

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0133-05

MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的构建、表达及其双重生物学功能的初步研究

张意¹, 陈国友¹, 王建莉², 卢琳¹, 蒋应明¹, 于益芝¹, 曹雪涛^{1,2} (1. 第二军医大学免疫研究所, 上海 200433; 2. 浙江大学免疫学研究所, 杭州 310031)

[摘要] **目的:** 利用基因工程技术制备具有双重生物学活性的 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白。**方法:** 通过引物设计和分级克隆的策略构建了 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因真核表达载体, MIP-2 γ 与 GM-CSF 由 (Gly₄Ser)₃ 相连; 瞬时转染 293-T 细胞后收集含融合蛋白的细胞培养上清; 研究了该融合蛋白在体外的促造血细胞增殖活性和对免疫细胞的趋化活性。**结果:** MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因载体构建正确; 融合蛋白分子量约为 24.9 kD; 初步生物学功能研究表明, 融合蛋白能有效促进 TF-1 细胞增殖, 比活性约为 2.2×10^7 IU/mg, 并能显著刺激骨髓细胞的集落形成; 融合蛋白能有效趋化未成熟树突状细胞和 CD3⁺T 细胞。**结论:** MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白具有促进造血和趋化免疫细胞的双重活性, 有望成为在造血调控和抗肿瘤免疫中具有良好开发应用前景的新型细胞因子。

[关键词] 融合蛋白; MIP-2 γ ; GM-CSF; 造血; 趋化

[中图分类号] Q784; Q786 [文献标识码] A

Expression of MIP-2 γ /GM-CSF Fusion Protein and Preliminary Study of Its Biological Bifunction

ZHANG Yi, CHEN Guo-you, WANG Jian-li, LU Lin, JIANG Ying-ming, YU Yi-zhi, CAO Xue-tao (1. Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Immunology, Zhejiang University, Hangzhou, 310031, China)

[Abstract] **Objective:** To generate a new kind of cytokine MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein by genetic engineering technology and investigate its biological bifunction. **Methods:** The eukaryotic expressing vector for MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein was constructed by primer design and step by step cloning. MIP-2 γ gene and GM-CSF gene were linked via a linker sequence (Gly₄Ser)₃. After transient expression, the cell supernatants of 293-T cells containing the aimed protein were obtained. The hematopoietic and chemotactic activities of the fusion protein were investigated *in vitro*. **Results:** MIP-2 γ /GM-CSF fusion gene vector was confirmed by restriction analysis and sequencing analysis. The molecular weight of the protein was about 24.9 kD. MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein could stimulate the proliferation of TF-1 cells like GM-CSF. The specific activity of the fusion protein was 2.2×10^7 IU/mg. The fusion protein was found to be effective in stimulating bone marrow cell colony-formation and chemoattracting immature dendritic cells and CD3⁺T cells. **Conclusion:** MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein exhibits bifunctions which including the promotion of hematopoiesis and chemoattraction of immune cells, suggesting that the fusion protein can be used to regulate hematopoiesis and antitumor immune response as a new kind of cytokine.

[Key words] fusion protein; MIP-2 γ ; GM-CSF; hematopoiesis; chemotaxis

* γ 型巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein-2 gamma, MIP-2 γ) 是我们从人树突状细胞 (dendritic cells DC) 的 cDNA 文库中通过大规模测序而独立发现的一个不含 ELR 基序的新型 CXC 类趋化因子 (chemokine)^[1]。初步的研究结果表明, 该新型趋化因子不仅对树突状细胞、中性粒细胞等免疫活性细胞有显著的趋化作用, 而且还具有一定的造血调控活性, 能

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30130170, 39970839) 国家 973 免疫学项目 (2001CB510002), 国家 863 项目 (2001AA215091)

[作者简介] 张意 (1976-), 男, 安徽芜湖人, 博士生, 主要从事肿瘤免疫、蛋白质工程的研究

[通讯作者] 曹雪涛, Email: caoxt@public3.sta.net.cn

协助 GM-CSF 等促进造血前体细胞的增殖与分化。GM-CSF 是一种具有广泛生物学活性的细胞因子,不仅具有刺激造血前体的增殖与分化的活性,还可以促进 DC 的成熟,增强 DC 的抗原递呈功能,增强免疫效应细胞的抗肿瘤效应^[24]。MIP-2 γ 与 GM-CSF 在功能上具有一定的互补性,所以将两者融合在一起制备融合蛋白,该融合蛋白可能在肿瘤免疫和促进造血方面依次发挥“趋化和聚集”、“激活和增强”免疫和造血细胞的功能,有望成为在肿瘤免疫和造血调控中具有更佳生物学活性的新型重组细胞因子。

1 材料与方法

1.1 工具酶与主要试剂

限制性内切酶, rTaq 酶, T4 DNA 连接酶等均购自 NEB 公司。Superfect 转染试剂购自 Qiagen 公司。人 GM-CSF 标准品 (1.11 $\times 10^7$ IU/mg) 购自先灵葆雅公司。Quantkinetu 人 GM-CSF 检测试剂盒、购自 R&D 公司。MethCulttuH4230 培养基购自 Stem Cell 公司。Trans well 趋化小室购自 Becton Dickson 公司。重组 MIP-2 γ 由我们自行制备(纯度 > 98%, 200 μ g/ml, 内毒素含量 < 0.03 Eu/ μ g 蛋白)。MACS 分离柱购自 Miltenvi Biotec 公司。

1.2 质粒与菌株

pcDNA-3.1/myc-His(-)B/hMIP-2 γ 、pGEM-3Z/hGM-CSF 质粒为本所构建,大肠杆菌 DH5 α 为本所保存。

1.3 引物合成与 PCR 扩增

设计合成 4 条引物。hMIP-2 γ 上游引物:5'-CG-GCTAGCGATGTCCTGCTCCAC-3' 是 MIP-2 γ 5' 端编码的序列编码其 5' 端外加 Nhe I 酶切位点和保护碱基 CG。下游引物:5'-CGGGATCCACCACCGCCAGATC-CACCGCCACCTTCTTCGTAGAACCTGCG-3' 是连接序列的前 30 个碱基和 MIP-2 γ 3' 端编码的后 18 个碱基,外加保护碱基 CG。hGM-CSF 上游引物:5'-CGGGATCCG-GTGCGCGCGATCTGCACCCGCCGCT-3' 是连接序列的后 15 个碱基和 hGM-CSF 5' 端编码的 15 个碱基序列,5' 端加保护碱基 CG。下游引物:5'-GGAAGCTTCACTCCTGGACTGGCTC-3' 是 hGM-端的序列。其 5' 端外加 Hind III 酶切位点和保护碱基 CG。两对引物分别以 pcDNA-3.1/myc-His(-)B/MIP-2 γ 和 pGEM-3z/hGM-CSF 为模板,按常规方法进行 PCR 反应。

1.4 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因表达载体的构建

hMIP-2 γ 的 PCR 产物用 Nhe I、BamH I 双酶切,与用相同酶切后的 pcDNA-3.1/myc-His(-)A 载体连

接,构建 pcDNA-3.1/myc-His(-)A/MIP-2 γ 载体。hGM-CSF 的 PCR 产物经 BamH I 和 Hind III 酶切,与经相应酶切的 pcDNA-3.1/myc-His(-)A/MIP-2 γ 载体连接,转化 DH5 α , 抽提质粒,以 Nhe I 和 Hind III 双酶切筛选目的克隆。

1.5 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因的序列测定

采用双脱氧终止法在美国 ABI 公司的 377 型自动序列分析仪上进行测定。上游测序引物为 5'-CTA-GAGAACCCACTGCTTACTG-3'; 下游测序引物是 5'-GACGGCGCTATTCAGATCCTC-3'。

1.6 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因的表达和融合蛋白的鉴定

用 Superfect 转染试剂将构建的 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因真核表达载体瞬时转染 293-T 细胞 (1 $\times 10^6$ /ml)。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 h 后收集细胞培养上清,进行 Western blot 分析,并以 Quantkine[®] 人 GM-CSF 检测试剂盒测定细胞上清中 GM-CSF 含量。

1.7 体外促 TF-1 细胞增殖实验

设 3 个实验组,分别为 GM-CSF 标准品组、含 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的细胞上清组、GM-CSF 与 MIP-2 γ 联合应用组(摩尔比 1:1),以 1640 培养基稀释 3 组样品使其所含的细胞因子浓度均为 0.4 ng/ml,各取 100 μ l 样品加入 96 孔培养板,依次做 2 倍稀释,每孔加入 100 μ l TF-1 细胞 (2 $\times 10^5$ cells/ml),以 MTT 掺入法^[5]测定其刺激 GM-CSF 依赖细胞株 TF-1 的增殖活性,以 10% SDS 溶解结晶,检测 OD₅₇₀ 值。绘制剂量-反应曲线。

1.8 骨髓集落形成实验

按说明书操作,稀释 GM-CSF 标准品组、含 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的细胞上清组、GM-CSF 与 MIP-2 γ /联合应用组(摩尔比 1:1),使其所含的细胞因子浓度均为 30 ng/ml,各取 400 μ l 加入 6 孔板,均依次做 2 倍稀释;采取胸外科手术患者的肋骨骨髓,分离单个核细胞,以 MethCulttu H4230 培养基混匀 (1 $\times 10^6$ /ml),每孔加入 800 μ l 细胞悬液。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 14 d,在倒置相差显微镜下计数 CFU-GM 数目,以 50 个细胞以上为一个集落。

1.9 分离培养未成熟树突状细胞

参照本所建立的方法^[1],取健康成人外周静脉血分离单个核细胞,以 5 $\times 10^6$ /ml 置 35 mm 培养皿中培养,弃悬浮细胞,在含 hGM-CSF (800 U/ml) 和 rhIL-4 (500 U/ml) 的 1640 完全培养基中继续培养 3 d,流式细胞仪检测为未成熟树突状细胞。

1.10 分选 CD3⁺T 细胞

取健康成人外周静脉血,分离淋巴细胞,取 CD3⁺

MiniMACS 免疫磁珠分离筛选 CD3⁺T 细胞,流式细胞仪检测纯度 >90%。

1.11 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白对未成熟树突状细胞和 T 细胞的趋化实验

设立 MIP-2 γ 组、含融合蛋白的培养上清组和 MIP-2 γ 与 GM-CSF 联合应用组(摩尔比 1:1)3 组样品,以 1640 培养基稀释,使其所含的细胞因子浓度均为 64 ng/ml,取 24 孔细胞培养板,每孔加入 600 μ l 样品依次做 5 倍稀释,阴性对照为 1640 培养基。在实验孔上方放入 8 μ m、5 μ m 孔径的趋化小室,8 μ m 孔径小室内加入 200 μ l 未成熟树突状细胞(5×10^5 /ml);5 μ m 孔径小室内加入 200 μ l CD3⁺T 细胞(1×10^6 /ml)。37 $^{\circ}$ C,4 h 后以流式细胞仪计数趋化至实验孔中的细胞数,计算趋化指数(chemotactic index, CI)。趋化指数 = 迁移到样品液的细胞数/迁移到阴性对照液的细胞数

2 结果

2.1 hMIP-2 γ ,hGM-CSF cDNA 序列的扩增

MIP-2 γ ,hGM-CSF cDNA 序列进行 PCR 反应,分别得到了约 370 bp 的片段,约 400 bp 的片段,与设计一致(图 1)。

图 1 hMIP-2 γ 和 hGM-CSF 全长 cDNA 的 PCR 产物的电泳鉴定

Fig.1 DNA electrophoresis analysis of the hMIP-2 γ and hGM-CSF full-length cDNA PCR products

A: hMIP-2 γ ; 1: DGL2000 marker; 2: hMIP-2 γ
B: hGM-CSF; 1: DGL2000 marker; 2: hGM-CSF

2.2 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因表达载体的酶切鉴定
构建的 pcDNA-3.1/myc-His(-)A/MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因表达载体转化 DH5 α ,挑取 6 个克隆以 Nhe I 和 Hind III 双酶切筛选含 770 bp 插入片段的阳性克隆,均为阳性(图 2)。

2.3 pcDNA-3.1/myc-His(-)A/MIP-2 γ /GM-CSF 的序列测定

测序表明,MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因序列与模板一致,并且两基因间的接头已恢复成完整的(Gly₄Ser)₃ 编码序列。

2.4 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因的表达与融合蛋白的鉴定

Western blot 分析结果显示在分子量 24.9 kD 处呈现一发光条带,与 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白理论分子量相符(图 3)。ELISA 检测结果表明培养上清中 GM-CSF 含量为 39 ng/ml,据 GM-CSF 与 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的分子量比(14.46:24.9),计算融合蛋白的含量约为 64 ng/ml。

图 2 MIP-2 γ /GM-CSF 融合基因的鉴定
Fig.2 Identification of pcDNA3.1/MIP-2 γ /GM-CSF by restriction analysis

1: D016-2 marker; 2: Clone1; 3: Clone2; 4: Clone3;
5: Clone 4; 6: Clone5; 7: Clone6

2.5 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的体外促进造血细胞增殖活性测定

融合蛋白与 GM-CSF 相类似,对 TF-1 具有明显的促增殖作用(图 4),其比活性约为 2.2×10^7 IU/mg,约相当于 GM-CSF 标准品的 2 倍。

2.6 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白的促进骨髓集落形成实验

MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白能促进骨髓细胞形成 CFU-GM 集落,在 1~5 ng/ml 时促进集落形成效果最佳,但其活性稍弱于 GM-CSF(图 5)。

2.7 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白对免疫细胞的趋化实验

融合蛋白与 MIP-2 γ 类似,可有效趋化未成熟 DC,且趋化效应与 MIP-2 γ 存在明显的量效反应关系(图

6)。而只有未稀释的含融合蛋白的细胞上清原液才对 CD3⁺T 细胞有明显的趋化作用,趋化指数为 3.38(图 7)。这是 MIP-2 γ 所不具备的特性,也提示融合蛋白的量须达到一定的阈值才对 T 细胞具有趋化作用。

长,趋化肿瘤细胞,促血管生成任用而促进肿瘤生长和转移,另一方面通过趋化免疫活性细胞抑制血管生成来抵抗肿瘤的生长和转移^[9-10]。目前关于趋化因子用于抗肿瘤治疗的研究报道不断增加,TCA-3、MCP-1 等基因转移都显示了一定的抗肿瘤作用,显示出良好的抗肿瘤应用前景^[11-12]。

图 3 含融合蛋白的细胞上清的 Western blot 分析
Fig. 3 Western blot analysis of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein in the supernatants

1: Marker; 2: Supernatants of 293-T cells containing fusion protein; 3: Control 293-T cells supernatants

图 5 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白对骨髓细胞集落生成活性的影响测定

Fig. 5 The effects of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein on the formation of CFU-GM colones

图 4 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白促 TF-1 增殖的活性测定
Fig. 4 The effects of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein on the proliferation of TF-1 cells

3 讨论

趋化因子是一类对血细胞迁移和聚集具有调节作用的小分子多肽,通过与相应的趋化因子受体结合,广泛参与了免疫应答、免疫细胞的发育、血管形成、病毒感染等生理和病理过程^[6-7]。最近研究者还发现,许多趋化因子不仅能影响造血干细胞的迁移、归巢,而且其本身还可以发挥直接的造血调控作用^[9]。趋化因子与肿瘤的关系具有双相性,一方面具有刺激肿瘤细胞生

图 6 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白对未成熟 DC 的趋化效应
Fig. 6 The chemotactic effects of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein on immature DCs

MIP-2 γ 是一种新型 CXC 类趋化因子,初步研究结果表明,该新型趋化因子除能趋化中性粒细胞与未成熟树突状细胞等造血免疫细胞外,还具有一定的造血调控作用,提示 MIP-2 γ 在造血细胞的分化发育、免疫应答的调控方面具有潜在应用价值。

在以往的工作基础上,考虑到 MIP-2 γ 与 GM-CSF 的功能可能具有较好的协同互补作用,本研究制备了

一种新型的 MIP-2 γ /GM-CSF 融合蛋白,并对其生物学活性进行了初步探讨。结果表明该融合蛋白具有与 GM-CSF、MIP-2 γ 相似的生物学活性。初步的体外实验结果表明,该融合蛋白在造血调控作用方面的生物学活性与 GM-CSF 相似,但对粒系及巨噬细胞前体细胞的促增殖作用并不明显优于单一细胞因子的作用。Bromeyer 等报道,MIP-2 γ 可协同 G-CSF 对 Sca-1⁺ Lin⁻ 造血祖细胞的动员效应,进一步通过对弹性蛋白酶缺陷小鼠体内的实验,发现该效应可能与 MIP-2 γ 下调造血祖表面的 L-Selectin 的表达有关^[13-14]。我们在体外并未观察到融合蛋白对骨髓集落的刺激作用强于单一使用 GM-CSF,但不能排除其体内应用后,通过增强造血祖/干细胞的动员而发挥其对机体造血功能的调控作用。

图7 融合蛋白对 CD3⁺ T 细胞的趋化效应

Fig. 7 The chemotactic effects of MIP-2 γ /GM-CSF fusion protein on CD3⁺ T cells

本实验中,我们还通过 Transwell 趋化体系,进一步观察了融合蛋白对免疫活性细胞的趋化作用。结果表明,融合蛋白与 MIP-2 γ 一样可以趋化未成熟树突状细胞。更有意义的是,融合蛋白可以趋化未经 PHA 活化的初始型 T 细胞,而单独采用 MIP-2 γ 则不能对初始型 T 细胞产生趋化效应。推测其机理可能与其中 GM-CSF 刺激 T 细胞的活化,从而可能使其对趋化因子的趋化效应更加敏感有关,我们将通过进一步的实验来探讨其可能的作用机制。

考虑到 GM-CSF 是调节机体内树突状细胞成熟和分化的一种重要的细胞因子^[15],而 MIP-2 γ 对未成熟树突状细胞具有明显的趋化效应,由于本实验中所获得的融合蛋白既具有 MIP-2 γ 对未成熟树突状细胞的趋化作用,又具有 GM-CSF 样的刺激未成熟树突状细胞成熟和分化的效应,因此体内应用该融合蛋白后,可以进一步增强体内树突状细胞的趋化及抗原递呈功

能,有望成为在机体抗病毒、抗肿瘤免疫治疗中具有更好应用价值的一种新型细胞因子。

趋化因子受体的研究是解决趋化因子体内生物学作用机理的一个关键问题,我们在本研究中观察到的一些实验现象急待进一步的深入探讨,本所前期工作也提示 MIP-2 γ 的受体不同于 MIP-2 α 等 CXC 类趋化因子的受体,可能是一种新型受体,寻找这种新型趋化因子的受体将为我们进一步阐明该新型趋化因子体内的作用机理提供最直接的实验依据。

[参考文献]

- [1] Cao X, Zhang W, Wan T, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for neutrophils and dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2588-2594.
- [2] Demetri GD, Antman KH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF): Preclinical and clinical investigations [J]. *Semin Oncol*, 1992, 19(4): 362-385.
- [3] Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors[J]. *Science*, 1987, 236(4806): 1229-1237.
- [4] Shannon MF, Coles LS, Vadas MA, *et al.* Signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells[J]. *Crit Rev Immunol*, 1997, 17(3-4): 30-42.
- [5] Kitamura T, Widmer U, Cerami A, *et al.* Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3 or erythropoietin[J]. *J Cell Physiol*, 1989, 140(2): 323-334
- [6] Baggolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines[J]. *Adv Immunol*, 1994, 55:97-179.
- [7] Rollins BJ. Chemokines[J]. *Blood*, 1997, 90(2): 909-928.
- [8] Youn BS, Mantel C, Bronxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis[J]. *Immunol Rev*, 2000, 177: 150-174.
- [9] 王青青, 王建莉. 趋化因子及其受体与肿瘤[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(1): 2-5.
- [10] Devora R, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 217-234.
- [11] Fioretti T, Fradelizi D, Stoppacciaro A, *et al.* Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3(MCP-3) gene transfer: Perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor[J]. *J Immunol*, 1998, 161(2): 342-351.
- [12] OwenLynch PJ, CzaPlewski LG, Hunter MG, *et al.* The growth inhibitory role and potential clinical value of macrophage inflammatory protein 1 alpha in myeloid leukaemias[J]. *Leuk Lymphoma*, 1998, 30(1): 41-48.
- [13] Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, *et al.* Murphy PM, Dominant myelopoietic effector functions mediated by chemokine receptor CCR1[J]. *J Exp Med*, 1999, 189(11): 1987-1992.
- [14] Wang J, Mukaida N, Zhang Y, *et al.* Enhanced mobilization of hematopoietic progenitor cells by mouse MIP2 and granulocyte-colony stimulating factor in mice [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 62(4): 503-509.
- [15] Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, *et al.* Hemopoietic growth factors[J]. *J Exp Med*, 1996, 184(2): 695-706.

[收稿日期] 2004-03-10

[修回日期] 2004-05-12