CII TA 反义 RNA 对 HLA II 类分子表达的抑制作用

周彩红 卢大儒* 朱其泉 邱信芳 薛京伦

(复旦大学生命科学学院遗传学研究所, 上海 200433. * 联系人, Email: drlu@fudan.edu.cn)

摘要 为研究 MHC II 类基因转录活化因子(C II TA)对人类白细胞抗原(HLA) II 类分子表达的影响, 用 RT-PCR 方法从 Raji 细胞中克隆到 C II TA 基因 cDNA 5' 端片段, 构建成 C II TA 反义 RNA 真核表达载体 pcDNA- II, 基因转移 HLA II 类分子诱导型表达的 HeLa 细胞. 经 IFN- γ 诱导, 发现稳定转染 pcDNA- II 的细胞中 HLA-DR, DP 和 DQ 的表达均较转 pcDNA3 空载体的细胞有显著下降, 而 HLA I 类分子的表达不受影响. 实验证明 C II TA 反义 RNA 对 HLA II 类分子表达具有显著的抑制作用, 为进一步开展低免疫原性的细胞移植提供了依据.

关键词 C II TA 反义 RNA HLA II 类分子

HLA II 类抗原是移植免疫应答中的主要移植抗原, 在抗原识别、T 细胞活化及免疫调节中起十分重要的作用^[1]. 同种异型 HLA II 类抗原的相容与否和急性排异反应的发生及移植细胞的存活密切相关, 抑制移植细胞中 HLA II 类分子表达, 对于诱导同种异型移植免疫耐受, 推广细胞移植在基因治疗和组织工程中的应用有重要价值. 1993 年, Steimle 等人^[2]首先克隆了对 MHC II 类基因表达起主要调控作用的转录活化因子 C II TA 的基因. 研究表明该因子对 HLA II 类分子及在抗原递呈中起重要作用的 DM, Ii 等分子的表达都有专一且严格的调控作用, 但对于 C II TA 在移植领域中的应用尚未见报道^[3, 4]. 我们应用反义 RNA 技术抑制细胞内 C II TA 基因的表达, 探讨其对下游 MHC II 类基因表达的影响, 从而为制备 HLA II 类分子低表达的移植细胞, 诱导同种异体细胞移植的免疫耐受提供了新的简单有效的方法.

1 材料和方法

(1) 实验材料. 细胞系 Raji 由上海长海医院检验科惠赠, 用 RPMI1640 培养基加 10% 小牛血清培养; HeLa 细胞系购自 ATCC, 用 DMEM 培养基加 10% 小牛血清培养. 质粒 pcDNA3 由上海第二军医大学分子遗传学教研室惠赠; 质粒 pBS(SK⁻)由本实验室保存. G418 为美国 Sigma 公司产品, AMV 反转录系统为 Promega 公司产品. 鼠抗人 HLA-A, B, C, HLA-DR, HLA-DP 及 HLA-DQ 单克隆抗体为 PharMingen 公司产品, 藻红蛋白标记羊抗鼠单克隆抗体购自 Immunotech 公司. 辣根过氧化物酶(HRP)标记试剂盒为晶美生物公司产品. C II TA 基因特异性引物由本实验室设计合成, 引物 1: 5' -GCCTGGCTGGGATTCCTACAC-3', 引物 2: 5' -CGATCACTTCATCTGGTCCTAT-3'; *neo* 基因检测引物由长海医院血液科提供, 引物 1: 5' -GTTGTCACTGAAGCGGGAAGG-3', 引物 2: 5' -CCATGAATATCGGCAAGCAGGC-3'.

(2) C II TA 基因 5' 端 cDNA 片段的克隆. 1×10^7 对数生长期 Raji 细胞按 QIGEN 公司 RNeasy Mini Kit 说明书抽提总 RNA, 反转录后进行 PCR 扩增获得 C II TA 5' 端 cDNA 片段, 条件如下: 95℃变性 5 min, 再以 55℃, 45 s, 72℃, 1 min, 94℃, 30 s 反应 30 个循环, 72℃延伸 5 min. 凝胶电泳, 回收目的片段, Klenow 酶处理. 各种质粒的酶切、连接及鉴定均按常规方法进行^[5].

(3) 细胞转染与鉴定. 对数生长期 HeLa 细胞以 30% 密度接种, 于 37℃含 5% CO₂ 的培养箱中培养至 50%~80% 融合. 磷酸钙介导基因转移方法按常规方法进行^[5]. 转染后 48 h 收集细胞, 1:10 接种后 G418 选择 2 周. 克隆扩增后抽提基因组 DNA, 分别以 *neo* 基因引物和 C

II TA 基因的引物进行 PCR 扩增. *neo* 基因引物的 PCR 扩增条件为: 95℃变性 5 min, 再以 56℃, 35 s, 72℃, 1 min, 94℃, 30 s 反应 30 个循环, 72℃延伸 5 min.

(4) 转染后细胞中 HLA I 类和 II 类分子的检测. (i) 流式细胞计数. 取 1 000 U/mL IFN- γ 诱导 3 d 后的 HeLa 细胞, 用 EDTA-Na₂ 消化液消化, PBS 洗 2 次, 调成 1×10^6 mL⁻¹, 依次标以鼠抗人 HLA-A, B, C, HLA-DR, HLA-DP 和 HLA-DQ 和藻红蛋白标记的二抗. 重复检测 3 次. (ii) HRP 标记细胞染色. IFN- γ 诱导后细胞接种至载玻片上, 待细胞贴壁后固定, 标以特异的一抗, 生物素标羊抗鼠抗体及 HRP 标记的链霉亲和素, 显色后细胞再以苏木素衬染.

2 结果和分析

2.1 C II TA 反义 RNA 表达载体的构建

C II TA 基因在人的组织和细胞中有 4 种不同的转录本, Raji 细胞中表达的属 III 型. 引物设计以 Steimle 等人^[2]报道的 cDNA 序列为模板, 从第 94 位开始至第 500 位止, 包含了 III 型转录本第 1, 2 个 AUG 起始密码子, 并包括 1, 2 外显子的部分序列. RT-PCR 后可检测到单一条带(图 1).

回收 RT-PCR 产物, Klenow 酶处理; pBS(SK⁻)质粒用 *EcoR* V 酶切, CIP 酶处理, 平末端连接两片段成质粒 pBS- II, 酶切鉴定出正确的转化子并进行测序. pBS- II 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切取基因片段, 与经同样处理的 pcDNA3 载体连接, 构建成 C II TA 反义 RNA 真核细胞

图 1 RT-PCR 电泳图谱
1—— 阴性对照, 2—— C II TA 基因片段, 3——
pBR322/*Msp* I

图 2 质粒 pcDNA- II 结构简图

表达载体 pcDNA- II (图 2).

中间载体 pBS- II 以 T7 引物测序时发现插入的 cDNA 全长为 406 bp, 其中在第 187 位有一 C 的缺失, 所测的两个克隆中都如此. 因该区域属 Kozak 保守序列, GC 百分含量相对较高, 推测由此形成的二级结构影响了反转录的准确性, 也可能由测序误差引起. 将该段序列反向接入 pcDNA3 表达载体中, 由细胞病毒早期启动子 CMV 控制转录, 以 *neo* 基因作为 G418 选择的标记基因.

2.2 基因转移细胞系的 PCR 鉴定

以质粒 pcDNA-3 作为阳性对照, 未转基因的 HeLa 细胞作为阴性对照. 将 pcDNA3 和 pcDNA- II 转染入 HeLa 细胞中, 筛选出 G418 抗性的克隆抽提总 DNA. 分别以针对 *neo* 基因和 C II TA 基因片段的引物进行 PCR 扩增, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 可发现 HeLa/pcDNA3 和 HeLa/pcDNA- II 两个细胞系中都出现 *neo* 基因特异性的 325 bp 条带, 而 C II TA 基因特异性的

图 3 基因转移 HeLa 细胞系的 PCR 鉴定

1, 2——阴性对照; 3, 4——质粒 pcDNA- II 的 *neo* 和 C II TA 基因产物; 5——pBR322/*Msp* I; 6, 7 和 8, 9 分别为 HeLa/pcDNA3, HeLa/pcDNA- II 细胞的 *neo* 和 C II TA 基因产物

406 bp 条带只在 HeLa/pcDNA- II 细胞系中检测到(图 3).

2.3 HLA II 类分子表达的检测

正常情况下, HLA II 类分子的表达仅限于 B 淋巴细胞、巨噬细胞、活化 T 细胞及树突状细胞等. HeLa 细胞属非职业性抗原提呈细胞, 一般为 HLA II 类分子表达阴性, 但经 IFN- γ 诱导, II 类分子的表达可显著增加. 在 HeLa/pcDNA- II 细胞中, 内源 C II TA 基因的表达为反义 RNA 所抑制, 即使经 IFN- γ 诱导, 与经同样处理的 HeLa/pcDNA3 细胞相比, 细胞表面及胞浆内 HLA-DR, DP, DQ 的表达都显著降低, 细胞阳性率分别从原来的 86.7%, 88.7%, 47.2% 降至 3.9%, 4.8%, 1.9%, 而 HLA I 类分子的表达变化很小(图 4 和 5). 这说明 C II TA 的表达抑制后, 对 HLA II 类抗原 3 种主要的亚型都有明显的抑制作用, 但几乎不影响 HLA I 类抗原表达.

3 讨论

MHC II 类基因是一多分子且具高度多态的复杂基因群, DR, DP, DQ 是 HLA II 类抗原中主要的 3 种亚型. 在免疫识别和应答过程中, 3 种分子可选择性结合不同的抗原肽, 而 Ii 和 DM 分子对于抗原肽-HLA II 类抗原复合物的形成至关重要^[6, 7]. 因其作用的相关性, 不同 HLA II 类分子及 Ii 和 DM 的表达是协同的. 本实验中, IFN- γ 的诱导可使 HeLa 细胞中 HLA-DR, DP 和 DQ 表达量增加, 且随着诱导时间的延长(1~3 d), 其增加的幅度也相应提高; 而在表达受抑制的情况下, 如 TGF- β 等细胞因子及 C II TA 基因反义 RNA 的作用等, 各不同分子的表达都相应降低. 但 3 种亚型表达并非完全一致, 一般而言, DR, DP 的表达量及阳性率要高于 DQ 的表达. 从基因结构上看, 3 种分子, 包括 DM 和 Ii, 各基因的启动子区都存在保守的 S/X/Y 盒, 可为一些共同的转录调节因子所调控^[8].

MHC II 类基因因其在免疫发生和维持中的重要作用而受到严格调控, 但在影响其转录的多种调节因子中, 惟有 C II TA 的表达是与其平行的. HLA II 类分子在不同组织和细胞中的特

图 4 FACS 检测 HLA 细胞阳性率

(a) HeLa/pcDNA3 细胞, (b) HeLa/pcDNA3+IFN- γ ; (c) HeLa/pcDNA- II; (d) HeLa/pcDNA- II +IFN- γ

图.5 免疫组化检测细胞中HLA抗原表达

A, B, C分别为阴性对照、HeLa/pcDNA3细胞+ IFN- γ 及HeLa/pcDNA- II细胞+ IFN- γ . 阴性细胞衬染成蓝色, 阳性细胞胞浆和膜上表达的HLA分子因HRP标记而呈红色, 细胞核不着色

异性表达也由 C II TA 调节^[9]. C II TA 在人类有 4 种不同的转录本, III 型转录本主要在 B 淋巴细胞和富含 B 淋巴细胞的组织如脾脏、甲状腺以及胸腺中表达, 但在树突状细胞和某些 IFN- γ 诱导后的细胞系中也可检测到低水平的 III 型 mRNA. IV 型转录本是皮肤成纤维细胞、内皮细胞等非职业性抗原提呈细胞经 IFN- γ 诱导表达的主要形式. 因 4 种转录本间有相同的 3' 末端, 设计引物时以 III 型转录本为模板, 尽管所得的反义 RNA 与 HeLa 细胞内源 C II TA mRNA 的 5' 端有部分序列不能完全匹配, 但从下游基因的表达抑制情况看, 该反义 RNA 的作用还是较为显著的.

C II TA 基因反义 RNA 在 HeLa 细胞系中的作用提示了其潜在的临床应用价值, 但对于 C II TA 反义 RNA 在其他细胞及细胞移植动物模型中的作用还有待于进一步实验证实. 基因治疗及组织工程中所采用的靶细胞大部分属于职业或非职业性的抗原提呈细胞, 移植后, 体内相关细胞因子的作用可促进或诱导细胞 HLA II 类分子的表达, 从而介导免疫杀伤. 原位或基因修饰后抑制细胞 HLA II 类分子的表达, 即可阻断移植抗原的识别和应答, 从而诱导抗原特异性的免疫耐受. 此外, HLA II 类分子的过量表达与多种自身免疫性疾病相关, 对这些疾病来说, C II TA 反义 RNA 不失为一种易于制备和操作的免疫药物.

致谢 感谢长海医院检验科沈茜研究员对本研究的指导和帮助. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39880019)和国家“八六三”高技术计划(863-Z20-02-01)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci*, 1999, 4: D476-480

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-13-1405>

- 2 Steimle V, Otten L A, Zufferey M. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or Bare lymphocyte syndrome). *Cell*, 1993, 75(1): 135~146
- 3 Chang C H, Flavell R A. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med*, 1995, 181(2): 765~767
- 4 Chin K C, Li G, Ting J P. Activation and transdominant suppression of MHC class II and HLA DMB promoter by a series of C-terminal class II transactivator deletion mutants. *J Immunol*, 1997, 159(6): 2789~2794
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 6 Fairchild P J. Presentation of antigenic peptides by products of the major histocompatibility complex. *J Pept Sci*, 1998, 4(3): 182~194
- 7 Brodsky F M, Lem L, Bresnahan P A, et al. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens*, 47: 464~471
- 8 Boss J M. Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9(1): 107~113
- 9 Mottet A M, Otten L A, Steimle V, et al. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator C II TA. *J EMBO*, 1997, 16(10): 2851~2860

(1999-08-12 收稿, 2000-03-30 收修改稿)