

鼠 CD40 配体基因的克隆及表达

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何 艳, 许 允

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何艳, 许允, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心 湖南省长沙市 410011

蒋永芳, 男, 1972-10-29, 湖南省衡山县人, 汉族, 1995 年湖南医科大学本科毕业, 2003 年中南大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事肝癌基因治疗的研究, 发表论 5 篇。

湖南省卫生厅科研基金资助, No.Y02-42

项目负责人: 蒋永芳, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心. jiangyongfang@hotmail.com

电话: 0731-5524222-2263

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-18

Cloning and expression of murine CD40 ligand gene

Yong-Fang Jiang, Xian-Shi Su, Guo-Zhong Gong, Yan He, Yun Xu

Yong-Fang Jiang, Xian-Shi Su, Guo-Zhong Gong, Yan He, Yun Xu, Center for Liver Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Supported by the Public Health Department Foundation of Hunan Province, China, No. Y02-42

Correspondence to: Dr. Yong-Fang Jiang, Center for Liver Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. jiangyongfang@hotmail.com

Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To study sub-cloning and expression of murine CD40 ligand (mCD40L) gene in eukaryotic cells as a basis for further study.

METHODS: The mCD40L gene fragment was amplified by using RT-PCR and sub-cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1⁺, then transfected into H22 cell with Lipofectamine. After 2-3 weeks selection with G418, DNA was extracted from infected cells and tested by RT-PCR, indirect immunofluorescence were used to detect the expression of mCD40 L.

RESULTS: The insertion mCD40L gene fragment in the eukaryotic expression plasmid was confirmed by enzyme digestion with EcoR I and Nhe I and sequence analysis. The result RT-PCR showed that mCD40L gene had been integrated into the genome of infected H22 cells. Indirect immunofluorescence analysis showed that mCD40L had been expressed in these cells.

CONCLUSION: The mCD40L gene is integrated into eukaryotic cells with eukaryotic expression plasmid and target gene is expressed efficiently.

Jiang YF, Su XS, Gong GZ, He Y, Xu Y. Cloning and expression of murine CD40 ligand gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6): 1349-1352

摘要

目的: 克隆和在真核细胞中表达鼠 CD40 配体(mCD40L)基因, 为进一步研究打下基础。

方法: 用 RT-PCR 法扩增 mCD40L 基因片段, 定向插入真核表达载体 pcDNA3.1⁺ 中, 重组质粒用脂质体转染 H22 细胞, G418 筛选抗性细胞, 用 RT-PCR 检测目的基因的插入, 间接免疫荧光检测目的基因的表达。

结果: 含 mCD40L 基因重组表达质粒用酶切分析和序列测定进行鉴定后, 转染 H22 细胞经 G418 筛选获得抗性细胞, 经 RT-PCR 鉴定有含目的基因, 间接免疫荧光鉴定有 mCD40L 的表达。

结论: 成功克隆 mCD40 L 基因并在真核细胞得到有效表达。

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何艳, 许允. 鼠 CD40 配体基因的克隆及表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1349-1352

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1349.asp>

0 引言

CD40 配体(CD40L)是分子质量为 39 kd 的糖蛋白, 在淋巴细胞和非淋巴细胞表面均有表达, 属肿瘤坏死因子家族中的一员, 可与抗原提呈细胞(APC)上的 CD40 结合. CD40-CD40L 相互作用在激活 APC 及激发细胞免疫和体液免疫方面起重要作用^[1]. 通过转导 CD40L 基因有可能成为治疗恶性肿瘤的一种有效的方法. 我们构建鼠 CD40 配体(mCD40L)基因真核表达载体及其表达, 为进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体 pcDNA3.1⁺, 带有强有力的巨细胞病毒 CMV 增强启动子, 能高效表达插入的目的基因, 含 SV40 启动子, 控制 G418 抗性基因的表达, 购于美国 Promega 公司; 大肠杆菌 JM109, 购于美国 Promega 公司; Balb/C 小鼠肝癌细胞株 H22 细胞购自武汉大学典型物保存中心; 修饰酶、连接酶和质粒回收试剂盒购自 Promega 公司; 限制性内切酶 NheI 和 EcoRI 分别购自大连宝生物有限公司和华美生物工程公司; DNA 分子量标准(1 031 bp), MBI 产品; PCR 纯化试剂盒, 美国 QIAGEN 公司产品; RPMI1640 培养基和 G418 购自美国 Gibco 公司; 脂质体转染剂 Lipofectamine PlusTM Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; SABC-FITC 试剂盒购自武汉博士德生

物工程有限公司. 根据 mCD40L 基因序列及载体要求, 我们设计扩增的引物序列分别为: 5' -GAC GCT AGC ATG ATA GAA ACA TAC AGC CAA CCT-3' 和 5' -GCC GAA TTC TCA GAG TTT GAG TAA GCC AAA AGA-3', 在引物的两端分别含有 NheI 和 EcoRI 酶切位点, 由上海生工合成.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增 mCD40L cDNA 从 Balb/c 小鼠的脾细胞提取细胞总的 RNA 后, 以 Oligod(T)18 合成第一链 cDNA, 作为 PCR 模板, 用 PCR 法扩增鼠 CD40L 基因, 反应条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 60 s、60 °C 50 s、72 °C 90 s 共 35 个循环, 72 °C 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增带, 并用 PCR 纯化试剂盒回收特异 PCR 扩增片段.

1.2.2 表达重组体的构建及鉴定 先用 T-A 克隆将 PCR 产物和 pUCm-T 载体连接, 构建中间重组体(pUCm-T-mCD40L), 经酶切鉴定和序列分析后. 将 pUCm-T-mCD40L 和真核表达载体 pcDNA3.1⁺ 均分别用 NheI 和 EcoRI 酶进行消化, 回收目的片段. 将含 NheI 和 EcoRI 两粘端的 PCR 产物定向亚克隆于含与之相匹配两粘端的 pcDNA3.1⁺, 构建成真核表达重组体(pcDNA3.1⁺-mCD40L cDNA). 通过 NheI 和 EcoRI 双酶切和序列分析进行鉴定.

1.2.3 质粒转染小鼠肝癌细胞株 H22 及筛选 常规复苏 H22 细胞, 适时传代, 细胞增生至足量后按 2.5×10^5 个细胞/孔的浓度接种六孔板中, 按脂质体转染 Lipofectamine PlusTM Reagent 试剂盒说明书进行, 简述如下, 4 μ L 脂质体和 4 μ g 重组质粒混合, 放置 15 min 后加到有 H22 细胞的六孔培养板中, 37 °C 50 mL/L CO₂ 的培养箱中孵育 3 h 后, 改用 200 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养, 转染后 4 d 后, 细胞 1:20 传代, 改用含 G418 的选择培养基进行筛选(G418 浓度前 2 d 为 250 mg/L, 3-4 d 为 500 mg/L, 以后为 800 mg/L), 隔日换液, 一共选择培养 18 d, 至阴性对照孔细胞全部死亡后恢复普通培养.

1.2.4 mCD40L 在真核细胞中的表达 将抗性 H22 细胞扩增培养后, 提取细胞 RNA, 按前面的反应体系和反应条件, 用 RT-PCR 方法检测目的基因. H22 细胞涂片后, 用间接免疫荧光法检测 mCD40L 的表达(按 SABC-FITC 试剂盒操作指南).

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 mCD40L 基因 以总 RNA 作为模板, 18 聚 T 寡核苷酸作引物合成 cDNA 第一链, 然后用特异引物进行 PCR 扩增, 能顺利扩增出大小约 783 bp 的条带(图 1).

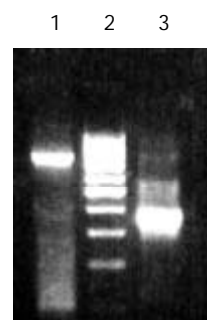


图1 鼠CD40配体 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳. 1: 目的产物; 2: DNA 分子量标准(1 031 bp); 3: 阳性对照(β -actin).

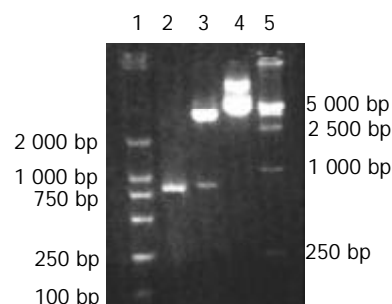


图2 鼠 CD40 配体真核表达质粒双酶切鉴定结果. 1: DNA 分子量标准(2 000 bp); 2: RT-PCR 产物; 3: pcDNA3.1⁺-mCD40L 经 NheI 和 EcoRI 双酶切; 4: pcDNA3.1⁺-mCD40L 未酶切; 5: DNA 分子量标准(10 000 bp).

2.2 表达重组体的构建及鉴定 中间重组体(pUCm-T-

```
GGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGATAGAAACATACAGCCAACCTTCCCCAGATCCGTGGCAACTGGAC
TTCCAGCGAGCATGAAGATTTTATGTATTTACTTACTGTTTTCCTTATCACCCAAATGATTGGATCTG
TGCTTTTGTGTGTATCTTCATAGAAGATTGGATAAGGTGGAAGAGGAAGTAAACCTTCATGAAGATT
TTGTATTCATAAAAAACCTAAAGAGATGCAACAAAGGAGAAGGATCTTTATCCTTGCTGAAGTGTGAGG
AGATGAGAAGGCAATTGAAGACCTTGTCAGGATATAACGTTAAACAAAGAAGAGAAAAAAGAAAAACA
GCTTTGAAATGCAAAGAGGTGATGAGGATCCTCAAATTGCAGCACACGTTGTAAGCGAAGCCAACAGTA
ATGCAGCATCCGTTCTACAGTGGGCCAAGAAAGGATATTATACCATGAAAAGCAACTTGGTAATGCTTG
AAAATGGGAAACAGCTGACGGTTAAAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACACTCAAGTCACCTTCTGCT
CTAATCGGGAGCCTTCGAGTCAACGCCCATTCATCGTCGGCCTCTGGCTGAAGCCCAGCAGTGGATCTG
AGAGAATCTTACTCAAGGCGGCAAAATACCCACAGTTCCTCCAGCTTTGCGAGCAGCAGTCTGTTCACT
TGGGCGGAGTGTTTGAATTACAAGCTGGTGCTTCTGTGTTGTCAACGTGACTGAAGCAAGCCAAGTGA
TCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTACTCAAACCTCTGAGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGT
GGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGT
```

图3 重组质粒序列测定结果. 测序结果表明包括起始密码子和终止密码子在内的完整的 mCD40L 基因插入表达质粒中.

mCD40L) 经酶切鉴定和序列分析证明正确后, 用 *NheI* 和 *EcoRI* 酶切将 PCR 产物定向亚克隆于表达质粒 pcDNA3.1⁺ 中, 构建表达重组体(pcDNA3.1⁺-mCD40L), 将 pcDNA3.1⁺-mCD40LcDNA 用 *NheI* 和 *EcoRI* 双酶切, 可获得两个片段, 小片段与 PCR 产物一致(图 2). 重组质粒经测序证实有包括起始密码子和终止密码子在内的完整的 mCD40L 基因片段插入 pcDNA3.1⁺ 载体中(图 3). 2.3 目的基因在真核细胞中的表达 逆转录 PCR 检测到 mCD40L 在 H22 细胞中表达(图 4); 用间接免疫荧光法检测到用 pcDNA3.1⁺-mCD40L 转染后的 H22 细胞中荧光染色阳性, 证明有 mCD40L 的表达(图 5).

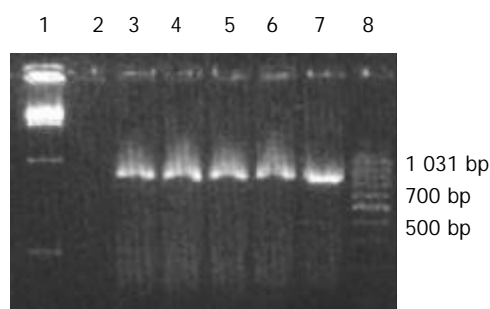


图 4 RT-PCR 检测鼠 CD40 配体基因在 H22 细胞中的表达. 1: 8: DNA 分子量标准(分别为 2 000 bp 和 1 031 bp); 2: 空白载体转染 H22 细胞 RT-PCR 结果; 3-6: 重组质粒转染 H22 细胞 RT-PCR 结果; 7: 鼠脾细胞 RT-PCR 结果.

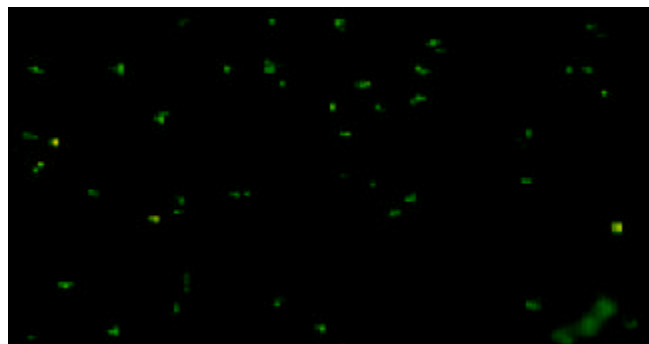


图 5 间接免疫荧光检测 H22 细胞中鼠 CD40 配体的表达. 有鼠 CD40 配体表达的 H22 细胞, 荧光染色呈阳性.

3 讨论

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一^[2-3], 由于肝细胞癌对于各种治疗方法的疗效均很差, 且易转移, 使之成为治疗上最困难的肿瘤之一^[4]. 所以急需寻找新的治疗方法, 近年来随着分子生物学的飞速发展, 免疫基因治疗被认为是一种很有前途的治疗方法^[5]. 在免疫基因治疗研究方面, 选择有效的目的基因至关重要. CD40 配体(CD40L), 又称作 CD154, 属于肿瘤坏死因子基因超家族中的一员, 在激活的 T 细胞等多种细胞表面均有 CD40L 的表达, 同样包括 B 细胞和多种肿瘤细胞在内细胞表面有 CD40 分子的表达, CD40L 和 CD40 相互作用, 能激活 B 细胞和前凝血质, 促进黏附因子、细胞因子、化学因子和 MMP 的释放^[1]. 其实质是诱发体液免疫

和细胞介导的免疫反应. 正由于 CD40L/CD40 相互作用所具有的多种生物学活性, 将外源目的基因 CD40L 基因导入机体内, 可能产生强烈的抗肿瘤免疫反应, 而将 CD40L 基因联合其他免疫治疗基因(如 IL-12, CD80 等)或肿瘤相关抗原(如 AFP)疗效可能更好^[6]. 利用鼠 CD40L 基因已开展了许多抗肿瘤免疫方面的研究, 治疗策略包括有: 用 CD40L 基因或者联合 IL-12 基因转染白血病细胞, 再把这些细胞注入机体内治疗急性白血病^[7]和慢性 B 淋巴细胞性白血病^[8]等, 能诱导明显的抗白血病免疫反应; 利用一定的载体将鼠 CD40L 基因导入荷瘤动物体内治疗肺癌^[9-10]、结肠癌^[11]、膀胱癌^[12-15]肝癌^[16-17]、胸膜间皮瘤^[18]、胃癌^[19]和黑色素瘤^[20]等, 结果表明鼠 CD40L 基因均能激活 T 细胞、上调 IL-12 等细胞因子水平和增加 NK 细胞活力等保护性免疫反应和增加癌细胞凋亡, 从而使荷瘤鼠的瘤结节退化, 能持久抑制再次注入的癌细胞的生长, 动物存活期延长; 由于 CD40L 转染 DC 细胞后能促进 DC 细胞成熟和分泌 IL-12^[21-22], 所以通过转染 CD40L 基因制备 DC 瘤苗同样可以治疗肿瘤; 自体 T 细胞经巨噬细胞集落刺激因子和 IL-4 刺激后, CD40L 分泌增多, 这样联合 DC 细胞和激活后的自体 T 细胞成为癌症免疫基因治疗的一种新的方法^[23]. CD40L 基因的治疗策略为癌症的基因治疗开辟一条新的途径.

我们以鼠脾细胞总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法, 成功扩增出了特异的 mCD40L 基因, DNA 序列测定表明, 所扩增的片段的确是 mCD40L 基因片段, 与国外报道的基因序列完全一致. 在此基础上, 成功构建了真核表达重组体 pcDNA3.1⁺-mCD40L, 重组质粒转染真核细胞后, 检测到有 mCD40L 的表达, mCD40L 真核表达载体的构建和有效表达, 为下一步研究其生物学活性和免疫基因治疗肝癌打下了良好的基础.

4 参考文献

- Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154(CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:687-693
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8: 243-246
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- Roenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999;10: 281-287
- Afford SC, Yong LS. Gene therapy for hepatocellular carcinoma-teaching old dogs new tricks. *Hepatology* 2001;34:207-209
- Saudemont A, Buffenoir G, Denys A, Desreumaux P, Jouy N, Hetuin D, Banters F, Fenanx P, Quesnel B. Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Leukemia* 2002;16: 1637-1644
- Wendtner CM, Kofler DM, Theiss HD, Kurzeder C, Buhmann R, Schweighofer C, Perabo L, Danhanser-Riedl S, Baumert J, Hiddemann W, Hallek M, Bunnig H. Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Blood* 2002;100:1655-1661

- 9 Masahiro N, Kazuyoshi I, Tsutomu K, Wakayama H, Horio Y, Sekido Y, Hara T, Hashimoto N, Takahashi M, Shimokata K, Hasegawa Y. Induction of antitumor immunity by transduction of CD40 ligand gene and interferon-gamma gene into lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2001;8:421-429
- 10 Tada Y, O-Wang J, Yu L, Shimozato O, Wang YQ, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Takemaga K, Sakiyama S, Tagawa M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther* 2003;10:451-456
- 11 Sun Y, Peng K, Lecanda J, Schmitz V, Barajas M, Qian C, Prieto J. In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther* 2000;7:1467-1476
- 12 Loskog A, Totterman TH, Bohle A, Brandau S. In vitro activation of cancer patient-derived dendritic cells by tumor cells genetically modified to express CD154. *Cancer Gene Ther* 2002;9:846-853
- 13 Loskog A, Biorkland A, Brown MP, Korsgren O, Malmstrom PV, Totterman TH. Potent antitumor effects of CD154 transduced tumor cells in experimental bladder cancer. *J Urol* 2001;166:1093-1097
- 14 Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, Murray PG, el-Magraby MM, Young L, James ND. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2003;88:586-592
- 15 Kimura T, Ohashi T, Kikuchi T, Kiyota H, Eto Y, Ohishi Y. Antitumor immunity against bladder cancer induced by ex vivo expression of CD40 ligand gene using retrovirus vector. *Cancer Gene Ther* 2003;10:833-839
- 16 Schmitz V, Barajas M, Wang L, Peng D, Puarte M, Prieto J, Qian C. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001;34:72-81
- 17 Yanagi K, Nagayama Y, Nakao K, Saeki A, Matsumoto K, Icshikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Immuno-gene therapy with adenoviruses expressing fms-like tyrosine kinase 3 ligand and CD40 ligand for mouse hepatoma cells in vivo. *Int J Oncol* 2003;22:345-351
- 18 Friedlander PL, Delaune CL, Abadie JM, Touos M, La Cour J, Marrero L, Zhong Q, Kolls JK. Efficacy of CD40 ligand gene therapy in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:321-330
- 19 Yamaguchi H, Tanaka F, Sadanaga N, Ohta M, Tnoue H, Mori M. Stimulation of CD40 inhibits Fas- or chemotherapy-mediated apoptosis and increases cell motility in human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 2003;23:1697-1702
- 20 Peter I, Naweath M, Kamarashev J, Odermatt B, Mezzacasa A, Hemini S. Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators. *Cancer Gene Ther* 2002;9:597-605
- 21 Machey MF, Wang Z, Eichelbery K, Germain RN. Distinct contributions of different CD40 TRAF binding sites to CD154-induced dendritic cell maturation and IL-12 secretion. *Eur J Immunol* 2003;33:779-789
- 22 Onaitis MW, Kalady MF, Emanis Abdel-Wahab Z, Tyler DS, Pruill SK. CD40 ligand is essential for generation of specific cytotoxic T cell responses in RNA-pulsed dendritic cell immunotherapy. *Surgery* 2003;134:300-305
- 23 Sato T, Terai M, Yasuda R, Watanabe R, Berd D, Mastrangede MJ, Hasumi K. Combination of monocyte-derived dendritic cells and activated T cells which express CD40 ligand: a new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:53-61

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.