中国科学 (C 辑)
第 30 卷 第 4 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 2000 年 8 月

一种核不均一核糖核蛋白 M4 缺失突变体的克隆*

黄 欣 赵忠良 袁正隆 张明徽 朱学军 陈国友 曹雪涛**
(第二军医大学免疫学教研室, 上海 200433)

摘要 利用减法杂交技术筛选人树突状细胞(DC)经抗原刺激后特异表达的基因, 成功地获得了十多个特异表达基因, 其中包括一种核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)M4 第 159~197 位氨基酸缺失的新基因. 对部分肿瘤细胞系及原代培养细胞进行 RT-PCR 检测发现, 它的表达与 hnRNP M4 基因是一致的, 同时证实了该基因表达于经 KLH 刺激后的 DC 而非正常的 DC. 组织分布分析显示, 该基因高表达于脾脏、外周血淋巴细胞、肺和肝脏. 另外, 通过多种细胞因子刺激的骨髓基质细胞(bone marrow-derived stromal cells, BMSC)也表达这两种分子, 但 TNF-α处理后 mRNA 的表达消失. 这一发现增加了对 DC 在抗原提呈过程中基因表达变化的认识, 为 hnRNP 家族增添了新成员.

关键词 树突状细胞 减法杂交 基因克隆 核不均一核糖核蛋白 缺失突变体

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前发现的机体内功能最强的抗原提呈细胞, 抗原提呈是免疫应答重要的中心环节, 是免疫学的中心问题之一. 从 DC 中发现新基因, 既能加深对抗原提呈机制的认识, 推动免疫学的发展, 同时还是人类基因组计划的组成部分, 是基础医学研究的重要内容[1, 2]. 本研究利用减法杂交筛选 DC 经抗原刺激后特异表达的基因, 发现了一种与核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)M4 基因高度同源但缺失其第 159~197 位氨基酸残基的缺失突变体.

1 材料与方法

1.1 细胞的制备与培养

人 DC 及 KLH 抗原刺激人 DC 的制备参照 Gluckman 等人[3]的方法进行, 基本步骤如下[4]: 新鲜成人外周血经淋巴细胞分离液(r = 1.077, Sigma)分离后, 取交界层细胞, 以 5×10^6 细胞/mL 的密度置于 35 mm 的培养皿中, 用 RPMI-1640 完全培养基 (Gibco) 培养 2 h, 轻轻晃动培养皿, 弃去悬浮的细胞, 在含 rhGM-CSF (800 U/mL, Sigma) 和 rhIL-4 (500 U/mL, Sigma)的 RPMI-1640 完全培养基中继续培养 5 d, 弃去紧密的贴壁细胞, 收集悬浮细胞继续培养 1~2 d,

1999-06-23 收稿, 2000-01-19 收修改稿
* 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39730420)和国家杰出青年科学基金资助项目(批准号: 39825123)
** 联系人(E-mail:caoxt@public3.sta.net.cn)

即为 DC, 流式细胞仪检测 $CD1a^+$, $CD83^+$, $HLA\text{-}DR^+$细胞占 90%以上. 将此 DC 在含有 KLH (50 μg/mL, Sigma) 的培养基中继续培养 24 h, 作为抗原刺激后的目的细胞.

人骨髓来源的基质细胞(BMSC)按下述方法制备: 新鲜成人骨髓经淋巴细胞分离液(r = 1.077, Sigma)分离后, 取交界层细胞, 以 5×10^5 细胞/mL 的密度置于 35 mm 的培养皿中, 用 RPMI-1640 完全培养基培养 2 周, 然后在 10%胎牛血清的 RPMI-1640 中体外长期培养 1 个月获得贴壁细胞即为骨髓基质细胞. 用 LPS (Sigma), KLH (Sigma), 钙离子通道阻断剂 A23187 (Sigma), TNF-α (Sigma) 等作不同的处理.

HeLa 细胞、人肝癌细胞株 SMMC-7721 和人白血病细胞株 KG1 由本室常规传代培养.

1.2　基因的克隆

hnRNP M4 缺失突变基因是在利用减法杂交技术筛选抗原刺激后人树突状细胞特异表达基因的过程中发现的, 详细技术方法见另文报道[5].

1.3　hnRNP M4 蛋白的结构分析

利用 ANTHEPROT 4.3 对 hnRNP M4 蛋白进行蛋白质基本性质的分析.

1.4　hnRNP M4 基因及其缺失突变体表达的 PCR 检测

细胞总 RNA 的提取采用 TRIZOL 法, 以 oligo-dT 引导反转录成 cDNA 后 PCR 检测基因的表达. PCR 引物序列如下: 上链引物, 5′ GCTGCGGAAGTCCTAAACAAG;下链引物, 5′ -AACAGTGCCTATTCCACGACT . PCR 条件: 200 μmol/L dNTP, PCR 上链引物 1 μL (10 μmol/L), 下链引物 1 μL(10 μmol/L), 1 μL 反转录模板, 50 μL 反应体积. PCR 参数为: 95℃, 20 s, 57℃, 30 s, 72℃, 30 s, 30 个循环.

1.5　hnRNP M4 基因及其突变体的 Northern 检测

以 cDNA 为模板, 随机引物标记法标记探针. 杂交按 MTN blots (Clontech)说明操作. 基本步骤如下: 68℃预热杂交液, 每 100 cm^2 杂交膜加入 5 mL 杂交液及终浓度为 100 μg/mL 变性/打断的鱼精 DNA, 68℃预杂交 30 min; 弃去预杂交液, 加入等体积的含 1.5×10^6 cpm/mL 标记探针的杂交液, 68℃杂交 1 h; 用 2×SSC, 0.05% SDS 室温下洗 3 遍, 10 min/次; 0.1×SSC, 0.1% SDS 50℃洗 10 min. –70℃放射自显影 1 d.

2　结果

2.1　减法杂交筛选 DC 经抗原刺激后特异表达的基因

该减法杂交技术能有效地筛选特异表达于抗原刺激后 DC 中的基因, 在随机测得的 180 个克隆中, 特异表达的克隆在 50%以上, 其中新的基因片段有 31 个, 有一个是与 hnRNP M4 蛋白高度同源但缺失其第 159~197 位氨基酸残基的缺失突变体, 该基因已登录至 GenBank (AF061832).

2.2　hnRNP M4 基因缺失体与 hnRNP M4 基因蛋白质的比较分析

hnRNP M4 基因缺失体全长 2 453 bp, 编码区 231~2 306, 编码氨基酸残基 691 个, 其推导的氨基酸序列与 hnRNP M4 的报道序列比较结果如图 1 所示. 从推导的氨基酸序列来看, 该蛋白质与 M4 蛋白除缺失部分外基本一致, 尚存在一处差异, 这种现象可能为人种间的差异. 缺失部分为第 159~197 位氨基酸残基, 共 39 个氨基酸残基, 117 个碱基. 比较 hnRNP M4 基因及缺失突变体的蛋白质结构特征(图 2), 缺失的部分可能位于 hnRNP M4 蛋白与膜结合的部

```
  1 MAAGVEAAAEVAATTEIKMEEESGAPGVPSGNGASGPKGEGERPAQNEKRKEKNIKRGGN 60
    ********************************* **************** ********
  1 MAAGVEAAAEVAATTEIKMEEESGAPGVPSGNGAPGPKGEGERPAQNEKRKVKNIKRGGN 60

 61 RFEPYANPTKRYRAFITNIPFDVKWQSLKDLVKEKVGEVTYVELLMDAEGKSRGCAVVEF 120
    ************************************************************
 61 RFEPYANPTKRYRAFITNIPFDVKWQSLKDLVKEKVGEVTYVELLMDAEGKSRGCAVVEF 120

121 KMEEESMKKAAEVLNKHSLSGRPLKVKEDPDGECARRAMQ 158
    ********************************* ******
121 KMEEESMKKAAEVLNKHSLSGRPLKVKEDPDGEHARRAMQ 158

    --------------------------------------
    --------------------------------------
159 VMATTGGMGMGPGGPGMITIPPSILNNPNIPNEIIHALQ 197

159 KAGRLGSTVFVANLDYKVGWKKLKEVFSMAGVVVRADILEDKDGKSRGIGTVTFEQSIEA 218
    ************************************************************
198 KAGRLGSTVFVANLDYKVGWKKLKEVFSMAGVVVRADILEDKDGKSRGIGTVTFEQSIEA 257

219 VQAISMFNGQLLFDRPMHVKMDERALPKGDFFPPERPQQLPHGLGGIGMGLGPGGQPIDA 278
    ************************************************************
258 VQAISMFNGQLLFDRPMHVKMDERALPKGDFFPPERPQQLPHGLGGIGMGLGPGGQPIDA 317

279 NHLNKGIGMGNIGPAGMGMEGIGFGINKMGGMEGPFGGGMENMGRFGSGMNMGRINEILS 338
    ************************************************************
318 NHLNKGIGMGNIGPAGMGMEGIGFGINKMGGMEGPFGGGMENMGRFGSGMNMGRINEILS 377

339 NALKRGEIIAKQGGGGGGGSVPGIERMGPGIDRLGGAGMERMGAGLGHGMDRVGSEIERM 398
    ************************************************************
378 NALKRGEIIAKQGGGGGGGSVPGIERMGPGIDRLGGAGMERMGAGLGHGMDRVGSEIERM 437

399 GLVMDRMGSVERMGSGIERMGPLGLDHMASSIERMGQTMERIGSGVERMGAGMGFGLERM 458
    ************************************************************
438 GLVMDRMGSVERMGSGIERMGPLGLDHMASSIERMGQTMERIGSGVERMGAGMGFGLERM 497

459 AAPIDRVGQTIERMGSGVERMGPAIERMGPSMERMVPAGMGAGLERMGPVMDRMATGLER 518
    ************************************************************
498 AAPIDRVGQTIERMGSGVERMGPAIERMGPSMERMVPAGMGAGLERMGPVMDRMATGLER 557

519 MGANNLERMGLERMGANSLERMGLERMGANSLERMGPAMGPALGAGIERMGLAMGGGGGA 578
    ************************************************************
558 MGANNLERMGLERMGANSLERMGLERMGANSLERMGPAMGPALGAGIERMGLAMGGGGGA 617

579 SFDRAIEMERGNFGGSFAGSFGGAGGHAPGVARKACQIFVRNLPFDFTWKMLKDKFNECG 638
    ************************************************************
618 SFDRAIEMERGNFGGSFAGSFGGAGGHAPGVARKACQIFVRNLPFDFTWKMLKDKFNECG 677

639 HVLYADIKMENGKSKGCGVVKFESPEVAERACRMMNGMKLSGREIDVRIDRNA# 691
    ****************************************************
678 HVLYADIKMENGKSKGCGVVKFESPEVAERACRMMNGMKLSGREIDVRIDRNA#730
```

图 1 hnRNP M4 缺失突变体与 hnRNP M4 蛋白的序列比较

上端链为 hnRNP M4 缺失突变体，缺失部分为第 159~197 位氨基酸残基，星号代表相同的氨基酸残基；下端链为 hnRNP M4 蛋白序列；双下划线代表检测引物

位. 该缺失突变体在 GenBank 进行蛋白质的同源性搜索发现，在 hnRNP M4 蛋白 198 位以后和 N-乙酰葡萄糖胺特异受体 1 (Accession NP-005959.1)(198~388, 99%)同源，而 198 位以前的 N 端序列变化很大，提示 M4 蛋白 198 位可能是两个功能域的交界点. 此外，新近克隆的 M 基因

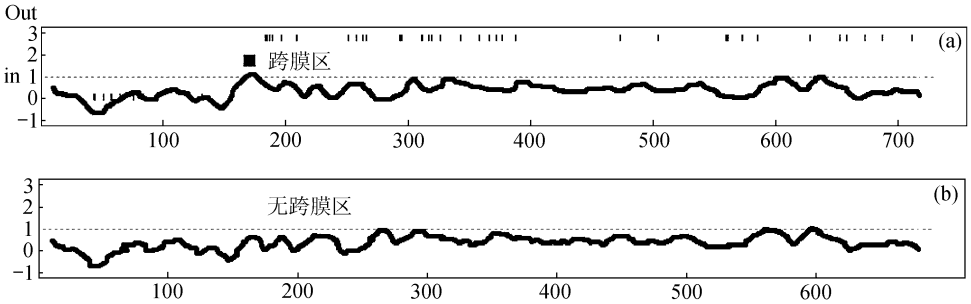

图 2　hnRNPM4 缺失突变体与 hnRNPM4 基因跨膜结构域的分析

(a) 为 hnRNPM4 基因; (b)为 hnRNPM4 缺失突变体

在 N 端与 M4 也发现有 11 个氨基酸(24~34)的差别[6]. N 端序列的这种变化可能具有很重要的意义.

2.3　hnRNP M4 基因缺失突变体的初步验证及其在 DC 中的表达

为验证该缺失突变体是客观存在还是克隆中产生的错误, 在缺失部位上下游设计了一对 PCR 引物进行 PCR 检测. 预计缺失突变体的 PCR 片段长度为 249 bp, hnRNP M4 基因的 PCR 片段长度为 366 bp. 结果如图 3 所示, 缺失突变体与 hnRNP M4 共同存在于细胞中, 说明该缺失突变体不是在克隆过程中产生的错误, 可能就是 hnRNP M 蛋白之一. PCR 显示该缺失突变体特异表达于经抗原刺激后的 DC 中, 点杂交显示同样的结果(资料未显示).

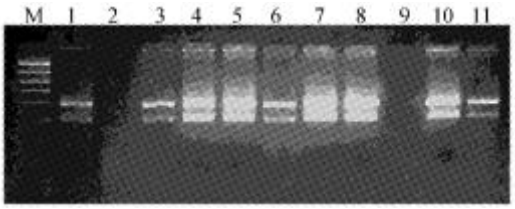

图 3　hnRNP M4 基因及其缺失突变体在细胞中表达的 PCR 检测

M 为 DNA 分子量标准; 1 为 HeLa; 2 为 DC; 3 为 DC+KLH; 4 为 KG1; 5 为胎肝 cDNA; 6 为 BMSC; 7 为 BMSC+LPS; 8 为 BMSC+IL-4; 9 为 BMSC+TNF-α; 10 为 BMSC+GM-CSF; 11 为 BMSC+A23187+IL-4

2.4　hnRNP M4 及其缺失突变体在不同状态骨髓基质细胞中表达的 PCR 检测

为了进一步探讨 hnRNP M4 基因及其缺失突变体与细胞状态发生改变的相关性, 初步观察了它们在不同状态 BMSC 及部分肿瘤细胞的表达情况, 结果如图 3 所示, hnRNP M4 基因及其缺失突变体表达于所有被检测的肿瘤细胞系和除了经 TNF 刺激外的各种 BMSC 中.

2.5　hnRNP M4 缺失突变体的组织分布分析

hnRNP M4 的组织分布 Northern 分析如图 4 所示, mRNA 转录本长约 2.4 kb, 高度表达于脾脏、外周血淋巴细胞、肺和肝脏; 中度表达于前列腺、小肠和大肠中; 在心、脑、胎盘、骨骼肌、肾、胰腺、胸腺、睾丸、卵巢中有少量的表达.

3　讨论

DC 是至今所发现的功能最强的抗原提呈细胞. 早期研究 DC 时, 由于对其来源、发育及分化等方面缺乏了解, 所以得不到足够的细胞进行深入的生物学研究. 在体外应用大量细胞因子扩增 DC 成功以后, 再加上生物技术的迅速发展, 对 DC 的研究深入开展到多个方面, 促

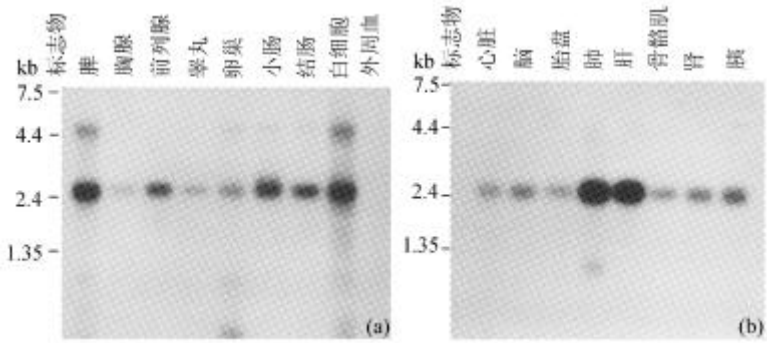

图 4 hnRNP M4 缺失突变体的组织分布分析

进了对抗原提呈乃至免疫学的认识. 其中从 DC 克隆新的基因是从分子机制理解抗原提呈功能的途径之一, 近期有多个与免疫功能相关的分子从 DC 中发现[7~9].

减法杂交是目前克隆组织细胞特异表达基因最有效的方法, 其效率又受到具体实验方法中的实验材料和分离手段的限制[10]. 本室以减法杂交为基础建立了一种高效筛选组织细胞中特异表达基因的方法[5], 对抗原刺激前后的 DC 进行特异表达基因的筛选, 结果在随机测得的 180 个克隆中, 特异表达的克隆在 50%以上, 其中新的基因片段有 31 个.

在全长基因中有一个是与 hnRNP M4 基因高度同源但缺失了第 159~197 位氨基酸残基的新分子, 暂称之为 hnRNP M4 缺失突变体. 由于在克隆的过程中经过了多次 PCR 扩增, 所以很有可能该分子是一种酶反应错误, 为此对多种细胞来源的 mRNA 进行 RT-PCR 检测, 结果证实了体内存在这种分子, 并且这种分子与 hnRNP M4 分子共同表达于细胞中.

真核细胞 mRNA 的加工成熟是通过与众多蛋白质组装形成核糖核蛋白颗粒来完成的, 这些蛋白质统称为 hnRNP, 目前已发现有 20 多种 hnRNP. 关于 hnRNP 的功能及作用机理目前并不完全清楚, 但有很多研究揭示它参与了 mRNA 的剪接、运输, 甚至是 mRNA 的转录调控过程[11]. hnRNP M 于 1993 年被报道[12], 其本身就存在多种蛋白质, 包括 M1, M2, M3 和 M4, 具有 RNA 结合蛋白的特征. 后又有证实利用抗 hnRNP M 的单克隆抗体可以阻止 mRNA 的剪接, 说明它是一个很重要的 hnRNP[6]. 本实验中所发现的这一新分子很可能就是 hnRNP 中的新成员.

此外, 在对细胞因子及其他生物活性分子所处理的 BMSC 的 RT-PCR 检测中发现 TNF 会导致 hnRNP M4 及其缺失突变体的不表达, 提示该 hnRNP M4 缺失突变体可能涉及细胞活化增殖状态相关的 mRNA 加工、运输和转录调控. 至于某类 hnRNP 的存在是否与特定基因的表达有关, 即不同 mRNA 的加工和运输是否需要特定的 hnRNP, 从目前对 20 多种 hnRNP 的研究结果来看, 存在着相对特异性. 本实验所观察到的现象初步证实这一分子的表达与细胞发挥功能这一过程相关. 对于抗原提呈过程中细胞表达基因的变化目前还了解得很少, 发现这一过程中出现表达或增高表达的基因是认识抗原提呈机制的基本途径之一.

参 考 文 献

1 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展. 中国免疫学杂志, 1998, 14(3): 161~168

2 曹雪涛. 树突状细胞的研究热点及其与疾病的防治. 中华医学杂志, 1999, 79(3): 163~165
3 Gluckman J C, Canque B, Chapuis F, et al. *In vitro* generation of human dendritic cells and cell therapy. Cytokines Cell Mol Ther, 1997, 3(3):187~196
4 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 等. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(4): 302~306
5 Zhao Z, Huang X, Li N, et al. Direct cloning of cell differential expression genes with full-length by a new strategy based on the multiple rounds of “long distance” PCR and magnetic beads mediated subtraction. J Biotech, 1999, 73: 35~41
6 Gattoni R, Mahe D, Mahl P, et al. The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. Nucleic Acids Res, 1996, 24(13): 2 535~2 542
7 Bates E E, Dieu M C, Ravel O, et al. CD40L activation of dendritic cells down-regulates DORA, a novel member of the immunoglobulin superfamily. Mol Immunol, 1998, 35(9): 513~524
8 de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class Ⅱ compartment. Immunity, 1998, 9(3): 325~336
9 Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, et al. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. J Exp Med, 1998, 188(3): 451~463
10 Sagerstrom C G, Sun B I, Sive H L. Subtractive cloning: past, present, and future. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 751~783
11 Dreyfuss G, Matunis M J, Pinol-Roma S, et al. HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annu Rev Biochem, 1993, 62: 289~321
12 Datar K V, Dreyfuss G, Swanson M S. The human hnRNP M proteins: identification of a methionine-arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. Nucleic Acids Res, 1993, 21(3): 439~446