DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.043
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1343-03

论著

人CD137分子基因克隆及其在COS-7细胞中表达的研究

黎万玲,黄 钢,姜 曼,白 云 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人CD137分子的编码序列,将其重组入真核表达载体,并表达于COS-7细胞。方法 从活化的人T细胞cDNA文库中以PCR方法克隆编码人CD137的编码序列,对其序列进行测定。将测序正确的CD137编码序列克隆入真核表达载体PCI-neo,构建重组表达载体。采用脂质体法转染COS-7细胞,用流式细胞仪检测CD137分子的表达。结果 PCR方法扩增出一800 bp左右的基因片段,插入PCI-neo构建重组表达载体后,经序列测定证实扩增的片段为人CD137编码序列。将重组子转染COS-7细胞,流式细胞仪检测显示有27.11%的细胞表达人CD137分子。结论 成功地克隆并在COS-7细胞中表达了CD137分子。

关键词:CD137;COS-7细胞;基因表达
中图法分类号:R329.24;R394-3;R394.2 文献标识码:A

Cloning of human CD137 molecule and its expression on COS-7 cells

LI Wan-ling, HUANG Gang, JIANG Man, BAI Yun (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone full-length human CD137 encoding sequence and to express functional CD137 molecule on the COS-7 cells. Methods PCR technique was used to clone the full-length DNA encoding CD137 molecule from human T cell cDNA library. The PCR product was digested and inserted into PCI-neo vector and sequenced. The right recombinant was transfected into COS-7 cell with lipofectamine reagent. The expression of CD137 molecule on the membrance of COS-7 cells was detected with FACS. Results A fragment about 800bp was cloned from human T cell cDNA library, and was subsequently digested and cloned into PCI-neo vector. Sequence analysis demonstrated that the fragment cloned fits in with the published CD137 encoding sequence. FACS revealled that 27.11% cells expressed human CD137 molecules. Conclusion CD137 is cloned successfully and expresses in COS-7 cells.

Key words: CD137; COS-7 cell; gene clone and expression

CD137是人类与小鼠4-1BB同源的细胞表面分子,主要表达于活化的$CD4^+$及$CD8^+$T细胞,属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员[1]。其配体表达于巨噬细胞、单核细胞、DC、B细胞及活化的T细胞[2,3]。CD137与CD137配体是除CD28-B7外的另一对重要的介导T细胞活化的共刺激分子,在维持活化的T细胞,尤其是CTL细胞的功能方面具有重要的意义。此外,研究发现CD137对不同状态的T细胞可发挥促进增殖或诱导凋亡的多样性调节作用,在特定的情况下,也可以提供不依赖CD28-B7信号的另一条共刺激信号途径,对T细胞介导的免疫应答产生重要的影响[4]。

目前,有关CD137在自身免疫性疾病发病机制中的意义,以及通过CD137共刺激信号激发机体抗肿瘤效应的研究倍受关注[5~7]。本研究应用基因工程技术,克隆编码人CD137分子基因的编码序列,构建真核细胞重组表达载体,通过基因转染,使其在COS-7细胞中获得高表达,为进一步研究CD137的功能,探讨其在肿瘤免疫和自身免疫性疾病中的地位和作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒和抗体

活化的人T细胞cDNA文库及真核表达载体PCI-neo由美国NIH郑立新教授惠赠;COS-7细胞购自上海细胞研究所;鼠抗人CD137单克隆抗体购自Ancell公司;FITC标记羊抗鼠IgG购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 试剂和试剂盒

T4连接酶及限制性内切酶*EcoR*Ⅰ、*Xba*Ⅰ购自Promega公司;*Taq*酶购于PE公司;dNTP和UNIQ-10 DNA回收试剂盒购自上海生物工程有限公司;引物由大连宝生物公司合成;High Pure质粒提取试剂盒、脂质体DOTAP购自Roche公司。

1.3 PCR扩增人CD137cDNA

根据文献[8]要求设计引物。上游引物为:5′-CG GAATTC ATCATGGGAAACAG-3′;下游引物为:5′-TGC TCTAGA CAGCCC-TATTGACTTCC-3′。上述带下划线部分序列分别为*EcoR*Ⅰ和*Xba*Ⅰ酶切位点。此两位点与PCI-neo上的相应多克隆位点相吻合。PCR循环以人T细胞cDNA文库为模板,循环条件为:95℃变性2 min—Auto touchdown:94℃ 30 s;65℃~50℃ 30 s;72℃ 1 min,共15个循环—94℃ 30 s;55℃ 30 s;72℃ 1 min,共30个循环—72℃ 10 min。产物于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度和分子量大小。

1.4 CD137重组质粒的构建

UNIQ-10 DNA回收试剂盒回收PCR产物。提取质粒载体PCI-neo,然后用*EcoR*Ⅰ和*Xba*Ⅰ对质粒和纯化后的PCR产物分

作者简介:黎万玲(1974—),女,四川省达川市人,助理实验师,主要从事补体学及分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752238
收稿日期:2002-03-27;修回日期:2002-06-10

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

别进行双酶切。酶切产物用 UNIQ－10 DNA 回收试剂盒回收，紫外分光光度计上定量载体和 PCR 两种双酶切产物量。然后按 3∶1(CD137∶PCI-neo)的摩尔比混合，16℃连接反应 4 h。置 70℃ 10 min 以终止反应。将连接产物转化感受态 DH-5α，氨苄平板筛选。取阳性单克隆进行扩增，抽提重组 CD137-PCI-neo 质粒备用。

1.5 重组质粒的鉴定

重组质粒 *EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ 双酶切，然后在 1% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定目的片段是否插入。鉴定正确的克隆送基康公司测序，上游测序引物为 T7 启动子序列，下游测序引物为 T3 启动子序列。

1.6 脂质体法转染 COS-7 细胞

COS-7 细胞于 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基中培养至对数生长期，转染前 1 d 传代，再培养至次日 40% ~ 60% 满底。按 DOTAP 使用说明书将 CD137-PCI-neo 转染至 COS-7 细胞中，37℃培养 24 h 后以胰酶消化按 1∶3 比例传代，继续培养 48 h，收集细胞进行检测。

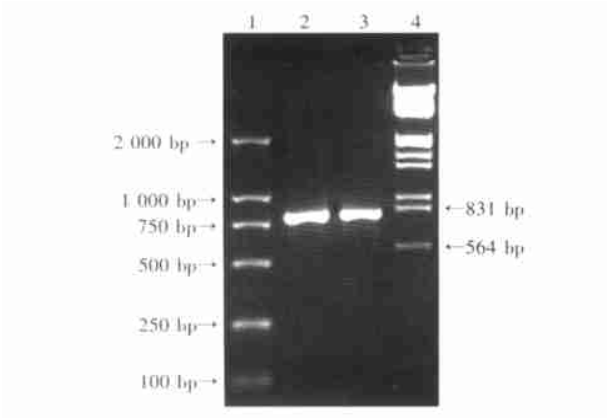
1.7 流式细胞仪检测 CD137 的表达

待转染后的 COS-7 细胞生长 72 h 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 按 1∶500 稀释的小鼠抗人 CD137 单抗重悬细胞，4℃孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次，以 200 μl 按 1∶100 稀释的 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 COS-7 细胞表面 CD137 分子的表达。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的片段

以 T 细胞 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，可见清楚的约 800 bp 的特异扩增带，片段大小与理论预期一致，见图 1。



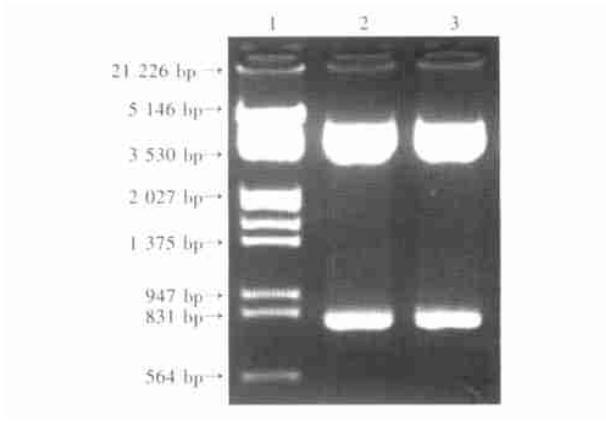
Lane 1: DL2000 PCR markers; Lane 2, 3: PCR product of CD 137 (808bp); Lane 4: λDNA/ *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ marker

图 1 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of PCR product on 1% agarose gel

2.2 表达载体的构建及目的片段的测序结果

用 *EcoR* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 分别对 PCR 扩增片段及 PCI-neo 载体双酶切，酶切产物经 T4 连接酶连接，转化 DH5α 后，在含氨苄青霉素的平板上可见分布均匀、形态大小均一的 10 余个阳性单克隆细菌；而对照平板上未见任何菌落生长。挑取阳性单克隆菌落，扩增后用 High Pure 质粒提取试剂盒提取质粒，用 *EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ 进行酶切分析，筛选出含目的片段的阳性克隆菌株，见图 2。并进一步用测序的方法进行鉴定。测序结果显示所克隆的 DNA 序列与已经报道的 CD137 编码序列完全一致。



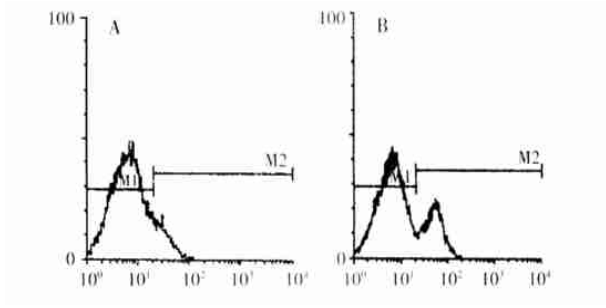
Lane 1: λ DNA/ EcoR1＋ Hind Ⅲ marker; Lane 2, 3: EcoR1/ Xba1 double digested products of recombinant plasmids(5 400 bp and 808 bp)

图 2 重组质粒 ***EcoR*** Ⅰ / ***Xba*** Ⅰ 双酶切在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 2 Eletrophoresis of *EcoR* Ⅰ / *Xba* Ⅰ double digested product of recombinant plasmids on 1% agarose gel

2.3 CD137 分子在 COS-7 细胞表面的表达鉴定

流式细胞仪检测结果表明，转染后 COS-7 细胞表达了 CD137 分子，表达 CD137 的细胞率为 27.11%，见图 3。



A: Control; B: CD137/PCI-neo Recombinatant

图 3 流式细胞仪检测 **COS-7** 细胞表面 **CD137** 分子的表达

Fig 3 Flow cytometric analysis of COS-7 for surface expression of human CD137

3 讨论

共刺激分子在 T 细胞活化等免疫反应过程中的作用越来越受到人们的注视。CD137 及其配体因在机体抗肿瘤免疫及自身免疫病中发挥重要作用而成为该领域的研究热点问题之一。而 CD137 基因的克隆及细胞表达模型的构建是研究其重要的生物学功能的前提条件。

CD137 结构上属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员，为Ⅰ型膜糖蛋白。编码人 CD137 分子的基因位于染色体 1p36.1，其 cDNA 总长 1.44 kb，蛋白质由 255 个氨基酸组成，第 1 ~ 17 位氨基酸为信号肽，紧

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

接着的是 169 个氨基酸的胞外区，第 187～213 位为疏水的跨膜区，最后 42 个氨基酸是胞内区。由于主要表达于活化的 T 细胞、胸腺细胞、NK 细胞、嗜酸细胞及上皮内的淋巴细胞，因此本实验中我们以活化的人 T 细胞 cDNA 文库为模板，采用 PCR 的方法独立扩增除了编码人 CD137 的基因片段。基因测序结果证实其序列与已经公布的 CD137 编码序列完全吻合。说明用这种方法获得需要的基因片段是可行的。

为了进一步验证我们所克隆的 CD137 分子能否正确的表达，同时也为了获得表达人 CD137 的细胞模型，我们将克隆到的 CD137 分子导入真核表达载体 PCI-neo，并用转染效率较高的脂质体转染的方法将重组基因片段导入 COS-7 细胞，经过短暂的培养后，收集细胞进行 CD137 表达的检测。结果我们用商品化的 CD137 的抗体在 COS-7 细胞的表面检测到了我们转染的 CD137 分子，从而证明我们克隆的 CD137 基因能够在细胞内正确表达。同时转染的结果也为我们提供了一个理想的研究 CD137 功能的细胞模型。

总之，本研究利用基因工程的方法，将 CD137 分子 cDNA 的完整阅读框克隆到真核表达载体 PCI-neo 构建成重组表达载体，用 COS-7 细胞表达出来，为进一步研究该分子机理及在肿瘤免疫、自身免疫性疾病中的地位和作用奠定了基础。

参考文献：

[1] Schwarz H, Tuckwell J, Lotz M. A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis factor receptor family[J]. Gene, 1993, 134(2): 295－298.
[2] Goodwin R G, Din W S, Davos-Smith T, *et al*. Molecular member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(10): 2 631－2 641.
[3] Alderson M R, Smith C A, Tough T W, *et al*. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(9): 2 219－2 227.
[4] Zhou Z, Kim S H, Hurtado J C, *et al*. Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand[J]. Immunol Lett, 1995, 45(12): 67－73.
[5] Melero I, Johnston J V, Shufford W W, *et al*. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies[J]. Cell Immunol 1998, 190(2): 167－172.
[6] Melero I, Shufford W W, Newby S A, *et al*. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors[J]. Nat Med, 1997, 3(6): 682－685.
[7] Kim J A, Averbook B J, Chambers K, *et al*. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation [J]. Cancer Res, 2001, 65(5): 2 031－2 037.
[8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 458－465.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2002)11-1345-02

个案与短篇

类风湿关节炎合并急性髓细胞白血病 1 例

A case report of rheumatoid arthritis combined with acute myelocytic leukemia

李景怡，方勇飞，王 勇 （第三军医大学附属西南医院中医科，重庆 400038）

患者，男性，45 岁。因反复多关节肿痛 2 年，加重 2 月于 2000-04-19 入院。病史：初发为左肩、左踝关节肿痛，后逐渐累及全身多个关节。入院前 2 月出现关节肿痛加重，伴腹泻，面色萎黄、乏力、精神差。院外服用萘普生、强的松治疗无效。入院时情况：双肩、双肘、双手掌指关节、近端指间关节、双膝、双踝、双足趾跖关节肿痛，晨僵＞1 h。查体：T 38.5℃，P 98 次/min，R 20 次/min，Bp 12/8 kPa。重度贫血貌，浅表淋巴结未触及肿大。肝肋下 2 cm，质中，无触痛，双肩外展受限，双肘屈曲受限，双腕、双手掌指关节、近端指间关节轻度肿胀及压痛，活动重度受限，双膝关节活动轻度受限，可触及骨擦感。余未见异常。辅助检查：WBC 5.7× 10^9/L，RBC 0.7× 10^{12}/L，Hb 24 g/L，PLT 1× 10^9/L，RF 16 U，C3 1.54 g/L，ESR＞150 mm/h，CRP 2.67 mg/L；X 线片提示：双腕关节及掌指关节、近端指关节关节间隙变窄，双手骨质疏松，左膝关节间隙变窄，双侧骶髂关节上部模糊，骨盆各骨骨质疏松，双肺纹影增加、毛糙，双肺门浓深，右肺门增大，以上改变符合类风湿关节炎；骨髓检查：增生明显活跃，原始细胞＋早幼粒细胞占 52%，可见到 Auer 小体，诊断：急性髓细胞白血病（AML-M2 a 型），于 2000-04-21 日转入血液科治疗。入院后以瑞力芬、柳氮磺胺吡啶等药物抗风湿治疗，3 d 后停药，于 2000-04-26 开始性化疗（DA 方案：柔红霉素＋阿糖孢苷），1 月后好转出院，出院时关节肿痛明显减轻。于 2000 年 8 月、11 月分别再次行 DA、HA（三尖杉酯碱＋阿糖孢苷）方案化疗后，关节疼痛明显缓解，关节肿胀基本消失。

讨论

文献[1]报道白血病可引起胫骨囊状破坏，类似类风湿关节炎；AML 伴关节痛和关节炎者占 2%，但急性白血病以骨痛和胸骨下端压痛多见[2]。国内尚无文献报道本病合并类风湿关

（下转 1354 页）

作者简介：李景怡（1974－），女，河北省唐山市人，医师，主要从事风湿性疾病临床治疗方面的研究。电话：（023）65321368

收稿日期：2001-07-10；修回日期：2002-02-11

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