

人骨形成蛋白-2A 与小鼠成骨细胞表面特异性结合的研究

刘新平 陈苏民 陈南春 高磊 赵忠良

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 西安 710032)

摘要 作者证实在大肠杆菌中表达的人骨形成蛋白-2A(hBMP2A)C端肽段具有骨诱导活性,再利用噬菌体呈现载体克隆并表达了 hBMP2A cDNA 3'端 567 个核苷酸,表面呈现有人 BMP2A C端肽段的噬菌体与小鼠成骨细胞系(MC3T3)能够特异地结合,用抗 M13 噬菌体抗体进行 ELISA 实验呈阳性反应,同时用³HTdR 参入重组 BMP2A 噬菌体时放射性计数比对照组高近 10 倍,推测小鼠成骨细胞表面存在有人 BMP2A 受体。

关键词 人 BMP2A,噬菌体呈现,ELISA,³HTdR 参入,受体

已经证明人 BMP2A 属于 TGF β 超家族中的一员,它的主要生物学活性是在体内诱导异位间充质细胞转化成软骨及骨细胞^[1],是人 BMP 家族中最有希望成为临床治疗多种骨缺损及骨疾病的生长因子,为了研究人 BMP2A cDNA 的活性区段及其作用机制,首先在大肠杆菌中成功地表达了人 BMP2A C 端 173 个氨基酸(另文报道),并证实它在小鼠肌肉中具有很好的骨诱导活性,然后又成功地利用噬菌体呈现载体表达了人 BMP2A cDNA 的 3'末端,并证明融合有人 BMP2A C 端肽段的噬菌体能与小鼠成骨细胞(MC3T3)表面结合,推测这种细胞表面可能存在有人 BMP 2A 的受体,这为进一步探讨人 BMP2A 通过怎样的信号转导系统将信息传入细胞内以及引起细胞内哪些生物学变化的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 PSP65-BMP2A cDNA:本校口腔医学院杨连甲教授赠送。

1.1.2 pCSM21 表达载体:陈苏民教授构建。

1.1.3 *E. coli* TG1:SupE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'(traD36 proAB⁻ lacI^d lac Z Δ M15)购自瑞典 pharmacia 公司。

1.1.4 限制酶:购自美国 promega 公司。

1.1.5 兔抗 M13 噬菌体抗血清:购自瑞典 pharmacia 公司。

1.1.6 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG:购自瑞典 pharmacia 公司。

1.1.7 邻苯二胺:购自 sigma 公司。

1.1.8 ³HTdR:中科院上海原子核研究所,比度为 22Ci/毫克分子,浓度为 1mCi/ml。

本文于 1995 年 3 月 13 日收到。

1.1.9 小鼠成骨细胞系(MC3T3):为本室冻存。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 重组及克隆:参照 Maniatis 等方法^[2]。

1.2.2 重组噬菌体—BMP2A 的表达:参照 Pharmacia 公司的重组噬菌体抗体系统的说明书进行。

1.2.3 重组噬菌体—BMP2A 基因的³HTdR 掺入:按 Miyazono, k. 等人的方法进行^[3]。

1.2.4 重组噬菌体—BMP2A 表达产物与 MC3T3 细胞表面结合活性的 ELISA 实验按 Pharmacia 公司的重组噬菌体抗体系统说明书修改后进行。

2 结果

2.1 人 BMP 2A C 端肽段的诱骨活性

大肠杆菌表达的人 BMP 2A C 端肽段,分子量 2.1kDa,经变性复性后定量冰冻干燥,取 2mg 埋植在 4 周龄昆明小鼠后肢股四头肌内,3 周后组织切片观察,图 1 可见肌肉组织中典型的骨诱导动态过程,间充质细胞增生肥大,核呈椭圆形,逐渐变成圆形,形成软骨细胞,最后软骨基质衍变成骨小梁,证明人 BMP2A C 端 173 个氨基酸在大肠杆菌中表达的产物具有良好的异位诱骨活性(图 1)。

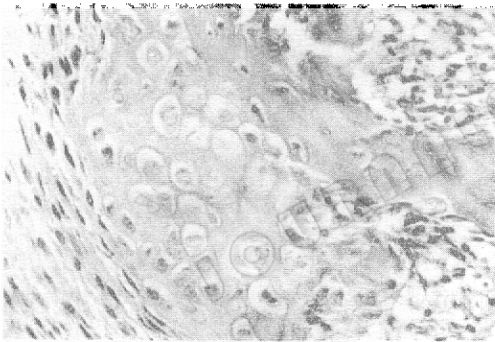


图 1 人 BMP2A C 端肽段在小鼠股四头肌中的诱骨活性

Fig. 1 Induced activity of hBMP2A C terminal peptide in mouse muscles

2.2 人 BMP2A cDNA 3' 端克隆入噬菌体表达载体

重组噬菌体表达载体 pCSM21(构建将有另文报道)是含有 lac 启动子,及 M13 噬菌体基因 III 全序列,并在基因 III 信号肽序列与编码成熟的基因 III 蛋白(gp3)序列之间插入多克隆位点,在证实了人 BMP2A C 端肽段有活性的基础上,再将这段人 BMP2A cDNA 3' 端 567 个核苷酸序列克隆到基因 III 信号肽下游,并调整其下游基因 III DNA 序列的读框,使人 BMP2A 与 gp3 以融合蛋白形式表达并组装在噬菌体表面,见图 2 和图 3。

2.3 重组噬菌体—BMP2A ³HTdR 的标记

克隆入 pCSM21 表达载体的人 BMP2A 3' 端 cDNA 基因与噬菌体基因 III 融合,形成一种表达性噬粒(Phagemid),它带有 M13 噬菌体单链和双链质粒的复制区,但要包装成完整的噬菌体必须有辅助噬菌体 M13K07 (Helper phage)的存在。

当噬菌体在菌体内复制时,加入³HTdR 使形成的重组噬菌体 DNA 带上了同位素的标记,这便于以后的检测。

过夜培养大肠杆菌 TG1(pCSM21-BMP2A),次日改用 2×YT 培养液(100μg/ml 氨苄青霉素 2% 葡萄糖),对照管用大肠杆菌 TG1(pCSM21),各加入 1μCi ³HTdR,37℃ 3h,各加 M13K07 12.5μl(2×10¹¹ pfu),37℃ 1h,再用 4ml 2×YT 培养过夜后,用 PEG-NaCl 沉淀重组

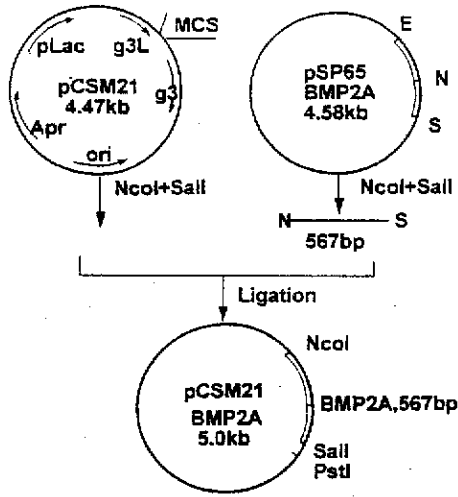


图 2 重组 BMP2A 噬菌体表达载体的构建

Fig.2 Construction of expressed phagemid of recombinant BMP2A

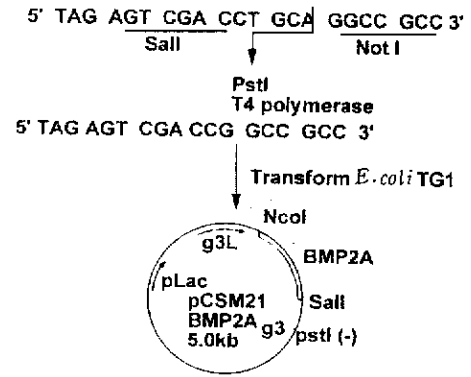


图 3 调整重组 BMP2A 噬菌体的读框

Fig.3 Adjustment of reading frame of recombinant BMP2A phagemid

噬菌体,噬菌体内被³HTdR 所标记,结果: 2.2×10^{15} pfu(噬斑形成单位)/ μ l,液闪计数为 30,000cpm/min。

2.4 重组噬菌体 BMP2A 与小鼠成骨细胞的特异性结合

2.4.1 ELISA 实验:10%小牛血清 DMEM 完全培养液培养小鼠成骨细胞(MC3T3),加入 96 孔培养板, 3×10^4 细胞/孔。按重组噬菌体-BMP2A 不同滴度加入每孔 MC3T3 中,37℃ 培养 4h 吸出全部液体后 PBS 洗 3 次,各加 20 μ l 兔抗 M13 血清(1:500 稀释)37℃ 2h 后;PBS 洗 3 次,各加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:1000 稀释),37℃,1h,PBS 洗 3 次,OPD 显色并读数,表 1 为 3 次实验的数据结果。

表 1 重组 BMP2A 噬菌体和对照噬菌体 ELISA 读数的比较

Table1 Comparison of ELISA counts of recombinant BMP2A phage and control phage

	Recombinant BMP2A phage (pfu)			Control phage (pfu)		
	2.2×10^{15}	2.2×10^{13}	2.2×10^{11}	2.2×10^{15}	2.2×10^{13}	2.2×10^{11}
ELISA						
(Count)	1.028	1.035	1.017	0.774	0.747	0.792
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
(592nm)	0.037	0.010	0.027	0.013	0.021	0.015

2.4.2 ³HTdR 参入计数:10%小牛血清 DMEM 培养的 MC3T3 细胞,加入 24 孔培养板, 8×10^4 细胞/孔,按不同噬菌体滴度单位加入各孔重组噬菌体和对照噬菌体,37℃,3h 后,用 0.25% 胰酶消化细胞,分别点在小滤纸片上,三氯醋酸洗,醇醚液洗,液闪计数,表 2 数据为 3 次实验的结果。

为进一步证明重组人 BMP2A 噬菌体对 MC3T3 细胞株的特异性结合,同时采用肝癌细胞株(L-292)进行同样的实验,结果均为阴性。

表 2 样品组与对照组³HTdR 参入计数的比较

Table 2 Comparison of ³HTdR counts of sample group and control group

	Recombinant BMP2A phage (pfu)			Control phage (pfu)		
	2.2×10^{15}	2.2×10^{13}	2.2×10^{11}	2.2×10^{15}	2.2×10^{13}	2.2×10^{11}
³ HTdR	1255	1162	322	158	130	122
(Count)	±	±	±	±	±	±
(cpm)384	384	252	55	3	5	14

3 讨论

近几年发展起来的噬菌体表面呈现技术^[4,5]的基本原理在于,在噬菌体外壳蛋白基因信号肽序列与编码成熟蛋白序列之间插入外源基因,可使外源蛋白融合在噬菌体外壳蛋白 N 端而得到有效表达并组装在活噬菌体的表面,这种外源蛋白能折叠为天然状态,恢复其生物活性,并能有效地与配体结合(如抗原抗体反应等)。如果将这种重组融合基因的质粒转化 supE 的大肠杆菌,插入的外源基因可以非融合蛋白的形式表达并由外壳蛋白信号肽引导到大肠杆菌细胞质,甚至分泌到培养液中^[6],我们将人 BMP2A cDNA3' 端 567 核苷酸序列插入噬菌体外壳蛋白信号肽序列与成熟蛋白序列之间,使之表达并组装在活噬菌体表面。

目前认为人 BMP2A 是一种骨源性生长因子,其核苷酸序列与 TGF- β 有同源性,将其列为同一超家族中^[1],有关人 BMP2A 的信号转导途径及引起细胞内生物效应所知较少,我们通过 ELISA 和³H 参入两种方法证明了表达在活噬菌体表面的 BMP2A C 端肽能与 MC3T3 细胞表面特异地结合,推测其表面可能存在人 BMP2A 的受体。1991 年 Paralkar^[7]用¹²⁵I 标记的方法证实了 MC3T3 细胞表面有重组人 BMP 2B 的受体。人 BMP2A 有 396 个氨基酸,人 BMP2B 有 406 个氨基酸,它们之间有 85% 同源,而且这种同源性主要集中在 C 端^[1],但我们证明的 BMP2A 受体是否与 BMP2B 受体是同一受体,这将在后续工作中做出结论。

参 考 文 献

- [1] Wozney J M, Rosen V, Celeste A] *et al.* Science, 1988, **242**:1528~1534.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [3] Miyazono K, Okabe T, Urabe A *et al.* J Biol Chem, 1987, **262**:4098~4101.
- [4] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* Nature. 1990, **348**:552~555.
- [5] Winter G, Milstein C. Nature, 1991, **349**:293~296.
- [6] Hoogenboom H R, Griffiths A D, Johnson K S *et al.* Nucl Acids Res, 1991, **19**:4133~4137.
- [7] Paralkar V M, Hammonds R G, Reddi A H. Proc Natl Acad Sci USA. 1991, **88**:3397~3401.
- [8] 周廷冲,马贤凯,唐佩弦等.多肽生长因子基础与临床.北京:中国科学技术出版社,1992,53~74.

Specific Binding of Human BMP2A with a Mouse Osteoblastic Cell MC3T3

Liu Xiping Chen Sumin Chen Nanchun Gao Lei Zhao Zhongliang
(The fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract Human BMP2A C-terminal peptide was expressed in *E. coli* system and the expressed product was able to induce ectopic bone formation in mouse muscle. Then its cDNA 3' terminal 567 nucleotides were cloned into a phage display vector(pCSM21) and expressed as phage g3p fusion protein on the phage surface. [³H] thymidine was incorporated into the recombinant phage DNA. The mouse osteoblastic cells (MC3T3) were coated onto the surface of well in a 96-well plastic microtiter plate. The recombinant phage BMP2A was added to the wells coated by MC3T3, and allowed to interact with the cells. The MC3T3 cells bound with recombinant phage BMP2A showed a positive result in ELISA. The [³H] TdR counts of the sample groups were 3 to 10 times higher than the control groups. It suggests that the surface of MC3T3 cells present the receptor for human BMP2A.

Key words Human morphogenetic protein, phage display system, ELISA, receptor