

抑瘤素 M cDNA 的克隆及表达研究

段海清 张兆山 董自正 曹 勇 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 抑瘤素 M (oncostatin M, OSM) 是一种多功能的细胞生长调节因子. 从 PMA 刺激后的 U937 细胞系提取总 RNA, 采用逆转录-PCR 方法分离到了抑瘤素 M 的 cDNA; 将抑瘤素 M 的 cDNA 克隆到质粒 pUC19 中, 筛选三个阳性克隆进行序列分析, 与国外报导序列完全一致; 将抑瘤素 M 的 cDNA 克隆到质粒 pBV 220 后再转化 DH5 α 进行模拟表达, SDS-PAGE 分析表明有 OSM 表达, 表达量约占细菌总蛋白 5%, 经过初步纯化的 OSM 能明显抑制 A375 细胞的生长.

关键词: 抑瘤素 M, 逆转录-PCR 技术, 基因表达, 活性测定

80 年代初期, 有人发现用 PMA 处理人组织细胞淋巴瘤细胞系 U937 后, 该细胞的生长受到抑制并逐渐分化, 表现出类似巨噬细胞的相关活性. 1986 年 Zarling 等^[1]首先分离纯化该细胞的抑制因子并命名为 oncostatin M (OSM). 后来发现它在机体免疫应答网络、细胞抗感染免疫及多种细胞因子间的功能协调等方面发挥着重要作用. 1989 年 Malik 等^[2]从 PMA 刺激 U937 细胞后构建的 cDNA 文库中筛选到了抑瘤素 M cDNA, 其大小为 1814 bp, OSM 的 mRNA 编码 252 氨基酸的多肽链, 其 N 端 25 个氨基酸为信号肽序列. Linsley 等^[3]研究证明, 去除 OSM 的 C 端 34 个氨基酸有利于提高其生物学活性. OSM 与 LIF、IL-6、CNTF 有一个相同的受体亚基 gp 130^[4], 而且 OSM 能直接与 gp 130 低亲和力结合^[5]. OSM 与 LIF、IL-6 及生长激素 (GH) 有着相同的空间折叠形式^[6], 在三维结构方面与 GM-CSF、IL-2、IL-4 有着较大的同源性, 这也可以解释 OSM 与这些细胞因子在功能上有着一定的交叉活性并有协调作用. 我们构建的 OSM 的原核表达菌株为研究 OSM 的生物学活性及其作用机理能提供有价值的材料.

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pUC 19 购自华美生物工程公司, 质粒 pBV 220 及大肠杆菌 DH5 α 为本室实验室保存, 组织淋巴瘤 U937 细胞株由本室保存, 黑色素瘤 A 375 细胞株由上海细胞生物学研究所细胞库提供, PCR 引物由本室合成, RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 Promega 公司, T7 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司, RPMI 1640、DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 其它常规试剂购自华美生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 U 937 细胞的培养及活化: U937 细胞用 RPMI 1640 含 10% 小牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉

• 收稿日期: 1996-03-18, 修回日期: 1996-07-05

素、100 U/ml 青霉素培养,用 PMA(10 pg/ml)刺激 24 h 后收集细胞。

1.2.2 活化的 U 937 细胞总 RNA 的提取和逆转录按 Promega 公司的试剂盒说明进行。

1.2.3 PCR 扩增:逆转录合成 cDNA 第一链后加入 PCR 扩增引物,调整反应体系使总体积为 100 μ l,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后加入 Taq DNA 聚合酶,反应参数为:94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min. 循环 30 次后在 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min。

1.2.4 OSM 克隆载体的构建及序列分析:将 OSM 的 cDNA 克隆至质粒 pUC 19 按常规方法进行,序列分析按 Pharmacia 公司的试剂盒说明进行。

1.2.5 OSM 表达载体的构建及表达分析:OSM 的 cDNA 克隆至质粒 pBV 220 并转化至 DH5 α 按常规方法进行,转化子在 30 $^{\circ}$ C 培养至 A_{600} 值为 0.2~0.6 时,升温到 42 $^{\circ}$ C 诱导 3.5 h,收集菌体,SDS-PAGE 分析 OSM 的表达水平。

1.2.6 rhOSM 的生物学活性分析:收集诱导后的菌体 1.0 g(湿重)加 1 ml 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris \cdot Cl,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl)进行超声破碎,10 000 g 离心 10 min,将沉淀用 1 ml 6 mol/L 尿素溶解过夜,10 000 g 离心 10 min 收集上清透析过夜,将透析过的样品进行 10 倍梯度稀释备用,A375 细胞培养在 DMEM(含 10%小牛血清、100 μ g/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素)中,调整其密度为 3×10^4 转入 96 孔细胞培养板,每孔加 100 μ l 细胞悬液,再分别加入 100 μ l 不同浓度的 rhOSM,培养 72 h 后观察细胞形态并用 MTT 法测定其相对活性。

2 结 果

2.1 OSM cDNA 的逆转录-PCR 扩增

PMA 刺激 U937 细胞后能诱导许多基因的表达,在 PMA 刺激 U937 细胞后 16~48 h 内都可以检测到 OSM 的 mRNA^[2]。根据国外报道的序列设计了 PCR 扩增引物:(1)5'-CG-GAATTCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCG-3'; (2) 5'-CGGGATCCTAC-CGGGGCAGCTGTCCG-3'。用引物(2)进行逆转录后再加入引物(1)进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳显示出一条约 800 bp 的 DNA 特异带(如 Fig. 1)。

2.2 OSM 克隆载体的构建及序列分析

将 PCR 扩增产物和质粒 pUC 19 用 Bam HI 和 EcoRI 双酶切后连接再转化 DH 5 α ,挑取转化子培养抽提质粒并进行酶切鉴定(如 Fig. 2),将阳性克隆保存用于序列分析及亚克隆。把带有 OSM cDNA 的质粒 pUC 19 命名为 pHD01,用通用引物从两端对 pHD01 进行测序,结果显示在四个克隆中有三个克隆的序列与国外报导序列完全一致,另一克隆在第 46 位苏氨酸密码子由 ACA 变成 ACG,其余序列与国外报导的一致,我们把带有突变 OSM cDNA 的质粒 pUC 19 命名为 pHDM01,我们认为这个突变是在 PCR 扩增过程中产生的。

2.3 OSM 表达载体的构建及表达水平分析

将 pHD01 和 pHM01 分别用 BamH I 和 EcoR I 双酶切后回收 OSM cDNA 片段克隆至 pBV220 中进行酶切鉴定(如 Fig. 2)。把带有突变 OSM cDNA 的质粒 pBV 220 命名为 pHZM01,把带有 OSM cDNA 的质粒 pBV 220 命名为 pHZ01。将 pHZM01 和 pHZ01 转化至 DH5 α 诱导表达,SDS-PAGE 分析表明有 OSM 表达,其分子量约为 28 kD,扫描分析 OSM 的表达量约占细菌总蛋白的 5%,超声破碎细菌离心分为上清和沉淀分别电泳分析,发现表达的 OSM 基本上在沉淀中(如 Fig. 3)。说明重组表达的 OSM 是以包涵体形式存在于细菌细胞内。于是我们采用包涵体纯化、变性、复性的常规方法^[7]将 OSM 进行初步纯化和复性。

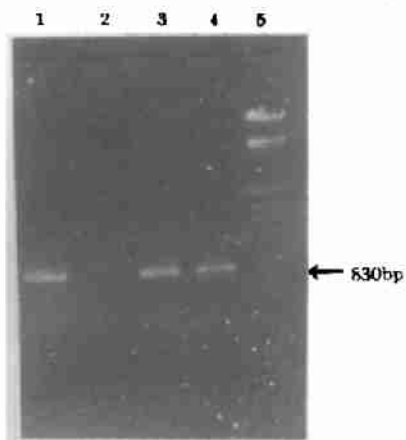


Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR product

- 1,3,4. RT-PCR product
2. Control (1st cDNA free)
5. λ (Hind III + EcoR I) marker

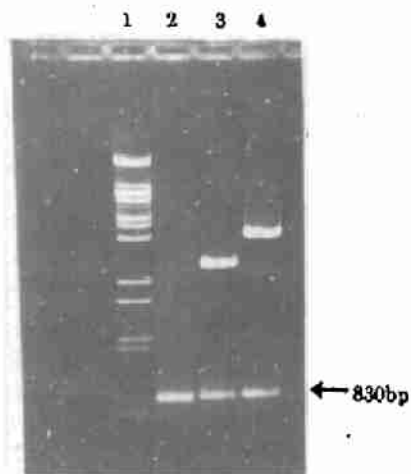


Fig. 2 0.8% agarose gel electrophoresis analysis of restriction fragment of plasmid pHZ01

1. λ (Hind III + EcoR I) marker
2. cDNA of OSM
3. pHZ01 (BamHI + EcoR I)
4. pHZ01 (BamHI + EcoR I)

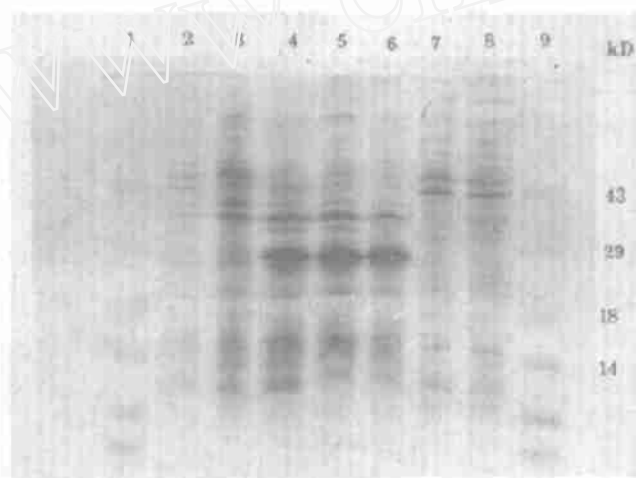


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression level of rhOSM

- 1,9. Molecular weight marker
 2. DH5 α (pBV 220), induced, CTP *
 3. DH5 α (pHZ01), uninduced, CTP *
 4. DH5 α (pHZ01), induced, CTP *
 5. DH5 α (pHZ01), induced, CPP *
 6. DH5 α (pHZM01), induced, CPP *
 7. DH5 α (pHZ01), induced, CSP *
 8. DH5 α (pHZM01), induced, CSP *
- * CPP, cell precipitation protein CSP, cell soluble protein
CTP, cell total protein

2.4 重组人 OSM 的生物学活性分析

初步纯化的重组人 OSM 能明显抑制 A 375 细胞的生长(如 Fig. 4)。实验组与对照组 A 375 细胞在细胞形态及生长曲线均有明显的差异,在对照组加 PBS 和 DH5 α (pBV 220)中, A375 细胞生长基本不受影响,而实验组中 DH5 α (pHZ01)和 DH5 α (pHZM01)均能抑制 A

375 细胞的生长,可以看出 c 组和 d 组中 A375 细胞受抑制的程度是不一样的,判断这种结果是由于两种菌株的表达水平不一样还是由于野生型和突变体 OSM 的抑制活性不一样尚需进一步的实验证实.但野生型和该突变体 OSM 对 A 375 均有抑制作用是可以肯定的.

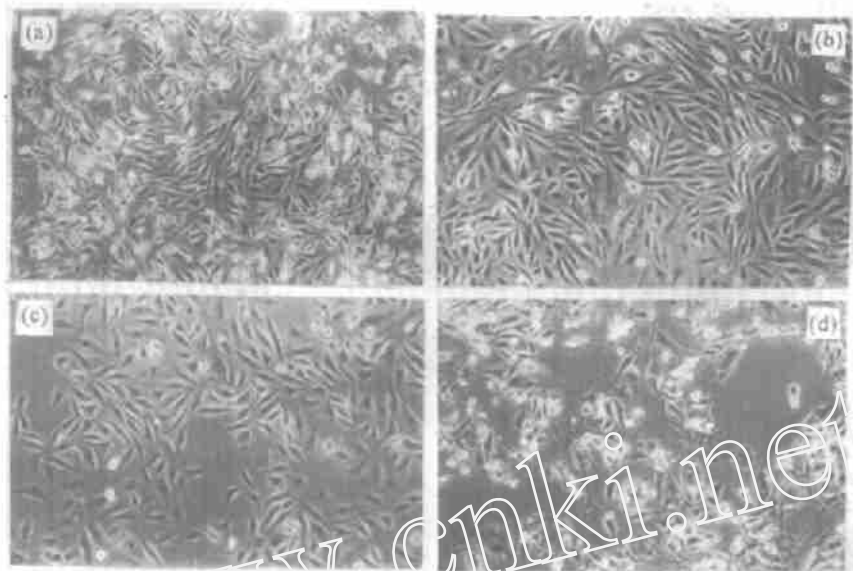


Fig. 4 Determination of biological activity of rhOSM

(a) PBS (b) DH5 α (pBN220) (c) DH5 α (pHZ01) (d) DH5 α (pHZM01)

我们采用逆转录 PCR 技术成功地克隆了 OSM cDNA,并且在大肠杆菌中表达出了有活性的重组人 OSM 蛋白,为下一步进行 OSM 的作用机理研究及 OSM 与其它细胞因子间的功能协调关系研究准备了材料,也为用于临床上进行肿瘤的生物治疗打下了基础.由于 OSM 分子内只有两个二硫键,其中只有一个是其发挥正常的生物活性所必需的,因此我们首先在原核表达,在设计 PCR 引物时去掉了 OSM 的信号肽,同时也去掉了 OSM cDNA 的 3' 端非编码区.为了克隆方便,在引物上还带了酶切位点及保护碱基. A375 细胞是检测 OSM 生物学活性的常用细胞株^[1],我们在实验中合理地设计了多个对照,同时每个样品还设置了三个重复,这样就保证了实验结果的可靠性.

参 考 文 献

- 1 Zarling J M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(24):9739~9743
- 2 Malik N, et al. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**:2847~2853
- 3 Linsley P S, et al. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(5):1882~1890
- 4 Idzerda R L, et al. *J Exp Med*, 1990, **171**:861~873
- 5 Bazan J F, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**:6934~6938
- 6 Rose T M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**:8641~8645
- 7 Sambrook J, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Study on Molecular Cloning and Primary Expression of Oncostatin M

Duan Hai-Qing Zhang Zhao-Shan Dong Zi-Zheng Cao Yong Huang Cui-Fen

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071*)

Abstract Oncostatin M (OSM) is a polypeptide cytokine having diverse biological activity. OSM cDNA was isolated from total RNA of U937 cells treated with PMA through reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis of four positive clones shows that there are three clones having the same sequence with the reported previously and the other one has a point mutation at the 46th threonine codon (ACA to ACG). Cloning the cDNA encoding sequence (without the signal peptide sequence) into plasmid pBV220 and transforming DH5 α resulted expression level of the rhOSM was about 5% of the total cell protein by SDS-PAGE analysis. The crude rhOSM can inhibit the growth of A 375 cells greatly.

Key words: Oncostatin M, RT-PCR, Gene expression, Biological activity