论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0028-04

小鼠 FasL 全长 cDNA 的克隆、真核表达载体构建及其在树突状细胞中的表达

王 彦[1],卓文磊[2],王长征[1],钱桂生[1],毕玉田[1],吴 奎[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[2]全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 克隆小鼠 FasL(mouse FasL, mFasL)全长 cDNA,构建其真核表达载体,并验证其在小鼠骨髓来源的树突状细胞(dendritic cells, DC)中的表达。**方法** 采用 RT-PCR 和 TA 克隆技术,从激活的小鼠脾脏 T 淋巴细胞中扩增 mFasL 全长 cDNA,亚克隆到 T 载体中,再克隆到 pIRES2EGFP 载体中。转染小鼠 DC 后,用 RT-PCR、免疫荧光及 Western blot 检测 mFasL mRNA 和蛋白表达。**结果** 测序证实所得的 mFasL cDNA 序列与其在 GenBank 中的序列完全一致。mFasL 真核表达载体转染小鼠 DC 后,能表达 mFasL mRNA 和蛋白。**结论** 成功克隆了 mFasL 基因,构建其真核表达载体,并证明能有效表达于 DC 中。

关键词: FasL; 克隆; 载体构建; 树突状细胞

中图法分类号: Q782; Q785; Q786 **文献标识码**: A

Cloning and eukaryotic expression vector construction of mouse FasL gene and its expression in dendritic cells

WANG Yan[1], ZHUO Wen-lei[2], WANG Chang-zheng[1], QIAN Gui-sheng[1], BI Yu-tian[1], WU Kui[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To clone mouse FasL (mFasL) full length cDNA and construct eukaryotic expression vector, and to detect its expression in dendritic cells. **Methods** RT-PCR and TA cloning technique were used to clone the mFasL full length cDNA from mouse activated T lymphocytes, and then eukaryotic expression vector pIRES2EGFP containing mFasL cDNA was constructed. The positive recombinants pIRES2EGFP-mFasL were transfected into dendritic cells (DC), the expression of mFasL mRNA was detected by RT-PCR and the expression of mFasL protein was assayed by immunofluorescence and Western blotting. **Results** The cloned full reading frame of mFasL cDNA was in coincidence with the sequence registered in GenBank. In the DC after transfection of pIRES2EGFP-mFasL, the expressions of mFasL mRNA and mFasL protein were detected. **Conclusion** The mFasL cDNA was cloned and constructed into the eukaryotic expression vector successfully, and mFasL gene could be expressed efficiently in DC transfected by pIRES2EGFP-mFasL.

Key words: FasL; clone; vector construction; dendritic cell

FasL 是一种属于肿瘤坏死因子家族的,分子量为 40×10^3 的Ⅱ型膜蛋白,它主要表达于活化的 T 细胞、NK 细胞、某些肿瘤细胞以及机体的免疫豁免区[1,2]。小鼠 FasL(mFasL)含有 278 氨基酸,其基因和人 FasL 具有 76.9% 的同源性。FasL/Fas 信号系统在介导活化淋巴细胞的凋亡、清除自身反应性淋巴细胞、诱导中枢和外周免疫耐受以及维持免疫平衡状态等过程中发挥重要作用[3,4]。克隆 FasL 全长 cDNA 基因并构建其表达载体,对于研究 FasL 基因在诱导细胞凋亡和免疫调节中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

C57BL/6 小鼠 60 只,雌雄不拘,体质量 20~30 g,6~8 周龄,购自重庆医科大学实验动物中心;pIRES2EGFP 质粒购自 Clontech 公司;PCR 引物订购于赛百盛公司;重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自 Peprotech 公司;刀豆蛋白(ConA)购自 Sigma 公司;小鼠白介素-2(mIL-2)购自 R&D 公司;高保真 RT-PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司;pMD18T 载体和限制性内切酶购自 Takara 公司;脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;TRI reagent 购自 MRC 公司;RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司;小鼠淋巴细胞分离液购自 TBD 公司;兔抗小鼠 FasL 一抗、

基金项目:国家自然科学基金(30470772)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470772)

作者简介:王 彦(1979-),女,江西省南丰县人,博士,医师,主要从事哮喘发病机制方面的研究。电话:(023)66752693, E-mail: wangyan-flower@163.com

通讯作者:王长征,电话:(023)68774603

收稿日期:2006-02-03;**修回日期**:2006-03-21

HRP 标记或 cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗分别购自 Santa Cruz 和中山公司。

1.2　方法

1.2.1　T 淋巴细胞的分离及激活　　取小鼠脾脏，于 RPMI1640 培养基中研碎并以 200 目网滤过，收集脾细胞悬液，按 1∶1比例加至淋巴细胞分离液上，2 000 r/min 离心 30 min，吸出中间细胞层，培养基重悬细胞，常规培养 2 h，收集悬浮细胞，按每 5×10^7 细胞/柱比例加入尼龙毛柱中，常规培养 1 h，收集流出的 T 淋巴细胞悬液，离心并用培养基重悬细胞后，加刀豆蛋白和 mIL-2 分别至 5 mg/L 和 20 μg/L 刺激 24 h，然后继续在含 20 μg/L mIL-2 的 RPMI1640 培养液中培养，5 d 后加离子霉素至 500 μg/L 再刺激 8 h 后收获细胞。

1.2.2　mFasL 全长 cDNA 的克隆　　取上述活化的 T 淋巴细胞，用 TRI reagent 以一步法提取细胞（10^7）总 RNA，取 RNA 2 μg，cDNA 合成：70 ℃ 5 min→42 ℃ 60 min→70 ℃ 10 min→冰上；PCR 扩增：依据 GenBank 中的 mFasL 序列（NM_010177），引物设计如下：上游：5′-CCGGAATTCATGCAGCAGCCCATGAATTAC-3′（*Eco*R Ⅰ）；下游：5′- CCGCTCGAGTTAAAGCTTATATACAAGCCG-3′（*Xho* Ⅰ），扩增产物长度为 858 bp（mFasL 编码区 840 bp + 引物两端酶切位点及其保护碱基）。反应条件为：94 ℃ 15 s→50 ℃ 30 s→68 ℃ 60 s，共 35 个循环，然后 68 ℃延伸 5 min 后终止反应。

1.2.3　PCR 产物的 TA 克隆　　经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，从凝胶中切下目的条带并纯化回收 PCR 产物，与 pMD18T 克隆载体按 4∶1比例在 T_4 DNA 连接酶的作用下行连接反应（16 ℃，16 h），然后转化至 *E. coli* DH5α 菌株，蓝白斑筛选，挑选阳性菌落（白色）摇菌扩增后，提取得 pMD18T-mFasL 质粒。

1.2.4　真核表达载体的构建　　将 pMD18T-mFasL 和 pIRES2EGFP 分别用 *Sal* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切，回收 mFasL 目的片段和线性化 pIRES2EGFP 载体，按 4∶1比例，在 T_4 DNA 连接酶的作用下行连接反应（16 ℃，16 h），转化至 *E. coli* DH5α 菌株，Kan 抗性筛选，阳性菌落扩增后提取得 pIRES2EGFP-mFasL 重组质粒，*Sal* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定，并送质粒测序。

1.2.5　小鼠骨髓来源树突状细胞（DC）的分离、培养和鉴定　参照文献[5,6]进行。无菌取 C57BL/6 小鼠完整的股骨、胫骨，离断干骺端，以 RPMI1640 培养液 1 ml 冲洗髓腔，获得单细胞悬液，2 000 r/min 离心 10 min，弃上清，重悬于 RPMI1640 培养基，加入重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（rmGM-CSF）至终浓度为 20 ng/ml，继续培养 10 d 后收获细胞，用流式细胞仪（FACS）鉴定 DC 特异性表面分子 CD11c 表达后，进行下一步实验。

1.2.6　mFasL 基因转染　　pIRES2EGFP-mFasL 重组质粒与 Lipofectamine™2000 按 1 μg∶3 μl 混合于 50 μl 培养基，室温 30 min，形成转染液复合物，加入培养在 6 孔板中的 DC 中，常规培养 24 h 后，行细胞换液并加入 G418 至 200 μg/ml，48 h 后进行以下实验（mFasL 组）。以未转染质粒（Control A 组）和转染空白质粒（Control B 组）的 DC 为对照，每组 5 个样本（$n=5$）。

1.2.7　RT-PCR　　合成 mFasL、GAPDH 2 对 PCR 引物：mFasL（446 bp）：上游：5′-GGGCTCCTCCAGGGTCAGTTTT-3′，下游：5′-TCCAGAGATCAGAGCGGTTCCATA-3′。GAPDH（311 bp）：上游：5′-CCTCTGGAAAGCTGTGGCG-3′，下游：5′-GGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3′。用 TRI reagent 以一步法提取各组 DC（10^7）总 RNA，取 RNA 2 μg 进行 cDNA 合成：70 ℃ 5 min→42 ℃ 60 min→70 ℃ 10 min→冰上；PCR 扩增：mFasL（33 循环）和 GAPDH（27 循环）：94 ℃预变性 90 s→94 ℃ 15 s→55 ℃ 30 s→68 ℃ 60 s→68 ℃延伸 5 min；PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1 ~ 1.5 h 后，图像扫描，用 GAPDH 为内参照进行半定量分析，以相对光密度值（relative optical density，ROD）表示 mFasL mRNA 相对含量。

1.2.8　免疫荧光　　各组细胞涂片后，75% 乙醇固定 15 min，室温下风干，封闭液（正常山羊血清）封闭 20 min；兔抗小鼠 FasL 抗体（1∶100）37 ℃孵育 1 h；cy3 标记的羊抗兔二抗 37 ℃孵育 0.5 h，三蒸水充分冲净后，50% 碱性缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察。阳性部分为鲜红色荧光。

1.2.9　Western blot　　用 TRI reagent 提取各组细胞蛋白质。取蛋白质 20 μg 以 10% SDS-PAGE 电泳分离；半干电转移蛋白到 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭，加一抗［兔抗小鼠 FasL（1∶500）或兔抗小鼠 GAPDH（1∶500）］4 ℃杂交过夜，二抗（HRP 标记的羊抗兔 IgG）室温孵育 1 h，DAB 染色。扫描蛋白条带，以 GAPDH 为内参照进行半定量分析，用相对光密度（ROD）值表示各组蛋白相对含量。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 行单因素方差分析。

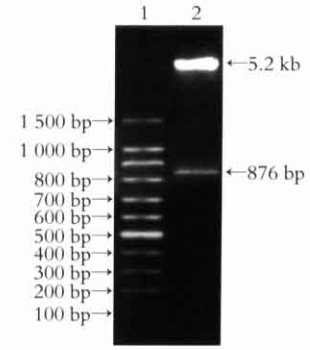
2　结果

2.1　mFasL cDNA RT-PCR 产物的鉴定

通过 RT-PCR 从激活的小鼠 T 淋巴细胞中扩增出长度为 858 bp 的 DNA 片段，同预计值相符。

2.2　pIRES2EGFP-mFasL 重组质粒结构鉴定

pIRES2EGFP-mFasL 重组质粒 *Sal* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后，经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示，可见 5.2 kb 片段（线性 pIRES2EGFP）和 876 bp 片段（mFasL 条带），提示 mFasL cDNA 片段成功构建至 pIRES2EGFP 质粒中。测序结果示 mFasL cDNA 序列与 GenBank 中 mFasL 的序列（NM_010177）完全符合。



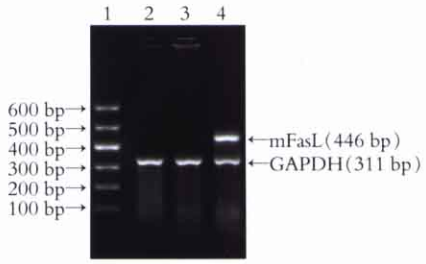
1：标准；2：pIRES2EGFP-mFasL

图 1　pIRES2EGFP-mFasL 质粒酶切鉴定电泳图

2.3　pIRES2EGFP-mFasL 重组质粒功能鉴定

FACS 检测表明，第 10 天培养细胞表达 CD11c（DC 特异性表面分子）阳性率为 82.78%，提示大多数骨髓细胞已分化为 DC。转染 pIRES2EGFP-mFasL 质粒后，荧光显微镜下可见转染成功的细胞呈现绿色荧光。

2.3.1 mFasL mRNA 表达 PCR 电泳如图 2 所示：各组在 311 bp 处皆显现明亮的 GAPDH 内参照条带且无明显差别。control A 组和 control B 组皆未见 446 bp mFasL 扩增产物条带，其 ROD 值相当于背景值，提示未转染 DC 和转染空质粒 DC 不表达 mFasL mRNA。mFasL 组可见明显的 446 bp mFasL 扩增产物条带，其 ROD 值显著高于 Control A 组和 Control B 组（$P<0.01$），提示转染 pIRES2EGFP-mFasL 后，DC 能表达 mFasL mRNA。见表 1。



1：标准；2：Control A 3：Control B 4：mFasL

图 2 pIRES2EGFP-mFasL 质粒转染对 DC 表达 mFasL mRNA 的影响（RT-PCR）

2.3.2 mFasL 蛋白表达（表 1） 免疫荧光结果表明，Control A 组和 Control B 组均未见荧光，mFasL 组如图 3 所示，可见明亮的鲜红色荧光，主要表达于细胞质和细胞膜。mFasL 组尚可见少量细胞核呈现红色荧光，分析可能为免疫荧光染色所致的假阳性。Western blot 结果如图 4 所示，各组在 37×10^3 处皆显现明显的 GAPDH 内参照蛋白印迹且无明显差别。control A 组和 control B 组皆未见 40×10^3 mFasL 蛋白条带，其 ROD 相当于 PVDF 膜背景值。mFasL 组可见明显的 40×10^3 mFasL 蛋白条带，其 ROD 值显著高于 control A 组和 control B 组（$P<0.01$），提示转染 pIRES2EGFP-mFasL 后，DC 能表达 mFasL 蛋白。

表 1 pIRES2EGFP-mFasL 质粒转染对 DC 表达 mFasL mRNA 和蛋白的影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	mRNA 的相对光密度	protein 的相对光密度
Control A 组	0.014 ± 0.005	0.016 ± 0.004
Control B 组	0.011 ± 0.004	0.013 ± 0.005
mFasL 组	1.468 ± 0.056[ab]	0.317 ± 0.063[ab]

a：$P<0.01$，与 Control A 组比较；b：$P<0.01$，与 Control B 组比较

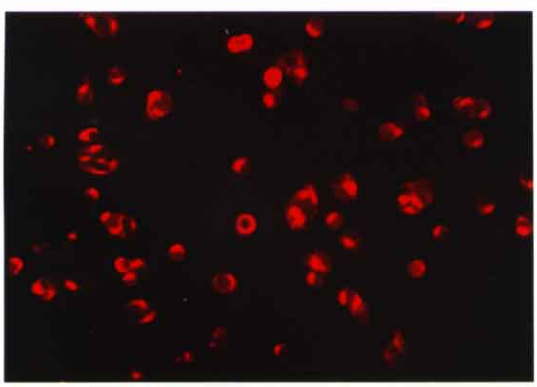
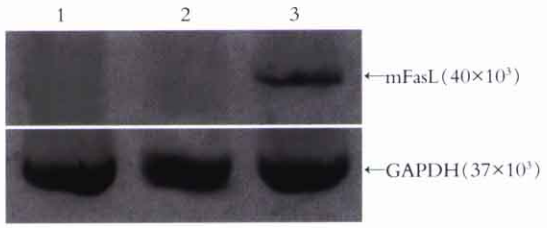


图 3 pIRES2EGFP-mFasL 质粒转染对 DC 表达 mFasL 蛋白的影响 （免疫荧光 ×200）



1：Control A；2：Control B；3：mFasL

图 4 pIRES2EGFP-mFasL 质粒转染对 DC 表达 FasL 蛋白的影响（Western blot）

3 讨论

Fas/FasL 信号途径介导的细胞凋亡在维持组织发育和调节免疫系统平衡中起着重要作用。FasL 表达异常与多种临床疾病的发生发展相关，如自身免疫性疾病和肿瘤等。多种肿瘤细胞通过表达 FasL，导致机体免疫细胞凋亡，从而逃避自身免疫系统的杀伤。在系统性红斑狼疮中，FasL 表达明显增高或非正常活化很可能通过细胞毒 T 淋巴细胞样作用介导组织损伤。另一方面，FasL 的表达可以通过 Fas/FasL 信号途径介导活化淋巴细胞的凋亡，而使眼、脑和胎盘等免疫赦免器官免于受到细胞免疫反应和炎症等的损伤。鉴于 Fas/FasL 介导的细胞凋亡诱导免疫耐受的作用，将 FasL 基因修饰的 DC 应用于抑制移植物免疫排斥、减轻变态反应性炎症和治疗自身免疫性疾病的研究中已越来越受到重视[7,8]。

Fas/FasL 介导的 T 细胞凋亡是机体维持对自身抗原免疫耐受（外周耐受）的重要机制。T 细胞在静息状态下基本上不表达或只表达少量 Fas，但被激活后可表达大量 Fas，并易于通过 Fas/ FasL 途径凋亡[3,4]。这种凋亡机制可以调节免疫应答的水平和维持 T 细胞耐受。Zhang 等[9]将 FasL 基因转染抗原递呈细胞（antigen presenting cell，APC），发现表达 FasL 的同种 APC 能够诱导同种抗原特异的 T 细胞无反应性，认为这可能是导致特异 T 细胞免疫耐受的机制之一。Min 等[10]研究发现，FasL 转染的 DC 能够通过抑制同种混合淋巴细胞反应，从而导致机体对同种抗原的低反应性；将 FasL 转染的供者 DC 注入受者腹腔后进行异位心血管移植，虽然不能完全阻止排斥反应的发生，但能显著提高移植物的存活期。总之，一系列研究表明，FasL 基因转染的 DC 及其他 APC 可能具有诱导免疫耐受的作用。

正常人在反复接触过敏源后，T 淋巴细胞能对过敏原的刺激产生免疫耐受，不会导致抗原特异性淋巴细胞活化，而哮喘患者则相反。因此，免疫耐受缺陷可

能在哮喘的发病中起重要作用。通过将FasL基因转染DC,诱导过敏原致敏小鼠的抗原特异性T细胞凋亡,以产生免疫耐受,可能达到防治哮喘的目的。克隆mFasL全长基因,并将其克隆至真核表达载体中,能为我们进一步研究FasL与哮喘防治关系打下基础。

本研究中我们通过RT-PCR法从激活的小鼠T淋巴细胞中扩增出mFasL全长基因,通过TA克隆法将其亚克隆至T载体中,再与pIRES2EGFP真核表达载体相连接成pIRES2EGFP-FasL。为检测mFasL的表达功能,我们将该pIRES2EGFP-mFasL转染DC,经RT-PCR、免疫荧光以及Western blot检测表明,转染后的DC能表达mFasL的mRNA和蛋白。但是,转染mFasL后的DC能否通过诱导免疫耐受,治疗动物或人体哮喘,仍有待我们进一步研究。

参考文献:

[1] Lee H O, Ferguson T A. Biology of FasL[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(3-4): 325-335.
[2] Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, *et al*. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape[J]. Science, 1996, 274(5291): 1363-1366.
[3] Ju S T, Panka D J, Cui H, *et al*. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation[J]. Nature, 1995, 373(6513): 444-448.
[4] O'connell J, O'sullivan G C, Collins J K, *et al*. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand[J]. J Exp Med, 1996, 184(3): 1075-1082.
[5] Lutz M B, Kukutsch N, Ogilvie A L, *et al*. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 77-92.
[6] 夏俊波,吴 奎,孙 鲲,等. 小鼠骨髓来源的树突状细胞体外扩增与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 942-944.
[7] Askenasy N, Yolcu E S, Yaniv I, *et al*. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator[J]. Blood, 2005, 105(4): 1396-1404.
[8] Bohana-Kashtan O, Civin C I. Fas ligand as a tool for immunosuppression and generation of immune tolerance[J]. Stem Cells, 2004, 22(6): 908-924.
[9] Zhang H G, Su X, Liu D, *et al*. Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells [J]. J Immunol, 1999, 162(3): 1423-1430.
[10] Min W P, Gorczynski R, Huang X Y, *et al*. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival[J]. J Immunol, 2000, 164(1): 161-167.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2007)01-0031-01

个案与短篇

法洛四联症根治术后急性肝功能衰竭1例

张鸿玲,刘 健,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

患儿,男性,4岁,体质量12 kg。心脏超声诊断:先天性心脏病,法洛四联症。于2005年11月7日在全麻下行法洛四联症根治术。转流时间86 min,阻断主动脉时间60 min,自动复跳。术后肢端凉,面色差,尿少,血压65~75/45~55 mmHg,中心静脉压17~22 cmH$_2$O,考虑合并低心排综合征。给予盐酸肾上腺素、多巴胺、米力农等治疗,2 d循环功能稳定,第4天脱除呼吸机。

术后第1~6天,患儿出现意识障碍,巩膜、皮肤重度黄染。查肝功见表1;尿素氮28.2 mmol/L;凝血酶原时间21.20 s,国际标准化凝血酶原时间1.84 s;血糖最高18.3 mmol/L,最低3.2 mmol/L。考虑急性肝功能衰竭(ALF)、肝性脑病(HE)。治疗:①阿托莫兰、思美泰、肝利欣保护肝细胞;前列腺素E降低肺循环阻力,缓解肝缺血损伤。②清除加重肝性脑病的因素:法莫替丁防治上消化道出血;复达欣抗感染;纠正水、电解质和酸碱平衡失调;避免使用止痛、镇静等药物。③乳果糖口服酸化肠道、减少肠内毒素的生成和吸收。④白蛋白、高糖、血浆等营养支持。⑤呼吸功能及心功能支持等治疗,患儿黄疸渐消退,意识状态由昏睡、反复扑置样震颤,转为淡漠,最后清晰,病情逐日好转,术后第18天复查肝功接近正常,康复出院,见表1。

表1 肝功检测结果

术后时间(d)	谷丙转氨酶(U·L^{-1})	谷草转氨酶(U·L^{-1})	总胆红素(μmol·L^{-1})	直胆红素(μmol·L^{-1})	总胆汁酸(μmol·L^{-1})	直胆汁酸(μmol·L^{-1})
1	28.0	255.0	57.0	38.0	91.0	28.9
3	2 458.0	170.0	59.0	46.0	133.3	80.3
4	2 732.0	997.0	61.0	45.0	85.4	54.6
5	2 233.0	2 400.0	62.0	46.0	64.8	40.5
18	57.0	29.0	59.1	41.4	13.8	7.6

讨论

ALF是指由于各种致病因素作用于机体,导致肝细胞在短

(下转38页)

作者简介:张鸿玲(1967-),女,云南省昆明市人,副主任医师,主要从事内科临床方面的研究。电话:13529663776
通讯作者:刘 健,电话:(023)68774667
收稿日期:2005-12-20;修回日期:2006-05-29