DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.005
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0667-03

论著

人LIGHT基因的克隆及其在293T细胞中的表达

姜 曼[1],黄 钢[2],黎万玲[1],白 云[2] (第三军医大学基础医学部:[1]全军免疫学研究所,[2]分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人LIGHT分子的全长cDNA,构建重组真核表达质粒pCI-neo-LIGHT并在293T细胞上获得稳定表达。方法 从人T细胞cDNA文库中用PCR技术克隆人LIGHT全长cDNA,装入T-Easy载体,测序证实后,将LIGHT cDNA装入质粒pCI-neo中构建真核表达载体。用电穿孔法转染293T细胞,经G418筛选后,用流式细胞仪检测LIGHT分子的表达。结果 测序证实克隆的LIGHT全长cDNA阅读框正确完整,酶切证实LIGHT-pCI-neo中LIGHT插入方向正确。转染的293T细胞经G418筛选3个月后,流式细胞仪检测有78.69%的细胞表达人LIGHT分子。结论 成功克隆LIGHT基因并获得稳定表达膜型LIGHT分子的293T细胞系。

关键词:LIGHT;293T细胞;基因克隆;真核表达
中图法分类号:R394.2;R392.12 文献标识码:A

Cloning of human LIGHT gene and expression of the cloned molecule on 293T cells

JIANG Man[1], HUANG Gang[2], LI Wan-ling[1], BAI Yun[2] ([1]Institute of Immunology, [2]Department of Molecular Genetics, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone the full length cDNA of human LIGHT and to construct the recombinant eukaryotic expression plasmid pCI-neo-LIGHT for the stable expression on 293T cells. Methods Human LIGHT cDNA was cloned from a normal human activated T cell cDNA library phAD.CAD by PCR. After sequencing, LIGHT cDNA was inserted into plasmid pCI-neo for the construction of the eukaryotic expression. The recombinant was transfected into 293T cells by electroporation. The expression of LIGHT on the surface of 293T cells was detected by flow cytometry after screening with G418. Results Sequencing confirmed that ORF of LIGHT gene was intact and right. Restrictive enzyme digestion proved that LIGHT gene was inserted into the recombinant plasmid of LIGHT-pCI-neo correctly. FACS analysis revealed that about 78.69% 293T cells expressed LIGHT protein on the cell surfaces at 3 months after screening with G418. Conclusion LIGHT gene has been cloned successfully, and a 293T cell line expressing LIGHT protein on its membrane surface has been obtained.

Key words: LIGHT; 293T cell line; gene cloning; eukaryotic expression

LIGHT是一个新发现的TNF超家族成员[1],又名TNFSF-14或HVEM-L[2~4],为一种分子量为29×10³的Ⅱ型跨膜糖蛋白,多以三聚体的形式诱导表达于活化的T细胞和选择性地表达于未成熟DC上,是一个多功能多效应分子,兼具共刺激和细胞毒两方面的活性。根据靶细胞上表达的受体与T细胞所分泌的细胞因子的不同,可启动不同的生物学效应。现有研究发现,LIGHT在淋巴器官的发生[5]、肿瘤免疫[2,6]、自身免疫病[5,7]、移植排斥反应[8]和抗病毒免疫[1]中,均发挥重要的作用。为进一步研究LIGHT在各种病理生理过程中的作用机制,我们克隆并表达了人LIGHT分子。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人的活化T细胞cDNA文库phAD.CAD和质粒pCI-neo,均由美国NIH郑力新教授惠赠。质粒载体pGEM®-T Easy Vector购自Promage公司。核酸酶类购自大连宝生物公司和上海生工公司。电穿孔仪为德国Eppendorf公司产品。G418购自德国Roche公司。293T细胞由本室保存。小鼠抗人LIGHT单克隆抗体(mAb)亦由美国NIH郑力新教授惠赠。HRP标记的羊抗鼠IgG购自北京中山公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计合成 针对LIGHT的完整ORF,利用引物设计软件Primer Premier 5.00进行设计。上游引物P1:5′-CTTGGGCATGGAGGAGAGTGTCGTA-3′,下游引物P2:5′-TCACACCAT-

基金项目:中关村新药基金资助项目(2000)
Supported by the New Medicine Foundation in Zhongguancun (Beijing, China, 2000)
作者简介:姜 曼(1963-),女,黑龙江省方正县人,实验师,主要从事分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752238-617
通信作者:白云,电话:(023)68752224,E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-08;修回日期:2003-09-28

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

GAAAGCCCCGAAGTAAG-3′，两端未加限制性酶切位点。引物由大连宝生物公司合成。

1.2.2 LIGHT-pGEM-T Easy 的构建与鉴定 利用引物 P1 和 P2 直接从文库中用 *Taq* 酶扩增 LIGHT cDNA 全长，100 μl 体系，反应条件：94 ℃ 2 min→{94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，进行 30 个循环}→72 ℃保温 8 min。将产物经电泳切胶回收后，直接与 pGEM®-T Easy 载体连接，并转化 DH5α 宿主菌。经 Amp^r 和蓝白斑筛选出阳性克隆后，用 *Eco*R Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 分别进行常规酶切鉴定，所获阳性重组子送上海基康公司测序。

1.2.3 LIGHT-pCI-neo 的构建与鉴定 将测序证实的 LIGHT cDNA 全长用 *Eco*RⅠ 酶从 LIGHT-pGEM-T Easy 载体上酶切下来，经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收，紫外测浓度。同时用 *Eco*RⅠ 酶使质粒 pCI-neo 线性化，经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收，紫外测浓度。再将 LIGHT 全长 cDNA 与线性化空载体 pCI-neo 连接，转化 DH5α 宿主菌。经 Amp^r 筛选出阳性克隆后，用 *Eco*RⅠ 和 *Kpn*Ⅰ 分别进行常规酶切鉴定。

1.2.4 电穿孔法转染 293T 细胞及 G418 筛选 用碱裂解法小量抽提质粒 LIGHT-pCI-neo 及空载体 pCI-neo 备用。293T 细胞于 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基中培养至对数生长期，穿孔前 1 d 传代，再培养至次日约 60% 满底。按 Eppendorf Multiporator® 使用说明书（No. 4308 915.029-11/1999，www.brinkmann.com）分别将 LIGHT-pCI-neo 及对照质粒转染至 293T 细胞中，37 ℃培养 24 h 后以胰酶消化按 1∶3 比例传代，加 G418 400 mg/L，培养约 1 周后，将 G418 浓度增至 800 mg/L，继续培养约 11 周，收集细胞进行检测。

1.2.5 流式细胞仪检测 LIGHT 的表达 转染后的 293T 细胞经 G418 筛选约 3 个月后，以胰酶消化后收集细胞，用 0.01 mol/L PBS（pH 7.4）洗涤 2 次，以 200 μl 浓度为 2 mg/L 的小鼠抗人 LIGHT 单抗重悬细胞，4 ℃孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次，以 50 μl 浓度为 10 mg/L 的 FITC-羊抗小鼠 IgG 重悬细胞，4 ℃孵育 30 min。再以 PBS 洗涤 2 次后，0.5% 多聚甲醛固定，用 FACS 440 型流式细胞仪检测 293T 细胞表面 LIGHT 分子的表达情况。以转染空空载体 pCI-neo 的 293T 细胞为对照。

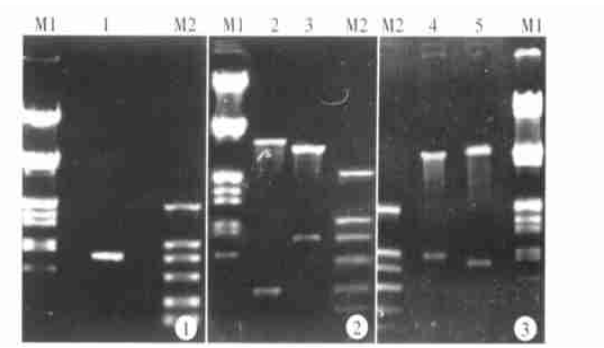
2 结果

2.1 LIGHT 全长 cDNA 的扩增及 LIGHT-T-Easy 重组子的鉴定

以活化 T 细胞 cDNA 文库为模板，用 PCR 扩增编码 LIGHT 全长 240 aa 的 DNA 序列，扩增产物的电泳结果显示特异性较好，见图 1。切胶回收后，连入载体 pGEM-T Easy。结合软件 SimVector1.2 电子酶切分析，对筛选出的阳性重组子进行酶切鉴定，见图 2：*Eco*RⅠ 酶切获得 3 000、750 bp 两个片段，*Pst* Ⅰ 酶切获得 3 490、202 和 52 bp 3 个片段，与电子酶切结果一致，插入 LIGHT cDNA 的起始密码子在 T Easy 载体多克隆位点的靠近 SP6 启动子一侧，为反向插入。而相应的正向插入的阳性重组子经 *Pst* Ⅰ 酶切应出现 3 171、521、52 bp 3 个片段。将双向测序结果与公布的 LIGHT cDNA 的序列（AF064090/AF036581）相比较，发现仅+147T 突变为 C。但因该碱基在 GCT 密码子（丙氨酸）的第 3 位，不改变编码氨基酸，属于同义突变（Synonymous mutation）。至此，即获得 ORF 完整的 LIGHT 全长编码基因。

2.2 真核表达载体 LIGHT-pCI-neo 的酶切鉴定

结合软件 SimVector1.2 电子酶切分析，对筛选出的阳性重组子进行酶切鉴定，见图 3：*Eco*RⅠ 酶切获得 5 474、750 bp 两个片段，*Kpn*Ⅰ 酶切获得 5 223、941、60 bp 3 个片段，该重组子与预期的正向插入 LIGHT-pCI-neo 重组子的电子酶切结果一致，即插入的 LIGHT cDNA 的起始密码子在 pCI-neo 载体多克隆位点的靠近 T7 启动子一侧，可以正向转录及翻译表达。



M1：λDNA/*Eco*RⅠ＋*Hind* Ⅲ markers（21 226、5 148、4 973、4 268、3 530、2 027、1 904、1 584、1 375、947、821、and 564 bp，from top to bottom）；M2：DL-2000 markers（2 000、1 000、750、500、250、and 100 bp，from top to bottom）；1：LIGHT cDNA（730 bp）；2：LIGHT-T-Easy/*Pst*Ⅰ（3 490、202、52 bp）；3：LIGHT-T-Easy/*Eco*RⅠ（3 000、750 bp）；4：LIGHT-pCI-neo/*Kpn*Ⅰ（5 223、941、60 bp）；5：LIGHT-pCI-neo/*Eco*RⅠ（5 474、750 bp）

图 1 LIGHT 全长 cDNA 的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of full length LIGHT cDNA

图 2 LIGHT-T-Easy 的酶切鉴定

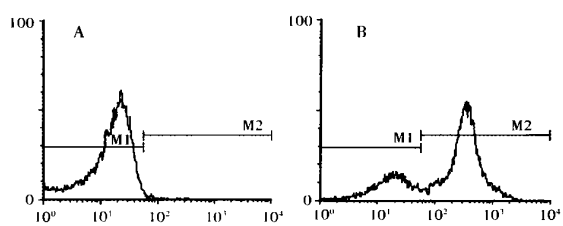
Fig 2 Restrictive enzyme digestion of LIGHT-T-Easy

图 3 LIGHT-pCI-neo 的酶切鉴定

Fig 3 Restrictive enzyme digestion of LIGHT-pCI-neo

2.3 LIGHT 蛋白在 293T 细胞表面的表达检测

流式细胞仪检测结果表明，转染后 293T 细胞稳定表达了 LIGHT 分子，膜表面表达 LIGHT 的细胞其百分率在 78.69% 以上，见图 4。



A：Control，293T cells transfected with empty vector pCI-neo；B：Ⅲ293T cells transfected with LIGHT-pCI-neo

图 4 用流式细胞仪检测 293T 细胞表面 LIGHT 分子的表达

Fig 4 Expression of LIGHT molecule on the surface of 293T cells by flow cytometry

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

3　讨论

LIGHT(TNFSF14)是 1998 年发现的促 T 细胞活化的共刺激分子, 属于 TNF 超家族(TNFSF)的成员, 主要表达于未成熟 DC, 单核细胞, 粒细胞及活化的 T 细胞[1,2]。作为一种可诱导表达的, 与 HSV 的包膜糖蛋白 D 竞争结合 T 细胞上 HVEM 受体的淋巴毒素的同源体(homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes, LIGHT), LIGHT 通过与不同靶受体结合而分别发挥共刺激或细胞毒等多种生物活性。目前已经发现的 LIGHT 天然受体有 3 种-HVEM(TR2)、LTβR 和 TR6/DcR3, 它们都是 TNFR 超家族成员。其中: ①HVEM 主要分布于各种免疫细胞的细胞膜上, 它与 LIGHT 结合后, 共刺激诱导以 IFN-γ、GM-CSF 及 IL-8 等分泌为主的 Th1 型免疫应答并激发特异性 $CD8^+$ CTL 反应。LIGHT-HVEM 介导的效应不依赖 CD28 共刺激途径, 产生的信号主要作用于 T 细胞活化的克隆扩增阶段[9]。②LTβR 是 LIGHT 的另一种受体, 它在 T 细胞上无表达, 而主要表达于淋巴组织的基质细胞及一些非淋巴相关性造血细胞。LTβR 主要通过募集活化 TRAF3 直接诱导细胞凋亡并介导 IL-8、RANTES 的分泌。目前发现, 许多肿瘤细胞上都有 LTβR, LIGHT 通过与之结合可以直接诱导肿瘤细胞凋亡[6,10]。③TR6/DcR3 是一个 LIGHT 的可溶性诱饵受体(decoy receptor), 主要由肺组织和结肠癌细胞表达, 它通过与 LIGHT 结合从而调节 HVEM 和 LTβR 介导的功能, 进而对免疫应答和免疫自稳进行调节, 并可作为肿瘤免疫逃逸的手段之一而发挥作用[11,12]。

体外实验证实 LIGHT 对许多肿瘤细胞系都表现出显著的杀伤效应[6,10,13]: 在某些肿瘤细胞系如结肠癌 HT29.14S、恶性黑色素瘤 A375 等, 用可溶性 LIGHT 融合蛋白交联肿瘤细胞的 LTβR 受体就足以抑制肿瘤生长并诱导其凋亡; 而在有些肿瘤细胞系乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 等则需要 HVEM 与 LTβR 的协同激活。用裸鼠和 SCID 小鼠通过 LIGHT 转基因方式也证实了其抗肿瘤效果; 此外, 虽然肥大细胞瘤 P815 细胞不表达 LTβR, 但用 LIGHT cDNA 多次瘤体内转染 P815 荷瘤小鼠后, 也能激发起小鼠的 CTL 活化, 使已经形成的肿瘤结节缩小。来自不同实验室的体内外实验结果均表明, LIGHT 对包括肺癌、黑色素瘤、结肠癌、肝癌、乳腺癌和宫颈癌等多种肿瘤都能产生抗瘤效应, 它是目前所知的抗肿瘤效果最好的免疫分子之一, 可望开发成为治疗各种肿瘤的新型治疗分子, 具有广阔的应用前景。

本研究中, 我们采用 PCR 方法克隆了 LIGHT 基因, 并构建了其真核表达质粒 LIGHT-pCI-neo, 用电穿孔法转染 293T 细胞, 并经过 G418 筛选获得可稳定表达膜 LIGHT 蛋白的 293T 细胞系, 探索了将来将 LIGHT 基因直接转染肿瘤细胞的可行性, 为将 LIGHT 用于肿瘤的免疫治疗提供了实验基础, 并建立了一个理想的研究 LIGHT 功能的细胞模型。

参考文献:

[1] Mauri D N, Ebner R, Montgomery R I, *et al*. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator[J]. Immunity, 1998, 8(1): 21—30.

[2] Harrop J A, McDonnell P C, Brigham B M, *et al*. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27548—27556.

[3] Misawa K, Nosaka T, Kojima T, *et al*. Molecular cloning and characterization of a mouse homolog of human TNFSF14, a member of the TNF superfamily[J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 89(1-2): 89—91.

[4] Granger S W, Butrovich K D, Houshmand P, *et al*. Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis [J]. J Immunol, 2001, 167(9): 5122—5128.

[5] Wang J, Chun T, Lo J C, *et al*. The critical role of LIGHT, a TNF family member, in T cell development[J]. J Immunol, 2001, 167(9): 5099—5105.

[6] Zhai Y, Guo R, Hsu T L, *et al*. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses *in vivo* tumor formation via gene transfer[J]. J Clin Invest, 1998, 102(6): 1142—1151.

[7] Wang J, Lo J C, Foster A, *et al*. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT[J]. J Clin Invest, 2001, 108(12): 1771—1780.

[8] Ye Q, Fraser C C, Gao W, *et al*. Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival[J]. J Exp Med, 2002, 195(6): 795—800.

[9] Morel Y, Truneh A, Sweet R W, *et al*. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2479—2486.

[10] Rooney I A, Butrovich K D, Glass A A, *et al*. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14307—14315.

[11] Yu K Y, Kwon B, Ni J, *et al*. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 13733—13736.

[12] Zhang J, Salcedo T W, Wan X, *et al*. Modulation of T-cell responses to alloantigens by TR6/DcR3[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1459—1468.

[13] Hehlgans T, Mannel D N. Recombinant, soluble LIGHT (HVEM ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells [J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(5): 333—338.

(编辑　刘洪娥)

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