

# 树鼯 IL-2R $\alpha$ (CD25)基因的分离、鉴定及表达分析

邵晓丽<sup>1,2</sup>, 张旭东<sup>1,2</sup>, 张远旭<sup>1</sup>, 张华堂<sup>1</sup>, 何有文<sup>1,3</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所动物模型和人类疾病机理重点实验室, 人类疾病灵长类模型研究海外团队和免疫生物学实验室, 云南昆明 650223;  
2. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027; 3. 杜克大学医学中心免疫学系, 北卡罗来纳州达勒姆市 NC 27710)

**摘要:** CD25 是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的重要标记分子。树鼯是一种重要的人类疾病动物模型, 但是, 树鼯的 CD25 基因还是未知。我们以树鼯脾脏 RNA 为模板, 对树鼯白介素-2 受体基因 alpha 链(tsCD25)进行了 RT-PCR(逆转录-聚合酶链式反应), 获得了一个 816bp 的开放阅读框。TsCD25 cDNA 编码一个由 271 个氨基酸组成的分子量为 30.9 ku 的蛋白多肽。预测的 tsCD25 包含 2 个 Sushi 结构域、2 个 N-糖基化位点和多个 O-糖基化位点。tsCD25 和灵长类 CD25 在氨基酸水平上的同源为 65.3%~66.4%。RT-PCR 检测发现, tsCD25 mRNA 分布于树鼯的外周血、脾脏和肺, 并受 PMA 和 ionomycin 刺激的调节。我们的结果为下一步制备 tsCD25 单克隆抗体, 抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs 功能以及开展有关的研究工作奠定了基础。

**关键词:** 树鼯; CD25; 逆转录-聚合酶链式反应; 组织分布

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A

## Isolation, identification and expression analysis of interleukin 2 receptor alpha chain (CD25) gene in *Tupaia belangeri*

SHAO Xiao-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Xu-dong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuan-xu<sup>1</sup>, ZHANG Hua-tang<sup>1</sup>, HE You-wen<sup>1,3</sup>

(1. Key laboratory of Animal models and Human Disease Mechanisms, the Overseas & Immunobiology Team, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;  
2. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;  
3. Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA)

**Abstract:** CD25 is an important cell surface marker for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) and tree shrew is an animal model used in the study of human viral infections. However, the molecular identity of tree shrew CD25 (tsCD25) remains unclear. We cloned tsCD25 and analyzed its expression pattern. A full-length cDNA of tree shrew interleukin 2 receptor alpha chain(tsCD25) gene was obtained from tree shrew spleen by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). The tsCD25 cDNA contains an ORF of 816 bp, encoding a 30.9 ku of peptide with a predicted 271 amino acids. The mature tsCD25 peptide contains two Sushi domains, two N-linked and multiple O-linked glycosylation sites. The tsCD25 is very similar to those of primates at the amino acid level, ranging from 65.3% to 66.4%. Tissue transcription analysis indicates that tsCD25 mRNA is expressed in peripheral blood, spleen and lung. Lymphocytes expression analysis demonstrates that tsCD25 mRNA is up-regulated by PMA and ionomycin stimulation.

收稿日期:2008-11-11;修回日期:2009-05-26

基金项目:中国科学院“百人计划”和海外创新团队,国家重点基础研究发展(973)计划(2007CB512807)资助。

作者简介:邵晓丽,女,1979年生,硕士。研究方向:乙型肝炎动物模型的建立。E-mail:xlshao@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:何有文,博士/副教授。E-mail:he000004@mc.duke.edu

Our results may provide a basis for future studies such as generating monoclonal antibodies to tsCD25.

**Key words:** tree shrew; CD25; reverse transcription-polymerase chain reaction; tissue distribution

## 0 引言

乙肝已成为严重危害人类健康的重大疾病, 每年约 50 万人死于由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染引起的肝硬化、肝癌<sup>[1]</sup>. HBV 研究一直面临缺少合适的动物模型的问题, 阻碍了其致病机理、药物筛选、疫苗开发等研究的进程<sup>[2]</sup>. 黑猩猩能有效感染 HBV, 因数量稀少、涉及伦理学等难以作为实验动物用于肝炎研究<sup>[3]</sup>. 树鼩 (*Tupaia belangeri*) 是一种小型哺乳动物, 属灵长目、原猴亚目、树鼩科, 分布于东南亚及我国的云南、贵州、广西等地<sup>[4]</sup>. 有价廉易获、易操作、易饲养等优点, 已用于单纯疱疹、轮状病毒、HCV、HBV 等多种人类疾病的研究<sup>[5~8]</sup>.

急性 HBV 患者体内可以发现特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) 和 CD4<sup>+</sup> T 辅助细胞 (Th) 免疫反应, 分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-2 等 I 型细胞因子, 这种特异性 T 细胞反应能在临床恢复后维持多年<sup>[9]</sup>. 慢性 HBV 患者不能有效清除 HBV, 体内存在免疫耐受<sup>[10,11]</sup>. 研究发现 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (Tregs) 在 HBV 感染中可抑制病毒特异性 CD8<sup>+</sup> 效应 T 细胞功能, 在 HBV 免疫耐受中起重要作用<sup>[12,13]</sup>.

IL-2 受体  $\alpha$  链 (CD25) 是 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 重要的表面分子和标志<sup>[14]</sup>. 利用树鼩建立慢性 HBV 感染模型, 以 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 的 CD25 为靶点, 通过抗体抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 的功能, 打破免疫耐受, 可能为慢性 HBV 的发病机理、治疗和防治提供新的研究平台. 我们应用 RT-PCR 技术克隆了树鼩 CD25 (tsCD25) 基因编码区 cDNA 序列, 并进行了相关分析. 我们的研究为下一步制备树鼩的抗 tsCD25 单克隆抗体, 抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 功能以及开展相关的研究工作奠定了基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

树鼩购自昆明动物研究所实验动物中心; DH5 $\alpha$  感受态细胞由实验室自备; pMD19-T 载体、Taq-DNA 聚合酶、dNTPs 购自大连宝生物工程有限公司; 谷氨酰胺、青霉素、链霉素、豆蔻酰佛波醇乙

酯 (PMA)、钙离子载体 (ionomycin) 购自 Sigma; EZ-Sep<sup>TM</sup> 淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司; RNAPrep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、TIANScrip M-MLV 购自天根公司; RevertAid<sup>TM</sup> 第一链 cDNA 合成试剂盒、EcoRI、BamHI 内切酶、引物、RPMI 1640 培养基、血清购自上海生工生物工程有限公司.

### 1.2 脾脏总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

无菌采集脾脏, 迅速冻存于液氮中, 在研钵中研碎, 用 RNAPrep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA. 取 2  $\mu$ g 总 RNA 用 RevertAid<sup>TM</sup> 第一链 cDNA 合成试剂盒以 oligo(dT)<sub>18</sub> 引物合成单链 cDNA.

### 1.3 树鼩 CD25 引物设计

以 GenBank 登陆的人 (NM000417)、小鼠 (NM008367) 和大鼠 (NM013163) 的 CD25 序列为参考, 利用生物软件 Bioedit 进行序列比对, 根据序列的保守特点和引物的特异性, 共分 5' 端和 3' 端两部分对 tsCD25 的编码区进行克隆, 应用 Primer 5.0 设计下列引物: P1 (5'-GAAGATGGAGCCAAAT TTGCTGATCT-3') 和 P2 (5'-CCTCYRTCTVYGY TGCCAGGTGARCCC-3'), P3 (5'-ATCACTTCG TGGTGGGGCAGAC-3') 和 P4 (5'-TTKCTAGAT KGTTCTTCTRCTCTTCC-3').

### 1.4 树鼩 CD25 基因扩增

以 cDNA 第一链为模板, 采用 50  $\mu$ L 反应体系扩增; 取模板 0.5  $\mu$ L, 加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, Taq-DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加灭菌水至 50  $\mu$ L. 反应程序: 5' 端扩增 (P1, P2), 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min. 3' 端扩增 (P3, P4), 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min. PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳.

### 1.5 目的片段的回收、转化、鉴定及测序

用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段, 连接到 pMD19-T 载体, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 平板 (Amp) 筛选培养, 挑选单菌落扩大培养后提取质粒, 酶切鉴定插入片段, 送北京三博生物公司测序.

## 1.6 树鼯 CD25 基因组织分布

脑、睾丸、肠、肝、肺、肌肉、心、肾、脾、骨髓、外周血总 RNA 提取同前, TIANScript M-MLV 反转录为 cDNA. 根据 tsCD25 的 cDNA 序列, 设计引物: 5'-CAGAAGTCAAATACGCCACAT-3' 和 5'-ACTGTGCTCAGATGCGTTTATGC-3' 用于组织分布检测.  $\beta$ -actin (AB004047) 为内参: 5'-AGAAGGAYTCMTATGTGGGYGACG-3' 和 5'-GGAACCGCTCRTTGCCAAATRGTTG-3'. Foxp3 (ENSTBET00000007696): 5'-GAACCTCACCCAGCTGGAGGGCT-3' 和 5'-GGTGCAGGGTTGGAGCCTCTGCT-3'. 1% 琼脂糖凝胶分离, 溴化乙锭染色.

## 1.7 淋巴细胞的活化和树鼯 CD25 基因表达

无菌采集脾脏, EZ-Sep™ 淋巴细胞分离液获得淋巴细胞, RPMI 1640 培养基, 补充 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 用 30  $\mu$ g/L PMA、500  $\mu$ g/L ionomycin 活化 0, 6, 24, 48, 72 和 96 h, 离心收集细胞, 提取 RNA 反转录为 cDNA, 后续 PCR 反应如前所述.

## 1.8 数据分析

CBS Prediction Server (www.cbs.dtu.dk) 和 ExPASy Proteomics Server (www.expasy.ch) 分析

蛋白质结构域和功能位点, DNASTar 计算等电点 (pI)、分子量 (Mw). ClustalX 分析 CD25 分子一致性. MEGA 4.0 构建系统发生树<sup>[15]</sup>.

## 2 结果和讨论

### 2.1 树鼯 CD25 基因的序列分析

tsCD25 基因全长 816 bp (登录号: FJ041153), 编码一个由 271 个氨基酸残基组成的多肽, 其核苷酸序列及推导氨基酸序列见图 1. SignalP 3.1 发现 tsCD25 的前体蛋白中含有一个由 21 个氨基酸组成的信号肽, 其成熟蛋白的相对分子重量为 30.9 ku, 理论 pI 为 8.1. tsCD25 成熟蛋白由胞外区 (216aa, Glu<sup>1</sup>-Glu<sup>216</sup>)、跨膜区 (21aa, Tyr<sup>217</sup>-Leu<sup>237</sup>) 和胞浆区 (13aa, Thr<sup>238</sup>-Ile<sup>250</sup>) 三部分组成. 胞外域 Glu<sup>1</sup>-Cys<sup>162</sup> 存在 2 个 Sushi 结构域 (分别为 D1, D2), D1 (63aa, Glu<sup>1</sup>-Met<sup>63</sup>), D2 (62aa, Gly<sup>101</sup>-Cys<sup>162</sup>). Sushi 是纤连蛋白 III 型结构域, 存在于多种补体和粘附蛋白中参与识别过程<sup>[16]</sup>. NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 3.1 分析发现 tsCD25 含有 2 个 N-糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr, NPS<sup>48-50</sup> 和 NAS<sup>164-166</sup>) 和 10 个 O-糖基化位点.

### 2.2 树鼯 CD25 分子的同源性比较和进化关系

tsCD25 和 Genbank 中登陆的 11 种哺乳动物

```

1 ATGGAGCCAAATTTGCTGATCTGGGGTTACTGACATTCATCATCAAACCTGGCTGTCTG 60
1 M E P N L I W G L L T F I I K P G C L 20
61 ACAGAGATTTGTGACGATAATCCGCCAGAAGTCAAATACGCCACATTCAAAGCCTTGCC 120
21 T |E I C D D N P P E V K Y A T F K A S A 40
121 TACAAGCACGGCACCATGTTAACTGTGAATGCAAGGAACGTTTCCGCAGAAAAATGGG 180
41 Y K H G T M L N C E C K E R F R R K N G 60
181 TCCCCGTTTCGTGATTGTGTCAGGAAACCCCTAGCCACCCTTCTCGGGATGACAAAGTCAA 240
61 S P F V I C A G N P S H P S W D D K C Q 80
241 TGTGAAAGCATGTCGCCAGAAAACCTCAAAAATACAAGTTACACCTCAACCTAAAGAACAG 300
81 C E S M S P E N S K I Q V T P Q P K E Q 100
301 AAAAGAAGAAAACTACAGAAATGCAAAAGTCACAAGCAGCCCATGGACCAAGTAAATCTT 160
101 K R R K T T E M Q S H K Q P M D Q V N L 120
361 CTAGGTCACTGCAAGGACCACCACCATGGGAACATGAAGGTGCAAAGAGAATTATCAC 420
121 L G H C K D H P P W E H E G A K R I Y H 140
421 TTCGTGGTGGGGCAGACAGTTCACTACCAGTGCATACAGGGATACAGGCCCTACGGGAGA 480
141 F V V G Q T V H Y Q C I Q G Y R P L R R 160
481 GTTCTCGCCAAGAGCGTCTGTGAAATGACTTGTGGGAAGACAAGGTGGACCCAGCCCGG 540
161 V P A K S V C E M T C G K T R W T Q P R 180
541 CTCAAATGCATAAAACGCATCTGAGCACAGTCCATTTCAGATGTAGAAGATCTCAAGAA 600
181 L K C I N A S E H S P F P D V E E S Q E 200
601 AACCTGGATGCTCCTGCAGAGAGTGAGACTTCTGCCCTTCCACAACAACAGATCTTCCA 660
201 N L D A P T A E S E T S C P F T T T D L P 220
661 AAATCTACAGAAAGTTGTTACAACCATGGAGCCATTCTGTGTTTACAACAGATATCAGGTA 720
221 K S T E V V T T M E P F V F T T E |Y Q V 240
721 GCAGTGGCTGGCTGCGTCTCTGCTGATCTGCGTCTCTTCTCAGTGGGGCTCACCTGG 780
241 A V A G C V L L I C V L L L S G L T W 260
781 CAACGTAGACAGAGGAAGAGTAGAAGAACAATCTAG 816
261 Q R R Q R K S R R T I * 271

```

The signal peptide is in italics; the extracellular region is marked with |▶◀|; the D1 and D2 are boxed; the transmembrane region is underlined; the cytoplasmic region is marked in curved line; the N-linked and O-linked glycosylation sites are marked in dark shadow; the stop codon is marked with asterisk

图 1 树鼯 CD25 的核苷酸序列和预测的氨基酸序列 (基因登录号为 FJ041153)

Fig. 1 Nucleotides and deduced amino acid sequence of tree shrew CD25 (GenBank accession No. FJ041153)

CD25 的氨基酸序列的比较结果见图 2. tsCD25 和灵长类 CD25 的同源性为 66.4%~65.3%, 和猪、马、牛、猫、狗的同源性分别为 59.5%, 56.9%, 52.4%, 61.8%, 64.1%, 和和小鼠、大鼠的同源性分别为 57.4%, 46.4%.

Amino acids identify of CD25/%

|    |             |                   |                      |                     |                     |                 |                     |                       |                  |                 |                   |                       |
|----|-------------|-------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| ts | hs          | pt                | pp                   | mm                  | bt                  | ec              | cf                  | fc                    | ss               | ms              | rn                |                       |
| ts | —           | 65.5              | 65.7                 | 65.7                | 66.4                | 52.4            | 56.9                | 64.1                  | 61.8             | 59.5            | 57.4              |                       |
| ts | tree shrew; | hs: Homo sapiens; | pt: Pan troglodytes; | pp: Pongo pygmaeus; | mm: Macaca mulatta; | bt: Bos taurus; | ec: Equus caballus; | cf: Canis familiaris; | fc: Felis catus; | ss: Sus scrofa; | ms: Mus musculus; | rn: Rattus norvegicus |

图 2 树鼩 CD25 与其他物种 CD25 的氨基酸一致性

Fig. 2 The identify of tree shrew CD25 with other species CD25

为了追踪 tsCD25 的分子进化,通过 Neighbor-joining 方法使用 Poisson correction 模式对这 12 种哺乳动物的 CD25 进行了进化分析,构建了系统进化树<sup>[17]</sup>,如图 3 所示. 图 3 中灵长目、奇蹄目、偶蹄目、啮齿目动物分别聚类,说明 CD25 在进化中存在明显的种属特异性,tsCD25 和灵长类 CD25 在一个大的分支上,显示其和灵长类 CD25 同源关系最近,和其他哺乳动物的 CD25,特别是和啮齿类的 CD25 分支较早,遗传关系较远. 对树鼩进化地位的研究曾

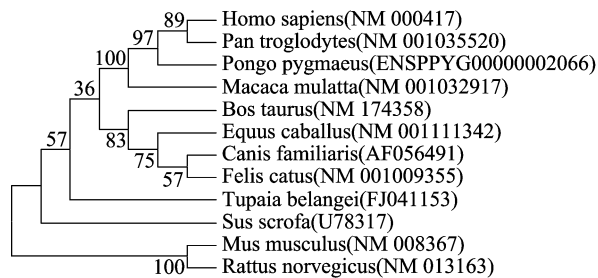
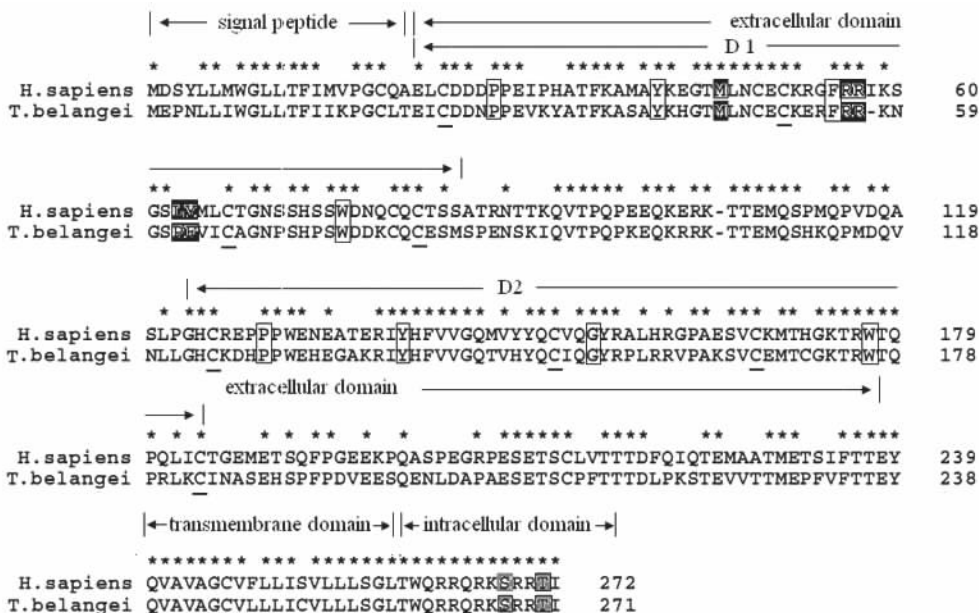


图 3 树鼩与其他哺乳动物 CD25 分子的系统进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of evolutionary relationship between tree shrew CD25 and its homologous proteins

存在分歧,但目前多数学者认为树鼩是灵长类进化上最原始的一个物种<sup>[18]</sup>. 我们从 CD25 这个基因得到的结果支持这一观点.

2.3 树鼩 CD25 分子与人 CD25 分子的氨基酸序列比较

图 4 显示 tsCD25 与人 CD25 (hCD25) 的氨基酸序列分析结果. tsCD25 和 hCD25 的 D1, D2 相似性是 67%, 69%, 跨膜区是 90%, 胞浆区是 100%. hCD25 胞浆区的 Ser<sup>248</sup>, Thr<sup>250</sup> 是蛋白激酶 C 磷酸化位点<sup>[19]</sup>. tsCD25 的胞浆区序列和 hCD25 完全相同,这 2 个位点可能具有相同的功能(图 4). hCD25 胞外的 D1, D2 对维持空间结构、结合 IL-2 起关键作用, Sushi 有 Cys<sup>3/30/46/61</sup>, Pro<sup>7</sup>, Tyr<sup>20</sup>, Gly<sup>33</sup>, Phe<sup>34</sup> 和 Trp<sup>55</sup> 的结构特征<sup>[20]</sup>. tsCD25 的 D1, D2 中这些位点



Identical amino acids are marked with asterisks; Pro<sup>7</sup>, Tyr<sup>20</sup>, Gly<sup>33</sup>, Phe<sup>34</sup> and Trp<sup>55</sup> are boxed; Met<sup>25</sup>, Arg<sup>35</sup>, Arg<sup>36</sup>, Leu<sup>42</sup> are marked in dark shadow; Cys<sup>3/30/46/61</sup>, Cys<sup>103/131/147/163</sup> are underlined; the phosphorylation sites Ser<sup>248</sup>, Thr<sup>250</sup> are marked in grey shadow

图 4 树鼩 CD25 和人 CD25 分子的氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of the predicted tree shrew CD25 amino acid sequence with human CD25

高度保守(图 4). hCD25 通过域内 Cys<sup>28/30</sup>-Cys<sup>59/61</sup>、Cys<sup>131</sup>-Cys<sup>163</sup> 和域间 Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>147</sup>、Cys<sup>46</sup>-Cys<sup>104</sup> 二硫键, D1, D2 成 90° 弯臂状分子结构, D1, D2 上形成两个深沟. IL-2 的 Tyr<sup>45</sup> 和 Phe<sup>42</sup>、Leu<sup>72</sup> 分别插入 CD25 的 Arg<sup>35</sup> 和 Arg<sup>36</sup>, Met<sup>25</sup>、Leu<sup>42</sup> 和 Tyr<sup>43</sup> 的疏水性口袋中成 IL-2/CD25 复合物<sup>[21]</sup>. Cys<sup>3/30/46/61</sup>, Cys<sup>103/131/147/163</sup> 在 tsCD25 中已发现保守, hCD25 的 Arg<sup>35</sup>, Arg<sup>36</sup> (tsCD25 为 Arg, Arg), Met<sup>25</sup>, Leu<sup>42</sup>, Tyr<sup>43</sup> (tsCD25 为 Met, Pro, Phe), Pro, Phe 属疏水性氨基酸, 不影响疏水性(图 4). tsCD25 的空间结构可能与 hCD25 相似. tsCD25 和 hCD25 的氨基酸序列分析显示两者有相似的特征, 可能有相似的生物学功能.

## 2.4 树鼩 CD25 基因的表达分析

CD25 有淋巴细胞分布的特异性<sup>[22]</sup>. 为了确定 tsCD25 的组织分布和其表达被调节方法, 利用 tsCD25 cDNA 中间一段 484 bp 的保守序列作为其 mRNA 特异性转录的标记, 分析了 tsCD25 mRNA 的组织分布和淋巴细胞表达情况. tsCD25 mRNA 分布在外周血、脾和肺, 外周血、脾的表达量高于肺(图 5). tsCD25 mRNA 在未活化及活化的淋巴细胞中均可测, 0~48 h 表达变化不显著, 在 72 h 明显上升, 在 96 h 下降, PMA, ionomycin 活化后, tsCD25 瞬时高表达在淋巴细胞上(图 6(a)). CD25 结构性表达在 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 上, 在抗原或有丝分裂原活化后, T, B 细胞等可诱导表达 CD25<sup>[22]</sup>. Foxp3 (forkhead/winged helix transcription factor) 是 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 发育和维持功能的主要调节基因<sup>[23]</sup>. 目前的研究把 Foxp3 作为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 特异性的鉴定标志<sup>[24]</sup>, 我们对 Foxp3 mRNA 的表达情况进行了分析. Foxp3 mRNA 在外周血、脾中可检测到其表达(图 5). 未活化时 Foxp3 mRNA 表达量较低, PMA, ionomycin 活化后, 在 48h 明显上升, 在 72h 比 48h 表达量明显增加(图 6(b)). tsCD25 的表达分析对利用该基因抑制 CD4<sup>+</sup>

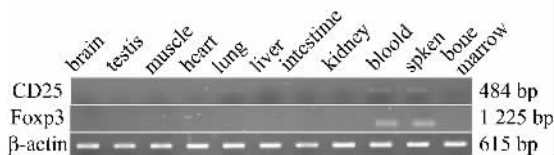
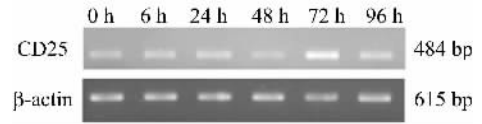
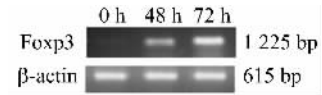


图 5 半定量 RT-PCR 分析树鼩 CD25 基因 mRNA 在不同组织的表达情况

Fig. 5 Tissue distribution of tree shrew CD25 mRNA by Semi-quantitative RT-PCR



(a) 树鼩 CD25 mRNA 在淋巴细胞上的表达



(b) 树鼩 Foxp3 mRNA 在淋巴细胞上的表达

图 6 半定量 RT-PCR 分析树鼩 CD25 mRNA 在淋巴细胞上的表达

Fig. 6 Lymphocytes expression of tree shrew CD25 mRNA by Semi-quantitative RT-PCR

CD25<sup>+</sup> Tregs 功能及开展相关体内、体外研究有重要意义. 由于缺少树鼩的有关抗体, 我们在 mRNA 水平初步分析 tsCD25 表达情况, 在各细胞群蛋白质水平表达情况, 有待抗 tsCD25 抗体和相关抗体制备工作完成后进一步分析.

## 3 结论

综上所述, 本文应用 RT-PCR 技术克隆了树鼩 Treg 细胞表面标志 CD25, 并对该基因的核苷酸和氨基酸序列进行了分析和同源比较, 确定了体内高丰度表达 tsCD25 的组织器官和有效诱导 tsCD25 的方法. 结果表明: tsCD25 的 ORF 长 816 bp, 编码一个由 271 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 包含 2 个 Sushi 结构域, 2 个 N-糖基化和多个 O-糖基化位点, 与灵长类同源基因有高度相似性, 在树鼩的外周血、脾脏、肺中表达丰富, 能够通过 PMA 和 ionomycin 体外进行调节. 为下一步制备 tsCD25 的单克隆抗体抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs 功能, 进一步利用树鼩为感染性疾病的宿主免疫应答模型研究如慢性 HBV 等感染性疾病的免疫学机制奠定了基础.

## 参考文献 (References)

- [1] de Franchis R, Hadengue A, Lau G, et al. Easl international consensus conference on hepatitis B. 13-14 september, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version) [J]. Journal of Hepatology, 2003, 39 (Suppl. 1): S3-S25.
- [2] Schinazi R F, Ilan E, Black P L, et al. Cell-based and animal models for hepatitis B and C viruses [J]. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 1999, 10: 99-114.
- [3] Prince A M, Brotman B. Perspectives on hepatitis B

- studies with chimpanzees[J]. *Ilar Journal*, 2001, 42(2):85-88.
- [4] Cao J, Yang E B, Su J J, et al. The tree shrews: Adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. *Journal of Medical Primatology*, 2003, 32(3):123-130.
- [5] Darai G, Schwaier A, Komitowski D, et al. Experimental infection of tupaia belangeri (tree shrews) with herpes simplex virus types 1 and 2[J]. *J Infect Dis*, 1978, 137(3):221-226.
- [6] Pang Q F, Liu J C, Wan X B, et al. Experimental infection of adult tupaia belangeri yunalis with human rotavirus[J]. *Chin Med J (Engl)*, 1983, 96(2):85-94.
- [7] Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo [J]. *Hepatology*, 1996, 24(1):1-5.
- [8] Zhao X, Tang Z Y, Klumpp B, et al. Primary hepatocytes of tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(2):221-232.
- [9] Isogawa M, Furuichi Y, Chisari F V. Oscillating CD8<sup>+</sup> T cell effector functions after antigen recognition in the liver[J]. *Immunity*, 2005, 23(1):53-63.
- [10] Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13:29-60.
- [11] Chisari F V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99:1 472-1 477.
- [12] Stoop J N, van der Molen R G, Baan C C, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2005, 41(4):771-778.
- [13] Franzese O, Kennedy P T F, Gehring A J, et al. Modulation of the CD8<sup>+</sup>-T-cell response by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(6): 3 322-3 328.
- [14] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *The Journal of Immunology*, 1995, 155(3):1 151-1 164.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8):1 596-1 599.
- [16] Norman D G, Barlow P N, Baron M, et al. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution[J]. *J Mol Biol*, 1991, 219(4): 717-725.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4:406-425.
- [18] Novacek M J. Mammalian phylogeny: Shaking the tree [J]. *Nature*, 1992, 356:121-125.
- [19] Shackelford D A, Trowbridge I S. Identification of lymphocyte integral membrane proteins as substrates for protein kinase C: Phosphorylation of the interleukin-2 receptor, class I HIA antigens, and T200 glycoprotein[J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(18):8 334-8 341.
- [20] Shackelford D A, Trowbridge I S. Evidence for two extracellular domains in the human interleukin-2 receptor: Localization of IL-2 binding[J]. *EMBO J*, 1986, 5(12):3 275-3 280.
- [21] Rickert M, Wang X, Boulanger M J, et al. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor[J]. *Science*, 2005, 308:1 477-1 480.
- [22] Waldmann T A. The interleukin-2 receptor[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(5):2 681-2 684.
- [23] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4:330-336.
- [24] Yi H, Zhen Y, Jiang L, et al. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2006, 3(3):189-195.