

小鼠 BTLA 基因重组慢病毒载体的构建及鉴定

王子杰¹, 邓忠磊², 杨雪健³, 韩志坚¹, 陶俊¹, 鲁佩¹, 殷长军¹, 谭若芸^{1*}, 顾民^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ²江苏省中医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ³宿迁市第一人民医院泌尿外科, 江苏 宿迁 223800)

[摘要] 目的: 构建小鼠 B、T 淋巴细胞衰减子(BTLA) 基因重组慢病毒载体, 探讨 BTLA 基因过表达对小鼠脾 T 淋巴细胞增殖及活化的影响。方法: 以小鼠脾脏组织总 RNA 为模板, 逆转录为 cDNA, 通过 PCR 技术扩增 BTLA 基因, 构建 pWPTS-mBTLA 慢病毒载体, 磷酸钙法感染人胚肾上皮细胞株 293T 细胞。RT-PCR 及 Western blot 法检测 BTLA mRNA 和 BTLA 蛋白表达, 50% 组织培养感染剂量(TCID₅₀)法检测重组慢病毒滴度。通过感染 pWPTS-mBTLA 及 pWPTS-GFP 慢病毒载体的 293T 细胞与小鼠脾脏 T 淋巴细胞混合培养, 初步研究 BTLA 基因过表达对小鼠脾 T 淋巴细胞活化与增殖的影响。结果: 成功构建小鼠 pWPTS-mBTLA 慢病毒载体, 并制备高滴度病毒颗粒(1.3×10^8 pfu/ml)。通过对比实验组与对照组小鼠脾 T 淋巴细胞的增殖结果, 发现 4 d 及 8 d T 细胞的增殖效应均明显受抑制, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 且这种抑制作用在 0~8 d 内具有时间依赖性。结论: 过表达 BTLA 基因的 293T 细胞与小鼠脾 T 淋巴细胞混合培养后对其增殖及活化有抑制作用, 提示成功构建具有生物学效应的小鼠 BTLA 基因重组慢病毒载体。

[关键词] BTLA; 慢病毒载体; 基因重组; T 淋巴细胞增殖

[中图分类号] Q813.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-173-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150207

Construction and identification of lentiviral vector of mice recombinant BTLA gene

Wang Zijie¹, Deng Zhonglei², Yang Xuejian³, Han Zhijian¹, Tao Jun¹, Lu Pei¹, Yin Changjun¹, Tan Ruoyun^{1*}, Gu Min^{1*}

(¹Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Urology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029; ³Department of Urology, Suqian People's Hospital, Suqian 223800, China)

[Abstract] **Objective:** To construct lentiviral vector of recombinant BTLA gene and investigate the effects on proliferation of mice splenic T lymphocytes after overexpression of BTLA gene mediated by lentiviral vector. **Methods:** The BTLA gene was cloned into the lentiviral expression vector(pWPTS-GFR), which was verified by reverse transcription and PCR. The lentiviral vector of recombinant BTLA gene was co-transfected into 293T cells. The morphological changes of 293T cells infected by lentiviral granules were observed by fluorescence microscope and lentivirus titer was tested by the method of TCID₅₀. **Results:** pWPTS-mBTLA lentiviral vector at a titer of 1.3×10^8 pfu /mL was successfully constructed. Overexpression of BTLA gene in mice splenic T lymphocytes significantly suppressed the activation and proliferation of mice splenic T lymphocytes on day 4 and 8 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Outcomes of the inhibiting effect in activation and proliferation of mice splenic T lymphocytes induced by overexpression of BTLA gene indicated the successful construction of lentiviral vector of the recombinant BTLA gene.

[Key words] BTLA; lentiviral vector; gene recombination; T lymphocytes proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 173-177]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81100532); 江苏省“六大人才高峰”资助(2010WSN-56, 2011-WS-033); 江苏省“科教兴卫”工程医学重点人才培养资助(RC2011055); 江苏省卫生厅面上项目(H2009907); 江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(2011, 2013)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tanruoyun112@vip.sina.com; lancetgu@aliyun.com

B、T 淋巴细胞衰减子 (B and T lymphocyte attenuator, BTLA) 是 CD28 家族中新近发现的第 3 个抑制性受体, 与其特异性配体——疱疹病毒侵入介体 (herpesvirus entry mediator, HVEM) 共同组成的 HVEM/BTLA 信号通路可对平衡机体免疫应答发挥负性调节作用^[1-2]。因此, 研究 HVEM/BTLA 信号通路对于研究机体免疫应答过程, 进而调控炎症免疫、肿瘤免疫、器官移植的急慢性排斥反应及自身免疫性疾病等具有重要意义。

BTLA mRNA 广泛存在于脾脏及淋巴结组织中。在 T 淋巴细胞的增殖、活化及分化过程中, 通过调节 BTLA mRNA 的表达, 可使 BTLA 表达于 Th1 细胞, 而在高度极化的 Th2 细胞中呈现出不表达或低表达^[2-3]。与 CTLA-4、PD-1 类似, 目前认为 BTLA 在机体免疫调节中具有重要作用, 能抑制 T 淋巴细胞的活化, 但对其作用机制尚未明确^[4]。本实验拟通过基因重组构建小鼠 BTLA 基因慢病毒载体, 并通过体外混合淋巴细胞培养实验观察其对小鼠脾 T 淋巴细胞增殖及活性的影响, 鉴定该病毒载体是否具备生物学效应, 为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 DH5 α 和人胚肾细胞株 293T 均为本实验室保存。C57BL/6 小鼠(南京医科大学动物实验中心)。慢病毒载体由 pWPTS-GFP、pLR/VSV-G 和 pCMV-LVR-8.91 组成, 均由南京医科大学卫生部活体肝脏移植重点实验室戴云惠赠。

限制性内切酶(Fermentas 公司, 日本); T4 DNA 连接试剂盒(Promega 公司, 美国); PCR 扩增试剂盒、反转录试剂盒、TRIzol 试剂及 DNA Marker (TaKaRa 公司, 日本); LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司, 美国); 胰酶、DMEM/F12 培养基及胎牛血清(Gibco 公司, 美国); 高纯度质粒小提中量试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、细胞裂解液 RIPA 及淋巴细胞分离液(南京凯基生物公司); 兔抗小鼠 BTLA 单克隆和兔抗小鼠 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司, 美国)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(南京凯基生物科技发展有限公司); 磷酸盐缓冲液(PBS, 杭州碧云天生物公司); 其他实验所需试剂及耗材均购买于南京医科大学设备科。

1.2 方法

1.2.1 BTLA 基因片段的获取

从 C57BL/6 小鼠(雌性、6~8 周龄)脾脏组织

中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 用 PCR 扩增获得 BTLA 基因片段(约 918 bp), 上游引物为 F: 5'-ACGCGTATGAAGACAGTGCC-3'; 下游引物为 R: 5'-GTCGACTTAACTTCTCACACAAATG-3'。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 30 个循环。

1.2.2 慢病毒载体 pWPTS-mBTLA 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Sal* I 双酶切扩增出的 BTLA 基因片段以及 pWPTS-GFP, 将目的片段与线性载体用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 接种于含有氨苄青霉素 50 μ g/ml 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C、压力筛选 14~16 h。挑选阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 慢病毒载体包装浓缩及滴度测定

感染前 24 h 胰蛋白酶消化对数生长期的人胚肾 293T 细胞, 调整密度为 5×10^5 个/ml, 接种于 10 cm² 细胞培养皿, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞汇合度达 70%~80% 开始感染。将 2.5 ml DNA 溶液(含 pWPTS-mBTLA 转移载体 10 μ g, pLR/VSV-G 包装质粒 6.6 μ g, pCMV-LVR-8.91 包膜质粒 3.5 μ g) 与 100 μ l LipofectamineTM 2000 混合液, 无菌水定容至 500 μ l, 加入 CaCl₂ 溶液 50 μ l, 混匀, 加入 $2 \times$ HBS 缓冲盐溶液 500 μ l, 室温放置 20~30 min。将 DNA-磷酸钙混合液移至只含单层细胞的培养液中, 混匀, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 8 h。PBS 洗涤, 更换含有 100 ml/L 胎牛血清新鲜细胞培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内继续培养 8 h。同法构建以 pWPTS-GFP 为转移质粒的慢病毒载体感染 293T 细胞作为对照。荧光显微镜观察 293T 细胞 GFP 蛋白的表达以及细胞的病变情况。待细胞完全病变, 反复冻融感染细胞并收集上清, 取 1 μ l 病毒上清, 加入 5 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 55 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 煮沸 5 min; 3 000 r/min, 离心 1 min, 取 1 μ l 上清进行 PCR 验证。待感染 48 h 后观察 293T 细胞 GFP 蛋白表达及细胞病变情况, 待细胞完全发生病变, 反复冻融细胞, 4 $^{\circ}$ C, 4 000 r/min 离心 10 min 移除细胞碎片并收集上清。采用 50% 组织培养感染剂量法(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)测定病毒滴度。

1.2.4 RT-PCR 检测 BTLA mRNA 表达

用 TRIzol 试剂提取感染后 293T 细胞内总 RNA。mBTLA RT-PCR 上游引物为: 5'-ACGCGTATGAAGACAGTGCC-3'; 下游引物为: 5'-GTCGACTTAACTTCTCACACAAATG-3', 其扩增片段长度为 918 bp。 β -actin 上游引物为: 5'-TGCTAT-

GTTGCTCTAGACTTCG-3';下游引物为:5'-TAGAG-GTCTTTACGGATGTCAAC-3',其扩增片段长度为 233 bp。PCR 反应体系依据 TaKaRa 公司一步法 RT-PCR 说明书进行操作。反应条件:50°C 30 min,94°C 2 min,94°C 30 s,60°C 30 s,72°C 30 s,30 个循环。取 RT-PCR 产物 5 μ l 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察结果并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测 BTLA 蛋白表达

提取病毒感染后 293T 细胞总蛋白并进行蛋白定量。根据 BCA 蛋白浓度测定结果确定蛋白质上样量,加入等体积 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,置沸水浴中加热 5 min。样本在 100 g/L SDS-PAGE 凝胶中电泳,电压 100 V。待蛋白质分离后,将蛋白凝胶在 4°C 条件电转移,转膜 80 min;转膜结束后,将蛋白膜于 4°C 封闭过夜。加一抗(兔抗鼠 BTLA 单抗 1:500,兔抗小鼠 β -actin 单抗 1:1 000)于室温孵育 2 h 后用 TBST 洗涤 3 次,辣根过氧化物酶标的羊抗兔 IgG (1:2 000)孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次。用 ECL 发光试剂于暗室曝光显影。

1.2.6 重组慢病毒载体感染目的细胞

无菌条件下取 BALB/c 小鼠(雌性,6~8 周龄)脾脏组织,研磨,灭菌 PBS 液冲洗。Tris-NH₄Cl 低渗状态下溶解红细胞,用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞;尼龙毛柱法分离出 T 淋巴细胞,调整细胞浓度至 2 \times 10⁶ 个/ml 备用。向感染 pWPTS-BTLA 的 293T 细胞中加入终浓度为 25 μ g/ml 的丝裂霉素 C,37°C 水浴 30 min,用 RPMI-1640 完全培养基洗涤 3 次后,调整细胞浓度至 2 \times 10⁵ 个/ml 备用;同法处理未感染 BTLA 的 293T 细胞。将刺激细胞以 1 \times 10⁴ 个/孔、T 细胞以 1.5 \times 10⁵ 个/孔铺入 96 孔板。建立分组:①实验组:感染 pWPTS-BTLA 慢病毒载体的 293T 细胞与小鼠 T 淋巴细胞混合培养;②GFP 组:感染 pWPTS-GFP 慢病毒载体的 293T 细胞与小鼠 T 淋巴细胞混合培养;③T 细胞组:小鼠脾脏 T 淋巴细胞;④293T 组:感染 pWPTS-BTLA 慢病毒载体的 293T 细胞。将以上 4 组细胞分别培养 0、2、4 及 8 d,后收集细胞行进一步实验。

1.2.7 小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖检测

以上各组离心后移除上清。各组细胞加入 20 μ l MTT 溶液(5 mg/ml)于 37°C 5%CO₂ 环境下培养 4 h,离心后吸弃上清,每孔用 PBS 洗涤 2 次后,加入 100 μ l DMSO 彻底溶解结晶,用酶标仪 570 nm 波长比色。以上实验步骤均重复至少 3 次。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,采用方差分析比较实验组与对照组,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 BTLA 基因慢病毒载体的鉴定

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,显示扩增片段位于 750 ~1 000 bp,同预期目的片段 918 bp 基本一致,表明目的基因克隆成功(图 1)。用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Sal* I 双酶切扩增成功的 BTLA 基因片段和 pWPTS-GFP 质粒,连接回收目的 BTLA 基因片段和载体,所得片段约为 900 bp,与预期一致(图 2)。挑选阳性克隆的 PCR 产物进行测序,测序结果显示插入序列与 NCBI 数据库前体序列相一致,提示小鼠 BTLA 基因重组慢病毒载体构建成功。

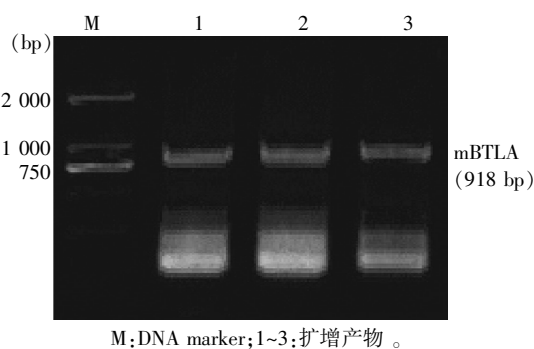


图 1 以 F、R 为引物 PCR 扩增结果
Figure 1 Amplification results of PCR based on F and R primers

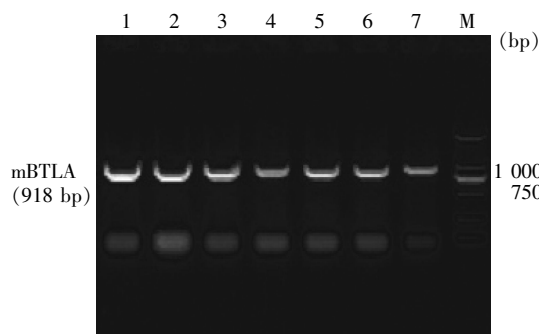


图 2 阳性克隆菌落 PCR 结果
Figure 2 PCR results of positive colony

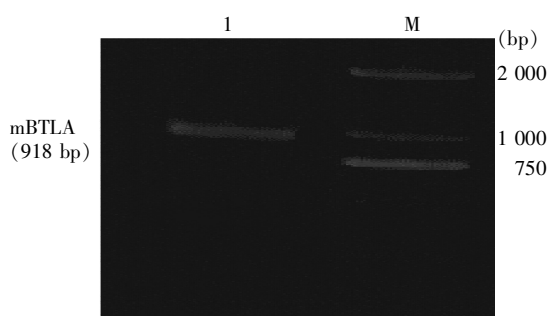
2.2 慢病毒载体的鉴定及滴度测定

RT-PCR 和 Western blot 法检测经慢病毒载体 pWPTS-mBTLA 感染 293T 细胞后 72 h,BTLA mRNA 和 BTLA 蛋白均得到有效表达(图 3、4)。

使用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度,重组慢病毒 pWPTS-mBTLA 及 pWPTS-GFP 的滴度分别为 1.3 \times 10⁸ pfu/ml 和 1.0 \times 10⁸ pfu/ml。

2.3 BTLA 基因重组慢病毒载体对小鼠脾 T 淋巴细胞增殖的影响

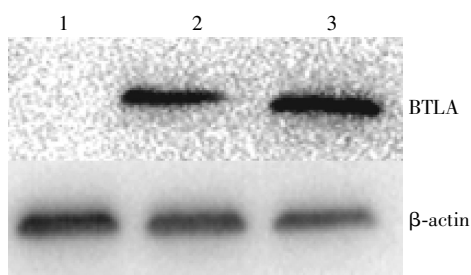
与感染 pWPTS-GFP 慢病毒载体的对照组相比,感染 BTLA 基因重组慢病毒载体的实验组(4、8 d)中 T 淋巴细胞 MTT 吸光值均降低,组内差异均有统计学意义($P < 0.05, n = 5$),证明 BTLA 基因重组慢病毒载体对小鼠脾 T 淋巴细胞具有抑制性作用,且具有时间依赖性(图 5)。



M: DNA marker; 1: pWPTS-mBTLA 慢病毒感染。

图 3 pWPTS-mBTLA 慢病毒 PCR 鉴定结果

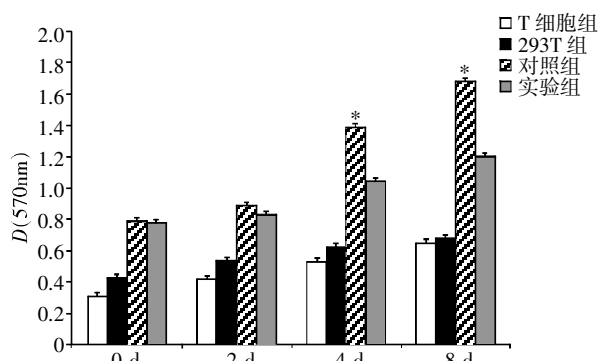
Figure 3 PCR identification results of pWPTS-mBTLA lentiviral vector



1: pWPTS-GFP; 2,3: pWPTS-mBTLA 慢病毒感染。

图 4 Western blot 法检测慢病毒感染后 BTLA 表达

Figure 4 Expression of BTLA infected with lentiviral vector by western blot assay



与感染 BTLA 慢病毒载体的实验组相比, $*P < 0.05$; 对照组在 4、8 d 的 T 淋巴细胞 MTT 吸光值均有显著升高。

图 5 不同培养时间下各组小鼠 T 淋巴细胞增殖反应

Figure 5 Proliferation of mice splenic T lymphocyte in each group

3 讨论

慢病毒载体是一类重组反转录病毒载体,可高效稳定地将外源基因整合到宿主染色体中而不影响靶细胞的功能,实现外源基因的持久性表达。慢病毒颗粒能有效感染神经元细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种细胞,很少引起机体免疫反应,可达到良好的基因治疗效果,目前已成为当前基因治疗载体研究的热点,具有广阔的应用前景^[5-7]。本实验以慢病毒作为携带目的基因的载体,在病毒包装质粒及细胞系的辅助下,成功构建有感染力的病毒颗粒,实现了小鼠 BTLA 基因在细胞中的表达^[8];并利用慢病毒载体感染能力强,介导基因持续、稳定表达等特点,实现了小鼠 BTLA 基因在小鼠脾 T 淋巴细胞中的高效、稳定表达,为进一步的体内实验奠定基础^[9-10]。

作为肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)中的一员,BTLA 与 LIGHT、CD160、HVEM 等一起组成的 HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 通路对 T 淋巴细胞起到“分子开关”的作用^[11]。在本试验中,与小鼠脾 T 淋巴细胞共培养 4 d 及 8 d 后,BTLA 基因重组慢病毒载体显著抑制了 T 淋巴细胞的增殖,证明 BTLA 基因参与体外增殖的负性调节,且这种调节作用在 0~8 d 内具有时间依赖性。机体的细胞免疫应答取决于 T 细胞接受的共刺激与共抑制信号,适当地抑制 T 细胞受体接受的共刺激信号将导致 T 淋巴细胞对活化信号不应答,进而导致细胞无能或凋亡^[12-13]。因此,适当提高共抑制信号强度可减弱 T 淋巴细胞的增殖与活化,降低机体细胞免疫应答,从而在自身免疫系统疾病、器官移植的急慢性排斥反应等疾病中都具有较高的应用价值。Tian 等^[14]报道,BTLA/HVEM 的表达水平可作为肾移植术后急性排斥反应的监测指标。在术后 14 d 急性排斥反应的受者体内,BTLA 基因于术后 7 d 表达程度显著降低,同时伴随体内 CD4/CD8、IL-2 及 IFN- γ 等指标的升高,说明 BTLA 基因的表达降低可提高 T 淋巴细胞的增殖与活化水平,增加患者术后急性排斥反应的发生率。此外,HVEM/BTLA 信号通路的负性调节机制也发现于细菌及病毒感染中,且 HVEM、BTLA 同样表达于多种类型的细胞,因此该信号通路所涉及的调节机制较为复杂,其在疾病发生与发展过程中的作用尚需更多的研究^[15-16]。

综上所述,本实验构建了小鼠 BTLA 基因重组慢病毒载体,并成功感染 293T 细胞。进一步体外混

合细胞培养实验证实 BTLA 慢病毒载体能显著抑制小鼠脾 T 淋巴细胞增殖,且这种作用呈现时间依赖性。这不仅为今后更好地研究 T 淋巴细胞的增殖与活化过程的调控机制提供了新的研究手段,而且为防治器官移植的急慢性排斥反应等免疫系统疾病奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Murphy TL, Murphy KM. Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28(1): 389-411
- [2] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1 [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(5): 670-679
- [3] Otsuki N, Kamimura Y, Hashiguchi M, et al. Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(7): 1121-1127
- [4] del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(3): 223-235
- [5] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(6): 401-406
- [6] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272: (1)263-267
- [7] Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(4): 871-875
- [8] Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(1): 1449-1470
- [9] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, 36(7): 184-204
- [10] Wang X, McManus M. Lentivirus production [J]. *J Vis Exp*, 2009, 17(2): 743-746
- [11] Shui JW, Steinberg MW, Kronenberg M. Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(3): 517-523
- [12] Miller JF, Morahan G. Peripheral T cell tolerance [J]. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10(1): 51-69
- [13] Schwartz RH. T cell anergy [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21(1): 305-334
- [14] Tian C, Liu YG, Yan JK, et al. B- and T-lymphocyte attenuator/herpes virus entry mediator as early indicators for acute rejection following kidney transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(1): 157-162
- [15] Sun Y, Brown NK, Ruddy MJ, et al. B and T lymphocyte attenuator tempers early infection immunity [J]. *J Immunol*, 2009, 183(4): 1946-1951
- [16] Serriari NE, Gondois-Rey F, Guillaume Y, et al. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on CMV-specific T cells during infection and regulates their function [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 3140-3148

[收稿日期] 2014-03-23

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。