文章编号:1000-5404(2010)12-1261-06

论著

EGFP-CD40L 融合基因的构建、表达及功能鉴定

马晶莹[1,2,3],谭晓华[1],陈媛媛[1],邱 实[1] (100700 北京,北京军区总医院生物治疗中心[1];400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队学员 3 队[2];100027 北京,武警北京总队医院内 1 科[3])

[摘要] **目的** 构建编码增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,EGFP)和人 CD40L 胞外段(hecdCD40L)组成的融合基因真核表达载体,并探讨表达后的融合蛋白对人树突状细胞(dendritic cells, DCs)表型和功能的影响。**方法** 以 RT-PCR 方法从健康人外周血单个核细胞中克隆 hecdCD40L 基因片段。小鼠血管内皮细胞生长因子受体 2 信号肽序列(Sig_{mKDR})和 EGFP 与 hecdCD40L 基因片段融合或不融合,插入真核表达载体 pcDNA3.1(-),构建 pcDNA3.1 Sig_{mKDR}-EGFP(sEGFP)和 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L。用脂质体将表达载体转染至体外培养的 COS-7 细胞后,G418 抗性筛选,流式细胞仪分选并检测 EGFP 和/或 CD40L 的表达。Western blot 检测融合蛋白在 COS-7 细胞及其上清中的表达,用镍柱和超滤离心管获取纯化浓缩的 sEGFP-hecdCD40L 和 sEGFP 融合蛋白与人 DCs 共孵育,流式细胞仪和 ELISA 分析 DCs 对 2 种融合蛋白的摄取率、DCs 表型变化以及细胞因子 IL-12 的分泌。**结果** pcDNA3.1 sEGFP 或 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L 转染 COS-7 细胞后,经 G418 抗性筛选和流式细胞仪分选筛选获得高效表达融合蛋白的单克隆细胞株,EGFP 阳性细胞可达 95% 以上,Western blot 在细胞内和上清中均能检测到融合蛋白。sEGFP 或 sEGFP-hecdCD40L 与 DCs 共孵育 2 h,流式细胞仪检测示 EGFP 阳性率前者为 28.6%,后者为 56.9%,24 h 后分析 DCs 的表型,sEGFP-hecdCD40L 融合蛋白增强 DCs 表面 CD80、CD83 和 HLA-DR 分子的表达以及刺激 IL-12 的分泌,而 sEGFP 对 DCs 的表型和 IL-12 的分泌无明显影响。**结论** 用 Sig_{mKDR}、EGFP 和 hecdCD40L 构建的融合基因能在真核细胞中表达并能分泌至细胞外,这种分泌型融合蛋白能靶向 DCs,诱导 DCs 的成熟和上调其表面共刺激分子和 MHC-II 分子的表达,并刺激 IL-12 分泌。

[关键词] 蛋白分选信号;绿色荧光蛋白质类;CD40 配体;树突细胞;白细胞介素 12
[中图法分类号] R394-33;R394.3 **[文献标志码]** A

Construction, expression and characteristics of EGFP-CD40L fusion gene

Ma Jingying[1,2,3], Tan Xiaohua[1], Chen Yuanyuan[1], Qiu Shi[1] ([1]Center for Biotherapy, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700; [2]3rd Team of Graduate Student, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department 1 of Internal Medicine, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing, 100027, China)

[Abstract] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector encoding a fusion gene consisting of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and human extracellular domain of CD40L (hecdCD40L), and to investigate the effects of the expression product of the fusion gene on phenotypes and function of human dendritic cells (DCs). **Methods** hecdCD40L was cloned from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by RT-PCR. The signal peptide of murine vascular endothelial cell growth factor receptor-2 (Sig_{mKDR}) and EGFP were fused with or without hecdCD40L, and then the fused fragments was inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-) to construct pcDNA3.1 Sig_{mKDR}-EGFP (sEGFP) and pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L. After transfection of COS-7 cells with the vectors by lipofectamine 2000™, the monoclonal COS-7 cells stably expressing sEGFP or sEGFP-hecdCD40L fusion proteins were obtained *via* G418-resistant screening and sorting of flow cytometer (FACS). The expression efficiencies of the fusion genes were analyzed by FACS and the fusion proteins in the cells and supernatants were detected by Western blotting, respectively. Uptake rates, phenotypic changes, and secretion of interleukin-12 (IL-12) in DCs were analyzed by FCAS and ELISA after co-incubation of DCs with the sEGFP or sEGFP-hecdCD40L proteins depurated and concentrated by Ni-NTA Agarose and ultrafiltration. **Results** After the transfection of the pcDNA3.1 sEGFP or pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L into COS-7 cells, the monoclonal COS-7 cells expressing the fusion proteins were obtained

[基金项目] 国家自然科学基金(30771997)
[通信作者] 谭晓华,E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

by G418-resistant screening and flow cytometer sorting, in which the cells expressed EGFP reached up to 95% by the analysis of FACS. Western blotting showed the expression of the fusion proteins in the cells and its supernatants. In addition, uptake rates to sEGFP or sEGFP-hecdCD40L by DCs were 28.6% and 56.9%, respectively, in 2 h after co-incubation of sEGFP or sEGFP-hecdCD40L with DCs. The increased expression of CD80, CD83, and HLA-DR and secretion of IL-12 on DCs were detected by FCAS and ELISA in 24 h after co-incubation with sEGFP-hecdCD40L protein. However, the sEGFP protein had no such an effect on DCs. **Conclusion** The fusion protein consisting of Sig_{mKDR}, EGFP, hecdCD40L is expressed in the eukaryotic cells and secreted out of the cells. The secreting protein can be targeted to DCs, and then induce maturation of DCs, up-regulate costimulatory and MHC-Ⅱ molecules on DCs, and stimulate the IL-12 secretion of DCs.

[Key words] protein sorting signals; green fluorescent proteins; CD40 ligand; dendritic cells; interleukin-12

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771997). Corresponding author: Tan Xiaohua, E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

以树突状细胞(dendritic cells, DCs)为基础的肿瘤疫苗是目前肿瘤免疫基因治疗研究的热点之一。DC是体内最强的抗原递呈细胞,在抗肿瘤免疫应答中发挥关键的作用。作为抗原递呈细胞,DC需要接受肿瘤抗原的刺激及相关的"危险信号"诱导其活化和成熟[1]。尽管DC可主动地摄取肿瘤抗原并对其进行加工、递呈,但这种肿瘤抗原处理方式的效率对DC作为一种瘤苗用于肿瘤的免疫治疗是难以满足需求的。因此,诸多的研究通过基因工程手段将肿瘤抗原靶向DC表面的某些受体分子如DEC-205[2]、DC-SIGN[3]、FcR[4]和CD40等以显著地增强DC摄取肿瘤抗原的能力。特别是DC表面表达的CD40分子,不仅可作为一种靶分子,还可通过与表达在$CD4^+$ T细胞上的CD40L分子发生作用后促进DC的成熟、上调其表面共刺激分子和MHC类分子的表达及提高其抗原提呈能力[5]。本研究构建了一个编码增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein ,EGFP)和人CD40L胞外段(hecdCD40L)组成的融合基因真核表达载体,并对其转染至真核细胞后的表达以及对DCs的表型和功能的影响进行了研究,为利用CD40L作为一种将肿瘤抗原靶向DC的策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

COS-7细胞为本实验室保存,用RPMI1640培养液加10%的胎牛血清培养。含EGFP的质粒pEGFP-C3购自美国Clone-Tech公司,各种培养液、脂质体Lipofectamine™2000、ThermoScript™第一链cDNA合成试剂盒、Anti-myc单克隆抗体、Geneticin(G418)和真核表达载体pcDNA3.1(-)、6×His纯化镍柱(Ni-NTA Agarose)购自美国Invitrogen公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司,PE-Conjugated Anti-human CD154(CD40L)购自eBioscience公司,CD1a-FITC、CD40-PE、CD80-PE、CD83-PE、CD86-PE和HLA-DR-PE等流式细胞仪抗体购自美国BD公司,蛋白离心超滤管(Amicon UltraCentrifugal, 15ml 30K NMWL)购自美国Millipore公司,人IL-12 ELISA试剂盒购自法国Diaclone公司,各种限制性内切酶购自日本TaKaRa公司,各种质粒提取试剂盒购自美国Omega公司,质粒pcDNA3.1 mVEGFR-2为本实验室构建[6]。

1.2 方法

1.2.1 人CD40L基因克隆 用细胞总RNA快速提取试剂盒提取健康人外周血单个核细胞的总RNA,按ThermoScript™试剂盒说明书合成第一链cDNA。按hCD40L在GenBank登记的序列号NM_000074提供的序列,设计1对特异性引物,上游引物:5′-GGAATTCGCCATGGTCGAAACATACAACC-3′(5′端引入*Eco*RⅠ位点);下游引物:5′-CGGGATCCTCAGAGTTTGAG-TAAGCC-3′(5′端引入*Bam*HⅠ位点,下划线部分表示所引入的位点)。用上述cDNA作为hCD40L基因模板、hCD40L特异性引物进行PCR扩增,反应条件是94 ℃预变性4 min,94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共30个循环,最后72 ℃延伸8 min。获得的PCR片段用*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ双酶切后插入pcDNA3.1(-)多克隆位点中,构建成pcDNA3.1(-)hCD40L,送公司测序证明克隆基因序列的正确性。

1.2.2 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L-Myc-6×His的构建 pcDNA3.1(-)为含有新霉素(Neomycin)抗性基因的真核表达载体,转染至细胞中其基因表达产物能使细胞在遗传霉素(Geneticin, G418)的压力下生长。该载体多克隆位点的3′末端含有1个myc表位(myc epitope)和6个组氨酸构成的标签(6×His *Tag*),其后即为终止密码子TGA。插入的目的基因在去掉本身的终止密码子后,可与myc表位和6×His *Tag*构成一个完整的开放阅读框,有利于通过抗myc单抗检测以及通过6×His *Tag*纯化和浓缩融合蛋白。设计3对引物,第1对引物用于扩增mVEGFR-2信号肽序列(Sig_{mKDR}),上游:5′-CTAGCTAGCATGGAGAGCAAGGCGCTGCTA-3′(在5′端引入*Nhe* Ⅰ位点),下游:5′-ATAAGAATGCGGCCGCGGCTCGGG-TCTCCACG-3′(在5′端引入*Not*Ⅰ位点);第2对引物用于扩增EGFP,上游:5′-ATAAGAATGCGGCCGCGGTGAGCAAGGGCGA-GGA-3′(去掉起始密码子ATG,同时在5′端引入*Not*Ⅰ位点),下游:5′-CCGCTCGAGGAGCTCGAGATCTGAGTAC-3′(去掉终止密码子TAA,同时在5′端引入*Xho*Ⅰ位点);第3对引物用于扩

增 hCD40L 胞外段:上游:5′-CCGCTCGAGATTGATGCTCAAGC-TCCTAAATCTCATAGAAGGCTGGACAAG-3′(去掉起始密码子 ATG,并在 5′端引入 NDAQAPKS 序列[7] 和 *Xho* Ⅰ位点),下游:5′-CCGGAATTCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGACGTGAAGCC-3′(在 5′端引入 *Eco*R Ⅰ位点)(下划线部分表示所引入的位点)。分别以 pcDNA3.1 mVEGFR-2、pEGFP-C3 和 pcDNA3.1(－)hCD40L 为模板,用相应的特异性引物 PCR 扩增 Sig_{mKDR}、EGFP 和 hecdCD40L 片段。Sig_{mKDR} PCR 片段经 *Nhe* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切后插入 pcDNA3.1(－)多克隆位点中,构建 pcDNA3.1(－)Sig_{mKDR};EGFP PCR 片段经 *Not* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切后插入 pcDNA3.1(－)Sig_{mKDR}相应的位点中,构建 pcDNA3.1(－)Sig_{mKDR}-EGFP 或简写为 pcDNA3.1(－) sEGFP;hecdCD40L PCR 片段经 *Xho* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切后插入 pcDNA3.1(－) sEGFP 相应的位点中,构建 pcDNA3.1(－) sEGFP- hecdCD40L。构建的载体送北京博迈德生物技术有限公司进行测序,证明融合基因 sEGFP 和 sEGFP-hecdCD40L 序列的正确性。

1.2.3　质粒 DNA 转染　对数生长的 COS-7 细胞用 0.25% 的胰酶消化后,按 5×10^5/孔接种至 24 孔板中。待细胞相互融合至 80% 左右,行脂质体转染,方法参照试剂盒说明书进行。转染 24 h 后更换含 1 mg/ml G418 的培养液,以后每 3 天更换含相同剂量 G418 培养液,直至有克隆细胞生长;然后将各个克隆生长的细胞用胰酶消化后传至 25 cm^2 的一次性培养瓶中继续生长,G418 抗性压力的培养下细胞进一步扩增至足够数量,用于流式细胞仪分选。

1.2.4　流式细胞仪分选和检测　转染了 pcDNA3.1 sEGFP 或 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L 的 COS-7 细胞在 G418 的抗性选择下扩增后,分别用胰酶消化成单细胞悬液,用含 1% 胎牛血清的 PBS 洗 2 次后用分选流式细胞仪(BD, FACSAria)进行单克隆分选。将荧光显微镜下发绿色荧光的克隆传至 6 孔板,最后传至一次性培养瓶中培养,用于流式细胞仪和 Western blot 检测。单克隆扩增的 COS-7 细胞,胰酶消化成单细胞悬液后 4% 多聚甲醛固定,用 PE-Conjugated Anti-hCD154 进行染色后,流式细胞仪分析 EGFP 和/或 CD40L 的表达。

1.2.5　融合蛋白的纯化和浓缩　1×10^7 经克隆选择表达 sEGFP/COS-7 或 sEGFP-CD40L/COS-7 细胞传代至 200 cm^2 的培养瓶中,过夜后更换 30 ml 新培养液,继续培养 24 h 后分别收集培养液上清(2 000 r/min 离心除去细胞残渣)及细胞,分别按 6×His 纯化镍柱说明书对其过柱,最终用 15 ml 洗脱液进行洗脱;将 15 ml 洗脱液加入蛋白离心超滤管中,4 000 r/min 离心 10 min 可将 15 ml 的洗脱液浓缩至 200 μl。对浓缩前、后的洗脱液分别进行蛋白定量。

1.2.6　Western blot 检测　分别收集经克隆选择、纯化浓缩的 sEGFP/COS-7 或 sEGFP-CD40L/COS-7 细胞及上清,按分子克隆第 3 版介绍的方法进行 SDS-PAGE 电泳分析,用考马斯亮蓝染色后,用 myc 单抗进行 Western blot 检测细胞裂解液及上清中的融合蛋白。

1.2.7　融合蛋白靶向人树突状细胞(DCs)的功能鉴定

1.2.7.1　人外周血 DCs 的分离和培养　抽取健康人外周血,用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离出人外周血单个核细胞,采用粘附贴壁法从外周血 $CD14^+$ 单核细胞用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养获得 DCs,用流式细胞仪测定 DCs 的表型。

1.2.7.2　流式细胞仪分析经融合蛋白刺激后 DCs 的表型变化　培养第 6 天的 DCs 按 2×10^5/孔浓度加入 24 孔板中,1 μg/ml sEGFP-CD40L 或 sEGFP 加入每孔的 DCs 中 37℃培养 24 h 后,收集每孔细胞,PBS 洗 2 次,分别加入 PE 标记的 CD80、CD83 和 HLA-DR 单克隆抗体,室温避光放置 30 min 后用 PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定,流式细胞仪分析 DCs 表型变化。

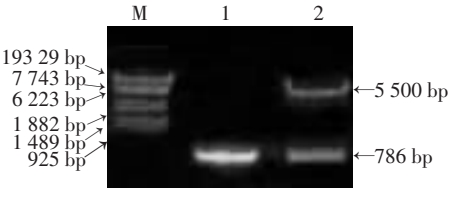
1.2.7.3　DCs 的吞噬效应　培养第 6 天的 DCs 按 5×10^5/孔浓度加入 6 孔板中,1 μg/ml sEGFP-CD40L 或 sEGFP 加入每孔的 DCs 中 37 ℃共孵育,在不同的时间点(0.5、1、2、3 h)收集 DCs,用 PBS 充分洗涤除去多余的融合蛋白后,用 4% 多聚甲醛固定,行流式细胞仪分析绿色荧光表达水平。

1.2.7.4　ELISA 法检测融合蛋白对 DCs 分泌功能的影响　培养第 6 天的 DCs 按 2×10^5/孔浓度加入 24 孔板中,1 μg/ml sEGFP-CD40L 或 sEGFP 加入每孔的 DCs 中 37 ℃培养 24 h 后,收集每孔上清,按 IL-12 ELISA 试剂盒说明书的方法测定上清中 IL-12 浓度。

2　结果

2.1　人 CD40L 基因的克隆

阳性克隆质粒经 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切和 PCR 鉴定证实,PCR 片段插入了 pcDNA3.1(－)载体中(图 1)。将酶切和 PCR 鉴定阳性的质粒测序,证实插入的 PCR 片段序列与 GenBank 登记的 hCD40L(序列号 NM_000074)序列完全一致(786 bp)。



M: λ-EcoT 14 DNA 标准;1: hCD40L PCR 片段;2: *Eco*R Ⅰ+*Bam*H Ⅰ双酶切 pcDNA3.1(－)hCD40L

图 1　hCD40L 的克隆及酶切鉴定

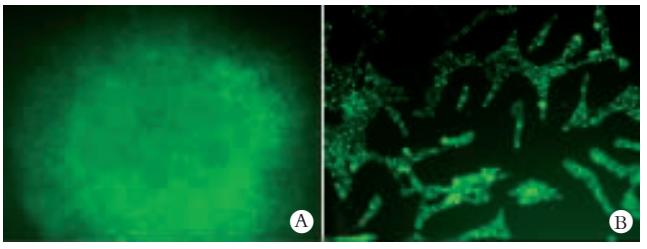
2.2　pcDNA3.1 sEGFP 和 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L 的构建

构建的 pcDNA3.1 sEGFP 与 myc 和 6×His *Tag* 形成一个完整的开放阅读框,整个融合基因序列长度预计值应为 879 bp;构建的 pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L 从信号肽起始,整个融合基因的序列依次为 Sig_{mKDR}、EGFP、hecdCD40L、myc 和 6×His,5 段序列构成一个完整的开放阅读框,长度预计值应为 1 581 bp。经测序证实,该开放阅读框序列与预计的完全一致。

2.3　表达 sEGFP 和 sEGFP-hecdCD40L 融合蛋白单克隆 COS-7 细胞株的建立

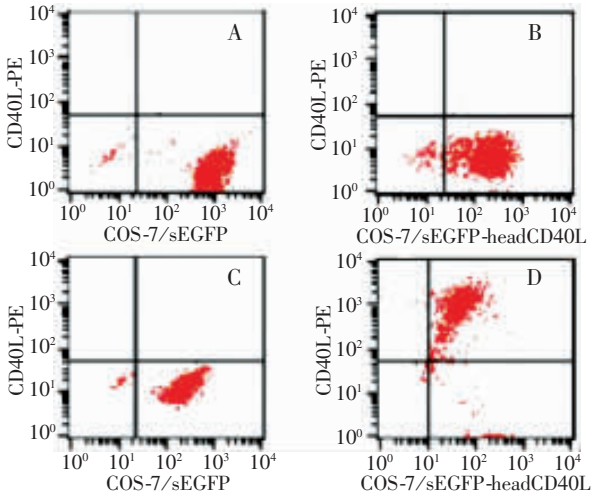
流式细胞仪对转染后的细胞进行单克隆分选后检测,所有细胞均表达绿色荧光蛋白,荧光显微镜下可见克隆生长的细胞形成绿色荧光团(图 2A),经多次传代,所有细胞仍然产生绿色

荧光(图2B)。用PE标记的抗CD154单抗对两种克隆细胞进行染色后流式细胞仪分析,结果显示:表达sEGFP-hecdCD40L的COS-7细胞呈EGFP(绿色荧光)和CD40L分子(红色荧光)双阳性表达,双阳细胞的百分率在95%以上;而表达sEGFP的COS-7细胞仅为EGFP(绿色荧光)阳性表达,阳性率在98%以上(图3)。表明sEGFP-hecdCD40L融合基因中的EGFP和hecdCD40L均能得以有效表达。



A:荧光显微镜下单克隆生长的COS-7细胞(×100);B:荧光显微镜下单克隆生长的COS-7细胞传至第5代后(×400)

图2　经G418抗性筛选、流式细胞仪分选后单克隆生长的COS-7细胞镜下观察

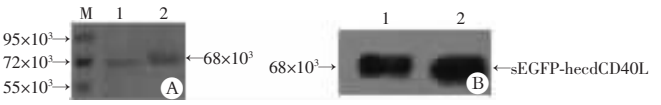


A:转染pcDNA3.1 sEGFP的COS-7细胞(绿色荧光表达98%);B:转染pcDNA3.1 sEGFP-CD40L的COS-7细胞(绿色荧光表达94%);C:经抗CD154-PE染色、转染pcDNA3.1 sEGFP的COS-7细胞(绿色荧光表达大于95%);D:经抗CD154-PE染色、转染pcDNA3.1 sEGFP-CD40L的COS-7细胞(同时表达绿色荧光和红色荧光的细胞大于95%)

图3　流式细胞仪检测融合基因在COS-7细胞中的表达

2.4　融合蛋白的分泌

SDS-PAGE分析显示,用镍柱纯化和超滤浓缩表达sEGFP-hecdCD40L融合蛋白的单克隆COS-7细胞裂解液和培养上清中均可见蛋白相对分子质量约68 000的蛋白条带,与sEGFP-hecdCD40L融合蛋白相对分子质量的理论值相同(图4A);用抗myc单克隆抗体行Western blot检测,上述细胞裂解液和上清液中均显示1条特异性条带,蛋白相对分子质量约为68 000,同预期的大小相一致,表明sEGFP-hecdCD40L融合蛋白能分泌至细胞上清中(图4B)。同样,表达sEGFP融合蛋白的单克隆COS-7细胞裂解液和上清液中也检测到sEGFP融合蛋白的存在。sEGFP融合蛋白相对分子质量为27 000。



M:标准蛋白分子量;1:转染pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L的COS-7细胞裂解液;2:转染pcDNA3.1 sEGFP-hecdCD40L的COS-7细胞上清液

A:SDS-PAGE分析;B:Western blot分析

图4　SDS-PAGE和Western blot分析经纯化浓缩的EGFP-CD40L融合蛋白在COS-7细胞中的表达

2.5　融合蛋白对树突状细胞表型及分泌功能的影响

第6天表型分析显示:高表达CD1a和HLA-DR,分别为82.4%和81.6%;中度表达CD40、CD80和CD86,分别为53.2%、65.4%和76.8%;基本不表达CD83,为6.6%。用sEGFP-hecdCD40L或sEGFP融合蛋白与培养第6天的DCs共孵育24 h后FACS分析DCs表型变化,sEGFP-hecdCD40L显著影响DCs的表型,主要是CD80、CD83和HL-ADR表达明显增强,分别是88.3%、84.5%和93.2%,而sEGFP对DCs的表型影响不明显,CD80、CD83和HL-ADR表达分别是68.1%、7.7%和82.4%,表明sEGFP-hecdCD40L能诱导DCs的成熟和增强共刺激分子的表达。sEGFP-hecdCD40L或sEGFP融合蛋白与DCs共孵育,分别在0.5、1、2、3 h用FACS分析DCs的绿色荧光水平,前者EGFP阳性率为25.2%、41.4%、56.9%和50.5%,而后者分别为9.2%、15.3%、28.6%和24.3%,表明hecdCD40L能明显地增强DCs对EGFP的吞噬。用IL-12 ELISA试剂盒检测共孵育24 h后所收集的细胞上清中IL-12的浓度,结果显示sEGFP组检测不到IL-12,而sEGFP-hecdCD40L组IL-12的浓度为(116.01 ± 14.79) pg/ml,提示sEGFP-hecdCD40L能刺激DCs分泌IL-12。

3　讨论

DCs在抗肿瘤免疫反应中发挥关键的作用,通过诱发细胞毒性T淋巴细胞(CTL)产生肿瘤特异性的细胞免疫反应。DCs在刺激和活化CTL的过程中,至少需要3类信号,第一类信号是DCs获取相应的肿瘤抗原,通过其抗原递呈功能,产生抗原肽-MHC复合物,供T细胞识别;第二类信号是DCs表面表达的共刺激分子;而第三类信号是成熟DCs分泌的细胞因子,如IL-2、IL-12和干扰素等[8,9]。DCs获取肿瘤抗原后,能否获得成熟信号的刺激将直接影响第二类和第三类信号的产生,只有成熟的DCs才能诱发有效的抗肿瘤免疫反应[10,11]。DCs在受到各种成熟信号刺激后,其表面CD80和CD86等共刺激分子表达明显上调,并分泌大量的IL-12细胞因子。IL-12是一个重要的第三类信号,能促进多种抗肿瘤效应细胞(T细胞、NK细胞和NKT细胞)的增殖和存活[12]。在诱导DCs成熟的信号中,CD40-CD40L相互作用是一条重要的途经[13],CD40L属于肿瘤坏死因子超家族成员的Ⅱ型跨膜糖蛋白,主要表达在$CD4^+$T细胞,其配基CD40分子表达较广泛,特别是表达在DCs表面。大量的研究证

实,CD40-CD40L 的相互作用能促进 DCs 的成熟、上调 DCs 表面共刺激分子和 MHC 分子的表达以及刺激 DCs 分泌细胞因子(特别是 IL-12),从而活化 Th 细胞和激发 CTL 的功能,在抗肿瘤免疫应答中发挥重要的作用[13-15]。正是因为 CD40-CD40L 在 DC 发挥其免疫调节功能中起着作不可或缺的作用,所以利用 CD40L 增强其抗肿瘤免疫的策略越来越受到重视。主要采用两种策略:一是 CD40L(可以用重组 CD40L 蛋白、病毒或非病毒载体编码的 CD40L[16,17] 以及 CD40L mRNA[18])直接与 DCs 表面的 CD40 发生作用增强抗肿瘤免疫;二是通过基因工程手段将肿瘤相关抗原与 CD40L 融合构建成融合基因,然后利用适当的载体表达该融合基因产物并能有效地靶向 DCs 表面的 CD40。Zhang 等[7]将小鼠 CD40L 胞外段序列通过一个含 8 个氨基酸(NDAQAPKS)的序列接头与 HPV E7 基因或 hMUC-1 肿瘤相关抗原基因连接,在融合序列的 5′端融合或不融合一个人生长激素信号肽序列,构建分泌或不分泌型的融合基因,并通过腺病毒载体编码这些融合基因,将其注射至小鼠皮下进行免疫,可诱导针对 HPV E7 或 hMUC-1 强烈的特异性细胞免疫反应,使已生长的肿瘤消退,显示出一种优良的体内靶向激活 DC 的抗肿瘤策略。

本研究构建了一个编码包含 mKDR 信号肽、EGFP、人 CD40L 胞外段组成的融合基因真核表达载体,转染至 COS-7 真核细胞后通过抗性筛选和流式细胞仪分选方法获得稳定表达融合蛋白的单克隆细胞,通过镍柱和蛋白离心超滤管对其细胞裂解液和上清进行纯化及浓缩获得高纯度的融合蛋白,用融合蛋白刺激人外周血来源的 DCs,对其表型和功能产生明显的影响。该研究证实:①有别于 Zhang 等的研究,本研究直接利用人 hCD40L 胞外段通过 NDAQAPKS 序列接头与目的基因相连接(采用了 EGFP),用荧光显微镜、流式细胞仪和 Western blot 检测证实 EGFP 和 CD40L 均能有效地在真核细胞中表达,由于使用的是人 CD40L,使之将这种靶向 DCs 策略向临床应用转化更推进了一步;②本研究采用小鼠 VEGFR-2(mKDR)信号肽序列作为融合基因的信号肽可使融合基因产物转化为分泌型融合蛋白,因为已经证实即使在人的细胞中其同样具有信号肽的作用,这在体内靶向 DCs 抗肿瘤策略中可能至关重要,因为在活细胞内表达的肿瘤相关抗原必需分泌至细胞外才有可能被 DCs 摄取。同样地,与 CD40L 融合的肿瘤相关抗原只有分泌至细胞外才能更有效地靶向 DCs;③本研究建立了一种适用、高效表达融合蛋白的方法,即将抗性筛选(采用的是 G418)和流式细胞仪单细胞分选结合起来,先通过抗性筛选出表达抗性基因的克隆,然后通过流式细胞术进行单细胞分选,并继续在抗性压力下生长,最终从单克隆扩增的细胞近 100% 地表达目的蛋白,整个过程大约只需要 1.5 个月,较经典的有限稀释法高效便捷得多,该方法耗时(>3 个月)、工作量大,且不容易获得稳定表达的单克隆细胞[19];④本研究提供了直接的证据证实利用与 hecdCD40L 的融合能有效地将目的基因靶向 DCs,此外还能诱导 DCs 的成熟和共刺激分子表达上调,并刺激 IL-12 的分泌,为 DCs 诱发抗肿瘤免疫提供充足的第一(在 EGFP 被肿瘤相关抗原取代时)、第二和第三类信号;⑤用某种(些)肿瘤相关抗原基因取代 EGFP,可构建一系列的肿瘤相关抗原与 hecdCD40L 构成的融合基因,采用本研究提供的方法获取纯化和浓缩的融合蛋白,或将此类融合基因进一步克隆至病毒或非病毒载体中,为体内靶向活化 DCs 进行肿瘤的免疫基因治疗提供了多种可能的策略。

本研究结果表明,通过与人 CD40L 胞外段融合所产生的融合蛋白能有效地靶向人外周血来源的 DCs,并诱导 DCs 的成熟、共刺激分子表达上调和 IL-12 的分泌,为利用人 CD40L 将肿瘤相关抗原体内外靶向 DCs 的蛋白质瘤苗或基因瘤苗的研发提供实验依据和理论支持。

参考文献:

[1] Skoberne M, Beignon A S, Bhardwaj N. Danger signals: a time and space continuum[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(6): 251-257.

[2] Bonifaz L C, Bonnyay D P, Charalambous A, *et al*. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination[J]. J Exp Med, 2004, 199(6): 815-824.

[3] Tacken P J, de-Vries I J, Gijzen K, *et al*. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells *via* a humanized anti-DC-SIGN antibody[J]. Blood, 2005, 106(4): 1278-1285.

[4] Boruchov A M, Heller G, Veri M C, *et al*. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2914-2923.

[5] Hanks B A, Jiang J, Singh R A, *et al*. Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines *in vivo*[J]. Nat Med, 2005, 11(2): 130-137.

[6] 谭晓华, 吴彬, 刘兵, 等. 腺病毒载体介导人血管内皮细胞生长因子受体-2 诱导抗小鼠肝癌免疫[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(4): 289-293.

[7] 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.

[8] Mescher M F, Curtsinger J M, Agarwal P, *et al*. Signals required for programming effector and memory development by $CD8^+$ T cells[J]. Immunol Rev, 2006, 211: 81-92.

[9] Curtsinger J M, Valenzuela J O, Agarwal P, *et al*. Type Ⅰ IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation[J]. J Immunol, 2005, 174(8): 4465-4469.

[10] de-Vries I J, Lesterhuis W J, Scharenborg N M, *et al*. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in ad-

vanced melanoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14): 5091-5100.
[11] Adams S, O'Neill D, Bhardwaj N. Maturation matters: importance of maturation for antitumor immunity of dendritic cell vaccines[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(18): 3834-3835.
[12] Park S H, Kyin T, Bendelac A, *et al*. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors[J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1197-1201.
[13] Ma D Y, Clark E A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells[J]. Semin Immunol, 2009, 21(5): 265-272.
[14] Hernandez M G, Shen L, Rock K L. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and $CD8^+$ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of $CD4^+$ T cell help[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2844-2852.
[15] 田坤, 钱桂生. 人CD40L真核表达体系的建立[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 963-966.
[16] Tomihara K, Kato K, Masuta Y, *et al*. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells[J]. Gene Ther, 2008, 15(3): 203-213.
[17] Serba S, Schmidt J, Wentzensen N, *et al*. Transfection with CD40L induces tumour suppression by dendritic cell activation in an orthotopic mouse model of pancreatic adenocarcinoma[J]. Gut, 2008, 57(3): 344-351.
[18] Calderhead D M, DeBenedette M A, Ketteringham H, *et al*. Cytokine maturation followed by CD40L mRNA electroporation results in a clinically relevant dendritic cell product capable of inducing a potent proinflammatory CTL response[J]. J Immunother, 2008, 31(8): 731-741.
[19] Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting[J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(11): 1821-1829.

(**收稿**:2010-03-09;**修回**:2010-03-25)
(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)12-1266-01

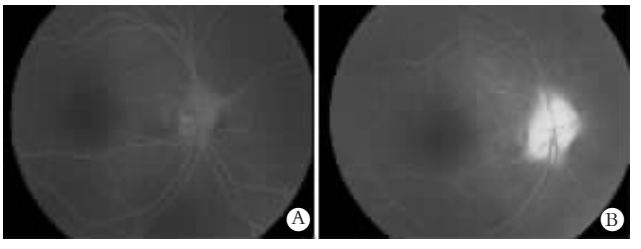
脊柱手术致缺血性视神经病变1例

唐 丽,李志敏,王 鲜,郝晓艳 (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院眼科)

[关键词] 缺血性视神经病变;脊柱手术;易感视乳头
[中图法分类号] R774.6 **[文献标志码]** B

1 临床资料

患者,男性,57岁,因"右眼突然视力下降2周"于2007年12月19日到我科入院。患者曾于2周前因"腰椎间盘脱位"在院外于全麻下行手术治疗,术中采取俯卧位,手术顺利,时间约2 h。患者麻醉清醒后发现右眼视力下降,伴鼻下方黑影遮挡。未予重视,后为进一步诊治来我院。既往有高血压病史,口服药物血压控制范围在140~150/80~90 mmHg。入院查:一般情况可,血压140/85 mmHg。视力,右眼:0.1,左眼:0.8。右眼结膜无充血,瞳孔圆,直径6 mm,直接对光反射迟钝,间接对光反射存在,眼底:右视盘C/D为0.1,上方视盘色淡,边界欠清,有小的出血点,余网膜未见出血,渗出。动脉细,反光强,A/V=1:2,黄斑中心凹反光存。眼压11.5 mmHg。入院诊断为:①右眼缺血性视神经病变;②右眼高血压性视网膜病变(Ⅰ期)。入院后查FFA提示右眼早期颞上方视盘可见一局限性低荧光区,晚期视乳头强荧光(图1)。Humphery静态视野检查提示:右眼鼻下方可见与生理盲点相连的弓形视野缺损(图2)。血脂检查甘油三酯高于正常。血黏度异常,血沉及C反应蛋白正常。颈部彩色超声多普勒检查未见粥样硬化斑块。头颅CT排除颅内占位性病变。入院后积极予改善微循环(前列地尔注射液10 μg静滴1次/d),降眼压(马来酸噻吗洛尔,2次/d,共10 d)、营养神经(甲钴胺、鼠神经生长因子),于右颞浅动脉旁,皮下注射2 ml复方樟柳碱(1次/d)及激素局部(地塞米松2 mg+山莨菪碱0.2 ml+利多卡因0.1 ml)球后注射,入院后右眼视力改善,至出院时视力达0.2,并感鼻下方黑影较入院时明显变淡。直接对光反应较入院时好转。出院后3个月复查,视力仍为0.2。



A:早期可见视盘颞上方低荧光,局限性荧光充盈不良,可见散在荧光遮蔽,为小出血点;B:晚期视乳头强荧光

图1 脊柱手术致缺血性视神经病变患者眼底荧光造影观察

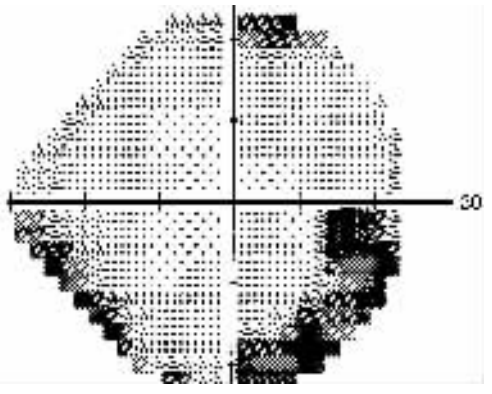


图2 脊柱手术致缺血性视神经病变患者的Humphery静态视野检查结果

[通信作者] 唐 丽,电话:(0851)6773824,E-mail: tleye@yahoo.cn

(下转1270页)