLIN; 将 apo AI-POLIO/IRES-LCAT 片段插入 pLIN 中 IRES 片段的上游, 形成一个由鼠白血病毒 MoMLV 启动子 LTR 驱动的 apo AI-POLIO/IRES-LCAT-EMCV/IRES-NEO 编码框, 构成重组质粒 pLAPLEN。以其转化 JM109 宿主菌并筛选阳性克隆, 获得 pLAPLEN 表达载体。

1.2 细胞培养

包装细胞 GP+ E-86 和 AM12 及检测病毒滴度的 NIH3T3 细胞由英国伦敦大学 Dickson 教授惠赠。C2C12 细胞为我室保存, 以上细胞均以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养。原代肌母细胞取材于新生的昆明种小鼠四肢骨骼肌, 以常规方法分离后在含 20% FCS 的 Ham F-10 培养基中生长。昆明种小鼠购于江苏省实验动物中心。

1.3 质粒的转化、提取及纯化

质粒的转化采用氯化钙处理法制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞。质粒的大量扩增与抽提采用碱裂解法, 质粒的纯化采用聚乙二醇沉淀法。

1.4 包装细胞的转染及高滴度产病毒细胞克隆的鉴定

质粒 pLAPLEN 转染包装细胞采用磷酸钙共沉淀法, 并以甘油休克增加其转染效率。转染后的包装细胞培养 2 天后按 1:20 传代, 加入含 500 mg/L G418 的选择性培养基进行筛选。4 周后用 NIH3T3 细胞检测滴度, 将高滴度产病毒包装细胞株冻存, 产生的重组病毒用于肌源性细胞的感染。病毒滴度用每升上清的克隆形成单位表示, 即: 病毒滴度 (kcfu/L) = 病毒稀释度 × 细胞稀释度 × 细胞克隆数。

1.5 原代肌母细胞及 C2C12 细胞的感染

原代肌母细胞生长达 80% 汇合时, 按一定感染强度加入病毒上清到完全培养基中共 2 mL, 并加入 polybrene 8 mg/L, 培养 24 h 后加 200 mg/L G418 筛选。2 天后细胞培养基换为含 2% FCS 的 DMEM 促分化培养基, 培养 3~4 天, 90% 以上的细胞转化为多核的肌管细胞 (myotube)。

C2C12 细胞按常规培养, 以同样方法进行感染, 2 天后细胞加 500 mg/L G418 进行筛选, 以产生稳定转染的 C2C12 细胞株。部分细胞加入含 2% FCS 的 DMEM 选择培养基促使其汇合并分化为肌管细胞。

1.6 人载脂蛋白 AI 表达产物的检测

细胞感染及分化后按一定时间收集无血清的细胞培养基, 用双抗体夹心 ELISA 法检测细胞培养基中人载脂蛋白 AI 浓度。

1.7 人卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性的测定

采用以 ^3H -胆固醇标记的 LCAT 失活血清高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 为底物, 并结合薄层层析以放射化学方法测定细胞培养基中 LCAT 活性, 结果以培养基中 ^3H -胆固醇的酯化率 $[\%/(L \cdot h)]$ 表示。

1.8 聚合酶链反应

提取稳定转染的 C2C12 细胞基因组 DNA, 以聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法检测目的基因的转移效率与整合情况。

1.9 免疫组织化学分析

稳定转染的 C2C12 细胞用中性福尔马林固定后浸于 1% 过氧化氢 10 min, PBS 充分洗涤后加入系列稀释的第一抗体, 置 37℃ 1 h, PBS 洗涤后加入系列稀释的酶标第二抗体, 37℃ 孵育 1 h。最后以 DAB 显色, 苏木素复染, 树胶封片。

2 结果

2.1 高滴度产病毒包装细胞的产生

本实验室首次构建了含人载脂蛋白 AI cDNA、LCAT cDNA 和 NEO 基因的三顺反子重组逆转录病毒表达载体 (图 1, Figure 1)。经转染包装细胞后获得高滴度产病毒细胞株, 包括 GP+ E-86 细胞 2 株 (9、12 号), AM12 细胞 2 株 (5、8 号)。用以鉴定病毒滴度的相应 NIH3T3 细胞培养基中也均测得人载脂蛋白 AI 与 LCAT 活性 (表 1, Table 1)。

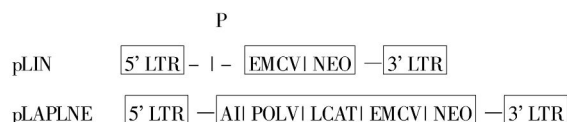


图 1. 逆转录病毒载体基因组结构示意图

Figure 1. Schematic representation of the proviral genome structure of retroviral vectors. P: polycloning site; LTR: long terminal repeat of retrovirus; AI: human apoAI cDNA; LCAT: human LCAT cDNA; EMCV: IRES fragment of encephalomyocarditis virus; POLV: IRES fragment of poliovirus; NEO: neomycin phosphotransferase gene.

表 1. 产病毒包装细胞株的病毒滴度与 NIH3T3 细胞的重组蛋白表达产物($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Analysis of retrovirus titre of producing cell clones and secretion of recombinant LCAT and apo AI in corresponding NIH3T3 fibroblasts

Clone No.	Packaging cells	Titre (cfu/L)	LCAT Secretion [%/(L·h)]	Apo AI Secretion (mg/L)
9	GP+ E-86	5.6×10^8	1060 ± 780	0.53 ± 0.05
12	GP+ E-86	3.8×10^8	1930 ± 1210	0.68 ± 0.08
5	AM12	2.4×10^8	1050 ± 390	0.32 ± 0.01
8	AM12	4.0×10^8	1470 ± 650	0.75 ± 0.05

2.2 小鼠原代肌母细胞分泌的表达产物

分别在感染后第 24~48 h、48~72 h 及第 6、7 天(已分化肌管细胞)收集 24 h 无血清细胞培养基,经载脂蛋白 AI 的 ELISA 与 LCAT 活性的放射化学法测定表明均有人载脂蛋白 AI 和 LCAT 的异源表达(表 2, Table 2)。

表 2. LAPLEN 感染的小鼠原代肌母细胞中人载脂蛋白 AI 和 LCAT 的异源性共表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Ectopic co-expression of apo AI and LCAT by primary cultured mouse myoblasts transduced with LAPLEN

Time	LCAT secretion [%/(L·h)]		Apo AI secretion (mg/L)	
	1	2	1	2
24~48 h	1710 ± 150	1537 ± 502	0.46 ± 0.05	0.76 ± 0.14
48~72 h	2820 ± 1080	1010 ± 682	0.53 ± 0.11	0.69 ± 0.01
6 d	1420 ± 542	1602 ± 81	0.38 ± 0.08	0.82 ± 0.10
7 d	1110 ± 857	2752 ± 1140	0.44 ± 0.03	0.62 ± 0.01

Cells at 24~48 h and 48~72 h are myoblasts; while at day 6~7, all cells had fused to form multinucleate myotubes induced by differential media (DMEM containing 2% FCS). 1: Transduced recombinant retrovirus were produced by GP+ E-86 packaging cells; 2: Transduced recombinant retrovirus were produced by AM12 packaging cells.

2.3 小鼠肌源性细胞 C2C12 分泌的表达产物

以 LAPLEN 重组逆转录病毒颗粒转化后的单核 C2C12 细胞能异源表达人载脂蛋白 AI 和 LCAT (24~48 h, 48~72 h), 在分化为多核的肌管细胞后(第 6、7 天)依然保持表达人载脂蛋白 AI 和 LCAT 的能力。感染后的细胞经 G418 筛选, 获得稳定转化的 C2C12 细胞株, 60 天后仍能有效表达人载脂蛋白 AI 和 LCAT(表 3, Table 3)。

表 3. 以 LAPLEN 重组逆转录病毒感染肌源性 C2C12 细胞的人载脂蛋白 AI 和 LCAT 的异源性共表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Ectopic co-expression of apo AI and LCAT by C2C12 myoblasts transduced with LAPLEN

Time	LCAT secretion [%/(L·h)]		Apo AI secretion (mg/L)	
	1	2	1	2
24~48 h	1620 ± 150	ND	0.67 ± 0.02	ND
7 d	1680 ± 460	1830 ± 320	0.46 ± 0.01	0.54 ± 0.02
10 d	1860 ± 560	1660 ± 580	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.07
20 d	ND	920 ± 430	ND	0.61 ± 0.02
30 d	ND	873 ± 560	ND	0.65 ± 0.07
60 d	ND	1317 ± 661	ND	0.57 ± 0.02

1: C2C12 myoblasts (24~48 h) or differentiated myotubes induced by exposing to 2% FCS (7 d); 2: Stable transduced C2C12 myoblast selected by G418; ND: not determined.

2.4 目的基因整合情况

采用 PCR 法对经 G418 筛选稳定转染 60 天的 C2C12 细胞基因组进行分析, 以相应引物扩增外源基因载脂蛋白 AI cDNA (821 bp) 与 IRES 片段 (793 bp), 检测重组载体基因的存在。结果显示, 外源基因载脂蛋白 AI cDNA 与 IRES 片段均整合入稳定转染的 C2C12 细胞基因组, 而未经转染的 C2C12 细胞基因组中未有外源基因的存在(图 2 和 3, Figure 2 and 3)。

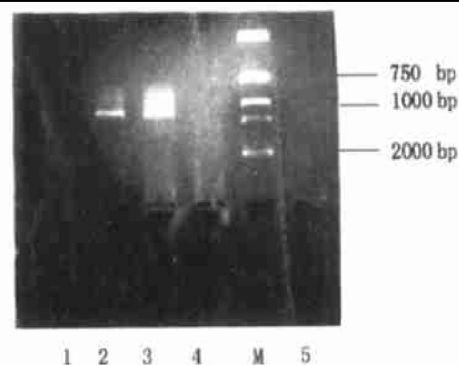


图 2. 稳定转染的小鼠肌源性 C2C12 细胞基因组中载脂蛋白 AI cDNA 的 PCR 分析

Figure 2. PCR analysis of apo AI cDNA in the genome of stable transfected mouse C2C12 myoblast. 1: PCR negative control; 2,3: stable transfected mouse C2C12 myoblast; 4,5: non-transfected mouse C2C12 myoblast; M: DNA Marker.

2.5 细胞免疫组织化学分析

免疫组织化学分析结果显示, 转染的 C2C12 细胞组 95% 以上的细胞胞浆中有载脂蛋白 AI 和 LCAT 的表达(图 4 和 5, Figure 4 and 5)。

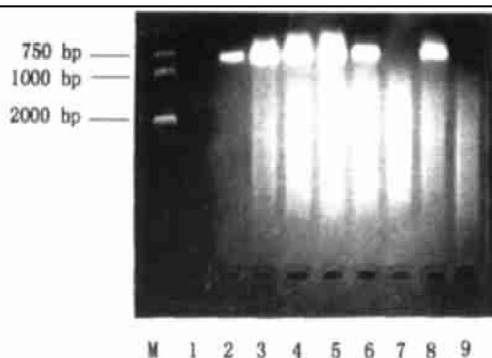


图 3. 稳定转染的小鼠肌源性 C2C12 细胞基因组中 IRES 片段的 PCR 分析

Figure 3. PCR analysis of IRES fragment in the genome of stable transfected mouse C2C12 myoblast. 1: PCR negative control; 2~ 6,8: stable transfected mouse C2C12 myoblast; 7,9: non transfected mouse C2C12 myoblast; M: DNA Marker.



图 4. pLAPLEN 转染的小鼠肌源性 C2C12 细胞中载脂蛋白 AI 表达的免疫组织化学分析

Figure 4. Immunohistochemical staining of C2C12 cells transfected with pLAPLEN (× 40).

3 讨论

高密度脂蛋白 (HDL) 的抗动脉粥样硬化作用已获得普遍公认, 作为 HDL 主要组分的 LCAT 与载脂蛋白 AI, 因其在 RCT 中的多种关键作用, 是 HDL 具有抗动脉粥样硬化特性的主要因素。后者已通过采用基因敲除或基因转导正反两方面的动物实验而获得进一步肯定^[2-5], 提示 LCAT 与载脂蛋白 AI 可作为动脉粥样硬化基因治疗的重要候选基因。本实

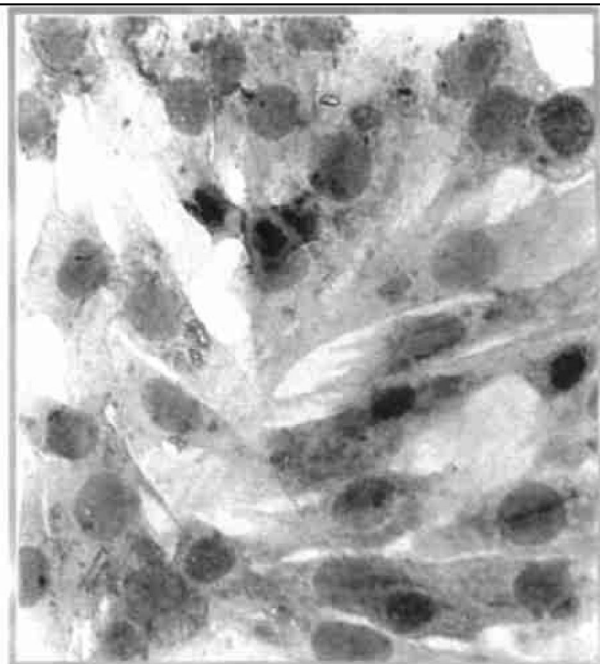


图 5. pLAPLEN 转染的小鼠肌源性 C2C12 细胞中 LCAT 表达的免疫组织化学分析

Figure 5. Immunohistochemical staining of C2C12 cells transfected with pLAPLEN (× 40).

验利用两者在 RCT 过程中的协同作用, 将 LCAT 与载脂蛋白 AI 基因构建于同一重组载体中, 实验证明以此转化的肌源性细胞能同时有效表达并分泌 LCAT 与载脂蛋白 AI。

骨骼肌量大, 血管丰富, 位于体表易于操作, 是表达外源基因的良好场所^[6]。骨骼肌细胞易于分离并大量培养, 更重要的是, 肌纤维细胞在肌肉生长过程中, 可以由多个单核细胞自动融合为多核肌管细胞, 形成一个共同染色体组。当经过基因修饰后的肌母细胞用注射方式移植回肌肉以后, 可与组织中的肌纤维融合, 其细胞核可长期存在并转录相应的目的基因^[7], 也可以卫星前体细胞的形式存在于移植组织中^[8]。虽然载脂蛋白 AI 和 LCAT 的主要合成部位是肝脏, 但二者均为分泌性蛋白质, 能够借助面广量大的肌肉组织作为合成和分泌场所。本实验选择小鼠肌源性 C2C12 细胞和乳鼠原代肌母细胞, 以重组逆转录病毒为载体转导入载脂蛋白 AI 和 LCAT 基因, 均得到有效表达, 而且证实诱导其分化为肌管细胞后仍能分泌载脂蛋白 AI 和 LCAT。这些结果为进一步研究和发展以骨骼肌为靶组织的动脉粥样硬化基因治疗提供了实验依据。

逆转录病毒载体 (retrovirus vector, RV) 是目前基因治疗中应用最多的一种^[9]。本实验构建的含

IRES 的逆转录病毒载体为一种有效的多基因表达载体。大多数重组逆转录病毒载体都利用其 5' 端 LTR 及一个内部的启动子来分别促进目的基因与选择基因的表达。但一个潜在的问题是若对这些逆转录病毒载体用选择剂来加强选择基因的表达, 将会使其他基因(目的基因)的表达受到抑制, 此称为启动子抑制。另外, 内部启动子的存在可能会影响病毒效价。有研究表明, 细小病毒利用其 5' 非翻译区的一个内部核糖体片段 IRES 能够逃避翻译过程中的标准核糖体浏览模式。在逆转录病毒载体中用 IRES 连接不同外源基因, 即可由一个启动子驱动而不经多转录单位剪接产生一分子多顺反子的 mRNA, 产生多种不同蛋白质, 从而避免了潜在的启动子抑制效应^[10]。本实验首次构建了能同时表达载脂蛋白 AI、LCAT 和 NEO 基因的三顺反子逆转录病毒表达载体, 各基因之间以 IRES 进行连接。以此转导培养的小鼠原代肌母细胞及肌源性 C2C12 细胞, 结果均得到长期有效的表达。PCR 检测表明载脂蛋白 AI cDNA 与 IRES 均存在于稳定感染的 C2C12 细胞染色体基因组中。

由此我们认为以多顺反子重组逆转录病毒载体在体外对肌源性细胞进行遗传修饰后再移植回骨骼肌内, 可能是一种在体内高效持久表达载脂蛋白 AI 和 LCAT 基因从而防止和/或减轻动脉粥样硬化的有效和安全的方法。当然, 这种方法的安全性及实际应用性尚需通过动物实验进一步验证。

参考文献

- [1] Glass CK, Witztum. Atherosclerosis: The road ahead [J]. *Cell*, 2001, **104**: 503-516
- [2] Tallex A, Hennuyer N, Caillaud JM, et al. Protective effect of human apo AI overexpression on atherosclerosis in transgenic rabbit [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **34**: 35-43
- [3] Brousseau ME, Wang J, Demosky SJ, et al. Correction of hypoalphalipoproteinemia in LDL receptor deficient rabbits by lecithin cholesterol acyltransferase [J]. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 1 558-567
- [4] Ng DS, Francone OL, Forte TM, et al. Disruption of the murine lecithin cholesterol acyltransferase gene causes impairment of adrenal lipid delivery and upregulation of scavenger receptor class B type I [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 15 777-781
- [5] Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice [J]. *Circulation*, 1999, **100** (17): 1 816-822
- [6] Ozawa CR, Springer ML, Blau HM. A novel means of drug delivery: Myoblast-mediated gene therapy and regulatable retroviral vectors [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, **40**: 295-317
- [7] Decary S, Mouly V, Hamida CB, et al. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: Implication for satellite cell-mediated gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**: 1 429-434
- [8] Yao SN, Kurachi K. Implanted myoblasts not only fuse with myoblasts but also survive as muscle precursor cells [J]. *J Cell Sci*, 1993, **105**: 957-963
- [9] Fassati A, Dunckley MG, Dickson G. Retroviral vectors [M]. *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. Edited by George Dickson, 1st edition. Chapman Hall, 1995, 1-19
- [10] Adam MA, Ramesh N, Miller AD, et al. Internal initiation of translation in retrovirus vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions [J]. *J Virol*, 1991, **65**: 4 895-901

(此文 2001-06-11 收到, 2001-11-06 修回)

(此文编辑 文玉珊)