

肿瘤坏死因子受体 2 突变载体对巨噬细胞炎症反应的影响

岳莉英, 卫娜, 白瑞, 杨慧宇, 王敏, 边云飞
(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 肿瘤坏死因子受体超家族 1B 基因; 可溶性肿瘤坏死因子受体 2; 巨噬细胞; TNF-TNFR2 信号通路; 炎症反应

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子受体超家族 1B(TNFRSF1B)196 位基因多态性(T 突变为 G)与巨噬细胞 TNF/TNFR2 信号通路介导炎症反应的相关性。方法 运用基因重组技术构建真核表达载体 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg},采用脂质体转染法分别转染至巨噬细胞中,转染 48 h 后使用杀稻瘟菌素抗性筛选 4 周,建立稳定转染细胞系。将酶消化法培养的巨噬细胞分为四组:空白对照组、pcDNA6.0 空质粒组、pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组及 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组。采用酶切及测序法鉴定重组质粒,RT-PCR 检测肿瘤坏死因子受体 2(TNFR2)、cIAP₁、cIAP₂ mRNA 的变化;Western blot 检测 p-JNK、cIAP₁、cIAP₂、TNFR2 及核因子 κB(NF-κB)的蛋白表达;ELISA 检测细胞上清液可溶性 TNFR2(sTNFR2)、白细胞介素 1β(IL-1β)和白细胞介素 6(IL-6)水平。结果 酶切测序结果显示成功构建了 TNFR2 基因^{196Met}和^{196Arg}表达载体。转染到巨噬细胞后,与空白对照组和 pcDNA6.0 空质粒组比较,pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组、pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组 TNFR2、cIAP₁、cIAP₂、IL-1β、IL-6 和 p-JNK 的表达增高($P < 0.05$);与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组比较,pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组 TNFR2、cIAP₁、cIAP₂、IL-1β、IL-6 和 p-JNK 的表达明显降低($P < 0.05$),TNFR2^{196Arg}介导的 NF-κB 活性显著降低。结论 成功构建稳定表达 TNFR2^{196Met}、TNFR2^{196Arg}载体,TNFR2 突变通过 TNF/TNFR2 信号通路介导炎症反应,可能是参与慢性炎症性疾病的作用机制。

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A

Effect of TNFR2 Mutation Vector on Inflammatory in Macrophages

YUE Li-Ying, WEI Na, BAI Rui, YANG Hui-Yu, WANG Min, and BIAN Yun-Fei
(Department of Cardiology, The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1B Gene; Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 2; Macrophages; TNF/TNFR2 Signaling Pathway; Inflammation Reaction

[ABSTRACT] Aim To discuss the correlation of the polymorphism of tumor necrosis factor receptor superfamily 1B (TNFRSF1B) in the 196ed gene (T mutation for G) to the inflammation reaction mediated by the macrophage TNF-TNFR2 signaling pathways. Methods Genetic recombination technology was used to bulid eukaryotic expression vector pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} and pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}, together with pcDN6.0 being transferred to macrophage by liposome transfection method respectively. In order to establish stable transfection cell lines, blasticidin was used to select them for 4 weeks after transfected 48 h. Digest the macrophages by pancreatic enzyme and divide them into four groups: control group, pcDNA6.0 empty plasmid group, pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} group and pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} group. TNFR2, cIAP₁, cIAP₂ mRNA were detected by RT-PCR, the expression of p-JNK, cIAP₁, cIAP₂, TNFR2 and NF-κB were detected by Western blot, the level of sTNFR2, IL-1β and IL-6 in cell supernatant fluid were detected by ELISA. Results TNFR2 gene^{196Met} and^{196Arg} expression vector were successfully constructed which was verified by enzyme sequencing method. After transfected to marcophages, TNFR2, cIAP₁, cIAP₂, IL-1β, IL-6 and p-JNK expression were increased ($P < 0.05$) in TNFR2^{196Arg} and TNFR2^{196Met} overexpression group compared with the blank control group and empty plasmid group. Each index decreased obviously in mutant TNFR2^{196Arg} cell group compared with TNF2^{196Met} cell group, especially,

[收稿日期] 2013-06-03
[基金项目] 山西省科技攻关项目(20090311057-4)
[作者简介] 岳莉英,硕士,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 yly6673@sina.cn。白瑞,硕士,技师。通讯作者边云飞,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 yunfeibian@sina.com。

the reduction of NF- κ B activity mediated by TNFR2^{196Arg} was significant. **Conclusions** Successfully building stable expression TNFR2^{196Arg} and TNFR2^{196Met} vector will lay the foundation for the next inflammation research. The mutation of TNFR2 mediates inflammatory disease through TNF/TNFR2 signaling pathways, which is molecular mechanism of chronic inflammatory disease.

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)诱导的信号转导途径在冠心病慢性炎症过程中起关键作用。肿瘤坏死因子受体 2(tumor necrosis factor reporter 2, TNFR2)由肿瘤坏死因子超家族成员 1B 基因(tumor necrosis factor receptor superfamily 1B, TNFRSF1B)编码,分为膜型和可溶性两种,膜型 TNFR2 特异性的表达在免疫细胞表面,而可溶性 TNFR2(soluble TNFR2, sTNFR2)是由蛋白酶水解而成,存在于血浆和尿中^[1]。TNF 的生物学效应都是通过细胞表面的两种 TNF 受体(tumor necrosis factor reporter, TNFR)引发,其信号转导通路主要包括 Caspase 家族介导的细胞凋亡、衔接蛋白 TRAF 介导的核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和 JNK 蛋白激酶的活化^[2]。TNFRSF1B 基因位于染色体 1p36.2,由 10 个外显子和 9 个内含子组成,除外显子 4、9、10 的非编码区存在基因多态性外,最近发现 6 号外显子 196 位(rs1061622 位点核苷酸序列 676 位)上有单核苷酸多态(T/G)。我们已通过大量的病例对照研究对冠心病患者的 TNFR2 基因型分析发现冠心病组 rs10616 22 位点 GG 基因型较对照组有统计学差异,提示 TNFRSF1B 基因的 rs1061622 位点 T/G 多态性与冠心病遗传易感性相关^[3]。国内外大量实验研究推测突变体 TNFR2^{196Arg}可能影响炎症信号通路 NF- κ B 活性、靶基因的诱导及细胞凋亡,但其具体作用机制尚不明确。本研究旨在构建真核表达质粒 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg},并将不同单倍型转染至细胞中,观察不同单倍型与 TNFRSF1B 基因及炎症因子 mRNA 和蛋白水平的变化,分析 TNFRSF1B 基因多态性与巨噬细胞 TNF/TNFR2 信号通路介导炎症反应的相关性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

定点突变试剂盒、PCR 突变引物、Trizol、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);胶回收试剂盒(台湾 Geneaid 公司);限制性内切酶 Hind III 和 EcoR I、T4 DNA Ligase(Fermentas 公司)、TIANprep 质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);胰蛋白胨、酵母菌提取物、琼脂(美国

Sigma 公司),氨苄青霉素钠(上海吉凯基因技术有限公司);Lipofectamine TM2000、杀稻瘟菌素(美国 Invitrogen 公司);DNA marker S plus、PCR 引物(上海生工生物工程有限公司);蛋白提取试剂盒(北京普利莱公司);cIAP₁、cIAP₂、TNFR2 抗体(北京博奥森公司);NF- κ B、磷酸化 JNK 和总 JNK 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);羊抗兔二抗(Santa 公司);Ecl-plus 发光试剂盒(武汉博士德公司);sTNFR2、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.2 菌株、质粒和细胞

人工合成 pMD18-T simple-TNFR2^{196Met}菌种购自日本 TaKaRa 公司;真核表达质粒 pcDNA6.0 菌种由山西医科大学寄生虫教研室王海龙老师惠赠;E. coli 感受态细胞 JM109 购自北京天根生化科技有限公司;小鼠单核巨噬细胞(细胞代号 RAW264.7, ATCC, USA)。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱(HERA cell 150)、倒置显微镜(Nikon TS100)、荧光倒置显微镜(Olympus IX50)、紫外可见分光光度计(CARY50)、水平电泳系列(Mini-Sub Cell GT, Bio-rad)、凝胶成像系统(GelDoc, Bio-rad)、激光共聚焦显微镜(Olympus FV300),均由山西医科大学第二医院干细胞研究中心提供。

1.4 pMD18-T simple-TNFR2^{196Met}载体的构建

根据 GenBank 人 TNFRSF1B mRNA 序列 NM_001066 人工合成 TNFRSF1B 全长,在两端分别加入 Hind III(AAGCTT)和 EcoR I(GAATTC)序列,共 1398 bp。与 pMD18-T simple 进行连接反应,将连接液全量转化至 E. coli Competent Cell JM109。对平板上的菌落用 M13-47/RV-M 引物进行 PCR,检测所含质粒中插入片段的长度大小。最后提取质粒 DNA 进行测序。其中 M13-47:5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3', RV-M:5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3',测序引物 pMD18 F:5'-GCC TCT TCG CTA TTA CGC CA-3', R:5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3'。

1.5 重组体 pMD18-T simple-TNFR2^{196Arg}的构建

根据 TNFRSF1B 全长设计突变引物,使得 TNFR2 第 196 位甲硫氨酸转变为缬氨酸。定点突变引

物上游:5'-GGG ATG CAG TCT GCA CGT CC-3'(包含突变位点),下游:5'-TGC TTG CAT TCC CAG GGA TGG-3'。突变 PCR 反应液:Pyrobest DNA Polymerase 0.25 μ L,10 $\times$ Pyrobest Buffer II 5 μ L,dNTP Mixture 4 μ L,Primer1 1 μ L,Primer2 1 μ L,Template 3.82 μ L,加灭菌蒸馏水至 50 μ L。94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,30 个循环;取 5 μ L PCR 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测;参照胶回收试剂盒说明书回收得到线性 pMD18-T simple-TNFR2^{196Arg} DNA。行 Blunting Kination、Ligation 连接反应(按照突变试剂盒说明书)。将反应液用热休克法全量转化至 E. coli 感受态细胞,挑取单克隆菌落接种于 100 mg/L 氨苄青霉素钠的 LB 培养基中培养。用 TIANprep 质粒小提试剂盒小量提取质粒 DNA,常规 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。分别用 TNFR2 基因两端的 Hind III 和 EcoR I 酶切位点进行酶切鉴定。反应体系:提取的质粒 10 μ L,Hind III (10 MU/L) 1 μ L,EcoR I (10 MU/L) 1 μ L,10 $\times$ Buffer R 4 μ L,灭菌蒸馏水加至 20 μ L,反应物轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。酶切后常规电泳检测 TNFR2 片段和载体的大小。经酶切鉴定后的菌液送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。

1.6 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}载体的构建及鉴定

pMD18-T simple-TNFR2^{196Met}、pMD18-T simple-TNFR2^{196Arg}和 pcDNA6.0 质粒 DNA 各取 10 μ L,分别进行 Hind III 和 EcoR I 双酶切反应,反应体系同前,37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h,常规电泳后切胶回收 TNFR2^{196Met}、TNFR2^{196Arg}与 pcDNA6.0 片段,将 TNFR2^{196Met}、TNFR2^{196Arg}分别与 pcDNA6.0 片段按体积比为 10:1 的比例混合,T4 DNA Ligase 16 $^{\circ}$ C 过夜;连接反应结束后,将连接产物转化入 E. coli 感受态细胞,涂 LB 平板后过夜培养。在每个平板上用接种针挑取约 20 个白色单菌落进行摇菌获得菌液。经引物设计,上游引物 5'-CCC CCA GCT GAA GGG AGC ACT-3',下游引物 5'-TAC CCC GGG CCT TAT CGG CA-3'。PCR 反应体系:菌液 2.0 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,2 $\times$ Mix 8 μ L,加 ddH₂O 至 20 μ L;PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 终末延伸 7 min,16 $^{\circ}$ C 保存 PCR 产物。取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。提取 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}真核表达质粒,以 Hind III 和 EcoR I 双酶切鉴定阳性克隆。双酶切反应体系和反应条件同前。之后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。阳性

克隆送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。保存测序正确的菌株,并大量制备和纯化 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}质粒。

1.7 细胞培养、质粒转染与筛选

小鼠巨噬细胞在高糖 1640 培养基,含 10% FBS、青霉素 50 ku/L 和链霉素 50 ku/L,5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的条件下培养。用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,按 2 $\times$ 10⁵ 个细胞/瓶接种至 25 cm² 培养瓶中。通过比较不同浓度(2、4、6、7、8 及 10 mg/L) 杀稻瘟菌素对转染前巨噬细胞的毒性作用,绘制杀伤曲线后选择最适宜的药物浓度 8 mg/L。转染前 1 天取对数生长期的巨噬细胞,以 2 $\times$ 10⁵ 接种于 24 孔板,加入不含抗生素的 DMEM 培养液,次日观察细胞达 90% 聚合开始转染。取纯化的目的质粒 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 4 μ g 和 Lipofectamine TM2000 10 μ L 分别稀释于 250 μ L 不含抗生素的 DMEM 培养液,5 min 内混匀,室温孵育 20 min 后转染入巨噬细胞。6 h 后更换新鲜培养液。转染后 24 h 按 1:10 的比例传代至 6 孔板,48 h 后开始用含 8 mg/L 的杀稻瘟菌素的选择性培养液进行筛选,其后每 2~3 天换液。2 周后开始出现细胞集落,约 4 周后挑取单克隆在选择性培养液中继续传代,扩大培养。同步转染阴性对照质粒 pcDNA6.0。

1.8 实验分组

将巨噬细胞分为四组:空白对照组,培养的小鼠巨噬细胞不做任何处理;pcDNA6.0 空质粒组,稳定转染 pcDNA6.0 的巨噬细胞;pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组,稳定转染 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}的巨噬细胞;pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组,稳定转染 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}的巨噬细胞。

1.9 巨噬细胞形态学观察

倒置相差显微镜观察各组巨噬细胞形态及细胞生长状态。

1.10 RT-PCR 检测细胞 TNFR2、cIAP₁ 和 cIAP₂ mRNA 的表达

用 Trizol 法提取细胞总 RNA,运用分光光度计检测 RNA 的浓度及 OD_{260/280},按 RNA 逆转录试剂盒行逆转录合成 cDNA,反应体系:5 $\times$ gDNA Eraser Buffer 2 μ L,gDNA Eraser 1 μ L、Total RNA 5 μ L、RNase Free H₂O 2 μ L、42 $^{\circ}$ C 2 min;5 $\times$ PrimeScript Buffer 4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μ L、RT Prime Mix 1 μ L、RNase Free H₂O 4 μ L、上述反应液 10 μ L,条件为:37 $^{\circ}$ C 15 min、85 $^{\circ}$ C 5 s、4 $^{\circ}$ C forever。RT-PCR 反应体系:2 $\times$ Mix 8 μ L、Forward Primer 0.5

μL、Reverse Primer 0.5 μL、cDNA 模板 2.0 μL、ddH₂O 9.0 μL,条件:92℃预变性 2 min,92℃变形 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环,72℃延伸 5 min。其中 TNFR2 引物同前;cIAP₁ 上游引物 5'-GCC TGA TGC TGG ATA ACT GG-3',下游引物 5'-GCT CTT GCC AAT TCT GAT GG-3';cIAP₂ 上游引物 5'-GCC TGA TGC TGG ATA ACT GG-3',下游引物 5'-GGC GAC AGA AAA GTC AAT GG-3'。扩增片段通过凝胶成像系统扫描,利用 Quantity one 4.6.2 分析系统测定灰度值,目的基因 PCR 产物的相对表达含量 = 目标基因电泳条带灰度值/GAPDH 电泳条带灰度值。

1.11 Western blot 检测细胞 p-JNK、cIAP₁ 和 cIAP₂、TNFR2 及 NF-κB 的蛋白表达

弃去培养基,将各组细胞用 PBS 洗 2 遍,收集细胞,然后按照蛋白抽提试剂盒说明书,分别制备各组细胞膜、核膜和胞质蛋白,用 Bradford 法测蛋白浓度。取 100 μg 样品蛋白,放沸水振荡水浴 1 min 变性,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转移至硝酸纤维膜,将硝酸纤维膜从半干转膜仪中取出,漂洗后置于封闭液(含 5% 小牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液)封闭后,依次加入兔抗鼠 p-JNK 抗体(1:2000)、cIAP₁(1:100)和 cIAP₂(1:100)抗体、TNFR2 抗体(1:100)、兔抗鼠 NF-κB(1:1000)浸泡滤膜,4℃过夜,洗涤后加入碱磷酶标记的羊抗兔 IgG(1:3000),洗膜后 ECL 化学发光试剂检测。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各目的条带积分灰度值,所测结果为扣除背景的积分光密度。

1.12 ELISA 测定巨噬细胞上清液中 sTNFR2、IL-1β 和 IL-6 水平

收集各组巨噬细胞培养液,按照 ELISA 试剂盒的操作说明测定各组巨噬细胞上清液中 sTNFR2、

IL-1β 和 IL-6 水平。

1.13 统计学方法

数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 载体的鉴定

重组质粒切出了约 5100 bp 和 1398 bp 的两个片段,分别与载体 pcDNA6.0 和 TNFR2 片段大小吻合,提示 TNFR2 基因片段已经插入到 pcDNA6.0 中(图 1)。取 PCR 初筛的和双酶切鉴定的阳性重组子的菌液进行测序,结果示插入片段的 rs1061622 位点的碱基排列顺序与目的片段一致(图 2),说明 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 重组质粒构建成功,可用于下一步实验。

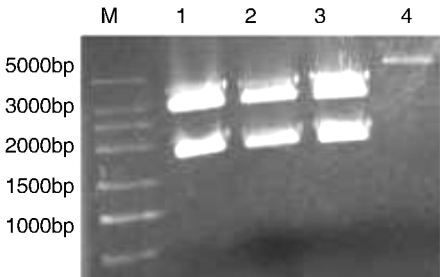


图 1. 经双酶切鉴定 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 重组质粒阳性克隆 M 为 DM5000 DNA Marker, 1、2 为 pMD18-T simple-TNFR2^{196Arg} 阳性克隆,3 为 pMD18-T simple-TNFR2^{196Met} 阳性克隆,4 为 pcDNA6.0。

Figure 1. Identification of recombinant plasmid pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}, pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} positive clones by double enzyme digestion

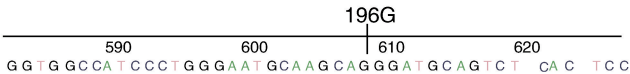
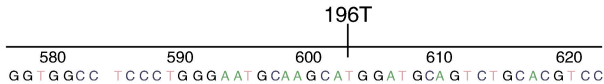


图 2. pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 和 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 表达基因测序图
Figure 2. The sequencing results of gene TNFR2 in pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} and pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}

2.2 巨噬细胞形态变化

巨噬细胞在含 10% 高糖 DMEM 培养基中生长良好,传代后 2 h 贴壁,形态以类圆形和不规则多边形为主,一般含 1~2 个核,有伪足,细胞体积较小,细胞生长快,5~6 天可汇合,采用脂质体转染法分别转染至巨噬细胞中,转染 48 h 后荧光显微镜观察可以看到转染组有绿色荧光的表达(图 3)。

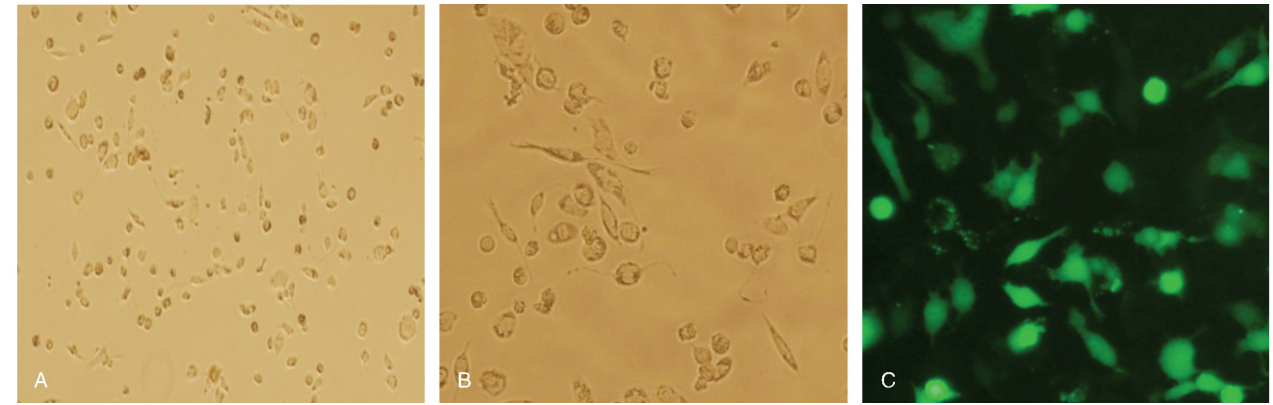


图 3. 巨噬细胞形态学变化 A 为倒置显微镜下观察正常培养的巨噬细胞(×100),B 为倒置显微镜下观察正常培养的巨噬细胞(×200),C 为倒置荧光显微镜下观察转染后的巨噬细胞。

Figure 3. The morphological changes of macrophages

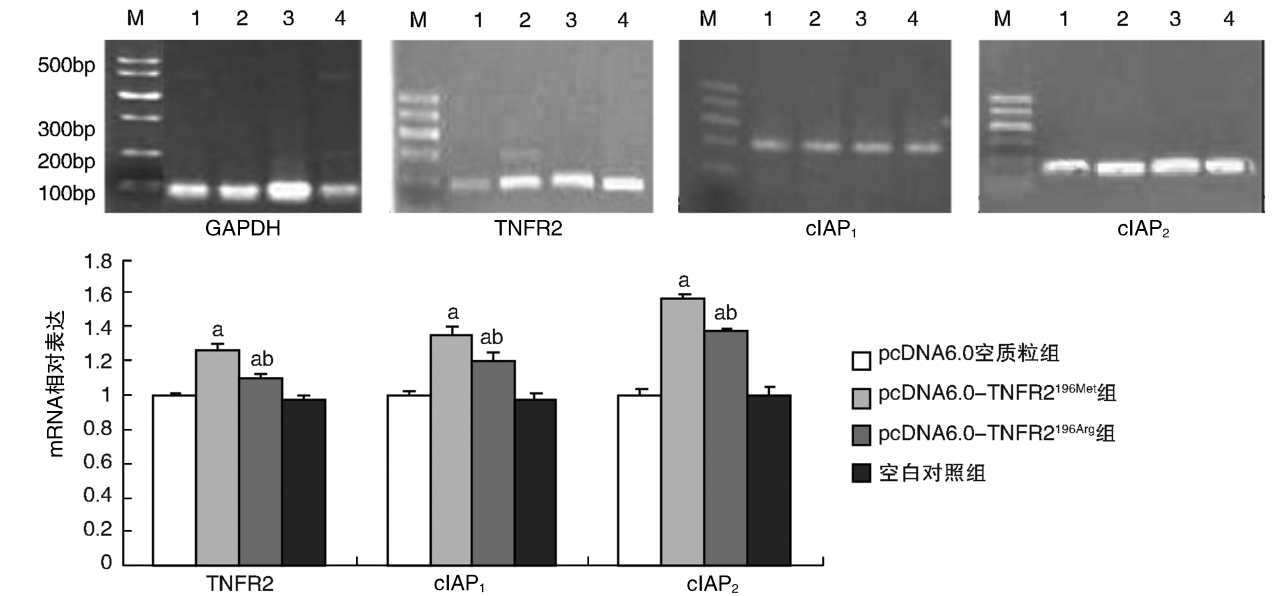


图 4. 巨噬细胞中 TNFR2、cIAP₁ 和 cIAP₂ mRNA 的表达 M 为 DM600 DNA Marker,1 为 pcDNA6.0 空质粒组,2 为 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组,3 为 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组,4 为空白对照组。a 为 $P < 0.05$,与空白对照组或 pcDNA6.0 空质粒组比较;b 为 $P < 0.05$,与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组比较。

Figure 4. The expression of TNFR2, cIAP₁ and cIAP₂ mRNA of macrophages

2.4 细胞 p-JNK、cIAP₁、cIAP₂、TNFR2 及 NF-κB 蛋白的表达

与空白对照组和 pcDNA6.0 空质粒组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组

2.3 细胞 TNFR2、cIAP₁、cIAP₂ mRNA 的表达

与空白对照组和 pcDNA6.0 空质粒组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组 TNFR2、cIAP₁、cIAP₂ mRNA 的表达上调;与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组各项指标下调($P < 0.05$;图 4)。

TNFR2、cIAP₁、cIAP₂、p-JNK、NF-κB 蛋白的表达明显上调($P < 0.05$)。与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}组各项指标下调($P < 0.05$;图 5)。

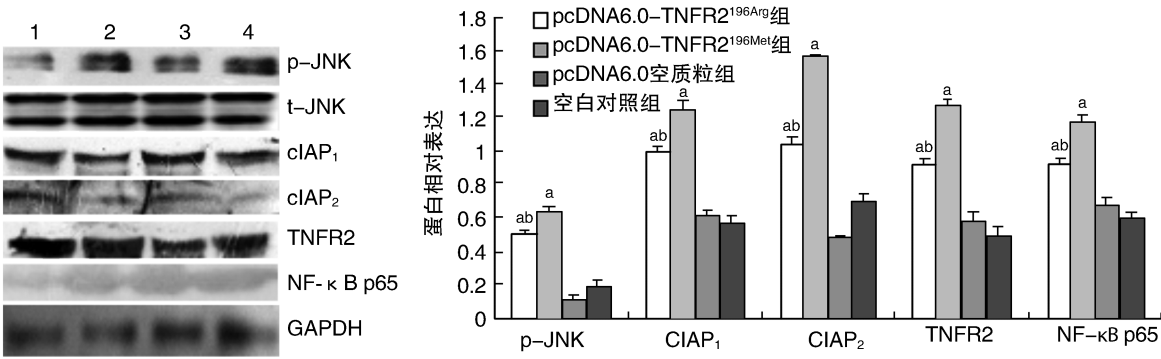


图 5. 巨噬细胞中 p-JNK、cIAP₁、cIAP₂、TNFR2 及 NF-κB 蛋白的表达 1 为 pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 组,2 为 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 组,3 为 pcDNA6.0 空质粒组,4 为空白对照组。a 为 $P < 0.05$,与空白对照组或 pcDNA6.0 空质粒组比较;b 为 $P < 0.05$,与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 组比较。

Figure 5. The expression of p-JNK, cIAP₁, cIAP₂, TNFR2 and NF-κB protein of macrophages

2.5 细胞上清液中 sTNFR2、IL-1β 和 IL-6 的水平

与空白对照组和 pcDNA6.0 空质粒组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 组、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 组 sTNFR2、IL-1β、IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$),与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 组相比,pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg} 组 sTNFR2、IL-1β、IL-6 水平明显降低 ($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 各组细胞上清液中 sTNFR2、IL-1β 和 IL-6 水平

Table 1. The levels of sTNFR2, IL-1β and IL-6 in each group

分 组	sTNFR2 (ng/L)	IL - 1β (ng/L)	IL - 6 (ng/L)
空白对照组	8. 57 ± 0. 13	5. 01 ± 2. 58	6. 51 ± 0. 22
pcDNA6. 0 空质粒组	10. 64 ± 0. 10	8. 51 ± 1. 57	10. 22 ± 0. 58
pcDNA6. 0-TNFR2 ^{196Met} 组	120. 89 ± 20. 78 ^a	68. 05 ± 6. 56 ^a	38. 09 ± 4. 28 ^a
pcDNA6. 0-TNFR2 ^{196Arg} 组	60. 66 ± 9. 54 ^{ab}	28. 50 ± 3. 58 ^{ab}	17. 21 ± 6. 58 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与空白对照组或 pcDNA6.0 空质粒组比较;b 为 $P < 0.05$,与 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met} 组比较。

3 讨 论

近年来,炎症学说逐渐引起了重视,越来越多的证据表明炎症在冠心病的发生、发展和预后过程中起重要作用^[4]。炎症因子与冠心病的关系已经成为冠心病研究领域新的热点^[5,6]。TNF-α 的生物学功能主要是通过与细胞表面相应的受体特异性的结合来实现的。因此,对 TNFR 的研究有助于更好的认识 TNF 的分子机制。国外学者研究发现 TNFRSF1B 基因的单核苷酸多态性是导致冠心病及其相关危险因素如糖尿病、高血脂等的遗传易患因素^[7]。有研究证实 TNFR2 蛋白产物是由携带 TNFRSF1A 产物的杂合子基因组构成,导致抗凋亡蛋白 cIAP₁ 和 cIAP₂ 的活化,两者具有 E3 泛素连接酶活性。cIAP₁ 可能通过泛素化使 TNFR2 退化产生抗凋亡信号增强 TNF-α 诱导的细胞凋亡。因此,TNFRSF1B 基因的遗传变异和冠心病炎症反应发生发展的相关性值得研究,目前国内尚未见相关报道,

本课题以此为切入点,进行相关的研究。

TNF 的生物学效应是通过细胞表面的 TNFR 引发,TNFR 有两种:TNFR1 和 TNFR2,均为 I 型跨膜蛋白。TNFR1 在体内大多数细胞表面广泛分布,TNFR2 的表达主要局限在免疫细胞。TNFR1 和 TNFR2 的胞外区都含有 4 个富含半胱氨酸的结构域(cysteine-rich-domain,CRD),每个 CRD 包含 6 个半胱氨酸的高保守氨基酸序列。CRD 独特的折叠方式决定了 TNF 与受体之间的特异性结合,与 TNF 结合部位是 CRD2 和 CRD3。虽然 CRD1 和 CRD4 不直接参与对 TNF 的识别与结合,而它们的缺失导致与 TNF 的结合能力显著下降。TNFR2 的 676 位 T 突变为 G,使得 CRD4 的 196 位氨基酸改变,由 Met 替换为 Arg,可能会影响 TNF 与 TNFR 相结合的能力。

定点突变是研究基因功能的重要技术之一。它可以有目的的改变 DNA 序列中的碱基,不仅可以阐明基因表达的调控机制,还可研究蛋白质结构与

功能的关系,也可以改变目的蛋白的氨基酸,使之符合研究者的要求。最常用的是用 PCR 技术进行定点突变,其原理是利用导入变异点的引物进行 PCR 反应,对 PCR 产物进行末端平滑化及 5'磷酸化处理,再用高效连接试剂 Ligation Solution I 进行自身连接(环化反应),然后转化、提取突变体 DNA。这种方法成功率高,操作简单,经济,是一种进行定点突变的有效的方法。

大量的研究和综述资料总结出 TNFR 信号传导通路主要包括 Caspase 家族介导的细胞凋亡、衔接蛋白 TRAF 介导的转录因子 NF-κB 和 JNK 蛋白激酶的活化。信号传导通路之间及各通路内部含有各种调节机制,使 TNF 的各种生物学功能协调发挥出来。TNF 由保守胞内结合域如 DD 死亡结构域,通过同型/异型受体相互作用蛋白调节胞内信号转导^[8]。TNFR2 虽不具有 DD 结构域,不能通过 DD 直接激活细胞凋亡的机制,但有结合 TRAF 的基序, TNFR2 与 TRAF 结合形成复合体激活 NF-κB 和 JNK 激酶,诱导基因转录,促进细胞存活、增殖和分化。Till 等^[8]将 TNFR2 的 Met 替换为 Arg,突变体 TNFR2 招募 TRAF2 的能力以及诱导依赖 NF-κB 的基因如 cIAP 表达大幅减少,引起不同程度的慢性炎症机能紊乱。

为进一步研究不同单倍型对 TNFR2 基因表达及功能的影响,我们通过定点突变的方法扩增了 TNFR2 基因 +90 至 +1475 基因全长,并对 676 位点进行了定点突变,构建了含有两种不同单倍型的 pcDNA6.0 重组质粒。这两种单倍型重组质粒除了突变的位点外,其余序列完全一致,因此,实验结果能够反映这个单核苷酸多态性位点对基因功能的影响。我们利用 pcDNA6.0 质粒上的多克隆位点,将扩增的 TNFR2 基因片段插入 pcDNA6.0 线性质

粒中,构建出 pcDNA6.0-TNFR2 真核细胞表达质粒。通过酶切及测序证实重组 pcDNA6.0-TNFR2^{196Met}、pcDNA6.0-TNFR2^{196Arg}构建成功,利用其所携带的菌素抗性基因构建过表达的稳定细胞株,为进一步研究 TNFR2 在心血管疾病治疗中的作用提供了良好的实验基础。本研究显示 RT-PCR、Western blot 检测 cIAP₁、cIAP₂、p-JNK、NF-κB 指标在突变体组中表达下调,再次证实了 TNFR2 突变体使抗凋亡和炎症因子减少,导致慢性炎症发展过程。

[参考文献]

[1] Hijdra D, Vorselaars AD, Grutters JC, et al. Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes[J]. J Inflamm (Lond), 2012, 9 (1): 38.

[2] Bialas M, Fiszler D, Rozwadowska N, et al. The role of IL-6, IL-10, TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis [J]. Am J Reprod Immunol, 2009, 62 (1): 51-59.

[3] 任俊峰, 李俊男, 苏锐, 等. TNFRSF1B 基因 6 号外显子 rs1061624 多态性与冠心病的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (9): 718-721.

[4] 阳巍, 廖端芳, 廖勤慧. 姜黄素抗动脉粥样硬化研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32 (1): 55-58.

[5] 鲍溪荷, 叶山东. 炎症与糖尿病肾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 04: 325-329.

[6] 李锐, 邱健, 赵树进, 等. 细胞色素氧化酶 P450 2C9 基因多态性与冠心病及血脂水平的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (5): 395-398.

[7] 丘创华, 侯敢, 黄迪南. TNF-α 信号传导通路的分子机理[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23 (6): 430-435.

[8] Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, et al. The Met-196 →Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (7): 5 994-6 004.

(此文编辑 文玉珊)