文章编号:1000-5404(2010)09-0887-04

论著

人源靶向补体抑制物 CR2-CD59 在中国仓鼠卵巢细胞中的稳定表达

郭 彦[1],寇志华[1],孙世惠[1],张传福[2],赵光宇[1],于 虹[1],宋宏彬[2],乔 飞[3],陈万荣[1],周育森[1] (100071 北京,军事医学科学院:微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室[1],疾病控制与预防研究所[2];SC29425 美国 查里斯顿,美国南卡医科大学微生物学和免疫学系[3])

[摘要] **目的** 构建人源靶向补体抑制物 CR2-CD59,并筛选中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell,CHO)高效表达细胞株。**方法** 运用 FuGENE 6 转染试剂,将含有人 CR2-CD59 的重组 PEE14.1 质粒转入 CHO 细胞,蛋氨酸亚氨基代砜(MSX)筛选出阳性克隆,并利用无血清培养基对 CHO 细胞表达株进行培养获得重组蛋白,以 ELISA、SDS-PAGE 和 Western blot 对表达蛋白进行鉴定。**结果** 成功构建 PEE14.1-CR2-CD59 重组质粒,获得 CHO 细胞稳定表达株。SDS-PAGE 结果表明,重组蛋白 CR2-CD59 的相对分子质量同预期结果一致。ELISA 和 Western blot 鉴定重组蛋白 CR2-CD59 可与 CR2、CD59 多克隆抗体特异性结合。且与含血清培养基相比,无血清培养基能明显提高 CHO 细胞的蛋白表达量($P<0.05$)。**结论** 在 CHO 细胞中成功表达人源靶向补体抑制物 CR2-CD59。

[关键词] 中国仓鼠卵巢细胞;CR2-CD59;补体
[中图法分类号] R322.65; R392.11; R392.13 [文献标志码] A

Stable expression of targeting complement inhibitor CR2-CD59 in Chinese hamster ovary cells

Guo Yan[1], Kou Zhihua[1], Sun Shihui[1], Zhang Chuanfu[2], Zhao Guangyu[1], Yu Hong[1], Song Hongbin[2], Qiao Fei[3], Chen Wanrong[1], Zhou Yusen[1] ([1]State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, [2]Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071, China; [3]Department of Microbiology and Immunology, Medical University of South Carolina, Charleston, SC29425, USA)

[**Abstract**] **Objective** To obtain Chinese hamster ovary (CHO) cell lines that stably express a targeting complement inhibitor CR2-CD59. **Methods** The recombinant plasmid PEE14.1-CR2-CD59 was constructed by cloning the DNA fragment CR2-CD59 into plasmid PEE14.1, and the obtained plasmid was transfected into CHO cells by FuGENE 6. The clones with stable high expression of target fragment were selected by methionine sulfoximine (MSX), the expression of CR2-CD59 was analyzed by ELISA, SDS-PAGE and Western blotting analysis. **Results** Several stable expression clones were obtained, and CR2-CD59 was highly expressed in the secret form in CHO cells. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the recombined protein CR2-CD59 was consistent with the predicted one. ELISA and Western blotting results revealed that the CR2-CD59 could react with both anti-human CR2 and anti-human CD59 polyclonal antibodies. Compared with serum-containing medium, the protein was highly expressed in serum-free medium ($P<0.05$). **Conclusion** Targeting complement inhibitor CR2-CD59 is successfully expressed in CHO cells.

[**Key words**] Chinese hamster ovary cell; CR2-CD59; complement

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z144) and the National Natural Science Foundation of China (30972616). Corresponding author: Zhou Yusen, Tel: 86-10-63858045, E-mail: yszhou@nic.bmi.ac.cn

补体是机体免疫防御机制的重要组成部分,但在一些因素的刺激下,补体系统的过度激活又可以导致自身免疫疾病和炎症反应。系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎(RA)等自身免疫性疾病都与补体的过度激活有关[1,2]。临床上已开始应用补体抑制剂治疗多种自身免疫疾病,因此如何将补体抑制剂靶向到炎症部位,减少长期使用非靶向补体抑制剂所带来的潜在的全身补体抑制反应,是应用补体抑制剂治疗自身免疫疾病的趋势。补体 C3 是补体激活途径的共同组

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2007AA02Z144);国家自然科学基金(30972616)
[通信作者] 周育森,电话:(010)63858045,E-mail:yszhou@nic.bmi.ac.cn

分,CR2 可结合补体活化后产生的 iC3b、C3dg 和 C3d 等沉积片段,并且结合产物长时间存在于补体活化部[3,4]。CD59 是一种重要的补体调节蛋白,主要功能是抑制 C9 与 C5 ~ C8 结合,影响攻膜复合体(membrane attack complex,MAC)的形成,保护自身正常的组织细胞免受补体介导的溶解损伤[5]。本实验利用 PEE14.1 载体构建人源靶向补体抑制物 CR2-CD59,并转染中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell,CHO),建立能适应无血清培养并稳定表达该基因的细胞系。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞及主要试剂

PEE14.1 载体由本室保存,PMB-CR2-CD59 质粒由军事医学科学院疾病控制与预防研究所宋宏彬教授惠赠,中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 购自上海细胞生物学研究所细胞库。选择性培养基 DMEM(不含谷氨酰胺)购自 Gibco 公司,蛋氨酸亚氨基代砜(methionine sulfoxmine, MSX)购自 Sigma 公司,CHO 专用无血清培养基购自德国 B·AG 公司,绵羊抗 CR2(CD21)多克隆抗体购自 R&D 公司,兔抗人 CD59 多克隆抗体及 HRP(辣根过氧化物酶)标记的兔抗绵羊 IgG 购自 Santa Cruz 公司,转染试剂 FuGENE 6 购自 Roche 公司,胶片显影试剂 SuperSignala West Dura Extended Duration Substrate 购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 的构建

1.2.1.1 目的基因的获得及纯化 根据 PMB-CR2-CD59 质粒序列设计并合成 PCR 引物,P1:5′-TCCCCCGGGGCCGCCACCATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCT-3′, P2: 5′-CGTGATCACTATCAATTTTCAAGCTGTTCGTTAAAG-3′,以质粒 PMB-CR2-CD59 为模板与上述引物 PCR 扩增得目的基因 CR2-CD59。反应条件为:95 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环,72 ℃延伸 7 min。再与 PMD-18T 载体相连,转化 BL21 感受态细胞。

1.2.1.2 重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 的构建及鉴定 CR2-CD59 质粒和 PEE14.1 质粒经 *Sma*Ⅰ和 *Eco*RⅠ酶切,纯化回收产物,T_4DNA 连接酶 16 ℃连接过夜,转化 BL21 感受态细胞,经 PCR、酶切鉴定,获得重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59,送六合通公司测序验证。

1.2.2 重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 的提取 按照博迈德公司去内毒素大量质粒提取试剂盒方法进行,并经测定浓度,调整至浓度为 1.0 μg/μl。

1.2.3 建立稳定转染 CR2-CD59 的 CHO-K1 细胞系

1.2.3.1 MSX 效应的测定 将 CHO-K1 细胞用胰酶消化,制成细胞悬液后等量接种入 24 孔细胞培养板中,按梯度浓度向每孔中加入不同浓度的 MSX(10、15、25、50…… 500 μmol/L),计算 2 周内能全部杀死 CHO-K1 细胞的最低浓度为 50 μmol/L。

1.2.3.2 CR2-CD59 转染 CHO-K1 细胞 CHO 细胞转染前 24 h,将生长良好的 CHO-K1 细胞消化、计数,铺板 1×10^6/孔,待细胞生长至 70% 时,按照 FuGENE 6 转染试剂盒操作说明进行转染。培养基改用选择性培养基(不含谷氨酰胺)置 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度下培养。设置未转染质粒的正常 CHO 细胞作对照组。

1.2.3.3 阳性细胞株的筛选 转染 24 h 后,换选择性 DMEM 培养基,并加入 MSX 至终浓度为 50 μmol/L,继续培养 48 h 后,用胰酶消化细胞,制成 2×10^4 的细胞悬液接种到 96 孔细胞培养板中,在含有 MSX(50 μmol/L)的选择性 DMEM 培养基中加压筛选 2 周,观察至出现单克隆。继续扩增筛选的单克隆细胞,使其稳定传代。获得具有抗 MSX 抗性的阳性细胞克隆,即为稳定表达 CR2-CD59 的 CHO 细胞系。

1.2.4 CHO-CR2-CD59 重组细胞的蛋白质检测

1.2.4.1 细胞上清的浓缩 培养 3 株细胞,先用有血清培养基培养 3 d,收集细胞上清,再用无血清培养基培养 3 d,收集细胞上清。

1.2.4.2 重组蛋白 CR2-CD59 的 ELISA 检测 用兔抗人 CD59 多克隆抗体包被(终浓度为 10 μg/ml),4 ℃过夜;封闭液 37 ℃封闭 1 h;PBST 洗涤 3 次,分别加入 100 μl 待测上清,37 ℃ 反应 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次后,加入绵羊抗人 CR2(CD21)抗体,37 ℃反应 1 h,充分洗涤后,再加入 HRP 标记的兔抗绵羊 IgG 抗体,37 ℃反应 1 h,再充分洗涤,四甲基联苯胺(TMB)显色,2 mol/L H_2SO_4 终止反应。测定波长 450 nm 处光密度值[D(450)]。阴性对照为未转染质粒的 CHO 细胞培养上清。

1.2.4.3 阳性细胞株的无血清培养 选取经 ELISA 检测 D(450) 值较高的 1 株 CHO 细胞在 50 ml 细胞培养瓶中培养,待细胞单层长满后,按常规方法对细胞进行传代培养,培养基改用含 10% 胎牛血清的 CHO 细胞专用无血清培养基,根据细胞生长状态,逐渐减低培养基中血清含量,直至细胞完全适应无血清培养基。

1.2.4.4 重组蛋白 CR2-CD59 的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测 分别取 20 μl 经 PEG20000 浓缩后的阳性克隆 CHO 细胞无血清培养上清、转染空载体 PEE14.1 对照组细胞培养上清,加入 4 μl 5 × SDS-PAGE 电泳上样缓冲液,煮沸 15 min。用 12% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳,用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色。另取样品 SDS-PAGE 电泳,并转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,绵羊抗人 CD21 多克隆抗体 4 ℃过夜,经 TBST 洗涤 4 次,每次 5 min,再与 HRP 标记的兔抗绵羊 IgG 作用 1 h,再经 TBST 洗涤 4 次,每次 5 min,最后胶片显影。

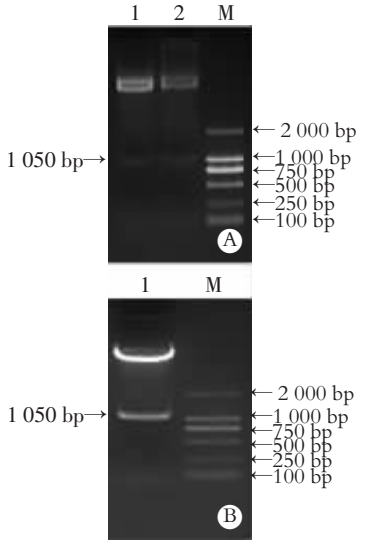
1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 4 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 的构建

以重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 为模板,进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见一条约 1 000 bp 的特异扩增带,片段大小与理论预期一致(图 1A)。同时,重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 经 *Eco*RⅠ、*Sma*Ⅰ双酶切,得到载体带及约 1 000 bp 目的片段,测序结果进一步表明成功构建重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59(图 1B)。



A:RT-PCR 电泳结果　1、2:CR2-CD59;M: 标准(DL 2000)
B:经 *Eco*R Ⅰ、*Sma*l Ⅰ双酶切结果　1:PEE14.1-CR2-CD59;M:标准(DL 2000)

图 1　重组质粒 PEE14.1-CR2-CD59 的 PCR 电泳结果及酶切鉴定

2.2　CR2-CD59 转染 CHO 细胞阳性克隆的筛选

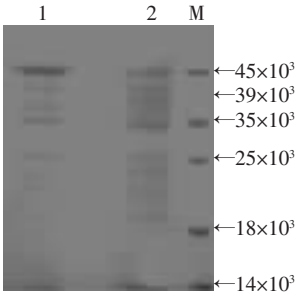
重组质粒 CR2-CD59 用 FuGENE 6 转染 CHO-K1 细胞,转染 24 h 后,换选择性 DMEM 培养基(不含谷氨酰胺),并加入 MSX 至终浓度为 50 μmol/L,约 2 周长出阳性克隆,而没有转染质粒的正常 CHO 细胞逐渐从瓶壁脱落,细胞裂解死亡。

2.3　CR2-CD59 融合蛋白的 ELISA 检测

选择 3 株细胞,分别用有血清培养基及无血清培养基培养 3 d,收集细胞上清,部分经 PEG20000 浓缩 5 倍备用,其余 -80 ℃ 保存。以 ELISA 方法检测 CR2-CD59 的表达,结果显示:CR2-CD59 以分泌形式在 CHO 细胞中表达,采用无血清培养基培养的 CHO 细胞稳定表达株的表达量(0.677 ±0.039)明显高于采用含血清的培养基培养的细胞(0.425 ±0.092, $P<0.05$)。

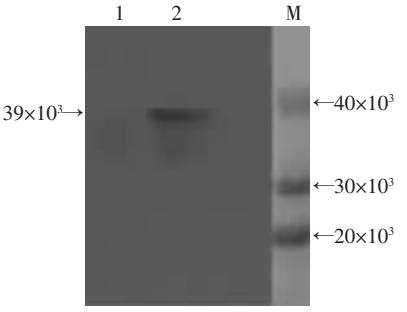
2.4　CR2-CD59 融合蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测

将无血清培养的 CHO 细胞上清用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳分析,经考马斯亮蓝 R-250 染色后,并经 Western blot 检测,结果与转染空载体 PEE14.1 的 CHO 细胞上清相比,CR2-CD59 可得到约 39×10^3 大小的条带,与理论预计的 CR2-CD59 融合蛋白结果大小一致(图 2、3)。



1:空载体;2:CR2-CD59;M:低分子量蛋白标准

图 2　SDS-PAGE 胶检测 CR2-CD59 融合蛋白的表达



1:空载体;2:CR2-CD59;M:低分子量蛋白预染标准

图 3　Western blot 检测 CR2-CD59 融合蛋白的表达

2.5　CR2-CD59 融合蛋白在无血清培养基中的表达

以无血清培养基调零,测定无血清培养基中的总蛋白含量约为 3.5 mg/ml,经 SDS-PAGE 电泳,利用 BADSCAN 软件对条带进行扫描分析,目的蛋白约占总蛋白含量的 6%,即约为 200 mg/L。

3　讨论

补体系统的过度激活直接或间接地导致机体自身组织的损伤[6],临床上应用补体抑制剂治疗某些补体系统疾病也有较长历史。人 CD59 为一种以糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚着于细胞膜表面的补体调节蛋白[7],其对补体的抑制作用与很多疾病相关[8,9]。CD59 能阻止 MAC 在细胞膜上的组装,调节补体活化,降低补体介导自身靶细胞的损伤[10,11]。已有研究证实,利用 CHO 细胞表达的 CD59 蛋白具有抗补体活性,但初步研究表明,可溶性 CD59(sCD59)在体外的治疗效果并不好,其疗效有待进一步研究[12,13]。因此,如何在提高补体抑制剂疗效的同时降低全身使用抑制剂的风险成为研究热点。

CR2 存在于 B 淋巴细胞胞膜及树突状细胞上,能加强人体的免疫反应,且 CR2 能利用滤泡树突状细胞长时间的捕获被 C3 片段沉积的抗原[14,15]。因此,设计由 CR2 连接补体调节蛋白 CD59 的融合蛋白,可以携带补体调节蛋白靶向到补体沉积的部位,直接在引起免疫反应损伤的部位发挥效用,从而能提高抑制补体激活的生物学活性。并且根据 Song 等[16]在对中国仓鼠卵巢细胞进行的体外补体裂解实验,说明融合的 CR2-CD59 比单独 CD59 分子对保护细胞免受补体激活后的细胞裂解更有效。因此与非靶向补体抑制物相比,CR2-CD59 能提高补体调节蛋白 CD59 在炎症局部的活性,降低全身使用补体抑制剂造成潜在感染的危险性。

本研究利用 CHO 细胞对靶向补体抑制物 PEE14.1-CR2-CD59 进行稳定表达,应用 SDS-PAGE 及 Western

blot等方法对CR2-CD59融合蛋白进行鉴定,获得人源CR2-CD59在CHO细胞中稳定表达的细胞系。Song等[16]以PBM为载体,在CHO细胞中表达CR2-CD59,但是该系统的表达量仅为100~200 μg/L。为进一步研究靶向补体的功能,利于生产纯化工艺,提高CR2-CD59的表达量至关重要。经分析,该CHO细胞株表达CR2-CD59融合蛋白的表达量能达到约200 mg/L,显著高于Song等[16]研究的细胞蛋白表达量。实验中所用的PEE14.1载体是一个含有GS酶筛选标志,且稳定、质粒拷贝数高的真核细胞表达载体。GS酶是一种能利用谷氨酸盐和氨为底物合成谷氨酰胺的酶,一些哺乳细胞(如CHO细胞),虽然有内源性的GS酶,但MSX能抑制细胞对谷氨酰胺的合成利用,因此在MSX提供的选择性压力的不含谷氨酰胺的培养基中不能生长,利用这种方法能高效稳定地扩增目的基因,更易于进行规模化生产[17]。

此外,血清由于其成分的复杂性并不适合基因蛋白工程表达产物的下游工作,且如采用血清培养基对CHO细胞稳定表达株进行培养,将会降低蛋白的表达量,也为以后生产蛋白制品带来诸多不利。但CHO细胞等哺乳细胞的生长依赖于含牛血清的培养基[18],突然降低培养基中血清浓度,即使使用商品化的无血清培养基,也会引起CHO细胞生长不佳甚至死亡。本实验中优化CHO细胞培养条件,采用逐渐替代的方法,减少无血清培养基中血清浓度,直至CHO细胞稳定表达株能完全适应无血清培养基,不影响CHO细胞的生长及蛋白的表达。用无血清培养基培养CHO细胞能获得高表达蛋白,节约成本,为重组蛋白CR2补体抑制物蛋白CR2-CD59大规模表达、纯化与生产打下基础,并为进一步获得针对炎症治疗的基因工程靶向蛋白药物,以提高补体抑制物的疗效,降低其毒副作用提供了实验依据。

参考文献:

[1] Markiewski M M, Lambris J D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight [J]. Am J Path, 2007, 171(3): 715-727.

[2] Grevink M E, Horst G, Limburg P C, *et al*. Levels of complement in sera from inactive SLE patients, although decreased, do not influence *in vitro* uptake of apoptotic cells[J]. J Autoimmunity, 2005, 24(4): 329-336.

[3] Asokan R, Hua J, Young K A, *et al*. Characterization of human complement receptor type 2 (CR2/CD21) as a receptor for IFN-alpha: a potential role in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 383-394.

[4] Szakonyi G, Guthridge J M, Li D, *et al*. Structure of complement receptor 2 in complex with its C3d ligand[J]. Science, 2001, 292(5522): 1725-1728.

[5] Huang Y, Smith C A, Song H, *et al*. Insights into the human CD59 complement binding interface toward engineering new therapeutics[J]. J Biol Chem, 2005, 280(40): 34073-34079.

[6] Mastellos D, Germenis A E, Lambris J D. Complement: an inflammatory pathway fulfilling multiple roles at the interface of innate immunity and development[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(1): 125-127.

[7] Petranka J, Zhao J, Norris J, *et al*. Structure-function relationships of the complement regulatory protein, CD59[J]. Blood Cells Mol Dis, 1996, 22(3): 281-296.

[8] Wu G, Hu W, Shahsafaei A, *et al*. Complement regulator CD59 protects against angiotensin Ⅱ-induced abdominal aortic aneurysms in mice[J]. Circulation, 2010, 121(11): 1338-1346.

[9] Shi X X, Zhang B, Zang J L, *et al*. CD59 silencing *via* retrovirus-mediated RNA interference enhanced complement-mediated cell damage in ovary cancer[J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(1): 61-66.

[10] Qin X, Krumrei N, Grubissich L, *et al*. Deficiency of the mouse complement regulatory protein mCd59b results in spontaneous hemolytic anemia with platelet activation and progressive male infertility [J]. Immunity, 2003, 18(2): 217-227.

[11] Qin X, Goldfine A, Krumrei N, *et al*. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: a possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(10): 2653-2661.

[12] Rushmere N K, Van-Den-Berg C W, Morgan B P. Production and functional characterization of a soluble recombinant form of mouse CD59[J]. Immunology, 2000, 99(2): 326-332.

[13] Sugita Y, Ito K, Shiozuka K, *et al*. Recombinant soluble CD59 inhibits reactive haemolysis with complement[J]. Immunology, 1994, 82(1): 34-41.

[14] Prodinger W M. Complement receptor type two (CR2, CD21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping [J]. Immunol Res, 1999, 20(3): 187-194.

[15] Carroll M C. The role of complement in B cell activation and tolerance [J]. Adv Immunol, 2000, 74: 61-88.

[16] Song H, He C, Knaak C, *et al*. Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation[J]. J Clin Invest , 2003, 111(12): 1875-1885.

[17] 吴曙光, 余传林, 徐伟, 等. 人肝细胞生长因子在CHO细胞的表达和生物学活性[J]. 第一军医大学学报, 1995, 15(4): 321-324.

[18] Keen M J, Rapson N T. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line[J]. Cytotechnology, 1995, 17(3): 153-163.

(**收稿**:2009-12-31;**修回**:2010-01-31)

(编辑 汪勤俭)