文章编号:1000-5404(2008)11-1033-04

论著

小鼠 IDO 真核表达载体的构建及其在未成熟树突状细胞中的表达

安晓静[1],钱桂生[1],王长征[1],夏俊波[1],党 涛[2],廖 伟[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]全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 构建小鼠 pEGFP-N1-IDO 真核表达载体并观察其在未成熟树突状细胞中的表达。**方法** 利用 RT-PCR 方法扩增小鼠 IDO 基因全长,利用 DNA 重组技术将其定向插入到真核表达载体 pEGFP-N1。经酶切和测序鉴定后,用 DOTAP 脂质体转染法转染未成熟树突状细胞。通过 G418 筛选,用倒置荧光显微镜观察转染的未成熟树突状细胞绿色荧光蛋白的表达,用 RT-PCR、Western blot 检测 IDO 的表达。**结果** 小鼠全长 IDO 基因序列正确插入 pEGFP-N1 载体,与 GenBank 中报道的序列一致,成功构建了 pEGFP-N1-IDO 真核表达载体,并转染未成熟树突状细胞,成功地表达目的基因。**结论** 真核表达载体成功构建和转染未成熟树突状细胞,并证明能有效表达于未成熟树突状细胞中。

关键词:吲哚胺 2,3 – 双加氧酶;绿色荧光蛋白;真核表达载体;未成熟树突状细胞
中图法分类号:R338.12;R394-33;R394.2 **文献标识码:**A

Construction of eukaryotic expression vector containing mouse IDO gene and its expression in immature DCs

AN Xiao-jing[1], QIAN Gui-sheng[1], WANG Chang-zheng[1], XIA Jun-bo[1], DANG Tao[2], LIAO Wei[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct a eukaryotic expression vector containing mouse IDO gene fused with enhanced green fluorescent protein (pEGFP-N1) and its expression in immature DCs. Methods The full-length IDO gene was obtained from mouse by RT-PCR and was inserted into eukaryotic expression vector pEGFP-N1. After identified by restriction digestion and sequencing, the recombinant pEGFP-N1-IDO was transfected into immature DCs by DOTAP liposome. After screened by G418, the green fluorescence protein expression in immature DCs was observed under inverted fluorescence microscope and the mRNA and protein expressions of IDO were respectively detected by RT-PCR and Western blot. Results The full-length sequence of IDO was successfully inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1 and confirmed by restriction digestion and sequencing. The recombinant was successfully transfected into immature DCs and the IDO gene was expressed. Conclusion The eukaryotic expression vector pEGFP-N1-IDO was constructed successfully and IDO gene could be expressed efficiently in immature transfected DCs.

Key words: indoleamine 2,3-dioxygenase; green fluorescent protein; eukaryotic expression vector; immature DC

吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine2,3-dioxygenase,IDO)是一种含亚铁血红素的酶,广泛存在于哺乳动物细胞质的血红素蛋白中,作为色氨酸代谢过程的限速酶,它能催化分解色氨酸使其沿着犬尿氨酸途径降解成一系列的代谢产物[1],其表达主要分布于胸腺髓质和次级淋巴器官的 T 细胞区,并散见于一些免疫耐受或免疫特赦(immune privilege site)组织中,如胸腺、胃肠道黏膜、附睾、胎盘及眼前房等。健康人 IDO 的表达水平低,但在感染、炎症和细胞因子的作用下可显著增加表达,而且脂多糖(lipo poly saccharide,LPS)、细胞因子如 IFN-γ 等均可诱导其表达[2]。

树突状细胞(dendritic cells,DCs)是体内最重要的抗原提呈细胞,其免疫学功能具有两重性。在一定条件下,能处理提呈抗原,表达共刺激分子,分泌细胞因子,活化 T 淋巴细胞,产生免疫应答,但在另一些条件下却可使 T 细胞产生耐受,即介导免疫耐受。DCs 广泛分布于机体所有组织和器官,根据 DCs 的发育状

基金项目:国家自然科学基金(30500231)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500231)
作者简介:安晓静(1976 –),女,山东省泰安市人,博士研究生,医师,主要从事哮喘发病机制方面的研究。电话:(023)62009928,E-mail:anxiaojing@yahoo.cn
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
廖 伟,电话:(023)68774202
收稿日期:2008-02-26 修回日期:2008-03-12

态又可将其分为未成熟 DCs(immature dendritic cells, imDCs)和成熟 DCs。通过对小鼠和 DCs 表面表达 IDO 的大量研究表明,DCs 表达 IDO 可能参与了机体的免疫耐受,在树突状细胞系中,IDO 介导的免疫活性抑制可见于成熟的 DCs 和 $CD123^+$ 未成熟 DCs 细胞,有 IDO 表达潜能的未成熟 DCs 在脂多糖(LPS)、细胞因子如 IFN-γ 刺激下可表达 IDO[3,4]。研究表明,胎儿免遭母体 T 细胞攻击主要是由于胎盘细胞绒毛中 IFN-γ 作用后的 DCs 能够合成 IDO,后者通过降解母胎界面的色氨酸从而抑制 T 细胞的增殖[5,6]。因此,DCs 可能通过 IDO 作用的色氨酸代谢途径来调节 T 细胞的作用,参与免疫抑制。

本实验将小鼠 IDO 基因的全长 cDNA 克隆到 pEGFP-N1 质粒,从而获得了一个能在真核细胞中组成性表达小鼠 IDO 蛋白的 pEGFP-N1-IDO 表达载体。将该载体转染未成熟树突状细胞并筛选高表达小鼠 IDO 的细胞,为开展对 IDO 的研究,进一步了解其功能及在哮喘发病机制中的作用,从而建立了一个 IDO 基因高表达的未成熟树突状细胞模型,为以后的工作打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 DH5α 由第三军医大学全军免疫学研究所刘东博士惠赠,真核表达载体 pEGFP-N1 购自 ClonTech,RT 试剂盒购自 Fermentas 公司;PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司;RNAiso 试剂,*Taq* DNA 多聚酶,T_4 DNA 连接酶,限制性内切酶(*Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ)等工具酶,pMD-19T 载体试剂盒,凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司;卡那霉素为上海华舜公司产品;RPMI1640 培养基及胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 产品,重组小鼠 GM-CSF 为 Peprotech 公司,DL2000 DNA Ladder 购自升博公司。脂质体 DOTAP 购自 Roche 公司;G418 购自 Amresco 公司;FITC-MHC Ⅱ mAb,FITC-CD80 mAb,FITC-CD86 mAb,与 PE-CD11cmAb 购自 eBioscience 公司;IDO 的抗体购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京鼎国公司。

1.2 小鼠胎盘总 RNA 抽提及 cDNA 合成

取孕 15 d BALB/c 孕鼠胎盘以 RNAiso 试剂提取总 RNA,按 Fermentas 公司 RT 试剂盒建议步骤直接进行逆转录反应:70 ℃ 5 min→37 ℃ 5 min→42 ℃ 60 min→70 ℃ 10 min→冰上,合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增。

1.3 技术路线与方法

1.3.1 引物设计 上游引物:5′-AGATCTCGCCACCATGGCACTCAGTAAAA TATCT-3′;下游引物:5′-GGTACCGGCCAACTCAGAAGAGCTTT C-3′。其中分别在上游和下游引物的 5′端加上了 *Bgl* Ⅱ和 *Kpn* Ⅰ 酶切位点和保护碱基,并且在起始密码前添加了 Kozak 序列(CCACC),引物由 TaKaRa 公司合成。

1.3.2 小鼠 IDO cDNA 的扩增 PCR 50 μl 反应体系中加入 cDNA 模板 1 μl,10 ×PCR 缓冲 5 μl,$MgCl_2$ 3 μl,dNTP (2.5 mmol/L) 1 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl,KOD plus Taq (2.5 U/ μl) 1 μl,H_2O 补足至 50 μl,反应条件为:94 ℃预变性 52 min;98 ℃ 10 s,54 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 40 s(35 个循环);72 ℃继续延伸 10 min。电泳初步鉴定 PCR 产物。

1.3.3 小鼠 pEGFP-N1-IDO 真核表达载体的构建 将上述 PCR 产物进行加 A 反应,1% 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化,按 pMD19-T simple vector 说明书进行连接反应,TA 连接产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态培养,挑取阳性克隆扩增后提取质粒进行酶切和 DNA 测序鉴定(由 TaKaRa 公司测定)。pMD19-T-IDO simple vector 用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ 进行双酶切检测将小片段(约 1 243 bp)进行胶回收。同时对 pEGFP-N1 质粒用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ 双酶切后胶回收大片段(约 4 700 bp)。将两个回收产物 IDO 和 pEGFP-N1 质粒在 16 ℃条件下,T_4 连接酶连接过夜,转化 DH5α 大肠杆菌感受态,Kana 抗性筛选出阳性克隆后,阳性菌落扩增后,以超纯质粒抽提试剂盒(Promega 公司)提取得 pEGFP-N1-IDO 重组质粒,并进行重组质粒鉴定,用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ 进行双酶切鉴定成功后,将 pEGFP-N1-IDO 重组质粒送至 TaKaRa 公司测序。

1.3.4 未成熟树突状细胞分离培养 小鼠骨髓来源未成熟树突状细胞的分离、培养参照文献[7-9]进行:BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死,75% 乙醇浸泡 5 min,无菌条件下取双侧股骨、胫骨和肱骨,剥除附着的肌肉,剪开骨的两端,注射器抽取 PBS 液冲洗骨髓腔直至变白,骨髓悬液经 400 目滤网过滤去除组织碎片,用红细胞裂解液去除红细胞后,细胞计数,用 RPMI 1640 全培养液配成 2×10^6/ml 的细胞悬液,加入 rmGM-CSF 的剂量为 50 U/ml,于 37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度下培养。

1.3.5 未成熟树突状细胞表面分子的检测 未成熟树突状细胞用 100 μl 0.1 mol/L PBS 重悬新鲜制备的未成熟树突状细胞 1×10^6/ml,然后每管细胞加入 PE-CD11cMHC Ⅱ mAb 2 μg、再分别加入 FITC-CD80 2 μg、FITC-CD86 2 μg 及 FITC-MHC Ⅱ 2 μg 进行荧光标记、设空白对照管,4℃ 放置 30 min,然后加入 PBS,2 000 r/min 洗涤 3 次,重悬于 0.4 ml PBS 中,上机分析,检测 CD11c、MHC Ⅱ、CD80、CD86。

1.3.6 转染未成熟树突状细胞后荧光显微镜观察 将纯化的 pEGFP-N1-IDO 重组质粒取 5 μg 加入 HBS 缓冲液中,使终体积至 50 μl。取 30 μl DOTAP 脂质体加入 HBS 70 μl,室温放置 15 min。将质粒 HBS 混合液加入 100 μl 脂质体 HBS 混合液中混匀,加入 2 ml 无血清的 PRMI1640 培养基中,再加入未成熟树突状细胞生长 70 % 融合的 25 ml 培养瓶中,37 ℃、5% CO_2 培养 8 h,更换有含 10 % 小牛血清的培养基继续培养 24 h 后,换用含 200 μg/ml 的 G418 的选择性培养基,继续培养 48 h 以检测转染基因的表达,同时用未转染质粒和转染空白质粒转染未成熟树突状细胞对照。转染小鼠未成熟树突状细胞 36 h 以后,直接在荧光显微镜下观察荧光的表达。

1.3.7 RT-PCR 检测 IDO 转录水平的表达 收集 pEGFP-N1 空白质粒转染细胞以及 pEGFP-N1-IDO 转染细胞,以 RNAiso 试剂提取总 RNA,按 Fermentas 公司 RT 试剂盒建议步骤直接进行逆转录反应,合成的 cDNA 即用于 PCR 扩增。PCR 50 μl

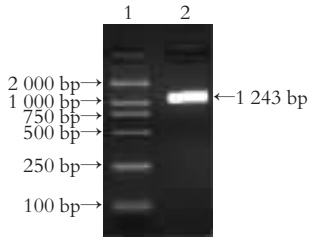
反应体系中加入 cDNA 模板 1 μl，10 × PCR 缓冲 5 μl，$MgCl_2$ 3 μl，dNTP（2.5 mmol/L）1 μl，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μl，KOD plus Taq（2.5 U/μl）1 μl，H_2O 补足至 50 μl，反应条件为：94 ℃预变性 52min；98 ℃ 10 s，54 ℃退火 30 s，68 ℃延伸 40 s（35 个循环）；72 ℃继续延伸 10 min，以 β-actin（480 bp）为内参进行 PCR 反应。取等体积 RT-PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.8　Western blot 检测 IDO 蛋白表达　　收集转染的未成熟树突状细胞，裂解后取 20 μg 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，与 1∶200 稀释后的一抗 4 ℃孵育过夜，PBST 洗膜 3 次，每次 15 min，然后与 1∶5 000 稀释后的 HRP 标记的 IgG 二抗 37 ℃孵育 1 h，PBST 洗膜 3 次，每次 15 min，DAB 显色，检测目的蛋白。

2　结果

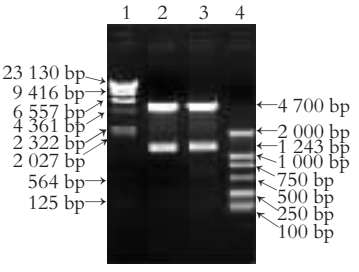
2.1　IDO 目的基因的扩增及载体构建

提取小鼠胎盘组织的总 RNA，经 RT-PCR 扩增出约 1 243 bp的目的片段（图 1），经 1% 琼脂糖凝胶电泳，与预期结果一致；pEGFP-N1-IDO 重组质粒的酶切鉴定结果（图 2）经 *Bgl* Ⅱ/*Kpn* Ⅰ 双酶切鉴定切出目的基因片段，电泳结果与 IDO 基因大小相符，测序结果与 pEGFP-N1 载体多克隆位点和 IDO 序列进行同源比较后证明融合区域的读码框正确，并有正确的方向，表明重组质粒 pEGFP-N1-IDO 克隆正确。



1 标准（DL 2000）；2 ：目的条带 IDO

图 1　IDO 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图



1 标准（λ-*Hind*Ⅲ）；2，3 ：pEGFP-N1-IDO 重组质粒双酶切后结果；4 标准（DL 2000）

图 2　pEGFP-N1-IDO 重组质粒 *Bgl*Ⅱ/*Kpn* Ⅰ 的双酶切鉴定

2.2　未成熟树突状细胞表面分子的检测

流式细胞仪流检测小鼠骨髓来源未成熟树突状细胞结果显示为散点图，CD80 与 CD11c 双阳性表达率为 8.81%，CD86 与 CD11c 双阳性表达率为 9.92%，MHCII 与 CD11c 双阳性表达率为 8.19%，CD11c 高表达（65% ~ 70%），MHC-II 类分子、CD86 和 CD80 均呈低水平表达，与未成熟树突状细胞表面标志物相符。

2.3　转染细胞的光镜和荧光显微镜观察

转染后光镜下可观察到较小较少半黏附细胞集落，细胞表面无典型的树突样突起，符合未成熟树突状细胞形态（图 3）。转染后在荧光显微镜下观察，转染重组质粒 pEGFP-N1-IDO 及空白质粒 pEGFP-N1 的未成熟树突状细胞均可见绿色荧光，而未转染未成熟树突状细胞未见绿色荧光，表明 DOTAP 脂质体转染成功（图 4）。

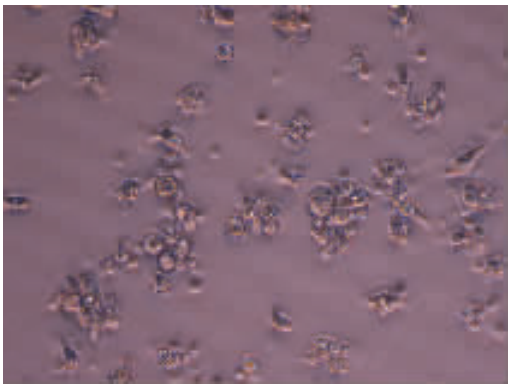


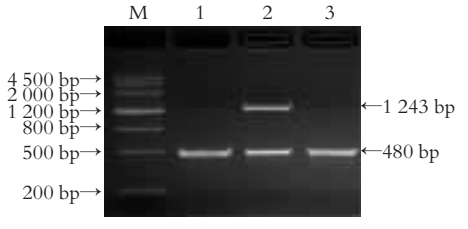
图 3　转染后未成熟树突状细胞光镜形态观察　（LM × 200）



图 4　未成熟树突状细胞转染重组质粒 pEGFP-N1-IDO 荧光显微镜下形态观察　（荧光显微镜 × 400）

2.4　转染的未成熟树突状细胞中 IDO mRNA 的表达

结果表明从转染 pEGFP-N1-IDO 重组质粒的未成熟树突状细胞中所提取的 RNA 能扩增出代表 IDO 基因（1 243 bp）及内参 β-actin（480 bp）的条带，而从转染 pEGFP-N1 空质粒的未成熟树突状细胞和未转染的未成熟树突状细胞中所提取的 RNA 仅能扩增出代表内参 β-actin（480 bp）的条带，说明 IDO 基因在转染 pEGFP-N1-IDO 重组质粒的未成熟树突状细胞中 mRNA 水平上得到了表达（图 5）。

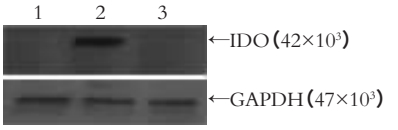


M 标准（λ-*Hind*Ⅲ）；1 ：空白质粒转染组未成熟树突状细胞；2 ：重组质粒转染组未成熟树突状细胞 IDO 基因 mRNA 表达；3 ：未转染组未成熟树突状细胞

图 5　各组 imDCs IDO 基因 mRNA 表达

2.5 转染的未成熟树突状细胞中 IDO 蛋白的表达

Western blot 结果表明，各组在 47×10^3 处皆显现明显的 GAPDH 内参照蛋白印迹且无明显差别，转染 pEGFP-N1-IDO 重组质粒的未成熟树突状细胞中检测出 42×10^3 IDO 目的蛋白的表达条带，而转染空质粒 pEGFP-N1 的未成熟树突状细胞和未转染组未成熟树突状细胞裂解物未出现目的条带（图6），提示转染 pEGFP-N1-IDO 重组质粒后，未成熟树突状细胞能表达 IDO 的蛋白。



1：空白质粒转染组未成熟树突状细胞；2：重组质粒转染组未成熟树突状细胞；3：未转染组未成熟树突状细胞

图6 Western blot 鉴定 pEGFP-N1-IDO 重组质粒 IDO 蛋白的表达

3 讨论

IDO 是一种含亚铁血红素的酶，是肝脏以外唯一可催化色氨酸分子中吲哚环氧化裂解，从而沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶。IDO 活性组成性地高表达于附睾和胎盘等重要脏器，低水平表达于脾脏、淋巴结和胸腺等淋巴器官，表明 IDO 活性并不只是一种诱导型的宿主防御机制，在免疫系统的反应调控中同样发挥着重要作用。色氨酸是细胞维持活化和增殖所必需的氨基酸，同时也是构成蛋白质不可缺少的重要成分，色氨酸的缺乏可使细胞功能受限，而色氨酸的代谢是受 IDO 调控的。IDO 可能通过以下两条途径发挥其抑制细胞增殖效应：启动产生色氨酸的3种代谢产物（L-犬尿酸、吡啶甲酸和喹啉酸）的生化反应级联效应。耗竭细胞外微环境中的色氨酸，以增强3种代谢产物的抑制细胞增殖的潜能。IDO 在肿瘤逃逸、母胎耐受、慢性感染、自身免疫性疾病和移植耐受中发挥重要的代谢性免疫调节作用[10]。

过敏性哮喘（哮喘）是一种以气道高反应性为特征的变态反应性炎症性疾病，初始型（naive）$CD4^+$ T 细胞激活是其发病的始动因素，而免疫耐受缺陷是哮喘发生的始动因素。未成熟树突状细胞在气道对过敏原的免疫耐受中占重要地位。IDO 可形成局部低色氨酸环境，抑制活化的 $CD4^+$ T 细胞增殖，诱导免疫耐受。研究说明表达 IDO 的 DCs 能通过以下机制诱导外周免疫耐受[11]：IDO 通过分解代谢局部微环境中的色氨酸而抑制激活 T 细胞分化、增殖，导致 T 细胞无能（Treg 样反应）。通过 IDO 催化色氨酸分解代谢的产物，诱导 T 细胞凋亡，从而清除活化的抗原特异性 T 细胞克隆。

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）质粒经蓝光或紫外激发可发射绿色荧光，可方便地用于荧光显微镜下观察，特别适合于标记活细胞，检测细胞的基因表达和蛋白定位[11]。EGFP 是一种优化突变型 GFP，其产生的荧光比野生型 GFP 强35倍，大大增强了报告分子的灵敏度。

本研究中我们通过 RT-PCR 法从小鼠胎盘中扩增出 IDO 全长基因，通过 TA 克隆法将其亚克隆至 T 载体中，再与 pEGFP-N1 真核表达载体相连接成 pEGFP-N1-IDO，这样比 PCR 产物直接酶切更准确，因为 PCR 产物酶切成功与否不能判断，实践表明应用 T 载体进行亚克隆比直接 PCR 产物进行酶切克隆更方便，我们的实验也证明了这一点。为检测 IDO 的表达功能，我们用 DOTAP 脂质体转染法转染未成熟树突状细胞，通过 G418 筛选，用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白，以 RT-PCR 和 Western blot 检测表明，转染后的未成熟树突状细胞能在 mRNA 和蛋白水平表达 IDO，为进一步研究 IDO 基因修饰未成熟树突状细胞诱导哮喘免疫耐受的机制及哮喘的特异性免疫治疗奠定了基础。

参考文献：

[1] Austin C J, Mizdrak J, Matin A, *et al*. Optimised expression and purification of recombinant human indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. Protein Expr Purif, 2004, 37(2): 392-398.

[2] Jung I D, Lee C M, Jeong Y I, *et al*. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells[J]. FEBS Lett, 2007, 581(7): 1449-1456.

[3] Munn D H, Sharma M D, Lee J R, *et al*. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. Science, 2002, 297(5588): 1867-1870.

[4] Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, *et al*. IDO expands human $CD4^+$ CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(11): 3054-3062.

[5] von-Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion[J]. Immunol Lett, 2008, 115(1): 21-32.

[6] Jones B J, Brooke G, Atkinson K, *et al*. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells [J]. Placenta, 2007, 28(11-12): 1174-1181.

[7] 冯剑锷，孙宗全，史嘉玮，等. 低剂量粒巨噬细胞集落刺激因子培养小鼠骨髓源性未成熟树突状细胞的实验研究[J]. 中华实验外科杂志，2006，23(2)：221-223.

[8] 张弘超，梁 健. 不同方法对未成熟树突状细胞体外诱生的研究[J]. 中国现代医学杂志，2007，17(22)：2728-2731，2735.

[9] 熊 菲，程 茜，刘明方，等. 树突状细胞分化发育过程中双歧杆菌的作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(3)：338-342.

[10] Mellor A L, Munn D H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(10): 762-774.

[11] Bauer T M, Jiga L P, Chuang J J, *et al*. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Transpl Int, 2005, 18(1): 95-100.

（编辑 王小寒）