

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.05.006

pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在小鼠体内表达的实验性研究*

肖欢^{1,2},潘卫民^{1,2},王超群²,陈鸿颜²,徐军发³

(1.海南医学院附属医院核医学教研室,海南海口 570102;2.海南医学院附属医院核医学科,海南海口 570102;3.广东省医学分子诊断重点实验室,广东东莞 523808)

[摘要] 目的 获得重组 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在肝内的高效稳定表达。方法 采用流体动力学法将表达 mB7-H4-hIg 融合蛋白的真核表达载体输注小鼠体内,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)和实时定量 PCR(RT-PCR)的方法,定量检测 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在小鼠体内的表达。结果 经尾静脉注射的 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 能在肝组织中稳定表达,在 48 h 时间点分泌的量达到最高,最大量约 120 ng/mL。结论 成功将 pcDNA 3.1/mB7-H4-Fc 表达载体导入了小鼠肝脏,并获得了 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在肝内的高效稳定表达。

[关键词] B7-H4;pcDNA3.1/mB7-H4-Fc;流体动力学**[中图分类号]** R392.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)05-0595-03

Experimental study of pcDNA3.1/mB7-H4-Fc expression of mice in vivo*

Xiao Huan^{1,2}, Pan Weimin^{1,2}, Wang Chaoqun², Chen Hongyan², Xu Junfa³

(1. Teaching and Researching Section of Nuclear Medicine; 2. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnosis, Dongguan, Guangdong 523808)

[Abstract] **Objective** To obtain efficient and stable expression of recombination pcDNA3.1/mB7-H4-Fc in liver. **Methods** The eukaryotic expression vector for expressing mB7-H4 fusion protein was infused into the mouse body by adopting the hydrodynamic method. ELISA and real-time RT-PCR were used to quantitatively detect the pcDNA3.1/mB7-H4-Fc expression in mouse. **Results** The pcDNA3.1/mB7-H4-Fc by via tail vein injection could be stably expressed in liver tissue, which reached the highest at time point of 48 h, the maximal amount was about 120 ng/mL. **Conclusion** The pcDNA3.1/mB7-H4-Fc expression vector is successfully guided into the mouse liver and efficient and stable expression of pcDNA3.1/mB7-H4-Fc in liver is obtained.

[Key words] B7-H4; PcDNA3.1/mB7-H4-Fc; hydrodynamics-based procedure

B7-H4^[1]分子自发现以来一直被公认为是 T 细胞活化一个强有力的负性调控因子。在机体的免疫应答过程中, B7-H4 分子为免疫细胞的激活提供了刺激信号。活化的 T 细胞产生以白细胞介素(IL)-10^[2]、IL-2^[3]、IL-12^[4]、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)^[5]、γ-干扰素(IFN-γ)^[6]为主的细胞因子。而 IL-2、TNF-α、IFN-γ 等细胞因子介导的肝细胞免疫性损伤正是病毒性肝炎的重要致病机制。本研究通过流体动力学法将重组 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 表达载体导入小鼠体内,采用实时定量 PCR(RT-PCR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)法分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测 mB7-H4-hIg 在体内的表达水平和表达持续时间。为进一步研究可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白对 Con A 诱导肝损伤的保护作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1)主要实验材料:真核表达质粒(pcDNA3.1/mB7-H4-hIg)^[7]由广东医学院临床免疫学教研室赠送;DH5a 宿主菌为本室保存;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 二抗、羊抗人 IgG 多克隆抗体、HRP 标记抗人 IgG 单抗和羊抗人 IgG-HRP 购自北京中山生物技术有限公司;TRIzol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自美国 Gibco 公司;质粒小量提取试剂盒和无内毒素质粒大提试剂盒购自上海舜生生物工程有限公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司。(2)实验动物:KM 小鼠 54 只,8~10 周龄,体质量 18~22 g,雌雄各半,由海南医学院动物中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物分组 KM 小鼠由本院实验动物中心常规饲养,整个实验过程自由摄食及饮水。根据注射成分不同分成 3 组,即注射空载体 pcDNA3.1 组(A 组)、注射表达载体 pcDNA3.1/mB7-H4-hIg 组(B 组)、空白对照组(C 组)。将 B 组小鼠按照时间,共分成 6 个组,即 8 h 组(1 组),24 h 组(2 组),48 h 组(3 组),72 h 组(4 组),96 h 组(5 组)及 120 h 组(6 组)。

1.2.2 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在小鼠体内的表达 按去内毒素大提质粒试剂盒说明书提取质粒,将分别携带 pcDNA3.1/mB7-H4-hIg 重组质粒和 pcDNA3.1 空载体的 DH5a 宿主菌分别接种于 500 mL Amp+LB 培养基,增菌至饱和状态。收集菌体,并提取质粒,紫外吸光度法鉴定备用。参照 Liu 等^[8]的方法,质粒溶于生理盐水中,每只小鼠注入 100 μg 质粒,使终体积(mL)为小鼠体质量(g)的 1/10,使用一次性无菌注射器通过尾静脉注入小鼠体内。注射前 75%乙醇消毒,注射后用无菌棉球压迫止血。不同时间点即 8、24、48、72 h,每组取 3 只小鼠,从尾静脉取血,每次每只约 1 mL。不同时间点即 8、24、48、72 h,颈动脉处死小鼠(每个时间点取 3 只小鼠),取肝脏(从相同解剖部位取材)用于总 RNA 提取。其中 B 组喂养有 96、120 h 时间点上的小鼠,但由于肝组织提取污染,没有进行总 RNA 提取。

1.2.3 RT-PCR 检测 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在小鼠体内的表达 经过体内表达的 KM 小鼠,分别在相应的时间点,即 0、

* 基金项目:海南省卫生厅科研基金资助项目(琼卫 2010-3);海南省自然科学基金资助项目(309393)。 作者简介:肖欢(1976-),副主任医师,硕士研究生,主要从事分子探针及肿瘤免疫逃逸的研究。

8、24、48、72 h, 给予每只小鼠去眼球取血后(留血清备用), 脱臼处死。无菌条件下, 取肝组织, 行 RT-PCR 检测 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在小鼠体内的表达。取 5 μ L PCR 产物, 加 1 μ L 6 \times 上样缓冲液混匀, 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。电压梯度为 10 V/cm, 电泳 40 min。用 1% EB 染液染色 15 min, 置紫外线投射仪观察结果并拍照。采用 BandsScan5.0 软件进行图像分析, 并以 mB7-H4-hIg/ β -actin mRNA 比值结果表示 mB7-H4-hIg 表达的水平。

1.2.4 融合蛋白 mB7-H4-hIg 分泌表达水平的检测 mB7-H4-hIg 蛋白中含有人 IgG Fc 片段, 因而检测 Fc 即可间接反映 B7-H4-hIg 融合蛋白的量。本研究采用抗人 IgG 多克隆抗体作为捕获抗体包被酶标板, 以人 IgG 作为标准品, 并用 HRP 标记的抗人 IgG 单抗作为检测抗体, 建立 ELISA 法检测 mB7-H4-hIg 融合蛋白水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双抗体夹心 ELISA 法的建立及 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 在体内的即时表达 本研究成功建立了检测 mB7-H4-hIg 的 ELISA 检测方法, 最低检测浓度为 6.25 ng/mL; 线性范围为 6.25~400.00 ng/mL, 图 1 为不同浓度人 IgG 标准品检测绘制的标准曲线, $r^2 = 0.976 2$, 提示线性关系较好。采用建立好的 ELISA 检测技术, 测定小鼠可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白的表达, 结果表明, 经尾静脉注射的 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 能在体内表达, 并且在 48 h 时间点分泌的量达到最高, 最大量约 120 ng/mL, 见图 2。

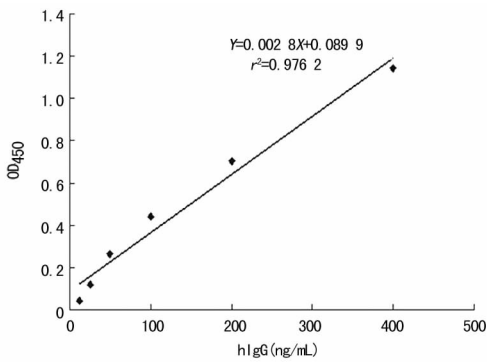


图 1 可溶性整合蛋白 mB7-H4-hIg 的 ELISA 的标准曲线

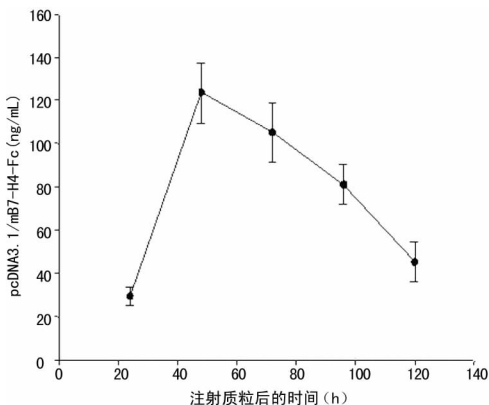


图 2 转染后小鼠血清 mB7-H4-hIg 浓度测定结果

2.2 B7-H4-Fc mRNA 在体内的即时表达 本研究采用 RT-PCR 技术, 取小鼠肝脏用于总 RNA 提取。结果表明, pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 经小鼠尾静脉注射, 能够在小鼠肝脏内表

达 mB7-H4-Fc 融合基因 mRNA, 并在 48 h 达到最高值, 见图 3、4。

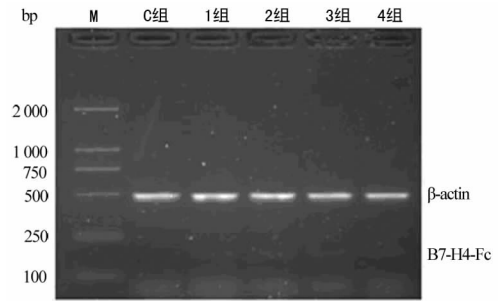


图 3 RT-PCR 检测小鼠肝脏 mB7-H4-Fc mRNA 表达

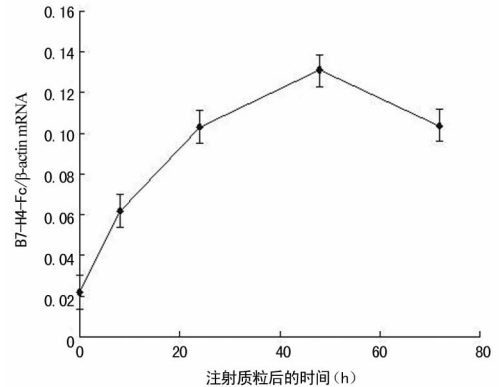


图 4 小鼠肝脏 mB7-H4-Fc mRNA 的表达水平

3 讨论

目前对 B7-H4 的研究主要集中在肿瘤方面, 如卵巢癌^[9]、胃癌^[10]等, B7-H4 在这些癌症中均高表达。B7-H4 在炎症方面的研究较少, 主要集中于类风湿关节炎^[11]、肾病^[12]等自身免疫性疾病。而关于 B7-H4 在自身免疫性肝炎中的表达情况尚少有相关研究。本研究思路为构建表达 mB7-H4-hIg 融合蛋白的真核表达载体, 并将该载体输入小鼠体内, 使其在肝脏内高表达可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白。

B7-H4^[13] 在单核/巨噬细胞、T 细胞、B 细胞和树突状细胞 (DC) 表面可诱导性表达, 但在其他组织中不表达或低表达, 说明 B7-H4 的表达可能存在某种调控机制。为了成功表达可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白, 本研究采用了高水平真核表达系统 pcDNA3.1(+)^[7], pcDNA3.1(+) 在多种哺乳类细胞中稳定转染或瞬时转染时可高表达目的蛋白。该表达系统 HAI 还具有 CMV 启动子和新霉素抗性基因供稳定表达筛选位点, 尤其在 COS-1 和 COS-7 细胞中高表达。本课题前期研究已经成功地将人 IgG1 α Fc 基因克隆到 pcDNA3.1(+) 多克隆位点, 构建 pcDNA3.1-hIg 载体^[7], 该载体无信号肽, 故不能单独表达人 IgG1 α Fc 蛋白, 但载体上游留取了多个酶切位点, 为本研究表达带人 IgG Fc 标签的 mB7-H4 融合蛋白奠定了基础。带 Fc 标签的融合蛋白具有如下优点^[7]: (1) Fc 可形成链间二硫键, 使目的蛋白形成二价, 有利于受体交联, 从而更有利于可溶性蛋白发挥生物学功能; (2) 因携带 Fc 标签, 可用蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析法进行纯化; (3) 使可溶性蛋白分子增大, 在体内难以降解; (4) 应用抗 Fc 抗体即可方便地检测。本研究在前期成功克隆 mB7-H4 基因的基础上, 构建了表达可溶性 mB7-H4-hIg 的真核表达载体 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc, 并转染 COS-7 细胞后成功表达了可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白。

流体动力学法 (hydrodynamics-based procedure) 是将裸露 DNA 转移到肝脏的较有效的办法, 目前已应用于 IL-10^[13]、

HDV^[14]、肝细胞生长因子^[15]等基因在肝脏的表达,结果表明流体力法能非常高效的将这些基因转移到肝脏,并且获得高水平表达。本研究通过流体力法将重组 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 表达载体导入小鼠体内,采用 RT-PCR 和 ELISA 检测法分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测 mB7-H4-hIg 在体内的表达水平和表达持续时间。采用建立好的 ELISA 检测技术,测定小鼠可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白的表达,结果表明,经尾静脉注射的 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 能在体内表达,并且在 48 h 时间点分泌的量达到最高,最大量约 120 ng/mL。采用 RT-PCR 技术,取小鼠肝脏用于总 RNA 提取。结果表明,pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 经小鼠尾静脉注射,能够在小鼠肝脏内表达 mB7-H4-Fc 融合基因 mRNA,也在 48 h 达到最高值。这为进一步研究可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白对 Con A 诱导肝损伤的保护作用奠定基础。

参考文献

- [1] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity[J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 849-861.
- [2] He C, Qiao H, Jiang H, et al. Inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 20(11): 695-704.
- [3] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity[J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 849-861.
- [4] Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. B7-H4 treatment of T cells inhibits ERK, JNK, p38, and AKT activation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): 28-32.
- [5] Zhu G, Augustine MM, Azuma T, et al. B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity[J]. *Blood*, 2009, 113(8): 1759-1767.
- [6] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in

the control of T cell immunity[J]. *Nature Rev Immunol*, 2004, 4(6): 336-347.

- [7] 徐军发,袁春雷,杨衡,等.小鼠 B7-H4 基因克隆及真核表达载体的构建[J]. *细胞与分子免疫学*, 2007, 23(7): 665-667.
- [8] Zhang G, Budkar V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 2011, 10(10): 1735-1737.
- [9] Zhang LL, Shao SL, Wu Y. Expression of osteopontin and B7-H4 in epithelial ovarian neoplasm and their significance[J]. *Clin J Cancer*, 2010, 29(1): 25-29.
- [10] Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis[J]. *Surg Oncol*, 2010, 102(7): 748-752.
- [11] 郭国宁,向强,文亮,等. B7-H4 在类风湿关节炎组织内的表达及分布研究[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(2): 130-134.
- [12] 俞大亮,厉小梅,王喜梅,等. 共刺激分子 B7-H4 在狼疮性肾炎肾组织及血清中的表达[J]. *安徽医学*, 2012, 33(7): 793-796.
- [13] Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(5): 1088-1092.
- [14] Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 289(5): 1088-1092.
- [15] Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro[J]. *Mol Ther*, 2013, 1(6): 522-532.

(收稿日期:2015-05-08 修回日期:2015-10-16)

(上接第 594 页)

- [1] [J]. *Lancet*, 2009, 373(9663): 582-592.
- [2] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nature Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [3] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. *Nature Immunol*, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [4] Lemmers A, Moreno C, Gustot T, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 646-657.
- [5] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4⁺ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.
- [6] Liang XS, Li CZ, Zhou Y, et al. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12(1): 43.
- [7] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Hepatology*, 2009, 50(5): 980-989.
- [8] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. *中国肝脏病杂志*,

2011, 3(1): 40-56.

- [9] Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond[J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 241-246.
- [10] Liu J, Fan D. Hepatitis B in China[J]. *Lancet*, 2007, 369(9573): 1582-1583.
- [11] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [12] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [13] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.
- [14] Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines[J]. *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 80-86.
- [15] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476.
- [16] Sarem M, Znaidak R, Macias M, et al. Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions[J]. *Gastroentero Hepatol*, 2006, 29(2): 93-101.

(收稿日期:2015-07-13 修回日期:2015-10-25)