论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0024-04

B7-H1 慢病毒的制备及其在 B16F10 细胞中的表达鉴定

张立群,段文元,许雪青,黄 钢,陈雪丹,白 云 (第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建小鼠 B7-H1 分子慢病毒表达载体并包装成感染性病毒颗粒,获得稳定表达 B7-H1 的 B16F10 细胞。**方法** 以小鼠 B7-H1 的测序质粒为模板,PCR 扩增 B7-H1 全长,装入 pLenti6/V5-D-TOPO 慢病毒表达载体,经过测序证实其序列与标准序列完全一致。将 B7-H1 表达载体用 Lipofectamine™ 2000 转染 293FT 细胞,包装成感染性病毒颗粒,感染 B16F10 细胞后,加入含 Blasticidin(终浓度为 4.0 μg/ml)的 RPMI1640 培养基,筛选出稳定表达 B7-H1 蛋白的 B16F10 细胞株。**结果** PCR 扩增得到编码小鼠 B7-H1 的 877 bp 基因片段,与预期大小一致。B7-H1 重组慢病毒感染 B16F10 细胞后,用 B7-H1 单抗进行免疫组化检测,荧光显微镜观察显示 B7-H1 分子表达于 B16F10 细胞。FACS 测定 B16F10 细胞荧光阳性率为 36%。**结论** 成功构建了 B7-H1 慢病毒表达载体,包装出感染性病毒颗粒,重组慢病毒感染 B16F10 细胞后表达出有活性的 B7-H1 膜表面蛋白,为进一步研究 B7-H1 分子在器官移植、自身免疫性疾病以及肿瘤免疫逃逸机制中的作用奠定了基础。

关键词: B7-H1;慢病毒;基因治疗

中图法分类号: R373; R392-33; R392.2 **文献标识码**: A

Construction of recombinant lentivirol expression vector carrying mouse B7-H1 gene and its expression and identification in B16F10 cells

ZHANG Li-qun, DUAN Wen-yuan, XU Xue-qing, HUANG Gang, CHEN Xue-dan, BAI Yun (Department of Medical Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct lentivirol expression vector of mouse B7-H1, and identify its expression in B16F10 cells. **Methods** Mouse B7-H1 encoding sequence was amplified, purified, ligated with pLenti6/V5 lentivirol vector and verified by sequencing. The verified recombinant was transfected into 293FT cells by Lipofectamine™ 2000 reagent. The supernatant of the cultured 293FT cells was collected and used to infect B16F10 cells. B16F10 cell line stably expressing B7-H1 protein was selected in the presence of Blasticidin (4.0 μg/ml). **Results** The mouse B7-H1 gene was successfully amplified by PCR. The recombinant lentivirol vector carrying B7-H1 gene for expression was constructed and its length was about 877 bp, very close to the expected value. By transfecting package cell line 293FT, the recombinant of pLenti6/V5-D-TOPO lentivirol vector carrying B7-H1 infected B16F10 cells in selective medium. B16F10 transgenic cells could stably express mouse B7-H1 protein on cell membrane. **Conclusion** Successful construction of mouse B7-H1 lentivirol expression vector and expression of its functional fusion protein based further investigation of the role of B7-H1 in immune tolerance, autoimmune disease and tumor immune escape.

Key words: B7-H1; lentivirol; gene therapy

T 淋巴细胞活化及特异性细胞免疫应答的产生及维持不仅需要 MHC-肽复合物提供的特异性信号,还必须有抗原递呈细胞(antigen presenting cell,APC)表面分子提供的共刺激信号。在众多共刺激分子中 B7 家族较为重要,而 B7-H1 是 B7 家族的成员之一[1,2]。B7-H1 与相应受体结合后,能抑制 T 细胞、B 细胞的功能。目前的研究已经证实 B7-H1 对 T 细胞的活化起负性调节作用[3,4],在肿瘤免疫逃逸和外周免疫耐受中可能具有非常重要的作用[5,6]。

为深入探讨 B7-H1 在调节外周耐受中的机制及其他生物学功能,本研究通过构建 B7-H1 慢病毒表达载体,经 293FT 细胞包装成感染性病毒颗粒,感染体外培养的 B16F10(小鼠黑色素瘤肺转移株),筛选出稳定表达 B7-H1 蛋白的 B16F10 细胞株。由于 pLenti6/V5-D-TOPO 慢病毒载体具有广泛的感染性、良好的感染效率,该病毒表达载体不仅可作为研究 B7-H1

基金项目:国家自然科学基金(30271246)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271246)

作者简介:张立群(1976-),男,甘肃省会宁县人,硕士研究生,检验技师,主要从事感染免疫以及免疫耐受方面的研究。电话:(023)68753670

通讯作者:白 云,电话:(023)68752258,E-mail: baiy37@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-07-11;**修回日期**:2006-09-29

共刺激信号通路在调节记忆性和效应性 T 细胞功能、维持外周耐受机制方面的有效工具，而且在自身免疫性疾病和器官移植排斥反应的治疗中也具有广阔的应用前景。

1　材料与方法

1.1　细胞株、质粒

pLenti6/V5-D-TOPO 慢病毒载体试剂盒，293FT 细胞株，感受态菌 stbl3™，Opti-MEM 无血清培养基，Lipofectamine™2000 均购自 Invitrogen 公司，大鼠抗小鼠 B7-H1 单克隆抗体购自 eBioscience 公司，FITC 标记的羊抗大鼠 IgG 二抗购自北京中杉公司，PCR 扩增试剂为 Toyobo 公司产品，胶纯化回收试剂盒为北京天为时代公司产品，DMEM 培养基 Gibco 公司产品，Tripure 试剂购自 Roche 公司。PCR 试剂盒为 Promega 公司产品。B16F10 细胞本室保存。

1.2　引物设计、合成

引物设计利用软件 Primer Premier 5.0 进行设计，上游引物加入 TOPO 酶连接位点 CACC，为便于与 V5 表位融合表达，设计下游引物时去除终止密码子，由北京赛百盛公司合成。

B7-H1 引物序列如下：

上游引物：5′-CACCATGGGGATATTTGCT-3′

下游引物：5′-TTACGTCTCCTCGAATTGTG-3′

1.3　PCR 扩增小鼠 B7-H1

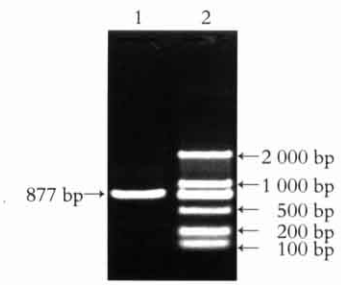
小鼠 B7-H1 全长 cDNA 由张利永博士提供，经过测序证实序列与标准序列完全一致。以其为模板扩增小鼠 B7-H1，PCR 循环条件：94 ℃ 2 min，暂停，加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 μl(5 U)，94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min；35 个循环，72 ℃ 10 min 取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4　B7-H1 重组慢病毒质粒的构建

胶纯化回收试剂盒纯化 PCR 产物，紫外分光光度计测定浓度。然后将纯化回收的 B7-H1、病毒载体按 1∶1 的体积分数混合，加入 6 × Buffer(Invitrogen) 1 μl，灭菌蒸馏水补至终体积 6 μl，22 ℃，5 min。将连接产物转化入感受态菌 stbl3™，用含氨苄的平板进行筛选。挑取阳性单克隆进行摇菌扩增，抽提重组子。

1.5　重组质粒的鉴定和测序

采用 *Spe* Ⅰ + *Xho* Ⅰ 双酶切鉴定阳性重组子，见图 1。将阳性克隆送上海生工测序。



1：PCR 产物；2：DL2000 标准

图 1　小鼠 B7-H1 cDNA 全长 PCR 扩增产物电泳图

1.6　病毒包装及效价测定

取 3 μg 重组质粒与 9 μg 包装混合物，混匀于 1.5 ml Opti-MEM 无血清培养基，用 Lipofectamine™2000 转染 6×10^6 293FT 细胞，37 ℃，5% CO_2 培养，72 h 后收集病毒，0.45 μm 滤膜过滤，−80 ℃冻存。6 孔培养板将 B16F10 细胞培养达 30% ~50% 融合度时，分别加入 10^{-7} ~ 10^{-2} 不同稀释度的病毒溶液，同时加入终浓度为 6 μg/ml 的 polybrene 和终浓度为 4.0 μg/ml 的 Blasticidin 筛选感染细胞至阴性对照孔看不到生长细胞，PBS 漂洗 2 遍，加入 1 ml 1% 的结晶紫(10% 乙醇)染液，室温 10 min，PBS 漂洗 2 遍后计数病毒效价。详细操作参照 pLenti6/V5 Directional TOPO Cloning Kit 操作手册。

1.7　B7-H1 融合蛋白的表达、鉴定

10 cm 培养瓶接种 2×10^5 个 B16F10 细胞于 RPMI1640 培养基，1 d 后加入 500 μl 的病毒原液，终浓度 polybrene 6 μg/ml，混匀，37 ℃，5% CO_2 孵箱培养 2 d 后，将含有病毒的培养基更换为新 RPMI1640 培养基，3 d 后 PBS 洗涤、0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化、收集细胞，调整细胞浓度为 2×10^6/ml，每个样品取 10^6 个细胞。加入 50 μl B7-H1 单抗(1∶400 稀释)，小心混匀，室温暗盒放置 25 min。离心，弃上清，加入 50 μl FITC 标记的 IgG 二抗(1∶400 稀释)，室温暗盒放置 25 min，离心，弃上清。加入流式样品稀释液 500 μl，混匀后流式细胞仪检测。阴性对照为空病毒载体替代重组慢病毒载体，操作相同。

1.8　免疫荧光组织化学检测 B7-H1、V5 的表达

B7-H1 重组慢病毒感染 B16F10 细胞后，经 Blasticidin(终浓度为 4.0 μg/ml)筛选 2 周，使 B16F10 细胞稳定表达 B7-H1，命名为 B16F10- B7-H1-LV 细胞。细胞生长至 80% 融合后 PBS 漂洗，0.25% 的胰酶 0.02% EDTA 消化、收集细胞，调整细胞浓度为 2×10^5/ml，接种至六孔板做细胞爬片，贴壁后用大鼠抗小鼠 B7-H1 单抗、羊抗大鼠 FITC 标记的 IgG 二抗进行免疫组化检测。并用 FITC 标记的 V5 单抗检测慢病毒载体标签 V5 的表达。同时以 B16F10 和转慢病毒空载体的 B16F10(命名为 B16F10- LV 细胞)为空白对照和空病毒载体对照。

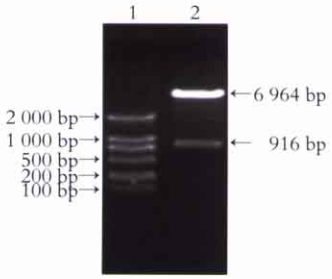
2　结果

2.1　PCR 扩增小鼠 B7-H1 cDNA 及阳性重组子的酶切鉴定

1% 琼脂糖凝胶电泳显示，PCR 扩增产物条带单一，大小约 877 bp，与预期大小吻合，见图 1。构建 B7-H1 重组慢病毒载体后，转化感受态菌，用氨苄抗性平板进行筛选。挑取阳性单克隆进行扩增，抽提重组质粒。用 *Spe* Ⅰ 和 *Xhol* Ⅰ 双酶切鉴定，酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见两条明显条带，其中一条大约 6 964 bp 的条带为慢病毒载体，另一条带大约 916 bp，为小鼠 B7-H1 的重组片段，与电子酶切结果完全吻合，表明重组慢病毒载体构建成功，见图 2。重组子经上海生工测序证实序列完全正确。

2.2　流式细胞术检测 B7-H1 表达

流式细胞术(FACS)检测结果见图 3。与 B16F10 -LV 细胞相比，B16F10- B7-H1-LV 细胞 B7-H1 阳性率为 36%。



1：DL2000 标准；2：重组慢病毒载体 *Spe* Ⅰ 和 *Xho*Ⅰ 双酶切

图2 小鼠 B7-H1- pLenti6/V5 的酶切鉴定电泳图

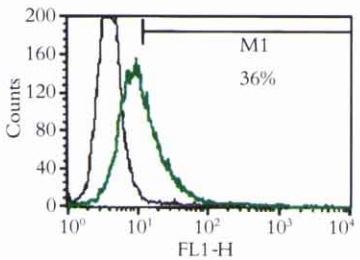
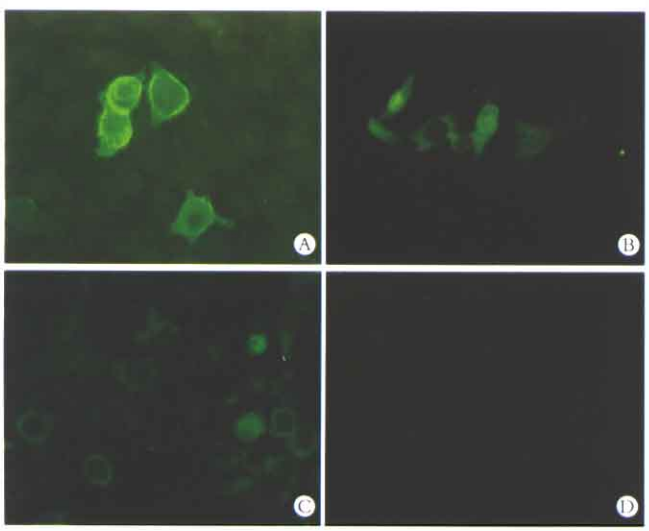


图3 流式细胞术检测 B7-H1 的表达情况

2.3 荧光显微镜检测 B7-H1、V5 的表达

荧光显微镜观察显示 B7-H1 分子表达于 B16F10- B7-H1-LV 细胞膜表面，而 B16F10 无 B7-H1 的表达，V5 抗原表位在 B16F10-B7-H1-LV 和 B16F10- LV 细胞上均有表达，见图4，并且在长达4个月的传代培养中均能稳定表达，表明 B7-H1 分子成功转入 B16F10 细胞。



A：B16F10- B7-H1-LV 细胞检测 B7-H1；B：B16F10- B7-H1-LV 细胞检测 V5；C：B16F10- LV 细胞检测 V5；D：B16F10 空白比照

图4 免疫荧光检测 B16F10 细胞慢病毒转染后 B7-H1、V5 的表达（FITC×200）

3 讨论

近年来，有关 T 细胞活化共刺激信号的研究取得了许多新进展。明确了 B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 和 CD40-CD40L 共刺激信号通路在激发初始 T 细胞活化中的主导地位[7]，同时也表明，大部分效应性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的维持，以及记忆性 T 细胞发生再次应答不依赖这两条共刺激信号通路。体内还存在 CD27-CD70、B7RP-1-ICOS、PD-1-B7-H1 等其他共刺激信号通路[8,9]。这些共刺激信号在动态的 T 细胞应答的不同阶段，通过刺激或抑制的方式调节 T 细胞的功能和效应。

B7-H1 作为共刺激分子与 T 细胞活化相关联，通过与其受体 PD-1 相互作用传递抑制性信号，在免疫应答中发挥负向调控作用。B7-H1 与 PD-1 的结合，可抑制 TCR 介导的淋巴细胞增殖和细胞因子 IL-2、IFN-γ 及 IL-10 的产生，导致细胞周期停滞，但不增加细胞死亡。阻断 APC 上 B7-H1 的表达，可导致 T 细胞增殖和细胞因子 IFN-γ 和 IL-10 增加，表明 B7-H1 的功能是抑制 T 细胞活化。APC 上抑制性 B7-H1 和协同刺激 B7-1 信号的相对水平，可能影响 T 细胞活化的程度，决定产生耐受还是自身免疫。B7-H1 由于在机体自身免疫病和外周免疫耐受中发挥重要作用而成为该领域的研究热点之一。目前关于 B7-H1 的研究国外已经有不少报道，但国内基本空白。为了深入探讨 B7-H1 在调节自身免疫病和外周免疫耐受中的机制及其他生物学功能，制备表达 B7-H1 的慢病毒载体成了我们解决这一突出问题的有力工具。

pLenti6/V5-D-TOPO 慢病毒载体表达系统，可以在分裂和非分裂哺乳动物细胞中进行稳定的高水平基因表达，感染效率高，表达稳定，自身抗原性弱，可操控性强[10]。因而本实验中我们选用该病毒表达载体。并在 B16F10 细胞株中进行表达，用 FACS 法和免疫荧光不仅证实了转染细胞上有 B7-H1 分子在细胞膜的表达，而且表达的蛋白分子具有良好的免疫学活性。

B7-H1 的细胞膜表达具有非常重要的意义：一方面，利用细胞膜表达的 B7-H1 蛋白分子对于移植的细胞、组织或者器官进行基因修饰，降低宿主对移植物的免疫排斥反应，可以作为一种免疫抑制剂用于移植免疫治疗。另一方面，获得的 B7-H1 细胞膜表达病毒载体，为我们进一步探讨 B7-H1 在免疫自稳调节中的地位及其在信号转导方面的机制奠定了坚实的基础。通过对负性共刺激信号 B7-H1 的深入研究，必将为临床肿瘤的免疫治疗、控制自身免疫性疾病和诱导抗原特异性的同种移植耐受提供新的治疗策略[1,11,12]。

参考文献：

[1] Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity[J]. J Mol Med, 2003, 81(5): 281-287.

[2] Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, *et al*. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy[J]. J Immunol, 2003, 170(7): 3637-3644.

[3] Magnus T, Schreinerb, Korn T, *et al*. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: impli-

cations for immune responses and autoimmunity in the CNS[J]. J Neurosci, 2005, 25(10): 2537-2546.
[4] Kim H K, Guan H, Zu G, *et al*. High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals[J]. J Leuk Biol, 2006, 79(4): 686-695.
[5] Greenwald R J, Freeman G J, Sharep A H. The B7 family revisited [J]. Ann Rev Immunol, 2005, 23(4): 515-548.
[6] Ichikawa M, Chen L. Role of B7-H1 and B7-H4 molecules in down-regulating effector phase of T-cell immunity: novel cancer escaping mechanisms[J]. Front Biosci, 2005, 10(9): 2856-2860.
[7] Kosmaczewska A, Magott-Procelewska M, Frydecka I, *et al*. CD40L, CD28, and CTLA-4 expression on CD4+ T cells in kidney graft recipients: a relationship with post-transplantation clinical course [J]. Transpl Immunol, 2006, 16(1): 32-40.
[8] Van-Berkel M E, Oosterwegel M A. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells[J]? Immunol Lett, 2006, 105(2): 115-122.
[9] Borst J, Hendriks J, Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(3): 275-281.
[10] Maciej W, Didiert. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(1): 42-47.
[11] Subudhi S K, Zhou P, Yerian L M, *et al*. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection[J]. J Clin Invest, 2004, 113(5): 694-700.
[12] 丁涵露,吴雄飞. ICOS和PD-1共刺激分子的免疫学作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(1): 83-85.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2007)01-0027-01

个案与短篇

B亚型血型1例

林子林,毕蔚茹 (解放军总医院输血科,北京 100853)

患者,男性,2006年7月14日因肺泡蛋白沉积症入我院呼吸内科。我们在做患者血型检测时,发现其为B亚型[1],现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂

国产抗A,抗B血清由长春生物制品研究所提供,进口抗A,抗B,抗H,抗A B血清由加拿大DBI公司提供,A_1、B_1由本血库自行配制,O由上海市血液中心提供。

1.2 方法

1.2.1 献血者血型鉴定 取献血者的抗凝血标本用血清学方法进行血型鉴定。

1.2.2 吸收放散试验 取患者洗涤后的压积RBC与等量抗B血清混合,4 ℃吸收1 h,洗涤后经56 ℃热放散,取放散液与B_1反应。

1.2.3 唾液血型物质测定 用标化好的抗B和抗H血清测定患者唾液上的血型物质[2]。

1.2.4 与抗H反应 取患者RBC与抗H反应。

2 结果

2.1 血型鉴定结果

见表1。

表1 血型鉴定结果

	抗-A	抗-B	抗$_{1}$-A	抗$_{1}$-B	抗AB	抗-H	A_1	B	自身	O筛
室温	-	-	-	-	-	3+	4+	-	-	-
4 ℃	-	-	-	-	-	4+^{s}	4+	-	-	-

2.2 吸收放散试验

结果为2+^{s},4 ℃增强,提示RBC上有弱的B抗原存在。

2.3 唾液血型物质测定

结果为唾液中含B、H 2种物质,为分泌型。

2.4 与抗H反应

试验结果4 ℃为4+^{s}。

3 讨论

上述检测结果表明,该患者血型符合Bm亚型血清学特点。B亚型较A亚型少见,其分类基本上与A亚型平行。国外有B_3、B_x、Bm及Bel的报道,但与Aend及Ay相当的B亚型尚少见,国内学者已有Bm1及B_x亚型的报道。血型是人类血液的主要特征之一,表达了产生抗原-抗体系统的遗传特性。在临床医学快速发展的今天,输血疗法已由原始的全血提高到现在的成份输血,并逐步形成了输血治疗体系,指导临床进行输血治疗、抢救等工作。特别在全面贯彻落实医疗事故处理条例,献血法等有关规定的今天,加强工作责任心,提高检测技术水平,从而指导临床输血治疗使之更加完善更加安全已成为我们每个血库工作者的重要任务,而准确无误的血型鉴定则是保证这一切的重中之重。亚型的判断虽有统一的标准,但不可能每例完全一致。为防止亚型漏判,定型时必须注意红细胞与抗血清凝集的强度,定型必须做正反定型,如结果不符,应进一步作血型血清学检查。

关键词:B亚型;血型
中图法分类号:R457.11 文献标识码:B

参考文献:

[1] 肖星南.输血技术手册[M].成都:四川科学技术出版社, 1992: 66-67.
[2] 吕鹏.最新输血技术学[M].北京:人民卫生出版社, 1994: 384-386.

(编辑 王 红)

作者简介:林子林(1977-),男,宁夏回族自治区银川市人,医师,主要从事输血临床方面的研究。电话:(010)66937134, E-mail:linzl1977@yip.sina.com

收稿日期:2006-07-18;修回日期:2006-11-06