

利用同源蛋白的信号肽和前肽序列在 CHO 细胞中表达重组人 BMP6 Expression of Recombinant Human BMP6 in CHO Cells by Fused to the Signal Peptide and Propeptide of Another Homologue Protein

闫继东, 杨爽, 吕树军, 雷荣悦, 朱天慧*

YAN Ji-Dong, YANG Shuang, LÜ Shu-Jun, LEI Rong-Yue and ZHU Tian-Hui*

南开大学医学院分子遗传实验室, 天津 300071

Laboratory of Molecular Genetics, College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

摘 要 BMP6 属于 TGF- β 超家族, 具有较强的骨诱导作用。主要利用 BMP6 自身的信号肽、前肽与成熟肽基因序列构建了表达质粒 pcDNA-BMP6, 同时利用 BMP2 的信号肽、前肽与 BMP6 的成熟肽基因序列构建了表达质粒 pcDNA-BMP2/6。将两种质粒分别瞬时转染 Cos7 细胞, 发现质粒 pcDNA-BMP2/6 表达 rhBMP6 的效率高于质粒 pcDNA-BMP6。然后将质粒 pcDNA-BMP2/6 与含二氢叶酸还原酶基因(*dhfr*)的表达质粒共转染 *dhfr* 缺陷型的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞, 经 G418 筛选、氨甲蝶呤(MTX)介导目的基因扩增、亚克隆后得到表达 rhBMP6 成熟肽的单克隆细胞株。将表达产物 rhBMP6 初步纯化后, 能诱导前成肌细胞系 C2C12 向成骨细胞方向转化, 显示其具有骨诱导作用。

关键词 BMP6, 中华仓鼠卵巢细胞, 重组表达, 骨诱导作用

中图分类号 Q897 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0413-05

Abstract BMP6 is a member of TGF- β superfamily, represent more effective osteogenic activity. Two recombinant plasmids were constructed to expression rhBMP6 in mammalian cells, one contained the cDNA encoding the signal peptide, propeptide and mature peptide of human BMP6, which was named pcDNA-BMP6, the other contained the recombinant DNA encoding the signal peptide, propeptide of human BMP2 and the mature peptide of BMP6, which was named pcDNA-BMP2/6. Transient expression in Cos7 cells demonstrated that the pcDNA-BMP2/6 produced more rhBMP6 than pcDNA-BMP6. For stable expression, the CHO-*dhfr*⁻ cells were transfected with pcDNA-BMP2/6 and pSV2-*dhfr*, then screened by G418 and treated with MTX for targeting gene amplification. The partially purified rhBMP6 by heparin affinity chromatography was shown to possess bone induction activity tested by the induction of alkaline phosphatase activity in C2C12 cells.

Key words BMP6, Chinese hamster ovary cell, recombination expression, bone induction

人们很早就发现脱钙骨基质能诱导骨形成, 但是直到 1965 年才由 Urist 分离出骨基质中能诱导骨形成的有效成分, 并将这种活性物质命名为骨形态

发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)^[1]。研究表明, BMPs 属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族, 它与该家族其它成员

Received: October 26, 2006; Accepted: December 19, 2006.

This work was supported by the grant from the Natural Science Foundation of Tianjin Municipality(No. 05YFJMJC01800).

* Corresponding author. Tel: +86-22-23505501; Fax: +86-22-23505501; E-mail: zhuth@nankai.edu.cn

天津市自然科学基金资助(No. 05YFJMJC01800)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

一样,在体内先合成包括信号肽、前肽和成熟肽的前体蛋白,通过三对链内二硫键形成半胱氨酸结构,一对链间二硫键形成同源或异源二聚体。经糖基化、酶切后释放出成熟肽二聚体来发挥其生物学功能。目前已发现的 BMPs 有十多种,不同 BMPs 的骨诱导作用方式和强度有所不同。

骨形态发生蛋白 6 (bone morphogenetic proteins 6, BMP6) 为 BMPs 家族中发现较晚的成员,作用于骨形成的更早期,能诱导成软骨细胞前体细胞分化,促进成软骨和成骨表型形成,对软骨与骨形成起关键作用^[2,3];BMP6 在骨折愈合过程的不同阶段均受到诱导表达,对骨折愈合发挥重要作用^[4];用携带不同 BMPs 基因的腺病毒载体分别转染成肌细胞系、裸鼠和大鼠时,发现 BMP6 与 BMPs 家族其它成员相比,以软骨内和膜内成骨方式,产生很强的骨诱导作用^[5,6]。但是 BMPs 组织含量低、来源有限、分离纯化步骤繁琐,而且存在感染、过敏等不良反应,难以满足实践的需要。通过基因重组技术制备人 BMP6,不仅可以满足基础与临床研究的需要,而且无感染和过敏等风险^[7,8]。

本研究旨在通过构建两种不同的 rhBMP6 表达质粒,在瞬时转染中比较其表达效果,并选其表达量高者制备稳定转染细胞株,对其生物学活性进行检测,为进一步的研究及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞株

质粒 pSV2-*dhfr*、pcDNA3.1(+) 由本室保存,pcDNA-BMP2/6、pcDNA-BMP6 为本室构建。菌株 DH5 α 本室保存, LB 培养基培养。Cos7、C2C12 细胞本室保存,在 10% FBS 的 DMEM 上培养;CHO-*dhfr*⁻ 购自上海细胞库,10% FBS 的 IMDM 培养基中添加次黄嘌呤和胸腺嘧啶培养,细胞培养基均含 100u/mL 青霉素-100 μ g/mL 链霉素,培养条件均为 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂。

1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及 T4 磷酸激酶购自大连宝生物公司,逆转录酶 MMLV 购自 Promega 公司,DNA 片段凝胶回收、质粒制备试剂购自 OMEGA 公司,Lipofectamine 2000、细胞培养试剂购自 Invitrogen 公司,羊抗人 BMP6 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology Inc,抗羊 IgG-HRP 购自 Promega,hBMP6 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,Heparin CL-6B 购自 Pharmacia 公司,碱性磷酸酶活性测定试剂盒、氨甲

蝶呤 (MTX) 购自 Sigma 公司,G418 购自 Promega 公司。

1.3 引物设计、合成与处理

根据人 BMP2 和 BMP6 的 mRNA 序列设计引物,由 Invitrogen 公司合成。克隆人 BMP2 信号肽、前肽基因序列 (pBMP2) 的上游引物为 hB2-321F :5'-gctggatccaccatggtggccgggaccgctgc-3' (BamH I),下游引物为 hB2-1169R :5'-acgtttttctctttgtggagaggatg-3';人 BMP6 成熟肽 (mBMP6) 的上游引物为 hB6-1323F :5'-caacagatcgtaatca-3',下游引物为 hB6-1721R :5'-ggccggctcagtagtggcatccacaagctct-3' (Xho I);人 BMP6 信号肽、前肽和成熟肽 (BMP6) 的上游引物为 hB6-16F :5'-ccttaagcttccggacgaccatgagagata-3' (Hind III),下游引物为 hB6-1721R。其中 hB2-1169R 与 hB6-1323F 经 T4 磷酸激酶磷酸化处理。GAPDH 的上游引物为 5'-tgaaggtcggtgtgaacggat-3',下游引物为 :5'-catgtaggccatgaggtccaccac-3'。

1.4 表达质粒 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 的构建

人胎盘组织由天津市第一中心医院妇产科提供,总 RNA 的抽提方法按 Trizol 试剂操作说明进行。取 2 μ g 总 RNA 为模板反转录,以反转录产物为模板,PCR 扩增 pBMP2、mBMP6 和 BMP6,反应产物按照 DNA 片段凝胶回收试剂的操作说明进行纯化、回收。将 BMP6 克隆到 pcDNA3.1(+) 中,构建成重组质粒 pcDNA-BMP6,pBMP2 和 mBMP6 片段用 T4 DNA 连接酶连接,以连接反应产物为模板,以 hB2-321F 与 hB6-1721R 为引物,PCR 扩增得到 BMP2/6,克隆到 pcDNA3.1(+) 中,构建成重组质粒 pcDNA-BMP2/6。

将重组质粒分别转化 DH5 α 菌株,经过菌落 PCR 初步筛选、限制性酶切反应鉴定后,获得的阳性克隆进行测序。用 BLAST 程序比对重组片段与目的基因在序列、起始密码子和阅读框架的一致性。

1.5 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 的瞬时表达

重组质粒 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 的大量制备按照质粒制备试剂的操作说明进行,Cos7 细胞为表达宿主,电穿孔介导转染。20 μ g 质粒/2 \times 10⁶ 细胞,终体积 0.4mL 加入到 0.4cm 电击杯中混匀,以 220V、25ms 间隔,电击 1 次,接种于 10cm 培养皿中。隔天换无血清培养基,24h 后收集,免疫印记检测 rhBMP6 蛋白水平的表达;Trizol 法提取总 RNA,RT-PCR 检测 rhBMP6 mRNA 水平的表达。

1.6 稳定表达 rhBMP6 细胞株的构建

按脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 的操作

说明 将 pcDNA-BMP2/6 与 pSV2-dhfr 以 10:1 的比例共转染 CHO-dhfr⁻。转染 48h 后消化,用含 0.75mg/mL G418 的选择培养基接种于培养皿中,筛选稳定转染细胞。

将稳定转染细胞消化后,用含 MTX 0.05 μ mol/L 的扩增培养基,以 3×10^5 细胞接种于 T25 培养瓶中,传 3 代后 4 倍梯度增加 MTX 浓度。MTX 浓度增加至 1.6 μ mol/L 时终止。然后消化细胞以 0.8 个细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板中,筛选单克隆细胞株。

1.7 rhBMP6 的表达和初步纯化

将稳定表达 rhBMP6 的单克隆 CHO 细胞株,接种到 T175 培养瓶,完全培养基培养至细胞汇合约 80% 后,换无血清培养基。将所收集培养基用截留分子量为 10kD 的超滤膜超滤浓缩 10 倍,浓缩液用 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 0.15mol/L NaCl 的结合缓冲液进行缓冲液交换,然后结合于溶胀、平衡好的 heparin Sepharose CL-6B 肝素亲和介质,用 10 倍体积的结合缓冲液洗涤后,用 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 1mol/L NaCl 洗脱,洗脱液经超滤浓缩、脱盐后 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.8 rhBMP6 浓度和蛋白含量测定

按照 hBMP6 DuoSet ELISA Development kit 操作步骤测定无血清培养基或初步纯化产物中 rhBMP6 的含量。蛋白浓度测定采用 BCA 显色法,牛血清白蛋白为标准品。

1.9 SDS-PAGE 和 Western blot

SDS-PAGE 和 Western blot 检测条件培养中 rhBMP6 的分泌表达。无血清培养基经三氯乙酸法 (TCA) 沉淀浓缩后,适量 PBS 溶解,BCA 法测定总蛋白浓度后, -70 $^{\circ}$ C 保存^[9]。SDS-PAGE 采用 Tris-Tricine 缓冲系统,还原或非还原性条件,Western blot 参照《分子克隆实验指南》^[9]所述方法进行。一抗为 2 μ g/mL 羊抗人 BMP6 多抗,二抗为 1:3000 稀释偶联辣根过氧化物酶的抗羊抗体,底物为氨基苯二酰肼。

1.10 rhBMP6 的生物学活性

根据骨形态发生蛋白能诱导成肌细胞向成骨细胞方向转化的原理,通过体外检测成肌细胞系 C2C12 在 rhBMP6 的诱导下,成骨细胞特异性标志物碱性磷酸酶表达水平的变化,来检验所得 rhBMP6 的骨诱导作用。以 3×10^3 个细胞/孔接种 C2C12 于 96 孔细胞培养板中,24h 后,换含不同浓度 rhBMP6、5% FBS 的 DMEM 3d 后 MTT 法计数活细胞,再加入碱性磷酸酶的底物,室温 20min 后测 A_{405} , A_{405} 经活细胞数平均后,比较组间差异。

2 结果

2.1 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 的构建与鉴定

以人胎盘 cDNA 为模板,经特异引物扩增后分别得到与 pBMP2、mBMP6 和 BMP6 的基因序列大小一致的片段;以 pBMP2 与 mBMP6 的连接产物为模板扩增到与 BMP2/6 基因序列大小一致的片段。将 BMP6 和 BMP2/6 分别克隆到 pcDNA3.1(+) 中,得到 pcDNA-BMP2/6 与 pcDNA-BMP6,经限制酶切鉴定后,选取阳性菌株进行测序。测序结果表明,基因序列、起始密码子及翻译框架与预期一致,说明重组质粒构建成功。

2.2 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 的瞬时表达

重组质粒 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 瞬时转染 Cos7 细胞 24h 后,提取细胞总 RNA,经 RT-PCR 反应检测发现,与转染空载体的对照组相比,质粒 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 在 mRNA 水平都能够有效表达 rhBMP6 (图 1)。

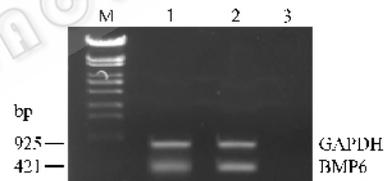


图 1 RT-PCR 检测 pcDNA-BMP6 与 pcDNA-BMP2/6 在 Cos7 中瞬时转染后的 mRNA 转录水平

Fig.1 Transient expression of pcDNA-BMP6 and pcDNA-BMP2/6 in Cos7 by RT-PCR

M :DNA molecular weight marker ; 1 : pcDNA-BMP2/6 ; 2 : pcDNA-BMP6 ; 3 : negative.

制备重组质粒 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6,瞬时转染 Cos7 细胞 24 h 后,收集无血清条件培养基经 TCA 沉淀、浓缩,经 10% SDS-PAGE、Western blot 检测,结果如图 2 所示,Cos7 细胞瞬时转染 pcDNA-BMP2/6 后的条件培养基在还原和非还原条件下,各检测到一条特异的条带;而转染 pcDNA-BMP6 后检

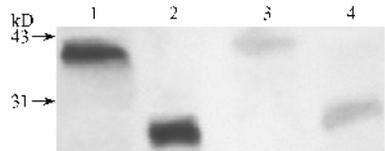


图 2 免疫印记检测 pcDNA-BMP6 与 pcDNA-BMP2/6 在 Cos7 中的瞬时表达

Fig.2 Transient expression of pcDNA-BMP6 and pcDNA-BMP2/6 in Cos7 by Western blot

pcDNA-BMP2/6.1 : non-reduced condition ; 2 : reduced condition ;

pcDNA-BMP6.3 : non-reduced condition ; 4 : reduced condition.

测到不明显的条带,表明重组质粒 pcDNA-BMP2/6 能在培养哺乳动物细胞中有效表达、分泌 rhBMP6。

2.3 稳定表达 rhBMP6 细胞株的构建

将 pcDNA-BMP2/6 与 pSV2-dhfr 共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, G418 筛选获得稳定转染细胞后,通过 MTX 使目的基因得以扩增。收集扩增前后的条件培养基,经 10% SDS-PAGE 与 Western blot 检测,表明扩增后 rhBMP6 的表达水平(图 3)有明显增加。亚克隆后,经 ELISA 检测、筛选到 rhBMP6 表达水平为 19.89ng/(10⁶ cells · 24h) 的单克隆细胞株 CHO-hBMP6。

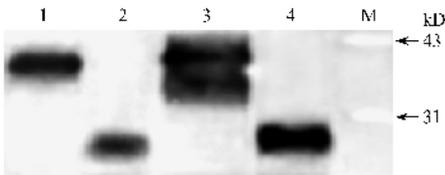


图 3 免疫印记检测 MTX 介导基因扩增前后 rhBMP6 表达量

Fig.3 The productivity of rhBMP6 increased after MTX mediated gene amplification

M: protein molecular weight marker. Before amplification. 1: non-reduced condition; 2: reduced condition. After amplification. 3: non-reduced condition; 4: reduced condition.

2.4 rhBMP6 的初步纯化与生物学活性

通过分批结合、洗脱的方法,用肝素亲和层析对条件培养基中的 rhBMP6 进行初步纯化。用含 0.15mol/L NaCl 的结合缓冲液平衡后,约 80% 的杂蛋白都不结合,然后用含 1mol/L NaCl 的洗脱缓冲液将 rhBMP6 洗脱,因此经过初步纯化可以去除 80% 左右的杂蛋白。洗脱液经超滤脱盐、浓缩后得到初步纯化产物。

体外检测成肌细胞系 C2C12 在初步纯化的 rhBMP6 的诱导下,成骨细胞标志物碱性磷酸酶活性呈剂量依赖地显著增加(图 4),表明所得 rhBMP6 具有明显的骨诱导作用。

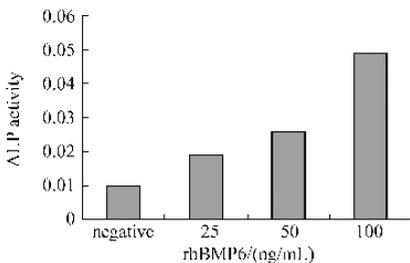


图 4 rhBMP6 的生物学活性

Fig.4 Biological activity of rhBMP6 measured by induction of ALP activity in C2C12 cells

3 讨论

骨的生长发育和成体后骨重建过程中骨组织形态结构的发生与形成,是众多生长因子与其胞内信号途径参与的一个复杂过程。BMPs 是其中的关键因素,外源性给予 BMPs 可以补充骨损伤部位内源性 BMPs 的不足,促进骨缺损的修复,加快缺损骨组织的重构。

由于 BMPs 在骨组织中含量甚微,通过基因重组技术制备 BMP6 是现实可行的途径。目前大肠杆菌和哺乳动物细胞是应用最成熟的表达系统,我们已尝试过以大肠杆菌为宿主细胞表达 rhBMP6,结果 rhBMP6 以包涵体形式产生^[10],但是与在大肠杆菌中以包涵体形式表达的 rhBMP2 相比,rhBMP6 的复性得率却很低,尚不清楚为什么同源性很高的两种蛋白在复性得率方面差别很大^[11]。由于哺乳动物细胞表达系统表达的重组蛋白在分子结构、理化特性和生物学功能方面更接近天然蛋白分子,因此本研究采用哺乳动物细胞为表达宿主。

我们分别构建了含 BMP6 信号肽、前肽与成熟肽基因序列和含 BMP2 信号肽、前肽与 BMP6 成熟肽基因序列的哺乳动物细胞表达质粒 pcDNA-BMP6 与 pcDNA-BMP2/6,该质粒均含有 CMV 启动子、SV40 复制起点及 Neomycin 抗性基因。分别将 pcDNA-BMP6 和 pcDNA-BMP2/6 在相同条件下瞬时转染 Cos7 细胞后,在 mRNA 水平,两者都有相似的表达水平,而在胞外分泌蛋白水平上却有明显的差异,pcDNA-BMP2/6 比 pcDNA-BMP6 更能有效表达、分泌 rhBMP6。只有在 pcDNA-BMP6 质粒和细胞数量增加约为 pcDNA-BMP2/6 的 10 倍以后,才能明显检测到 rhBMP6 的表达(结果未列出)。表明转染由 BMP2/6 构成的融合质粒不仅能够有效地分泌表达 rhBMP6,而且表达效率比 BMP6 基因构建的质粒高。这可能是由于 BMP2 基因的翻译起始、分泌效率本身较高的缘故。与 Zou 等应用鼠血清白蛋白信号肽序列在 CHO 表达 TGF- β 1 的结果一致^[12],采用自然条件下高表达蛋白的信号肽序列能提高外源目的蛋白的表达量。

本研究以 CHO 为表达宿主,经抗性筛选、基因扩增后得到 rhBMP6 表达量较高的细胞株,表达产物经初步纯化后,具有有效的骨诱导作用。为 BMP6 的结构和功能研究,以及进一步的应用开发研究奠定了基础,也为其它重组蛋白的分泌表达提供借鉴作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Urist MR. Bone : formation by autoinduction. *Science* , 1965 , **150** (698) :893 - 899.
- [2] Gitelman SE , Koblin MS , Ye JQ , *et al* . Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and enchondral bone formation *in vivo* . *The Journal of Cell Biology* , 1994 , **126** (6) :1595 - 1609.
- [3] Gitelman SE , Kirk M , Ye JQ , *et al* . Vgr-1/BMP-6 induces osteoblast differentiation of pluripotential mesenchymal cells. *Cell Growth & Differentiation* , 1995 , **6** (7) :827 - 836.
- [4] Le AX , Miclau T , Hu D , *et al* . Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *Journal of Orthopaedic Research* , 2001 , **19** (1) :78 - 84.
- [5] Li JZ , Li H , Sasaki T , *et al* . Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Therapy* , 2003 , **10** (20) :1735 - 1743.
- [6] Kang Q , Sun MH , Cheng H , *et al* . Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Therapy* , 2004 , **11** (17) : 1312 - 1320.
- [7] Pietro De Biase , Rodolfo Capanna. Clinical applications of BMPs. *Injury* , 2005 , **36** (S3) :S43 - S46.
- [8] Termaat MF , Den Boer FC , Bakker FC , *et al* . Bone morphogenetic proteins development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 2005 , **87** :1367 - 1378.
- [9] Sambrook J , Russell D. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 3rd eds , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001.
- [10] Yang JH (阳菊华) , Zhao L (赵丽) , Yang S (杨爽) , *et al* . Expression of recombinant human BMP6 in *E. coli* and its purification and bioassay *in vitro* . *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* 2003 , **19** (5) :556 - 560.
- [11] Wolfman. Mutants of bone morphogenetic proteins. United States Patent , 5804416 , 1998.
- [12] Zou ZC , Sun PD. Overexpression of human transforming growth factor- β 1 using a recombinant CHO cell expression system. *Protein Expression and Purification* , 2004 , **37** (2) :265 - 272