

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT9501

計畫名稱：CD93 在單核球分化之功能研究

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

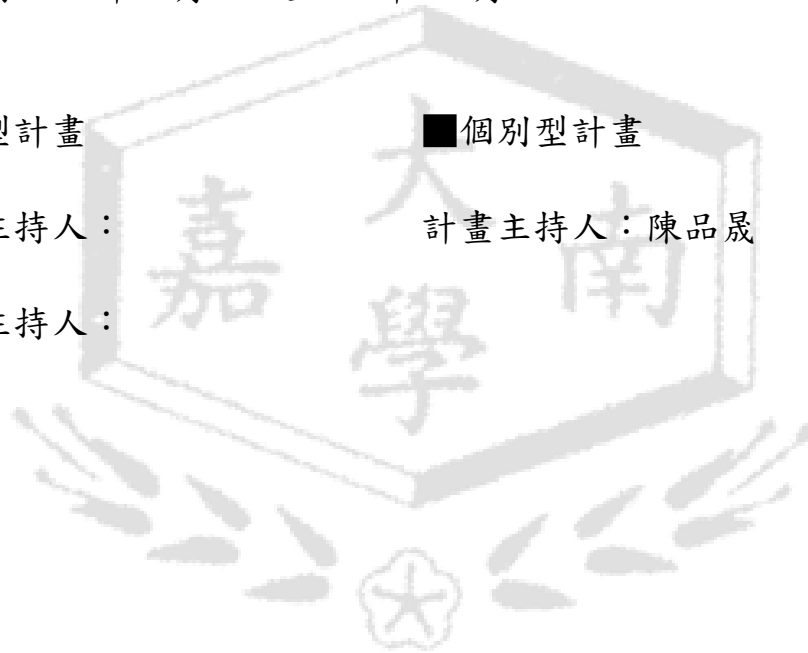
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：陳品晟

子計畫主持人：



中華民國 96 年 2 月 26 日

## 摘要

人類 CD93 蛋白是一種位於細胞表面的穿膜糖蛋白。其被發現表現在單核球、嗜中性球、血小板、小神經膠質細胞、內皮細胞、早期幹細胞等多種細胞。CD93 蛋白具有 652 個胺基酸，其中包含了碳水化合物辨認區域、五個 EGF 相似區域、一個黏蛋白相似區以及一個短的細胞內尾端。CD93 蛋白最初被命名為 C1qRp，認為和補體分子 C1q 促進的吞噬作用有關。然而最近的一些報導卻認為 CD93 蛋白並不參與在 C1q 促進的吞噬作用中。因此 CD93 蛋白的功能目前仍然是未知而且是有爭議的。在本計畫中，我們擬選殖並構築 CD93 基因的表現載體，並將 CD93 及其不同長度的片段 DNA 轉殖入單核球 THP-1 細胞表現，研究 CD93 及其片段蛋白質對於 THP-1 細胞分化為巨噬細胞的影響，以及分析這些蛋白質對巨噬細胞之吞噬作用的影響。結果發現，當 THP-1 細胞接受 PMA 刺激而分化為巨噬細胞時，CD93 蛋白的表現會下降。當 THP-1 細胞過量表現 CD93 蛋白時，細胞的吞噬作用會被抑制，並且 THP-1 細胞吸附到內皮細胞的能力也會被抑制。這些結果顯示，CD93 蛋白可能調節了單核球的某些功能。

## 背景

人類 CD93 蛋白是一種位於細胞表面的穿膜醣蛋白。其被發現會表現在單核球(monocytes)、嗜中性球(neutrophils)、血小板(platelets)、小神經膠質細胞(microglia)、內皮細胞(endothelial cells)及造血幹細胞(haematopoietic cells)等多種細胞<sup>1</sup>。CD93 基因位於人類第 20 號染色體，為可表現出具有 652 個胺基酸的蛋白質。其蛋白質結構，由 N 端開始依序為含 C-type 碳水化合物辨識區域(C-type carbohydrate recognition domain, CRD)，五個上皮細胞生長因子(epidermal growth factor, EGF)相似區域，一個黏蛋白(mucin)相似區，穿膜 (transmembrane) 區域，以及最末端一個僅含有 47 個胺基酸的細胞內尾端(intracellular tail)。CD93 預測的分子量為 66 kD，但以西方點墨法分析後為 126 kD，推測此蛋白可能具有高度的醣化作用<sup>2,3</sup>。

CD93 最初被命名為 complement component 1q receptor (C1qRp)，意即 C1q 的受體。C1qRp 蛋白在 1989 年被發現並分離出<sup>4</sup>，並在後續的研究中，發現此蛋白質的單株抗體可以抑制由 C1q 所促進的單核球吞噬作用(monocytic phagocytosis)，表示 C1q 可能藉由與此蛋白質結合而調控吞噬作用<sup>5</sup>。此外，附著到 C1qRp 抗體的細胞亦會促進吞噬作用<sup>6</sup>。一直到 1997 年，由 Nepomuceno 等人選殖出 CD93 的 cDNA，經由序列比對才確定 C1qRp 即為 CD93<sup>2</sup>。

雖然 CD93 被認為可能在調控單核球的吞噬作用扮演角色，但最近卻有不同的看法。在 CD93 與 C1q 結合的研究中，Tenner 等人發現以 CD93 抗體(U40.3、R139 及 R3)處理過後的人類單核球，並不能抑制 C1q 結合到細胞上，僅有 R3 抗體約有 30%的抑制效果。由於 R3 抗體是 IgM 的型態，推測是因為巨大的空間排列而阻礙蛋白質接觸到 C1q 的結合位置，而非專一性地阻斷 CD93 與 C1q 的結合<sup>7</sup>。因此推測 CD93 可能不是 C1q 直接結合的受體 (Tenner *et al.*, 1999)。此外，Gasque 等人利用 CD93-Fc 融合蛋白為材料，發現亦無法與 C1q 做結合<sup>8</sup>。

而在 2004 年，CD93 基因剔除老鼠被製造出來，發現其不像 C1q 基因剔除老鼠，會發生紅斑性狼瘡等疾病，間接證明 CD93 與 C1q 可能沒有直接的相互作用。相對的，CD93 剔除老鼠可以健全的存活與生長，唯一受到影響的是吞噬細胞清除凋亡細胞的作用。由此推論 CD93 可能參與辨識凋亡細胞的過程，進而傳遞清除凋亡細胞的訊息<sup>9</sup>。

為了進一步研究 CD93 與細胞吞噬作用的相關性，Tenner 團隊使用基因工程方法將 CD93 之細胞內片段與 GST (glutathione S-transferase) 接在一起，並表現出融合蛋白。再利用 GST (glutathione S-transferase) pull down 的方法，尋找可能會與 CD93 細胞內片段蛋白進行交互作用的蛋白質。結果發現 CD93 會與 moesin 發生交互作用。以螢光免疫色法觀察人類單核球，也觀察到 Moesin 與 CD93 分佈在相同的位置，確定這兩種蛋白質在細胞內亦會結合在一起。Moesin 為 zrin/radixin/moesin(ERM) 家族的一員，ERM 蛋白可作為一些細胞膜蛋白與細胞骨架蛋白，如 actin，的架橋蛋白。更深入的研究發現，CD93 細胞內片段蛋白的細胞膜旁(juxtamembrane)區域之正電荷胺基酸，以及 C 端末尾的 11 個胺基酸，對於 moesin 的結合是相當重要的。Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) 亦會藉由影響 CD93 與 Moesin 的交互作用。這些結果顯示 CD93 可能藉由與 moesin 結合，影響細胞骨架蛋白，進而調控細胞功能<sup>10</sup>。

最近的研究也發現，表現在單核球及嗜中性球細胞表面的 CD93，會因為一些刺激，包括發炎反應，而被切除。這些被切除並被釋放到細胞外的 CD93 片段，包括有 CRD，以及 EGF 相似區域等片段。而這些片段也可在血液中被發現，顯示 CD93 的切割在正常生理條件下是存在的<sup>11</sup>。而這些游離的 CD93 片段蛋白，是否具有其他生理功能，則是完全未知。

CD93 在許多不同種類的細胞也都有表現，顯示 CD93 在不同的生理狀況下，可能具有不同的生物功能。例如人類 CD93 在老鼠的同源基因 AA4，會大量表現在老鼠的血管內皮細胞，被推測與調控細胞生長，參與血管的重新塑型、血管新生以及微血管生成有關<sup>12</sup>。

## 研究方法

本計畫將以單核球為材料，研究 CD93 在發炎反應時所扮演的角色。研究方法分列如下：

1. 從人類單核球前期細胞株 U937 中抽取 RNA，以 RT-PCR 方法選殖人類 CD93 基因。再以 PCR 方法取得全長、刪除 CRD (CRD-deleted,  $\Delta$ L) 與刪除細胞內區域(cytoplasmic-deleted,  $\Delta$ C)的 CD93 基因。DNA 兩端分別以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後轉接至螢光蛋白(GFP)表現載體 pEGFP-N1。CD93 與 pEGFPN1 載體接合後轉移到大腸桿菌 DH5- $\alpha$  勝任細胞，再以 kanamycin 初步篩選菌落。將選出的菌落進行小量培養後抽取 DNA，並以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割加以確認。再利用 CD93-pEGFPN1 質體作為模版，以 PCR 夾出 CRD 區域缺失的 CD93DNA，並在 5' 端接上 CD93 基因前端的訊息片段(signal peptide)DNA，選殖出的表現載體稱為 CD93- $\Delta$ L -pEGFPN1。CD93- $\Delta$ C 的基因片段同樣是以 CD93-pEGFPN1 為模版，以 PCR 方法得到 C-tail 缺失的 CD93，再以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後，接合並且進行轉移，篩選菌落以及確認序列，將此基因表現載體命名為 CD93- $\Delta$ C -pEGFPN1。實驗步驟如下：

### A. U937 cell RNA 的萃取

1. 將 U937 細胞用 trypsin-EDTA 打下後，加入適量的 TRIzol<sup>B</sup> Reagent
2. 加入 300 $\mu$ l 的 chloroform (每 1ml TRIzol 需加入 300 $\mu$ l 的 chloroform)。
3. 用手劇烈搖晃約 30 秒然後靜置於室溫下 3 分鐘。
4. 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 12,000 x g (~10,000 rpm)，15 分鐘。
5. 小心吸出上清液。
6. 加入等量的 isopropyl alcoholic。
7. 小心的將離心管正反翻轉 10 次。
8. 在室溫下靜置 10 分鐘。
9. 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 12,000 x g (~10,000 rpm)，10 分鐘。
10. 將上清液吸出，保留在管底的 RNA pellet。
11. 加入 600 $\mu$ l 的 75% RNase-free ethanol，vortex 5~10 次。
12. 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 10,000 x g (~8500 rpm)，5 分鐘。
13. 將上清液吸出，並將離心管倒放，靜置室溫下 15 分鐘
14. 視 RNA pellet 的大小加入 50 or 100 or 200 $\mu$ l 的 DEPC 水並靜置在 60 $^{\circ}$ C 下 10 分鐘

## B. 反轉錄-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

1. 將 1 $\mu$ g 的 RNA 置於 65°C 下 5 分鐘，然後迅速置於冰上至少 5 分鐘。
2. 配置 mixed buffer。
  - Oligo (d T) 15 primer.....1 $\mu$ l
  - 10mM dNTP.....2 $\mu$ l
  - RNase-free water.....9.5 $\mu$ l
  - RNasin.....0.5 $\mu$ l
  - MMLV reverse transcriptase.....1 $\mu$ l
  - 5X MMLV RT buffer.....4 $\mu$ l
3. 將 mixed buffer 加入含有 1 $\mu$ g 的 RNA 的 PCR 專用離心管。
4. 置於 37°C 下反應 5 分鐘。
5. 置於 42°C 下反應 60 分鐘。
6. 置於 70°C 下反應 10 分鐘。
7. 置於 4°C 下至少 5 分鐘。
8. 循環 35 次

## C. 人類 CD93、 $\Delta$ L CD93、 $\Delta$ C CD93 -PCR

1. 配置 mixed reaction buffer
  - Sense primer.....1 $\mu$ l
  - Antisense primer.....1 $\mu$ l
  - dNTP.....1 $\mu$ l
  - Taq polymerase.....0.5 $\mu$ l
  - 10X PCR buffer.....5 $\mu$ l
  - H<sub>2</sub>O.....36.5 $\mu$ l加入 5 $\mu$ l RT-PCR 產物(總體積 50 $\mu$ l)
2. 放入基因放大儀反應

[註]：Primer sequence

Primer	Sequence
C1qRp 3' (stop deletion)	5'-CGC GGA TCC CAG TCT GTC CCA GGT GT-3'
C1qRp 1129 antisense	5'-GGG GTA CCC TTG GGG GCA GC-3'
C1qRp 1129 sense	5'-GGG GTA CCA GCT GGA CTC GA-3'
C1qRp 5'	5'-GGA ATT CCG ATG GCC ACC TCC ATG GGC CTG-3'

C1qRp Signal 5'	5'-CCC AAG CTT ATG GCC ACC TCC ATG GGC-3'
C1qRp Signal 3'	5'-GGA ATT CCC CCG CCC CGG GCT GGG TCA G-3'
C1qRp TM 3'	5'-CGG GAT CCC CCA GAC CCA GGG CCA GCA G-3'
C1qRp 2Ds	5'-TTG GAA TTC CCC AAG TAT GGC TGC AAC TTC-3'

## D. 構築質體的方法

### D1. 限制酶切割質體 DNA

將預備切割的載體 (pEGFP-N1) 依照實驗的不同，換算出所需的體積，根據所需作用的限制酶，選擇最適當的限制酶反應緩衝液，在特定的溫度下反應，而反應時間依照 DNA 的數量而有所差異，平均約 1 到 3 小時。

### D2. 載體 DNA 的瓊脂膠電泳(agarose gel electrophoresis)

1. 製作瓊脂膠電泳膠片，以 TAE 為膠片的緩衝液，0.8 %之電泳膠片。

瓊脂膠(Agarose) 0.8 g

0.5X TAE buffer 100 ml

以微波爐加熱溶解，待冷卻至 40-50 °C，加入溴化亞乙烯溶液，混合均勻，倒入模型中待凝固備用。

溴化亞乙烯溶液(EtBr, 10 mg/ml) 5  $\mu$ l

2. 將限制酶作用完成的載體 DNA，加入總體積十分之一的 10X loading dye，混合均勻，取適當體積的混合物於前一步驟準備好的瓊脂膠電泳膠片中，在同一膠片的另一個樣品槽中注入 DNA marker，以作為 DNA 樣品分子量大小的依據，用 100V 的電壓在水平式電泳槽中進行電泳分析，以紫外燈觀察結果，照相作為紀錄。

### D3. 載體 DNA 片段回收

1. 將經過適當限制酶切割的載體 DNA，在 0.8 %瓊脂膠電泳膠片中進行電泳分析。
2. 在紫外燈下觀察結果，以刀片切下正確分子量位置含 DNA 片段的瓊脂膠，置於乾淨的 1.5ml 小離心管內。
3. 使用 Gene-spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit 來進行 DNA 片段的回收。
4. 加入與切下的瓊脂膠相同體積的 binding buffer，於 60 °C 靜置 5 ~ 15 分鐘，直到管內的膠體完全溶解。
5. 將已完全溶解的膠體混合液加入 spin column 中。
6. 離心 12000 rpm 1 分鐘，去除下層廢液。
7. 再加入 500  $\mu$ l binding buffer，離心 12000 rpm 1 分鐘，去除下層廢液。

8. 加入 700  $\mu\text{l}$  washing buffer，離心 12000 rpm 1 分鐘，去除下層廢液。
9. 離心 12000 rpm 3 分鐘，以移除殘餘的液體。
10. 將 spin-down 管柱置於乾淨的 1.5 ml 小離心管中，加入 50  $\mu\text{l}$  elution solution，離心 12000 rpm 3 分鐘，即可得到回收的 DNA 片段。

#### D4.接合反應( ligation )

1. 將所得到的載體與插入的 DNA 利用接合酶 (ligase)進行接合。
2. 載體 DNA 與插入 DNA 的莫耳比調整為 1 : 3 ~ 1 : 5。
3. 再加入 1  $\mu\text{l}$  的 T4 DNA ligase 與所需的 ligation buffer。
4. 於 16  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽反應 16 小時。

#### D5.勝任細胞(DH5 $\alpha$ strain competent cell)的製備

1. 將 DH5 $\alpha$  strain 的 *E.coli* 接種於 LB 培養基上，使用三區畫法以達到有單一菌落的存在，37  $^{\circ}\text{C}$  培養 16 小時。
2. 從培養基上挑取單一菌落，接種於 10 ml SOB 培養液中，37  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽，以 200 rpm 震盪培養 8 小時。
3. 取 4 ml 的已培養好 SOB 菌液，到另一含有 250 ml SOB 培養液的錐形瓶中，於 18  $^{\circ}\text{C}$  以 200 rpm 震盪培養 16 ~ 24 小時。
4. 量測菌液在 OD<sub>600</sub> 的吸光值，代表菌液的濃度，當吸光值達到 0.55 ~ 0.6 時，將含菌液的錐形瓶置於冰上 10 分鐘。
5. 再於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 3500 rpm 離心 10 分鐘，收集細菌。
6. 加入 80 ml 的 TB 重新懸浮菌體。
7. 於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 3500 rpm 離心 10 分鐘，收集細菌。
8. 再加入 20 ml 含有 7% DMSO 的 TB 重新懸浮菌體。
9. 快速將菌液分裝到 1.5 ml 的離心管中，分裝有菌液的離心管立即置入液態氮中急速冷凍，最後移到 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### D6.載體 DNA 或接合反應後 DNA 的形質轉移 (transformation)

1. 將載體 DNA 或接合反應後 DNA 加入 200  $\mu\text{l}$  的勝任細胞中，靜置於冰上 30 分鐘。
2. 移至 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽中反應 90 秒鐘，再置冰上 2 分鐘。
3. 加入 800  $\mu\text{l}$  的 SOC 培養液，於 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽，以 200 rpm 震盪培養 1 小時。
4. 以 3000 rpm 離心 2 分鐘，移除 800  $\mu\text{l}$  的上清液。
5. 以剩下的液體重新懸浮菌體，均勻塗抹於 LB 培養基上，於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養 12 ~ 16 小時。



2. 我們利用人類單核球細胞 THP-1 來研究 CD93 的功能，觀察活化的 THP-1 細胞是否會影響人類 CD93 的表現。將 THP-1 以刺激發炎反應的物質，PMA (phorbol myristate acetate)、TNF- $\alpha$ 或 LPS 處理 24 與 48 小時後，THP-1 細胞會由懸浮型態的細胞，發生型態變化並貼附於培養皿底部，分化為具有高度吞噬能力的巨噬細胞。收集細胞，以 1% paraformaldehyde 固定後，再以 anti-CD93 抗體(VIMD2b)偵測細胞表面的 CD93 蛋白，經螢光二級抗體作用後，以流式細胞分析儀(flow cytometer)分析細胞表面的 CD93 蛋白變化。實驗步驟如下：

#### A. THP-1 細胞的轉染

1. 準備 0.5  $\mu$ g 的 CD93-pEGFPN1 質體、 L CD93-pEGFPN1 質體、 C CD93-pEGFPN1 質體與室溫的 Nucleofector<sup>TM</sup> Solution。
2. 將 THP-1 用室溫的 Nucleofector<sup>TM</sup> Solution 配製為  $1.5 \times 10^6 / 100 \mu$ l。
3. 將上述的混合液加入套組所附的透明小容器中。
4. 選擇 U-01 程式進行電擊。
5. 迅速將混合液充分吸出，放入 37  $^{\circ}$ C 的 RPMI-1640 培養液中，培養超過六小時後，等細胞開始表現外送蛋白時，進行其他實驗。

#### B. THP-1 細胞的分化

1. 將 THP-1 細胞以 RPMI-1640 配製為  $1 \times 10^6$  顆/ml 的濃度
2. 在 6-well 培養皿中加入上述濃度細胞 2ml，以最終濃度為 10 nM PMA (Sigma)處理。
3. 在 37  $^{\circ}$ C 培養箱中培養至少 16 小時，可以觀察到分化後 THP-1 細胞由原本懸浮圓形細胞，轉變為緊貼在培養皿底部的細胞。依照分化的程度不同，有部分細胞會有拉長類似偽足的細胞構造產生，隨著細胞分化的時間越久，形變的比率也會升高。

## 實驗結果

經由本計畫的執行，我們選殖出 CD93 的 cDNA，並得到 CD93 全長、CD93- $\Delta$ L-及 CD93- $\Delta$ C-pEGFP 等表現載體。將 CD93 轉殖入單核球 THP-1 細胞表現後，我們分析 CD93 的表現對 THP-1 細胞被 PMA 刺激而分化成巨噬細胞之影響，也探討 CD93 對巨噬細胞之吞噬作用的影響。

### 一、構築人類 CD93 全長 (CD93-pEGFPN1)、人類 CD93 刪除 lectin-like 區域 (CD93 $\Delta$ L -pEGFPN1)、人類 CD93 刪除細胞內尾端 (CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1) 的基因

由於人類 CD93 基因中內含一個插入序列，因此我們先分離出人類淋巴瘤細胞株 U937 的 mRNA，反轉錄為 cDNA 後，再進行基因的選殖。人類 CD93 全長 1956bp，從 1129bp 位置分兩段 PCR (表一)，再將產物接起來，成為全長的 CD93。兩端分別以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後接入哺乳動物表現載體 pEGFPN1，pEGFPN1 是一個有綠色螢光蛋白 GFP 基因的載體 (附錄一)。人類 CD93 基因與 pEGFPN1 載體接合後轉移到 DH5- $\alpha$  勝任細胞中，再以 kanamycin 初步篩選菌落。將選出的菌落進行小量培養後抽取 DNA，並以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割加以檢視，其切下的片段大小為 1956bp (圖一)，在限制酶確認無誤後的質體，將其命名為 CD93-pEGFPN1，接著進行正向與反向的 DNA 定序(附錄二)，確認定序結果無誤。再利用 CD93-pEGFPN1 質體作為模版，以引子 C1qRp 2Ds 和 C1qRp 3' stop deletion 夾出 CRD 區域缺失的 CD93 的後半部，再以 U937 的 cDNA 和 Signal 3' 與 Signal 5' 引子，夾出前端的訊息片段(signal peptide)，兩個產物都以 EcoR I 限制酶切割後，互相接合並進行轉移，篩選菌落以及確認都與全長的過程相同，其片段大小為 1451bp，其命名為 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1。CD93 $\Delta$ C 的基因

片段同樣是以 CD93-pEGFPN1 作為模版，以引子 C1qRp 5'和 C1qRp TM3's 做聚合酶連鎖反應得到 C-tail 缺失的 CD93，再以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後，接合並且進行轉移，篩選菌落以及確認都與全長的過程相同，其片段大小為 1802bp，其命名為 CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1。

## 二、PMA 刺激 THP-1 分化會降低人類 CD93 蛋白的表現

我們利用人類單核球細胞 THP-1 來研究 CD93 的功能。首先，我們觀察由 PMA 活化的細胞是否會影響人類 CD93 的表現。將 THP-1 在 10 nM 的 PMA (phorbol myristate acetate)處理，經 24 與 48 小時後，再以 anti-CD93 抗體(VIMD2b)偵測 CD93 蛋白表現，並利用流式細胞分析儀分析細胞表面的 CD93 蛋白變化。由圖二所示，隨著 THP-1 被 PMA 刺激活化的時間增加，細胞表面的 CD93 蛋白表現量會逐漸減低。在刺激後的第一天降低約百分之五十，第二天更降低到約百分之二十五的表現量。由此可知 PMA 的刺激分化 THP-1 會降低人類 CD93 蛋白的表現。

## 三、PMA 刺激 THP-1 分化會刺激對乳膠顆粒的吞嚥作用

我們又更進一步觀察 PMA 刺激 THP-1 分化為巨噬細胞後，其吞嚥作用是否有影響。將 10 nM PMA 刺激活化 THP-1，經 24 與 48 小時後，收集細胞並與相同濃度的乳膠螢光顆粒互相混合反應兩小時後，經過仔細的清洗，藉由流式細胞分析儀偵測細胞的螢光量，代表其吞入的乳膠顆粒數量，以及吞嚥能力的強弱。由圖三所示，我們可以發現 PMA 刺激的時間越長，THP-1 細胞吞嚥乳膠顆粒的能力就越強，刺激一天後的吞嚥能力相較於未活化但是有加入乳膠顆粒作為陰性對照的組別來得高兩倍，而刺激過兩天的細胞吞嚥能力更是高於對照組九倍。配合先前觀察到 PMA 的刺激分化 THP-1 會降低人類 CD93 蛋白的表現，顯示 PMA 刺激活化 THP-1 且降低人類 CD93 蛋白的表現可能與吞嚥能力有關。

#### 四、比較 THP-1 細胞轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L -pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1 後吞噬乳膠顆粒能力的差異

為了進一步研究人類 CD93 蛋白的表現減少與巨噬細胞吞噬能力的相關性，我們將不同人類 CD93 片段的質體轉染至 THP-1 作為實驗組，而轉染入 pEGFPN1 載體作為對照組，在細胞轉染並培養六小時後確保轉染入的質體已經開始表現蛋白後，以 10 nM PMA 刺激活化 THP-1，在 16 到 24 小時間收取細胞，進行乳膠顆粒的吞噬實驗，最後以流式細胞分析儀偵測紅色螢光。首先比較未轉染任何質體，但有 PMA 處理的細胞比未經由 PMA 刺激的細胞有更多的紅色螢光，確定 PMA 的刺激成功。再圈選有綠色螢光表現細胞( pEGFPN1 為綠色螢光，表示有轉染入標的質體)，分析其紅色螢光百分比(乳膠顆粒為紅色螢光，代表細胞吞噬乳膠顆粒的程度)。所得結果如圖四所示，發現轉染入 CD93-pEGFPN1 的實驗組吞噬乳膠的百分比較空載體對照組低百分之四十，而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯的差異，顯示全長的人類 CD 蛋白表現會影響 PMA 刺激分化 THP-1 的乳膠吞噬能力，造成吞噬能力的降低。當去除掉 lectin-like 區域以及細胞內尾端時，都會影響對吞噬能力的調控，而使吞噬能力回復到和 pEGFPN1 載體的對照組一樣。

#### 五、分析轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L -pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1 的 THP-1 細胞經 PMA 刺激分化後附著能力的差異

在觀察轉染全長的人類 CD93 蛋白會抑制細胞吞噬乳膠顆粒的同時，我們也發現到轉染不同片段的人類 CD93 基因後的 THP-1，經 PMA 刺激分化後，其附著到培養皿的細胞數量有明顯的差異。我們由圖五可見，細胞轉染 CD93-pEGFPN1 的實驗組經刺激分化黏著的細胞數量明顯少於轉染入 pEGFPN1 載體的對照組。黏著細胞數降低百分之六十；而轉染入

CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯的差異。比較特殊的是轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的實驗組相對於對照組，細胞黏著的數量增加百分之六十。

#### 六、觀察 THP-1 細胞轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 後對 TNF- $\alpha$ 活化的人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)黏著能力的差異

最後，我們利用活化的血管內皮細胞來誘發 THP-1 成為巨噬細胞，以此來研究 CD93 的功能。我們先將轉染後的 THP-1 細胞標定活細胞染劑 Calcein AM，再事先用 25 ng/ml TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 培養一個小時，最後用螢光儀偵測螢光，由螢光的高低表示細胞黏著的數量，藉此代表黏著能力的差異。結果由圖六所示，細胞轉染 CD93-pEGFPN1 的實驗組黏著的細胞數量明顯少於轉染入空載體的對照組，黏著細胞數降低百分之三十三，而轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯的差異，再次證明人類 CD93 蛋白是確實對於單核球細胞黏著到內皮細胞的能力有其抑制的作用。

## 討論

CD93 自 1986 年被發表以來，其功能仍不太清楚。在本研究中，我們發現在單核球被 PMA 刺激為巨噬細胞的過程中，CD93 的表現量隨著時間越長逐漸減少，在活化到第二天時減少約百分之五十；同時，我們亦觀察到巨噬細胞的吞噬能力會隨著活化的天數而增加，在活化後第二天的細胞其吞噬能力比未刺激的對照組促進約八倍。此結果顯示 CD93 蛋白的表現可能與單核球的分化有關，因此更進一步將 CD93、CD93 $\Delta$ L 或 CD93 $\Delta$ C 蛋白暫時性的表現至 THP-1 細胞來探討其與單核球分化及吞噬作用的相關性。實驗結果顯示，轉染入 CD93 的細胞在 PMA 活化後的黏著能力比轉染入空載體的對照組降低約百分之六十，而轉染入 CD93 $\Delta$ L 的細胞則沒有差異，轉染入 CD93 $\Delta$ C 的細胞會促進約百分之六十。在研究 THP-1 細胞吞噬作用的實驗中，我們發現轉染 CD93 的細胞其吞噬乳膠顆粒的能力較送入空載體的對照組降低約百分之四十，而轉染入 CD93 $\Delta$ L 和 CD93 $\Delta$ C 則沒有明顯差異。最後，將轉染 CD93 的 THP-1 加入活化後的 HUVEC，也發現轉染入 CD93 的細胞對活化後的 HUVEC 的黏著能力比轉染入空載體的對照組降低約百分之三十三，而轉染入 CD93 $\Delta$ C 則和對照組沒有差異。因此人類 CD93 蛋白可能與抑制巨噬細胞的細胞黏著與吞噬作用有關，並且 CD93 蛋白的 CRD 片段與細胞質內尾端可能在 CD93 的不同細胞功能中扮演不同角色。

人類的巨噬細胞被定義為穿過內皮細胞層後的單核球所轉變而成，主要執行吞噬作用(phagocytosis)，也經由細胞上的 MHC class II 呈現外來物質的片段給 helper T 細胞進而活化 B 細胞產生抗體，巨噬細胞再經由抗體的吸引參與吞噬外來物質的機制。目前已知低濃度的 PMA (phorbol myristate acetate)可以促使 THP-1 細胞由單核球分化為巨噬細胞，並由懸浮狀態的細胞轉變為附著性細胞。分化後的細胞會表現許多巨噬細胞所具有的功能，其中包括了吞噬作用、免疫相關細胞激素的釋放以及 PKC 訊息傳導路徑的活化，並且在沒有活化因子的刺激下，能

夠提高 MHC class I 和 II 的表現，適合用以研究巨噬細胞的免疫相關機制<sup>13</sup>。我們將 THP-1 細胞經過 10 nM PMA 的處理後，可以發現刺激後的 THP-1 細胞其細胞核質比(N/C ratio)下降，細胞質所佔的比率上升，細胞邊緣開始有不規則的型態或有拉長狀的偽足產生，我們分別在 24 小時與 48 小時收取附著到培養皿底部的細胞，以流式細胞分析儀偵測 CD93 在細胞上的表現。由圖二可以看到，隨著 PMA 的刺激時間增長，THP-1 在趨向分化為巨噬細胞時，人類 CD93 的表現量是逐漸降低，這也印證了在人類的巨噬細胞並沒有 CD93 蛋白的表現<sup>1</sup>。

由於活化的吞噬細胞具有良好的吞噬能力，我們也利用 PMA 刺激 THP-1 24 小時與 48 小時後的細胞，進行乳膠顆粒的吞噬實驗，同樣以流式細胞分析儀偵測細胞的螢光表現，當螢光表現越強時，表示被吞噬的乳膠顆粒越多。在這個實驗中，我們發現 PMA 刺激後的 THP-1 是具有吞噬能力的，而且隨著刺激時間越久，吞噬能力越強。綜合兩個實驗結果來探討，隨著 PMA 刺激時間越長，吞噬能力增加，但 CD93 的量卻是下降的，倘若以往所提出 CD93 調控促進吞噬作用是真實的，在我們實驗中所看到的應該會是隨著刺激時間越長，吞噬能力會因為 CD93 量的下降而趨緩。因此我們認為人類 CD93 在 PMA 刺激活化 THP-1 轉變的過程中，對於巨噬細胞吞噬作用是負向的調控，在單核球未受到免疫刺激時，穩定表現的 CD93 可以抑制單核球往免疫活化的方向走，相反地當單核球受到刺激需要進行免疫活化時，CD93 的量減少與單核球受到調控往免疫活化轉變為巨噬細胞有關。

由於 PMA 刺激後 THP-1 的 CD93 量下降，但是吞噬作用增加，我們想進一步探討 CD93 與吞噬作用之間的關連性，因此將 CD93-pEGFPN1 轉染入 THP-1 細胞中，等待六小時後其蛋白穩定表現，經由 PMA 刺激細胞分化為巨噬細胞，進行吞噬作用試驗，挑選讓細胞吞噬乳膠顆粒來廣泛定義所吞噬的對象，藉由流式細胞分析儀圈選有表現標的質體的細胞，並偵測其吞噬乳膠顆粒的比例。由圖三可見，在轉染 CD93-pEGFPN1 的 THP-1，經 PMA 活化後其轉變為巨噬細胞時吞噬乳膠顆粒的能力相較於轉染入空載體的對照組低，顯示其吞噬能力在表現

CD93 蛋白之後受到抑制，而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 與 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 細胞吞噬能力與對照組沒有明顯差異。此結果推測不論是醣蛋白辨識區域或是細胞內尾端，對於人類 CD93 抑制細胞吞噬作用的調控都有扮演重要角色。

單核球活化為巨噬細胞的過程中，要先經過單核球在內皮細胞表面滾動 (rolling)，活化 (activation) 後進行細胞黏著 (adherence)，再穿越內皮細胞層 (extravasation) 進而成為一個活化的巨噬細胞執行各項任務。因此我們想要了解在轉染 CD93-pEGFPN1 的 THP-1 活化後，吞噬作用受到抑制，是否與更前期的細胞黏著有相關聯。我們將 CD93-pEGFPN1 轉染入 THP-1 細胞中，等待六小時後其蛋白穩定表現，經由 PMA 刺激細胞分化為巨噬細胞，讓細胞黏貼到培養皿的底部，24 小時後進行有黏附的細胞計數。由圖五中可見，轉染 CD93-pEGFPN1 的 THP-1 活化後黏附到培養皿底部的細胞量會減少，證明 CD93 的表現與單核球活化為巨噬細胞中黏著的這個步驟有負向的調控，而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 的細胞黏附能力與對照組一樣，推測醣類辨識區域對於細胞黏著的步驟有其重要的角色，以至於當刪除掉這個區域時就無法抑制細胞黏著。而轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的細胞有促進細胞黏著的現象，推測與蛋白質構型的改變或外送位置不正確有關。

由上面的討論和實驗知道 CD93 的表現會負向調控 THP-1 經由 PMA 活化黏著到細胞培養皿底部的能力。我們進一步模擬生物體內的真實情況，直接將轉染後的 THP-1 細胞與 TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 接觸，探討 THP-1 活化與 CD93 的關係。由圖六可見，轉染入 CD93-pEGFPN1 的 THP-1 黏著到活化的 HUVEC 的能力低於轉染入空載體的對照組，而轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的細胞黏著的能力則沒有受到抑制，顯示 CD93 蛋白的細胞質內尾端對於調控抑制 THP-1 細胞黏著到 HUVEC 的能力是有重要影響。

這些研究成果，使我們有更大的思考空間來全面探討 CD93 蛋白質對吞噬作用的影響，而不僅侷限在 CD93 與 C1q 之交互作用的分析。同時，利用調控單核球 THP-1 細胞之 CD93 蛋白表現，亦能對 CD93 作用的機轉做更深入的研究。而



利用 CD93 片段的重組蛋白，更可以研究這些蛋白質的生理功能。這將提供我們更多關於 CD93 蛋白功能的資訊，讓我們有更大的機會可以利用這些成果來研發出可改善生理健康功能的相關醫藥應用。



## 參考文獻

1. Nepomuceno RR, Tenner AJ. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol.* 160:1929-35, 1998.
2. Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity.* 6:119-29, 1997.
3. Park M, Tenner AJ. Cell surface expression of C1qRP/CD93 is stabilized by O-glycosylation. *J Cell Physiol.* 196:512-22, 2003.
4. Malhotra R, Sim RB. Chemical and hydrodynamic characterization of the human leucocyte receptor for complement subcomponent C1q. *Biochem J.* 262:625-31, 1989.
5. Guan E, Robinson SL, Goodman EB, Tenner AJ. Cell-surface protein identified on phagocytic cells modulates the C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol.* 152:4005-16, 1994.
6. Nepomuceno RR, Ruiz S, Park M, Tenner AJ. C1qRp is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity. *J Immunol.* 162:3583-9, 1999.
7. Tenner AJ. Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol.* 11:34-41, 1999.
8. McGreal EP, Ikewaki N, Akatsu H, Morgan BP, Gasque P. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J Immunol.* 168:5222-32, 2002.
9. Norsworthy PJ, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Taylor PR, Bygrave AE, Thompson RD, Nourshargh S, Walport MJ, Botto M. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol.* 172:3406-14, 2004.
10. Zhang M, Bohlson SS, Dy M, Tenner AJ. Modulated interaction of the ERM protein, moesin, with CD93. *Immunology.* 115:63-73, 2005.
11. Bohlson SS, Silva R, Fonseca MI, Tenner AJ. CD93 is rapidly shed from the surface of human myeloid cells and the soluble form is detected in human plasma. *J Immunol.* 175:1239-47, 2005.
12. Dean YD, McGreal EP, Gasque P. Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense. *Eur J Immunol.* 31:1370-81, 2001.
13. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T.

A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb.* 11:88-97, 2004



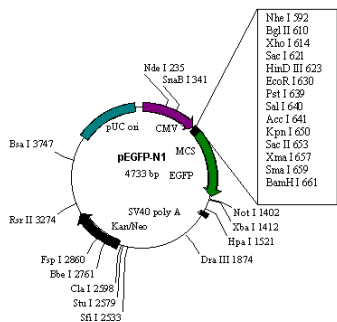
表一、PCR 引子核苷酸鏈的序列

引子	序列
C1qRp 3' (stop deletion)	5'-CGC <u>GGA TCC</u> CAG TCT GTC CCA GGT GT-3' BamH I
C1qRp 1129 antisense	5'-GGG GTA CCC TTG GGG GCA GC-3'
C1qRp 1129 sense	5'-GGG <u>GTA CCA</u> GCT GGA CTC GA-3' Kpn I
C1qRp 5'	5'- <u>GGA ATT</u> CCG ATG GCC ACC TCC ATG GGC CTG-3' EcoR I
C1qRp Signal 5'	5'-CCC <u>AAG CTT</u> ATG GCC ACC TCC ATG GGC-3' Hind III
C1qRp Signal 3'	5'- <u>GGA ATT</u> CCC CCG CCC CGG GCT GGG TCA G-3' EcoR I
C1qRp TM 3'	5'- <u>CGG GAT CCC</u> CCA GAC CCA GGG CCA GCA G-3' BamH I
C1qRp 2Ds	5'-TTG <u>GAA TTC</u> CCC AAG TAT GGC TGC AAC TTC-3' EcoR I

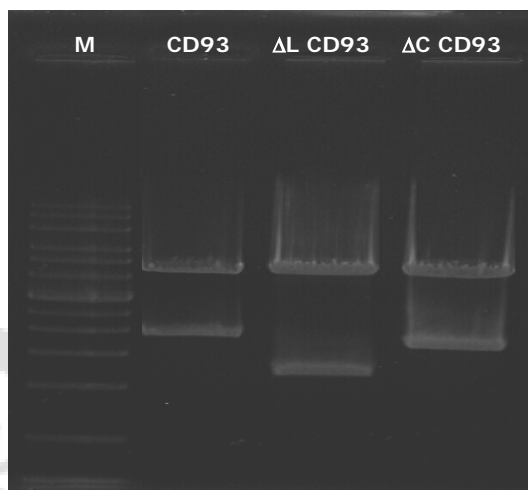
表二、人類 CD93 蛋白的基因及各結構序列

區域	結構	基因序列
Domain I	CRD region	186—644
Domain II	EGF-like domain	900—1526
Domain III	Mucin-like domain	1527—1862
Domain IV	Transmembrane domain	1863—1925
Domain V	Cytoplasmic tail	1926—2075

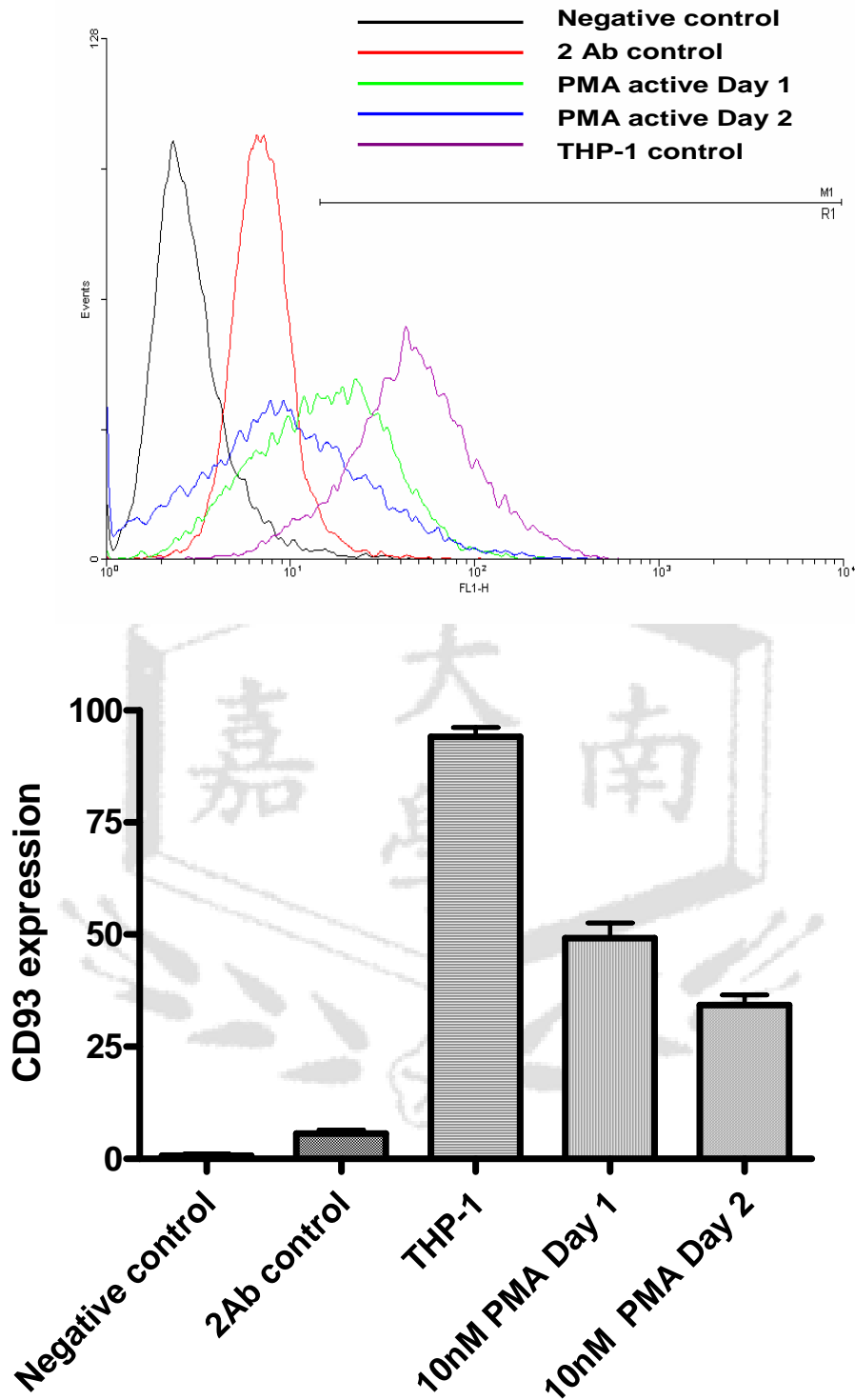
A



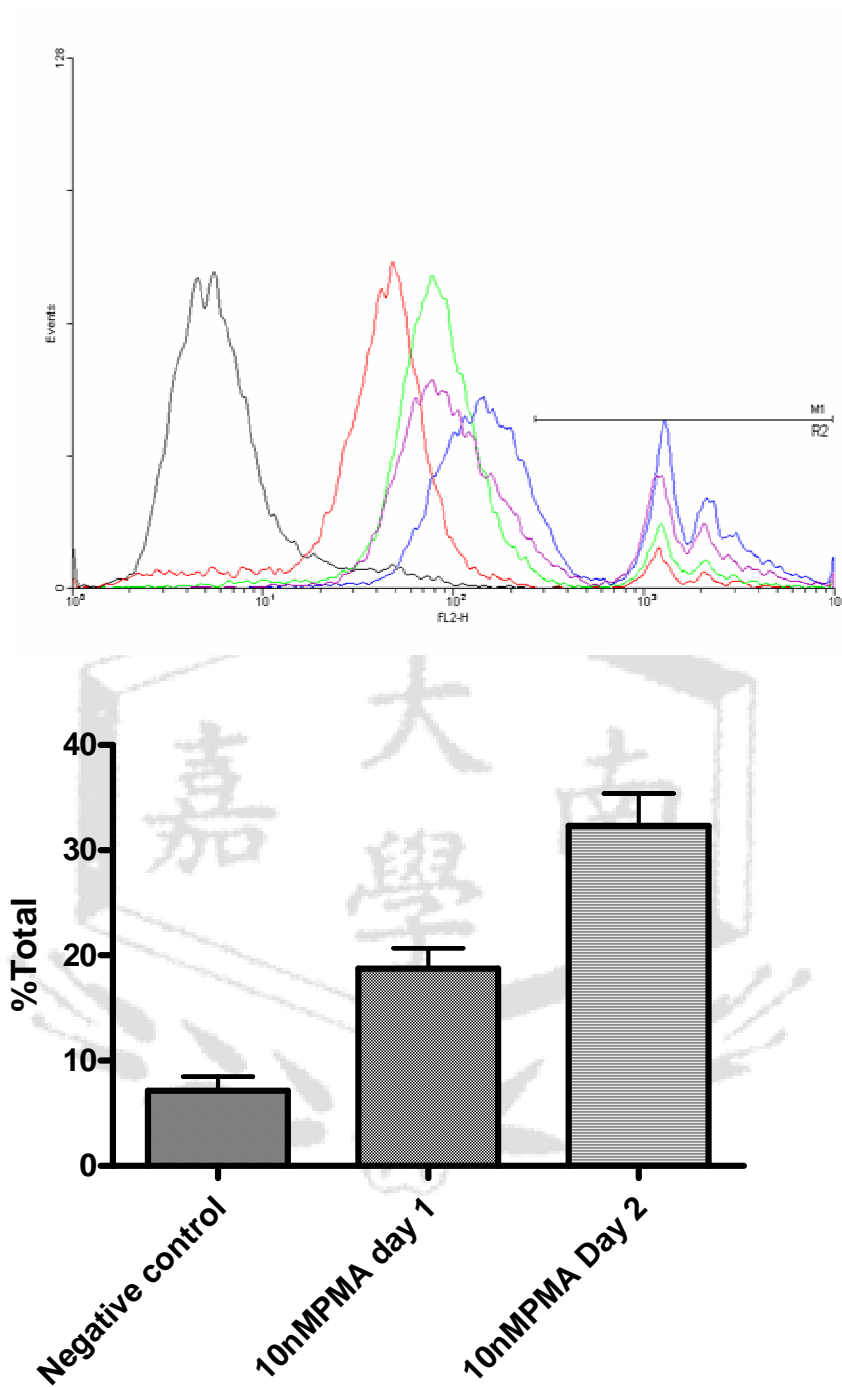
B



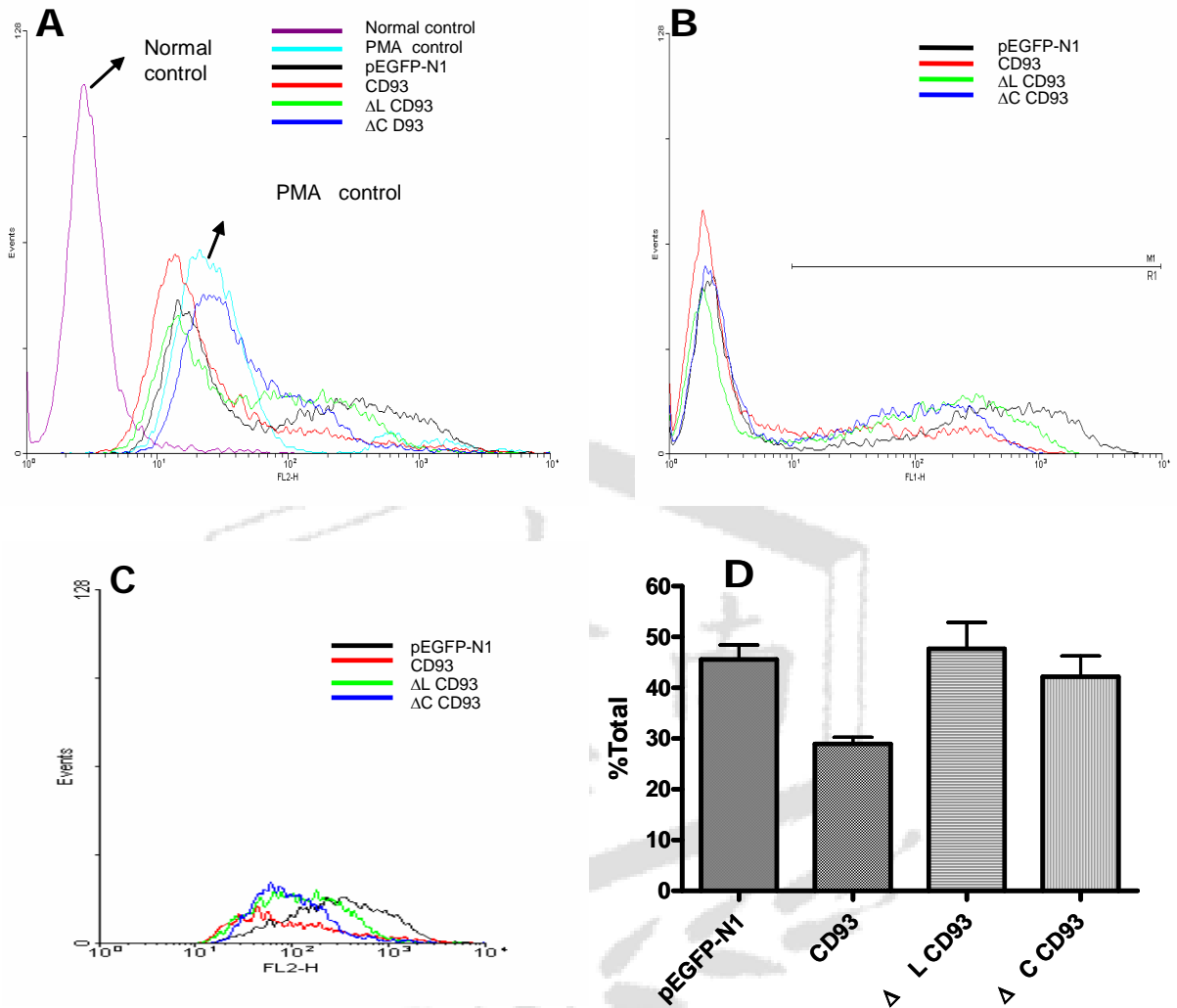
圖一、分別將 CD93、CD93- $\Delta$ L 及 CD93- $\Delta$ C 基因構築到螢光蛋白(GFP)表現載體 pEGFP-N1 (A)。以限制酶檢視構築在載體上基因之正確性 (B)。CD93-pEGFPN1 和 CD93- $\Delta$ C-pEGFPN1 以限制酶 EcoR I and BamH I 切割; CD93- $\Delta$ L-pEGFPN1 以限制酶 BamH I and Hind III 切割。



圖二、利用流式細胞分析儀偵測 THP-1 細胞經 PMA 刺激後的人類 CD93 表現。在 Histogram 圖中，定義 THP-1control 與 2Ab control 間約 10<sup>1</sup> 到 10<sup>4</sup> 螢光表現為 M1/R1 區域，圈選此區域定義為有表現 CD93 蛋白的細胞，每個組別都偵測 10<sup>4</sup> 顆細胞 (此為五次實驗中的代表)。



圖三、利用流式細胞分析儀偵測 THP-1 細胞經 PMA 刺激後吞噬乳膠顆粒的百分比 (此為四次實驗中的代表)。在 Histogram 圖中，定義  $2 \times 10^2$  到  $10^4$  螢光表現為 M1/R1 區域，圈選此區域定義為有吞噬乳膠顆粒的細胞。% Total : 有吞噬乳膠顆粒的細胞佔所有偵測細胞的百分比。每個組別都偵測  $10^4$  顆細胞。



圖四、利用流式細胞分析儀偵測轉染 CD93、CD93 $\Delta$ L、CD93 $\Delta$ C 之 THP-1 細胞

經 PMA 刺激後吞噬乳膠顆粒的百分比 (此為四次實驗中的代表)

A. THP-1 細胞吞入的乳膠顆粒螢光表現量 (紅光)

B. THP-1 細胞轉染入 CD93 不同片段表現螢光表現量 (綠光)

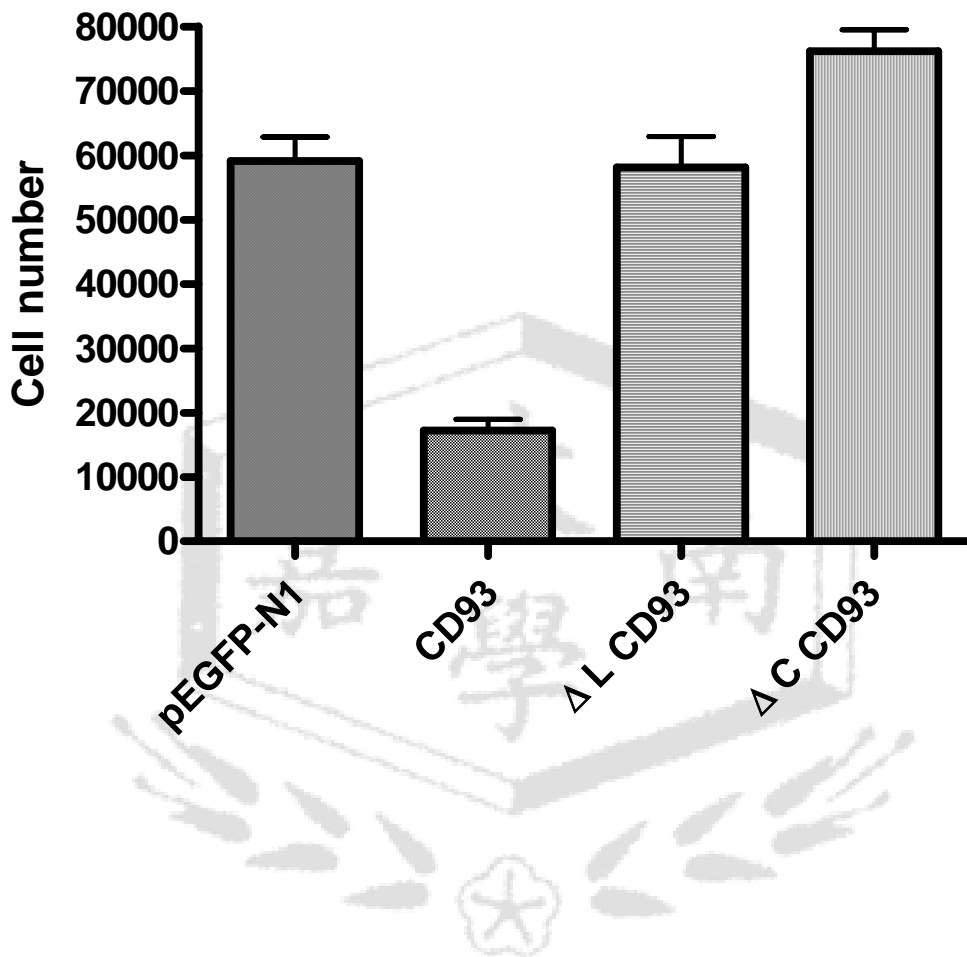
C. 轉染後 THP-1 細胞有吞入乳膠顆粒的細胞數與螢光表現量

藉由定義 B.圖中  $10^1$  到  $10^4$  的螢光表現區域為轉染陽性區 M1/R1，圈選此區域的細胞偵測其乳膠螢光量，每個組別偵測  $10^4$  顆細胞。

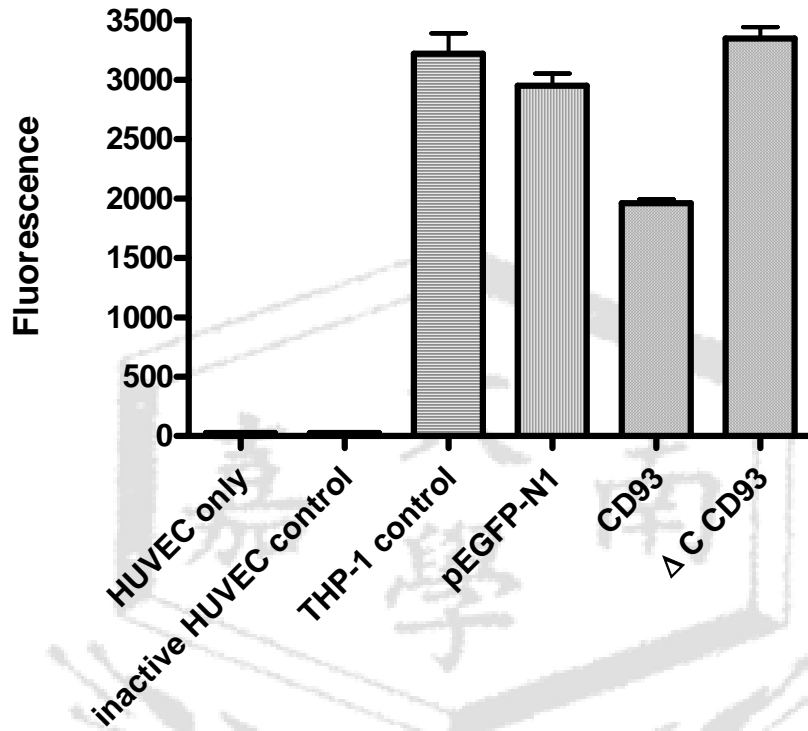
D. 轉染後 THP-1 細胞有吞噬乳膠顆粒的細胞數百分比

將圈選出的 C.圖的細胞除以所有偵測細胞，每個組別都偵測  $10^4$  顆細胞。  
% Total : 有吞噬乳膠顆粒的細胞佔所有偵測細胞的百分比。



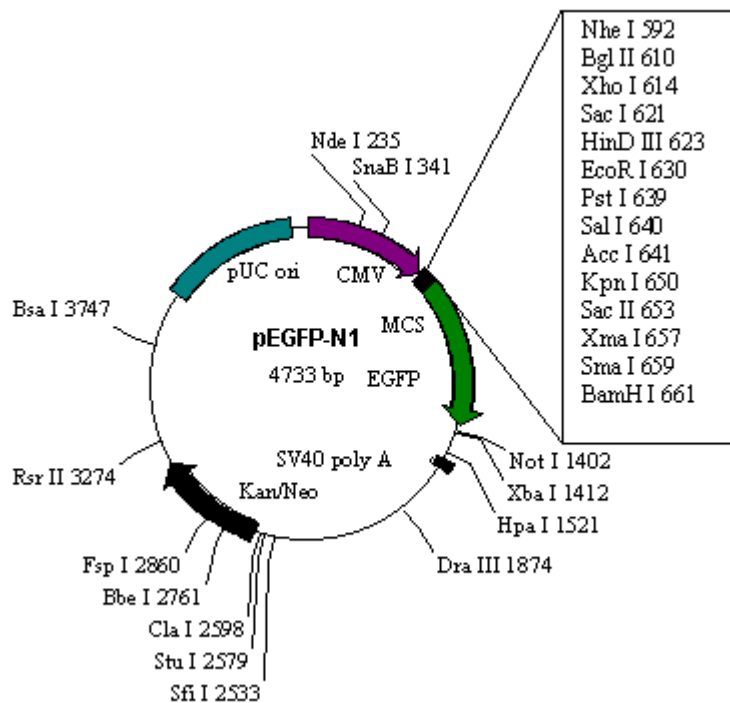


圖五、轉染 CD93、CD93 $\Delta L$ 、CD93 $\Delta C$  之 THP-1 細胞經 PMA 刺激後細胞分化黏著的分析圖 (此結果為三次實驗的代表)



	HUVEC cell	TNF- $\alpha$ activation	Labeled THP-1 cell
HUVEC only	+	-	-
Inactive HUVEC control	+	-	+
THP-1 control	+	+	+

圖六、轉染 CD93、CD93 $\Delta C$  之 THP-1 細胞黏著於 TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 細胞分析圖 (此為四次實驗中的代表)



GGGAGGTCATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGA 605  
Nhe I

CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCC 665  
Bgl II Xho I Sac I Hind III EcoR I Pst I Sal I/Acc I Kpn I Sac II Xma I/Sma I BamH I

ACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC 693  
Age I

附錄一、pEGFP-N1 質體的圖譜與選殖限制酶切點

( BD Biosciences Clontech)

**AJ295142 Homo sapiens mRNA for C1q receptor protein (CD93 gene)**

1 ctgcgccgga gtggctgcag ctcacccctc agctcccctt ggggccccagc tgggagccga  
61 gatagaagct cctgtcgccg ctgggcttct cgctcccgc agagggccac acagagaccg  
121 ggatggccac ctccatgggc ctgctgctgc tgetgctgct gctcctgacc cagcccgggg  
181 cggggacggg agctgacacg gaggcggtgg tctgcgtggg gaccgcctgc tacacggccc  
241 actcgggcaa gctgagcgt gccgaggccc agaaccactg caaccagaac gggggcaacc  
301 tggccactgt gaagagcaag gaggaggccc agcacgtcca gcgagtactg gccagctcc  
361 tgaggcggga ggagccctg acggcgagga tgagcaagtt ctggattggg ctccagcgag  
421 agaagggcaa gtgcctggac ctagtctgc cgctgaaggg ctcagctgg gtgggcgggg  
481 gggaggacac gccttactct aactggcaca aggagctccg gaactcgtgc atctccaag  
541 gctgtgtgtc tctgctgctg gacctgtccc agccctcct tcccagccgc ctccccaa  
601 ggtctgaggg cccctgtggg agcccaggct cccccgaag taacattgag ggctcgtgt  
661 gcaagttcag cttcaaaggc atgtgccggc ctctggccct ggggggccc ggtcaggtga  
721 cctacaccac ccccttcag accaccagt cctccttggg ggetgtgccc ttgectctg  
781 cggccaatgt agcctgtggg gaaggtgaca aggacgagac tcagagtcat tatttctgt  
841 gcaaggagaa ggccccgat gtgttcgact ggggcagctc gggccccctc tgtgtcagcc  
901 ccaagtatgg ctgcaactc aacaatgggg gctgccacca ggactgctt gaaggggggg  
961 atggctcctt cctctcgggc tgccgaccag gattccggct gctggatgac ctggtgacct  
1021 gtgcctctcg aaaccttgc agctccagcc catgtcgtgg gggggccacg tgcgcctgg  
1081 gacccatgg gaaaaactac acgtgccgt gccccaagg gtaccagctg gactcgagtc  
1141 agctggactg tgtggactg gatgaatgcc aggactcccc ctgtgccag gagtgtgca  
1201 acaccttgg gggctccgc tgcgaatgct gggttggcta tgagccgggc ggtcctggag  
1261 agggggcctg tcaggatgtg gatgagtgtg ctctgggtcg ctcgccttgc gccagggct  
1321 gcaccaacac agatggctca tttactgct cctgtgagga gggctacgtc ctggccgggg  
1381 aggacgggac tcagtgccag gacgtggatg agtgtgtggg cccggggggc cccctctg  
1441 acagcttgtg cttcaacaca caagggtcct tccactgtgg ctgcctgcca ggctgggtgc  
1501 tggccccaaa tggggtctct tgcacatgg ggctgtgtc tctgggacca ccatctgggc  
1561 ccccgatga ggaggacaaa ggagagaaag aaggagcac cgtgccccgc gctgcaacag  
1621 ccagtccac aaggggccc gagggcacc ccaaggctac accaccaca agtagacctt  
1681 cgctgtcacc tgacgcccc atcacatctg cccactcaa gatgtggcc cccagtgggt  
1741 cctcagcgt ctggaggag cccagatcc atcacgccac agctgcctct ggccccagg  
1801 agcctgcagg tggggactcc tccgtggcca cacaaaaca cgatggcact gacgggcaaa  
1861 agctgctttt attctacac ctaggcaccg tggtgccat cctactcctg ctggccctgg  
1921 ctctgggct actggtctat cgcaagcga gagcgaagag ggaggagaag aaggagaaga  
1981 agccccagaa tgcggcagac agttactcct gggttccaga gcgagctgag agcagggcca  
2041 tggagaacca gtacagtccg acacctggga cagactgctg aaagtgaggt ggcctagag

2101 aactagagt caccagccac catcctcaga gctttgaact cccattcca aagggcacc  
2161 cacatTTTT tGaaagactg gactggaatc ttagcaaaca attgtaagtc tctccttaa  
2221 aggcccttg gaacatgcag gtatttcta cgggtgttg atgttctga agtggagct  
2281 gtgtgtggc gtgccacgt ggggattcg tgactctata atgattgta cccccctc  
2341 ctttcaaat tccaatgta ccaattcgg atcagggtgt gaggaggctg gggctaaggg  
2401 gctccccga atatcttc tgctcactc caccatctaa gaggaaagg tgagttgctc  
2461 atgtgatta ggattgaaat gattgttc tctcctagg atgaaaacta aatcaattaa  
2521 ttattcaatt aggtagaag atctggttt ttgtcaaag ggaacatgt cggactgga  
2581 acattcttt acattgcat tctccattt cggcagcaca agtcttgcta aatgtgatac  
2641 tgtgacatc ctccagaatg gccagaagt caattaacct cttaggtggc aaggaggcag  
2701 gaagtgcctc ttagttctt acattctaa tagccttggg ttatttgca aaggaagctt  
2761 gaaaatatg agaaaagtg cttgaagtgc attacaggtg ttgtgaagt cacataatct  
2821 acggggctag ggcgagagag gccagggatt tgtcacaga tactgaatt aatcatcca  
2881 aatgtactga ggtaccaca cactgacta cggatgtgat caactaac aaggaaaca  
2941 attcaaggac aacctgtctt tgaccaggg caggcctcag acaccctgcc tgtggccccg  
3001 cctccactc atctgcccc gaatgccagt gctccgagct cagacagagg aagcctgca  
3061 gaaagttca tcaggctgtt tctaaagga tgtgtgaacg ggagatgat cactgtgtt  
3121 tGaaagttgt cattttaaag catttagca cagttcatag tccacagttg atgcagcatc  
3181 ctgagattt aaatcctgaa gtgtgggtgg cgcacacacc aagtagggag ctagtcaggc  
3241 agtttgetta aggaacttt gtctctgctc tcttctt aaaattgggg gtaaggaggg  
3301 aaggaagagg gaaagagatg actaactaaa atcattt

## 附錄二、人類 CD93 蛋白之 cDNA 序列