

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.008

活化 / 抑制 CD59 对 T 淋巴细胞增殖的影响 *

李园园 高美华[△] 丛蓓蓓 王丽娜 王 冰 张 蓓 李 营 梁 洁

(青岛大学医学院免疫学教研室 山东 青岛 266071)

摘要 目的:研究活化 / 抑制 CD59 分子对 T 细胞增殖的影响。**方法:**Jurkat 细胞分别电转入 pSUPER-siCD59 质粒及用 CD59 活化抗体刺激。激光共聚焦显微镜下观察细胞的电转情况及 CD59 分子在细胞膜上的分布及表达; MTT 比色法检测细胞的增殖。Western blot 检测 CD59 分子表达及 T 细胞活化相关蛋白 ZAP70 磷酸化水平。**结果:**激光共聚焦显微镜下可见电转染细胞表达绿色荧光, 转染效率约为 40%。转染 pSUPER-siCD59 质粒后 CD59 荧光强度降低, CD59 分子均匀分布于细胞膜与正常 Jurkat 细胞分布一致。抗体活化后 CD59 在细胞膜成簇状分布。抗体活后细胞增殖速率和磷酸化 ZAP70 的蛋白表达水平均高于正常组 ($P < 0.05$), 而细胞电转质粒后则恰恰相反。**结论:**CD59 通过与信号转导分子的相互作用促进 T 细胞活化增殖。

关键词:siCD59; 电转染; Jurkat; 磷酸化蛋白

中图分类号:Q78, R392.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3631-04

The Effect of Activation / down-regulation
of CD59 on T Lymphocyte Proliferation*LI Yuan-yuan, GAO Mei-hua[△], CONG Bei-bei, WANG Li-na, WANG Bing, ZHANG Bei, LI Ying, LIANG Jie

(Department of Immunology, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266071, China)

ABSTRACT Objective: The present study aims to investigate the effect of CD59 on T lymphocyte proliferation. **Methods:** Jurkat cells were transfected with pSUPER-siCD59 plasmids by electroporation or stimulated by anti-CD59 antibody. Confocal laser scanning microscopy was used to observe the transfection efficiency and cellular location of immunostained CD59. The cells proliferation was measured by MTT assay. Furthermore, western blot was performed for the detection of CD59 expression and ZAP70 phosphorylation. **Results:** 40% of Jurkat cells were successfully transfected and showed lower fluorescence staining. In contrast to the uniform distribution, CD59 formed clusters on the cell surface upon stimulation with anti-CD59 antibody. And also compared with the untreated control cells, anti-CD59 stimulated-cells showed a higher level of proliferation and ZAP70 phosphorylation, while knocking down of CD59 led to the decreased cell proliferation and ZAP70 phosphorylation. **Conclusion:** CD59 has a positive effect on T cell activation and proliferation.

Key words: SiCD59; Electric transfection; Jurkat; Phosphorylation

Chinese Library Classification: Q78, R392.11 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3631-04

前言

CD59 是糖基磷脂酰肌醇锚固蛋白 Ly-6 超家族成员之一。其相对分子量为 18kDa~21kDa, 表达广泛, 几乎存在于人体所有的组织细胞和循环细胞中, 如心脏, 肝脏, 脾脏, 肾脏, 外周血白细胞, 红细胞及血管内皮细胞等^[1]。CD59 是重要的内源性补体调节因子, 通过阻断 C9 与 C5-8 复合体的结合而抑制膜攻击复合物(MAC)的形成, 从而起到保护细胞免遭补体裂解^[2]。有研究表明, 在某些疾病如肿瘤、糖尿病和获得性免疫缺陷综合征患者的细胞表面 CD59 表达量异常^[3-5]。CD59 分子既可以结合于细胞膜, 也可以分泌形式存在于多种体液中, 如尿液、汗液、唾液等。成熟的 CD59 蛋白由 77 个氨基酸构成的球状结构, 没有跨膜区和胞内区, 以糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定于细胞膜。研究发现, CD59 能转导信号至胞内, 在 TCR 缺陷的 JCaM2.5 细胞, 用 CD59 抗体刺激后可引起淋巴细胞的部分活

化, 如 IL-2 升高, Ca^{2+} 内流等^[6]。

前期研究已证实 CD59 分子能促进 LAT/CBP 介导的 T 细胞信号的转导^[7,8]。本研究选择 CD59 分子为靶蛋白, 通过对电转染 pSUPER-siCD59 质粒以及 CD59 活化抗体刺激 Jurkat 细胞后多种指标的检测, 进一步探讨 CD59 分子与 T 细胞活化增值的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

pSUPER-siCD59 质粒由本实验室前期构建, Jurkat 细胞和大肠埃希菌 JM109 由本实验室保存。兔抗人 CD59 单抗、兔抗人 ZAP70 磷酸化单抗购于 Abcam, TRITC 标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 购于北京康为。兔抗人 β -Actin 单克隆抗体购于中杉金桥。电转仪 ECM830 购于美国 BTX 公司, 激光共聚焦显微镜 OLYMPUS FLUOVIEW

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81273206)

作者简介: 李园园(1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤分子免疫学, E-mail: liyuanyuan0626@126.com

[△] 通讯作者: 高美华, E-mail: meihuagao66@163.com

(收稿日期: 2014-01-06 接受日期: 2014-01-29)

FV1000 购于日本。

1.2 方法

1.2.1 质粒扩增及重组载体的鉴定 pSUPER-siCD59 质粒转染感受态大肠杆菌扩增后按 EndoFree Plasmid ezFlow Maxiprep Kit (BIOMIGA) 说明抽提质粒。用 EcoR1 单酶切 pSUPER-siCD59 重组质粒, 取 5 μ L 酶切产物琼脂糖凝胶电泳, 以 DL2000 DNA Marker 为参照。

1.2.2 重组质粒转染 Jurkat 细胞 收集对数生长期 Jurkat 细胞并调节细胞浓度为 4×10^6 个/mL。取 250 μ L 细胞悬液与 50 μ L 质粒加入 4 mm 电转杯(BTX), 混匀, 冰上孵育 15 min, 300 V、10 ms 电击, 冰上孵育 15 min, 转入含 20%血清 PBS 离心管中离心, 完全培养基重悬于 24 孔板继续培养。

1.2.3 RT-PCR 检测 CD59 mRNA 的表达 提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 进行 RT-PCR。以 GAPDH 为内参, 引物序列如下: GAPDH 上游引物 5'-CGGGAACTCTGGCGTGAT-3', 下游引物 5'-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3'; CD59 上游引物 5'-TGGACAATCACAATGGGAATC-3', 下游引物 5'-TGCTGCCAGAAATGGAGTCAC-3'。扩增片段为 509 bp 和 267 bp。RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 47 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 35 个循环, 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 5 μ L 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检测 CD59 在细胞膜上的表达及分布 收集转染 pSUPER 空载体的 Jurkat 细胞及电转干扰质粒的细胞, 涂成单细胞层, 晾干。依次 4%多聚甲醛固定, 10%山羊血清封闭, CD59 一抗(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, PBS 洗涤, 37 $^{\circ}$ C 孵育罗丹明标记二抗(1:100 稀释)1 h, 70%甘油封片, 立即共聚焦激光显微镜观察。同时取部分正常 Jurkat 细胞加 CD59 抗体室温低速摇床孵育 2 h, PBS 洗涤, 加入罗丹明标记二抗避光继续孵育 1 h, 涂片晾干, 70%甘油封片, 立即共聚焦激光显微镜观察。

1.2.5 MTT 比色法检测细胞增殖率 取正常 Jurkat 细胞及质粒电转细胞, 按 1×10^4 个/100 μ L, 接种于 96 孔板, 每组设 3 个平行复孔。其中抗体活化组加入 CD59 抗体(1:500 稀释), 细胞培养箱中培养 12 h。加入 MTT(5 mg/mL)10 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 离心去上清, 加入 DMSO 150 μ L/孔, 室温低速振荡 10 min 使结晶完全溶解。全自动酶标检测仪于 490 nm 处测定各组吸光度(A)值。

1.2.6 Western blot 检测 CD59 的表达及 ZAP70 的磷酸化水平 收集细胞, 提取总蛋白。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉室温低速摇床封闭 2 h, 分别加入 CD59 一抗(1:5000 稀释)和 β -Actin 一抗(1:1000 稀释)4 $^{\circ}$ C 摇床过夜孵育。TBST 漂洗, 辣根过氧化物酶标记二抗(1:2000 稀释)室温摇床孵育 2 h。TBST 漂洗, 加入显色液室温避光孵育 5 min, 曝光拍照。

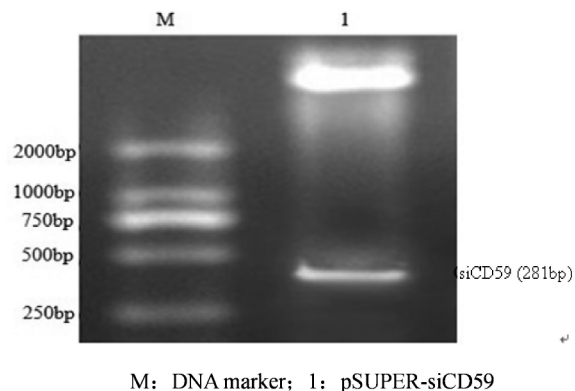
1.2.7 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 所有计量资料均用均数 $\pm$ 标准差表示。组间比较采用独立 t 检验, 其中双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

pSUPER-siCD59 重组质粒总长度为 7448 bp, 干扰序列 5' 和 3' 酶切位点均为 EcoR1, 经 EcoR1 单酶切后得到 281 bp 小

片段(图 1), 酶切结果证实重组质粒片段正确。



M: DNA marker; 1: pSUPER-siCD59

图 1 pSUPER-siCD59 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pSUPER-siCD59 by digestion

2.2 重组质粒转染 Jurkat 细胞后荧光表达

pSUPER-siCD59 重组质粒电转 Jurkat 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下可见绿色荧光表达, 其中阳性细胞数可占细胞总数的 40%(图 2), 表明建立了有效的质粒转染体系。

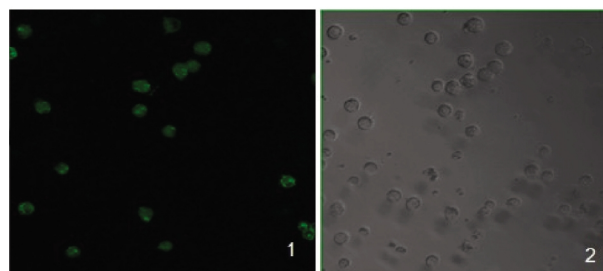


图 2 重组质粒转染后 Jurkat 细胞荧光表达($\times 200$)

Fig. 2 Transfection efficiency on Jurkat cells($\times 200$)

注: 1. 转染 pSUPER-siCD59 后荧光图片; 2. 细胞明场图片

Note: 1. The fluorescent image of Jurkat cells transfected with pSUPER-siCD59; 2. The DIC image of cells transfected with pSUPER-siCD59

2.3 RT-PCR 检测各组细胞 CD59 mRNA 的表达变化

成功扩增了 CD59 基因及 GAPDH 基因。与正常细胞及抗体活化细胞相比, 转染质粒后细胞 CD59 mRNA 表达量下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 而正常细胞与抗体活化细胞 CD59 mRNA 表达水平无明显差别。各细胞内参 GAPDH mRNA 表达量基本一致(图 3)。

2.4 免疫荧光检测 CD59 分子在各组细胞细胞膜上的表达及分布

转染 pSUPER-siCD59 重组质粒后, CD59 的荧光表达强度显著低于正常细胞及抗体活化细胞(图 4A), 说明干扰质粒发挥作用。CD59 在电转质粒细胞和正常细胞膜上分布均匀(图 4A/B)。而抗体活化后 CD59 分子在细胞膜上的分布以点簇状聚集为主(图 4C), 说明 CD59 分子经抗体活化后可被募集于细胞膜脂筏区域, 与前期^[9]实验结果一致。

2.5 MTT 比色法检测细胞增殖效率

转染 pSUPER-siCD59 重组质粒后细胞的增殖效率明显低于正常 Jurkat 细胞和抗体活化细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Jurkat 细胞经 CD59 抗体活化后其细胞的增殖效率明显高于正常细胞, 差别有显著性 ($P < 0.05$)(图 5)。

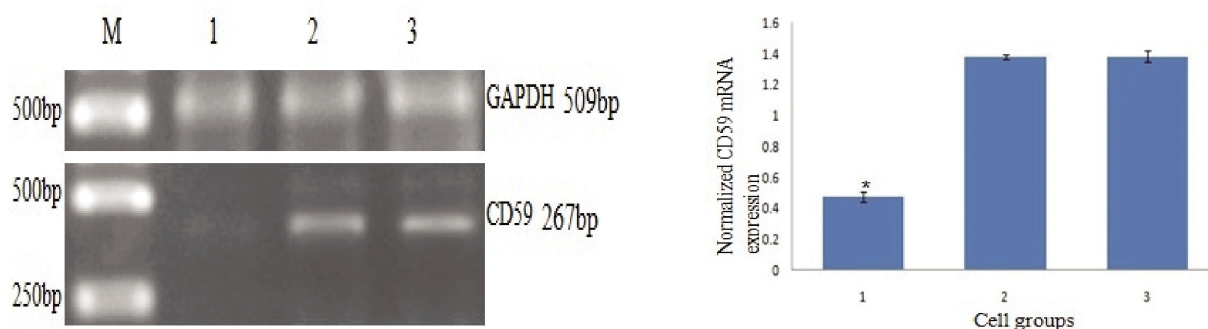


图3 RT-PCR 检测各组细胞 CD59 mRNA 的表达水平

Fig. 3 CD59 mRNA levels of different groups

注: M: DNA marker; 1. 转染 pSUPER-siCD59 重组质粒细胞; 2. 正常细胞; 3. CD59 抗体活化细胞 (*P<0.05, 1 vs 2 or 3)

Notes: 1. Jurkat cells transfected with pSUPER-siCD59; 2. Normal Jurkat cell controls; 3. Jurkat cells stimulated with anti-CD59 (*P<0.05, 1 vs 2 or 3)

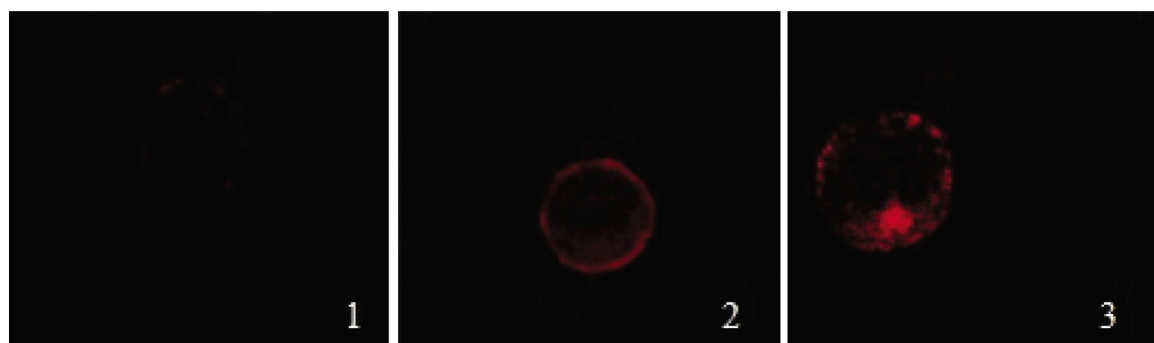


图4 CD59 分子在细胞膜上的表达及分布 (× 160)

Fig. 4 Expression and distribution of CD59 on cell membrane of different groups (× 160)

注: 1. 转染 pSUPER-siCD59 质粒细胞 CD59 的表达; 2. 正常 Jurkat 细胞 CD59 的表达; 3. anti-CD59 活化细胞 CD59 的表达

Notes: 1. CD59 expression on Jurkat cells transfected with pSUPER-siCD59; 2. CD59 expression on normal Jurkat cells;

3. CD59 expression on Jurkat cells stimulated by anti-CD59

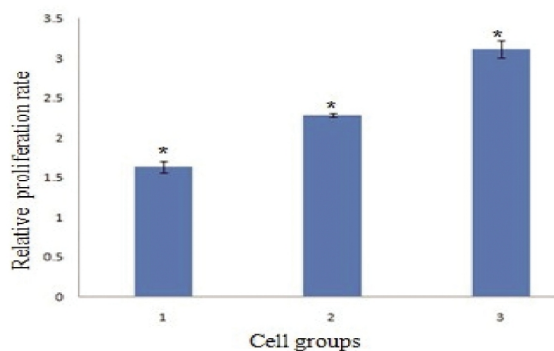


图5 MTT 检测不同处理组 Jurkat 细胞的增殖效率

Fig. 5 Jurkat cell proliferation by MTT assay

注: 1. 转染 pSUPER-siCD59 重组质粒细胞; 2. 正常 Jurkat 细胞; 3. CD59 抗体活化细胞组 (*P<0.05, 1 vs 2 vs 3)

Notes: 1. Jurkat cells transfected with pSUPER-siCD59; 2. normal Jurkat cells; 3. Jurkat cells stimulated by anti-CD59 (*P<0.05, 1 vs 2 vs 3)

2.6 CD59 分子的表达和 ZAP70 的磷酸化水平的检测

结果可看出 Jurkat 细胞电转 pSUPER-siCD59 重组质粒后, CD59 的表达水平明显低于另外两组 ($P<0.05$), 差别有统计学意义。而正常对照组和抗体活化组 CD59 表达差别不大。ZAP70 的磷酸化水平, 质粒转染组、空白对照组、抗体活化组依次升高, 差别明显 ($P<0.05$), 说明干扰 CD59 分子的表达可降低 T 淋巴细胞的活化水平。

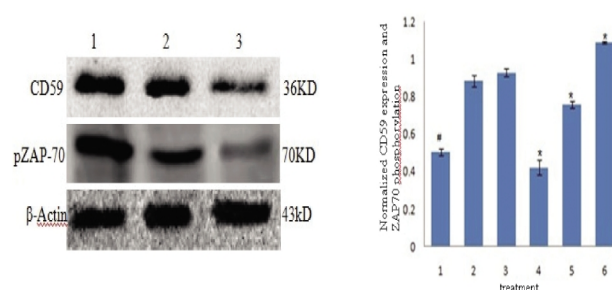


图6 Western blot 检测各组细胞的 CD59 表达和 ZAP70 的磷酸化水平

Fig. 6 CD59 expression and ZAP70 phosphorylation analysis detected by western blot

注: 1/4: 转染 pSUPER-siCD59 重组质粒细胞蛋白; 2/5: 正常 Jurkat 细胞蛋白; 3/6: CD59 抗体活化细胞蛋白 (CD59, *P<0.05, 3 vs 1 or 2; pZAP-70, *P<0.05, 4 vs 5 vs 6)

Notes: 1/4: Jurkat cells transfected with pSUPER-siCD59 recombinant plasmid; 2/5: Normal Jurkat cells; 3/6: Jurkat cells stimulated by anti-CD59 (CD59, *P<0.05, 3 vs 1 or 2; pZAP-70, *P<0.05, 4 vs 5 vs 6)

3 讨论

T 淋巴细胞活化是 TCR 与抗原肽-MHC 分子复合物结合后在协同刺激分子共同作用下, 激活蛋白酪氨酸激酶 (Src/PTKs) 如 ZAP70, Lck, Fyn 等, 引起胞内信号通路分子活化的过程, 最终引起细胞内 Ca^{2+} 的释放、IL-2 的分泌、核转录因子

NF- κ B 表达并启动 Ras 丝裂原活化的蛋白激酶途径^[9-11]。脂筏(lipid rafts)位于多种细胞的细胞膜上富含胆固醇、鞘磷脂并含有一系列信号分子,如:GPI 锚固蛋白、Src 家族蛋白酪氨酸激酶、GTP 结合蛋白、LAT^[12-14]等。T 淋巴细胞的 TCR 分子与脂筏相关,TCR 交联后引起脂筏上蛋白分子的聚集及酪氨酸磷酸化^[15,16],因此脂筏可作为 T 细胞信号转导的场所。CD59 分子没有跨膜区和胞内区,通过其末端的糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定与细胞膜。研究发现 CD59 除了可以调节补体活性外,在细胞信号转导中的发挥一定的功能^[6],Inmaculad Monleon 等指出在 TCR/CD3 缺陷的 T 淋巴细胞中 CD59 分子仍能介导部分细胞活化功能^[17]。CD59 介导信号转导其机制可能为组成 CD59 分子的糖鞘的脂肪酸链插入细胞膜质层与质层中信号分子的脂肪酸链相互作用,诱导脂筏微域中如 Lck、Fyn 等蛋白酪氨酸激酶在膜内重新分配和聚合,通过 PTK 分子间的酪氨酸磷酸化而相互活化,进而活化下游分子引起信号传导^[18]。蛋白质分子通过糖基磷脂酰肌醇或通过烷基化修饰与脂筏结合发挥功能,也有推测 CD59 可能通过向非特异性跨膜分子或接头蛋白提供棕榈酸基团而实现其信号转导功能。

本实验通过将携带绿色荧光蛋白(GFP)编码序列的 pSU-PER-siCD59 重组质粒导入 Jurkat 细胞,研究 CD59 干扰后对细胞活化增殖的影响,同时用 CD59 单克隆抗体刺激 Jurkat 细胞观察 CD59 活化后对细胞的影响。绿色荧光蛋白的应用使我们可以直观判断干扰质粒的转染效率。电转质粒后 CD59 分子在细胞膜上的分布和空白对照细胞相比其分布方式无明显差异,但 CD59 分子的荧光强度明显降低,说明质粒成功发挥抑制 CD59 分子表达的作用。CD59 分子经抗体活化后在细胞膜上的分布方式以簇状分布为主,结果与前期研究一致^[7,8]。T 淋巴细胞活化后胞内的蛋白酪氨酸激酶活化磷酸化而被激活,参与胞内的多种效应。 ξ 相关蛋白(ξ -associated protein, ZAP-70)是 T 细胞信号转导通路中的重要效应分子^[19,20]。与空白对照组相比 CD59 干扰后磷酸化的 ZAP-70 表达降低,而 CD59 抗体交联后蛋白的磷酸化水平显著升高,提示 CD59 分子在 T 细胞活化信号转导中发挥作用,为后期研究 CD59 与多种蛋白分子在 T 细胞信号转导中的相互作用提供依据。

参考文献(References)

- [1] Hideshima T, Okada N, Okada H. Expression of HRF20, a regulatory molecule of complement activation, on peripheral blood mononuclear cells[J]. Immunology, 1990, 69(3): 396-401
- [2] Ana Paula Alegretti, Laiana Schneide, Amanda Kirchner Piccoli, et al. The role of complement regulatory proteins in peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus: Review [J]. Cellular Immunol, 2012, 277(1-2): 1-7
- [3] Li B, Lin H, Fan J, et al. CD59 is overexpressed in human lung cancer and regulates apoptosis of human lung cancer cells [J]. Int J Oncol, 2013, 43(3): 850-858
- [4] Ghosh P, Sahoo R, Vaidya A, et al. A specific and sensitive assay for blood levels of glycated CD59: a novel biomarker for diabetes[J]. Am J Hematol, 2013, 88(8): 670-676
- [5] Weiss L, Okada N, Haeffner Cavaillon N, et al. Decreased expression of the membrane inhibitor of complement-mediated cytotoxicity CD59 on T-lymphocytes of HIV-infected patients [J]. AIDS, 1992, 6(4): 379-385
- [6] Patricia E. Korty, Clara Brando, Ethan M. Shevach. CD59 functions as

- a signal-transducing molecule for human T cell activation [J]. The Journal of Immunology, 1991, 146(12): 4092-4098
- [7] 秦云,高美华,王冰,等.T 细胞活化链接蛋白脂筏定位功能缺失影响 T 细胞内 CD59 信号转导的功能[J].细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(11): 1121-1124
- Qin Yun, Gao Mei-hua, Wang Bing, et al. Impact of the palmitoylation of linker for T cells on signal transduction pathway of CD59 in T cells [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(11): 1121-1124
- [8] 高美华,姬静,王冰,等.锚定蛋白 CD59 与接头分子 Cbp 在 T 细胞上的定位及功能研究[J].细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(6): 565-569
- Gao Mei-hua, Ji Jing, Wang Bing, et al. Localization and function of CD59 and CBP in T lymphocytes [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(6): 565-569
- [9] Andre E. Nel, MD Los Angeles, Calif. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse [J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(5): 758-770
- [10] Andre E. Nel, MD, Ndaisha Slaughter, et al. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: Role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(6): 901-915
- [11] 王秀丽,李大金. 转接蛋白是免疫信号传导中的重要调节子[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 3(21): 239-242
- Wang Xiu-li, Li Da-jin. Adapter protein is an important regulator of immune signal transduction[J]. Chinese Journal of Immunology, 2005, 3(21): 239-242
- [12] Suzuki KG, Kasai RS, Hirose KM, et al. Transient GPI-anchored protein homodimers are unites for raft organization and function[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(9): 774-783
- [13] Fujita M, Jiqami Y. Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780(3): 410-420
- [14] Weiguo Zhang, Ronald P. Tribble, Lawrence E. Samelson, et al. Lat Palmitoylation: Its Essential Role in Membrane Microdomain Targeting and Tyrosine Phosphorylation during T Cell Activation[J]. 1998, 9(2): 239-246
- [15] Peter W. Janes, Steven C. Ley, Anthony I. Magee, et al. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signaling [J]. seminars in Immunology, 2000, 12(1): 23-34
- [16] Leandro N. Ventimiglia, Miguel A. Alonso. The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signaling in T-cells[J]. Biochem J, 2013, 454(2): 169-179
- [17] Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, et al. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(4): 1078-1087
- [18] 熊茂林. GPI 锚的结构、功能及 GPI 锚定 B7 分子在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 国际免疫学杂志, 2003, 26(5): 230-233
- Xiong mao-lin. The structure, function of GPI anchor and GPI anchor B7 molecule in tumor immunotherapy [J]. International Journal of Immunology, 2003, 26(5): 230-233
- [19] Alarcon B, van Santen HM. Two receptors, two kinases, and T cell lineage determination[J]. Sci Signal, 2010, 3(114): 11-11
- [20] Leandro N. Ventimiglia, Miguel A. Alonso. The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signaling in T-cells[J]. Biochem. J., 2013, 454(2): 169-179