

人纤溶酶原激活剂的抑制物 2 在昆虫细胞中的表达

周爱武 裴 轶 董雪吟 谢 维 徐贤秀

(南京大学生物化学系国家医药生物技术重点实验室 南京 210093)

纤溶酶原激活剂(Plasminogen Activator, PA)对血液中蛋白水解酶的活性有重要的调节作用。纤溶酶原激活剂的抑制物(Plasminogen Activator Inhibitor, PAI)可特异地抑制 PA(t-PA 和 u-PA),其作用迅速,是 PA 活性的重要调节因子。很多证据表明,PAI、PA 和体内许多生理反应有密切的关系,如炎症^[1]、组织重塑^[2]、肿瘤生长及恶性细胞的转移^[3,4]等。目前已发现了四种类型的 PAI,PAI-2 是其中的一种,它可由人胎盘滋养层细胞合成,在孕妇血浆中大量存在^[5]。该蛋白具有两种形式:一种分子量为 43~47kDa 的非糖基化形式;另一种分子量为 58~60kDa 的糖基化形式^[6,7]。对其结构与功能深入的研究将有助于了解许多生理现象,但由于 PAI-2 基因在大肠杆菌和哺乳动物细胞中的表达都不理想,不能获得足够量的该活性蛋白,本文在以杆状病毒为载体在昆虫细胞中成功地表达了该基因。

1 材料和方法

1.1 材料

人 PAI-2 基因由南京师范大学曹祥荣博士惠赠。野生型 AcNPV DNA、转移载体质粒 pBlueBac、及两种草地夜蛾细胞 SF9、H5 均由本实验室提供。TNM-FH 培养基购自 Sigma 公司。同位素 [α -³²P] dATP 系杜邦公司产品。限制酶及其它工具酶、DNA 序列测定试剂盒、Lipofectin、X-Gal 购自 BRL 和 NEB 公司。重组所用 *E. coli* DH5 α 和 TGI 为本实验室保藏菌株。

1.2 重组转移载体的构建

质粒 DNA 的提取、DNA 的酶切、连接反应及原位杂交实验均按分子克隆手册进行^[8]。DNA 序列测定参照试剂盒说明书。

1.3 病毒 DNA 的制备、共转染

参照文献^[9]的方法提取病毒 DNA 和根据 Lipofectin 的产品使用说明进行共转染。

1.4 重组病毒的筛选

SF9、H5 细胞的培养及重组病毒的筛选主要参考 Smith^[10]等的方法。使用含 10% FBS 和 100 μ g/ml 链霉素的 TNM-FH 培养液在 27 $^{\circ}$ C 培养 SF9 及 H5 细胞。空斑筛选时在直径为 50mm 的平板内加入 1×10^6 cell, 贴壁 1h 后加不同稀释度的病毒液感染 1h, 然后吸去病毒液, 铺入 2ml 混合胶, 混合胶为: $1 \times$ TNM(10% FBS) 中含有 150 μ g/ml X-Gal 和 1% 低熔点琼脂糖。27 $^{\circ}$ C 培养 6d 后挑取蓝斑, 振荡悬浮于 1ml 无血清 TNM-FH 培养液中, 4 $^{\circ}$ C 浸泡过夜, 稀释后进行下一轮铺板。

1.5 基因表达产物和感染时间的关系

重组病毒液 1.5ml 感染 SF9 一瓶(4×10^6 cell, MOI = 10PFU/cell), 1h 后倒去病毒液, 加培养液 4ml, 每 24h 吸取部分培养液和细胞测定活性。同法在 H5 细胞中进行表达。

1.6 Western Blot

本文于 1995 年 8 月 7 日收到。

样品经 12% SDS-PAGE 电泳分离,再转移到 NC 膜上,以 1% 脱脂奶粉溶液封闭 1h,加兔抗人 PAI-2 多抗(1:1000)保温 1.5h,再以 $1 \times \text{PBS} + 1\% \text{TWEEN}20$ 洗涤 3 次,加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:500)反应 1h 清洗。用 HRP 显色剂显色。

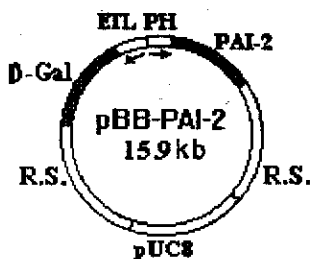
1.7 PAI-2 活力的测定

PAI-2 的活力通过纤维蛋白琼脂平板法^[11]和发色底物法^[12]测定,1 个 PAI-2 的活力单位相当于抑制 1 单位的尿激酶(uPA)。

2 结果

2.1 重组转移载体的构建及共转染

如图 1 所示,PAI-2/pEM 经 EcoRI 酶切回收基因片段,载体 pBB 以 NheI 酶切、回收,两者补平后连接,经原位杂交、酶切鉴定和测序(图略)筛选出 PAI-2 基因正确接在 PH 启动子下游的重组质粒 pBB-PAI-2。然后用该质粒 DNA 和野生型 AcNPV DNA 共转染草地夜蛾 SF9 细胞,4d 后收集共转染液,平板法检测其活性,结果表明共转染液具有了抑制活力,转染成功,如图 2。



1 重组转移载体 pBB-PAI-2 的示意图

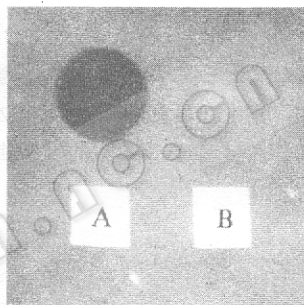


图 2 共转染液活性检测

A: SF9 细胞裂解液加 0.5u 尿激酶

B: 共转染培养液加 0.5u 尿激酶

2.2 重组病毒的筛选

稀释共转染液至 10^4 、 10^5 和 10^6 三个滴度后铺平板 3 块,6d 后挑出 3 个蓝斑。再经两轮蓝斑筛选,得到 3 个纯重组病毒毒株。对筛选的 3 个毒株表达活力进行比较,发现各毒株之间表达活力差别可达 2~3 倍,其中表达 hPAI-2 活力最强的重组病毒定名为 AcVPAI-2。

2.3 重组 PAI-2 的表达

用重组病毒 AcVPAI-2 感染 SF9 和 H5 单层细胞,培养 24h 开始收集部分培养液测其活性。当感染 96h 后两者的表达量都达到最高峰,活力分别为 $4.6 \times 10^3 \text{u/ml}$ 及 $5.9 \times 10^3 \text{u/ml}$ (如图 3)。收集此时的细胞,比较细胞内外 PAI-2 的活性,结果表明胞外部分占总活力的 59% 和 48%(见表 1)。

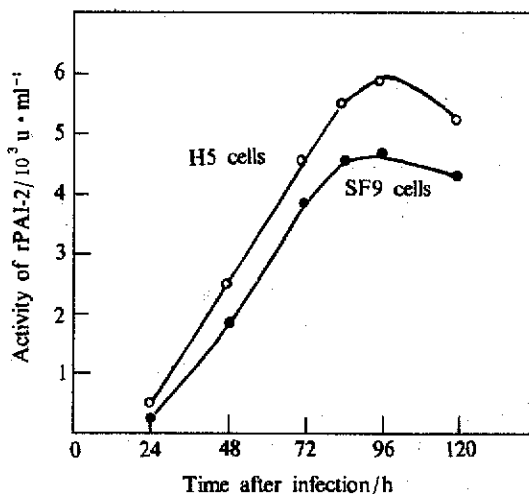


图 3 PAI-2 在 SF9(-●-)及 H5(-○-)细胞中表达的时间曲线

表 1 感染 96h 后 SF9、H5 细胞内和培养基中 PAI-2 活力测定

样品	体积/ml	细胞数/ 10^6	活力/ $u \cdot ml^{-1}$	*总活力/ $10^4 u$
SF9 培养液	4.0	4.0	4.6×10^3	1.84(59%)
SF9 裂解液	0.4	4.0	3.1×10^3	1.24(41%)
H5 培养液	4.0	4.0	5.9×10^3	2.36(48%)
H5 裂解液	0.4	4.0	6.5×10^3	2.60(52%)

* 百分数表示细胞产生的活性 PAI-2 在胞内、外分布的百分比。

2.4 重组 PAI-2 的鉴定

分别收集表达的细胞和培养液,进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 5%,分离胶 12%),考马斯亮蓝 R250 染色后薄层扫描显示,在细胞内重组 PAI-2 的表达量约占细胞总蛋白的 15%~18%,分泌的 PAI-2 约占胞外总蛋白的 60%(如图 4)。对应的 Western Blot 表明该重组蛋白可以和兔抗人 PAI-2 多抗结合,其分子量约 43kDa 和理论值相似^[6,7](图略)。

3 讨论

人 PAI-2 基因已在 *E. coli*、哺乳动物细胞等多种系统中进行了表达,但结果都不理想。本文以杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达了该基因,其表达量可达细胞内总蛋白的 15~18%(可能部分以无活性的形式存在),其分泌部分约占胞外总蛋白的 60%(不需要 PMA 的刺激)。对 hPAI-2 在 SF9 和 H5 细胞中表达的比较发现,两者表达量都在第 4 天达到最高峰,但在 H5 细胞中 PAI-2 的活性蛋白的总表达量比 SF9 细胞高出大约 67%。

虽然人 PAI-2 基因 N 端没有可被切断的信号肽,但人们发现在很多情况下 PAI-2 可被细胞所分泌,且 PAI-2 在胞内和胞外的分布比例在不同的细胞系和在不同的培养条件下往往变化很大。在 PMA 刺激后的 U937 细胞中大约 70% 的 PAI-2 被分泌到胞外^[13],而在未受 PMA 刺激的 U937 细胞和转染后的 CHO 细胞中,绝大部分的 PAI-2 都滞留在胞内^[7,14],近来的研究发现在 PAI-2 的 N 端有两个疏水的 α 螺旋 H1(第 4-16 氨基酸)和 α 螺旋 H2(第 28~46 氨基酸),它们介导了 PAI-2 的分泌,且在一定程度上控制了胞内 PAI-2 的分泌效率^[15]。虽然其具体的作用机制尚有待进一步研究,但在本文中昆虫细胞所表达的重组 PAI-2 大约有 48-59% 的活性部分被分泌到胞外,这和以上结果是相吻合的。

参 考 文 献

- [1] Vassali J D, Hamilton J, Reich E, Cell, 1976, 8:271~281.
- [2] Saksela O. Biochem Biophys Acta. 1995, 823:35~65.
- [3] Dano K, Andreassen P A, Grondahl-Hansen. J Adv Cancer Res, 1985, 44:139~166.
- [4] Shultz R M, Yu H, J-Y, Z Fibrinolysis. 1992, 6: Suppl 1, 23~39.

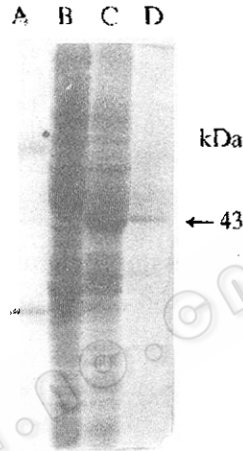


图 4 SDS-PAGE 分析表达产物

- A. 低分子量标准蛋白
- B. 野生型病毒感染后的 SF9 细胞
- C. 重组病毒 AcVPAI-2 感染后的 SF9 细胞
- D. SF9 感染 AcVPAI-2 后的培养液

- [5] Kruithof E K O, Trans-Thang C, Gudinchet Blood, 1987, **69**:460~466.
- [6] Kruithof E K O, Vassali J D, Schleuning W D, *et al.* J. Biol. Chem. 1986, **261**:11207~11213.
- [7] Genton C, Kruithof E K O, Schleuning W D, J Cell Biol. 1987, **104**:705~712.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis, T. Molecular Cloning, A Lab Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Lab, New York, 1989.
- [9] Summers MD, G S, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agriculture Experiment Station, Texas, 1987.
- [10] Smith G E, Faser M J, Summers, M D J, Virol. 1983, **46**:584~593.
- [11] Plog T, Kjeldgaard N O. Biochem Biophys Acta 1957, **94**:970.
- [12] Wun T C, Reich E J Biol. Chem. 1987, **262**:3646~3653.
- [13] Ye R D, Wun T C Sadler J E, J Biol Chem. 1988, **263**:4869~4875.
- [14] Ny T, Hansson L, Lawrence D A, Leonarasson G. *et al.* Fibrinolysis. 1989, **3**:189~196.
- [15] Belin D, Wohlwend A, Scheluning W D *et al.* EMBO J. 1989, **10**:3287~3294.

Expression of Human Plasminogen Activator Inhibitor-2 in the Baculovirus Expression System

Zhou Aiwu Pei Yi Don Xueyin Xie Wei Xu Xianxiu

(National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology and

Department of Biochemistry, Nanjing university, Nanjing 210093)

Abstract A cDNA coding for human plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) was first inserted into a transfer vector, pBlueBac, which could produce blue plaque for selection. Then it was transferred into the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus adjacent to the polyhedrin promoter by cotransfection. Cells infected with recombinant virus synthesized a 43kDa PAI-2 protein at a level of 15%~18% of total cellular protein. Interestingly, the protein without a signal peptide can be secreted into the medium partially and accounts for 60% of the total protein in culture medium. The recombinant PAI-2 was identical to native PAI-2 purified from human placenta with respect to interaction with polyclonal antibody and inhibition of urokinase-type plasminogen activator.

Key words hPAI-2, baculovirus, insect cells, gene expression