

CD74 基因转染对内皮细胞特性的影响

姜艳红

摘要 **目的** 探讨 CD74 基因在 HUVEC 的转染条件和 CD74 基因转染对细胞特性及功能的影响,为深入研究基于调节 CD74 表达的生物治疗打下基础。 **方法** (1)pCMV-CD74 质粒转染前后 ECV304 细胞功能相关基因 (HLA-A、HLA-DR、IFNGR)表达的检测;采用 Real-time RT-PCR 比较转染前后脐静脉内皮细胞各功能相关基因的表达。(2)应用 Real-time RT-PCR 分析软件分析实验数据。 **结果** Real-time RT-PCR 结果显示,转染前后 ECV304 细胞 HLA-A ΔCt 值分别为 9.4881 和 12.1097 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 6.1543 大于 2,说明转染前后 HLA-A 表达有显著差异;IFNGR ΔCt 值分别为 4.9828 和 5.5228 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 1.4539 小于 2,转染前后无显著差异;HLA-DR ΔCt 值分别为 14.1098 和 14.7924 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 1.3036 小于 2,转染前后无显著差异。 **结论** 人脐静脉内皮细胞 ECV304 表达 HLA-A、HLA-DR、IFNGR 和 CD74mRNA,pCMV-CD74 转染可增加 ECV304 细胞 CD74 基因和膜分子的表达,增加 HLA-A 基因的表达,但不增加 HLA-DR 和 IFNGR 的表达,为深入探讨 CD74 基因与内皮细胞功能的相关性提供实验数据。

关键词 CD74;人脐静脉内皮细胞;基因转染;HLA

中图分类号 R-33 **文献标识码** A **文章编号** :1009-9727(2011)12-1454-03

Impact of gene transfection on the expression of vein endothelial cell. JIANG Yan-hong.(Henan Provincial Tumor Hospital Zhengzhou 450008 Henan P. R. China)

Abstract **Objective** To transfect the CD74 gene to ECV304 cells for observing the impact of transfecting HUVEC on the expression of CD74. **Methods** The expression of some function-associated genes (HLA-A, HLA-DR and IFNGR) before and after transfecting ECV304 by Real-time PCR was detected. **Results** The ΔCt values of HLA-A before and after transfecting CD74 gene to ECV304 were 9.4881 and 12.1097 and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was 6.1543 showing that the expression of HLA-A was significantly different. The values of IFNGR and HLA-DR were 4.9828, 5.5228, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was 1.4539, while the HLA-DR and ΔCt were 14.1098 and 14.7924 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was 1.3036 respectively showing that there was no significant differences in the expressions of IFNGR and HLA-DR before and after transfection. **Conclusion** Human umbilical vein endothelial cell ECV304 can express HLA-A, HLA-DR, IFNGR and CD74 mRNA. ECV304 can increase the expression of CD74 gene and membrane molecules and it can also increase the expression of HLA-A gene but it can't increase the expression of HLA-DR and IFNGR.

Key words: CD74; Human umbilical vein endothelial cells; Gene transfection; HLA

CD74 即 MHC-II 类分子相关恒定链(major histocompatibility complex II-associated invariant chain, Ii),主要表达于树突状细胞、单核巨噬细胞、B 细胞等抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC),与抗原提呈功能有关。近来研究还发现 CD74 可做巨噬细胞移动抑制因子的受体,与相应细胞因子结合激活 NF- κ B 和 ERK1/2 信号转导途径,进而诱导炎性细胞因子的分泌^[1];研究还发现 CD74 分子还在内皮细胞、肿瘤细胞表达,与相应疾病的发生、发展有关^[2]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 人脐静脉内皮细胞 (ECV304);大肠杆菌 DH5 α ;pCMV-CD74。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒;内毒素清除剂;内毒素检测试剂;限制性内切酶;DNA marker 购自 Takara 公司;DMEM 及 Trizol RNA 提取试剂;RT-PCR 试剂;DNA 合成试剂盒;多

聚赖氨酸;转染试剂; β -actin、鼠抗人 CD74 一抗、兔抗鼠二抗;免疫组化试剂盒;

1.1.3 主要实验仪器设备 二氧化碳培养箱;ZD-9556 型水平摇床;DK-80 型电热恒温水槽;手提式不锈钢蒸汽消毒器;PCR 仪;ABI 7300 荧光定量 PCR 仪;Bio-Rad 半干式电转仪;DYY-型电泳槽;DYY-5 型电泳仪。

1.2 实验方法

1.2.1 pCMV-CD74 质粒在大肠杆菌的扩增和鉴定 (1)感受态细菌的制备 (2)质粒的转化 (3)转化后的大肠杆菌氨苄抗性筛选并扩增 (4)pCMV-CD74 质粒提取 (5)酶切鉴定 (6)测序鉴定。

1.2.2 转染实验

2 结果

2.1 pCMV-CD74 大肠杆菌扩增后提取质粒的酶切鉴定 在大肠杆菌扩增后提取的质粒经 EcoRI 单酶切,电泳显示

pCMV- CD74 质粒线性大小约 4.7kb ,EcoRI 和 XbaII 双酶切可见大小约 1.35kb 的基因片段。(CD74 cDNA 全长 1.327kb,插入 pCMV 的 EcoRI 和 XbaII 两个酶切位点之间。)

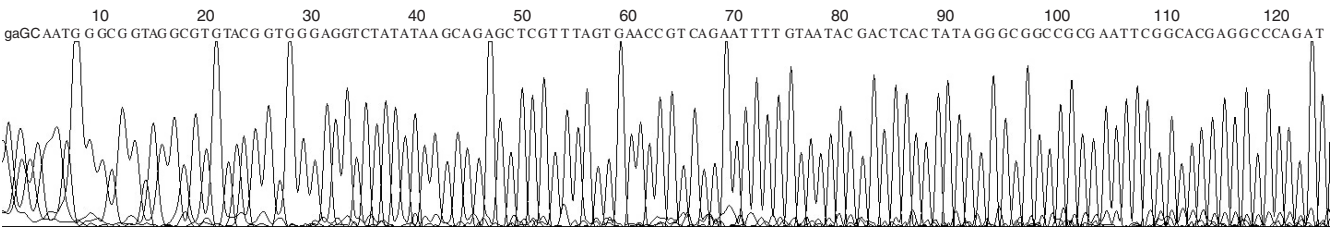


图 1 CD74 基因部分测序图

果 荧光显微镜观察转染后绿色荧光蛋白的表达情况 ,并且经过计算得出脂质体介导的 ECV304 细胞的转染率是 65.8%。

2.4 免疫组化检测转染前后 ECV304 CD74 的表达结果 通过转染前后免疫组化结果比较 转染 CD74 后 脐静脉内皮细胞 CD74 表达增强。

2.5 Real-time RT-PCR 检测转染后 CD74 mRNA 水平的表达结果 Real-time RT-PCR 定量结果 :CD74 基因 ,目的标本 ΔC_t 值为 4.8599 ,对照标本 ΔC_t 为 9.2496 , $\Delta\Delta C_t$ 为 -4.3987 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为 20.9619。CD74 基因的表达明显高于对照组 ,结果有统计学意义($2^{-\Delta\Delta C_t}>2$ 有统计意义) ,说明经转染后 CD74 基因的表达显著升高。

从图 2 可以看出 待测基因 CD74 的扩增曲线平滑 ,重复性比较好 ,与对照转染前 CD74 和 β -actin 相比 转染后 CD74 基因的表达明显高于对照转染前 CD74 基因的表达。

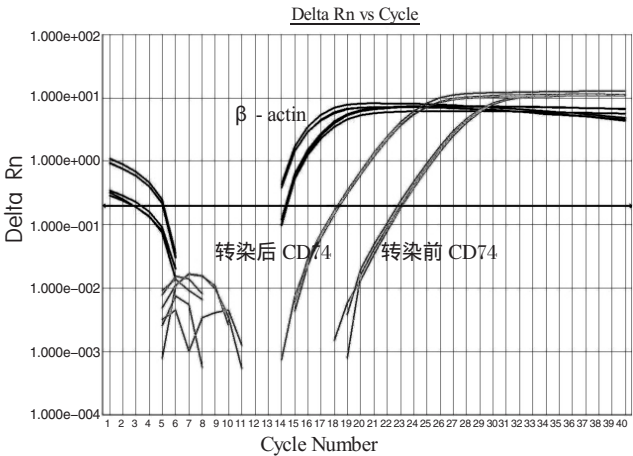


图 2 β -actin、转染前 CD74、转染后 CD74 扩增曲线

2.6 Western blot 检测转染前后脐静脉内皮细胞 CD74 的表达结果 通过 CD74 转染脐静脉内皮细胞后 ,脐静脉内皮细胞 CD74 表达增高。见图 3。



1 为转染前 β -actin 显色结果 2 为转染后 β -actin 显色结果 3 为转染前 CD74 显色结果 4 为转染后 CD74 显色结果。

图 3 β -actin 和 CD74 Western blot 显色图

2.7 转染前后 ECV304 HLA- A、HLA- DR、IFNGR 的表达 Real-time RT-PCR 定量结果见表 1 ,从表 1 中可以看出通过与对照

2.2 测序鉴定结果 经测序分析符合 CD74 基因序列 ,部分测序结果如图 1。

2.3 SUPER/EGFP 荧光质粒转染 ECV304 检测转染率 照相结

和 β -actin 相比 经过 CD74 转染后 HLA- A 基因表达增高有统计学意义 ,而经过 CD74 转染后 IFNGR 和 HLA- DR 基因表达增高无统计学意义 ,说明经过 CD74 转染后 HLA- A 基因表达明显增高 ,而 IFNGR 和 HLA- DR 基因表达增高不明显。

表 1 实时定量 RT-PCR 验证结果(IFNGR、HLA- DR 和 HLA- A)

基因	目的标本 ΔC_t 值	对照标本 ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
IFNGR	4.9828	5.5228	-0.54	1.4539
HLA-DR	14.1098	14.7924	-0.3826	1.3036
HLA-A	9.4881	12.1097	-2.6216	6.1543

注 $2^{-\Delta\Delta C_t}>2$ 有统计意义

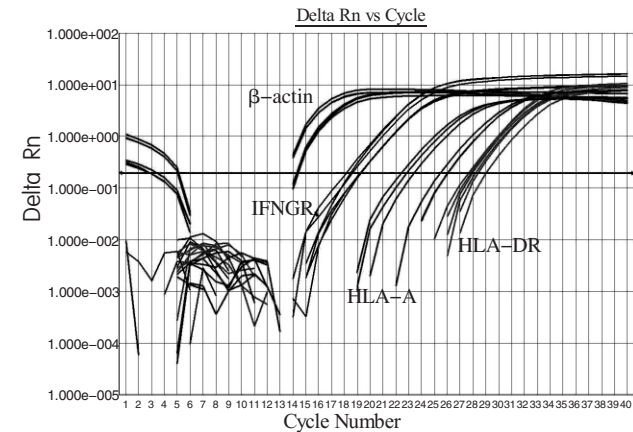


图 4 β -actin、IFNGR、HLA- DR 和 HLA- A 的扩增曲线

从图 4 可以看出 待测基因 IFNGR、HLA- DR 和 HLA- A 的扩增曲线平滑 ,重复性比较好 ,与对照和 β -actin 相比 转染后 HLA- A 基因的表达明显高于对照 HLA- A 基因的表达 ,而 IFNGR 和 HLA- DR 表达增加不明显。

3 讨论

CD74 分子是 MHC- Ⅱ类分子的恒定链(Ii) ,参与 MHC Ⅱ类分子的组装及抗原肽 - MHC Ⅱ类分子复合物的形成 ,其功能与 MHC- Ⅱ类分子高度相关 ,在抗原提呈过程中起重要作用。CD74 是翻译后的糖基化产物 ,并且存在同源蛋白质。因为通过免疫共沉淀和琼脂糖电泳发现有不同的条带出现 ,并且通过化学去糖基化 ,仅见到通过其它翻译起始和剪接的产物的同源蛋白质。最常见的同源蛋白质是 33kDa(p33) ,但是同源蛋白质 p35、p41 和 p43 也存在^[3]。同源蛋白质 p35 和 p33 的主要功能是调节 MHC Ⅱ类分子的抗原提呈 ,而同源蛋白质 p41 则可能在 T 细胞在胸腺内的选择起到重要作用^[4]。CD74 常见的翻译后修饰是加一个糖胺多糖侧链 ,这种同源蛋白质的作用主要是通过

T 细胞表面的 CD44 相互作用来活化 T 细胞^[5]。

CD74 是一种具有多种免疫功能的多态糖蛋白, 功能是其对 MHC 类分子在抗原提呈细胞的转运的调节作用。同时 CD74 是巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 的受体复合物的不可缺少的一部分, MIF 作为一种多功能的细胞因子样分子, 不但调节先天性和获得性免疫能力, 而且在慢性炎症性疾病和致癌方面也起到很大的作用。有研究表明, CD74 在作为 MIF 的受体转导信号时需要与 CD44 相结合, 而且必须是硫酸软骨素修饰过的 CD74, 因为 CD44 只与这种同源蛋白质相结合。另外, 表达于巨噬细胞具有趋化吸引白细胞到感染部位的 IL-8^[6], 其受体 CXCR2 也和 CD74 形成复合物, 至于 CXCR2 在与 CD74 形成的复合物上的作用, 还需进一步的研究。

CD74 与 MIF 结合诱导激活 NF- κ B 信号转导途径并引发接下来的一系列细胞反应, 如炎症细胞因子的分泌。MIF 通过抑制糖皮质激素对炎症免疫反应的负面影响从而加强炎症反应, 如提高 IL-1、IL-8、TNF- α ^[7] 表达。通过 CD74 参与诱导产生的一种主要的炎症细胞因子是 IL-8, 而 IL-8 是吸引中性粒细胞到炎症或感染部位的趋化性因子。一旦到达, 中性粒细胞就开始吞噬抗原并形成吞噬泡, 而在这个吞噬泡中会有反应性氧产物和水解酶的释放, 这个过程在机体抗感染的机制中是非常重要的。

最近, 发现 CD74 也表达于除抗原提呈细胞外的其它细胞表面, 如内皮细胞^[8]。这项研究表明独立于 MHC 类分子表达的 CD74 也可能有其它的功能^[9]。为探讨 CD74 在内皮细胞的表达及其意义, 本文采用人脐静脉内皮细胞株 (ECV304 细胞株), 对其 CD74 基因及分子的表达进行检测, 同时观察 CD74 基因转染对 ECV304 细胞 MHC-I 类分子、MHC-II 类分子、IFNGR 等基因表达的影响, 发现 CD74 基因和分子在内皮细胞表达增加, 不引起 MHC-II 类分子和 IFNGR 表达增加, 说明在 ECV304 细胞的 CD74 是独立于 MHC-II 类分子的表达, 可能有与抗原提呈不同的其他生物学功能。

本研究结果显示, CD74 基因转染 ECV304 细胞后, MHC-I 类分子表达增加。人类白细胞抗原 HLA-A^[10] 是 MHC 类分子表面受体亚型的组成部分, 其基因位于 6 号染色体短臂, HLA-A 分子表达于所有有核细胞和血小板。HLA-A 分子由 α 链和较小的 β 链组成, 其中 α 链由 HLA-A 基因编码。在所有哺乳动物中, 人的 MHC 类分子在其初级结构有非常大的变

化, 而 HLA-A 基因序列是其中变化最快的。本实验通过 Real-time RT-PCR 检测 CD74 转染前后其表达情况的变化, 结果显示其表达增高显著, 具有统计学意义, 这表明通过 CD74 转染脐静脉内皮细胞, 增强了其表达能力, 这可能是 CD74 所触发激活的细胞内信号转导系统的级联反应影响并增强了 HLA-A 的表达。至于 CD74 是怎样影响 HLA-A 表达增强的, 还需进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Benlagha K, Park SH, Guinamard R, et al. Mechanisms governing B cell developmental defects in invariant chain-deficient mice [J]. *J. Immunol* 2006, 172: 2076–2083.
- [2] Stumptner-Cuvelette P and Benaroch P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim [J]. Biophys. Acta*, 2007, 1542: 1–13.
- [3] Warmerdam PA, Long EO, Riche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments [J]. *J Cell Biol* 2006, 133: 281–291.
- [4] Wright RJ, Bikoff EK, Stochinger B. The Ii41 isoform of invariant chain mediates both positive and negative selection events in T-cell receptor transgenic mice [J]. *Immunology* 2008, 95: 309–313.
- [5] Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, et al. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44 [J]. *Cell* 2005, 74: 257–268.
- [6] Shi X, Leng L, Wang T, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage [J]. *Immunity* 2006, 25: 595–606.
- [7] Calandra T, Metz CN, Spiegel LA, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production [J]. *Nature* 2009, 377: 68–71.
- [8] Barrera CA, Beswick EJ, Sierra JC, et al. Polarized expression of CD74 by gastric epithelial cells [J]. *J Histochem Cytochem* 2005, 53: 1481–1489.
- [9] Henne C, Schwenk F, Koch N, Moller P. Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens [J]. *Immunology*, 2008, 84: 177–182.
- [10] Noble J, Valdes A, Bugawan T, et al. The HLA class I A locus affects susceptibility to type 1 diabetes [J]. *Hum Immunol* 2004, 63(8): 657–664.

收稿日期: 201106-15 编辑: 吴中菲