DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.007
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
576 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-0576-04

人衰变加速因子在CHO细胞的表达及其衰变加速活性研究

郭 波[1],郑 萍[1],马正伟[2],许桂莲[1],李 华[1],谢佩蓉[1],吴玉章[1],邹 强[1] (第三军医大学:[1]基础医学部全军免疫学研究所,[2]西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获得稳定表达人衰变加速因子(human decay-accelerating activity, hDAF)的中国仓鼠卵巢(Chinese hamsterovary, CHO)细胞系,观察在补体活化情况下,hDAF对异种细胞的保护作用。方法 构建真核表达载体DAF-pcDNA3.1,用脂质体转染法将其导入CHO细胞,有限稀释法筛选稳定表达hDAF的单细胞克隆,流式细胞仪检测hDAF的表达,C3沉积实验和^{51}Cr释放法测定其促补体衰变活性。结果 成功构建了真核表达载体DAF-pcDNA3.1,并获得了表达hDAF的单细胞克隆,表达hDAF的CHO能减少补体C3的沉积,减弱补体的杀伤作用。结论 获得在细胞膜上稳定表达具功能活性的hDAF的CHO克隆,为进一步研究其结构与功能的关系准备了条件。

关键词:补体;衰变加速因子;CHO细胞;^{51}Cr释放法
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Expression of human hDAF in CHO cells and its decay-accelerating activity

GUO Bo[1], ZHENG Ping[1], MA Zheng-wei[2], XU Gui-lian[1], LI Hua[1], XIE Pei-rong[1], WU Yu-zhang[1], ZOU Qiang[1] ([1]Institute of Immunology; [2]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain Chinese hamsterovary (CHO) cell line expressing human decay-accelerating activity (hDAF) stably and to observe the protective effect of hDAF on heterologous cells under the circumstance of complement activation. Methods The eukaryotic expression vector DAF-pcDNA3.1 was constructed and then transfected into CHO cells by lipofection. Monoclones of cells expressing hDAF stably were screened by the method of limiting dilution. hDAF expression was detected by flow cytometry. The decay-accelerating activity of hDAF was determined by assay of C3 deposition and 51Cr release. Results The expression vector DAF-pcDNA3.1 was successfully constructed, and monoclones of cells expressing hDAF were obtained. CHO cells expressing hDAF could decrease C3 deposition and attenuate the killing effect of activation of the complement system. Conclusion We have obtained CHO cell clones expressing hDAF stably, which is helpful for the further studies of the relationship of the structure with the functions of hDAF.

Key words: complement; human decay-accelerating factor; CHO cell; 51Cr release assay

衰变加速因子(decay-accelerating factor, DAF, CD55)是一种广泛分布于与血清相接触的多种细胞表面的补体调节蛋白,可以抑制补体的活化,使补体不能在细胞膜上形成攻膜复合物,以保护细胞不受自身补体的攻击。已知阵发性夜间血红蛋白尿的病因即是病人红细胞表面缺乏DAF和CD59[1]。近年来,最引人注目的发现是:通过转基因动物技术将人DAF分子等补体调节蛋白表达于异种动物(通常选择猪)细胞表面,可以有效抑制人体补体系统引发的对异种器官的超急性排斥反应[2]。然而,DAF仍存在某些缺陷,比如其有限的衰变加速能力以及缺乏I因子的辅因子活性,限制了DAF的临床应用,其为部分病原微生物受体的角色对异种移植有潜在危险。因而对DAF进行改造是一种较好的选择。为了研究其结构与功能的关系以及进一步对其进行改造,我们首先在中国仓鼠卵巢(Chinese hamsterovary, CHO)细胞表面表达天然人DAF分子的基础上,筛选单细胞克隆,并研究其补体调节功能,为下一步实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 DAF- pBluescript M13-(Amp+)质粒和含有1 848 bp的编码人DAF蛋白完整开放阅读框的cDNA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080032)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30080032)
作者简介:郭 波(1972-),男,湖南省株洲市人,博士,讲师,主要从事补体分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752234-613
通信作者:郑 萍,电话:(023)68752234-613,E-mail:immuno06@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-09-05;修回日期:2003-12-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pBluescript M13 重组质粒由本室保存[3]。*E. coli* DH5α 为本所保存。真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2　主要试剂　限制性内切酶购自 New England 公司, Taq 酶及 T4 DNA 连接酶购自 promega 公司。针对 DAF 不同表位的单抗 DG3 由本室制备[4], PE 标记的抗人 DAF 单抗和 FITC-山羊抗小鼠 C3 多克隆抗体(能与人 C3 及裂解片段结合)分别来自 DIACLONE 公司和 Cappel 公司(ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA), FITC-山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。

1.2　表达载体的构建

根据已报道的人 DAF cDNA 序列, 设计并合成以下引物, P1: 5′-GGA ATT CCG CGC CAT GAC CGT CG-3′, P2: 5′-CCC TCG CTC TAG AGG ATC CTG TGT ATT TTC TTC TTA ACT C-3′, 其中 P1 含有 *Eco*RⅠ 酶切位点, P2 含有 *Xba*Ⅰ 酶切位点。以 DAF-pBluescript M13-(Amp+) 质粒为模板 PCR 扩增出 DAF 成熟蛋白的开放阅读框序列。酶切后克隆到酵母呈现载体 pcDNA3.1(+), 转化 *E. coli* DH5α。回收载体 DAF-pcDNA3.1。酶切及测序鉴定。

1.3　脂质体转染 CHO 细胞

按常规方法。简要如下, 转染前 24 h 按 10^5/瓶的密度铺细胞于 10 ml 培养瓶, 24 h 后用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 加入 DNA 脂溶液孵育 6 min, 弃去 DNA 脂溶液, 加入完全培养基继续孵育 2 d, 更换为加入 G418 的完全培养基, 培养 3~5 d。

1.4　单克隆的筛选及 DAF 的流式细胞仪检测

胰酶消化细胞, 有限稀释法将细胞铺于 96 孔细胞培养板, 使每孔仅有一个细胞, 持续培养, 独立繁殖的克隆用流式细胞仪检测 DAF 的表达。

1.5　C3 沉积实验

空载体和 DAF-pcDNA3.1 转化的 CHO 单细胞克隆, 分别加入兔抗 CHO 细胞的多克隆抗体, 4℃孵育 1h 后, 分别加入 1∶50 用明胶巴比妥缓冲液(GVB)稀释的正常人血清, 30 ℃孵育 30 min, 洗涤细胞后加入 FITC 标记的抗 C3 抗体和 PE 标记的抗人 DAF 单抗, 37 ℃孵育 30 min, 洗涤细胞 2 次, 流式细胞仪检测。

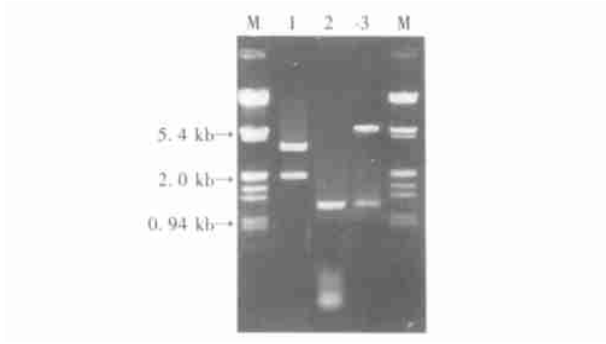
1.6　^{51}Cr 释放法检测 DAF 功能

按常规^{51}Cr 释放法检测。简要如下: 兔抗 CHO 细胞多克隆抗体致敏细胞, 常规^{51}Cr 标记法标记致敏的细胞, 然后 10^4/孔铺 96孔V型板, 分别与不同稀释度的正常人血清30 ℃孵育30 min。离心, 每孔取 100 μl 上清用 γ 计数仪检测放射性强度 cpm 值。细胞杀伤率=(实验组 cpm− 自释放组 cpm)/(最大释放组 cpm− 自释放组 cpm)×100%。

2　结果

2.1　表达载体的构建

以 DAF-pBluescript M13-(Amp+)质粒(含 1.8 kb DAF 全长 cDNA 序列)为模板 PCR 扩增出 DAF 的开放阅读框序列(1.2 kb)。酶切后克隆到酵母呈现载体 pcDNA3.1(+), 转化 *E. coli* DH5α。回收载体 DAF-pcDNA3.1, 酶切鉴定。重组质粒经 *EcoR*Ⅰ+*Xba*Ⅰ 双酶切, 酶切后的片段经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 图谱中清晰可见 1 200 bp 插入片段和 5.4 kb 的 pcDNA3.1 载体片段(图 1)。测序(结果未显示)表明序列完全正确。



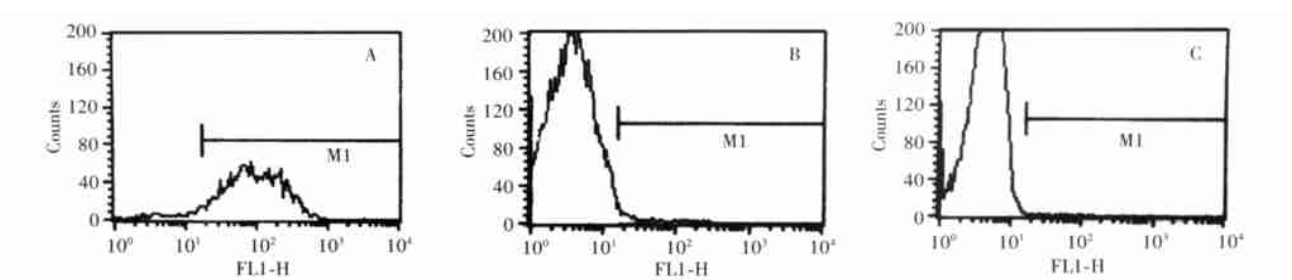
M: λDNA Marker/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ; 1: DAF-pBluescript M13/*Eco*RⅠ; 2: Production of PCR; 3: DAF-pcDNA3.1/*Eco*RⅠ + *Xbn*Ⅰ

图 1　重组质粒 **DAF-pcDNA3.1** 的鉴定

Fig 1　Identification of recombinant plasmid DAF-pcDNA3.1

2.2　单克隆的筛选及 DAF 的检测

经 3 轮有限稀释法对细胞进行克隆, 选取其中一株独立繁殖的克隆用流式细胞仪检测 DAF 的表达。结果如图 2 显示, DAF-pcDNA3.1 转化的 CHO 细胞膜上有 hDAF 的表达(图 2A), 并且细胞均一性好、适合进行 DAF 的功能检测, 而空载体转化的细胞(图 2B)以及没转质粒的 CHO 细胞(图 2C)均没有 hDAF 的表达。



A: CHO/DAF-pcDNA3.1 Cells were stained with anti-hDAF mAb DG3 followed by FITC-labeled goat anti-mouse IgG; B: CHO/pcDNA3.1; C: CHO

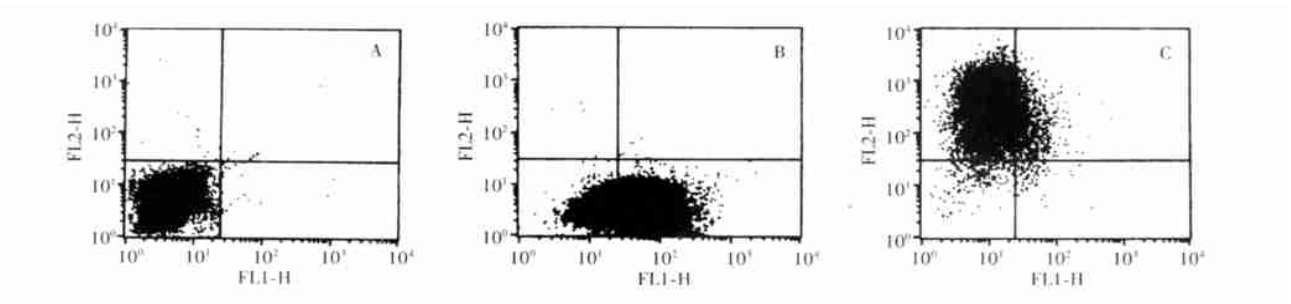
图 2　表达 **hDAF** 的 **CHO** 细胞的流式细胞仪检测

Fig 2　Flow cytometric analysis of CHO expressing DAF

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 DAF 能减少补体 C3 在 CHO 细胞上的沉积

抗原抗体复合物可以从经典途径活化补体系统，C3 是补体级联反应的中心分子，活化的 C3 可以沉积在细胞膜上，因此，检测补体活化的一个常用方法是观察细胞表面补体分子 C3 沉积量的变化。由于 DAF 可以促进 C3/C5 转化酶的衰变，因而可以减少 C3 在细胞膜上的沉积。为此，我们比较了 DAF-pcDNA3.1、空载体 pcDNA3.1 转化 CHO 细胞膜上 C3 沉积的差异。结果如图 3 所示，图 3A 为对照，不用血清处理的 CHO 细胞。空载体 pcDNA3.1 转化的 CHO 细胞，其膜表面沉积的 C3 量较高(图 3B)，而 DAF- pcDNA3.1 转化的 CHO 细胞，由于膜上有 DAF 的表达，其膜上 C3 的沉积显著减少(图 3C)。



A：Control；B：CHO/pcDNA3.1；C：CHO/DAF-pcDNA3.1

图 3 CHO 细胞膜表达的 DAF 对 C3 沉积的影响

Fig 3 Effect of DAF expressed on CHO cell surface on C3 deposition

2.4 DAF 能减轻补体对 CHO 细胞杀伤

补体活化后的结果之一是在细胞膜上形成攻膜复合物，导致细胞杀伤，细胞内物质释放。DAF 可以促进 C3/C5 转化酶的衰变，因而可以减少攻膜复合物的形成，保护细胞免受补体攻膜复合物的杀伤。为此，我们采用常规[5] Cr 释放实验检测 DAF 对 CHO 细胞的补体杀伤保护效果，结果如图 4 所示。DAF-pcDNA3.1 转化的 CHO 细胞，由于细胞膜上有 hDAF 的表达，可以明显减少补体对细胞的杀伤。而空载体转化细胞，由于没有 hDAF 的表达，在每个血清稀释度，其被杀伤的比例显著高于 DAF 表达细胞。

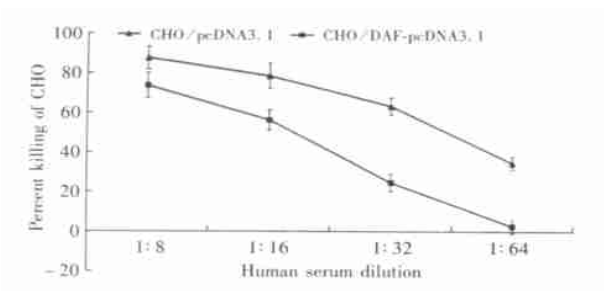


图 4 CHO 细胞膜表达的 DAF 对补体杀伤活性的影响

Fig 4 Effect of DAF expressed on CHO cell surface on complement killing activity

3 讨论

DAF 是可通过阻断补体激活途径中 C3/C5 转化酶的组装以及促进其衰变，保护自身宿主细胞免受补体系统的攻击。除参与 PNH 的发病机制外，DAF 的表达异常在生殖免疫、肿瘤免疫、自身免疫性疾病等病理生理过程中也发挥重要作用。细胞表面表达人 DAF 分子的转基因动物可以有效抑制人体补体系统对异种器官的超急性排斥反应[2,5]，表明在异种移植中 DAF 有很好的应用前景。然而，有限的抑制能力及缺乏 I 因子的辅因子活性限制了 DAF 的临床应用。另外，DAF 是一些病毒的受体，比如：埃可病毒、柯萨奇病毒[6,7]。这些病毒有可能更易于通过表达有 DAF 的宿主动物器官传染给人[8,9]。研究 DAF 结构与功能的关系以及进一步对其进行改造以增强活性、去除病毒结合表位是当今研究的重点之一。

要研究 DAF 的结构与功能首先需要建立细胞模型。DAF 是一种具有同源限制的补体调控蛋白，目前，研究具有同源限制的补体调控蛋白的结构与功能，通常选用异种细胞——中国仓鼠卵巢(CHO)细胞作模型，因为 CHO 细胞不表达人 DAF，对人补体溶破比较敏感，因而，在 CHO 细胞膜上表达 hDAF，建立稳定表达 hDAF 的细胞克隆可以很好的用来研究其结构与功能。此外，异种器官移植中的超急性排斥反应的发生，主要就是由于异种细胞上无人补体调控蛋白的表达，选用异种的 CHO 细胞做模型，也便于在以后筛选 DAF 高活性突变体中比较 DAF 对异种细胞的保护作用。为此，我们构建了真核表达载体，成功地在 CHO 细胞表达了 hDAF，并通过有限稀释法筛选到细胞膜上稳定表达 hDAF 的细胞克隆。为了进一步了解膜表达的 hDAF 是否具有功能，我们又通过 C3 沉积实验和[51] Cr 释放实验证实膜表达的 hDAF 能很好的保护异种 CHO 细胞免受人补体系统的杀伤。以上结果说明我们获得

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

了细胞膜上稳定表达的 hDAF 的 CHO 细胞克隆, 为进一步研究其结构与功能准备了条件, 同时可以作为研究 DAF 相关病毒的细胞模型。

参考文献:

[1] Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease[J]. Am J Hematol, 1999, 62(3): 175—182.

[2] Chen R H, Naficy S, Logan J S. *et al*. Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates[J]. Xenotransplantation, 1999, 6(3): 194—200.

[3] 郭　波, 谢佩蓉, 邹　强, 等. 酵母表面呈现的人 CD55 的鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 765—767.

[4] 邹　强, 谢佩蓉, 郑　萍. 抗人 DAF 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(2): 122—124.

[5] Schmidt P, Goto M, Le Mauff B, *et al*. Adenovirus-mediated expression of human CD55 or CD59 protects adult porcine islets from complement-mediated cell lysis by human serum[J]. Transplantation, 2003, 75(5): 697—702.

[6] He Y, Lin F, Chipman P R, *et al*. Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus-receptor complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(16): 10325—10329.

[7] Yanagawa B, Spiller O B, Choy J, *et al*. Coxsackievirus B3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice[J]. Lab Invest, 2003, 83(1): 75—85.

[8] Mollnes T E, Fiane A E. Xenotransplantation: How to overcome the complement obstacle[J]? Mol Immunol, 1999, 36(4—5): 269—276.

[9] Fry E E, Knowles N J, Newman J W, *et al*. Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation[J]. J Virol, 2003, 77(9): 5475—5486.

(编辑　王　红)

(上接 572 页)

胞和胆管上皮细胞存在 HLA-DR 表达, 肝细胞未见 HLA-DR、-DQ 表达。36 例慢性乙型肝炎肝组织中除上述细胞有表达外, 8 例肝细胞检出有 HLA-DR 表达, 阳性率为 22.22%, 7 例肝细胞检出有 HLA-DQ 表达, 阳性率为 19.44%。HLA-DR、-DQ 主要在肝细胞膜上表达, 部分在细胞浆表达。HLA-DR、-DQ 阳性肝细胞呈灶状或散在分布, 主要位于汇管区周围碎片状坏死区和小叶内灶性坏死区。免疫组化双重染色发现, HLA-DR、-DQ 和 HBcAg 同时阳性的肝细胞变性、坏死明显。

2.2　HLA-DR、-DQ 表达与慢性乙型肝炎病理程度的关系

HLA-DR 阳性表达率与慢性乙型肝炎病理严重程度密切相关, 中度和重度肝炎肝细胞 HLA-DR 抗原表达阳性率(37.5%)明显高于轻度肝炎(10%), 两者相比差异显著($\chi^2=3.89$, $P<0.05$)。HLA-DQ 阳性表达率与慢性乙型肝炎病理严重程度密切相关, 中度和重度肝炎肝细胞 HLA-DQ 抗原表达阳性率(37.5%)明显高于轻度肝炎(5%), 两者相比差异显著($\chi^2=5.99$, $P<0.05$)。

3　讨论

HLA Ⅱ类分子在正常情况下仅分布于机体的某些免疫细胞表面, 如 B 细胞、活化的 T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞、郎罕细胞等, 但在某些病理状态下, 如病毒感染、自身免疫性疾病、良恶性肿瘤等, 机体其他细胞也可检出[1,2]。正常人的肝细胞基本不表达或仅微量表达 HLA 抗原, 在慢性乙型肝炎时肝细胞可有不同程度的 HLA 抗原表达异常。

HLA-DR 和-DQ 在肝细胞及窦内皮细胞等的表达与肝炎发病机制的关系至今尚不十分清楚, 可能的机制为[3]: ① 在对 HBV 特异细胞免疫的研究表明, 除 CD_8^+ 细胞毒 T 细胞(CTL)外, 还存在 HBV 特异的 CD_4^+ CTL, CD_4^+ CTL 识别靶抗原时受 HLA-Ⅱ分子限制, 因此乙型肝炎时肝细胞 HLA-DR 和-DQ 异常表达, 有助于 CD_4^+ CTL 对 HBV 感染肝细胞的识别和杀伤。② HLA-DR 和-DQ 在肝细胞表达可使肝细胞成为抗原提呈细胞, 或使 Th 细胞与肝细胞反应, 促进 CTL 对肝细胞的攻击。③ HLA-DR 和-DQ 多在巨噬细胞等抗原提呈细胞内表达, CD_4^+ T 细胞通过识别抗原提呈细胞提呈的特异抗原及 HLA-DR 和-DQ 分子而发挥免疫激活功能。④ 乙型肝炎发病中存在一定程度的自身免疫机制, HLA-DR 和-DQ 异常表达可能与自身免疫反应有关。

本研究表明正常肝组织中肝细胞未见 HLA-DR 和-DQ 表达, 而各型慢性乙型肝炎肝细胞均有 HLA-DR 和-DQ 表达, 中度和重度肝炎 HLA-DR 和-DQ 表达阳性率均明显高于轻度肝炎, HLA-DR 和-DQ 阳性肝细胞主要位于汇管区周围碎片状坏死区和小叶内灶性坏死区。以上结果说明肝炎时 HLA-DR 和-DQ 过度表达可能与病毒活动度和肝细胞坏死机制有关, 在一定程度上参与了乙型肝炎的发病。HBcAg 表达阳性的肝组织中肝细胞 HLA-DR 或/和-DQ 表达阳性, 说明 HLA-DR 或/和-DQ 的表达与病毒复制有关。此外, HLA-DR(-DQ)和 HBcAg 同时阳性的肝细胞变性、坏死明显, 提示在慢性乙型肝炎的免疫损伤机制中两者可能具有协同作用。

关键词: 慢性乙型肝炎; HLA-DR 抗原; HLA-DQ 抗原; 免疫组织化学

中图法分类号: R512.620.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Feinmesser M, Sulkes A, Morgenstern S, *et al*. HLA—DR and beta 2 microglobulin expression in medullary and atypical medullary carcinoma of the breast: histopathologically similar but biologically distinct entities[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(4): 286—291.

[2] Loercher A E, Nash M A, Kavanagh J J, *et al*. Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells[J]. J Immunol, 1999, 163(11): 6251—6260.

[3] Ahn S H, Han K H, Park J Y, *et al*. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea[J]. Hepatology, 2000, 31(6): 1371—1373.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net