

Tim-1 基因促进 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 表达上调

张毅, 张一彤, 韩雪, 祁赞梅

中国医科大学基础医学院免疫学教研室, 辽宁 沈阳 110001

摘要: **目的** 通过在猪肾小管上皮细胞(LLC-PK1)中过表达 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 1(Tim-1),研究 Tim-1 基因过表达对 LLC-PK1 细胞中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的影响及 Tim-1 单克隆抗体(RMT1-4)对 LLC-PK1 细胞的作用。**方法** 构建 Tim-1 基因慢病毒表达载体,包装慢病毒并构建过表达 Tim-1 基因的 LLC-PK1 细胞系。流式细胞术检测转染效率及 Tim-1 蛋白表达。实时定量 PCR 检测过表达 Tim-1 的 LLC-PK1 细胞在 Tim-1 抗体刺激前后 MCP-1 mRNA 相对表达量。**结果** Tim-1 基因过表达慢病毒载体构建及包装成功;过表达 Tim-1 基因的 LLC-PK1 系构建成功;过表达 Tim-1 的 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 表达显著上调($P < 0.01$),Tim-1 抗体(RMT1-4)能显著上调 Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 mRNA 表达水平($P < 0.01$)。**结论** Tim-1 基因过表达能促进 LLC-PK1 中 MCP-1 表达上调。Tim-1 抗体能促进 Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞中趋化因子 MCP-1 的产生。

关键词: T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 1; 单核细胞趋化蛋白 1; 猪肾小管上皮细胞; 慢病毒

中图分类号: R 392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)11-1480-04

Tim-1 gene promoting up-regulation of MCP-1 expression in LLC-PK1 cells

ZHANG Yi, ZHANG Yi-tong, HAN Xue, QI Zan-mei

Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China

Corresponding author: QI Zan-mei, E-mail: zmqi@cmu.edu.cn

Abstract: Objective By overexpressing T cell immunoglobulin and mucin domain 1(Tim-1) in porcine renal tubular epithelial cells (LLC-PK1), to study the effects of Tim-1 overexpression on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in LLC-PK1 cells and the effects of Tim-1 monoclonal antibody (RMT1-4) on LLC-PK1 cells. **Methods** Constructing lentivirus expression vector of Tim-1 gene, the lentivirus were packaged, and the LLC-PK1 cell lines with overexpressing of Tim-1 were constructed. The flow cytometry was used to detect transfection efficiency and expression of Tim-1 protein. Real-time PCR was used to detect the relative expression of MCP-1 mRNA in LLC-PK1 cells with overexpression of Tim-1 before and after Tim-1 antibody stimulation. **Results** The lentivirus vector over-expressing Tim-1 was successfully constructed and packaged. LLC-PK1 cell lines with Tim-1 overexpression were successfully established. MCP-1 expression was significantly up-regulated in LLC-PK1 cells overexpressing Tim-1 ($P < 0.01$), and Tim-1 antibody (RMT1-4) could significantly up-regulate MCP-1 mRNA expression in LLC-PK1 cells with Tim-1 positive expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Tim-1 overexpression can up-regulate the expression of MCP-1 in LLC-PK1 cells. Tim-1 antibody can promote the production of MCP-1 in LLC-PK1 cells with Tim-1 overexpression.

Key words: T cell immunoglobulin and domain mucin 1; Monocyte chemoattractant protein-1; Porcine renal tubular epithelial cells; Lentivirus

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子(T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein, Tim) 家族是 2001 年由 McIntire 等^[1]通过基因定位克隆技术发现的一个新的基因家族, Tim-1 是该家族中第一个被发现的成员,也称为甲型肝炎病毒细胞受体 1 (hepatitis A virus receptor1, HAVCR-1) 和肾损伤因子 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1)。与 Tim 其他成员一样, Tim-1 编码 I 型膜蛋白, 包括一个 N 端富含半

胱氨酸的免疫球蛋白 V 区(IgV)结构域、黏蛋白样结构域、跨膜区和有磷酸化位点的胞质区。Tim-1 主要表达在激活的 CD4⁺T 细胞表面,尤其在 Th2 型细胞表面有高水平的表达^[2]。此外,在肥大细胞、Th1 细胞、Th17 细胞^[3]、CD19⁺调节性 B 细胞^[4]、树突状细胞^[5]等抗原递呈细胞以及自然杀伤细胞^[6]中也有少量或低水平的 Tim-1 的表达。Tim-1 在正常肾脏不表达或低表达,但在肾缺血或急性肾损伤后, Tim-1 也

表达于肾小管上皮细胞^[7]。血清中的 Tim-1 可预测健康中年人未来肾小球滤过率的下降和慢性肾病的风险^[8],也可预测糖尿病肾病肾功能的下降^[9],并可作为检测早期肾癌的标志物^[10]。实验证明尿 Tim-1 与肿瘤组织中的 Tim-1 表达显著相关,并且是肾透明细胞癌诊断的高敏感标志物^[11]。尿 Tim-1 水平还能作为造影剂肾病早期诊断提供依据^[12]。但 Tim-1 的表达对肾小管上皮细胞分泌趋化因子的影响尚不清楚。本实验拟构建带有小鼠 Tim-1 基因的慢病毒表达载体,通过在猪肾小管上皮细胞(LLC-PK1)中过表达 Tim-1 基因,研究 Tim-1 基因过表达对 LLC-PK1 细胞中单核细胞趋化因子 1(MCP-1)的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

P23-pHAGE-fEF1a-IRES-ZsGreen 慢病毒载体(目的基因和绿色荧光蛋白 ZsGreen 表达于同一载体),人肾上皮细胞系 293T 细胞、LLC-PK1 细胞系,嘌呤霉素(Solarbio 公司),DMEM(HyClone 公司),FBS(Solarbio 公司),0.25% Trypsin-EDTA(gibco 公司),RNAiso Plus(TAKARA 公司),Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TAKARA 公司),TB Green™ Premix Ex Taq™ II(TAKARA 公司),抗 Tim-1-BV421 单克隆抗体(RMT1-4, BD Biosciences),Tim-1 单克隆抗体(RMT1-4, eBioscience),PCR 仪(S1000 Thermal Cycler, 美国 BIO-RAD),Real-time PCR 仪(7500, 美国 Applied Biosystems),流式细胞仪(FACS-Celesta, 美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Tim-1 目的基因扩增及慢病毒表达载体构建

PCR 扩增目的基因 Tim-1,扩增引物 Tim-1F: CAT GGC GGC CGC ATG AAT CAG ATT CAA GTC TTC, Tim-1R: CAT GGG ATC CTC AAG GTC TAT CTT CAA CAA T。扩增产物回收,NotI 和 BamHI 酶切,连接到 P23-pHAGE-fEF1a-IRES-ZsGreen 慢病毒载体上,转化大肠杆菌 stbl3,涂布 Amp 平板,37 °C 过夜培养至转化子长出,挑取转化子,进行 PCR 菌检。菌检引物 fEF1a-F: CTC AAG CCT CAG ACA GTG GTT, IRES-R: CAA ACG CAC ACC GGC CTT ATT C。

1.2.2 慢病毒包装

接种 293T 细胞至 150 mm 培养皿中,过夜培养至细胞密度 70%,准备转染:按照慢病毒质粒(15 μg)、pSPAX2(5 μg)、pMD2.G(5 μg)的比例转染 293T 细胞,转染 12~18 h 后换液,移除旧的培养基,加 30 ml 新的完全培养基 36 h 后,收病毒上清 1,再加入 20 ml 完全培养基,24 h 后收集病毒上清 2,合并病毒上清 1 和 2,4 °C 1 000 rpm

离心 5 min,去除细胞碎片;0.45 μm 滤膜过滤,进一步去除细胞碎片;然后上清 12 000 rpm,4 °C 超速离心 2 h,收集病毒沉淀(DMEM 溶解)。

1.2.3 慢病毒滴度测定

通过慢病毒载体的长末端重复序列区(LTR)设计定量引物,利用实时定量 PCR 检测慢病毒中 LTR 的拷贝数来确定病毒滴度。PCR 引物 LTR-F: GGT TAG ACC AGA TCT GAG CCT, LTR-R: GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA C。

1.2.4 慢病毒转染 LLC-PK1 细胞系

细胞接种 6 孔板,每孔接种 1×10^5 LLC-PK1 细胞,过夜培养至细胞密度 50% 左右,换液,并加入慢病毒[按照感染指数(感染时病毒和细胞数量的比值,MOI) = 10 来感染],24 h 后更换培养基,消化细胞,铺 6 孔板,并加入 1 μg/ml 嘌呤霉素筛选 7~10 d,培养板上标注单个克隆,并用浸泡过胰酶消化液的滤纸覆盖单克隆,消化,将消化下来的细胞转移到 96 孔板,加入 1 μg/ml 嘌呤霉素筛选,逐渐扩大培养(96 孔—24 孔—6 孔—100 mm 培养皿),荧光检测,保种。

1.2.5 流式细胞术检测转染效率及目的基因表达

将转染 Tim-1 慢病毒组、空病毒组和阴性对照组 LLC-PK1 细胞,用适量消化液消化后用 PBS + 2% FBS 重悬并计数,每个流式管流式洗液定量 100 μl PBS + 2% FBS,每管含有 1×10^6 个细胞,加入 Fcγ III/II 封闭抗体冰上孵育 20 min;每个样品加入说明书剂量的抗 Tim-1 抗体,冰上孵育 30 min;每管加入 1 ml PBS + 2% FBS,重悬细胞,4 °C 1 200 rpm,离心 5 min,洗涤两次;弃掉上清,加入 300 μl PBS + 2% FBS 重悬细胞,进行流式细胞术检测。目的基因 Tim-1 及绿色荧光蛋白 ZsGreen 表达于同一载体上,通过检测绿色荧光蛋白表达确认转染效率。

1.2.6 Tim-1 过表达 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 的检测

将空病毒组及过表达 Tim-1 的 LLC-PK1 细胞按 5×10^5 细胞铺板(6 孔板),加入 Tim-1 抗体(RMT1-4)5 μg/ml 孵育 24 h 后提取细胞总 mRNA。将 mRNA 反转录为 cDNA,实时定量 PCR 检测 MCP-1 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	正向 5'-CAC TGG TGT CTT CAC GAC-3'
	反向 5'-GGT TCA CGC CCA TCA CAA-3'
MCP-1	正向 5'-TCT CCA GTC ACC TGC TGC TA-3'
	反向 5'-AGG CTT CGG AGT TTG GTT TT-3'

1.3 统计学方法

使用 Prism 7.0 软件对数据进行分析。采用方差分析和 Bonferroni 校正法进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 Tim-1 慢病毒表达载体 目的基因 PCR 扩增结果经琼脂糖凝胶电泳后显示,扩增目的片段大小与已知 Tim-1 (849 bp) 大小相符合(图 1)。挑取 4 个转化子进行 PCR 菌检,结果显示检测到 4 个阳性转化子(图 2)。

2.2 慢病毒滴度测定 实时定量 PCR 检测结果: 1.09×10^{10} copies/ml (注:实时定量 PCR 法检测到的病毒拷贝数目包含所有病毒,实际有活力的病毒颗粒占 1%)。病毒的有效滴度为 1.09×10^8 TU/ml。

2.3 流式细胞术检测 LLC-PK1 细胞的转染效率及

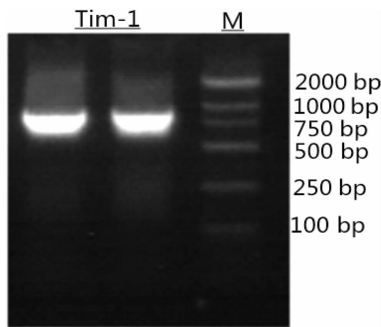


图 1 PCR 扩增目的基因琼脂糖凝胶电泳图

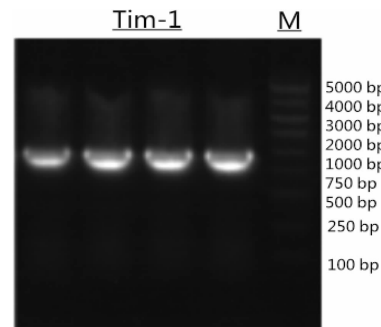
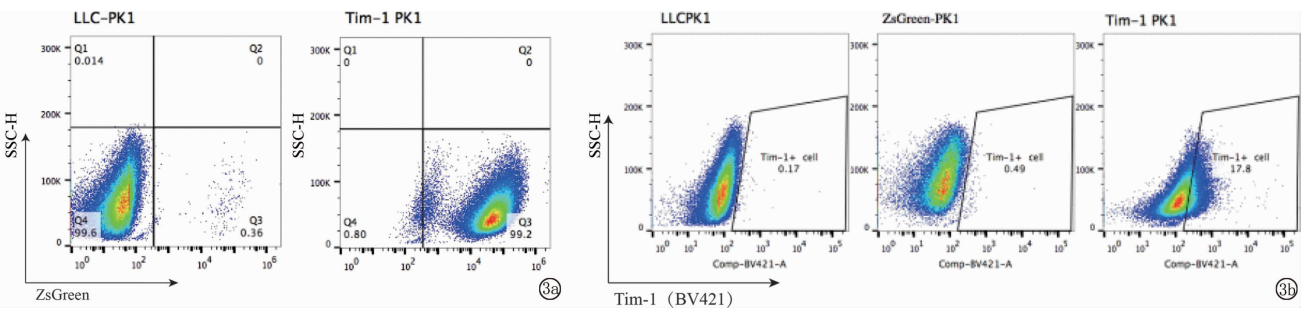
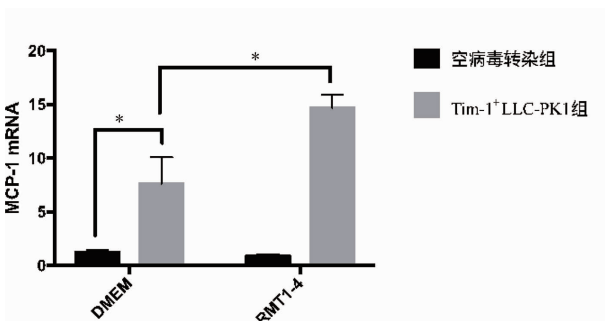


图 2 转化子 PCR 菌检琼脂糖凝胶电泳图



注:LLC-PK1 表示阴性对照组;ZsGreen-PK1 表示空病毒组;Tim-1 PK1 表示转染 Tim-1 慢病毒组。

图 3 慢病毒转染 LLC-PK1 细胞 Tim-1 及绿色荧光蛋白(ZsGREEN)表达的流式细胞术检测图



注:两者间比较, $^*P < 0.01$ 。

图 4 Tim-1 过表达细胞系 MCP-1 相对表达量

3 讨论

基于 Tim-1 在肾损伤后在 LLC-PK1 中的表达, Tim-1 也被称为 KIM-1。本研究结果显示,表达 Tim-1 的 LLC-PK1 MCP-1 表达水平显著上调。有学者指

出, Tim-1 是 LMIR5/CD300b(白细胞单免疫球蛋白样受体 5)的内源性配体,并且 Tim-1 与 LMIR5 特异性结合,可诱导肾缺血/再灌注损伤模型中的炎症细胞聚集与活化,分泌炎症细胞因子引起肾小管损伤,证明 Tim-1 对炎症细胞有明显的趋化作用^[13]。MCP-1 是重要的趋化因子,能特异性激活和趋化单核/巨噬细胞,加重炎症反应,有研究显示,肾脏损伤程度越高 MCP-1 表达水平越高^[14]。因此推测 Tim-1 介导的 MCP-1 表达上调可能与肾损伤时炎症反应有关。

2.4 Tim-1 过表达细胞系 MCP-1 检测结果 实时定量 PCR 结果示, Tim-1 阳性 LLC-PK1 组 MCP-1 mRNA 表达水平显著高于空病毒转染组 ($P < 0.01$)。为评价 Tim-1 抗体对 Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞的作用,用 Tim-1 抗体(RMT1-4)孵育过表达 Tim-1 的 LLC-PK1 细胞,24 h 后检测 MCP-1 mRNA 表达水平。Tim-1 抗体能上调 Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。见图 4。

出, Tim-1 是 LMIR5/CD300b(白细胞单免疫球蛋白样受体 5)的内源性配体,并且 Tim-1 与 LMIR5 特异性结合,可诱导肾缺血/再灌注损伤模型中的炎症细胞聚集与活化,分泌炎症细胞因子引起肾小管损伤,证明 Tim-1 对炎症细胞有明显的趋化作用^[13]。MCP-1 是重要的趋化因子,能特异性激活和趋化单核/巨噬细胞,加重炎症反应,有研究显示,肾脏损伤程度越高 MCP-1 表达水平越高^[14]。因此推测 Tim-1 介导的 MCP-1 表达上调可能与肾损伤时炎症反应有关。

Tim-1 单克隆抗体可以调节 Tim-1 活性,在不同的免疫反应中作用不同。抗 Tim-1 单克隆抗体对 T 细胞功能的影响取决于特定的抗体结合表位和亲和力。结合 Tim-1 IgV 结构域的抗 Tim-1 单克隆抗体 4A2.2 对 Th2 型反应具有拮抗作用,而与 Tim-1 的黏蛋白结构域结合的另一种抗 Tim-1 单克隆抗体

1H8.2 传递激动信号,导致炎性细胞浸润,Th2 细胞因子明显增多^[15]。另一研究表明,高亲和力抗 Tim-1 单克隆抗体增加了抗原特异性 T 细胞 IFN- γ 和白细胞介素(IL)-17 的产生,而低亲和力抗体抑制抗原特异性 T 细胞的产生和这些细胞因子的产生^[16]。而抗 Tim-1 单克隆抗体对 LLC-PK1 中细胞因子产生的影响尚不清楚。本实验显示,在抗 Tim-1 单克隆抗体(RMT1-4)刺激下,Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞中 MCP-1 表达水平显著上调。RMT1-4 曾被证明对 Tim-1 具有较大的亲和力,并且在 TCR 作用下,RMT1-4 能刺激 NKT 细胞产生 Th2 细胞因子(IL-4、IL-13)^[17]。

综上所述,Tim-1 基因过表达能促进 LLC-PK1 中 MCP-1 表达上调,RMT1-4 能进一步促进 Tim-1 阳性 LLC-PK1 细胞中趋化因子的产生,而肾损伤时 Tim-1 介导的 LLC-PK1 中信号转导通路有待进一步研究。

参考文献

[1] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(12): 1109 - 1116.

[2] Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(5): 447 - 454.

[3] Cao W, Ryan M, Buckley D, et al. Tim-4 inhibition of T-cell activation and T helper type 17 differentiation requires both the immunoglobulin V and mucin domains and occurs via the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Immunology*, 2011, 133(2): 179 - 189.

[4] 石炳毅,肖漓,高钰,等. Tim-1⁺ CD19⁺ 调节性 B 细胞在肾移植受者外周血的鉴定与功能研究[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(48): 3388 - 3392.

[5] Xiao S, Zhu B, Jin HL, et al. Tim-1 stimulation of dendritic cells regulates the balance between effector and regulatory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(6): 1539 - 1549.

[6] Xiao S, Brooks CR, Zhu C, et al. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,

2012, 109(30): 12105 - 12110.

[7] Ichimura T, Brooks CR, Bonventre JV, et al. Kim-1/Tim-1 and immune cells: shifting sands[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(9): 809 - 811.

[8] Schulz CA, Engström G, Nilsson J, et al. Plasma kidney injury molecule-1 (p-KIM-1) levels and deterioration of kidney function over 16 years[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019. [Epub ahead of print]

[9] Colombo M, Looker HC, Farran B, et al. Serum kidney injury molecule 1 and β 2-microglobulin perform as well as larger biomarker panels for prediction of rapid decline in renal function in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(1): 156 - 168.

[10] Seelo G, Muller DC, Riboli E, et al. KIM-1 as a blood-based marker for early detection of kidney cancer; a prospective nested case-control study[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(22): 5594 - 5601.

[11] Mijuskovic M, Stanojevic I, Milovic N, et al. Tissue and urinary KIM-1 relate to tumor characteristics in patients with clear renal cell carcinoma[J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(1): 63 - 70.

[12] Liao BX, Nian W, Xi AQ, et al. Evaluation of a diagnostic test of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and urine KIM-1 in contrast-induced nephropathy (CIN)[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 565 - 570.

[13] Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, et al. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b; LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(7): 1501 - 1511.

[14] 魏兰,刘立桥,白静,等. MCP-1、TLR-4 及尿蛋白定量与原发 IgA 肾病病理损伤的相关性研究[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(1): 40 - 44.

[15] Sizing ID, Bailly V, McCoon P, et al. Epitope-dependent effect of anti-murine TIM-1 monoclonal antibodies on T cell activity and lung immune responses[J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2007, 178(4): 2249 - 2261.

[16] Xiao S, Najafian N, Reddy J, et al. Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(7): 1691.

[17] Kim HS, Kim HS, Lee CW, et al. T cell ig domain and mucin domain 1 engagement on invariant NKT cells in the presence of TCR stimulation enhances IL-4 production but inhibits IFN- γ production[J]. *J Immunol*, 2010, 184(8): 4095 - 4106.

收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-03-24 编辑:周永彬

(上接第 1479 页)

[10] Silber S, Albertsson P, Avilés FF, et al. Guidelines for percutaneous coronary interventions the task force for percutaneous coronary interventions of the European society of cardiology[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(8): 804 - 847.

[11] Nagata Y, Usuda K, Uchiyama A, et al. Characteristics of the pathological images of coronary artery thrombi according to the infarct-related coronary artery in acute myocardial infarction[J]. *Circ J*, 2004, 68(4): 308 - 314.

[12] Kang S, Yang YJ. Coronary microvascular reperfusion injury and no-

reflow in acute myocardial infarction[J]. *Clin Invest Med*, 2007, 30(3): E133 - E145.

[13] 罗新林,刘强,王丽丽,等. 延期支架置入对高血栓负荷 ST 段抬高急性心肌梗死预后的影响[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2014, 22(11): 697 - 701

[14] Carrick D, Oldroyd KG, McEntegart M, et al. A randomized trial of deferred stenting versus immediate stenting to prevent no-or slow-reflow in acute ST-segment elevation myocardial infarction (DEFERSTEMI)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(20): 2088 - 2098.

收稿日期:2019-02-05 修回日期:2019-03-06 编辑:周永彬