

## 人白细胞介素-11 基因在家蚕培养细胞和虫体内的表达

郭锡杰<sup>1,2\*</sup> 金勇丰<sup>1</sup> 杨明观<sup>2</sup> 张耀洲<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(浙江大学生物化学研究所 杭州 310029) <sup>2</sup>(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

**摘要** 将缺少编码信号肽序列的人白细胞介素-11(hIL-11)546 核苷酸 cDNA,重组于质粒 pBacPAK8 构建重组转移载体 pBacIL-11,与经线性化修饰的家蚕核型多角体病毒(BmBacPAK)DNA 共转染家蚕培养细胞株 BmN,获得了插入 hIL-11 基因的重组病毒。Southern 杂交表明重组病毒基因组中含有 hIL-11 基因片段, RNA 斑点杂交表明 hIL-11 基因得到了转录。重组病毒感染 BmN 细胞株、家蚕幼虫和蛹,在细胞培养上清、细胞抽提物、幼虫和蛹的体液样品中, SDS-PAGE 电泳分析都能检测得到表达产物的特异性条带;采用 IL-11 依赖细胞株 B<sub>0</sub>.11 和 MTT 法测定表达产物的生物活性,表明 hIL-11 基因分别在培养细胞和蚕体内得到了高效表达。

**关键词** 人白细胞介素-11, 重组杆状病毒, 家蚕细胞与虫体, 表达

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0030-05

白细胞介素(IL-11)是哺乳动物造血微环境中来源于骨髓成纤维细胞的一种多功能细胞因子<sup>[1]</sup>。它可以刺激 IL-6 依赖细胞株增殖,对于依赖于 T 细胞的 B 细胞抗体分泌具有刺激作用<sup>[2]</sup>;与 IL-3 协同作用促进人及小鼠巨核细胞的形成与成熟<sup>[3]</sup>,促进原始祖细胞的增殖<sup>[4]</sup>,增加血小板数量,促进红细胞生成<sup>[5]</sup>,诱导肝脏中急性期蛋白的分泌<sup>[6]</sup>,作用于造血微环境,抑制脂肪的积累<sup>[7]</sup>。人白细胞介素 11(hIL-11)cDNA 核苷酸序列含有 597 个核苷酸,预期编码 199 个氨基酸的多肽,前 21 个氨基酸为信号肽,成熟蛋白为 178 个氨基酸残基的活性蛋白。hIL-11 成熟蛋白的氨基酸序列中缺少连接糖侧链的天冬酰胺一致序列(Asn-Xaa-Thr/Ser),因此,表达的蛋白缺少异质性<sup>[2]</sup>。

自 1990 年 IL-11 分子克隆成功以来,IL-11 的基因结构及其生物学功能也相继得到阐明,并先后在哺乳动物细胞 cos-1<sup>[2]</sup>、小鼠成纤维细胞系 NIH-3T3<sup>[8]</sup> 和大肠杆菌<sup>[9]</sup> 中进行表达,获得了有活性的 IL-11。本文选用缺少编码信号肽序列的 546 核苷酸 hIL-11cDNA,构建了重组转移载体质粒,与经线性化修饰的家蚕核型多角体病毒(BmNPV)DNA 共转染家蚕培养细胞株 BmN,获得了插入 hIL-11 基因的重组病毒,分别在培养细胞和蚕体内表达了具有活性的 hIL-11。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

含 hIL-11 cDNA 的 pGEMIL-11,转移载体质粒 pBacPAK8,线性化修饰的 BmNPV,大肠杆菌菌株 TG1,家蚕培养细胞 BmN 均为浙江大学生物化学研究所保存;实验中所用的限制酶,Klenow 酶,T4DNA 连接酶,共转染试剂 Dosper 脂质体为 Boehringer Mannheim 公司产品,昆虫细胞培养基 TC-100 和胎牛血清均为 GIBCO 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 转移载体 pBacIL-11 的构建:**分子克隆方法如限制酶酶切,Klenow 酶末端补平,cDNA 片段回收,与转移载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞等,均参阅文献[10]进行。

**1.2.2 BmNPV DNA 的抽提与酶切线性化:**BmNPV 的繁殖及 DNA 抽提按文献[11]进行。抽提得到的 BmNPV Bm-BacPAK DNA 用限制酶 AocI 酶切,37℃ 反应 2.5h,65℃ 水浴 10min,置 4℃ 备用。

**1.2.3 家蚕细胞培养:**按文献[11]方法进行。

**1.2.4 共转染构建重组病毒:**将重组转移载体 pBacIL-11 与经线性化修饰的 Bm-BacPAK DNA 在共转染试剂 Dosper 介导下共转染 BmN 细胞株<sup>[12]</sup>,27℃ 培养 3~4d 至细胞出现发病症状。

收稿日期:2001-07-30,修回日期:2001-10-25。

\* 通讯作者。现工作单位中国农业科学院蚕业研究所。 Tel:86-511-5616543; Fax:86-511-5622507; E-mail: guoxijie@fm365.com。

**1.2.5 重组病毒的筛选与 Southern 杂交鉴定:**重组病毒筛选参照文献[11]进行, Southern 杂交参照文献[10]进行。

**1.2.6 RNA 斑点杂交:**参照文献[10]进行。

**1.2.7 rhIL-11 在家蚕培养细胞和虫体内表达:**取 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶。分别接种 3 × 10<sup>6</sup> 细胞, 静置使细胞贴壁, 按 MOI = 10 接种重组病毒, 于 27℃ 下培养; 每天取出 3 瓶, 吸出上清液等体积混合于灭菌的离心管内; 然后倒净培养基, 定量加入 0.01 mol/L、pH7.4 PBS。细胞和上清液分别置于 -18℃ 保存, 供测定生物活性。取在 BmN 细胞上扩增繁殖的重组病毒悬浮液, 加入氨苄青霉素至 100 μg/mL。用昆虫针蘸取病毒液, 穿刺接种于五龄起蚕。接种后用喷洒有 500 u/mL 氯霉素溶液的桑叶喂饲 24h, 改用正常桑叶饲养。饲养温度 24 ~ 25℃。每天取蚕数条剪断腹足取出血液, 并加入少量巯基乙醇防止血液氧化变黑, 置 -20℃ 冰冻保存备用。取化蛹后第 2 ~ 3 天的蚕蛹, 用昆虫针接种上述同样处理的重组病毒悬浮液, 于 25℃ 条件下保育, 每天取蚕蛹数个于 -20℃ 冰冻保存备用。

**1.2.8 rhIL-11 SDS-PAGE 鉴定:**取在培养细胞、蚕的幼虫和蛹体内表达的 IL-11 样品, 与等体积上样缓冲液混匀, 沸水浴 5min, 上样前 10000 r/min 离心 10 min, 用 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, 分析表达产物。

**1.2.9 rhIL-11 的活性测定:**细胞样品在冰浴中用超声波处理 2 次, 每次 30s, 4℃、10000r/min 离心 10 min, 上清液用于测定活性, 每次取样的 3 瓶细胞样品按等体积混合; 细胞培养上清液离心去沉淀后用于测定活性。蚕幼虫血液样品经 4℃、12000r/min 离心 10 min, 将上清转移到新的离心管内, 用 PBS (0.01mol/L、pH7.4) 稀释 10 倍后, 再经过一次离心, 上清液用于测定活性。蚕蛹样品的制备是将冷冻蚕蛹磨碎成匀浆, 移入 Eppendorf 管内, 4℃、12000r/min 离心 15 min, 取上层油脂和沉淀之间的水相, 移至灭菌 Eppendorf 管内, 再次离心, 取上清液用 PBS 稀释 10 倍, 再经过 1 次离心, 上清液用于测定活性。移液和稀释均在无菌条件下进行。

样品的活性测定委托苏州大学医学生物技术研究所进行, 方法如文献[13, 14]所述。

## 2 结果

### 2.1 重组转移载体 pBacIL-11 的构建

将携带有 hIL-11 cDNA 的质粒 pGEMIL-11, 用限

制酶 *Nae* I 酶切, 经 Klenow 酶补平后, 用 *Bam*H I 酶切得到约 0.5kb 的 hIL-11 cDNA 片段, 该片段与经 *Hinc* II 和 *Bam*H I 双酶切的质粒 pBluescript 连接, 得到重组质粒 pBsIL-11。将该重组质粒用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 得到加上了 *Xho* I 酶切位点的 hIL-11 cDNA 片段, 定向插入到转移载体质粒 pBacPAK8 的 *Xho* I 和 *Bgl* II 两位点之间, 得到重组转移载体质粒 pBacIL-11, 结构如图 1。

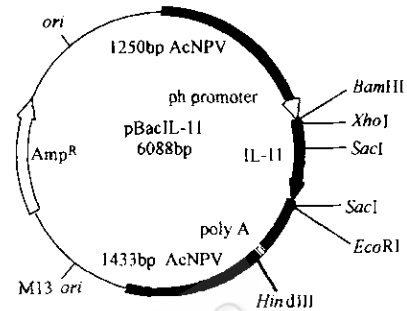


图 1 重组转移载体 pBacIL-11 的结构

Fig.1 Structure of recombinant transfer vector pBacIL-11

### 2.2 共转染与重组病毒筛选

在共转染试剂 Dosper 脂质体作用下, 重组转移载体 pBacIL-11 与线性化的 BmNPV DNA 共转染家蚕培养细胞 BmN, 于 27℃ 条件下培养 4d 左右, 细胞出现明显的发病症状。取培养上清液, 经空斑筛选得到重组病毒, 重组效率为 93%。

### 2.3 Southern 杂交鉴定重组病毒

在 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶内, 铺约 2 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 待细胞贴壁后分别接种经初步测定能表达 rhIL-11 的重组病毒和野生型病毒, 并设不接种对照。培养 72h 后抽提细胞总 DNA, 用限制酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 重组转移载体同样酶切作阳性对照, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段, 拍照记录。采用毛细管转移法将 DNA 转移到尼龙膜上, 以 <sup>32</sup>P 标记的探针进行杂交, 放射自显影结果如图 2 所示。重组转移载体双酶切得到的小片段杂交呈阳性, 双酶切的重组病毒感染细胞的总 DNA 中有一个相同大小的片段也呈杂交阳性, 而野生型病毒感染细胞和无接种细胞的总 DNA 的酶切产物中没有杂交阳性片段出现。说明本实验成功地构建了含 hIL-11 目的基因的重组病毒。

### 2.4 重组病毒对家蚕培养细胞和家蚕幼虫与蛹的感染性

本研究构建的重组病毒对家蚕培养细胞、幼虫和蛹都有很强的感染性。对于培养细胞, 在接种病

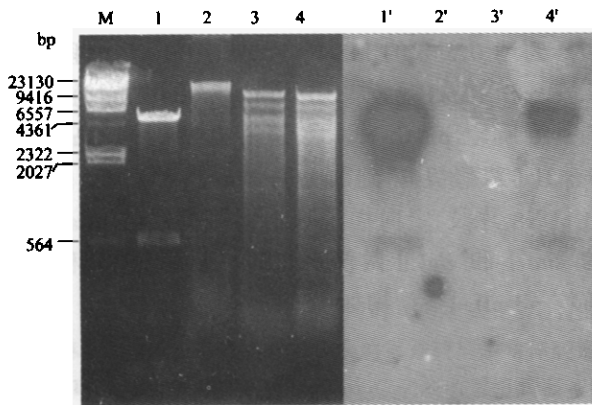


图2 重组病毒的 Southern 杂交鉴定

Fig.2 Analysis of recombinant BmNPV by southern hybridization

1,1'. pBacIL-11; 2,2'. Total DNA of Mock-infected Cells; 3,3'. Total DNA of cells infected with wild-type BmNPV; 4,4'. Total DNA of cells infected with recombinant BmNPV; M. Marker

毒后第3天开始出现发病症状,至第5天细胞即从细胞培养瓶上脱落,悬浮在培养液中。对于家蚕五龄幼虫和蛹,穿刺接种后3~4d即出现明显发病症状,接种后4~5d幼虫狂燥爬行,体壁破裂,流出乳白色体液而死亡;蛹则体壁松软,一触即破,流出体液。因此,在用家蚕幼虫和蛹表达 rhIL-11 时,必须在体壁破裂前收集样品。

## 2.5 重组 hIL-11 mRNA 斑点杂交

用<sup>32</sup>P 标记的探针,与用 Trizol 试剂抽提的 BmN 细胞总 RNA 进行杂交,结果如图3所示。携带有 hIL-11 cDNA 的质粒 pBsIL-11 和 pBacIL-11 都能与探针发生杂交反应,正常细胞和野生型病毒感染细胞的总 RNA,都不能与探针发生杂交反应,而重组病毒感染细胞的总 RNA 与探针发生杂交反应。说明 hIL-11 cDNA 不仅重组进入野生病毒 Bm-PacPAK 的 DNA 中,而且得到了转录。

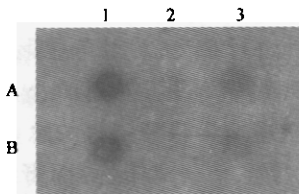


图3 重组人 IL-11 mRNA 点杂交

Fig.3 rhIL-11 mRNA Dot blotting

A1: pBacIL-11; B1: pBsIL-11; A2: Total RNA of mock-infected cells; B2: Total RNA of cells infected with wild-type BmNPV; A3, B3: Total RNA of cells infected with recombinant BmNPV.

## 2.6 表达产物的 SDS-PAGE 检测

将重组病毒以 MOI = 10 感染培养细胞,72h 后

收集上清液和细胞样品。蚕幼虫和蚕蛹则在穿刺接种后 72h 收集血液,用 15% 胶浓度进行 SDS-PAGE 分析。结果在细胞培养上清和细胞样品、血液样品中都能检测得到表达产物的条带,其分子量大小与天然 hIL-11 的分子量相符,约为 19kD,如图4所示。

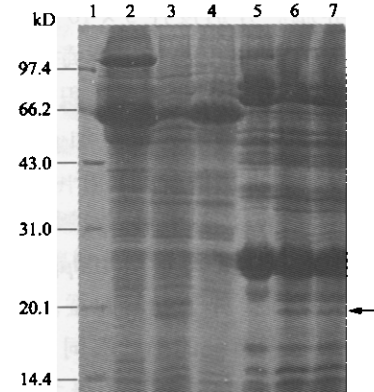


图4 在家蚕细胞和幼虫体内表达的重组人 IL-11 的 SDS-PAGE 检测

Fig.4 SDS-PAGE patterns of rhIL-11 expressed with recombinant BmNPV in cell culture and in larvae of silkworm

1. Marker; 2. Extracts of cells infected with wild-type BmNPV; 3. Extracts of cells infected with recombinant BmNPV; 4. Extract of mock-infected cells; 5. Haemolymph of larvae infected with wild-type BmNPV; 6&7. Haemolymph of larvae infected with recombinant BmNPV (Arrow indicates the bands of rhIL-11)

## 2.7 表达产物的生物活性

重组病毒感染 BmN 细胞的培养上清液和细胞抽提物、重组病毒感染家蚕幼虫和蛹的体液都对 IL-11 依赖细胞株 B<sub>9-11</sub> 具有增殖作用,而野生型病毒感染的细胞、家蚕幼虫和蛹的样品都不支持 B<sub>9-11</sub> 细胞株的增殖,说明重组病毒在培养细胞和蚕体及蛹体内表达了 rhIL-11。初步活性测定结果表明,细胞抽提物和蛹的体液中 IL-11 的活性较高,如表 1、2、3 所示。

表 1 结果显示, hIL-11 标准品对 B<sub>9-11</sub> 细胞株具有增殖作用,当剂量大于 100ng/L 时, hIL-11 对 B<sub>9-11</sub> 细胞的增殖呈正的剂量依赖关系。

表 2 结果显示,重组病毒感染培养细胞的抽提物,能支持 B<sub>9-11</sub> 细胞的生长,随着样品稀释倍数的增加, OD 值呈梯度降低,即对 B<sub>9-11</sub> 细胞的增殖作用降低。表中数据也可以粗略地显示 rhIL-11 在 BmN 细胞中的表达趋势,即重组病毒感染细胞后,第 1 天的表达量较少,以后样品的生物活性逐渐增强,到第 2~3 天生物活性达到最大值,然后又逐渐降低。野

表 1 IL-11 标准品对  $B_{9-11}$  细胞株的增殖作用Table 1 Proliferation of  $B_{9-11}$  cell line stimulated by standard hIL-11

Content (ng/L)	10000	3333	1000	333	100	33	10	3	0
$OD_{570nm}$	1.14	1.10	1.06	0.91	0.65	0.45	0.46	0.50	0.50

表 2 细胞抽提物对  $B_{9-11}$  细胞株的增殖作用 ( $OD_{570nm}$ )Table 2 Proliferation of  $B_{9-11}$  cell line stimulated by extract of cells infected with recombinant baculovirus ( $OD_{570nm}$ )

Dilution	1:100	1:1 000	1:10 000	1:100 000	Non-infection
Days after infection with recombinant virus	1	1.09	0.78	0.45	0.39
	2	1.25	1.11	0.83	0.45
	3	1.24	1.09	0.85	0.47
	4	1.17	0.93	0.52	0.45
	5	0.94	0.53	0.48	0.41
Wild-type virus infection	0.50	0.43	0.43	0.40	0.42

表 3 蚕蛹体液对  $B_{9-11}$  细胞株的增殖作用 ( $OD_{570nm}$ )Table 3 Proliferation of  $B_{9-11}$  cell line stimulated by haemolymph of pupae infected with recombinant baculovirus ( $OD_{570nm}$ )

Dilution	1:1 000	1:10 000	1:100 000	1:1 000 000	Non-infection
Days after infection with recombinant virus	1	0.79	0.59	0.56	0.41
	2	1.34	1.07	0.58	0.42
	3	1.35	1.04	0.88	0.54
	4	1.24	0.99	0.87	0.52
	5	0.90	0.45	0.40	0.38
Wild-type virus infection	0.50	0.43	0.41	0.38	0.34

生型病毒感染细胞的抽提物,则不能支持  $B_{9-11}$  细胞的生长,各稀释度的  $OD$  值基本保持不变,并与阴性对照的  $OD$  值相近。

重组 hIL-11 在蚕蛹体内也得到了高效表达,体液样品经 1:1 000 000 稀释后仍具有生物活性(表 3)。在蚕蛹体内, rhIL-11 的表达也与在培养细胞内呈现相同表达动态趋势,重组病毒感染蚕蛹后,体液中 rhIL-11 的活性随时间的延长而增强,到第 3 天时达到最高,以后逐渐降低。野生型病毒感染蚕蛹的体液其不同稀释度的  $OD$  值也基本保持不变,并与阴性对照的  $OD$  值接近。

### 3 讨 论

如上所述,本实验通过重组转移载体与经线性化修饰的家蚕核型多角体病毒 DNA 共转染家蚕培养细胞,经蓝白斑筛选、Southern 杂交鉴定,证明成功地构建了含有 hIL-11 基因的重组病毒。重组病毒对 BmN 细胞株和家蚕幼虫及蛹都具有较强的感染性,从重组病毒感染细胞抽提的总 RNA 斑点杂交呈

阳性反应,感染细胞的抽提物、培养上清液、感染幼虫和蛹的体液都具有 hIL-11 的生物学活性。这些结果说明,重组病毒感染细胞后,在病毒的复制过程中, hIL-11 基因不仅得到了正确转录,而且表达了具有生物活性的 hIL-11 蛋白。

鉴于 IL-11 重要的生物学功能和临床意义,国内外多家研究机构相继进行研究和表达。但由于 IL-11 在体内的有效作用剂量较高<sup>[15]</sup>,建立一种 IL-11 的高效表达系统具有广阔的应用前景。杆状病毒表达系统表达外源基因具有表达效率高、表达后加工较完善等特点,已受到越来越多的重视。而家蚕杆状病毒表达系统,因家蚕容易大量饲养、蚕体大,比其他昆虫杆状病毒表达系统具有更大的优越性,采用该系统表达 IL-11,可望建立一条高效表达生产 IL-11 的有效途径。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Du X X, Williams D A. Interleukin-11: A multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood*, 1994, 83: 2030 ~ 2038

- [ 2 ] Paul S R, Bennett F, Calvetli J A *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**:7512 ~ 7516
- [ 3 ] Taramura M, Kobayashi S, Hoshino S *et al.* Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Blood*, 1992, **79**:327 ~ 331
- [ 4 ] Schibler K R, Yang Y C, Christensen R D. Effect of interleukin-11 on cycling status and clonogenic maturation of fetal and adult hematopoietic progenitors. *Blood*, 1992, **80**:900 ~ 903
- [ 5 ] Du X X, Williams D A. Interleukin-11: Review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood*, 1997, **89**:3897 ~ 3908
- [ 6 ] Baumann H, Schendel P. Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J Biol Chem*. 1991, **266**:20424 ~ 20427
- [ 7 ] Killer D C, Du X X, Srou E F *et al.* Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in long term marrow cultures. *Blood*, 1993, **82**:1428 ~ 1435
- [ 8 ] SUN K(孙凯), JIN B Q(金伯泉), ZHU Y(朱勇) *et al.* Experimental study of the effects of interleukin-11 gene therapy on mouse hematopoiesis. *Chinese Journal of Immunology* (中国免疫学杂志), 1997, **13**:71 ~ 74
- [ 9 ] MIAO J H(苗继红), WANG J X(王嘉玺), PENG S Y(彭善云) *et al.* Cloning and expression of human interleukin-11 gene in *Escherichia coli*. *Science in China* (Series B) (中国科学(B辑)), 1995, **25**:616 ~ 622
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 11 ] Summers M D, Smith G E. A manual of method for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, 1987, pp. 33 ~ 35
- [ 12 ] Kitts P A, Possee R D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*, 1993, **14**: 810 ~ 817
- [ 13 ] LIU B L(刘蓓岭), WANG J F(王江方), ZHANG X G(张学光). A highly sensitive specific bioassay for human interleukin-11. *Chinese Journal of Hematology* (中国血液学杂志), 1996, **17**:654 ~ 655
- [ 14 ] CHEN Y Z(陈永珍), WANG J F(王江方), ZHANG X G(张学光) *et al.* Bioassay method for human interleukin-11. *Chinese Journal of Immunology* (中国免疫学杂志), 1997, **13**:165 ~ 166
- [ 15 ] Schwertschlag U S, Trepicchio W L, Dykstra K H *et al.* Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*, 1999, **13**:1307 ~ 1315

## Expression of Human Interleukin-11 in Cell Culture and Larvae of Silkworm

GUO Xi-Jie<sup>1,2\*</sup> JIN Yong-Feng<sup>1</sup> YANG Ming-Guan<sup>2</sup> ZHANG Yao-Zhou<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and <sup>2</sup> College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** A recombinant transfer vector, pBacIL-11, containing hIL-11 cDNA of 546 nucleotides lacking leader sequence was constructed and co-transfected into BmN cells with linearized BmBacPAK(modified BmNPV) DNA for construction of a recombinant baculovirus carrying the hIL-11 gene. Southern hybridization analysis suggested that the recombinant baculovirus DNA contained hIL-11 cDNA fragment. RNA dot blotting demonstrated that the hIL-11 gene was transcribed. The recombinant baculovirus has a strong infectivity to BmN cell line and to silkworm larvae and pupae. Specific hIL-11 bands were detected from all the samples of cell extract, culture supernatant, haemolymph of larvae and pupae by SDS-PAGE analysis. Biological activity of the expressed product was determined with IL-11 dependent B<sub>9</sub>-11 cell line and by MTT colorimetric assay, which indicated that biologically active rhIL-11 protein was overexpressed in BmN cell line and in silkworm larvae and pupae.

**Key words** human interleukin-11, recombinant baculovirus, cell culture and silkworm, expression

Received: 07-30-2001

\* Corresponding Author. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang City 212018, Jiangsu Province, China.  
Tel: 86-511-5616543; Fax: 86-511-5622507; E-mail: guoxijie@fm365.com