【研究简报】

CD8 α 和 CD3 ϵ 的融合分子介导
T 淋巴细胞凋亡郑德先^① 郑 勇^{①*} Cox Terhorst^②

(①中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 北京 100005; ② Harvard Medical School, Boston MA 02215, USA. * 中国医学科学院基础医学研究所进修人员)

关键词 T 淋巴细胞凋亡 CD8 α /CD3 ϵ 融合分子 细胞凋亡测定法

T 淋巴细胞抗原受体(TCR)的 α/β 或 γ/δ 异二聚体与 CD3 形成抗原受体复合物(TCR/CD3), 才能识别抗原刺激并传递抗原刺激信号. CD3 一般由 4 种亚基组成, 即 CD3 γ , δ , ϵ 和 ζ . 在 8 条多肽链组成的 TCR/CD3 复合物中, CD3 ϵ 是 TCR/CD3 复合物装配的起始者和抗原刺激信号的传递者^[1]. 以抗 CD3 ϵ 的单克隆抗体模拟抗原刺激, 可引起胸腺细胞凋亡(apoptosis), 而在成熟的 T 细胞中, 一般会引起细胞激活、增殖或免疫不应性, CD3 ϵ 的激活信号是通过 CD3 ϵ 的胞内功能区 ITAM (immune receptor tyrosine-based activation motif) 而传递的^[2]. 最近的研究表明, 抗 CD3 ϵ 单克隆抗体也可诱导某些肿瘤细胞的凋亡, 这种细胞死亡形式称为激活诱导的细胞死亡(activation-induced cell death)^[3]. 但是, 到目前为止, 对于 CD3 ϵ 传递凋亡信号的分子机制尚未见报道.

本文报告采用聚合酶链反应(PCR)和分子克隆等方法, 构建了包括编码 CD8 α 的胞外区、跨膜区以及 CD3 ϵ 的膜内区的融合基因(CD8 ϵ)的真核细胞表达载体(pcDNA3/CD8 ϵ), 并在 CD8 阴性的人 Jurkat T 淋巴细胞(JK)中得到稳定表达. 使用抗 CD8 α 单克隆抗体刺激, 可诱导表达 CD8 ϵ 的 T 淋巴细胞凋亡, 但不能诱导对照细胞的凋亡, 表明 CD3 ϵ 的胞内功能区可接受并传递 CD8 α 的抗原刺激信号, 引起细胞凋亡; CD3 ϵ 的胞内区既含有细胞激活功能区, 也含有细胞凋亡功能区.

1 材料与方法

1.1 CD8 ϵ 融合基因的合成

根据文献[4, 5]报道的人 CD8 α 和 CD3 ϵ cDNA 的核苷酸顺序分别设计如下引物:

P1. 5'-CGCGAAAGCTTTGGCCATGGCCTTACCAG-3',

P2. 5'-GCTCCAGTAATAAATGACCATGTTGCAGTAAAGGGTGATAACC-3'

P3. 5'-GGTTATCACCCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGACGTG-3',

P4. 5'-CGGGATCCTCAGACTGCTCTCTGATTC-3'.

其中引物 P1 为包括 Hind III 内切酶切点和 CD8 α 起始密码子的 5'上游序列, 引物 P2 为 CD8 α 第 600 到 621 位核苷酸序列与 CD3 ϵ 第 460 到 480 位核苷酸序列融合序列, 分别代表 CD8 α 跨膜区与 CD3 ϵ 膜内区连接处序列, 引物 P3 为引物 P2 的互补序列, 引物 P4 为包括 BamHI 酶切位点和 CD3 ϵ 终止密码子的 3'下游序列. 为了得到包括 CD8 α 胞外区、跨膜区和 CD3 ϵ 胞内区的融合基因, 首先以 CD8 α cDNA 为模板和 P1, P2 为引物以 PCR 法扩增 CD8 α 的胞外区和跨膜

区,长度为 621 bp. 然后再以 CD3 ϵ cDNA 为模板和 P3, P4 为引物,以 PCR 法扩增 CD3 ϵ 胞内区,长度为 186 bp. 将两组 PCR 产物混合,在适当条件下变性和复性后,再进行第三次 PCR 扩增,从而得到两端分别有 Hind III 和 BamHI 酶切位点 CD8 ϵ 融合基因,全长为 816 bp(图 1).

图1 CD8 ϵ 融合基因的合成及其真核表达载体的构建与鉴定

(a) CD8 ϵ 融合基因的合成及克隆示意图;(b) CD8 ϵ /pcDNA3 表达载体的鉴定:1——CD8 ϵ /pcDNA3 质粒 DNA, 2——CD8 ϵ /pcDNA3 质粒 DNA 以 HindIII 单酶切的结果,3——CD8 ϵ /pcDNA3 质粒 DNA 以 HindIII/BamHI 双酶切的结果,4——DNA 分子量标准

1.2 CD8 ϵ cDNA 真核表达载体 pcDNA3/CD8 ϵ 的构建与鉴定

CD8 ϵ cDNA 和真核表达载体 pcDNA3 (Clon Tech) 分别经 HindIII 和 BamHI 酶切水解、纯化后,在 T₄ DNA 连接酶作用下连接,转化大肠杆菌 DH5 α (GIBCOBRL),按常规筛选鉴定,制备 pcDNA3/CD8 ϵ 真核表达载体质粒 DNA,进行酶切、琼脂糖凝胶电泳和 Sanger 法序列分析鉴定正确无误后备用。

1.3 稳定表达 CD8 ϵ 细胞株的建立

人 Jurkat T 细胞(JK, ATCC)在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基和 5% CO₂ 孵育箱中、37℃ 培养至对数生长期后,收集 4×10^7 个细胞,悬浮于 2 mL 含 10 mmol/L MgCl₂ 和 20 mmol/L Hepes 的磷酸缓冲液(PBS)中备用. 用 0.4 cm 的电极杯中加入 0.7 mL 细胞悬液和约 40 μ g 线性化的 pcDNA3/CD8 ϵ 质粒 DNA,混匀,冰上放置 10 min 后,使用基因脉冲仪(Bio-Red),在电压 0.25 kV、电容 960 μ F 和室温条件下进行电穿孔术转染细胞. 设置不含有 DNA 的细胞悬液为阴性对照,以加 pcDNA3 质粒 DNA 的细胞为实验对照. 电穿孔后,细胞于室温放置 10 min,转移到 25 mL 培养瓶中,加入 RPMI1640 完全培养基培养 24 h,加入选择性抗菌素 G418(GIBCOBRL)至 0.8 mg/mL,继续培养 14 d. 对照组没有细胞生长,实验组长出具有 G418 抗性的细胞后,进行有限稀释法制备阳性细胞克隆. 以 PE 标记的抗人 CD8 α 单克

隆抗体(PharMingen)对各细胞克隆染色并用流式荧光激活细胞仪(Coulter 752)进行鉴定, PE 阳性的细胞为稳定表达 CD8 ϵ 的细胞, 命名为 JK/CD8 ϵ .

1.4 JK/CD8 ϵ 细胞凋亡的诱导

在 96 孔平底培养板中, 每孔加入 100 μ L 纯化的鼠抗人 CD8 α 单克隆抗体(IgG1, 100 μ g/mL PBS, PharMingen), 于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中包被 1.5 h, 然后吸去抗体, 用 RPMI 1640 培养基洗 2 次, 加入已悬浮于 RPMI1640 培养基中的 JK/CD8 ϵ 细胞 100 μ L (2.5×10^5 个/mL), 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 孵箱中培养 48 h, 分别取样测定凋亡细胞的百分数. 以未包被抗体的孔中细胞作阴性对照, 以 pcDNA3 质粒 DNA 转染的细胞为实验对照.

1.5 JK/CD8 ϵ 凋亡细胞的标记测定

根据核酸缺口末端标记法(nick end labeling)的基本原理, 建立了如下使用流式荧光激活细胞仪测定细胞凋亡的方法: 实验组和各对照组细胞先用含 1% 甲醛的 PBS(pH7.4)在冰上固定 15 min, PBS 洗两次后, 将细胞悬浮于 100 μ L 70% 的乙醇, 置 -20 $^{\circ}$ C 固定 1 h(最长可放置 3 d), 再用 PBS 洗 2 次, 去除上清, 加入 10 μ L 脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)缓冲液[0.1 mol/L (CH $_3$) $_2$ ·AsO·ONa pH6.85, 1 mmol/L CoCl $_2$, 0.1 mmol/L DTT, 0.1 mg/mL BSA], 5U TdT 酶(Promega)、0.5 μ L Cy5-dCTP(3 nmol/L, BDS Incorp.)和 39.25 μ L H $_2$ O, 混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min. 细胞用含 0.5% Tween 20 的 PBS 洗 3 次后, 重悬于 400 μ L PBS 中, 避光保存于 4 $^{\circ}$ C. 细胞荧光测定在流式荧光激活细胞仪(Coulter 752)上进行, 使用激发光滤光片为 640/20, 发射光滤光片为 682/22. Cy5 阳性细胞即为凋亡细胞. 设置 Jurkat T 淋巴细胞为阴性细胞对照, pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞为模拟细胞对照, 不加 TdT 酶的 CD8 ϵ /pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞为标记的阴性对照.

1.6 凋亡细胞 DNA 断裂的测定

按文献[6]的方法提取各细胞 DNA 后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析.

2 实验结果

2.1 CD8 ϵ 融合基因的合成及其真核表达载体的构建

按图 1(a)所示的步骤合成 CD8 α 的胞外区、跨膜区和 CD3 ϵ 胞内区的融合基因(命名为 CD8 ϵ)的长度应为 816 bp, 定向克隆入 pcDNA3 表达载体后, 经以 Hind III/BamH I 双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定, 证明大小正确(图 1(b)); 经 DNA 序列分析表明 CD8 ϵ 的核苷酸序列与已知序列完全一致(数据未列出), 证明 CD8 ϵ 融合基因的合成及其真核表达载体(pcDNA3/CD8 ϵ)的构建获得成功.

2.2 稳定表达 CD8 ϵ 融合蛋白的细胞株的建立与鉴定

采用电穿孔术将 CD8 ϵ 融合基因真核表达载体 DNA 转染 CD8 阴性的 Jurkat T 淋巴细胞株后, 经 G418 筛选和有限稀释法培养, 得到细胞克隆后, 进行荧光抗体染色鉴定, 如图 2 所示, 未转染的(图 2(a)) 和 pcDNA3 DNA 转染的(图 2(c)) Jurkat T 淋巴细胞经 PE 标记的抗 CD8 α 单克隆抗体色均为阴性, 而未转染的和 pcDNA3/CD8 ϵ DNA 转染的 Jurkat T 淋巴细胞分别经 PE 标记的抗 CD3 ϵ (图 2(b)) 和 CD8 α (图 2(d)) 单克隆抗体染色均为阳性, 表明成功地获得了稳定表达 CD8 ϵ 融合蛋白的细胞株, 命名为 JK/CD8 ϵ .

2.3 流式荧光细胞仪鉴定 CD8 α 单克隆抗体诱导的 JK/CD8 ϵ 细胞凋亡

如图 3 所示, 用 Cy5-dCTP 核酸缺口末端标记法和流式荧光细胞仪分析, JK/CD8 ϵ 细胞经

图2 流式荧光细胞仪鉴定稳定表达 CD8 ϵ 融合蛋白细胞的结果

(a) Jurkat T 淋巴细胞以抗 CD8 α 单克隆抗体染色; (b) Jurkat T 淋巴细胞以抗 CD3 ϵ 单克隆抗体染色; (c) pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞以抗 CD8 α 单克隆抗体染色; (d) CD8 ϵ /pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞以抗 CD8 α 单克隆抗体染色结果. M1 代表 PE-CD8 α 阳性细胞荧光强度

鼠抗人 CD8 α 单克隆抗体刺激 48 h 后, 有 33% 的细胞凋亡(图 3(a)), 而未转染的(图 3(a))和 pcDNA3 DNA 转染的(图 3(b)) Jurkat T 淋巴细胞均未出现细胞凋亡, 表明 CD8 α 单抗特异地诱导 JK/CD8 ϵ 细胞凋亡.

2.4 JK/CD8 ϵ 细胞凋亡的 DNA 断裂分析

为了进一步鉴定 CD8 α 单克隆抗体诱导 JK/CD8 ϵ 的细胞凋亡, 从抗体刺激的细胞提取 DNA 后, 进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析, 表明 JK/CD8 ϵ 细胞 DNA 明显断裂, 形成梯形 DNA 区带(DNA ladder), 而对照细胞未出现(图 4), 为 CD8 α 单克隆抗体诱导 JK/CD8 ϵ 细胞凋亡提供了生物化学证据.

3 讨论

本研究采用基因分子生物学的方法, 构建了人 CD8 α 分子的胞外区、跨膜区和 CD3 ϵ 分子的胞内区的融合基因(CD8 ϵ), 并在 CD8 阳性的人 Jurkat T 淋巴细胞株中得到稳定表达(JK/CD8 ϵ), 抗人 CD8 α 单克隆抗体刺激可诱导 JK/CD8 ϵ 细胞产生明显的细胞凋亡. 由于 Jurkat 细胞是 CD8 阴性细胞株, CD8 ϵ 融合基因的建立和表达, 不仅把 CD8 α 分子与 CD3 ϵ 分子联系起来, 而且用 CD8 α 单克隆抗体处理 JK/CD8 ϵ 细胞排除了细胞内源性分子的干扰, 从而在分子水平上, 首次证明了 CD3 ϵ 能接受并传递 CD8 α 分子的刺激信号, 诱导人 Jurkat T 淋巴细胞产生凋亡. 同时表明 CD3 ϵ 分子的胞内区除了含有已报道的激活功能区外, 还含有死亡功能区, TCR/CD3 介导的信号传递作用, 既与细胞的激活有关, 又与细胞的凋亡有关. 研究 T 细胞激活与凋亡之间的平衡关系, 对于理解 T 细胞的发育、分化、成熟及其功能表达, 具有十分重要的意义.

最近, King 等^[7]根据哺乳动物的 Fas/Apo-1 受体、肿瘤坏死因子受体(TNFR1)和神经生长因子受体(NGFR)的死亡功能区与果蝇的死亡基因(reaper)的核苷酸序列有同一性的特点, 提出了“嵌合祖先假说”, 认为在进化过程中, 细胞凋亡分子 Fas/Apo-1 是由 NGFR 家族的胞

图3 Cy5-dCTP 核酸缺口末端标记和流式荧光细胞仪分析法鉴定 JK/CD8 α 细胞凋亡

(a) Cy5-dCTP 标记的 Jurkat T 淋巴细胞, 为阴性细胞对照; (b) Cyt-dCTP 标记的 pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞, 为模拟细胞对照; (c) CD8 ϵ /pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞, 标记时不加 TdT 酶, 为 Cy5-dCTP 标记的阴性对照; (d) Cy5-dCTP 标记的 CD8 ϵ /pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞

图4 凋亡的 JK/CD8 α 细胞 DNA 断裂分析结果

1——100 bp DNA 分子量标准; 2——Jurkat T 淋巴细胞; 3——pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞; 4——CD8 ϵ /pcDNA3 转染的 Jurkat T 淋巴细胞 (JK/CD8 ϵ)

外功能区与一个胞内功能区嵌合的结果. 因此, 本研究建立的能稳定表达 CD8 ϵ 融合分子的 Jurkat T 淋巴细胞, 为进一步在分子水平上研究 CD3 ϵ 凋亡功能区的结构以及 CD3 ϵ 介导的凋亡信号传递途径打下良好的基础.

致谢 国家自然科学基金(批准号:39470160)、卫生部基金(合同号:94-1-017)、中国医学科学院基金(批准号:931008)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Clevers H, Durlap S, Satio H, et al. Characterization and expression of the murine CD3 ϵ gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(22):8 623~8 627
- 2 Cambier J C. New nomenclature for the Reth motif (or ARHI/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today*, 1995, 16(2): 110
- 3 Ju S T, Panka D J, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*, 1995, 373(6513):444~447
- 4 Littman D R, Thomas Y, Maddon P J, et al. The isolation and sequence of the gene encoding T8; a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell*, 1985, 40(2): 237~246
- 5 Gold D P, Puck J M, Pettet C L, et al. Isolation of cDNA clones encoding the 20 K nonglycosylate polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. *Nature*, 1986, 321(22): 431~434
- 6 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, 119(2): 493~501
- 7 King K L, Squier M K T, Sellins K S. Cell death comes to life in purgatory: a keystone meeting on apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 1995, 5(7): 287~289

(1996-01-08 收稿, 1996-04-02 收修改稿)