

· 论 著 ·

过敏毒素 C3a 在肾小球足细胞中的分泌性表达试验

郑敬民, 尹 广, 赵文紧

〔摘要〕 目的 建立过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒体系和分泌性高表达过敏毒素 C3a 的足细胞株, 为研究过敏毒素 C3a 对足细胞的作用创造条件。方法 人工合成过敏毒素 C3a 分泌性表达基因; 以重组慢病毒为媒介, 将过敏毒素 C3a 分泌性表达基因导入到人足细胞系 (human podocytes, HPC); 利用药物筛选和连续梯度稀释克隆法获得稳定整合有过敏毒素 C3a 转基因结构的 HPC 细胞株; 利用实时定量 PCR 从 mRNA 水平、酶联免疫吸附测定方法从蛋白质水平对过敏毒素 C3a 的表达和分泌情况进行鉴定。结果 成功建立了过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒体系; 获得了分泌性高表达过敏毒素 C3a 的人肾小球足细胞株。结论 所建立的过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒体系和分泌性高表达过敏毒素 C3a 的足细胞株, 为进一步分析过敏毒素 C3a 对足细胞的作用创造了条件。

〔关键词〕 过敏毒素; C3a; 慢病毒表达体系; 分泌性表达

〔中图分类号〕 R363.1 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.03.001

Secretory expression of anaphylotoxin C3a in a podocyte strain

ZHENG Jing-min, YIN Guang, ZHAO Wen-Jin. National Clinical Research Center of Kidney Diseases, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

〔Abstract〕 Objective To pave the way for investigation of the roles of anaphylotoxin C3a in glomerular podocytes, in the present study, an anaphylotoxin C3a secretory expression lentiviral system and a podocytes strain highly expressing C3a in a secretory manner was constructed. Methods Anaphylotoxin C3a secretory expression unit was synthesized and cloned into a lentivirus expression vector. After the sequence was confirmed by direct sequencing, recombinant lentivirus was packaged in 293T cells. Infection of HPC, a human glomerular podocytes cell line, with the recombinant lentivirus was carried out. Blasticidin resistant cell clones were screened out. Significantly increased expression and secretion of anaphylotoxin C3a was proved by real-time PCR and enzyme linked immunosorbent assay. Results An anaphylotoxin C3a secretory expression lentiviral system was correctly established. A podocyte strain highly expressing anaphylotoxin C3a in a secretory manner was obtained. Conclusion An anaphylotoxin C3a secretory expression lentiviral system and a podocytes strain highly expressing C3a in a secretory manner were successfully constructed. The podocytes strain was very useful for study of the function of C3a/C3aR axis in podocytes. The anaphylotoxin C3a secretory expression lentiviral system was also useful in study of the function and mechanisms of C3a in other cells.

〔Key words〕 anaphylotoxin; C3a; lentiviral expression system; secretory expression

作为先天性免疫的一个重要组成部分, 补体系统在机体免疫防御中起着极为重要的作用^[1-3]。但补体系统的不适当激活也会导致组织的损伤, 成为引发人类疾病发生和发展的重要因素^[4-7]。在肾脏, 补体活化与包括糖尿病肾病在内的多种病变相关^[8-11], 但有关补体系统参与糖尿病肾病等肾脏损伤的机制仍未明了。长期以来, 人们对补体系统功能了解更多的是基于膜攻击复合物对病菌和病变细胞裂解的效应, 在各种途径的补体活化过程中, 还产生了一系列被称作过敏毒素的补体成分小片段 (包括 C3a、C4a 和 C5a, 分别由 C3、C4 和 C5 裂解产

生), 它们也可能参与糖尿病肾病等肾组织损伤过程。有研究显示^[12-13], 包括肾小管上皮细胞、肾小球足细胞和壁层上皮细胞在内的肾组织上皮细胞均有表达过敏毒素 C3a 的受体 C3aR, 且在糖尿病肾病等特定病理条件下肾组织上皮细胞中 C3aR 的表达水平亦明显增加, 提示过敏毒素 C3a 可通过其受体参与糖尿病肾病等肾脏疾病的肾组织损伤过程, 然而各种过敏毒素在肾组织损伤中的确切病理作用和意义仍不是很清楚。为了探讨过敏毒素 C3a 在肾小球足细胞中的可能作用和病理意义, 本文设计和建立了过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒体系, 并将其导入人肾小球足细胞系中, 建立了分泌性高表达过敏毒素 C3a 的人肾小球足细胞株, 为深入探讨 C3a 对肾小球足细胞的作用及机制提供了很好的

细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂来源 人足细胞系(human podocytes, HPC)从美国 ATCC 购得;胰岛素-转铁蛋白-硒试剂、胎牛血清和 1640 培养基从 Gibco 公司购得;杀稻瘟菌素、凝聚胺(Polybrene)和 TRIZOL 为 invitrogen 公司产品;“PrimeScript RT Master Mix”逆转录试剂盒和“SYBR Premix Ex Taq II”荧光定量 PCR 试剂盒为 Tarkara 产品;293 T 细胞、慢病毒空载体和包装质粒均由 Invitrogen 公司提供;人 C3a ELISA 试剂盒购自 BD 公司。

1.2 稳定转染分泌性高表达过敏毒素 C3a 细胞株的构建方法

1.2.1 HPC 的培养 HPC 采用 1640 培养基培养,其中含 1% ITS 和 10% 胎牛血清,HPC 细胞的培养温度为 33 ℃(于含 CO₂ 5% 的孵箱中)。

1.2.2 基因转染和稳定转染细胞筛选 将 HPC 细胞以 2×10^5 /mL 接种到 24 孔细胞培养板中(每孔接种 0.5 mL);33 ℃ 培养 24 h 后,按感染复数(multiplicity of infection, MOI)等于 10 的比例吸取适量过敏毒素 C3a 表达重组慢病毒,以培养液稀释病毒液(最后稀释致 100 μ L/孔的量),同时加入 8 μ g/mL(终浓度)的 Polybrene,吹打混匀后将其加入至吸去培养液的 24 孔板细胞上;继续培养 6 h 后,吸去含病毒的培养液,换上新鲜的培养液继续培养;48 h 后于荧光显微镜下观察细胞是否发出绿色荧光(成功转染的细胞可发出绿色荧光,据此判断细胞转染是否成功);消化细胞,将转染细胞转移到 6 孔板中,加入杀稻瘟菌素(终浓度为 10 g/mL)进行药物筛选,每 3 d 换一次培养液,2 周后,即得到稳定转染慢病毒的足细胞。

1.2.3 建立单克隆细胞株 通过连续梯度稀释培养构建单克隆细胞株。即先利用细胞计数板对欲建立单细胞克隆的细胞悬液进行计数,再利用培养液对细胞悬液进行梯度稀释,稀释至每毫升培养液约含 5 个细胞时,将稀释液以每孔 50 μ L、100 μ L 的量接种到 96 孔板中。置 33 ℃ 孵箱培养 14 d 后,相差显微镜下观察找出单克隆细胞团,经扩大培养,获得单克隆细胞株。

1.3 C3a 分泌水平分析 以 2×10^5 个细胞/孔分别将稳定转染过敏毒素 C3a 的单克隆细胞株和未转染的对照足细胞株接种于 24 孔板(每种细胞各 3 孔),待细胞贴壁(约 6 h)后,将培养液换成无血清的培养液,继续培养 2 d 后,吸取细胞培养上清,

10 000 $\times g$ 离心 5 min 后,取上清利用人 C3a ELISA 试剂盒分析培养上清中 C3a 水平。

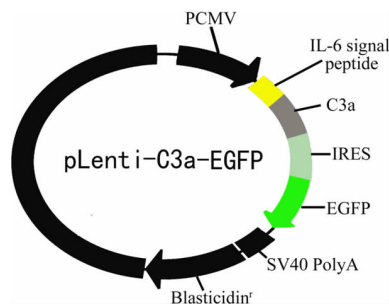
1.4 C3a mRNA 表达水平的分析 采用实时定量 PCR 的方法进行,具体如下:利用 TRIZOL 试剂提取细胞 RNA;利用“PrimeScript RT Master Mix”试剂盒合成 cDNA;采用“SYBR Premix Ex Taq II”试剂盒于 ABI 公司的 7900 型实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增和检测。检测过程以 18S RNA 作为内参。PCR 过程为:95 ℃ 下预变性 1 min,然后进行 DNA 变温扩增过程(95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30s, 如此 40 个循环)。所用引物由金唯智公司合成,其序列为:人 18S RNA sense:5'-ttt ctc gat tcc gtg ggt gg-3';人 18S RNA antisense:5'-agc atg cca gag tct cgt tc-3';人 C3a sense:5'-aag tcg gca agt acc cca ag-3';人 C3a antisense:5'-agt tgc agc agt cca gga ag-3'。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行。定量数据表示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过敏毒素 C3a 分泌型慢病毒表达体系的构建结果 通过先构建过敏毒素 C3a 分泌型表达慢病毒载体、再在 293 T 细胞中包装成重组慢病毒,最后得到滴度约为 5×10^8 /mL 的过敏毒素 C3a 分泌型表达重组慢病毒溶液。图 1 所示的是本文设计的过敏毒素 C3a 分泌型表达慢病毒载体结构示意图[重组 C3a 基因由 5' 端的 IL-6 基因的信号肽序列和下游 C3a 编码序列组成,整个基因的表达由 CMV 启动子控制;此外,载体上有一绿色荧光蛋白基因(EGFP)和杀稻瘟菌素分解酶基因(Blasticidin)];图 2 所示的是其部分测序结果,显示所构建载体的序列完全正确。

2.2 过敏毒素 C3a 分泌性表达转基因细胞细胞株的构建结果 以过敏毒素 C3a 分泌性表达重组慢病毒转染 HPC 细胞 48 h 后,荧光显微镜下可见几乎所有细胞均可发出很强的绿色荧光,说明病毒转染效率很高,转染很成功。经过 14 d 的培养液中加入杀稻瘟菌素筛选,获得了稳定转染过敏毒素 C3a 分泌性表达重组慢病毒的细胞群,其中的每个细胞均可发出明亮的绿色荧光(图 3,其中 d 是 c 同一视野下的相差显微镜照片)。再通过连续梯度稀释法筛选,构建成了稳定转染过敏毒素 C3a 的重组细胞克隆(图 3 中 e,可见所有细胞发出了均匀的绿色荧光),经扩大培养得到了稳定转染过敏毒素 C3a 重组慢病毒的细胞株 HPC-C3a。



Blasticidinr:杀稻瘟菌素分解酶基因;C3a: C3a 编码序列;EGFP:绿色荧光蛋白基因;IRES: 内核糖体进入序列;kozak:kozak 序列(GCCACC);IL-6 signal peptide:IL-6 基因信号肽序列;PCMV:CMV 启动子

图 1 过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒载体结构示意图

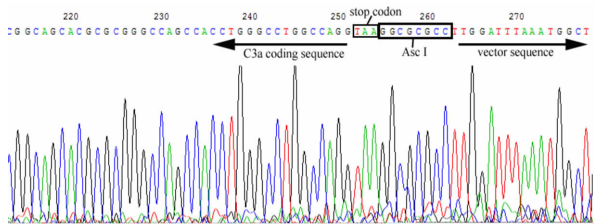
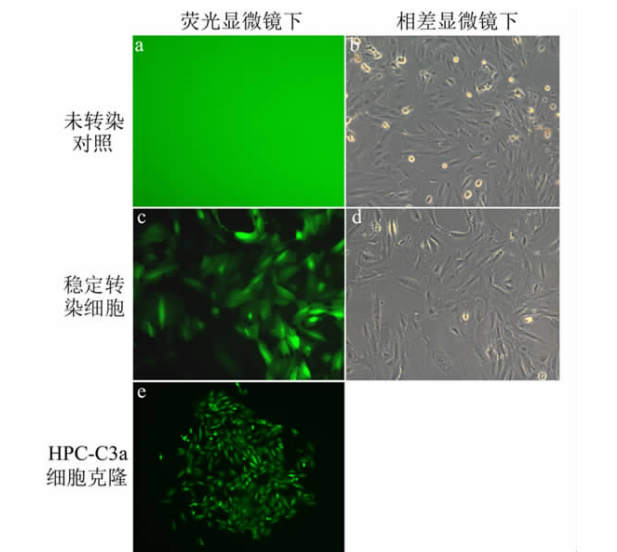


图 2 过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒载体的部分测序结果(示过敏毒素 C3a 基因 3' 端插入点周围的测序结果)



a 和 b 为作为对照的非转染细胞(100 ×);c 和 d 为稳定转染了过敏毒素 C3a 的细胞(100 ×);e 为连续梯度稀释法得到的稳定转染了过敏毒素 C3a 的细胞克隆——HPC-C3a(40 ×)

图 3 稳定转染过敏毒素 C3a 的细胞株(HPC-C3a 细胞株)的构建结果

2.3 HPC-C3a 细胞株中 C3a 表达和分泌水平分析结果 PCR 分析显示:与作为对照的正常(非转染)HPC 细胞相比,HPC-C3a 细胞株中 C3a mRNA 表达水平显著升高[正常对照 C3a mRNA 相对水平为

(1.0 ± 0.6),HPC-C3a 细胞株 C3a mRNA 相对水平为(771.0 ± 172.0)].对细胞培养上清中过敏毒素 C3a 水平的检测显示:与作为对照的未转染 HPC 细胞相比,HPC-C3a 细胞培养液上清中的 C3a 水平增加了 600 多倍[(201.0 ± 21.0) ng/mL vs (0.3 ± 0.1) ng/mL]。

3 讨论

近年来,有关补体系统的不当激活在人类疾病中的作用引起了越来越多研究者的关注,成为了人类疾病机制研究的一个新热点^[14]。虽然人们早就认识到包括糖尿病肾病、膜性肾病和狼疮性肾炎在内的多种肾脏疾病患者肾组织中均存在补体过度活化现象,但对于补体系统在肾组织损伤中的确切作用和参与肾组织损伤的确切分子机制的认识却仍然很有限。

理论上,补体的过度活化可以多种方法参与肾脏疾病的发生发展过程。其中膜攻击复合物长期以来一直为人们所关注。但在补体的链式激活过程中,同时产生了包括过敏毒素 C3a 在内的一系列小片段分子,它们被释放到周围微环境中,参与了对机体细胞功能的各种调节。作为一种重要的炎症因子,过敏毒素 C3a 可通过与其受体 C3aR 的相互作用趋化和激活白细胞^[14-17]。近年的研究显示^[11],除了广泛表达于各种免疫细胞外,过敏毒素 C3a 的受体 C3aR 还表达于包括脑、肝、肺、肾脏在内的多种器官中的组织细胞中,且在不同的生理和病理情景中显示出了多种重要功能。在肾脏,C3aR 主要表达于上皮细胞(包括肾小管上皮细胞、肾小球足细胞和壁层上皮细胞)^[12-13],但目前对于肾组织细胞中 C3aR 的生理功能和各种病理情景下的病理意义仍不清楚。考虑到多种肾病患者肾组织中存在的补体过度活化现象(即有大量的过敏毒素 C3a 会被释放出来并可能激活其肾组织细胞中的受体 C3aR)、C3a 信号传导在一些组织细胞中所表现出来的包括影响细胞发育分化、细胞增殖或凋亡等在内的重要功能^[18-22]以及肾小球足细胞损伤在糖尿病肾病等肾脏疾病中的重要性,我们推测:在糖尿病肾病等病理情况下,肾组织补体过度活化产生的过敏毒素 C3a 很可能通过激活其位于足细胞上的受体参与足细胞损伤过程,从而在疾病的发生发展中发挥作用。为了探讨过敏毒素 C3a 在肾小球足细胞损伤中的可能病理作用和分子机制,本文进行了分泌性过表达过敏毒素 C3a 人肾小球足细胞株的构建。我们首先设计合成了过敏毒素 C3a 分泌性表达单元,并

成功地将其克隆到了慢病毒表达载体上,经全序列测序验证,得到序列完全正确的过敏毒素 C3a 分泌性慢病毒表达载体。在此基础上,笔者利用 293 T 细胞进行了重组慢病毒的包装,并得到了高滴度的过敏毒素 C3a 分泌性表达重组慢病毒。利用过敏毒素 C3a 分泌性表达重组慢病毒转染 HPC 细胞 48 h 后,笔者在荧光显微镜下观察到了大量的能发出绿色荧光的转染细胞。这些发出绿色荧光的转染细胞可分为两类:基因组中插入重组慢病毒 DNA 的细胞和基因组中未插入重组慢病毒 DNA 的细胞(重组 DNA 在细胞基因组外游离存在)。其中,只有基因组中插入重组慢病毒 DNA 的细胞可长期稳定地传递和表达转基因(包括过敏毒素 C3a 基因、绿色荧光蛋白基因和杀稻瘟菌素分解酶基因),故称为稳定转染细胞。而重组 DNA 游离在细胞基因组外的转染细胞却不能将转基因(包括过敏毒素 C3a 基因、绿色荧光蛋白和杀稻瘟菌素分解酶基因)稳定地传递到下一代细胞,其转基因的表达具有瞬时性,故称为瞬时转染细胞。根据这一原理,本文利用在培养液中长期加杀稻瘟菌素的办法来除去瞬时转染细胞和未转染细胞,得到了稳定转染细胞群。在此基础上,本文又利用连续梯度稀释克隆法进行了细胞的克隆化筛选培养,最终得到了稳定转染了过敏毒素 C3a 分泌性表达重组慢病毒的足细胞株 HPC-C3a。利用 PCR 和 ELISA 方法,本文对 HPC-C3a 细胞株过敏毒素 C3a 的表达和分泌情况进行了分析,结果证实了过敏毒素 C3a 在 HPC-C3a 细胞株中的分泌性高水平表达,说明成功构建了分泌性过表达过敏毒素 C3a 的人肾小球足细胞株。上述工作不仅为进一步研究各种病理情况下过敏毒素 C3a 在人肾小球足细胞损伤中的作用和意义,探讨补体活化产生的过敏毒素 C3a 致肾小球足细胞损伤的分子机制提供了很好的细胞模型,所建立的过敏毒素 C3a 分泌性表达慢病毒体系也为进一步开展 C3a 对其他细胞的作用和病理意义创造了条件。

【参考文献】

- [1] Lappegard KT, Garred P, Jonasson L, et al. A vital role for complement in heart disease[J]. *Mol Immunol*, 2014, 61(2):126-134.
- [2] Schramm EC, Clark SJ, Triebwasser MP, et al. Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration; a review[J]. *Mol Immunol*, 2014, 61(2):118-125.
- [3] Peterson SL, Anderson AJ. Complement and spinal cord injury; traditional and non-traditional aspects of complement cascade function in the injured spinal cord microenvironment[J]. *Exp Neurol*, 2014, 258:35-47.
- [4] Hertle E, Stehouwer CD, van Greevenbroek MM. The complement system in human cardiometabolic disease[J]. *Mol Immunol*, 2014, 61(2):135-148.
- [5] 甘燕玲, 杨至宜, 孙朝晖, 等. 快速 CRP 检测对儿童上呼吸道感染鉴别诊断价值[J]. *华南国防医学杂志*, 2011, 25(3):264-265.
- [6] 陈金弟, 王智华, 李华良, 等. 抗脑抗体对精神分裂症自身免疫反应的探讨[J]. *东南国防医药*, 2004, 6(3):171-172.
- [7] 任红旗, 吴梅月, 蔡青, 等. 肾淀粉样变性 10 例临床病理分析[J]. *东南国防医药*, 2011, 13(4):348-349.
- [8] Fearan A, Sheerin NS. Complement activation in progressive renal disease[J]. *World J Nephrol*, 2015, 4(1):31-40.
- [9] Thurman JM. Complement in kidney disease: core curriculum 2015[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 65(1):156-168.
- [10] 郑敬民, 尹广, 姚根宏, 等. 肾病患者肾组织补体活化与肥大细胞滑润的关系研究[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(10):1040-1044.
- [11] Klos A, Wende E, Wareham KJ, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(1):500-543.
- [12] Braun MC, Reins RY, Li TB, et al. Renal expression of the C3a receptor and functional responses of primary human proximal tubular epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(6):4190-4196.
- [13] 郑敬民, 朱小东, 张明超, 等. 过敏毒素受体(C3aR)在 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达及病理意义分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(8):847-845.
- [14] Mueller-Ortiz SL, Morales JE, Wetsel RA. The receptor for the complement C3a anaphylatoxin (C3aR) provides host protection against listeria monocytogenes-induced apoptosis[J]. *J Immunol*, 2014, 193(3):1278-1289.
- [15] Niebuhr M, Bumer W, Kietzmann M, et al. Participation of complement 3a receptor (C3aR) in the sensitization phase of Th2 mediated allergic contact dermatitis[J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(1):52-56.
- [16] Bao L, Wang Y, Haas M, et al. Distinct roles for C3a and C5a in complement-induced tubulointerstitial injury[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(5):524-534.
- [17] Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation[J]. *Immunobiology*, 2012, 217(2):225-234.
- [18] Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, et al. Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(6):1026-1037.
- [19] Yu M, Zou W, Peachey NS, et al. A novel role of complement in retinal degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(12):7684-7692.
- [20] Tu Z, Bu H, Dennis JE, et al. Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation[J]. *Blood*, 2010, 116(22):4456-4463.
- [21] Lim J, Iyer A, Suen JY, et al. C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling[J]. *FASEB J*, 2013, 27(2):822-831.
- [22] Xu XH, Peng HS, Sun MQ, et al. C-terminal peptide of anaphylatoxin C3a enhances hepatic function after steatotic liver transplantation; a study in a rat model[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(3):737-740.

(收稿日期:2015-03-10;修回日期:2015-03-27)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)