



人CD40分子基因转染人脐静脉内皮细胞ECV-304

CD40是相对分子质量为45 000~50 000的I型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族。主要表达于B细胞发育分化的各个阶段,进一步研究发现,T淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞及内皮细胞中也都有CD40的表达。CD154是CD40的配体,又称CD40L,它是相对分子质量为30 000~33 000的II型跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子家族。CD40/CD40L作为一种重要的炎症调节途径,在各种炎症性疾病的发生发展中起到关键作用[1][2]。Ross教授在1999年明确地提出动脉粥样硬化是一种炎症性疾病,并且认为各种损伤因子首先导致内皮功能不良[3]。正常情况下内皮细胞中有少量CD40的表达,而发生动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的内皮细胞CD40的表达量明显增加[4],阻断CD40-CD40L炎症信号通路从而成为抗AS药物作用新靶点[5],而且我们前面的研究已经表明洛伐他汀、非诺贝特通过阻断CD40/CD40L炎症途径起到抗动脉粥样硬化的作用[6][7]。因此,建立高表达CD40的内皮细胞株,进而建立细胞膜色谱模型,可以对经典抗动脉粥样硬化中药进行特异性、靶向性筛选。目前把CD40 cDNA作为目的基因转染人脐静脉内皮细胞的研究国内外还未见报道。本实验旨在通过脂质体介导的转染,建立高表达CD40的内皮细胞株,为下一步的药物筛选做准备。

1 材料与方法

1.1 细胞株

采用的人脐静脉内皮细胞株ECV-304引自美国组织培养库(ATCC CRI-1998)。

1.2 主要试剂

含有人CD40编码区cDNA的克隆载体pUCD40由军事医学科学院基础医学研究所刘荷中教授惠赠; pcDNA3.1、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、LipofectamineTM2000(Invitrogen公司);膜蛋白提取试剂盒(Pierce Biotechnology, USA); RT-PCR试剂盒(Fermentas); T4 DNA连接酶、限制性内切酶HindIII、Xba I(大连宝生物公司);鼠抗人CD40单抗、FITC标记的羊抗鼠IgG(Santa Cruz);碱磷酶标记的羊抗鼠二抗(北京中山); G418、OPTI-MEM I、RPMI 1640(Gibco公司);新生牛血清(杭州四季青公司)

1.3 方法

1.3.1 人CD40分子真核表达载体的构建 pUCD40用HindIII和Xba I双酶切,电泳后切下CD40基因片段用凝胶回收试剂盒回收,与经相同酶切的真核表达载体pCDNA3.1(+)用T4DNA连接酶连接,16℃连接20 h。连接产物转化JM109菌,在含X-Gal、IPTG平皿上培养,挑取白色菌落扩大培养,用质粒提取试剂盒少量提取质粒,酶切鉴定阳性重组子。

1.3.2 内皮细胞培养 人脐静脉内皮细胞株ECV-304引自美国组织培养库(ATCC CRI-1998),在含10%新生牛血清的RPMI 1640培养基中以37℃、5% CO₂条件培养,生长至单层融合后待用。

1.3.3 转染和筛选 用0.25%胰酶消化细胞,以1×10⁵/孔接种于24孔培养板中,继续培养24 h。基因转染步骤参照LipofectamineTM2000说明操作,对于每孔细胞,用50 μl OPTI-MEM I培养基分别稀释0.8 μg重组表达质粒、pCDNA3.1(+)和2 μl LipofectamineTM 2000试剂,30 min内将两者轻轻混匀,室温反应20

min后，加到细胞长至90%密度的24孔板上，37℃、5% CO₂培养。转染后第2天，按1×10⁵个/ml的密度将细胞传代接种在24孔板上，转染后72 h，加入终浓度为600 mg/L的G418进行筛选，以未转染细胞为参照。培养6 d后，当未转染细胞全部死亡时，换用G418浓度为300 mg/L的完全培养基维持培养。3~4 d后，存活细胞长出小片状克隆，待克隆长成200~300个细胞的集落时，挑取细胞克隆，扩大培养。

1.3.4 RT-PCR分析CD40 mRNA的表达 收集转染pCDNA3.1(+)/CD40 4个细胞克隆，1×10⁶ /克隆，加入1 ml Trizol 常规抽提细胞总RNA。CD40上游引物：5' CTAAAGCTTCTCGCCATGGTTCGTCTGC3'，下游引物：3' TACGTCGACCAGCCTCACTGTCTCTCCT5'；内参照β-actin的上游引物：5' CGTGACATTAAGG AGAAGCTGTGC3'，下游引物：5' CTCAGGAGGAGC AATGATCTTGAT3'。取总RNA 2 μg，做RT-PCR。引物用CD40和内参照β-actin的上下游引物，热循环条件：95℃预变性4 min，94℃变性30 s，66℃退火30 s，72℃延伸2min。循环25次。反应结束后取反应产物进行1%琼脂糖电泳鉴定扩增结果。

1.3.5 Western blotting法对表达产物CD40的鉴定 用胰酶消化细胞，PBS洗3次，用试剂盒提取膜蛋白后，检测蛋白的浓度，经SDS-PAGE电泳分离，将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。在PBS溶液中轻轻摇动，洗涤15 min。加入用0.5%的BSA/TBS稀释的鼠抗人CD40单抗(稀释度是1:1000)，室温下温和摇动过夜，PBS洗膜3次，加入碱磷酶标记的羊抗鼠二抗(1:500)，温和摇动1 h，PBS洗膜3次。用66 μl NBT溶液与10 μl碱性磷酸酶缓冲液混匀，加入BCIP溶液进行显色，出现条带为阳性结果。

1.3.6 流式细胞仪检测CD40的表达 采用流式细胞仪间接免疫荧光法检测。将1×10⁶个/ml细胞悬于PBS中，4℃ 1000 r/min离心3 min，去上清，加10 μl鼠抗人单抗(200 μg/ml)于样品管中，对照组加10 μl PBS，4℃下反应60 min，PBS洗2次后，4℃ 1000 r/min离心3 min，加入30 μl FITC标记的二抗(1.4 μg/ml)，4℃反应60min，PBS洗2次。用4%的甲醛固定，上流式细胞仪检测细胞表面CD40蛋白的表达。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建和鉴定

用限制性内切酶HindIII 和Xba I 对pCDNA3.1(+)/CD40进行双酶切，1%的琼脂糖凝胶电泳结果显示，CD40cDNA长度与所设计的一致，为 831 bp(图1)，表明人CD40分子表达载体构建成功。

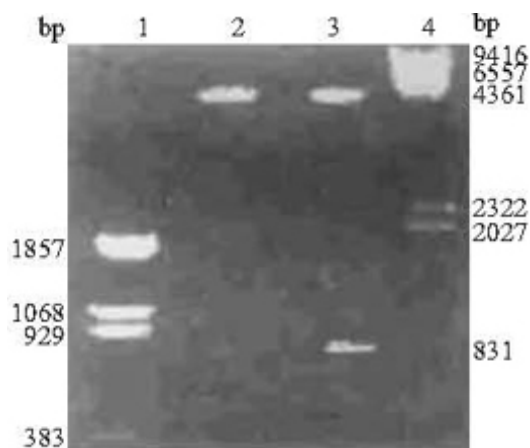


图1 重组真核表达质粒中插入目的片段CD40的酶切鉴定

Fig.1 Identification of CD40 in recombinant eukaryotic expression vector

Lane 1: PBR322 digested with BstNI ; Lane 2: pCDNA3.1(+)/CD40 digested with HindIII ;
Lane 3: pCDNA3.1(+)/CD40 digested with HindIII and Xba I ; Lane 4: λ DNA digested with Hind III

2.2 RT-PCR鉴定目的基因mRNA的表达

提取转染pCDNA3.1(+)/CD40、pCDNA3.1(+)和正常对照ECV-304细胞克隆的总RNA，经RT-PCR扩增后均

出现831 bp的条带。正常对照、转染pCDNA3.1(+)/CD40和pCDNA3.1(+)+组以 β -actin为内对照(360 bp), 由于正常对照组和转染pCDNA3.1(+)+组细胞CD40的表达量较低, 因此其条带的亮度远远低于转染pCDNA3.1(+)/CD40组。图2为阳性克隆的电泳图。

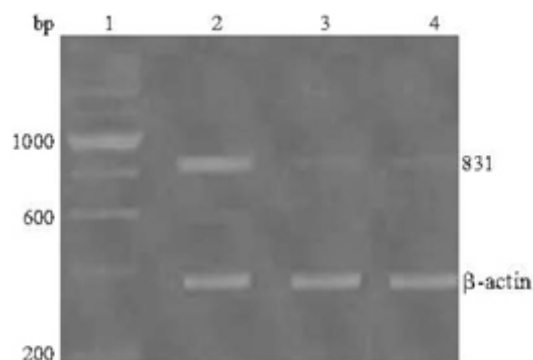


图2 RT-PCR检测转染了pCDNA3.1(+)/CD40、pCDNA3.1(+)+和正常对照的ECV-304中CD40的表达
Fig.2 Expression of CD40 in ECV-304 cells transfected with pCDNA3.1(+)/CD40 and pCDNA3.1(+)+ and normal ECV-304 detected by RT-PCR

Lane 1: 200 bp DNA ladder; Lane 2: ECV-304 cells transfected with pCDNA3.1(+)/CD40; Lane 3: ECV-304 cells transfected with pCDNA3.1(+)+; Lane 4: Control ECV-304 cells. β -actin was used as an internal control.

2.3 转染的内皮细胞表达CD40蛋白水平

Western-blotting显示转染CD40cDNA成功的内皮细胞在相对分子质量49 000处出现一条染色的蛋白带, 而转染pCDNA3.1(+)+和转染前细胞ECV-304可能由于CD40的表达量较低而无明显的条带出现(图3)。

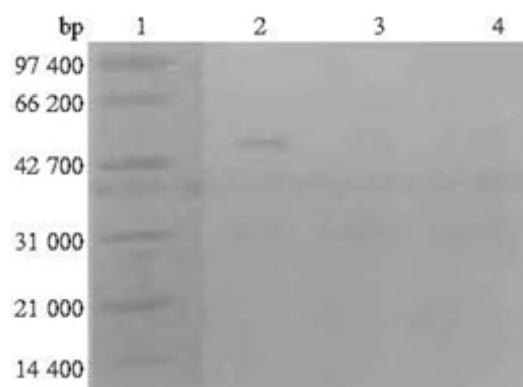


图3 Western blotting鉴定转染细胞的表达产物

Fig.3 Identification of the expression product of the transfected cells with Western blotting

Lane 1: Protein marker; Lane 2: ECV-304 transfected with pCDNA3.1(+)/CD40; Lane 3: ECV-304 cells transfected with pCDNA3.1(+)+; Lane 4: Control ECV-304 cells

2.4 流式细胞术定量分析转染的内皮细胞表达CD40水平

流式细胞仪检测结果表明, 转染前ECV-304细胞CD40表达率为2.5%(图4), 转染pCDNA3.1(+)/CD40细胞CD40表达率为95%(图5), 得到了高表达CD40的ECV-304。

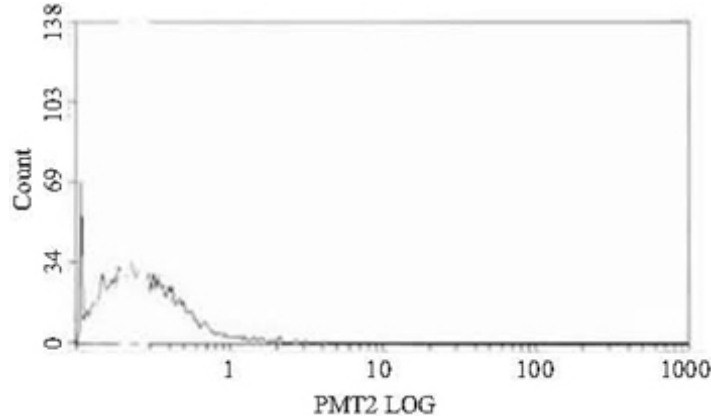


图 4 流式细胞仪检测ECV-304细胞CD40蛋白的表达
Fig.4 Expression of CD40 in ECV-304 cells detected by flow cytometry

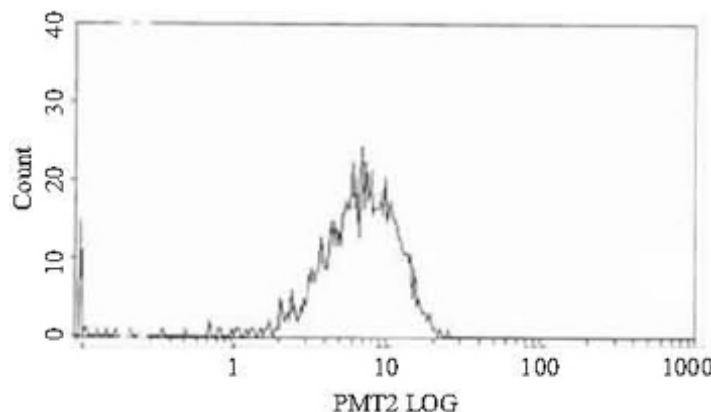


图 5 流式细胞仪检测转染pCDNA3.1(+)/CD40的ECV-304细胞CD40蛋白的表达
Fig.5 Expression of CD40 in ECV-304 cells transfected with pCDNA3.1(+)/CD40 detected by flow cytometry

3 讨论

AS是严重危害人类健康的常见病，其发病率有逐年增加的趋势，AS的发生机制是多因素综合作用所诱发的机体应答反应，如脂质代谢、血凝、炎症反应、细胞因子和血液动力学的影响等等，但很难归结出一条共同的致病途径。Ross教授于20世纪80年代提出内皮损伤是始动因素学说，在1999年又新提出AS是免疫系统参与的慢性炎症反应[4]。而跨膜蛋白CD40/CD40L作为炎症反应调节中的重要因子，在AS炎症反应过程中起到关键的作用[8]。它们之间作用不仅限于炎症细胞间信号传递，还参与AS斑块内主要细胞(血管内皮细胞、血管平滑肌细胞以及巨噬细胞)的炎症反应调节，而内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞通过表达粘附分子、细胞因子、基质金属蛋白酶和组织因子等参与AS的发生和发展，这些都表明CD40/CD40L和AS有关[9][10]。

早期病理学研究发现，仅在AS的病变组织中存在CD40和CD40L的表达且存在于AS斑块的各种细胞，在正常动脉的内皮细胞中有少量CD40的表达，而在发生动脉硬化的内皮细胞中发现CD40的表达量增加[5]。随着人类基因组计划的完成，越来越多的与疾病相关的基因被发现。因此利用基因组的研究成果，确定与疾病相关的基因，并从靶基因或靶分子出发，筛选、发现新药，将是药物研究的方向和趋势[11]。细胞膜色谱技术是一种研究药物与靶体(包括受体)相互作用的亲和色谱分析技术，它不需经过分离纯化步骤而能直接确定某一中药的有效成分[12]，可以用于药物的筛选。贺浪冲等用正常细胞的细胞膜已经成功筛选了红毛七[13]、太白花[14]和红花等[15]中药的有效成分，但是用正常细胞的细胞膜进行药物筛选缺乏特异性和靶向性，因此有必要建立高特异性的细胞膜色谱模型，对药物进行特异性和靶向性的筛选。已知CD40是AS有关的基因，所以

我们构建了含有CD40 cDNA的真核表达载体pCDNA3.1(+)/CD40,酶切电泳证明表达载体构建成功。然后用脂质体法将目的基因转染ECV-304,RT-PCR结果显示转染pCDNA3.1(+)/CD40组、转染空载体pCDNA3.1(+)/CD40组和正常对照ECV-304细胞扩增后均出现831 bp的条带,由于转染pCDNA3.1(+)/CD40组CD40的表达量远远高于转染空载体组和正常对照组,因此其条带的亮度也远远高于它们。Western blotting也显示转染pCDNA3.1(+)/CD40组在49 000处有一条染色的蛋白带,而转染空载体pCDNA3.1(+)/CD40组和正常对照组细胞可能由于CD40的表达量较低,没有出现明显的染色条带。流式细胞仪检测转染pCDNA3.1(+)/CD40组细胞CD40的表达率为95%。进而可以建立CD40特异性表达的血管内皮细胞膜色谱模型,利用药物与转染的内皮细胞膜上高表达量的CD40蛋白相结合可以对多种抗动脉粥样硬化药物进行筛选,以确定它们的活性成分和有效部位,然后再进行全面的药理学研究,将会发现抗动脉粥样硬化药物中有药理活性的成分或新型先导化合物,从而为抗动脉粥样硬化药物的现代化提供新的思路,可以用于抗动脉粥样硬化药物的开发。

参考文献:

- [1] Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(1): 4-43.
- [2] Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40[J]. Nature, 1992, 357(6373): 80-2.
- [3] Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-26.
- [4] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(5): 1931-6.
- [5] Phipps RP, Koumas L, Leung E, et al. The CD40-CD40 ligand system: a potential therapeutic target in atherosclerosis[J]. Curr Opin Invest Drugs, 2001, 2(6): 773-7.
- [6] Lin R, Liu JT, Gan WJ. C-reactive protein -induced expression of CD40-CD40L and the effect of lovastatin and fenofibrate on it in human vascular endothelial cells[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(10): 1537-43.
- [7] Lin R, Liu JT, Peng N. Lovastatin reduces nuclear factor kappaB activation induced by C-reactive protein in human vascular endothelial cells[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(9): 1630-4.
- [8] Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12(1): 27-32.
- [9] Brummer D, Riggers U, Holzmeister J, et al. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions[J]. Am J Cardiol, 2001, 87(1): 21-7.
- [10] Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1998, 137(Suppl): S89-95.
- [11] 魏尔清, 沈建中. 后基因组时代药理学研究趋势[J]. 生理科学进展, 2002, 33(1): 7-11.
- [12] Wei EQ, Shen JZ. Trends in the post-genomic pharmacological research[J]. Prog Physiol Sci, 2002, 33(1): 7-11.
- [13] 贺浪冲, 耿信笃. 细胞膜受体色谱法-研究药物与受体作用的新方法[J]. 生物医药色谱进展, 1996, 3: 8-9.
- [14] 高琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 14-6.

Gao K, He LC, Yang GD. Screening the effective component of *Leontice robustum* by cell membrane chromatography[J]. *Chin Pharm J*, 2003, 38(1): 14-6.

[14] 张汉利, 杨广德, 贺浪冲, 等. 太白花活性成分的筛选与药理作用相关性研究[J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(2): 92-4.

Zhang HL, Yang GD, He LC, et al. Studies on screening the effective components of *Cladonia alpestris* and its correlation with pharmacological effects[J]. *Chin Pharm J*, 2003, 38(2): 92-4.

[15] 王锐平, 陈 蓁, 贺浪冲, 等. 细胞膜色谱法筛选红花中的有效成分[J]. *陕西中医*, 2004, 25(7): 643-4.

[回结果列表](#)