人 CD40 分子基因转染人脐静脉内皮细胞 ECV-304

王维蓉[1],林 蓉[1],杨玉琮[2],甘伟杰[1],刘俊田[1],吕社民[3](西安交通大学医学院[1]药理教研室,[2]第一医院实验医学中心,[3]生物化学教研室,陕西 西安 710061)

摘要:目的 构建人 CD40 的真核表达载体,建立持续、稳定高表达 CD40 的人脐静脉内皮细胞 ECV-304。**方法** 将含有 CD40 的克隆载体 pUCD40 酶切后,再克隆到真核表达载体 pCDNA3.1 中,构建重组质粒 pCDNA3.1(+)/CD40,并对重组质粒进行酶切鉴定。然后用脂质体法将重组质粒转染 ECV-304,G418 筛选转染的细胞。RT-PCR、Western-blotting 和流式细胞仪定性定量检测转染后的 ECV-304 的 CD40 的表达情况。**结果** 经酶切鉴定,重组体中已插入目的基因片段 CD40。RT-PCR 和 Western-blotting 证实,重组质粒转染的 ECV-304 中有 CD40 基因的表达,流式细胞仪检测转染后的 ECV-304 的 CD40 的表达率为 95%。**结论** 成功构建了真核表达载体 pCDNA3.1 (+)/CD40,并建立了高表达 CD40 的 ECV-304,为筛选抗动脉粥样硬化药物奠定了基础。

关键词:CD40;人脐静脉内皮细胞;转染;基因表达
中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2588(2005)12-1474-04

Liposome-mediated human CD40 gene transfection and human umbilical vein endothelial ECV-304 cells

WANG Wei-rong[1], LIN Rong[1], YANG Yu-cong[2], GAN Wei-jie[1], LIU Jun-tian[1], LÜ She-min[3]
Department of Pharmacology[1], Laboratory Medical Center of the First Hospital[2], Department of Biochemistry[3], Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector containing human CD40 gene for its efficient, continuous and stable expression in human umbilical vein endothelial ECV-304 cells. **Methods** The recombinant plasmid pUCD40 was digested with endonucleases to obtain human CD40 gene fragment, which was cloned into pCDNA3.1 vector to construct recombinant eukaryotic expression vector pCDNA3.1(+)/CD40. The recombinant vector was identified by enzyme digestion before introduced into ECV-304 cells via liposome, with the positive cell clones selected with G418. The stable transfection and expression of CD40 in ECV-304 cells were identified by reverse transcription (RT)-PCR, Western blotting and flow cytometry, respectively. **Results** Enzyme digestion analysis showed that target gene had been cloned into the recombinant vector. The transfected ECV-304 cells successfully expressed human CD40 as determined by RT-PCR and Western-blotting, and 95% of the cells were CD40-positive as shown by flow cytometry. **Conclusion** The rcombinant eukaryotic expression vector pCDNA3.1(+)/CD40 has been successfully constructed, which is capable of stable transfection and expression of CD40 in ECV-304 cells to facilitate further investigation of the roles of CD40 molecule in antiatherosclerotic drug development.
Key words: CD40; human endothelial cells; transfection; gene expression

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。

收稿日期:2005-05-16
基金项目:国家自然科学基金(30371759)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30371759)
作者简介:王维蓉(1979-),女,在读硕士研究生,电话:029-85274383, E-mail: wangweirong1222@163.com
通讯作者:林 蓉(1963-),女,西安交通大学医学院药理系,副教授,电话:029-82656215, E-mail: linrong@mail.xjtu.edu.cn

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(ATTCC 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、Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司);膜蛋白提取试剂盒 (Pierce Biotechnology,USA);RT-PCR 试剂盒 (Fermentas);T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hin*dⅢ、*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 *Hin*dⅢ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 T_4DNA 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,用质粒提取试剂盒小量提取质粒,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(ATTCC CRI-1998),在含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中以 37 ℃、5% CO_2 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 1×10^5/孔接种于 24 孔培养板中,继续培养 24 h。基因转染步骤参照 Lipofectamine™2000 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 Lipofectamine™ 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 孔板里,37 ℃、5% CO_2 培养。转染后第 2 天,按 1×10^5 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,1×10^6 / 克隆,加入 1 mlTrizol 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-action 的上游引物:5'CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC3',下游引物:5'CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT3'。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 1×10^6 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 *Hin*dⅢ 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。

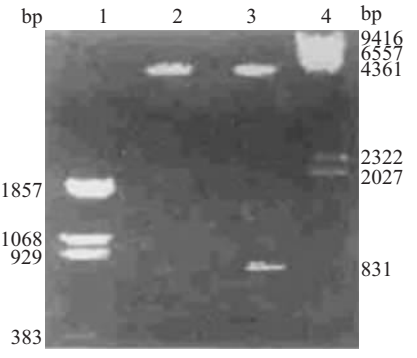

图 1 重组真核表达质粒中插入目的片段 CD40 的酶切鉴定

Fig.1 Identification of CD40 in recombinant eukaryotic expression vector

Lane 1: PBR322 digested with *Bst*NⅠ; Lane 2: pCDNA3.1(+)/CD40 digested with *Hin*dⅢ; Lane 3: pCDNA3.1(+)/CD40 digested with *Hin*dⅢ and *Xba*Ⅰ; Lane 4: λ DNA digested with *Hin*dⅢ

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。

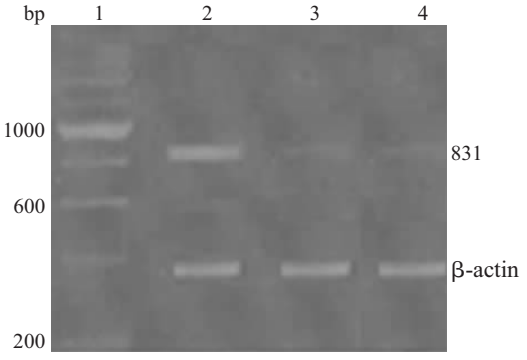

图 2 RT-PCR 检测转染了 pCDNA3.1(+)/CD40、pCDNA3.1(+)和正常对照的 ECV-304 中 CD40 的表达

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)。

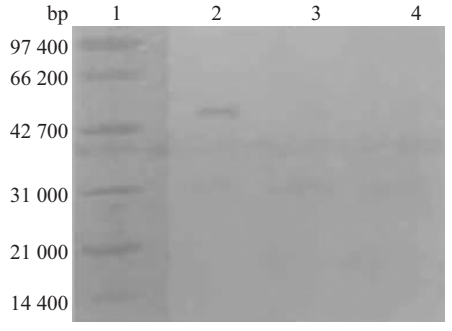

图 3 Western blotting 鉴定转染细胞的表达产物

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。

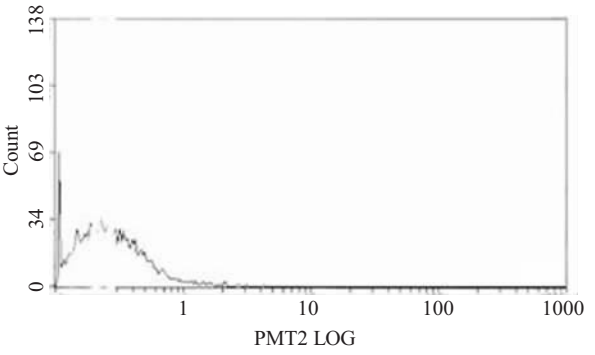

图 4 流式细胞仪检测 ECV-304 细胞 CD40 蛋白的表达

Fig.4 Expression of CD40 in ECV-304 cells detected by flow cytometry

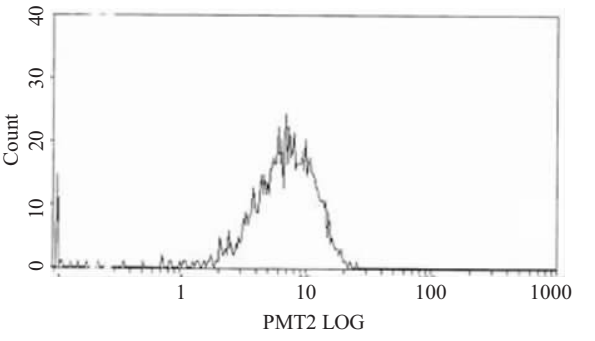

图 5 流式细胞仪检测转染 pCDNA3.1(+)/CD40 的 ECV-304 细胞 CD40 蛋白的表达

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(+)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(+)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] Bruemmer 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.
Wei EQ, Shen JZ. Trends in the post-genomic pharmacological research[J]. Prog Physiol Sci, 2002, 33(1): 7-11.

[12] 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.

[13] 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.