

潜在腺病毒感染的肺泡上皮细胞模型的构建

陈娟¹ 李冰² 刘启才² 熊丽红³ 冉丕鑫^{1*}¹广州医学院第一附属医院, 广州呼吸疾病研究所, 广州 510182; ²广州医学院实验医学研究中心, 广州 510182;³深圳市第二人民医院急诊ICU, 深圳 518039)

摘要 为了探讨腺病毒潜伏感染对正常气道上皮细胞生理功能的影响以及与呼吸道疾病发生、发展的关系, 构建了含腺病毒最主要效应蛋白 E1A 的高效真核表达载体, 转染正常大鼠肺泡上皮细胞(CCL149), 经过长期抗性筛选获得多个抗性细胞克隆, 应用 PCR、RT-PCR、Western 印记和免疫组化的方法对抗性克隆进行鉴定, 最终获得不同 E1A 蛋白表达强度的阳性细胞克隆。通过细胞增殖曲线和周期分析, 观察 E1A 基因对细胞基本功能的影响。结果显示, E1A 基因明显抑制细胞增殖周期, 引起细胞 S 期比例下降, G₁ 期延长, 同时 E1A 能明显增强 TNF α 诱导下的细胞凋亡。

关键词 腺病毒; 肺泡上皮细胞; E1A 蛋白; 慢性阻塞性肺疾病

腺病毒是儿童时期急性下呼吸道感染的主要病原体之一, 其除了引起急性呼吸系统感染外, 病毒的 DNA 可以长期存在于上呼吸道的组织细胞内形成潜伏感染。临床病例分析^[1,2]和流行病学调查资料^[3-5]显示腺病毒潜伏感染是可能的导致成年肺部、支气管和气管某些进行性病变的危险因素, 此后进行的动物实验也支持以上观点^[6]。由于上述研究的结果说明腺病毒潜伏感染所引起的呼吸道组织和细胞的病理改变, 以及与其他致病因素如吸烟、致炎因素等的协同作用可能是一些呼吸道疾病的重要发病机制。为验证这一假说, 需要在体外细胞水平进行相关的分析, 了解腺病毒潜伏感染对宿主细胞的一般生理活动的影响, 以及与呼吸道疾病密切相关的众多致病因素如: 炎症因素、氧化/抗氧化失衡、细胞凋亡的相互作用, 从而探索其意义。

E1A 蛋白是腺病毒侵染细胞后持续表达的最主要的蛋白质, 被认为主要通过作用于宿主细胞一些重要的调控蛋白来影响宿主和病毒自身相关基因的转录^[7,8], 因此是可能的最重要的效应蛋白。本研究将腺病毒早表达基因 E1A 克隆到高效真核表达载体 pCDNA₃, 转染 CCL149(大鼠肺泡上皮细胞), 筛选出稳定表达 E1A 蛋白的抗性克隆, 并对稳定表达 E1A 蛋白的细胞进行基本特性分析, 为下一步对 E1A 蛋白在气道细胞的功能以及与疾病发生发展的关系研究提供细胞模型。

1.1 试剂及试剂盒

脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000、Trizol、高保真 Taq 酶以及 G418、T 载体购自 Invitrogen 公司, 小鼠抗 E1A 抗体、RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司, 免疫组化试剂 PV-6002 购自中杉生物工程有限公司, 限制性内切酶 *Hind*III、*Bam*HI、*Sac*I 等为 TaKaRa 公司产品。TNF α 为 Biorsource 公司产品。

1.2 细胞培养

CCL149 细胞株(大鼠肺泡上皮细胞)和 293 细胞株(腺病毒 E1 基因转染的原代人胚肾细胞)由 ATCC 提供。CCL149 细胞培养常规使用含 10%FBS 的 F12K 培养基(购自 Gibco 公司)在 37 °C, 5%CO₂ 细胞培养箱培养; 293 细胞使用含 10%FBS 的 DMEM(购自 Gibco 公司)的培养基培养, 培养条件同前。293 细胞用于腺病毒 E1A 蛋白阳性表达对照。

1.3 质粒

含腺病毒 E1A 编码区序列的质粒 pneo-E1A 由加拿大肺病研究中心 James C.Hogg 教授惠赠, 该质粒携带腺病毒 5 基因组从 25 到 1770 核苷酸序列, 真核表达载体 pCDNA₃、pEGFP-C₂ 由本所提供。

1.4 E1A 真核表达质粒的构建

用高保真 Taq 酶 PCR 扩增 pneo-E1A 质粒的 E1A 基因完整编码区, 在基因上下游分别加入 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切序列, 全长 1 560 bp。上游引物: 5'-

1 材料与方法

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-11-14

* 通讯作者。Tel: 020-81340482, E-mail: pxran@vip.163.com

AAGCTTGC GTTCCGGGTCAAAGTTGG-3' 下游引物: 5'-GGATCCGCGACCTCGCGGGTTC-3', 引物由博亚生物有限公司合成。将 PCR 扩增片段定向克隆于 T 载体, T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 小量裂解法提取质粒 DNA, 用 *Hind*III/*Bam*HI 双酶切对 T 载体进行鉴定; 再次切胶回收酶切产物定向连接于 pCDNA₃ 质粒, 重组质粒经 *Hind*III/*Bam*HI 双酶切鉴定, 并将这个重组质粒测序。构建的表达质粒命名为 pCDNA₃-E1A。

1.5 细胞转染

将培养的 CCL149 细胞按 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ 个接种于 24 孔板, 培养 24 h 至细胞汇合度 90%~95%, 然后按试剂说明书步骤分别混匀质粒与 Lipofectamine™ 2000 到 F12K, 逐滴加入已换无血清培养基的 CCL149 细胞中, 根据转染质粒的不同和实验分组需要分为 pCDNA₃-E1A、pCDNA₃ 组、空白对照组。转染 24 h 后以 1:10 的比例将转染细胞传代至 96 孔板中, 再培养 24 h 后换含终浓度为 700 μ g/ml G418 的完全培养基筛选 3 周, 筛选出的单克隆在含 G418 的培养基中进一步扩大培养。

1.6 E1A 阳性表达的 CCL149 细胞克隆的鉴定

E1A 转染组和对照质粒组分别转染 6 次, 先后得到 109 个抗性细胞克隆, 将抗 G418 的细胞克隆扩大培养后分别提取细胞 DNA、mRNA 和蛋白质分别进行 PCR、RT-PCR、Western 印迹、免疫组化检测。

1.6.1 抗性克隆细胞 PCR、RT-PCR 的鉴定 提取细胞基因组 DNA、总 RNA 分别进行 PCR、RT-PCR 检测^[9,10]。

1.6.2 抗性克隆细胞 E1A 蛋白表达的免疫组化鉴定

将 E1-E20 和 C1-C9 细胞克隆分别接种于 96 孔板, 经 4% 多聚甲醛固定后, 用小鼠抗大鼠的 E1A 单克隆抗体进行免疫组化检测(SABC 法^[11])。

1.6.3 抗性克隆细胞 E1A 蛋白表达的 Western 印迹鉴定 将 E1-E20 和 C1-C9 细胞克隆 CCL149 细胞和 293 细胞进行蛋白质抽提, 并进行蛋白质定量(BCA 法, Pierce 公司)。分别取 20 μ g 总蛋白进行 12%SDS-PAGE 不连续胶电泳, 并转移至 PVDF 膜上, 封闭液封闭后加入腺病毒 5 型单克隆抗体 M58(1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 温育过夜, 次日加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000), 室温温育 1 h 后进行化学发光。将条带经光密度扫描后进行统计分析。

1.7 克隆细胞生长曲线测定

取对数生长期的稳定转染 E1A、对照质粒转染

细胞及 CCL149 细胞分别接种于培养瓶中, 每瓶接种 1×10^5 个细胞。每组每天取 3 瓶细胞计数, 以平均数绘制细胞生长曲线并求倍增时间。

1.8 克隆细胞周期分析

稳定转染 E1A、对照质粒转染细胞及 CCL149 细胞培养至 80% 汇合状态, 用胰蛋白酶消化细胞后, 离心收集细胞, 磷酸盐缓冲液洗 2 次, 加入终浓度为 75% 乙醇固定, 加入碘化丙啶(PI)染色 15 min。取 1×10^5 个细胞在流式细胞仪(Coulter Elite, USA)上进行细胞周期分析。

1.9 膜联蛋白 V-FITC 标记法定量检测细胞凋亡

稳定转染 E1A、对照质粒转染细胞接种于 6 孔板, 每孔接种 5×10^5 个细胞, 接种第 2 天加入终浓度为 30 ng/ml TNF α , 作用 8 h, 用 0.25% 胰蛋白酶消化吹起后收集细胞, PBS 清洗 1 次, 于 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 10 min。离心后弃上清液, 加入结合缓冲液, 重悬细胞, 调整细胞数为 5×10^5 个/ml, 取 195 μ l 细胞重悬液, 加 5 μ l 膜联蛋白 V-FITC, 室温下混合, 温育 10 min。加入 200 μ l 结合缓冲液, 清洗细胞, 于 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 加入 190 μ l 结合缓冲液, 重悬细胞, 加入 10 μ l 20 mg/L PI, 每样本收集 20 000 个细胞荧光信号, 采用 Cellquest 软件分析结果。

膜联蛋白 V-FITC/PI 双标记流式细胞术可以将实验样本中正常、坏死、凋亡细胞区分开。以 FITC 和 PI 荧光作双参数点图, 细胞分为 4 个区, A: 膜联蛋白 V-FITC⁻、PI⁻ 代表活细胞。B: 膜联蛋白 V-FITC⁻、PI⁺ 代表机械损伤细胞。C: 膜联蛋白 V-FITC⁺、PI⁻ 为早期凋亡细胞。D: 膜联蛋白 V-FITC⁺、PI⁺ 为凋亡晚期或坏死细胞。分别计数四群细胞比例并在试验组和对照组间比较。

1.10 统计学方法

用 SPSS 10.0 进行统计学分析。实验数据以均数 \pm 标准差表示, 组两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 真核表达载体的构建

pneo-E1A 质粒经 PCR 扩增后在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示: 有大小 1 560 bp 的片段, 大小与预期相符。将 PCR 产物经切胶回收后经克隆、亚克隆于 pCDNA₃ 质粒, 重组质粒经酶切鉴定, 所得片断大小与预期相符。测序鉴定与 GenBank 中腺病毒 5 型 E1A 序列比对完全吻合, 所得重组质粒构建成功(图 1)。



图1 重组质粒的酶切鉴定电泳结果

1: λ -HindIII marker; 2: pCDNA₃-E1A 经 HindIII/BamHI 酶切后电泳; 3: pEGFP-C₂-E1A 经 HindIII/BamHI 酶切后电泳; 4: pCDNA₃ 质粒电泳; 5: DL2000 DNA marker。

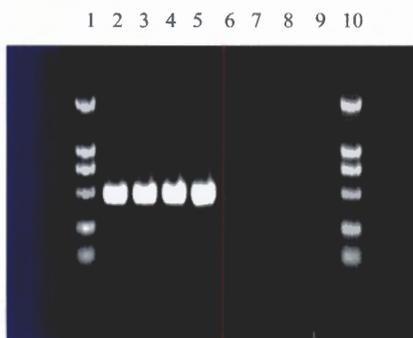


图2 稳定转染pCDNA₃-E1A及pCDNA₃的CCL149细胞RT-PCR鉴定结果

1、10: DL2000 marker; 2~5: 4个E1A阳性细胞克隆均扩增出486 bp的特异性片段。6~8: 对照质粒转染细胞RT-PCR鉴定结果; 9: 正常CCL149细胞RT-PCR鉴定结果。

2.2 稳定转染CCL149细胞系的鉴定

2.2.1 PCR、RT-PCR 鉴定稳定转染E1A的细胞系内E1A基因

E1A转染组和对照质粒组共得到109个抗性细胞克隆, 分别提取细胞克隆基因组DNA进行PCR检测, E1A转染组94个抗性细胞克隆中仅有9个克隆PCR扩增有相应1560 bp的片段; 对照质粒转染组所得细胞克隆均未见相应PCR扩增片段。将PCR阳性的细胞克隆进一步扩大培养, 进行RT-PCR鉴定: 9个PCR阳性的E1A转染组细胞仅有4个克隆可见有486 bp的特异性扩增片段, 命名为E1、E6、E8和E17; 对照质粒转染组和正常CCL149细胞均未见相应PCR扩增片段(图2)。

2.2.2 稳定转染E1A的细胞系的免疫组化鉴定

对E1~E20和C1~C9细胞克隆定期进行免疫组化鉴定。结果显示: E1、E6、E8和E17阳性细胞克隆持续稳定表达E1A蛋白, 阳性产物定位于细胞核, 呈棕黄色。对照质粒转染细胞和正常CCL149细胞均未见阳性表达。此外, 4个E1A阳性的细胞克隆表达E1A蛋白的强度有不同(图3)。

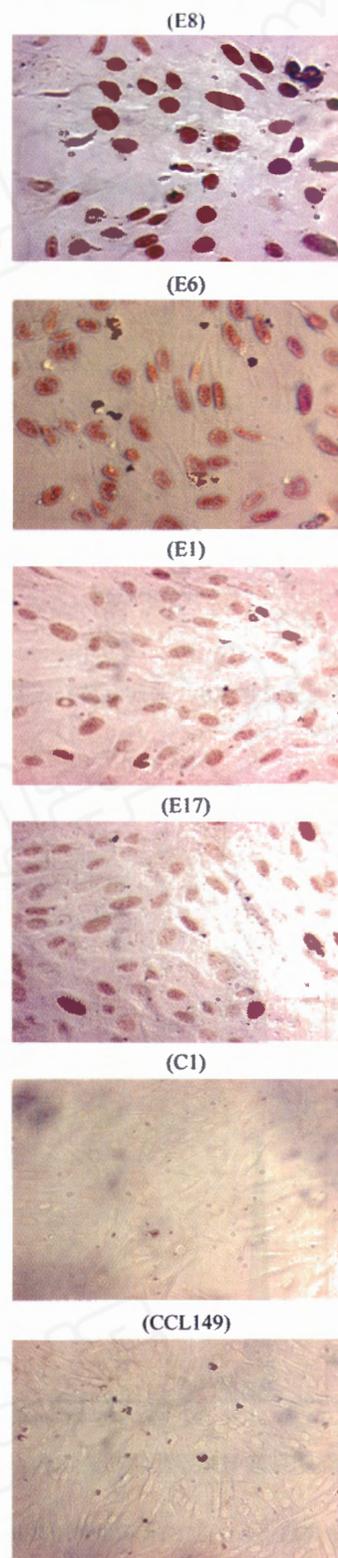


图3 稳定转染E1A的细胞克隆和对照细胞、正常CCL149细胞免疫组化鉴定结果(200×)

E8、E6、E1、E17: 4个E1A阳性细胞克隆在转染后5个月进行免疫组化鉴定, E1A蛋白位于细胞核内呈棕褐色; C1: 阴性对照(对照质粒转染细胞)免疫组化结果; CCL149: 为正常CCL149细胞免疫组化鉴定结果。

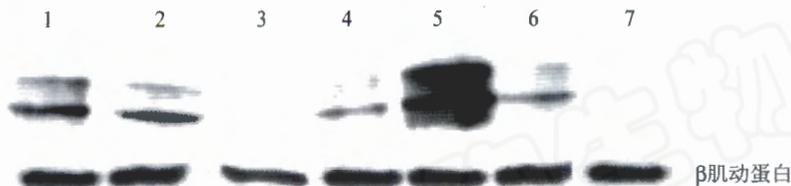


图4 不同细胞克隆 Western 印迹结果

1: E8 细胞克隆; 2: E6 细胞克隆; 3: 阴性对照(对照质粒转染细胞); 4: E1 细胞克隆; 5: 阳性对照 293 细胞; 6: E17 细胞克隆; 7: 正常 CCL149 细胞; 图中上两行蛋白质为 E1A 蛋白, 大小约为 45~48、50~52 kDa; β 肌动蛋白大小约为 40 kDa。

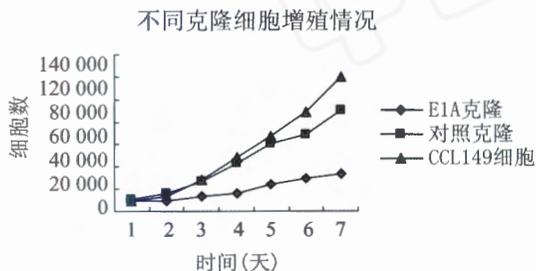


图5 E1A 阳性细胞克隆(E8)、对照细胞和正常 CCL149 细胞的生长曲线

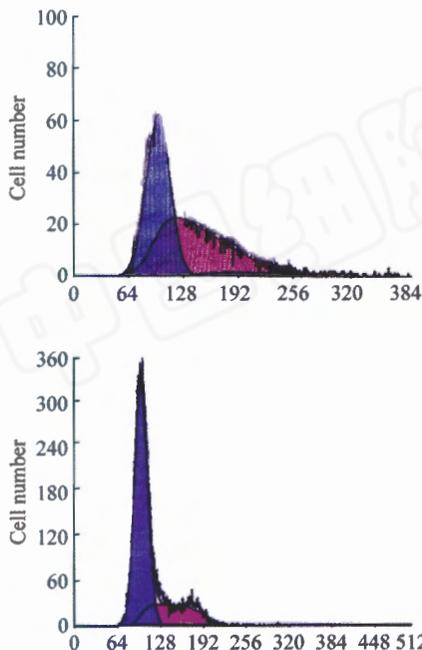


图6 E1A 阳性细胞克隆与对照质粒转染细胞克隆的细胞周期分析

上: 对照质粒细胞周期分析; 下: E1A 阳性细胞(E8)细胞周期分析。

表 1 E1A 阳性细胞和对照质粒转染细胞的细胞周期分析($\bar{x} \pm s$)

细胞(%)	E1A 克隆	对照克隆
G ₁ 期	71.77 \pm 3.04*	54.17 \pm 6.31
S 期	24.37 \pm 1.66*	41.33 \pm 6.4
G ₂ 期	3.87 \pm 1.53	4.50 \pm 0.97

与对照相比, * $P < 0.05$ 。

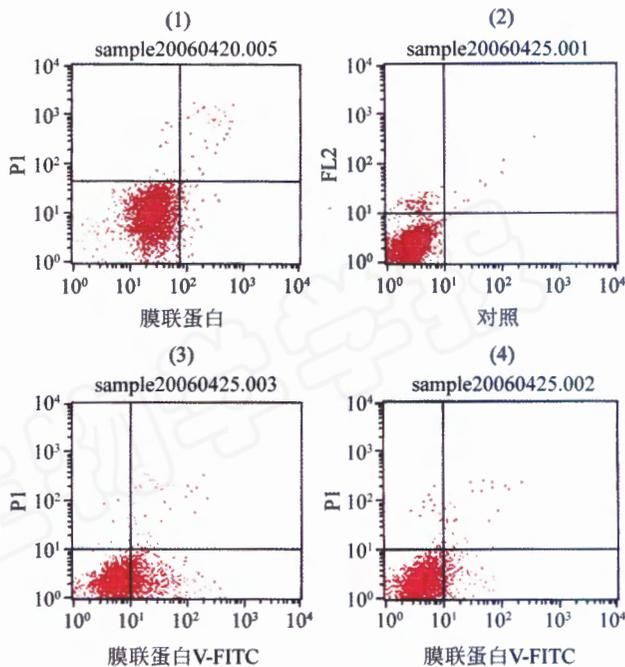


图7 E1A 阳性细胞和对照质粒转染细胞经膜联蛋白 V-FITC 和 PI 双染后流式凋亡分析图

1: E1A 阳性细胞(E8); 2: 对照细胞; 3: E1A 阳性细胞(E8)经 30 ng/ml TNF α 作用后 8 h; 4: 对照细胞经 30 ng/ml TNF α 作用后 8 h。

2.2.3 稳定转染 E1A 的细胞系的 Western 印迹鉴定

蛋白质印迹结果经光密度扫描分析定量表明, 4 个 E1A 阳性的单细胞克隆与阳性对照 293 细胞均表达 E1A 蛋白, 其中 E8 克隆表达最强, E1 和 E17 克隆表达最弱, E6 表达强度介于两者之间($P < 0.05$)而对照质粒转染细胞和正常 CCL149 细胞均无 E1A 蛋白的表达(图 4)。

2.3 稳定转染 E1A 的 CCL149 细胞系的动力学观察

结果显示 E8、E6 和 E17 细胞克隆的倍增时间分别为 98 h、68 h 和 68 h, 而对照质粒转染及正常 CCL149 细胞倍增时间为 48 h, 两组相比, E1A 阳性细胞克隆的倍增时间明显延长($P < 0.05$)(图 5)。

表2 TNF α 对E1A阳性细胞和对照质粒转染细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞比例(%)	空白		TNF α (10 ng/ml)	
	E1A组	对照组	E1A组	对照组
凋亡细胞	2.63 \pm 0.8*	0.62 \pm 0.3	25.38 \pm 0.9*	6.08 \pm 0.2
死细胞	1.92 \pm 0.7	0.56 \pm 0.2	5.62 \pm 0.3	1.28 \pm 0.3
活细胞	90.56 \pm 0.3	95.52 \pm 0.6	65.32 \pm 0.7	91.10 \pm 0.4

与对照相比, * $P < 0.05$ 。

2.4 稳定转染E1A的CCL149细胞系的细胞周期分析

与对照质粒转染细胞相比, E1A稳定转染细胞S期由(41.33 \pm 6.4)%降至(24.37 \pm 1.66)%, G₁期(54.17 \pm 6.31)%延长为(71.77 \pm 3.04)% ($P < 0.05$); G₂M期细胞无明显变化(图6,表1)。

2.5 TNF α 对不同克隆的细胞凋亡的影响

流式细胞仪结合膜联蛋白V-FITC标记法检测发现, E1A转染和对照质粒细胞在无刺激因素作用下, 细胞凋亡率分别为(2.63 \pm 0.8)%和(0.62 \pm 0.3)%, E1A组凋亡率高于对照组, 差别有统计学意义($P < 0.05$); 在30 ng/ml TNF α 作用8 h后, E1A组细胞凋亡率为(25.38 \pm 0.9)%明显高于对照组(6.08 \pm 0.2)%, 差别有显著性($P < 0.01$)(表2, 图7)。

3 讨论

儿童时期下呼吸道感染是导致成年后慢性阻塞性肺疾病(COPD)发病的独立危险因素^[12], 腺病毒是重要的病原体。腺病毒除了可以引起急性感染外, 还与宿主细胞基因组整合或独立于宿主细胞基因组之外的方式长期潜伏于宿主体内, 研究发现腺病毒潜伏感染的部位主要在淋巴组织、扁桃腺和肺组织^[13]。腺病毒潜伏感染后, 虽然病毒基因已停止了复制, 但能持续表达E1A蛋白。通过对COPD患者的研究发现, 与肺功能正常者相比较, COPD患者的气道上皮、肺泡和黏膜下腺体检出较多的E1A蛋白^[1,2]。此后, 体内、外研究发现潜在的腺病毒感染持续表达E1A蛋白时, 具有促进一些炎症介质的表达, 扩大肺部炎症的潜能^[6,9,10]。此外, 研究还发现腺病毒E1A蛋白能够上调连接组织生长因子(CTGF)、转化生长因子(TGF- β)和铁蛋白等气道重塑及氧化应激相关的基因表达^[14,15]。提示腺病毒E1A蛋白可能通过增强肺部炎症反应、影响肺内氧化/抗氧化失衡、促进气道重塑等多重机制参与COPD的发生和发展。

以往对腺病毒潜伏感染的研究多集中于病例调

查和动物试验, 不能直接反映腺病毒潜伏感染所引起的细胞生理变化过程及其机制; 加之有研究发现: E1A基因会引起肿瘤细胞生长抑制、诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[6], 大大增加了将E1A基因导入正常细胞并使其稳定表达的难度。所以相关报道的腺病毒潜伏感染的细胞模型也主要是建立在肿瘤细胞上^[11], 就E1A基因对正常细胞是否也有相似影响尚无明确结论。而肿瘤细胞模型很难全面、准确的反应疾病发生、发展的过程。本试验将E1A基因插入高效真核表达质粒多克隆酶切位点, 经酶切鉴定和测序证明基因克隆正确, 利用脂质体方法转染CCL149细胞, 经过长期的抗性筛选过程, 采用PCR、RT-PCR、免疫组化和Western印迹等多项指标检测表明, 所获稳定转染细胞系能够稳定表达E1A蛋白, 并且在获得的四个细胞克隆中, E1A蛋白的表达存在差异, 为进一步对E1A蛋白的功能研究建立了细胞模型。我们初步观察发现, E1A蛋白的表达对正常细胞形态、增殖周期有明显影响, 通过对细胞生长曲线和细胞周期分析发现, E1A转染的细胞出现明显的G₁期延长、S期比例下降, 细胞生长明显减慢; 我们进一步研究发现E1A能明显增强TNF α 诱导的细胞凋亡, 提示E1A蛋白可能通过某种机制广泛参与细胞生命活动包括周期调控及凋亡等方面, 需进一步研究。

总之, 我们通过对腺病毒潜伏感染的正常大鼠肺泡上皮细胞模型的建立, 为阐明腺病毒潜伏感染与氧化抗氧化失衡、炎症反应、细胞凋亡以及气道重构等重要的呼吸道疾病发病机制之间的关系, 提供了良好的平台。为评价腺病毒潜伏感染在呼吸道疾病发病中的作用建立了细胞模型。

参考文献(Reference)

- [1] Retamales I et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **164**: 469
- [2] Hayashi S. *Chest*, 2002, **121**: 183S
- [3] Burrows B et al. *Am Rev Respir Dis*, 1977, **115**: 751
- [4] Samet JM et al. *Am Rev Respir Dis*, 1983, **127**: 508
- [5] Gold DR et al. *Am Rev Respir Dis*, 1989, **140**: 877
- [6] Vitalis TZ et al. *Eur Respir J*, 1998, **11**: 664

- [7] Liu F *et al. Nature*, 1994, **368**: 520
[8] Yang Y *et al. J Virol*, 2002, **76**: 8910
[9] Higashimoto Y *et al. Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **166**: 200
[10] Fujii T *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **284**: L290
[11] Keicho N *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **16**: 23
[12] Hogg JC. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **160**: s26
[13] Vitalis TV *et al. Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, **14**: 225
[14] Orino K *et al. FEBS Lett*, 1999, **461**: 334
[15] Ogawa E *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286**: L189
[16] Shao R *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 21495

Establishment of Cell Model with Latent Adenovirus Infection

Juan Chen¹, Bing Li², Qi-Cai Liu², Li-Hong Xiong³, Pi-Xin Ran^{1*}

¹Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Frist Hospital Affiliated Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

²The Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

³Department of ICU Medicine, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518039, China)

Abstract The influences of latent adenovirus infection on the rat alveolar epithelial cells, and the relationship between latent adenovirus infection and airway disorder have been well documented. For illustrating the roles of adenovirus infection in the process of airway disorder, we constructed a eukaryotic expression vector for expressing adenovirus E1A protein and transfected into CCL149 cell. Cells stably expressing E1A protein were selected by G418 resistance. 109 G418-resistant clones were obtained, those clones were identified by PCR, RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry. Among them four E1A-positive clones and nine control clones were verified as stable transfected clones. Primary study showed that E1A gene could inhibit the proliferation of CCL149 and reduce the cell of S phase and prolong the cells in the G₁ phase at the same time E1A sensitizes cell to TNF α induced apoptosis of CCL149 cell.

Key words adenovirus; alveolar epithelial cells; E1A protein; chronic obstructive pulmonary disease

Received: July 25, 2006 Accepted: November 14, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-20-81340482, E-mail: pxran@vip.163.com