文章编号:1000-5404(2006)03-0243-04

论著

人CTLA-4Ig融合基因减毒鼠伤寒沙门菌真核表达载体的构建及表达

周春丽[1],郝 进[1],唐书谦[1],钟白玉[1],吴 军[2],贺伟峰[2],郝 飞[1] (第三军医大学西南医院:[1]皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建能稳定表达人CTLA4Ig融合基因的减毒鼠伤寒沙门菌真核表达载体,探讨其在哺乳动物细胞中的表达并对表达产物进行鉴定。**方法** 用touchdown PCR法扩增CTLA-4Ig融合基因,将PCR产物连接真核表达载体pcDNA3.1(+),构建pcDNA3.1(+)-CTLA-4Ig,用电穿孔仪转入减毒鼠伤寒沙门菌SL7207。将表达质粒转染COS-7细胞,SDS-PAGE、Western blot检测转染细胞裂解上清中目的蛋白的表达。**结果** 酶切鉴定和基因序列测定显示重组质粒构建成功。在pcDNA3.1(+)-CTLA-4Ig质粒转染后48 h细胞裂解上清中,检测到CTLA-4Ig融合蛋白的表达,该蛋白能与抗人CTLA-4单抗特异结合。**结论** 成功构建了能稳定表达人CTLA4Ig融合基因的减毒鼠伤寒沙门菌真核表达载体,并在哺乳动物细胞中成功表达有生物学活性的重组人CTLA-4Ig蛋白。

关键词:CTLA-4Ig;减毒鼠伤寒沙门菌;真核表达载体;基因表达
中图法分类号:R378.23;R392-33;R392.13 **文献标识码**:A

Construction of eukaryotic expression vector of attenuated *Salmonella typhimurium* containing hCTLA4Ig gene and expression in COS-7 cells

ZHOU Chun-li[1], HAO Jin[1], TANG Shu-qian[1], ZHONG Bai-yu[1], WU Jun[2], HE Wei-feng[2], HAO Fei[1] ([1]Department of Dermatology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression vector of attenuated Salmonella typhimurium containing hCTLA-4Ig cDNA and identify its expression in COS-7 cells for the further study of function in SLE models. **Methods** Touchdown PCR was used to amplify hCTLA-4Ig cDNA. The PCR product was ligated into the multiple clone site of eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) by gene recombination technique. Then the recombinated plasmid pcDNA3.1(+)-CTLA-4Ig was transfected into COS-7 cells using DOTAP. The expression of interest protein in the supernatant of the cell disruption was detected with SDS-PAGE and Western blotting. **Results** Restriction analysis and DNA sequence analysis showed that the CTLA-4Ig cDNA had been successfully inserted into pcDNA3.1(+) eukaryotic expression vector. The interest protein could be detected in the supernatant of cell disruption 48h after the transfection of pcDNA3.1(+)-CTLA-4Ig. This protein specifically bound with human CTLA-4 monoclonal antibody. **Conclusion** The eukaryotic expression vector containing hCTLA-4Ig gene was successfully constructed and bioactive interest protein could be successfully expressed in mammalian cells.

Key words: CTLA-4Ig; attenuated *Salmonella typhimurium*; eukaryotic expression vector; gene expression

系统性红斑狼疮(systemic erythematosus lupus, SLE)是一种典型的自身免疫性疾病,发病机制复杂,治疗主要依赖糖皮质激素等非特异性免疫抑制剂,长期应用常导致严重的全身感染等多种不良反应。因此探索可控性的免疫治疗措施是SLE等自身免疫性疾病防治研究的方向[1]。细胞毒性T淋巴细胞抗原4-Ig(cytotoxic lymphocyte antigen 4-Ig, CTLA4-Ig)与B7的结合能阻断T淋巴细胞活化所必需的信号,导致T淋巴细胞失能,诱导特异性免疫耐受。减毒鼠伤寒沙门氏菌由于能靶向感染黏膜相关淋巴组织内的树突状细胞等专职APC,是目前极具潜力的口服疫苗载体。因此,我们设想将CTLA-4Ig融合基因转入减毒鼠伤寒沙门氏菌中,采用口服活菌苗的形式探讨其诱导免疫耐受的可能性。本研究拟构建能稳定表

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200258)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200258)
作者简介:周春丽(1971-),女,河南省郑州市人,博士研究生,主治医师,主要从事结缔组织病的相关方面研究。E-mail: zhouchunlicn@yahoo.com.cn
通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416,E-mail:haofei@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-08-24;**修回日期**:2006-01-04

达 CTLA-4Ig 融合基因的真核表达载体，并对其在哺乳动物细胞中的表达及表达产物进行鉴定，为后续免疫耐受实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 含致瘤素分泌信号肽和人 CTLA-4Ig cDNA 的质粒 pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所贺伟峰博士提供。真核表达质粒 pcDNA3.1(+)购自美国 Invitrogen 公司。*E. coli* DH5α 由第三军医大学临床微生物和免疫教研室保存。减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 由美国 Stanford 大学 Bruce Stocker 教授惠赠。非洲绿猴肾细胞株 COS-7 细胞购自中科院上海细胞所中国细胞库。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ、DNA Marker DL2000、DL15000、DGL4000、DNA 快速连接试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 PCR 试剂购自 Takara 公司。转染试剂盒 DOTAP 购自 Roche 生物公司。PCR 产物回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司。去除内毒素的质粒提取试剂盒(Promega 公司)。培养基 DMEM 购自美国 GIBCO 公司。鼠抗人 CTLA-4 单抗(Pharmingen)，羊抗鼠 IgG-HRP(北京三博公司)。引物合成(北京三博公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 hCTLA-4Ig 的基因序列，设计上游引物：5′-GCG AAGCTT ATG ggtgtactgctcacac，下游引物：5′-GCCGAATTC TCAAAGCATCCTCGTG 该引物分别在 CTLA-4Ig 基因片段的 5′和 3′端引入了酶切位点 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ。

1.2.2 Touchdown PCR 法扩增目的基因(CTLA-4Ig) 模板质粒(pCTLA4Ig-IRES2-EGFP)的制备参照质粒提取试剂盒说明。使用上述引物用 touchdown PCR 法从 pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 质粒中扩增出 CTLA-4Ig 融合基因。PCR 反应体积为 50 μl。

取 3μl PCR 扩增产物，1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察扩增产物。

1.2.3 pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig 的构建和筛选 制备 pcDNA3.1(+)载体质粒。将 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。将目的片段和载体质粒同时用 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切，分别胶回收 1 200 bp 目的片段和 5.4 kb pcDNA3.1(+)载体片段，以载体与插入片段 1∶3 的摩尔比，用 T4 DNA 连接酶连接后，$CaCl_2$ 法转化感受态 *E. coli* DH5α。挑单菌落振摇过夜，抽提质粒后用 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定，并将酶切鉴定正确的菌落送英骏生物技术有限公司测序。

1.2.4 重组质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 提取转入了 DH5α 中的质粒 pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig 和 pcDNA3.1(+)，制备电转感受态 SL7207，用 Gene Pulser (Bio Rad) 电穿孔仪将质粒转入 SL7207。电转化条件：2 500 V 电压，25 μF 电容，200 Ω 电阻，2 mm 电转杯。挑取转化平板单菌落振摇过夜，抽提质粒备转化细胞。

1.2.5 DOTAP 法转染 COS-7 细胞 复苏冻存的 COS-7 细胞，传 2 代后，取对数生长期的 COS-7 细胞，胰酶/EDTA 常规消化，接种 100 ml 培养瓶，37 ℃ 5% CO_2 培养 24 h 后(约 70% 融合)，取不同量的 DOTAP 和 pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig 质粒及空载体 DNA 加入 HBS 中，制备 DNA-DOTAP 混合液，室温放置 15 min，缓慢滴加至 COS-7 细胞中，培养 6 h 后更换为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。转染 48 h 后，收获转染细胞，加入蛋白样品缓冲液重悬细胞，沸水煮 10 min，用于融合蛋白的检测。

1.2.6 SDS-PAGE、Western blot 鉴定融合蛋白的表达 SDS-PAGE 采用垂直板不连续凝胶电泳法。常规配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶，取上述样品和蛋白分子量标准以每孔 20 μl 加样，100 V 恒压电泳 3～4 h，考马斯亮蓝染色。

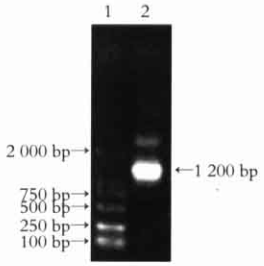
Western blot：SDS-PAGE 电泳结束后，将凝胶电转移至 PVDF 膜(40V，4 ℃，16 h)。鼠抗人 CTLA-4 单克隆抗体(1∶1 000稀释)，4 ℃过夜；再加入 HRP-羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(1∶500稀释)，37 ℃ 60 min，DAB 显色，待特异条带出现后，蒸馏水漂洗终止反应。

1.2.7 融合蛋白在 BALB/c 鼠体内的表达 将 pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig/SL7207 以 10^9 CFU/只喂饲 Balb/c 鼠，1 次/周，共两次，第 2 次喂饲后 3 d 取脾脏作冰冻切片，以鼠抗人 CTLA-4 单克隆抗体(1∶100 稀释)为一抗作免疫组织化学染色。

2 结果

2.1 Touchdown PCR 法扩增出目的基因 hCTLA-4Ig

用设计的引物成功地从 pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 中扩增出了 CTLA-4Ig 融合基因。1% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物条带与预期的目的基因大小吻合，约 1 200 bp(图 1)。

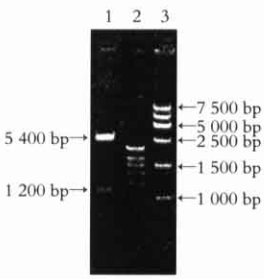


1：DNA 标准 DL2000；2：CTLA-4Ig 融合基因 PCR 扩增产物

图 1 CTLA-4Ig 融合基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳图

2.2 pcDNA3.1(+)-CTLA-4Ig 载体的鉴定

重组质粒经 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切后，1% 琼脂糖凝胶电泳得到 1 200 bp 和 5.4 kb 两条带，与预期相符(图 2)。测序结果与预期一致。

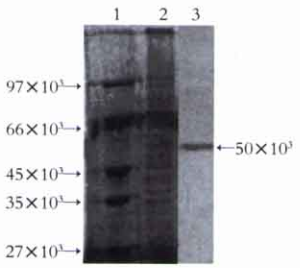


1：pCDNA3.1(+)-CTLA4Ig 双酶切后，示前方条带为目的片段；2：DNA 标准DGL4000；3：DNA 标准 DL15000

图 2 pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig 的酶切鉴定

2.3　Western blot 检测融合蛋白的表达

将转染 48 h 的细胞裂解上清进行 12% SDS-PAGE，显示有 1 条分子量约为 50×10^3 的蛋白条带，与预期分子量大小相符（图 3）。免疫印迹结果表明，pcDNA3.1(+)-CTLA4Ig 质粒转染细胞裂解上清中的 50×10^3 蛋白条带能与抗人 CTLA-4 单抗特异结合（图 3），说明该 50×10^3 蛋白条带正是我们构建并表达的 CTLA4Ig 融合蛋白。



1：中分子蛋白质标准；2：重组质粒转染细胞裂解上清的 SDS-PAGE；3：重组质粒转染细胞裂解上清的 Western blot

图 3　12%SDS-PAGE 显示重组质粒转染细胞裂解上清中目的蛋白的表达

2.4　融合蛋白在 BALB/c 鼠体内的表达

免疫组化显示在脾脏细胞中散在细胞质呈黄褐色的阳性细胞（图 4）。

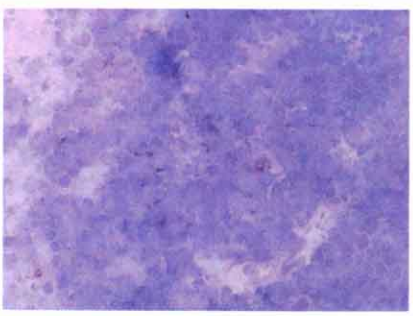


图 4　融合蛋白在 BALB/c 鼠体内的表达　免疫组化显示在脾脏细胞中散在细胞质呈黄褐色的阳性细胞　(S-P×200)

3　讨论

SLE 是一种以多脏器受累和存在多种自身抗体为特征的自身免疫病，治疗上十分棘手。其异常免疫应答以 T、B 细胞的异常活化最为突出，自身反应性 Th 细胞在 SLE 致病性自身抗体的产生中具有关键作用。Th-B 细胞共刺激信号理论的发展证实，同种反应性 T 细胞的完全活化除需 CD3-TCR/MHC-Ag 提供的抗原特异性信号激活外，还需协同刺激分子提供共刺激信号才能发挥免疫效应[2,3]，这使利用能选择性抑制活化淋巴细胞的生物制剂治疗 SLE 成为可能。

这类生物制剂主要包括抗 CD40 配体单克隆抗体、CTLA-4Ig、抗 B7-1 和 B7-2 单克隆抗体等。B7/CTLA-4 信号途径在 T 细胞活化和调节中发挥重要作用[4]，大量研究表明 CTLA-4Ig 是阻断此共刺激通路、诱导特异性免疫耐受的有效制剂[5]。CTLA-4 表达在活化 T 细胞表面，能竞争性抑制 APC 膜上的 B7 分子与 T 细胞膜上的 CD28 结合，从而阻断 T 细胞的完全活化，是机体维持淋巴细胞稳态的关键环节。CTLA-4Ig 是由 CTLA-4 胞外区与 IgG Fc 段通过基因重组形成的融合蛋白，具有与 CTLA-4 完全相同的生物学功能，能阻断协同刺激信号传递而使同种反应性 T 细胞凋亡或处于无反应状态，诱导特异性免疫耐受，因此被广泛用于器官移植和自身免疫性疾病的治疗。Flink 等[6-8]发现，CTLA-4Ig 能够阻断 SLE 样小鼠自身抗体的产生，并且延长小鼠寿命；能抑制（NZB x NZW）F（1）（BPW）狼疮鼠的 $CD4^+$ T 细胞增殖和分泌 IL-2、IL-4 和 IL-10，并抑制其增殖，阻止自身抗体的产生。Mihara[9]以腺病毒为载体向 SLE 小鼠体内转导 CTLA-4Ig 基因，发现高剂量的病毒可以导致 CTLA-4Ig 在血浆内长期表达而不引起机体对病毒反应。CTLA-4Ig 的表达显著抑制了自身反应性 B 细胞和活化的 $CD4^+$ T 细胞的增殖。

近几年，学者们利用基因重组和基因转移等技术，将 CTLA-4Ig 融合基因构建到逆转录病毒等载体转入目的细胞或动物体内使其表达 CTLA-4Ig，或直接使用 CTLA-4Ig 融合蛋白抗免疫排斥和治疗自身免疫性疾病，探讨更加安全有效、合理方便的应用途径[10-12]。减毒鼠伤寒沙门氏菌能靶向感染树突状细胞等专职 APC，是目前较常用的口服疫苗载体[13]，作为工程菌能直接在肠壁表达 CTLA4Ig，而且表达的蛋白可通过肠壁微褶细胞直接传递给 APC，从而阻断 B7-CD28 介导的共刺激信号，抑制 T 细胞活化，诱导免疫耐受。根据上述设想，本研究设计引物，通过 touchdown PCR 法成功构建具有分泌 CTLA4Ig 融合蛋白的重组真核表达载体。并通过重组质粒转染真核细胞、Western blot 检测出融合蛋白的表达，证实我们成功克隆并在 COS-7 细胞中表达了有生物学活性的 CTLA4Ig 融合蛋白，为进一步直接应用减毒鼠伤寒沙门氏菌活菌苗在肠道内表达 CTLA4Ig 诱导 SLE 免疫耐受奠定基础。

参考文献：

[1] ZIMMERMAN R, RADHAKRISHNAN J, VALERI A, *et al*. Advances in the treatment of lupus nephritis[J]. Annu Rev Med, 2001, 52(1): 63-78.

[2] KOBOTA T, AZUMA M, YAGITA H, *et al*. Role of costimulatory molecules in autoimmunity[J]. Rev Immunogenet, 2000, 2(1): 74-80.

[3] DAVIS S J, IKEMIZU S, EVANS E J, *et al*. The nature of molecular

recognition by T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(3): 217-224.
[4] DAIKH D, WOFSY D, IMBODEN J B. The CD28-B7 costimulatory pathway and its role in autoimmune disease[J]. J Leukoc Biol, 1997, 62(2): 156-162.
[5] DALL'ERA M, DAVIS J. CTLA4Ig: a novel inhibitor of costimulation [J]. Lupus, 2004, 13(5): 372-376.
[6] FINCK B K, LINSLEY P S, WOFSY D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig[J]. Science, 1994, 265(5176): 1225-1227.
[7] DAIKH D I, WOFSY D. Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide[J]. J Immunol, 2001, 166(5): 2913-2916.
[8] WANG X, HUANG W, MIHARA M, *et al*. Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2002, 168(4): 2046-2053.
[9] MIHARA M, TAN I, CHUZHIN Y, *et al*. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Invest, 2000, 106(1): 91-101.
[10] JIANG Z, SCHIEDNER G, GILCHRIST S C, *et al*. CTLA4Ig delivered by high-capacity adenoviral vector induces stable expression of dystrophin in mdx mouse muscle[J]. Gene Ther, 2004, 11(19): 1453-1461.
[11] PARK C G, THIEX N W, LEE K M, *et al*. Targeting and blocking B7 costimulatory molecules on antigen-presenting cells using CTLA4Ig-conjugated liposomes: *in vitro* characterization and *in vivo* factors affecting biodistribution[J]. Pharm Res, 2003, 20(8): 1239-1248.
[12] KREMER J M, WESTHOVENS R, LEON M, *et al*. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig[J]. N Engl J Med, 2003, 349(20): 1907-1915.
[13] SIRARD J C, NIEDERGANG F, KRAEHENBUHL J P. Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines[J]. Immunol Rev, 1999, 171(1): 5-26.

(编辑 王 红)

(上接242页)

2 讨论

大脑表面的引流静脉向中线汇集注入矢状窦，近矢状窦段形成短粗充盈的桥静脉，相对固定，弹性差，壁薄而易破裂出血。头部外伤后，尤其是枕部减速伤后，桥静脉破裂出血并向大脑纵裂缓慢延伸时就形成较少见的外伤性大脑间纵裂血肿，进一步还可以向小脑幕硬膜下腔发展[2]，或液化后流向皮层表面而表现为慢性硬膜下血肿。少数大脑间纵裂血肿是由于大脑前动脉动脉瘤破裂、凝血机制异常等引起。

外伤性纵裂血肿的临床特点是早期症状体征不重或者有中间清醒期。该类血肿的临床表现包括：①由于血肿累及大脑纵裂，直接受累的是中央静脉，旁中央小叶或中央前回副运动区，可以有下肢明显的偏瘫，典型表现为对侧下肢单瘫或偏瘫；下肢重于上肢，被称之为大脑镰综合征[1]，另外还可以有脑性截瘫和排尿困难，程度较重，与意识状况不相符。②颅内压增高、脑膜刺激征等脑外伤症状体征。③内脏活动异常如排尿困难等，是旁中央小叶受到损伤或血肿压迫的原因。④其他神经系统体征可出现如锥体束征，腱反射亢进等[1]。本组4例纵裂血肿主要表现为意识障碍，对侧下肢单瘫或脑性截瘫和小便失禁。其中3例伤后虽然有原发性昏迷，1例以中间清醒期意识障碍为特点。3例伤后当时无神经系统阳性体征，而在伤后7~12 d患者出现对侧下肢单瘫、脑性截瘫和小便失禁等临床表现，复查头颅CT提示大脑间纵裂内血肿。因此，我们认为大多数外伤性纵裂血肿的另一重要临床特点为迟发性颅内血肿。

CT检查对TISH诊断具有特殊价值，典型表现为中线血肿影像，贴附大脑镰并突向一侧。本组3例伤后立即行头颅CT检查均无阳性发现，以后病情改变，复查头颅CT提示纵裂内带状高密度影像，2例局限于大脑镰前部，另2例局限于大脑镰后部，轴位呈镰旁片状高密度影像与大脑镰紧密相连，CT值50~80 HU，密度均匀，边缘光滑，相应部位大脑纵裂池变窄或消失，同侧脑沟及对侧纵裂池、脑沟正常。

我们认为，根据枕部减速性受伤机制，伤后出现渐进性颅内高压和锥体束损害，且与意识状况不相符合的肢体瘫痪，特别是下肢单瘫、偏瘫、脑性截瘫以及排尿困难，应考虑本病，要进行CT扫描动态观察，争取及早发现迟发的血肿。

经典的治疗包括保守观察或开颅术。神经功能稳定的患者提倡用保守治疗，保守治疗是针对于没有意识障碍和临床病情稳定的患者，指征有：①CT示幕上脑沟和脑池存在；②症状自然好转的患者采取严密观察，非手术治疗可能更有利于恢复。如果在保守治疗的情况下伤情未见减轻反而加重，患者出现进行性意识障碍和局灶性功能障碍加重时需要外科治疗[1]。本组1例出现意识障碍而行开颅血肿清除术，术后恢复良好；另3例患者意识清醒，表现为对侧下肢单瘫或双下肢瘫痪(脑性截瘫)而采取保守治疗，但功能恢复不彻底。因此，我们认为手术指征应放宽，包括：①患者表现肢体运动功能障碍，需要早期手术清除血肿；②已经发现颅内高压或者有膀胱功能障碍的患者；③血肿量超过40 ml。

关键词：外伤性大脑间纵裂血肿；诊断；治疗
中图法分类号：R651.15 文献标识码：B

参考文献：

[1] SHANKAR A, JOSEPH M, CHANDY M J. Interhemispheric subdural hematoma: an uncommon sequel of trauma[J]. Neurol India, 2003, 51(1): 63-64.
[2] LLAMAS L, RAMOS ZUNIGA R, SANDOVAL L. Acute interhemispheric subdural hematoma: two case reports and analysis of the literature[J]. Minim Invasive Neurosurg, 2002, 45(1): 55-58.

(编辑 薛国文)