

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0275-05

M-CSF 可溶性受体在烟草中的表达及其抗 M-CSF 作用研究

郑国光, 杨应华, 饶青, 林永敏, 吴克复(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] **目的:** 在烟草中高效表达人 M-CSF 可溶性受体并研究其抗 M-CSF 活性。**方法:** 采用基因重组技术构建表达 C 端含组氨酸标签和内质网滞留信号的 M-CSF 可溶性受体植物表达载体, 通过根瘤土壤杆菌转化烟草, 获得转基因植株。PCR、蛋白印迹实验鉴定转基因植株, ELISA 方法测定重组蛋白表达水平, 集落形成实验测定重组蛋白活性。**结果:** 获得 50 余株转基因烟草植株, PCR 证实目的基因已整合到烟草基因组中, 蛋白印迹实验证实转基因植株表达目的蛋白; M-CSFsR 在烟草中获得高效表达, 但不同转基因植株的表达水平存在差异, 其中表达水平最高的一株 M-CSFsR 占叶片可溶性蛋白的 1.92%; 集落形成实验证明 M-CSFsR 可以抑制 J6-1 细胞的集落形成。**结论:** 在烟草中高效表达有生物学活性的重组人 M-CSFsR。

[关键词] 巨噬细胞集落刺激因子受体; 可溶性受体; 烟草; 表达; 生物活性

[中图分类号] Q784; Q786 [文献标识码] A

The Expression of M-CSF Soluble Receptor in Tobacco Plants and Its Anti-M-CSF Effect

ZHENG Guo-guang, YANG Ying-hua, RAO Qing, LIN Yong-min, WU Ke-fu (State Key Laboratory for Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To effectively express human M-CSF soluble receptor in tobacco plants and study its anti-M-CSF activity. **Methods:** The plant expression plasmid expressing recombinant human M-CSF soluble receptor with C-terminal His-tag and endoplasmic reticulum retention sequence was constructed. Then the target gene was introduced into tobacco genome by agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. PCR and Western blot were used to select the transgenic tobacco plants. ELISA was used to evaluate the expression level while colony forming assay was used to test its biological activity. **Results:** More than 50 transgenic tobacco plants were developed. PCR results showed the insertion of target gene into tobacco genome and Western blot results showed the expression of recombinant protein. The recombinant M-CSFsR was effectively expressed, however, the expression levels varied among different transgenic tobacco plants, with the maximum reaching 1.92% of total soluble protein in leaf tissues. The tobacco-derived M-CSFsR could inhibit the colony formation of J6-1 cells. **Conclusion:** Bioactive recombinant human M-CSFsR was expressed in transgenic tobacco plants at high level.

[Key words] macrophage colony stimulating factor; soluble receptor; tobacco; expression; bioactive

细胞因子调控网络在维持细胞生存和功能中起着十分重要的作用, 其异常将导致疾病的发生; 细胞因子可溶性受体是细胞因子调控网络中的重要环节, 很多细胞因子存在天然可溶性受体, 它们通过不同机制促进或抑制相应细胞因子的信号传递^[1]; 重组细胞因子可溶性受体的研究为治疗细胞因子调控网络异常的疾病提供了新的思路。巨噬细胞集落刺激因子(macro-

phage colony stimulating factor, M-CSF) 是一种多功能细胞因子, 存在可溶型、膜结合型等多种形式, 异常高

[基金项目] 天津市科技发展计划项目(003119311); 国家自然科学基金(30470897)

[作者简介] 郑国光(1967-), 男, 天津人, 副研究员, 主要从事正常及异常细胞的细胞间通讯研究

[通讯作者] 郑国光, E-mail: zhenggtj@sohu.com

表达于白血病、淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌等恶性细胞中^[2,3];其受体(macrophage colony stimulating factor receptor, M-CSFR)由原癌基因 *c-fms* 编码,属酪氨酸激酶家族受体,可形成可溶性受体(macrophage colony stimulating factor soluble receptor, M-CSFsR)。重组 M-CSFsR 可抑制 M-CSF 的信号传递,有抗细胞因子治疗的潜在应用价值。

植物生物反应器具有成本低、无污染等优点,因此具有广阔的前景,目前已在植物系统中表达出多种具有生物学活性的外源重组蛋白^[4]。本研究在烟草中高效表达具有生物学活性并易于纯化的重组人 M-CSFsR,为使用植物生物反应器研制可溶性受体类药物提供实验线索。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

植物高效表达载体 pBin438^[5]由中国科学院微生物所田颖川教授惠赠,大肠杆菌 DH5 α 、根瘤土壤杆菌 LBA4404、人白血病细胞系 J6-1、烟草 NC-89 均为本实验室保存。BamH I 和 Sal I 限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司。羧苄青霉素(CB)、卡那霉素(Kan)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、吲哚乙酸(IAA)为 Sigma 公司产品。Chelating SepharoseTM层析柱基为 Amersham 公司产品。M-CSFR 抗体 RE2 为本室制备^[6]。

1.2 植物表达载体的构建

我们已经克隆了正常人 M-CSFR 胞外区的配体结合结构域片段,并经 DNA 序列测定证实,本研究以此为模版设计含特定插入序列的引物,正向引物 P1 为 5'-CTTGATCCCATGGGCCAGGAGTTCTGC-3',反向引物 P2 为 5'-GCGTCGACTCATAGCTCATCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCTCAGAGCTCAAG-3',其中正向引物含 BamH I 酶切位点,下游引物在 M-CSFR 结合结构域序列下游插入编码组氨酸标签、内质网滞留信号、终止密码子和 Sal I 酶切位点的序列。按照常规方法使用高保真 Pyrobest DNA 聚合酶 PCR 扩增,扩增片段 975 bp,用低熔点琼脂糖凝胶电泳法回收目的片段。将目的片段和植物表达载体 pBin438 分别用 BamH I 和 Sal I 双酶切,回收片段和载体后进行连接,转化 DH5 α 感受态细菌,在 Kan^r抗性板上挑选阳性克隆,提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定确证后,通过冻融法将重组表达载体 pBin438-M-CSFsR 导入根瘤土壤杆菌 LBA4404。

1.3 植物的遗传转化及植株再生

将 60 d 苗龄的烟草无菌苗的幼嫩叶片切成 0.5

cm 的小方块,在根瘤土壤杆菌悬液中浸泡 10 min,无菌滤纸吸干后,转移到 MS1 培养基(含 6-BA 2 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L)中,25℃ 暗培养 3 d;然后转移到 MS2 培养基(含 6-BA 2 mg/L、IAA 0.5 mg/L、Kan 200 mg/L 和 Cb 500 mg/L)中,光照培养 2~3 周,将 2~3 cm 的抗性芽移到生根培养基(含 IAA 0.5 mg/L)中,1 周后逐渐生根。待小苗长到 5~6 cm 高时,移栽到营养钵中。

1.4 转基因植株的 PCR 检测

根据所插入的 M-CSFR 结合结构域序列设计另一对引物 P3(5'-TGATAGAGCCCAGTGT-3')和 P4(5'-GTTCTGCTCAGAGCTCAAG-3'),按文献[7]的方法进行烟草植株 DNA 的提取和常规 PCR 扩增,目的片段长度为 860 bp。

1.5 烟草蛋白的提取和蛋白印迹实验

2 g 烟草叶片加液氮磨碎,加入 1 ml 蛋白提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 400 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT),再匀浆,然后 10 000 r/min 离心收集上清。上清按照常规方法进行 10% SDS-PAGE 电泳,然后转移到 NC 膜上,用 M-CSFR 抗体 RE2 进行常规蛋白印迹实验^[8]。

1.6 ELISA 法检测烟草中重组蛋白的表达量

称取 0.5 g 新鲜叶片,加液氮磨碎,加入 1 ml 包被液(0.008 mol/L Na₂CO₃, 0.042 mol/L NaHCO₃, pH 9.6),再进行匀浆,然后 10 000 r/min 离心收集上清液,按照文献[9]的方法进行 ELISA 测定。

1.7 集落形成实验测定烟草中重组蛋白的活性

8.5 g 新鲜叶片加液氮磨碎,加入 50 ml 上样缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L 咪唑, 100 μ mol/L PMSF)进行匀浆和超声波破碎,离心后,上样 Chelating SepharoseTM层析柱,收集 300 mmol/L 咪唑洗脱峰,经过透析、浓缩、除菌过滤、浓度测定,获得烟草来源的 M-CSFsR。集落形成实验参照本室方法^[10],实验组培养体系中加入终浓度为 1 μ g/ml 的 M-CSFsR,中和实验组 M-CSFsR 与 RE2 先在 37℃ 孵育 1 h 后加入体系中,重复 3 孔,以 PBS 和未转化的烟草植株相应提取物为对照。

2 结果

2.1 重组转化烟草植株的获得

pBin438 携带 CaMV-35S 启动子、Nos 终止子以及用于筛选的标记基因 Npt II 等序列,是高效植物表达载体,其 T-DNA 区结构如图(1)所示。PCR 扩增的区域具有配体结合功能的、包含 M-CSFR 胞外区 N 端 3 个免疫球蛋白样结构域,在它下游,通过 PCR 方法添加 6 个组氨酸的纯化标签、内质网滞留信号(序列为

KDEL)和终止密码子, BamH I 和 Sal I 双酶切后插入 pBin438 载体中, 替代 *udiA* 基因。重组载体经 PCR 和

限制性内切酶鉴定后通过冻融法导入根瘤土壤杆菌用于烟草转化, 共获得超过 50 株抗性苗。

图 1 重组表达载体 T-DNA 区结构

Fig. 1 Structure of the T-DNA of recombinant expression vector

2.2 重组转化植株的鉴定

随机选取 20 株抗性苗, 提取 DNA 后, 采用 P3 和 P4 引物进行 PCR 鉴定, 结果所有抗性苗均可检出特异的 860 bp 条带, 图 2 显示其中 6 株抗性苗的 PCR 结果, 未转化的烟草植株没有特异 PCR 条带。从其中随机选取 1 株抗性苗, 进行蛋白印迹实验, 如图 3 所示, 抗性苗可检出一条分子质量大约为 33 kD 的条带, 未转化的烟草植株没有特异蛋白条带。以上结果表明目的基因已经整合到烟草基因组中, 而且可以表达出重组 M-CSFsR。

图 2 M-CSFsR 转基因植株 PCR 检测结果

Fig. 2 Genomic PCR analysis of M-CSFsR transformants

M: DNA marker DL2000; 1: Negative control, untransformed tobacco plant; 2: Positive control, pBin438-sR plasmid; 3~8: Different transformed tobacco plants

2.3 重组蛋白表达量的测定

将 1 g 叶片匀浆后, 用 ELISA 方法测定 6 株抗性植株中重组 M-CSFsR 的表达水平, 发现不同植株表达水平差异很大, 分别为 1.1 ± 0.7 , 35.2 ± 3.6 , 14.4 ± 1.2 , 72.0 ± 5.3 , 7.2 ± 1.1 和 0.7 ± 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 分别占叶片可溶性蛋白的 0.02%, 0.80%, 0.48%, 1.92%, 0.08% 和 0.02%。未转化的烟草植株没有检出 M-CSFsR 的表达。

2.4 重组蛋白的活性分析

白血病细胞系 J6-1 高表达膜结合 M-CSF 和 M-CSFR, J6-1 细胞通过二者介导的并置性作用机制刺激自身细胞的增殖, 集落形成实验中 M-CSFsR 可以阻断二者的相互作用, 抑制 J6-1 细胞的集落形成^[10]。如图 4 所示, 加入未转化的烟草植株提取物不能抑制 J6-1 细胞的集落形成, 加入烟草来源的 M-CSFsR 可显著抑制 J6-1 细胞的集落形成 ($P < 0.01$); 中和实验中, RE2 可以中和 M-CSFsR 的活性, 集落数显著高于 M-CSFsR 组 ($P < 0.01$), 与 PBS 组和未转化的烟草组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

图 3 M-CSFsR 转基因植株 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of M-CSFsR transformant

1: Pre-stained recombinant protein molecular marker (RPN800); 2: Untransformed tobacco leaves; 3: M-CSFsR transformed tobacco leaves

3 讨论

细胞因子是调节细胞生存和功能的重要成员, 细胞因子调控网络的异常将导致疾病的发生, 抗细胞因子治

疗可以应用于多种因子高表达的疾病,如在类风湿性关节炎中使用 TNF 可溶性受体抗 TNF- α 治疗取得良好的效果^[11]。M-CSF 是在造血系统和非造血系统中均起重要作用的细胞因子,在白血病、淋巴瘤及肝癌、卵巢癌和子宫内膜癌等恶性肿瘤中均可检出其异常高表达,因此抗 M-CSF 治疗可能成为一种辅助治疗手段。

图 4 烟草表达的 M-CSFsR 对 J6-1 细胞集落形成的作用

Fig. 4 Biological activity of tobacco-expressed human M-CSFsR

PBS: PBS group; C: Control tobacco fraction group;

T: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M-CSFsR; T + RE2: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M-CSFsR plus RE2

* T compared with PBS or C group ($P < 0.01$);

** T compared with T + RE2 ($P < 0.01$)

我们以往的工作采用植物表达载体 pBI121 构建了 M-CSFsR 重组表达载体,经 PCR 和蛋白印迹实验证实获得了重组植株,但 M-CSFsR 的表达水平比较低,仅为 200 ng/g 叶片,相当于叶片可溶性蛋白的 0.004%,而且由于没有纯化标记,烟草叶片中其它成分干扰集落形成实验,无法测定是否具有生物学活性^[12]。

在本研究中我们采用如下策略提高重组蛋白的表达水平:首先选择另一个高效植物表达载体 pBin438^[5],该载体的 T-DNA 区有如下特点:有 2 个 CaMV 35S 启动子序列,可有效提高转录水平;有烟草花叶病毒 Ω 序列 (TMV Ω),可以提高翻译效率^[13],因此可以提高外源重组蛋白在植物中的表达。其次,在重组蛋白的 C 末端加上内质网滞留信号(序列为 KDEL),它可以提高外源蛋白在植物细胞中的表达,并被广泛应用于高水平表达外源基因的转基因植物的构建中^[14]。通过这两种手段,重组转基因烟草 M-CSFsR 的表达水平显著提高:在 6 株重组烟草植株中,4 株的表达水平提高了 20 倍以上,在其中 1 株表达水平最高的植株中,M-CSFsR 可达总可溶性蛋白 1.92%,表达

水平提高了约 480 倍,这个结果与国外学者使用内质网滞留信号在植物细胞中获得外源蛋白高表达的水平相当^[14]。而且,通过 PCR、蛋白印迹实验证实我们成功地获得了高表达 M-CSFsR 的转化烟草植株。不同植株的表达水平相差很大,这是在进行外源基因表达过程中经常遇到的问题,影响其表达水平的原因可能有:插入部位的基因结构和每个细胞基因组中插入外源基因的拷贝数;高表达植株中插入部位附近的基因结构适于表达,而且可能插入多个拷贝的外源基因。

如何从转化植株中获得重组蛋白也是一个重要的环节。如果在植物中单纯表达 M-CSFsR,由于缺乏纯化标签无法获得纯化的重组蛋白^[12]。本研究中,在重组蛋白的 C 末端加入 6 个组氨酸的纯化标签,可以采用固定金属亲和层析(immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)的方法方便地获得高纯度的重组蛋白,这种方法不仅广泛应用于从原核系统获得纯化重组蛋白,也应用于在植物系统获得纯化重组蛋白^[15]。

我们运用基因重组技术在植物中表达了 C 端含组氨酸的纯化标签和内质网滞留信号的重组 M-CSFsR,初步的研究显示它们并没有影响 M-CSFsR 的生物学活性,可以抑制 M-CSF 的作用。由于在植物系统中表达 M-CSFsR 有成本低、无污染等特点,我们的研究为在植物系统表达细胞因子可溶性受体类蛋白提供了新的思路和实验线索。

[参考文献]

- [1] Levine SJ. Mechanisms of soluble cytokine receptor generation [J]. *J Immunol*, 2004, 173(9): 5343-5348.
- [2] Wu KF, Zheng GG, Rao Q, *et al.* Cellular macrophage colony-stimulating factor and its role [J]. *Haematologica*, 1999, 84(10): 951-952.
- [3] Zheng GG, Wu KF, Geng YQ, *et al.* Expression of membrane-associated macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in Hodgkin's disease and other hematologic malignancies [J]. *Leuk Lymphoma*, 1999, 32(3-4): 339-344.
- [4] Zhang B, Yang YH, Lin YM, *et al.* Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(19): 1629-1635.
- [5] 周岩,田颖川,吴标,等.转雪花莲外源凝集素基因烟草对桃蚜的抑制作用 [J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 13-19.
- [6] Rao Q, Han JS, Geng YQ, *et al.* Antigen association of J6-1 cell membrane associated factor receptor with macrophage colony stimulating factor [J]. *Chin J Cancer Res*, 1999, 11(4): 235-240.
- [7] 左晓峰,张晓钰,掸龙,等.人小肠三叶因子(hITF)基因在生菜中的整合与表达 [J]. *植物学报*, 2001, 43(10): 1047-1051.

- [8] 沙晓津, 宋玉华, 饶青, 等. 巨噬细胞集落刺激因子可溶性受体与儿童血液病关系初探[J]. 白血病·淋巴瘤, 2002, 11(4): 195 - 198.
- [9] Rao Q, Han JS, Geng YQ, *et al.* Decreased serum soluble macrophage colony stimulating factor receptor in leukemia patients [J]. *Haematologica*, 2001, 86(9): 989 - 990.
- [10] Wu KF, Rao Q, Zheng GG, *et al.* Enhancement of J6-1 human leukemic cell proliferation by membrane-bound M-CSF through a cell-cell contact mechanism II. Role of an M-CSF receptor-like membrane protein [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(1): 55 - 60.
- [11] Edwards CK 3rd, Martin SW, Seely J, *et al.* Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(10): 1315 - 1336.
- [12] 杨应华, 李戈, 郑国光, 等. M-CSF 受体配基结合区基因克隆及其在烟草中的表达 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(4): 287 - 288.
- [13] Gallie DR, Feder JN, Schimk RT, *et al.* Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: The role of the reporter gene in controlling expression [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 228(1-2): 258 - 264.
- [14] Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, *et al.* Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 262(3): 810 - 816.
- [15] Valdez-Ortiz A, Rascon-Cruz Q, Medina-Godoy S, *et al.* One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco [J]. *J Biotechnol*, 2005, 115(4): 413 - 423.
- [收稿日期] 2005 - 07 - 04 [修回日期] 2005 - 09 - 14
- [本文编辑] 王莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0279-01

自杀基因对乳腺癌放疗的增敏作用

李荣清¹, 金冶宁²(1. 成都军区昆明总医院肿瘤科, 昆明 650032; 2. 第二军医大学附属长海医院放疗科, 上海 200433)

自杀基因联合放射治疗恶性肿瘤是一种非常具有潜力和临床应用价值的治疗手段,但应用自杀基因进行的大量基础研究和临床试验发现,这一疗法并不令人满意。首先,体内凡是转染自杀基因的细胞都可能被前体药物的代谢产物杀死,该治疗的特异性较差。其次,导入体内的自杀基因不能长期稳定表达,疗效难于长期维持,治疗后肿瘤仍容易复发或转移。自杀基因一般通过重组腺病毒、逆转录病毒或脂质体等载体导入体内,但这些载体在体内的活性都比较短暂,因此疗效不能维持和巩固。此外,自杀基因治疗只能用于局部治疗,虽然有“旁观者效应”,但对播散的病灶、特别是血液中的微小转移灶,自杀基因治疗就无能为力。所有这些缺点都限制了自杀基因疗法的临床应用。本课题通过在体实验探讨了腺病毒介导的自杀基因(CD/5FC)对乳腺癌放疗的增敏作用,以期通过研究尝试基因治疗与放射治疗联合治疗乳腺癌(尤其是对放疗不敏感或者进展期乳腺癌),为进一步的临床试验提供实验依据。将 24 只 Balb/c 小鼠背部皮下注射 MCF-7 细胞,约 7 ~ 10 d 后肿瘤长至约 5 × 5 mm² 大小,将荷瘤小鼠随机分为 PBS 对照组、AdCD + 5FC 治疗组、单纯放疗组、AdCD + 5FC + 放疗组。PBS 对照组:瘤体内注射 PBS 0.1 ml,每天 1 次,连续 7 d; AdCD + 5FC 治疗组:瘤体内注射 AdCD(10⁸ PFU/次) 0.1 ml,每天静滴 5FC(500 mg/kg 体重),连续 7 d; 单纯放疗组:

每天 2 GY,连续 3 d; AdCD + 5FC + 放疗组:瘤体内注射 AdCD(10⁸ PFU/次) 0.1 ml,每天静滴 5FC(500 mg/kg 体重),连续 7 d,后 3 d 同时结合放疗(每天 2 GY); 治疗开始后每 2 天测量肿瘤大小 1 次,以长短径之积(mm²)表示。绘制 4 组小鼠的肿瘤生长曲线,比较 PBS 对照组、基因治疗组、单纯放疗组及基因联合放疗组对肿瘤的疗效。肿瘤体积的比较用未配对计量资料的 *t* 检验。结果显示, PBS 对照组肿瘤呈进行性生长; 基因治疗组和单纯放疗组肿瘤生长受抑制,单纯放疗组的疗效好于基因治疗组,但差异不显著(*P* > 0.05); 基因联合放疗组肿瘤生长明显控制,疗效明显优于基因治疗组和单纯放疗组(*P* < 0.05)。以上结果表明,自杀基因对乳腺癌放疗治疗具有增敏作用,放射治疗又可以提高自杀基因在肿瘤内的表达,两者具有协同作用。其可能的机制在于利用辐射实现了对自杀基因体内表达的时空调控,或是辐射提高了自杀基因靶向转移的效率,此外自杀基因也可能提高了肿瘤对放射治疗的敏感性等。

[关键词] 乳腺癌; 自杀基因; 放射治疗; 基因治疗; 放疗增敏

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] D

[收稿日期] 2005 - 08 - 10 [修回日期] 2005 - 09 - 20

[本文编辑] 王莹