

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00254

稳定表达可诱导共刺激分子 CHO 细胞株的筛选及其生物学活性鉴定

丁庆莉,刘梦蕾,龙宪连,沈 茜*

第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433

[摘要] **目的:**构建携带人可诱导共刺激分子(inducible costimulator molecule, ICOS)基因的重组逆转录病毒载体,筛选稳定表达 ICOS 蛋白的 CHO 细胞株,并对其生物学活性进行鉴定。**方法:**RT-PCR 法从人 PBMC 中获取 ICOS cDNA,定向克隆到逆转录病毒载体上,制备逆转录病毒重组体 pMSCV-ICOS;经病毒包装细胞包装后抗性筛选出产高滴度病毒的细胞株,用高滴度病毒上清感染 CHO 细胞,抗性筛选出稳定表达细胞株。将 CHO-ICOS 细胞和 PBMC 以不同比例(1:1,1:2,1:5,1:10)共培养,加入亚刺激剂量(200 ng/ml)的抗人 CD3 抗体,采用³H-TdR 掺入法检测 PBMC 的增殖,流式细胞仪检测 T 细胞表面活化分子 CD25 表达情况,并以 CHO-pMSCV 细胞和 PBMC 以 1:1 比例共培养作为阴性对照以及未处理的 PBMC 作为空白对照。**结果:**成功构建逆转录病毒重组体 pMSCV-ICOS,筛选出稳定表达 ICOS 蛋白的 CHO 细胞株。³H-TdR 掺入法和流式细胞仪检测结果表明,与阴性对照及空白对照相比,CHO-ICOS 细胞与 PBMC 共培养能抑制 CD3 抗体诱导的 PBMC 增殖及活化($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞比例为 1:1 时抑制率最大,分别为(68±5.9)%、(44.08±3.26)%。**结论:**成功建立具有生物学活性的膜稳定表达人 ICOS 蛋白的 CHO 细胞株,为今后研究奠定了基础。

[关键词] 可诱导共刺激分子;重组逆转录病毒载体;转染

[中图分类号] R 392.111 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0254-05

Screening for CHO cell line stably expressing inducible costimulator protein and its biological activity

DING Qing-li, LIU Meng-lei, LONG Xian-lian, SHEN Qian*

Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant retroviral vector carrying human inducible costimulator (ICOS) gene, screen for CHO cell line stably expressing ICOS protein and to study its biological activity. **Methods:** ICOS cDNA was obtained from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) through RT-PCR and was cloned into retroviral vector to construct retroviral recombinant pMSCV-ICOS; the latter was then packed and the high-titer virus producing cells were screened. Then CHO cell was infected by this high-titer virus and the stable cell line was screened. CHO-ICOS cells were co-cultured with PBMC (the ratio of CHO-ICOS to PBMC being 1:1, 1:2, 1:5, and 1:10) in presence of substimulating dose of anti-human CD3 antibody. The proliferation of PBMC and the CD25 expression on T cells were examined by ³H-TdR incorporation method and flow cytometry, respectively. CHO-pMSCV cells co-cultured with PBMC (1:1) served as the negative control and PBMC served as blank control. **Results:** We successfully constructed the retroviral recombinant pMSCV-ICOS and obtained CHO cell line stably expressing ICOS protein. ³H-TdR incorporation method and flow cytometry showed that, compared with the negative control group and the blank control group, co-culture with CHO-ICOS cells significantly inhibited the anti-CD3 antibody-induced activation and proliferation of PBMC ($P<0.05$); the maximal inhibitory rates of activation and proliferation were obtained when the ratio of CHO-ICOS to PBMC was 1:1, being (68±5.9)% and (44.08±3.26)%, respectively. **Conclusion:** CHO cell line stably expressing ICOS protein has been successfully established, which lays a foundation for future study.

[KEY WORDS] inducible costimulator; recombinant retroviral vector; transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3):254-258]

T 细胞完全活化不仅需要 T 细胞受体 (TCR) 提供的第一信号,还需要 T 细胞表面共刺激分子与

[收稿日期] 2007-10-09 **[接受日期]** 2007-12-03

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2002AA214091). Supported by Hi-tech Research and Development Program of China (“863” program) (2002AA214091).

[作者简介] 丁庆莉,硕士生. E-mail: lydiadql@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070648, E-mail: msminli@hotmail.com

抗原递呈细胞(APC)表面相应受体结合所提供的共刺激信号(第二信号)。缺乏共刺激信号,则会发生抗原特异性 T 细胞凋亡或失能。共刺激分子家族中,研究最广泛也最深入的是 CD28 及其配体 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)。Hutloff 等^[1]发现局限表达于活化 T 细胞膜上 CD28 家族新成员——可诱导共刺激分子(inducible costimulator molecule, ICOS)。进一步的研究^[2-3]发现其生物学功能与 CD28 介导的共刺激信号不尽相同:CD28 是诱导初始 T 细胞增殖活化的关键性分子,而 ICOS 则是活化后促进 T 细胞分化并发挥效应的主要共刺激分子;CD28 分子主要参与机体的初次免疫应答,而 ICOS 主要是在再次免疫应答以及免疫记忆中发挥着重要作用。

国外研究^[4-6]发现,ICOS 共刺激途径在自身免疫性疾病、移植物抗宿主反应等的发生和发展中均起着至关重要的作用,成为目前相关研究的热点。Janke 等^[7]研究认为,ICOS 共刺激途径在 T 调节细胞、髓样树突状细胞等的生成和效应上也起主要作用。目前国内不少实验室已经表达出 ICOS 的融合蛋白用于实验研究,但体内 ICOS 蛋白并不以可溶性蛋白形式存在,而是锚定于 T 细胞膜表面发挥生物学作用。因此,本研究应用 PCR 方法制备逆转录病毒重组体 pMSCV-ICOS,表达高滴度病毒,感染 CHO 细胞,筛选稳定高表达 ICOS 蛋白的细胞株,并对其生物学功能进行初步鉴定,为今后的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 逆转录病毒载体 pMSCVpuro、病毒包装细胞系 PT-67 和 NIH3T3 由第二军医大学细胞生物学教研室惠赠。CHO 细胞和 JM109 菌为本实验室常规保存。人 ICOS PCR 引物由基康公司合成,胶回收试剂盒购于华舜公司,质粒抽提试剂盒购于 V-gene 公司,脂质体转染试剂盒 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司,各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、逆转录 PCR 试剂盒、DNA 相对分子质量标准物 DL-2000 均购于 TaKaRa 公司,重组逆病毒转化菌 DNA 序列由 TaKaRa 公司测序。FITC 标记抗人 ICOS 抗体、FITC 标记抗人 CD4 抗体、APC 标记抗人 CD25 抗体均购于 eBioscience 公司。

1.2 重组逆转录病毒载体的制备

1.2.1 人外周血单个核细胞(PBMC)的 RNA 抽取 取2份正常献血员外周血各 3 ml,经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心分离出 PBMC,按照 RNA 抽提常规操作步骤,从 PBMC 中提取出总 RNA。

1.2.2 逆转录 PCR(RT-PCR)及 PCR 反应 逆转录反应体系 20 μ l,包括总 RNA、缓冲液、dNTP 混合物、RNA 酶抑制剂、AMV 逆转录酶和随机引物等。反应条件:25 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 1 h,70 $^{\circ}$ C 10 min,产物 cDNA 进行 PCR 反应。人 ICOS 上游引物:5'-GTT GGA TCC GCC ACC ATG AAG TCA GGC CTC-3',下游引物:5'-GAG AAT TCT TAT AGG GTC ACA TCT G-3'。PCR 反应体系 50 μ l,包括引物、RT-PCR 产物、dNTP、*Taq* DNA 酶等;反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,共 35 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;反应完毕后 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 重组载体的构建与鉴定 ICOS 的 PCR 产物胶回收后经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,酶切产物电泳后再次胶回收用于连接和转化;同时,逆转录病毒载体 pMSCVpuro 也经上述酶切与胶回收。将 ICOS 的酶切胶回收产物与 pMSCVpuro 载体经 T4 DNA 连接酶连接过夜(16 $^{\circ}$ C),连接产物转化感受态 JM109 菌,转化菌涂布于抗性平板后 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养过夜。次日挑选单克隆菌落再次扩增过夜,用碱裂解法抽提出重组逆转录病毒载体 pMSCV-ICOS 后利用 *Xba*I 位点酶切鉴定,并进行 DNA 序列测定。

1.3 重组逆转录病毒的包装与产高滴度病毒细胞株的筛选 采用脂质体转染法。于转染前 24 h,铺 1×10^6 个 PT-67 包装细胞于 6 孔板内,当细胞汇合率达 70% ~ 80% 时,按照转染试剂盒 Lipofectamin2000 的操作步骤将 pMSCV 空载(对照)及 pMSCV-ICOS 转染入 PT-67 包装细胞,6 h 后更换培养基。转染 24 h 后加入嘌呤霉素筛选 1 周,筛选出的单克隆细胞利用 NIH3T3 细胞检测其产生病毒的滴度。滴度测定前 24 h,于 6 孔板内每孔铺 1×10^5 个 NIH3T3 细胞,共铺 6 孔,测定时每孔分别加入 10 倍系列稀释的病毒上清,24 h 后更换为抗性培养基,筛选 1 周。1 周后根据滴度测定值挑选出能产生高滴度病毒的稳定 PT-67 细胞株,并扩增此细胞株,收集病毒上清,于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 重组逆转录病毒感染 CHO 细胞与稳定细胞

株筛选 铺 2×10^5 个 CHO 细胞于 6 孔板内, 18~24 h 后当细胞汇合率至 60%~70% 时, 加入病毒上清, 并同时加入 $8 \mu\text{g/ml}$ polybrene, 培养 24 h 后更换为含嘌呤霉素的抗性培养基进行稳定细胞株的筛选。挑选出单克隆细胞抗性扩增并应用流式细胞仪对其进行鉴定, 直至筛选出 ICOS 表达率较高的 CHO-ICOS 细胞株及仅具有嘌呤霉素抗性但不表达 ICOS 的 CHO-pMSCV 空载细胞株。

1.5 CHO-ICOS 的生物学活性检测 采用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测细胞 PBMC 增殖, 利用流式细胞仪检测 PBMC 细胞表面活性分子 CD25 的表达。取正常献血员外周血 5 ml, 经 Ficoll 密度梯度离心分离出 PBMC, 调整细胞密度至 $4 \times 10^5/\text{孔}$, 共 96 孔。同时, CHO-ICOS 细胞以及 CHO-pMSCV 细胞经 0.5% 戊二醛处理 30 s 后再加入甘氨酸 3 min 中和固定细胞, 以保持其活性但不再增殖^[8], 并能悬浮于培养基中与 PBMC 更好的相互作用。将处理好的 CHO-ICOS 细胞和 PBMC 分别以 1:1、1:2、1:5、1:10 比例加入 96 孔板内共培养, 并设 CHO-pMSCV 细胞和 PBMC 以 1:1 比例共培养对照孔以及未处理的 PBMC 空白对照孔。

PBMC 在亚剂量 (200 ng/ml) 抗 CD3 抗体刺激下, 可以引起 T 细胞的活化和增殖。外源性 CHO-ICOS 可竞争结合 ICOS 配体 (ICOSL), 抑制或阻断 ICOS 共刺激通路, 从而使 T 细胞的活化和增殖降低。因此, 本研究在各孔内加入亚刺激剂量 (200 ng/ml) 的抗人 CD3 抗体, 培养 54 h 后实验孔及对照孔均加入 $^3\text{H-TdR}$ $50 \mu\text{l}/\text{孔}$, 18 h 后吸取细胞, 每孔加入闪烁液 $300 \mu\text{l}$ 后液闪仪 (Wallac) 测定每分钟脉冲计数, 观察细胞增殖程度。另一组在加入相同浓度抗 CD3 抗体刺激培养 72 h 后, 吸取细胞应用流式细胞仪检测其表面活性分子 CD25 的表达。以上实验中分离出 5 例正常献血员 PBMC, 进行了 5 次重复性实验, 取平均值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行单因素方差分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物 从人 PBMC 提取并逆转录出的 ICOS cDNA 经 PCR 扩增后, 其产物通过琼脂糖凝胶电泳可见 1 条 600 bp 的特异性条带 (图 1),

与预期结果一致。

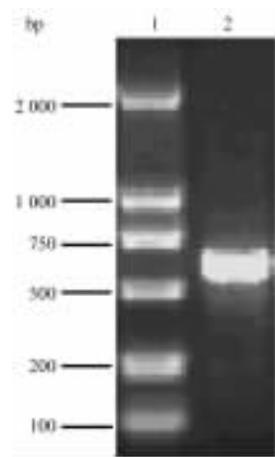


图 1 ICOS PCR 鉴定结果

Fig 1 Identification of ICOS on CHO cell membrane by PCR
1: DL2000 marker; 2: ICOS

2.2 重组逆转录病毒载体酶切鉴定 pMSCVpuro 上有 2 个 *Xba* I 酶切位点, 将 ICOS 连接入 pMSCVpuro 载体后, 由于 ICOS 内部也存在 *Xba* I 位点, 因此用 *Xba* I 对 pMSCV-ICOS 进行酶切鉴定, 结果 (图 2) 出现 3 条条带 (3.6、1.8、1.4 kb), 与预期结果一致。测序结果也与已知序列相符。

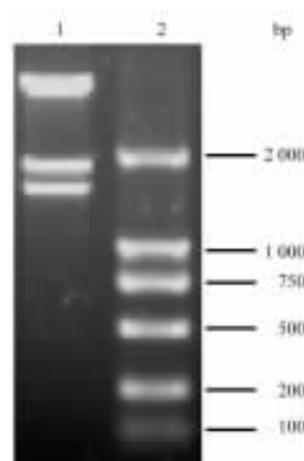


图 2 重组逆病毒载体酶切鉴定结果

Fig 2 Identification of recombinant pMSCV-ICOS by restriction enzyme digestion
1: pMSCV-ICOS; 2: DL2000 marker

2.3 CHO 细胞膜上 ICOS 分子的稳定表达 流式细胞仪检测抗性培养基筛选后的 CHO-ICOS 细胞, 结果 (图 3) 发现, ICOS 表达的阳性率 (98.43%) $> 98\%$, 而转染空载体的 CHO-pMSCV 细胞 ICOS 的阳性率仅为 0.74%。

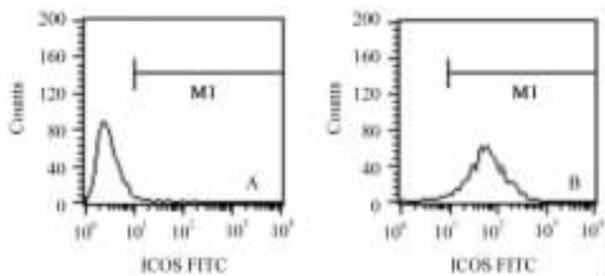


图3 流式细胞术检测 CHO 细胞膜 ICOS 的表达

Fig 3 Detection of ICOS on CHO cell membrane by flow cytometry
A:CHO-pMSCV;B:CHO-ICOS

2.4 CHO-ICOS 的生物学活性检测 ³H-TdR 掺入法(图4)及流式细胞结果(图5)发现:与仅存在抗 CD3 抗体刺激而不加入任何 CHO 细胞共培养的 PBMC 相比,对照 CHO-pMSCV 空载对 T 细胞的增殖以及 CD4⁺ T 细胞表面活化标志 CD25 的表达

均没有影响;CHO-ICOS 细胞与 PBMC 共培养能抑制 CD3 抗体诱导的 PBMC 增殖及活化($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),细胞比例为 1 : 1 时抑制率最大,分别为 $(68 \pm 5.9)\%$ 、 $(44.08 \pm 3.26)\%$ 。

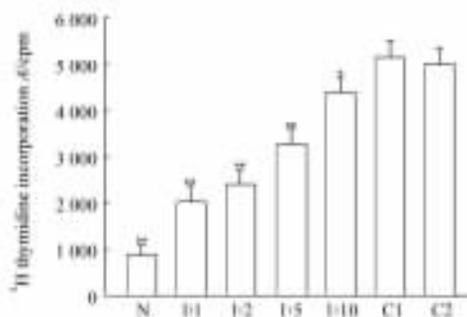


图4 CHO-COS 抑制 PBMC 的增殖

Fig 4 Inhibition of PBMC proliferation by CHO-ICOS
N:PBMC alone;1:1-1:10;Co-culture of CHO-ICOS and PBMC at indicated proportions + anti-CD3;C1: Co-culture of CHO-pMSCV and PBMC at 1 : 1 + anti-CD3; C2: PBMC + anti-CD3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs C1 group; $n=5, \bar{x} \pm s$

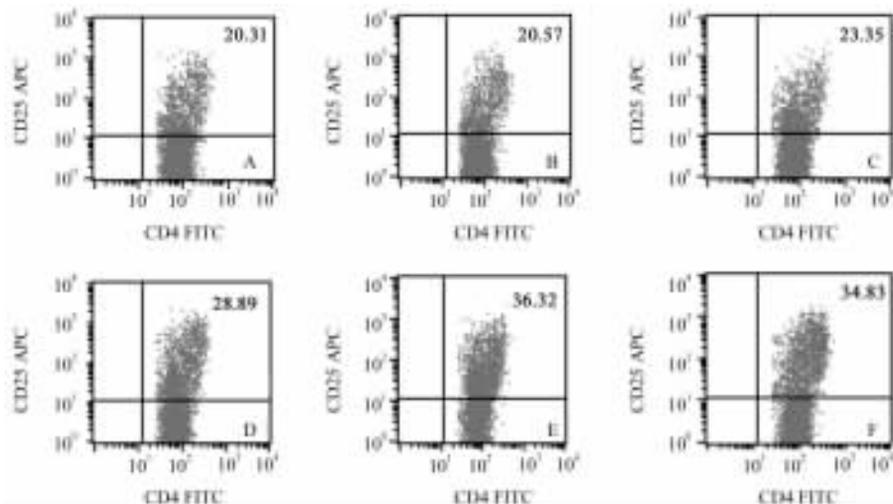


图5 CHO-ICOS 抑制 PBMC 的活化

Fig 5 Inhibition of PBMC activation by CHO-ICOS

A-D: Co-culture of CHO-ICOS and PBMC at 1 : 1,1 : 2,1 : 5,1 : 10 + anti-CD3; E:Co-culture of CHO-pMSCV and PBMC at 1 : 1+ anti-CD3; F:PBMC+anti-CD3. Data is a representative from one donor

3 讨论

T 淋巴细胞在细胞免疫和体液免疫的诱导中均发挥着重要的作用,自从双信号学说提出以来,共刺激分子在疾病的发生、发展中的作用越来越受到重视,对共刺激信号通路进行人工干预已成为治疗许多临床疾病的重要手段。ICOS 作为 CD28 家族的成员,是重要的共刺激分子,它在 T 细胞的增殖和活化,诱导细胞因子产生的过程中以及在 T/B 细胞

协同作用、抗体产生和类型转换中,均发挥着至关重要的作用^[2-3,9-11]。目前对多种疾病的动物模型研究表明,以 ICOS 途径为靶点的免疫调节对包括自身免疫性疾病和移植免疫长期耐受的形成以及某些感染性疾病的发生发展中均有着重要的临床治疗意义。

ICOS 仅表达在活化和记忆的 T 细胞上,而 ICOSL 则组成性表达在树突状细胞(DC)、B 细胞等抗原递呈细胞表面;也可经 TNF- α 、IFN- γ 诱导表达

于单核细胞、内皮细胞、上皮细胞等表面^[12]。较构建 ICOS 融合蛋白而言,非淋巴细胞源细胞膜上表达的 ICOS 更能真实的模拟 T 细胞 ICOS 表达的状态,为深入研究 ICOS 共刺激通路的生物学功能提供了非常有用的工具。本研究利用逆转录病毒载体成功地将人 ICOS 稳定表达于 CHO 细胞膜表面。为了验证重组 ICOS 的生物学活性,我们在亚刺激量抗 CD3 抗体模拟 TCR 激活 T 细胞的培养体系中,加入 CHO-ICOS 细胞作为与 ICOSL 结合的竞争物,阻断或抑制 ICOS 共刺激途径。实验结果表明:表达于 CHO 细胞膜上的 ICOS 具有很好的生物学活性,可以竞争性抑制抗 CD3 抗体刺激引起的 PBMC 细胞增殖和活化,抑制率最大可分别达(68±5.9)%和(44.08±3.26)%。因此,本研究成功建立膜稳定表达 ICOS 蛋白的 CHO 细胞株,为进一步深入研究 ICOS 共刺激途径奠定了基础。

(志谢 本研究得到第二军医大学长海医院实验诊断科张军博士、张薇薇技士的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Hutloff A, Dittrich A M, Beier K C, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28[J]. *Nature*, 1999, 397: 263-266.
- [2] Dong C, Juedes A E, Temann U A, Shresta S, Allison J P, Ruddle N H, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function[J]. *Nature*, 2001, 409: 97-101.
- [3] Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga S K, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses[J]. *Nature*, 2001, 409: 105-109.
- [4] Shilling R A, Bandukwala H S, Sperling A I. Regulation of T : B cell interactions by the inducible costimulator molecule: does ICOS "induce" disease[J]? *Clin Immunol*, 2006, 121: 13-18.
- [5] Kashizuka H, Sho M, Nomi T, Ikeda N, Kuzumoto Y, Akashi S, et al. Role of the ICOS-B7h costimulatory pathway in the pathophysiology of chronic allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2005, 79: 1045-1050.
- [6] Ansari M J, Fiorina P, Dada S, Guleria I, Ueno T, Yuan X, et al. Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice[J]. *Clin Immunol*, 2008, 126: 140-147.
- [7] Janke M, Witsch E J, Mages H W, Hutloff A, Kroczeck R A. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells[J]. *Immunology*, 2006, 118: 353-360.
- [8] Bertho N, Cerny J, Kim Y M, Fiebiger E, Ploegh H, Boes M. Requirements for T cell-polarized tubulation of class II⁺ compartments in dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2003, 171: 5689-5696.
- [9] Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, et al. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 1796-1808.
- [10] Lohning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages H W, Bonhagen K, Radbruch A, et al. Expression of ICOS *in vivo* defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10[J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 181-193.
- [11] McAdam A J, Greenwald R J, Levin M A, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching[J]. *Nature*, 2001, 409: 102-105.
- [12] Tan A H, Goh S Y, Wong S C, Lam K P. T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 128-136.

[本文编辑] 贾泽军

· 书 讯 ·

《呼吸系统毒理学基础与临床》已出版

本书由陆国才、袁伯俊编著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-776-6,16开,350页,定价60.00元。

本书全面介绍了呼吸系统毒理学基础理论与临床诊治方法。全书主要内容有:呼吸系统毒理学概述;呼吸系统解剖学基础;呼吸系统生理学基础;呼吸系统中毒的临床诊断与治疗;作用于呼吸系统的药物与毒物;呼吸系统毒理学实验技术和方法。本书可作为新药研发人员、呼吸系统专科医生、药理学和毒理学研究人员、研究生等专业人员的参考书。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>