

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0025- 05

人白血病细胞系 J6-1 变异 M-CSF 的表达及受体结合活性研究

曹震宇, 饶青, 李戈, 张斌, 林永敏, 郑国光, 吴克复(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所, 天津 300020)

[摘要] 目的: 从人白血病细胞系 J6-1 克隆并表达变异的 M-CSF 的功能区, 研究其受体结合活性。方法: RT-PCR 克隆 muM-CSF, 并在大肠杆菌 BL21

[关键词] 巨噬细胞集落刺激因子; 原核表达; 酶联免疫吸附分析

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Expression of Mutant M-CSF from Human Leukemic Cell Line J6-1 and the Binding Activity for Its Receptor

CAO Zhen-yu, RAO Qing, LI Ge, ZHANG Bin, LING Yong-min, ZHENG Guo-guang, WU Ke-fu(Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To clone and express functional part of mutant M-CSF (muM-CSF) from human leukemic cell line J6-1 and investigate its Kd for dissociation and biological activity on the proliferation of J6-1. **Method:** Functional part of muM-CSF was cloned by RT-PCR and inserted into pET32c(+) and expressed in *E. coli* BL212+ affinity column and antibody linked affinity column. ELISA was performed to define the Kd of the muM-CSF to its receptor. Colony formation assay was performed to test its effects on the proliferation of J6-1. **Results:** The protein was purified and its Kd to the receptor was 3.7 nmol/L. muM-CSF showed elevated proliferation-stimulating potential than normal M-CSF. **Conclusion:** muM-CSF could be expressed in the pET32c(+), BL21 system and the muM-CSF showed elevated proliferation promoting ability as to normal M-CSF.

[Key words] macrophage colony-stimulating factor (M-CSF); prokaryotic expression; ELISA

* 巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), 又称集落刺激因子-1(colony stimulating factor, CSF-1)是多功能细胞因子, 参与造血、妊娠、炎症、肿瘤等多种生理和病理过程^[14]。M-CSF 为单基因编码的同源二聚体蛋白, 由于选择性剪接转录产物的不同, 有多种异型体(Isoforms), 如分泌型 M-CSF, 膜结合型 M-CSF, 基质结合型 M-CSF(糖蛋白 M-CSF)等。M-CSF 受体由原癌基因 *c-fms* 编码, 为酪氨酸激酶受体。人白血病细胞系 J6-1 高表达 M-CSF 且有多种异型体^[5], 表现为: (1)用免疫酶标法在 J6-1 细胞的细胞膜、细胞质和细胞核中都能测出 M-CSF; (2)用免疫沉淀和蛋白印记法测出 J6-1 细胞的 M-CSF

呈现不同的分子量; (3)用 RT-PCR 法测出 J6-1 细胞的 M-CSF 有多种转录版本。本研究从该细胞系克隆分泌型 M-CSF, 在原核细胞表达其胞外活性片段, 并初步研究其生物学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

[基金项目] 天津市科技发展计划项目资助(003119311)

[作者简介] 曹震宇(1976-), 男, 江苏人, 博士研究生, 主要从事细胞因子研究。

[通讯作者] 吴克复, E-mail: kfwu@public.tpt.tj.cn

原核表达载体 pET32c(+)、工程菌 BL21E. coli DH5 α 为本室保存。Trizol™ 试剂盒, M-MLV™ 逆转录酶, T4 DNA 连接酶购自 GIBCOL/BRL。Taq DNA 合成酶购自 Clonetech。DNA 限制性内切酶为宝生物(TAKARA)产品。Wizard PCR Purification System 试剂盒购自 PROMEGA。M-CSF 标准品购自 PerTech EC. LTD(UK), M-CSF 受体片段^[6]和鼠抗人 M-CSF 单抗 B5^[7]为本室制备,鼠抗人 M-CSF 单抗购自 R&D Inc., 羊抗鼠 IgG, 辣根过氧化物酶偶联的生物素-卵白素复合物(ABC 复合物)为 Vector Lab Inc 产品。溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B 购自 Pharmacia。所有引物合成由上海生工公司进行,所有 DNA 测序由上海博亚生物公司测定。

1.2 J6-1 细胞系 M-CSF 的克隆和测序

J6-1 细胞总 RNA 由 Trizol™ 试剂盒提取。逆转录使用 M-MLV™ 逆转录酶。M-CSF 的克隆引物根据 GENE BANK 提供的 M-CSF 的 cDNA 序列设计为: P 上游: 5' GAG CCA GCT GCC CCG TAT GAC 3'; P 下游: 5' CCC TCT ACA CTG GCA GTT CCA C 3'; 克隆片段插入 T 载体, 测序后通过 GENE BANK 比较其同源性。

1.3 重组 muM-CSF 原核表达载体的构建

以 PCR 的方法从 1.2 的所得质粒的编码区中克隆 muM-CSF 的功能区, 在克隆的功能区的两端由 PCR 的方法加入 2 处酶切位点 Nco I 和 Sal I, 引物为 P 正向引物: 5' CTTGCCATGGAGGAGGTCTCGGAGTACTG 3' (Nco I); P 反向引物: 5' ATGTGTCGACCTCCTG-GAGCTGCGGGCTG 3' (Sal I)。PCR 产物片段经酶切纯化后插入原核表达质粒 pET32c(+), 转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 粗筛后选取阳性克隆进行测序。测序鉴定后提取重组的质粒, 转染工程菌 BL21\mug/ml)卡那霉素(15 μ g/ml)双抗性 LB 筛选阳性克隆并鉴定。

1.4 重组 muM-CSF 的诱导表达和纯化

重组 BL21 工程菌接种双抗性 LB 培养基 1 L, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6, 加入 IPTG 诱导(100 μ g/ml), 20 $^{\circ}$ C 继续振荡培养 36 h。菌体收集后加入结合缓冲液(Tirs · Cl 20 mmol/L, NaCl 0.5 mmol/L, PMSF 0.1 mmol/L), 超声波粉碎(60% 能量, 300 s)。离心破碎菌体(20 000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)取上清进行常规镍柱整合层析纯化。咪唑溶液洗脱重组蛋白。将洗脱液透析过夜(Tris · Cl, 50 mmol/L, pH8.0, 4 $^{\circ}$ C)以除去咪唑。凝血酶切除菌体片段(凝血酶: 重组蛋白 = 0.2 μ g: 1 mg, 25 $^{\circ}$ C, 2 h)后, 反应液进行抗体亲和层析纯化。亲和层析介质制备使用纯化鼠抗人 M-CSF 单

抗 B5^[7] 耦联溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B, 用甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.7)洗脱重组蛋白。用碳酸氢钠溶液(1 mol/L)快速中和和洗脱液至 pH7.4 后透析(PBS, pH7.4, 4 $^{\circ}$ C)。BCA 法测定重组蛋白的浓度。12% SDS-PAGE 电泳分析各组分。

1.5 重组异型 M-CSF 的受体结合分析

实验方法和数据处理参照 Novokhatny 等^[8]的方法进行: 在 96 孔酶标板加入 100 μ l 包被液(Na₂CO₃-NaHCO₃ 0.05 mol/L, pH9.6, M-CSF 受体 10 nmol/L), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 洗 3 遍(PBS 0.01 mol/L, Tween-20, 0.05%), 封闭液(PBS 含 0.2% 明胶, 1% 牛血清白蛋白)封闭 2 h 后甩去封闭液, 洗涤 3 遍。加入 100 μ l 梯度浓度的重组 muM-CSF, 以牛血清白蛋白溶液作对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。除去反应液后依次加入抗 M-CSF 单抗(1:100 稀释), 羊抗鼠 IgG, 辣根过氧化物酶偶联的生物素-卵白素复合物(ABC 复合物)各反应 2 h, OPD 显色, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪(Vamed Engineering, Austria)测定各孔 OD_{492nm} 吸光值。每个因子浓度设 3 孔取均值。将数据代入 $\Delta A = \Delta A_{MAX} \times L / (Kd + L)$ 即 $\Delta A = -Kd \times \Delta A / L - \Delta A_{MAX}$ (ΔA 为实验组与对照组的 OD 值的差, L 为加入的重组的 muM-CSF 的浓度。回归分析计算 Kd。

1.6 J6-1 细胞的集落形成试验

集落形成试验参照本室方法^[9], 在每孔的培养体系中加入重组 muM-CSF 至终浓度 20 μ g/ml, 重复 3 孔, 以正常 M-CSF 和 PBS 为对照。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 5 d, 计数形成的细胞集落, 40 个细胞以上的细胞丛为一个集落。以 3 孔的集落数均值为集落数。

2 结果

2.1 J6-1 细胞系中 M-CSF 的克隆

由 J6-1 细胞系克隆出 2 种长度为 768 bp 和 1 662 bp 的 M-CSF 的 cDNA 片段, 测序后, 与 GENE BANK 中提供的序列比较, 小片段与 GENE BANK 中的同源性为 99.2%, 大片段的同源性为 99.4%, 即小片段编码膜结合形式的 M-CSF 而大片段则为分泌型 M-CSF 的转录产物。本实验选择大片段作为模版进行其功能的研究。

2.2 原核表达质粒的构建

本实验选择除去信号肽的胞外编码区进行重组蛋白的制备进而研究其生物学性质, 该片段包含 M-CSF 的所有生物活性区^[10]。插入片段长度为 1 401 bp, 并采取在下游引物中加入一个碱基的方式将质粒的读框改成 pET32b(+) 的 C 端肽段, 从而减小重组蛋白中非相关氨基酸的数量, 并在末端引入另一组氨酸片段, 方

便大规模制备时的纯化(图2)。对多个氨苄青霉素抗性菌落克隆,直接进行PCR检测结果如图3(A),选取

其中之一进行测序证实插入片段与来源片段一致,其质粒电泳分析如图3(B)。

图1 分泌型 muM-CSF 的结构及克隆表达的片段

Fig.1 Structure of s-muM-CSF and the fragment expressed

图2 原核表达载体的结构

Fig.2 Structure of expression vector

图3 菌落PCR结果(A)和重组质粒的电泳结果(B)
Fig.3 Detection of positive germ clones (A) and the electrophoresis of the constructed plasmid (B)

1~6: Different clones, M1, DNA marker DL 2000;

P: Plasmid; M2: DNA marker λ -Hind III

2.3 工程菌 BL21 的制备和重组 muM-CSF 诱导表达

工程菌 BL21 trx B(DE3)为硫氧还蛋白还原酶(trx B)突变菌株,利于重组蛋白二硫键的形成从而促进重组蛋白正确折叠。对表达重组 muM-CSF 的工程菌 BL21 表达蛋白的细胞内定位结果表明,重组蛋白出现在细胞浆和包涵体中,且发现低温有利于重组蛋白以可溶性形式表达。实验中采取了利于重组蛋白可溶性表达的最适温度 20℃ 进行诱导表达。

2.4 重组 muM-CSF 的纯化

重组蛋白的纯化结果如图4,本实验采取 Ni^{2+} 整合层析和抗体亲和层析两步纯化蛋白。以凝血酶酶切重组蛋白得到的重组 muM-CSF 的相对分子量约为 55 800,纯化产物经亲和层析后经 SDS-PAGE 电泳分析为一条区带(图4)。

图4 重组 muM-CSF 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.4 PAGE analysis of recombinant M-CSF expressed in *E. coli* BL21

1~3: Different concentration eluted uncleaved recombinant muM-CSF; 4: Uncleaved recombinant muM-CSF; 5~7: muM-CSF eluted from B5

2.5 重组 muM-CSF 的受体结合活性

结合曲线(图5)表明在 M-CSF 受体量一定时,随

muM-CSF 浓度的增加与 M-CSF 受体的结合量也在一定范围内增加。实验中对 muM-CSF 与其受体的解离常数的分析如图 5, 通过回归分析确定 muM-CSF 与其受体的解离常数 $K_d = 3.7 \text{ nmol/L}$ ($R^2 = 0.99$)。

图 5 muM-CSF 与 M-CSF 受体的结合曲线

Fig. 5 Receptor binding activity of muM-CSF by ELISA

2.6 重组 muM-CSF 的生物活性分析

已知白血病细胞系 J6-1 共表达 M-CSF 及其受体^[11]。培养体系中加入 M-CSF 可增加集落形成。本文纯化的 muM-CSF 对其集落形成的刺激活性, 如图 6 所示: 重组 muM-CSF 刺激形成的集落数高于正常 M-CSF 的 2.6 倍 ($P < 0.01$)。

图 6 muM-CSF 对 J6-1 细胞集落形成的作用

Fig. 6 Clone formation analysis of muM-CSF to J6-1 cells

3 讨论

M-CSF 最早发现于造血系统, 是造血细胞分化中出现较晚的因子, 主要促进单核-巨噬细胞的分化。以后的研究表明, M-CSF 来源广泛, 参与多种生理和病理

过程。与心血管疾病, 癌症, 艾滋病^[12], 老年性痴呆, 风湿性关节炎^[8]等有关。在一些恶性肿瘤中, M-CSF 和其受体形成的自分泌环路是细胞恶变的重要环节^[13]。对 M-CSF 在人白血病细胞系 J6-1 中的作用研究表明, M-CSF 和其受体存在自分泌环路和自家并置性刺激 (auto-juxtacrine) 作用, 并且因子与受体的内化和降解速度变慢^[14]。本实验从该细胞系克隆了 M-CSF 的编码序列, 并进行原核表达, 发现 J6-1 细胞来源的 M-CSF 有多个基因位点突变。对该因子和受体的结合分析发现, 二者的解离常数低于正常的 M-CSF^[15]。将重组 muM-CSF 作用于 J6-1 细胞时, 发现其刺激细胞增殖的能力高于正常的 M-CSF, 重组 muM-CSF 在低浓度即可刺激细胞增殖, 亦即低浓度的重组 muM-CSF 即可刺激 J6-1 细胞增殖, 提高肿瘤细胞对生长信号的反应性, 获得转化的重要性质—不受控制的生长能力 (self-sufficiency in growth signals)^[16]。

对于 M-CSF 的结构分析表明, M-CSF 受体结合区位于前 150 个氨基酸, 是典型的生长因子四螺旋结构 (up-up-down-down)。迄今对 M-CSF 结构的认识仅限于此^[17]。有多个结构域的蛋白, 其生物活性是整体作用的结果, 并非只有部分结构域决定的。本研究表达的重组 muM-CSF 包含了完整的胞外结构, 该因子的突变位点不在前 150 个氨基酸, 似乎难以解释重组 muM-CSF 与其受体结合能力的变化。但是, 对下游氨基酸突变的分析发现, 第 408 和 440 位的氨基酸突变是由亮氨酸变为脯氨酸, 脯氨酸是蛋白转角结构的主要组分, 这种突变有可能改变所在结构域的构型, 影响 muM-CSF 蛋白的整体结构。另外, 与真核系统表达的蛋白不同, 原核细胞表达的重组蛋白缺少糖基化修饰, 势必影响重组蛋白的生物学特性, 是影响重组 muM-CSF 生物活性的第二种可能。第三, 本研究采用的原核表达系统残存载体的部分序列也可能导致重组蛋白性质的改变。

[参考文献]

- [1] Chambers SK, Kacinski BM, Carcangiu ML, *et al.* Over expression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: A poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1 [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 999-1000.
- [2] Suzuki M, Tamura N, Kobayashi H, *et al.* Clinical significance of combined use of macrophage colony-stimulating factor and squamous cell carcinoma antigen as a selective diagnostic marker for squamous cell carcinoma arising in mature cystic teratoma of the ovary [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 77: 405-409.
- [3] Toy EP, Chambers JT, Kacinski BM, *et al.* The activated macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) receptor as a predictor of poor outcome in advanced epithelial ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 80: 194-200.

- [4] Yang WQ, Wu KF, Zhao MH, *et al.* Co-expression of M-CSF with its receptor in human hepatoma cells and its potential roles [J]. *Chin J Cancer Res*, 1999, 11(2): 79-84.
- [5] Wu KF. On bio-diversity, complexity of M-CSF and its receptor [J]. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(20): 1918-1920.
- [6] Luo SQ, Zheng DX, Liu YX, *et al.* Analysis of ligand-binding domain of macrophage colony-stimulating receptor [J]. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(13): 1191-1194.
- [7] 耿以琪, 饶青, 孔健, 等. 白血病细胞膜相关因子(MAF-J6-1)单克隆抗体的制备及性质[J]. *中华血液学杂志*, 1994, 15(12): 630-632.
- [8] Novokhatny V, Medved L, Lijnen HR, *et al.* Tissue-type plasmin activator (tPA) interacts with urokinase-type plasminogen activator (uPA) via tPA's lysine binding site [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 8680-8685.
- [9] Wu KF, Rao Q, Zheng GG, *et al.* Enhancement of J6-1 human leukemic cell proliferation by cell-cell contact: Role of an M-CSF-like membrane-associated growth factor [J]. *Leukemia Res*, 1994, 18: 843-849.
- [10] Fixe P, Praloran V. M-CSF: Haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? [J]. *Cytokine*, 1998, 10(1): 32-37.
- [11] Tang SS, Zheng GG, Wu KF, *et al.* Autocrine and possible intracrine regulation of HL-60 cell proliferation by macrophage colony-stimulation factor [J]. *Leukemia Res*, 2001, 25(12): 1107-1114.
- [12] Joseph K, Lynne C, Steven F, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 4955-4960.
- [13] Martine FR, Charles JS. Mouse NIH3T3 cells expressing human colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptors overgrow in serum-free medium containing human CSF-1 as their only growth factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7924-7929.
- [14] Tang SS, Liu HZ, Chen GP, *et al.* Half-life and internalization mediated by membrane bound macrophage colony-stimulating factor [J]. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(6): 627-632.
- [15] 罗寿青, 郑德先, 饶青, 等. rhM-CSFR 在大肠杆菌中的表达及其配基结合活性分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(5): 709-713.
- [16] Douglas H, Robert AW. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- [17] Douglas PC, Janis W, Dirk A, *et al.* Human macrophage-colony stimulating factor: Alternative RNA and protein processing from a single gene [J]. *Mol Immunol*, 1988, 25(8): 761-770.

[收稿日期] 2002-11-05

[修回日期] 2002-12-05

《肿瘤防治杂志》10周年刊庆暨肿瘤防治研究新进展研讨会征文通知

2003年为《肿瘤防治杂志》创刊10周年。为了庆祝创刊10周年,杂志社拟召开“《肿瘤防治杂志》10周年刊庆暨肿瘤防治研究新进展研讨会”。会议有关事项通知如下。

一、参会人员

①本刊编委及特邀审稿人;②本刊作者及读者;③有无论文均可参会。

二、会议主要内容

①会议期间重组新一届编委会;②6~10名国内著名专家(本杂志社编委)作肿瘤防治研究新进展学术报告;③自然来稿作者作大会学术交流。

三、会议时间及地点

时间:初步定于2003年9月26~30日。地点:青岛、杭州待定(具体会址见正式通知)。

四、征文内容与要求

会议主要议题为“肿瘤三级预防及热点问题研究的现状”。内容包括:①肿瘤流行病学与病因学研究;②肿瘤诊断方法与治疗策略研究;③晚期肿瘤患者的生活质量问题等。征文要求:①未在全国性学术会议及全国性公开刊物发表的基础或临床研究、综述、短篇报告等学术论文;②论文的结构与撰写格式以《肿瘤防治杂志》相关栏目的格式为准;③稿件请用word格式制作,A4纸打印,寄稿件时请附软盘(或同时发E-mail: yjzszs@163169.net),在信封上注明“征文”字样;④来稿请盖所在单位公章(请作者注明联系电话、E-mail)。参会论文择优在《肿瘤防治杂志》上正式发表。征文截稿日期:2003年8月1日(以当地邮戳为准)。

五、其他事宜

来稿请寄:济南市济南路440号·山东省肿瘤医院内·肿瘤防治杂志社收

联系人:杨靖,钟伟

联系电话:0531-7984777-82516

E-mail: yjzszs@163169.net