文章编号:1000-5404(2007)10-0963-04

论著

人 CD40L 真核表达体系的建立

田 坤,钱桂生 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 构建人 CD40L 真核表达体系并鉴定其在转染细胞中的表达。**方法** 以 DNA 重组技术构建 CD40L 的真核表达载体 pcDNA3.1(+)-CD40L,脂质体法转染于人小细胞肺癌细胞株 h446,流式细胞技术鉴定其在转染细胞中的表达。**结果** 双酶切及 DNA 测序证明,CD40L DNA 插入表达载体 pcDNA3.1(+)序列及方向正确,转染肺小细胞肺癌细胞株 h446 后,经流式细胞仪鉴定转染细胞中存在 CD40L 表达。**结论** 成功地建立人 CD40L 表达体系,为构建以人 CD40L 为组件的抗肿瘤疫苗的临床研究奠定基础。

关键词: 人 CD40L;真核表达载体;肺小细胞肺癌细胞

中图法分类号: R392-33; R394.2; R730.51 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression system of a cell surface molecule——human CD40 ligand

TIAN Kun, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct human eukaryotic expression system expressing T cell surface molecule CD40L and identify the expression product in SCCL cell line h446. Methods The expression vector pcDNA3.1-CD40L was constructed by recombinant DNA technology, then transfected into h446 cell line of SCCL by lipidosome methods, and the expressed membrane protein was identified by flow cytometry. Results The pcDNA3.1(+)-CD40L was constructed successfully and the coding region was inserted into the vector correctly. The membrane protein was observed by flow cytometry on transfected h446 cell line of SCCL. Conclusion Human CD40L was expressed successfully in eukaryotic system, which is very important in the anti-tumor vaccination study with a recombinant human CD40L in clinic.

Key words: human CD40L; eukaryotic expression vector; SCCL cell line

CD40L(CD154)相对分子质量为 39×10^3 的Ⅱ型膜糖蛋白,是 CD40 的配体。在免疫系统,二者分别表达于不同的细胞膜,CD40L 主要表达于激活的 T 淋巴细胞表面,当其分别与 B 细胞及树突状细胞(dendritic cell, DC)细胞表面的 CD40 结合时,对于调节体液与细胞免疫具有枢纽作用[1]。CD40 不仅表达于增殖潜能较强的造血与淋巴细胞,许多肿瘤细胞表面也有表达,并且与肿瘤的发生有某种内在联系。近年研究表明,CD40 信号的激活可以为恶性肿瘤治疗开拓新的途径。一定状态下,CD40L 与肿瘤细胞表面 CD40 结合可以直接抑制肿瘤细胞增殖[2],增加抗肿瘤制剂的敏感性[3]。更重要的是 CD40L 一方面诱导 DC 细胞成熟,延长 DC 细胞生存期[4],改善肿瘤患者自身 DC 细胞过快自发性凋亡,上调内源性肿瘤肽[3]和共刺激分子表达,使抗原呈递细胞的效能达到最佳状态;另一方面通过增加一些免疫刺激因子的分泌。从而提高抗原呈递细胞的抗原呈递效应,促进细胞毒 T 细胞的增生、活化与细胞因子的分泌,增强了宿主抗肿瘤免疫的能力。本研究建立人 CD40L 表达体系[5],为抗肿瘤免疫的临床研究提供了一种途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 健康人外周血(西南医院血站),pcDNA3.1(+)表达载体质粒(本实验室保存)。

作者简介:田 坤(1959-),女,四川省成都市人,博士研究生,副主任医师,主要从事肺癌临床诊治方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)60853594,E-mail: tiankun195910@126.com

通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603

收稿日期:2006-12-06;修回日期:2007-01-10

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 培养基(GiBCOL 公司),淋巴细胞分离液(天津 TBE 公司),PMA(佛波脂)(Sigma 公司),ConA(刀豆蛋白)(Sigma 公司),RNA 提取细胞裂解液 Tipure(罗氏公司),RT-PCR 试剂盒、pMD18-vecter 试剂盒、限制性内切酶(大连 TaKaRa 公司),质粒提取试剂盒(北京博大泰克公司),T_4 连接酶(TOYOBO 公司),脂质体 Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司),PE 标记 CD154 单抗(美国 ED 公司),DNA 纯化试剂盒(北京天为时代公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 由 NCBI 核酸数据库获得人 CD40L 基因序列,利用 primer Premier 5 引物设计软件进行引物设计,保证阅读框正确。上游引物 5′-TGCCAGAAGATAC-CATTT-3′,下游引物 5′-GCTGTATTATGAAGACTCCC-3′,上、下游引物 5′端分别加载 *Nhe* Ⅰ 与 *Kpn* Ⅰ 酶切位点。引物由 TaKaRa 宝生物工程有限公司合成。

1.2.2 目的基因存在细胞的获取 取健康成人外周血约 40 ml,以淋巴细胞分离液离心得单个核细胞,经贴壁收集非贴壁的淋巴细胞,再经尼龙毛柱过滤去除 B 淋巴细胞,得 T 淋巴细胞。以含有 IL-2 、10% 小牛血清 RPMI1640 培养液培养 6 d,再分别加 PMA 与 ConA 使其终浓度分别为 10 ng/ml 与 10 μg/ml,刺激培养 10 h 收获激活的 T 淋巴细胞。

1.2.3 CD40L 目的基因的扩增 收集激活 T 淋巴细胞以 Tripur 提取 T 细胞 RNA,用 RT-PCR 试剂盒以 RT-PCR 法,逆转、扩增 CD40L 目的基因并给予纯化。

1.2.4 CD40L 目的基因克隆` 用 pMD18 -T Vector 试剂盒,将已纯化的 CD40L 与 pMD-18 T 载体连接,并转化于 DH5α 感受态菌株。以蓝、白斑筛选阳性菌落,菌液 PCR 检测及菌液质粒的 DNA 测序,对克隆载体进行鉴定。

1.2.5 pcDNA3.1(+)- CD40L 表达载体的建立 用质粒提取试剂盒,分别提取表达载体 pcDNA3.1(+)与重组克隆载体 pMD18-T/CD40L 的质粒。两质粒分别经 *Nhe* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ 双酶切与切胶纯化回收。回收所得 pcDNA3.1(+)载体与 CD40L DNA 片段,以 1∶8 摩尔浓度在 T_4 连接酶作用下进行连接。将连接所得 pcDNA3.1(+)-CD40L 重组载体转化于 Top10 感受态细菌。在含氨苄青霉素 SOC 固体培养基进行阳性菌落的筛选。对阳性菌液分别进行 PCR 检测、质粒 DNA、质粒双酶切 DNA 片断的比较以及重组表达载体质粒的 DNA 测序(上海生工)各项鉴定。

1.2.6 重组表达载体 pcDNA3.1(+)-CD40L 肺小细胞肺癌细胞株 h446 转染 将 1.5×10^5 个细胞 500 μl 接种与 24 孔培养板,培养 24 h 当细胞融合至于 85% ~90% ,将脂质体 Lipofectamine™2000 2 μl 分别与 pcDNA3.1(+)及 pcDNA3.1(+)-CD40L 各 1 μg 混合,将混合物 100 μl 加入相应培养孔,转染 8 h,更换培养液,继续培养 48 h。

1.2.7 转染阳性细胞的检测

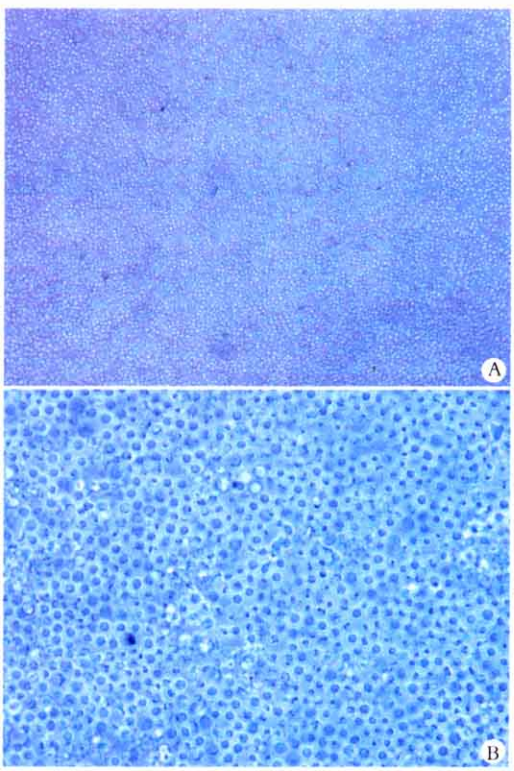
1.2.7.1 RP-PCR 法测试 转染后 48h 以 RT-PCR 法分别检测空载体 pcDNA3.1(+)与重组载体 pcDNA3.1(+)-CD40L 转染细胞的 CD40L mRNA 转录。

1.2.7.2 流式细胞仪检测 转染后 48 h,以 PE 标记 CD40L 单抗分别对空载 pcDNA3.1(+)与重组载体 pcDNA3.1(+)-CD40L 转染的 h446 细胞进行染色,用流式细胞仪检测转染细胞的 CD40L 细胞膜表达率。

2 结果

2.1 活化的 T 淋巴细胞收集

T 淋巴细胞经 6 d 培养,细胞排列密集,呈沉底悬浮状态生长。经过 10 h PMA 与 ConA 刺激,胞体增大,上浮聚集呈微绒球样、成簇生长,成为活化 T 淋巴细胞。如图 1A、B。



A:刺激前;B:刺激后

图 1 人血原代培养 T 淋巴细胞刺激前后对照 (LM×400)

2.2 活化 T 细胞总 RNA 的提取、CD40L 逆转录、扩增与纯化

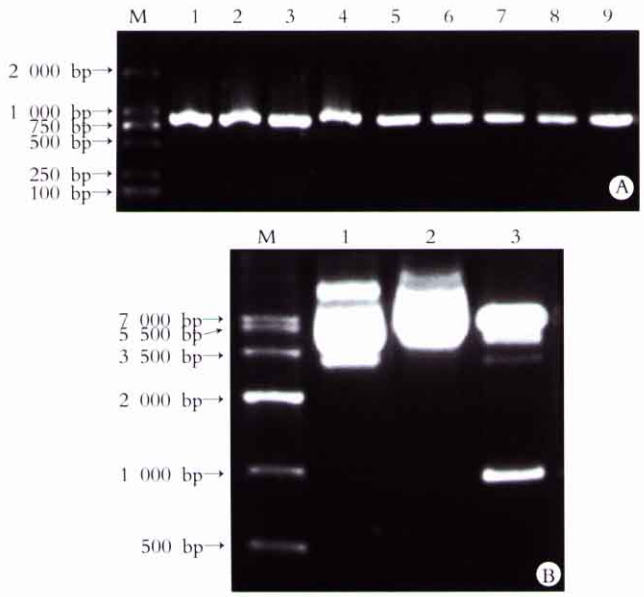
用 RT-PCR 法,从人激活 T 细胞总 RNA 中逆转并扩增得 876 bp CD40L 目的基因片段。

2.3 目的基因的克隆与鉴定

CD40L 与 pMD18-Vertor 连接、转化 DH5α 感受态细菌后,经蓝、白斑筛选,共挑 13 株阳性菌落,有 3 株菌液 PCR 检测有 CD40L 目的片段存在。对其中两株提取质粒与标准 DNA Ⅳ比较,其电泳之处位于 2 000 ~3 500 bp,与 pMD18-T/CD40L 重组克隆质粒的大小基本相符。该质粒经 DNA 测序,插入 DNA 序列与 NCBI 核酸数据库收录的编号为 BC071754 CD40L 序列中 40 ~915 碱基序列完全相符。

2.4　pcDNA3.1(+)-CD40L 表达载体的建立

pcDNA3.1(+)与 pMD18-T/CD40L 两质粒分别酶切、连接后，得重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-CD40L，经转化 Top10 感受态细菌，于 SOC 固体培养基挑选 41 株经氨苄筛选的阳性菌落，其菌液 PCR 检测有 15 株提示有 CD40L 插入 DNA 的存在（如图 2A）。将重组质粒及未重组质粒与标准 DNA 进行比较并双酶切，可见质粒 2 pcDNA3.1(+)-CD40L 较质粒 1 pcDNA3.1(+)片段大，双酶切粒质 2 示该质粒中存在 CD40L DNA 片段（如图 2B）。对重组质粒进行 DNA 测序，结果，在载体 pcDNA3.1(+)序列的两酶切位点 *Nhe* Ⅰ与 *Kpn* Ⅰ之间插入的 DNA 序列与 BC071754 CD40L 序列中 40～915 碱基序列完全相符。



A：菌液 CD40L DNA　　M：标准（DL 2000）；1－9：9 株氨苄抗性菌液 CD40L 的 PCR 测试结果

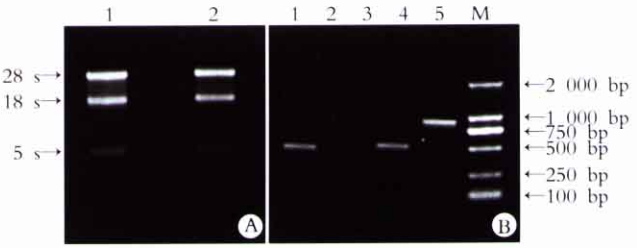
B：质粒 DNA　　M：标准；1：pcDNA3.1(+)；2：pcDNA3.1(+)-CD40L；3：pcDNA3.1(+)-CD40L 双酶切

图 2　菌液 PCR 与 pcDNA3.1-CD40L 表达载体质粒

2.5　转染阳性细胞的检测结果

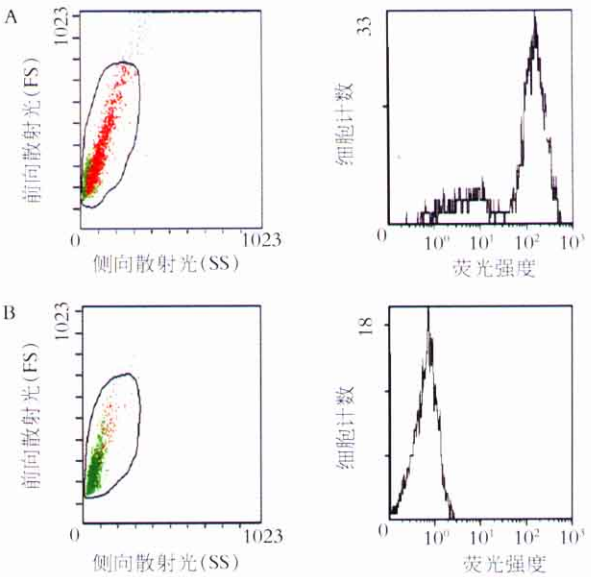
2.5.1　h446 转染细胞 CD40L mRNA 表达的 PCR 检测　　脂质体 Lipofectamine™2000 分别介导 pcDNA3.1(+)与 pcDNA3.1(+)-CD40L 转染肺小细胞肺癌细胞株 h446，转染后 48 h，PR-PCR 法分别对两种载体转染的 h446 细胞进行 CD40L mRNA 转录表达的检测，结果，重组 pcDNA3.1(+)-CD40L 转染细胞有 CD40L mRNA 的表达；空载 pcDNA3.1(+)转染细胞无 CD40L mRNA 的表达（图 3）。

2.5.2　h446 转染细胞 CD40L 表达的流式细胞仪检测　　PE 标记 CD40L 单抗与转染细胞 CD40L 结合后染色，流式细胞仪检测 PE 标记 CD40L 单抗的结合细胞的百分率。设双复管，空载转染细胞结合率分别为 3.7%、2.8%（图 4A），考虑为非特异结合，重组载体转染细胞结合率分别为 72.42%、63.69%（图 4B）。说明重组 pcDNA3.1(+)-CD40L 表达载体通过脂质体介导顺利转染于 h446 细胞，并且该载体在 h446 细胞能正常执行功能，使 CD40L 得到有效地转录、翻译与表达。



A：两种转染细胞 RNA；1：重组载体转染细胞总 RNA；2：空载转染细胞总 RNA　B：两种转染细胞 CD40L PCR 检测；1：重组载体转染细胞 CD40L；2：重组载体转染细胞内参；3：空载体转染细胞；4：空载体转染细胞内参；M：标准（DL2000）

图 3　转染细胞总 RNA 及 CD40L 表达 PCR 测试



A：空载 pcDNA3.1(+)转染 h446 抗 CD40L 结合率；B：重组 pcDNA3.1(+)-CD40L 转染 h446 抗 CD40L 结合的率　红色为 PE 标记抗 CD40L 与 CD40L 的结合；绿色为未结合的细胞

图 4　h446 转染细胞 CD40L 表达的流式细胞仪检测

3　讨论

CD40L 主要表达于激活的 T 淋巴细胞，当其分别与 B 淋巴或 DC 表面的 CD40 结合时，既可诱导 B 淋巴细胞增殖，促进其同类型转换；又可提高抗原呈递细胞，抗原处理与呈递能力，并协助 $CD8^+$ T 细胞向记忆细胞转化；同时还促使配体表达 T 细胞的增殖。增强了体液与细胞免疫效应。近年研究表明，在一定状态下，CD40L 可以抑制肿瘤细胞增殖，增加抗肿瘤制剂敏感性，更重要的是具有刺激、增强抗肿瘤免疫反应的

作用。故本研究建立人 CD40L 表达体系。

CD40 表达体系的建立涉及多个环节，其中 T 细胞总 RNA 的提取是 CD40L 扩增的基础，对于原代培养 T 细胞，按常规方法用 10×10^5 个细胞，加入 1 ml Tripur其总 RNA 的提取量极少，很难满足 RT-PCR 的正常扩增，分析原因：①原代培养的悬浮生长的细胞悬液中存在一定量活性差，甚至死亡细胞，所以能表达 CD40L 的活细胞量远少此数。②T 细胞虽为悬浮生长，但更趋向于不贴壁下沉样生长，细胞活性越好，越集中于瓶底，尽管收集细胞时，反复吹打使其浮起再收集，但并不彻底。本实验提总 RNA 时，采取将欲提 RNA 的培养瓶中的细胞悬液全部收集于离心管，收集沉淀。先用 1 ml Tripure 裂解液将原培养瓶洗涤 1 遍，再将此液移入细胞沉淀的管中进行裂解。如此，总 RNA 的提取量明显增加。保证了 RT-PCR 的顺利进行。

本研究获得 CD40L 基因对其克隆后，在经 DNA 测序证实该序列为人的 CD40L 基因的基础上，将 CD40L 再重组于 pcDNA3.1(+)的真核表达载体中，经转染使其在肺小细胞肺癌细胞株 h446 中表达，经 RP-PCR 及流式细胞鉴定证实，转染的 H466 有 CD40L 的表达，其瞬时表达率 50% ~70%，简言之，被转染的 H466 细胞的部分胞膜上存在 CD40L 糖蛋白。说明本表达系统能够在真核细胞中执行表达 CD40L 的功能。当然，对于不同状态、不同类型的细胞表达程度不同。

近年来，以活化 CD40 信号为途径的抗肿瘤疫苗种类繁多，主要是以鼠 CD40L 重组的各类抗肿瘤疫苗，归结为：①腺病毒-直接携带 CD40L 基因构成的病毒疫苗。②CD40L 基因转导肿瘤细胞。③该基因转导 DC 细胞的细胞疫苗。其在动物肿瘤模型的研究中，通过介导、增强宿主的抗肿瘤免疫能力，使诸多肿瘤得到有效的控制[6,7]。因此，建立人 CD40L 表达系统，意在为肿瘤免疫治疗临床研究提供一个平台。本实验建立的 CD40L 表达体系在小细胞肺癌细胞株中得到有效瞬时表达，但在原代培养的细胞中表达如何，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Quezada S A, Jarvinen L Z, Lind E F, *et al*. CD40/CD154 Interactions at the interface of tolerance and immunity [J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 307 - 328.

[2] Schattner E J, Mascarenhas J, Bishop J, *et al*. CD4$^+$ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells [J]. Blood, 1996, 88(4): 1375 - 1382.

[3] Hill S C, Youde S J, Man S, *et al*. Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis [J]. J Immunol, 2005, 174(1): 41 - 50

[4] Medema J P, Schuurhuis D H, Rea D, *et al*. Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells [J]. J Exp Med, 2001, 194(5): 657 - 667.

[5] 李钊伦，田普训，薛武军，等. sCD40LIg 重组腺病毒载体的构建鉴定和体外表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(21)：2107 - 2110.

[6] Zhang L, Tang Y, Akbulut H, *et al*. An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen/CD40-ligand fusion protein to dendritic cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15101 - 15106.

[7] Belousova N, Korokhov N, Krendelshchikova V, *et al*. Genetically targeted adenovirus vector directed to CD40-expressing cells [J]. J Virol, 2003, 77(21): 11367 - 11377.

（编辑 王 红）

（上接 962 页）

讨论

沙利度胺，昔名反应停，20 世纪 50 年代曾用于改善妊娠早期的恶心、呕吐反应。60 年代因导致胎儿畸形而被禁用。随着血管生成在肿瘤发病中的研究，发现它具有抗血管生成活性，故在复发和难治多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)的治疗取得一定进展。其毒副作用明显少于传统的化疗药物。主要副作用分为 4 级，1 和 2 级包括便秘、嗜睡等，通常为轻度。3 级以上的非血液学毒性包括皮疹、周围神经病。潜在的不良反应为深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)，与化疗及激素类药物联用时增加其发生率。Gachon 等[1]报道了沙利度胺引起 VTE 形成。本例为单用沙利度胺治疗 MDS 12 周后出现广泛左下肢深静脉血栓形成。患者用药前无血栓形成的高危因素如高凝血症、血管内皮损害及血流缓慢等，且停药及短期抗凝治疗后后壁消失，故考虑为沙利度胺应用后的副作用。沙利度胺引起 VTE 的具体机制尚不清楚，是否与沙利度胺联合化疗药物时打破了凝血与抗凝平衡，而导致血栓形成有关，有待进一步研究[2]。

关键词：沙利度胺；MDS；深静脉血栓

中图法分类号：R543.606 文献标识码：B

参考文献：

[1] Gachon J, Grob J J, Richard M A. Thrombotic accidents induced by thalidomide: two cases[J]. Rev Med Interne, 2002, 23(8): 724 - 727.

[2] Scarpace S L, Hahn T, Roy H, *et al*. Arterial thrombosis in four patients treated with thalidomide [J]. Leuk Lymphoma, 2005, 46(2): 239 - 242.

（编辑 陈聪连）