

## 人 MCP cDNA 在 NIH3T3 细胞中表达及功能研究

黄 健 李文鑫\* 郑从义

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

**摘 要** 通过构建表达人膜辅因子蛋白 MCP 编码区全长 cDNA 的重组载体 pcDNA3MCP,以磷酸钙沉淀法转染 NIH3T3 细胞,用 G418 筛选阳性克隆,并鉴定 MCP cDNA 在细胞中的表达。将血清梯度稀释并与细胞孵育,然后检测细胞活力:灭活的人血清不能引起对照细胞与 MCP 转染细胞的胞毒作用,而新鲜人血清可使对照细胞发生补体依赖的细胞毒反应,MCP 转染细胞由于 MCP 蛋白的合成,细胞受到保护不发生该反应。另外,MCP 转染细胞只获得对人补体的抵抗能力,对兔、豚鼠补体与对照细胞一样有不同程度的细胞裂解,在细胞水平上人同种限制因子的表达可以保护异源细胞免受补体的攻击。

**关键词** 同源限制因子, MCP, NIH3T3 细胞, 补体溶破

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0155-03

异种器官移植有可能是解决我国乃至全世界可供移植器官严重缺乏的有效途径之一<sup>[1]</sup>,但免疫排斥,特别是超急性排斥反应的迅速发生完全制约了它的发展。补体系统在激发超急性排斥反应过程中的作用非常重要<sup>[2]</sup>,补体激活的调控机制成为解决问题的关键:其中人的补体调节因子复杂多样,至今已发现 17 种,例如衰变加速因子 DAF、膜辅因子蛋白 MCP、CR<sub>1</sub>、C<sub>8</sub>bp 及 CD59 等一些具同种限制作用的蛋白质能使补体系统分辨“自我”与“非我”,使补体的激活处于严密的调节和控制之下<sup>[3]</sup>。膜辅因子蛋白(Membrane cofactor protein, MCP)是其中的一个膜结合补体调控蛋白,它具有细胞表面标记和辅助活性,它可与 C<sub>3</sub>b 或 C<sub>4</sub>b 结合,促进 C<sub>4</sub>b/C<sub>3</sub>b 灭活酶对之进行裂解灭活,从而中断补体激活途径<sup>[4]</sup>。我们采用 RT-PCR 方法从人胚胎总 RNA 得到了一种人 MCP 编码区全长 cDNA<sup>[5]</sup>,将该 cDNA 与 pcDNA3 重组构建哺乳动物细胞表达载体,转染 NIH3T3 细胞,并对细胞表达蛋白的功能进行了初步检测。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 质粒与菌株

含人 MCP 全长 cDNA 的 pGEM MCP(-)载体

系本室采用 RT-PCR 方法克隆获得<sup>[5]</sup>,pcDNA3 载体购自 Invitrogene 公司。

#### 1.2 酶与试剂

工具酶购自 Promega 公司或华美生物工程公司,其它生化试剂均为国产分析纯。

#### 1.3 细胞株与培养基

小鼠 NIH3T3 细胞来源于中国典型培养物保藏中心(CCTCC,武汉),其完全培养基为 DMEM(Gibco),其中含 12% 小牛血清(Gibco),选择培养基为上述培养基加入 G418 组成。

**1.4 pcDNA3 MCP 重组真核表达载体构建及鉴定**  
质粒 DNA 的酶切、片段回收、连接、转化和酶切鉴定,参照文献[6]进行。

#### 1.5 转染哺乳动物细胞

参照文献[6]用磷酸钙沉淀法将 pcDNA3(对照)及 pcDNA3 MCP 二种质粒分别转染 NIH3T3 细胞。

#### 1.6 PCR 方法检测外源基因的整合

参照文献[5],分别以 MCP 转染细胞及对照细胞的高分子量 DNA 为模板进行 PCR 检测。

#### 1.7 表达产物的功能测定

将新鲜或灭活的正常人、兔、豚鼠血清梯度稀释,与 MCP 转染细胞和对照细胞分别于 37℃ 孵育

收稿日期:1999-03-15,修回日期:2000-01-03。

基金项目:湖北省“九五”重点科技计划项目资助课题(96192004)。

\* 通讯联系人。

1h,用5%伊红染色,检测细胞活力,按活细胞% =  $\frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100$  计算。

## 2 结 果

### 2.1 重组表达载体的构建

将本室构建的 pGEM MCP(-)质粒中 MCP cDNA 先插入到 pBS 质粒的 *Pst*I 和 *Eco*RV 位点上,再将其插入到 pcDNA3 质粒的 *Eco*RV 和 *Xho*I 位点上,即得到了含正确插入方向的 pcDNA3 MCP,其内切酶图谱见图 1。用单酶切产生 6.6kb 大小的片段,用目的基因二端的酶进行双酶切得到 5.4kb 的载体片段和 1.2kb 的目的片段。

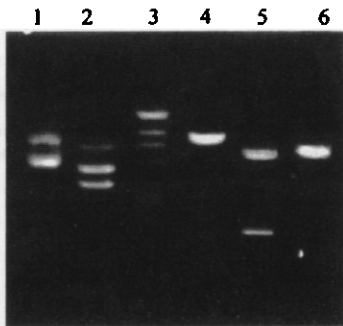


图 1 pcDNA3 MCP 重组表达载体的内切酶图谱

Fig.1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pcDNA3 MCP

1. Plasmid pcDNA3 MCP; 2. pcDNA3 MCP/*Sma*I + *Pvu*I; 3.  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker; 4. pcDNA3 MCP/*Eco*RI; 5. pcDNA3 MCP/*Eco*RI + *Xho*I; 6. pcDNA3/*Eco*RI

### 2.2 转染 NIH3T3 细胞及 PCR 检测

纯化的 pcDNA3 MCP 及 pcDNA3 质粒分别转染 NIH3T3 细胞后在含有 G418 的 DMEM 培养基中培养,约 2 周后出现阳性克隆,3 周后原瓶消化,继续培养,然后撤掉 G418,并经过连续 3 个月的传代培养,最终得到抗 G418 的细胞克隆,即 pcDNA3 或 pcDNA3 MCP 的转基因细胞。

以常规方法提取细胞大分子 DNA 后以之为模板进行 PCR 反应,随即进行琼脂糖电泳检测,由图 2 观察到在对照细胞中未扩出 MCP 片段,而在 MCP 转染细胞中扩出 1.2kb 的与以质粒 pcDNA3 MCP 为模板扩出的条带完全一致的片段。这说明 MCP cDNA 已稳定地整合到 NIH3T3 细胞染色体上,能够稳定表达。

### 2.3 MCP 转染细胞能够有效抑制补体依赖的细胞毒反应

新鲜的正常人血清中含补体成分,与外源细胞



图 2 PCR 鉴定 MCP 基因在转化细胞基因组 DNA 上的整合

Fig.2 PCR analysis of the generation of MCP gene on transfected cells

1. High molecular weight DNA of pcDNA3 MCP transfected cells was template; 2. High molecular weight DNA of pcDNA3 transfected cells was template; 3. Plasmid pcDNA3 MCP was template; 4.  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker

混合孵育后,抗原抗体的结合,能够激活补体,启动补体系统进行高度有序的级联反应,发挥广泛的生物学效应,这就是补体最重要的功能之一,也是最引人注目的免疫学现象之一,是揭示最早的一种胞毒作用<sup>[7]</sup>,但这种溶破作用仅限于致病微生物、衰变细胞、异源细胞等,而对同种或自身的正常细胞从不加以破坏,保护同种或自身无辜细胞的完整性而不受损害,这一现象称为补体介导的溶细胞反应的同种限制作用<sup>[8]</sup>。我们所得到的 MCP 转染细胞,其合成的 MCP 蛋白无疑能够保护细胞,抑制补体依赖的细胞毒反应,具有同种限制作用。

灭活的人血清其补体成分均已被破坏,不能引起任何细胞发生细胞毒效应(图 3a),而新鲜的人血清中随血清浓度增加而增加的补体能够强烈地引起对照细胞的死亡,可是 MCP 转染细胞却因为细胞合成了 MCP 蛋白,可以保护转染细胞不发生溶细胞效应(图 3b),另外, MCP 转染细胞合成的是人 MCP 蛋白,它使细胞获得的是抑制人补体活性的能力,而对于兔、豚鼠补体依然没有抵抗能力。由种属亲缘关系的远近,按人血清、兔血清、豚鼠血清的顺序对对照细胞的细胞毒效应依次增强(图 3c),而对 MCP 转染细胞,除人血清外,兔血清和豚鼠血清仍保持与对照细胞相同程度的细胞毒效应(图 3d)。

本研究构建了中国人 MCP cDNA 真核表达载体,转染细胞后,在细胞水平得到了表达,合成的

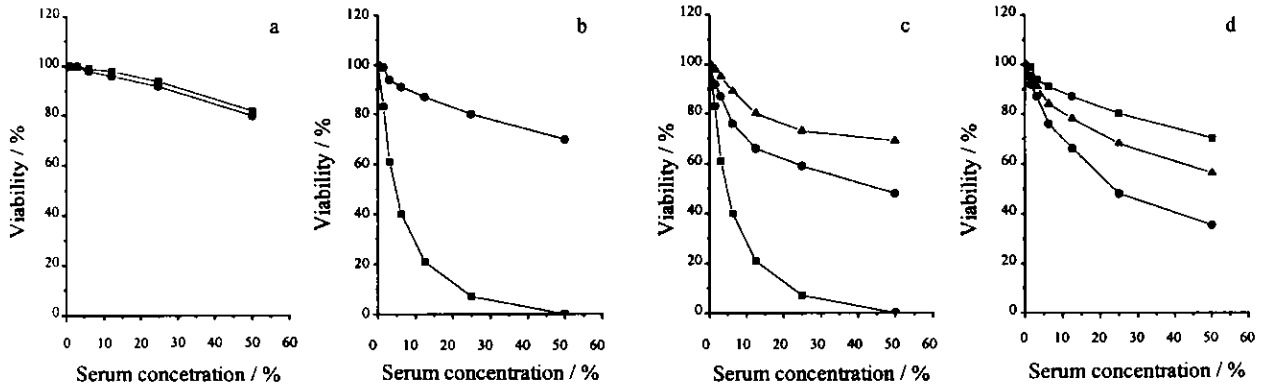


图 3 人 MCP 蛋白可保护细胞抑制人补体激活的细胞毒效应

Fig.3 human MCP protein can protect the transfected cell from complement-dependent cytotoxicity

a. Inactive human serum; b. Normal human serum; c. Control cells; d. MCP transfected cells

a. b.: -■- Controll cells, -●- MCP transfected cells; c. d.: -■- Human serum, -▲- Guinea pig serum, -○- Rabbit serum

MCP 蛋白能够保护细胞免受因补体激活而引起的补体依赖细胞毒作用<sup>[9]</sup>,在这一结果的基础上,我

们可以在动物水平上表达该蛋白,从而获得人源化的动物器官<sup>[10]</sup>,最终实现异种器官移植。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Platt J L, Logan J S. *Transplantation Reviews*, 1996, 10(2): 69~73
- [ 2 ] Johnston P S, Wang M W, Lim S M L. *Transplantation*, 1992, 54: 573~581
- [ 3 ] Hourade D, Holers V M, Atkinson J P. *Adv Immunol*, 1989, 45: 381~416
- [ 4 ] Seya T, Turner J R, Atkinson J P. *J Exp Med*. 1986, 163: 837~846
- [ 5 ] 黄 健, 苟德明, 李文鑫等. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(4): 355~358
- [ 6 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [ 7 ] Saadi S, Holzkecht R A, Patte C P. *J Exp Med*, 1995, 182: 1807~1815
- [ 8 ] Atkinson J P. *Clin Exp Immunol*, 1991, 86: 36~40
- [ 9 ] Ayako K, Kazunori I, Tsukasa S *et al.* *J Immunol*, 1993, 151(3): 1519~1527
- [ 10 ] Fordor W L, Williams B L, Matis L A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11153~11161

## Studies on Expression and Function of Human Membrane Cofactor Protein in NIH3T3 Cells

HUANG Jian LI Wen-Xin ZHEN Cong-Yi

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** One recombinant human membrane cofactor protein (MCP) expression plasmid pcDNA3 MCP was constructed. After transfected into NIH3T3 cells with calcium phosphate-DNA precipitate method, the expression clones were obtained by G418 selection. To determine whether MCP generated on heterologous cells by cDNA transfection retains its capacity to inhibit human complement, NIH3T3 cells transfected with MCP cDNA were incubated with human serum as well as guinea pig, rabbit serum. Under identical conditions, the control cells transfected with pcDNA3 vector were completely lysed by human serum but the cells transfected with MCP were barely lysed. However, the cells transfected with MCP were lysed by guinea pig and rabbit serum complement as the same extent as control cells.

**Key words** Expression of MCP cDNA, NIH3T3 cell, complement lysis