文章编号:1000-5404(2006)17-1749-03

论著

人 DcR3 cDNA 克隆及其在 COS-7 细胞中的表达

王槐志[1],黎万玲[2],董家鸿[1],倪 兵[2],姜 曼[2],吴玉章[2] (第三军医大学:[1]西南医院全军肝胆外科研究所,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人 DcR3 分子的 cDNA,将其重组入真核表达载体,并表达于 COS-7 细胞。**方法** 以 PCR 方法克隆编码人 DcR3 分子的 cDNA,对其序列进行测定。将测序正确的 DcR3 cDNA 克隆入真核表达载体 pAAV-IRES-hrGFP,构建重组表达载体。采用脂质体法转染 COS-7 细胞,用 Western blot 检测和激光共聚焦检测重组 DcR3 分子在 COS-7 细胞中的表达。**结果** PCR 方法扩增出一 1 000 bp 左右的基因片段,插入 pAAV-IRES-hrGFP 构建重组表达载体后,经序列测定证实扩增的片段为人 DcR3 分子 cDNA。将重组子转染 COS-7 细胞,Western blotting 和激光共聚焦检测到 DcR3 分子的表达。**结论** 成功地克隆并在 COS-7 细胞中表达了 DcR3 分子。

关键词:DcR3;COS-7 细胞;基因表达
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Cloning and expression of human DcR3 molecule in COS-7 cells

WANG Huai-zhi[1], LI Wan-ling[2], DONG Jia-hong[1], NI Bing[2], JIANG Man[2], WU Yu-zhang[2] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone ORF of DcR3 gene and insert it into eukaryotic expression vector and express it in COS-7 cells. **Methods** Encoding sequence of human DcR3 gene was cloned by PCR and sequenced. The sequenced ORF was cloned into eukaryotic expression vector pAAV-IRES-hrGFP to construct recombinant plasmid. COS-7 cells were transfected with recombinant plasmid by lipofectamine2000. Expression of recombinant DcR3 gene was verified by Western blotting and confocal microscopy. **Results** A 1 000-bp gene segment was obtained by PCR and inserted into pAAV-IRES-hrGFP to construct recombinant plasmid. The gene segment was proved to be encoding sequence of human DcR3 gene by sequencing. DcR3 expression in COS-7 cells was verified by Western blotting and confocal microscopy. **Conclusion** DcR3 gene was successfully cloned and expressed in COS-7 cells.

Key words: DcR3; COS-7 cells; gene expression

诱骗受体 3 (decoy receptor 3, DcR3)分子是一个新发现的具有免疫抑制作用的分子[1]。现有研究证明它具有强大的抗凋亡效应,在 T 细胞和 DC 细胞的功能调节、免疫黏附、肿瘤血管生成及转移等方面发挥重要的作用[2,3]。虽然对 TNFR 超家族的一些成员的结构和功能研究得较为清楚,但由于 DcR3 分子发现较晚,其结构和功能的关系部分是根据同源分子来预测,直接的实验资料尚不充分,因此有关 DcR3 在自身免疫性疾病发病机制中的意义以及可能在移植排斥反应的防治中发挥作用的研究备受关注。

本研究应用基因工程技术,克隆编码人 DcR3 分子基因的编码序列,构建在重组腺相关病毒表达载体中,通过基因转染,使其在 COS-7 细胞中获得顺利表达,为进一步制备重组腺相关病毒基因疫苗,研究其在抗移植排斥反应中的地位和作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒和抗体

DH-5α 菌株由本室保存,pAAV-IRES-hrGFP 质粒购自 Stratagene 公司,pRK. DcR3 质粒由 Pitti RM 惠赠,COS-7 细胞购自上海细胞研究所;Goat anti-human DcR3 购自 R&D systems, Inc,HRP 标记的 rabbit anti-goat IgG、Cy3 标记的 rabbit anti-goat IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 试剂和试剂盒

Pyrobest DNA polymerase、限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ及 DL2000 DNA markers、λ/*Hind* Ⅲ Markers 购自 TaKaRa 公司,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400418),重庆市自然科学基金资助重点项目(CSTC,2005BA5004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400418) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BA5004)
作者简介:王槐志(1969-),男,四川省犍为县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝脏移植的临床与实验方面的研究。电话:(023)68765310,E-mail: whuaizhi@yahoo.com.cn
通讯作者:董家鸿,电话:(023)68754168, E-mail: jhdong@hbsky.com.cn
收稿日期:2006-03-02;**修回日期**:2006-05-06

E. N. Z. A. Gel Extraction Kit、E. N. Z. A. Plasmid Miniprep Kitl 购自 Omega 公司，T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。引物由大连宝生物公司合成，脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。BM Chemiluminescence Western Blotting Kit(Mouse/Rabbit)、PVDF 膜购自 Roche 公司，Triton X-100 购自 Fluka 公司。

1.3 PCR 扩增人 DcR3cDNA

根据已知的 DcR3 cDNA 序列，利用引物设计软件 DNAstar 进行设计，覆盖全长 ORF 编码区(108～1 011bp)，产物全长 998 bp。上游引物 5′-CCGGAATTCTCGCGAGCGGCCGCACAACTTT-3′，下游引物 5′-ACG CGTCGACGTGCACAGGGAGGAAGCGCTCACG-3′，下划线碱基序列分别为 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ限制性酶切位点，此两位点与载体 pAAV-IRES-hrGFP 上的相应多克隆位点相吻合。PCR 循环以质粒 pRK. DcR3 为模板，循环条件为：94 ℃ 45 s，63 ℃ 90 s，72 ℃ 1 min，共进行 35 个循环，最后一个循环 72 ℃延伸 10 min。

1.4 DcR3 重组质粒的构建和鉴定

ENZA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。提取质粒载体 pAAV-IRES-hrGFP，然后用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ对质粒和纯化后的 PCR 产物分别进行双酶切。酶切产物用 ENZA 胶回收试剂盒回收，紫外分光光度计上定量载体和 PCR 两种双酶切产物量。然后按 3∶1 (DcR3∶pAAV-IRES-hrGFP) 的摩尔比混合，16 ℃连接反应过夜。将连接产物转化感受态 DH-5α，氨苄平板筛选。取阳性单克隆进行扩增，抽提重组 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 质粒进行 *Eco*RⅠ/*Sal*Ⅰ双酶切，然后在 1% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定目的片段是否插入。鉴定正确的克隆送大连宝生物公司测序。

1.5 脂质体法转染 COS-7 细胞

COS-7 细胞用完全 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清)培养，细胞长至 80% 密度时用 0.25% 胰酶消化传代。培养到24 h 后达 90% 密度，状态良好时开始转染。按 Lipofectamine 2000 使用说明书将 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 转染至 COS-7 细胞中，同时转染空载体 pAAV-IRES-hrGFP 作为对照。37 ℃ CO_2 孵箱培养 10 h 后更换为无血清培养基，继续培养 48 h 后收集培养上清作转染基因表达检测。

1.6 Western blot 鉴定重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

将培养上清离心去掉细胞后，加入 MW 8 000～10 000 的透析袋中，置于 PEG6000 上浓缩。待上清浓缩到 1/10 体积时，将透析袋放在大量的 0.01 mol/L PBS 中透析 6 h。透析后取出上清放于 1.5 ml Ep 管，加等体积 2×SDS 加样缓冲液 100 ℃煮沸 5 min。样品经 12% SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜，按化学发光试剂盒说明进行抗原抗体反应和发光实验，并将结果曝光于 X 线片上。

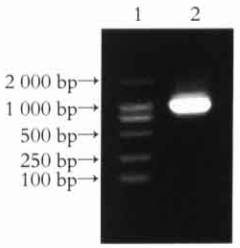
1.7 激光共聚焦检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

将对数生长期的 COS-7 细胞接种于 20 mm×20 mm 玻片上，至次日长到 90% 密度状态良好时开始转染。转染后 24 h 取出培养玻片，用 4% 多聚甲醛固定 30 min，0.1% Triton X-100(PBS/1% BSA 配)孵育 8 min 后，2% BSA 室温封闭 1 h。滴加一抗(Goat anti-human DcR3)、二抗(Cy3 标记的 rabbit anti-goat IgG)，反应结束后用 50% 甘油封片，激光共聚焦显微镜观察结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的片段

以质粒 pRK. DcR3 为模板进行 PCR 扩增，产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳，可见一约 998 bp 的特异扩增带，片段大小与理论预期一致(图 1)。

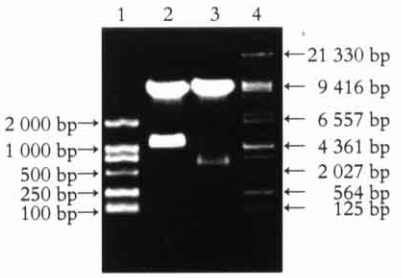


1：DL-2000 标准；2：PCR 扩增的 DcR3 cDNA

图 1 DcR3 cDNA 全长的 PCR 扩增产物电泳分析

2.2 表达载体的构建及目的片段的测序结果

用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ分别对 PCR 扩增片段及载体 pAAV-IRES-hrGFP 双酶切，酶切产物经 T4 连接酶连接，连接后转化 DH5α。在含氨苄青霉素的平板挑取阳性单克隆菌落，进行质粒酶切分析，筛选出含目的片段的阳性克隆菌株(图 2)。DNA 测序结果显示所克隆的 DNA 序列与已经报道的 DcR3 编码序列完全一致。

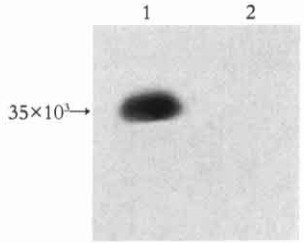


1：DL2000 标准；2：阳性重组子(*Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切)；3：阴性重组子(*Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切)；4：λ/*Hind* Ⅲ Markers

图 2 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 的酶切鉴定

2.3 Western blot 鉴定重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

DcR3 是可溶性的分泌性蛋白，转染 48 h 后细胞上清经 Western Blot 检测结果表明，转染后 COS-7 细胞表达了 DcR3 蛋白，从 X 线片上可以看到特异目的条带(图 3)。

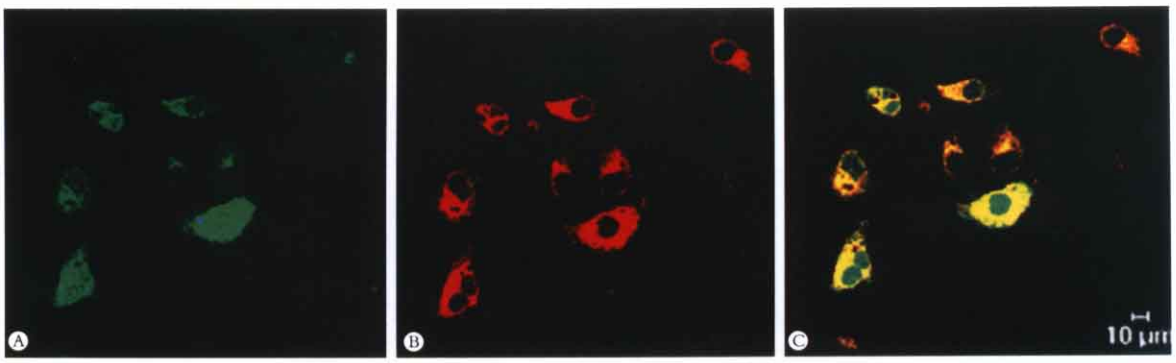


1：DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 重组质粒转染的 COS-7 细胞培养上清浓缩液；2：pAAV-IRES-hrGFP 空质粒转染的 COS-7 细胞培养上清浓缩液

图 3 Western blot 检测重组质粒转染的 COS-7 细胞培养上清中 DcR3 的表达

2.4　激光共聚焦检测 DcR3 在重组质粒转染的 COS-7 细胞中的表达

用重组质粒 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 转染 COS-7 细胞，24 h 后细胞涂片经间接免疫荧光染色，在激光共聚焦显微镜下观察，可见转染的 COS-7 细胞绿色荧光蛋白表达阳性并在细胞质和细胞膜中均质分布（图 4A），抗 DcR3 抗体免疫荧光染色显示 COS-7 细胞中有丰富的外源性 DcR3 表达（图 4B）。将两者叠加后显示 GFP 和 DcR3 的表达有良好的共聚性及一致性（图 4C），提示 DcR3 在细胞质中得到成功表达。



A：转染的 COS-7 细胞表达绿色荧光蛋白；B：转染的 COS-7 细胞表达外源性 DcR3；C：A、B 叠加后显示良好的共聚性及一致性

图 4　激光共聚焦检测 DcR3 在重组质粒转染的 COS-7 细胞中的表达　（免疫荧光 ×200）

3　讨论

DcR3 又称为肿瘤坏死因子受体 6（tumor necrosis factor receptor 6，TR6），属于肿瘤坏死因子受体（tumor necrosis factor receptor，TNFR）超家族的成员，其开放阅读框（open reading frame，ORF）编码 300 个氨基酸（包括 29 个氨基酸残基组成的信号肽），但没有跨膜区，是一个分泌性的蛋白。其基因定位于 20q13.3，含有 4 个半胱氨酸富集区[4]。主要由胃、脊髓、结肠、淋巴结、脾脏、内皮细胞系如 HUVEC 以及肺和结肠来源的肿瘤细胞如 SW480 表达，在 Jurkat 细胞系可诱导表达。DcR3 的配体均是 TNF 家族成员，包括 Fas 配体（Fas ligand，FasL）、LIGHT[（herpes virus entry mediator（HVEM）-L]和 TL1A[5]。它可干扰 FasL 或淋巴毒素 β 受体（lymphotoxin β receptor，LTβR）介导的凋亡，还可通过阻断肿瘤坏死因子受体 2（tumor necrosis factor receptor 2，TR2）和 LIGHT 之间的双向信号转导、TL1A 至死亡受体 3（death receptor 3，DR3）的单向信号转导抑制 T 细胞共刺激，因而在肿瘤逃逸及转移、自身免疫性疾病、移植排斥反应中扮演了重要的角色[2,3]。本研究利用基因工程的方法，将 DcR3 分子 cDNA 的完整阅读框克隆到真核表达载体 pAAV-IRES-hrGFP 构建成重组表达载体，用 COS-7 细胞表达出来，为进一步研究该分子机制及在肿瘤免疫、自身免疫性疾病中的地位和作用奠定了基础。

DcR3 是分泌型可溶性分子，半衰期仅有 20 min 左右，在组织中的累积浓度较低，因此用免疫组化等方法不易检测到转染至组织中 DcR3 蛋白的表达[6]。但是 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 质粒中 GFP 的观测较为容易，因此我们探讨用 GFP 的表达作为 DcR3 在真核细胞中表达标志的可能性。我们采用激光共聚焦显微技术成功检测到 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 质粒的 GFP 在 COS-7 细胞的细胞质及细胞膜上均有表达，细胞发出均质的绿色荧光。DcR3 主要在细胞质中表达，推测可能分布在内质网和高尔基氏体，与天然 DcR3 分子在细胞质中的分布一致。将 GFP 与 DcR3 叠加以后两者共聚良好，说明 GFP 与 DcR3 在真核细胞中的表达具有一致性，可以将 GFP 的表达作为 DcR3/pAAV-IRES-hrGFP 质粒转染的真核细胞中 DcR3 表达的标志，使我们在进一步的实验中更易观察到转染至组织中 DcR3 蛋白的表达。

参考文献：

[1] PITTI R M, MARSTERS S A, LAWRENCE D A, *et al*. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer [J]. Nature, 1998, 396(6712): 699 - 703.

[2] YANG C R, HSIEH S L, HO F M, *et al*. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells *via* NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression[J]. J Immunol, 2005, 174(3): 1647 - 1656.

[3] CHANG Y C, CHAN Y H, JACKSON D G, *et al*. The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion[J]. J Immunol, 2006, 176(1): 173 - 180.

[4] WROBLEWSKI V J, WITCHER D R, BECKER G W, *et al*. Decoy receptor 3 (DcR3) is proteolytically processed to a metabolic fragment having differential activities against Fas ligand and LIGHT[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(4): 657 - 667.

[5] WAN X, ZHANG J, LUO H, *et al*. A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells[J]. J Immunol, 2002, 169(12): 6813 - 6821.

[6] WU Y, HAN B, LUO H, *et al*. DcR3/TR6 effectively prevents islet primary nonfunction after transplantation[J]. Diabetes, 2003, 52(9): 2279 - 2286.

（编辑　陈聪连）