

可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白的真核表达及生物学活性检测

陈素云^{1,2}, 何秋山³, 董小岩^{2,4}, 吴小兵², 高基民^{1,3}

1 温州医学院 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035

2 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052

3 南方医科大学生物技术学院, 广州 510515

4 北京五加和分子医学研究有限公司, 北京 100176

摘要: 本研究设计和构建了一种人肿瘤坏死因子受体 II 胞外区与人脂联素球部的融合基因 *sTNFRII-gAD*, 且相应的融合蛋白在哺乳动物细胞 BHK-21S 的无血清培养体系中实现了表达, 并对该融合蛋白进行了初步鉴定。首先, 用 RT-PCR 方法从人的外周血淋巴细胞总 RNA 中扩增人肿瘤坏死因子 II 型受体胞外区基因片段, 与脂联素球部基因片段融合, 克隆至 pAAV2neo 表达载体中, 构建成 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD*。随后, 用 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 转染 BHK-21S 细胞获得 G418 抗性细胞 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD*; 然后, 将原来含有血清的培养液换成无血清的化学成分限定的培养液, 细胞从贴壁培养方式转换成悬浮培养方式; 最后, 收集 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 后的培养上清, 进行 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白的鉴定分析。酶切鉴定和测序结果显示, 所构建的 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 质粒结构正确, *sTNFRII-gAD* 序列与预期一致; 分别用抗人肿瘤坏死因子受体 II 和抗人脂联素球部的单克隆抗体检测 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 瞬时转染的 BHK-21S 细胞, 免疫荧光呈现阳性; 免疫印迹分析在 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 稳定转染的 BHK-21S 细胞上清中检测到 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白的表达, 并以单体、三聚体和三聚体以上的多聚体形式存在。活性测定结果表明, *sTNFRII-gAD* 融合蛋白具有显著抑制 TNF α 杀伤 L929 细胞的活性。因此, 本研究为下一步大量制备 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白用于体内外功能研究提供了良好基础。

关键词: 肿瘤坏死因子 α 拮抗剂, 可溶性肿瘤坏死因子受体 II, 脂联素, 融合蛋白, 真核表达

Eukaryotic expression and bioactivity determination of the fusion protein *sTNFRII-gAD* consisting of soluble tumor necrosis factor receptor II and globular domain of adiponectin

Suyun Chen^{1,2}, Qiushan He³, Xiaoyan Dong^{2,4}, Xiaobing Wu², and Jimin Gao^{1,3}

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Received: September 6, 2009; **Accepted:** November 19, 2009

Supported by: National Major Specific Project for Innovation of New Pharmaceuticals (No. 2009ZX09103-649), Zhejiang Provincial Major Research Program (No. 2008C14082), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. R2080407), Zhejiang Provincial Program for the Cultivation of High-level Innovative Health Talents (No. Y2008), Program from National Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering (No. 2008-S-0008).

Corresponding author: Jimin Gao. Tel: +86-577-86689746; Fax: +86-577-86689977; E-mail: jimingao@yahoo.com

Xiaobing Wu. Tel: +86-10-6352-3187; Fax: +86-10-6353-2053; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

国家新药创新重大专项 (No. 2009ZX09103-649), 浙江省重大科技专项 (No. 2008C14082), 浙江省自然科学基金 (No. R2080407), 浙江省卫生高层次创新人才培养工程 (No. Y2008), 病毒基因工程国家重点实验室开放课题 (No. 2008-S-0008) 资助。

2 National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

3 School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

4 Beijing Fiveplus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

Abstract: In order to get soluble TNF receptor (sTNFR) II with good neutralizing activity against TNF α , we constructed the fusion gene *sTNFRII-gAD*, which encoded human sTNFR II and the globular domain of adiponectin (gAD), and then expressed it in mammalian cells and analyzed its anti-TNF α activity. First, *sTNFRII* cDNA was obtained by RT-PCR from the total RNA of human peripheral blood lymphocytes, and fused in frame with gAD gene. Then, the fusion gene *sTNFRII-gAD* was cloned into the expression vector pAAV2neo to result in the plasmid pAAV2neo-sTNFRII-gAD. By immunofluorescent staining with monoclonal antibody either against TNFRII or against adiponectin, we demonstrated that the pAAV2neo-sTNFRII-gAD-transiently-transfected BHK-21S cells were positive. To obtain G418-resistant BHK-21S/pAAV2neo-sTNFRII-gAD cells, we cultured the transfected BHK-21S cells above in 10% FBS containing DMEM media with 800 μ g/mL G418 for 15 days, and changed the serum-containing culture media to a serum-free chemically defined media so as to change the cells culturing style from adhesion to suspension. 24 hours later, we harvested the supernatant of the culture for sTNFRII-gAD fusion protein characterization and anti-TNF α activity analysis. With monoclonal antibody either against TNFRII or against adiponectin, the Western blotting analysis showed that the sTNFRII-gAD fusion protein was expressed and existed as monomer, trimer and multimer forms in the supernatant. The bioactivity assay demonstrated that the sTNFRII-gAD fusion protein had the ability to neutralize TNF α so as to inhibit the cytotoxicity of TNF α on L929 cells. Put together, this study has laid the groundwork for large-scale preparation of sTNFRII-gAD fusion protein.

Keywords: TNF α antagonist, soluble TNF receptor II, adiponectin, fusion protein, eukaryotic expression

TNF α (肿瘤坏死因子 α) 在许多疾病的病理生理过程中起着重要的介质作用, 拮抗 TNF α 已经成为治疗自身免疫性疾病的新手段^[1]。可溶性 TNFR (Soluble TNF receptor, sTNFR) 是肿瘤坏死因子受体胞外区经剪切脱落而成, 分为 sTNFR I 与 sTNFR II 两种。它们都能与 TNF α 结合而拮抗其活性^[2]。现已上市用于治疗类风湿性关节炎的药物 Etanercept 被认为是一种高效的 TNF α 拮抗剂, 它是一种融合蛋白, 是通过将 *sTNFRII* 基因编码区与 IgG 的 *Fc* 基因编码区融合并在哺乳动物细胞中表达而成。借助于 *Fc* 的二聚化作用使其拮抗 TNF α 的能力较相应 sTNFR II 单体提高了 50~1000 倍^[3]。由于体内成熟的 TNF α 主要以三聚体形式存在^[4-5], 本研究欲借助脂联素球部 (Globular domain of adiponectin, gAD) 可形成同源三聚体^[6]的特性, 构建一种可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部的融合基因, 并在无血清悬浮培养的哺乳动物细胞中表达, 试图获得具有更高比活性和稳定性的 TNF α 拮抗剂。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种和细胞

pET24-gAD 质粒由南方医科大学高基民教授课

题组提供; pGluc-Basic 质粒购自 NEB 公司; Max Efficiency DH5 α ™ 购自 Invitrogen 公司; pBluescript SK 质粒为病毒基因工程国家重点实验室保存; pAAV2neo 质粒、BHK-21S 细胞由北京五加和分子医学研究所提供, BHK-21S 细胞已经过无血清悬浮驯化, 在有血清存在时表现为贴壁生长, 在化学成分限定的无血清培养基 LK021 中则表现为悬浮生长特性; L929 细胞购自美国 ATCC, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。

1.2 主要试剂和材料

限制性内切酶及连接酶、蛋白 Marker、Gaussia Luciferase Assay Kit 购自 NEB 公司; 质粒大提试剂盒购自 Qiagen 公司; Ficoll 试剂购自北京鼎国生物技术有限公司; ConA 购自 Sigma; Trizol 试剂盒, 脂质体 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司; G418 购自 Merck 公司; 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自 Ameresco; 放线菌素 D 购自 Fluka; 鼠抗人脂联素单抗由本元正阳基因技术有限公司谭淑萍老师提供; 鼠抗人 TNFRII 单抗购自 Abcam 公司; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自中山金桥; IRD800CW 羊抗鼠的 IgG 购自 LI-COR 公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco; 化学成分限定培养基

LK021 由北京五加和分子医学研究所提供; 人 TNF α 国家标准品 (3500 U/支) 由中国药品生物制品检定所提供; hTNFR-Fc 阳性对照品由复旦张江生物医药公司提供; 100 kDa 超滤离心管购自 Sartorius; 人脂联素定量 ELISA 试剂盒购自北京博雷德生物科技有限公司。

1.3 质粒构建

1.3.1 人肿瘤坏死因子 II 型受体胞外区的扩增

抽取 10 mL 健康人外周血于肝素抗凝管中, 以 PBS 稀释 1 倍后用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 将其于含有 2 μ g/mL ConA 的 1640 全培中培养 24 h, 离心收集刺激后的细胞, 按 Trizol Kit 操作说明提取总 RNA, 取 1 μ g 进行反转录, 以逆转录后的 cDNA 为模板 PCR 扩增得到目的基因 *sTNFRII*。目的基因上游引物: 5'-ggggtaccatggcgcccctgcccgtctggg-3' (下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点), 下游引物: 5'-gaagctgtgccagtgctccctcagctg-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增得到目的基因 *sTNFRII* 大小为 771 bp。1% 琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, *Kpn* I、*Hind* III 双酶切后克隆入 pBluescript SK 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α TM, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切及测序鉴定, 获得 pBluescript SK-*sTNFRII*。

1.3.2 脂联素球部区域基因的扩增

以 pET24-gAD 质粒为模板 PCR 扩增得到 *gAD* 基因片段。上游引物: 5'-gaagcttctctggagaaggtgctatg-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点), 下游引物: 5'-ccggatctcagtggtggtggtggtgctc-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), 扩增得到目的基因 *gAD* 大小为 423 bp。*gAD* PCR 产物纯化后以 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切后克隆入 pBluescript SK-*sTNFRII* 中, 转化大肠杆菌 DH5 α TM, 挑取氨苄抗性克隆酶切鉴定, 获得 pBluescript SK-*sTNFRII-gAD*。

1.3.3 *sTNFRII-gAD* 融合基因克隆入 pAAV2neo 载体

将 pBluescript SK-*sTNFRII-gAD* 用 *Kpn* I 及 *Bam*H I 酶切, 得到目的基因 *sTNFRII-gAD*, 克隆到以 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切的 pAAV2neo 载体片段中 (*Bam*H I 和 *Bgl* II 是同尾酶), 获得表达质粒

pAAV2neo-*sTNFRII-gAD*, 酶切鉴定。

1.3.4 对照质粒 pAAV2neo-Gluc-gAD 的构建

构建分泌型报告基因 *Gluc* 与 *gAD* 基因的融合基因 *Gluc-gAD* 作为 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 的对照质粒。根据 pGluc-basic 序列设计引物。上游引物: 5'-ttaggtacccagccaccatgggagtc-3' (下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点, 阴影部分为 ATG 起始密码子), 下游引物: 5'-taagaattctcaccaccggcccc-3' (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点, 已去除终止密码子), 以 pGluc-Basic 为模板 PCR 扩增得到含 *Gluc* 的目的片段。琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, *Kpn* I、*Eco*R I 双酶切后克隆到 pAAV2neo 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α TM, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 pAAV2neo-*Gluc* 质粒。

根据 Adiponectin 开放阅读框序列设计引物。上游引物: 5'-gcggaattcctctggagaaggtgctta-3' (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点), 下游引物: 5'-ggcggatctcagttggtgctatgta-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点, 阴影部分为终止密码子), 以构建成功的 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 质粒为模板进行 PCR 扩增得到含 *gAD* 的目的片段, *gAD* 片段回收后经 *Eco*R I 与 *Bam*H I 酶切后克隆入以 *Eco*R I 与 *Bgl* II 酶切的 pAAV2neo-*Gluc* 质粒中, 酶切鉴定获得 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒。

1.4 BHK-21S 细胞的转染

BHK-21S 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 贴壁生长。参考 LipofectamineTM2000 说明书, 转染前 1 天将细胞以 1 \times 10⁵/孔接种于 24 孔板中, 待 BHK-21S 细胞密度达到 80%~90% 时转染, 转染前培养基更换为不含血清和双抗的 DMEM 培养基, 取 0.8 μ g 质粒用 100 μ L 无血清培养基稀释混匀, 2 μ L LipofectamineTM2000 同样用 100 μ L 无血清培养基稀释, 将上述 2 种液体放到同一 EP 管中混匀, 室温避光放置 20 min 后分别加入对应的 24 孔板中, 6~8 h 后补加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.5 转染细胞中 *sTNFRII-gAD* 蛋白表达的检测

1.5.1 免疫荧光检测

pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 和 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒瞬时转染 BHK-21S 细胞 24 h 后, 免疫荧光检

测目标蛋白在细胞中的表达。24孔板中转染目的质粒的细胞和阴性未转染质粒细胞,分别弃去上清,PBS洗涤3次,用200 μ L冰预冷的甲醇固定20 min,弃去甲醇,分别加入1:300(用5%脱脂牛奶稀释)的鼠抗人脂联素抗体或1:500(用5%脱脂牛奶稀释)的鼠抗人TNFR II抗体各200 μ L,37 $^{\circ}$ C温育1 h。PBS洗涤3次后,加入1:100稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG二抗200 μ L,37 $^{\circ}$ C避光温育1 h。PBS洗涤3次,加0.01%的伊文斯兰染色15 min,荧光显微镜观察结果。

1.5.2 分泌性荧光素酶的检测

按照 *Gaussia Luciferase Assay Kit* 说明书, pAAV2neo-*Gluc-gAD*、pAAV2neo-*sTNFR II-gAD* 转染 BHK-21S 细胞 24 h 后,分别取 20 μ L 细胞培养上清,加入 50 μ L *Gluc* 底物,混匀后,用发光检测仪 (ModulusTM Luminometer) 测定其相对光强度单位 (Relative light unit, RLU),光子收集时间为 10 s。

1.6 稳定表达细胞株的建立及无血清悬浮培养

采用脂质体介导的细胞转染技术,将真核细胞表达质粒 pAAV2neo-*sTNFR II-gAD* 和 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 分别导入 BHK-21S 细胞。利用 pAAV2neo 质粒上带有 *neo* 抗性基因筛选将质粒 DNA 稳定整合入基因组的 BHK-21S 细胞。转染后第 2 天改加含 G418 的选择性培养基 (G418 浓度为 800 μ g/mL),细胞长满后转移至培养瓶中,加压筛选 15 d,获得抗性细胞株。

抗性细胞株 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFR II-gAD* 和 BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* 在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中贴壁生长,分别更换为无血清悬浮培养基 LK021 培养,待细胞数达到 2×10^6 /mL,加入丁酸钠使其终浓度为 10 mmol/L,24 h 后离心收集上清。

1.7 培养上清的超滤浓缩和 ELISA 检测

将抗性细胞 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFR II-gAD*、BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 的上清分别经 0.22 μ m 滤膜过滤,用 100 kDa 超滤浓缩管离心将上清浓缩 20 倍。浓缩后上清用人脂联素定量 ELISA 试剂盒检测 *sTNFR II-gAD* 蛋白含量,该试剂盒的包被抗体及检测抗体采用的是鼠抗人脂联素单克隆抗体,标记检测系统为生物素、亲和素辣根酶,定量标准品为人全长脂联素。

1.8 Western blotting 检测 *sTNFR II-gAD* 蛋白的表达

取浓缩 20 倍的上清 10 μ L 加入 10 μ L $2 \times$ loading buffer,100 $^{\circ}$ C沸水煮 5 min,20 μ L 样品上样,10%分离胶进行 SDS-PAGE 分离,然后用湿胶转移仪将蛋白转移至 NC 膜上。取出 NC 膜,用封闭液 (5%脱脂牛奶,PBS 配制) 37 $^{\circ}$ C 封闭 NC 膜 1 h。弃去封闭液,加入 1:300 (用含 5%脱脂奶的 PBST 稀释) 的鼠抗人脂联素单抗或 1:500 (用含 5%脱脂奶的 PBST 稀释) 的鼠抗人 TNFR II 的单抗,温育 1 h。PBST 洗涤 NC 膜 3 次后,加入 1:5000 (用含 5%脱脂奶的 PBST 稀释) IRD800CW 标记的羊抗鼠 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 避光温育 1 h。避光 PBST 洗涤 3 次后,PBS 洗涤 2 次去除多余的吐温,用 Odyssey 红外荧光成像仪进行检测。

1.9 *sTNFR II-gAD* 融合蛋白的生物活性测定

以 L929 为靶细胞,检测 *sTNFR II-gAD* 融合蛋白拮抗 TNF α 杀伤细胞的中和活性^[7]。取对数生长期的 L929 细胞,胰蛋白酶消化计数,用 5% 的 DMEM 培养基调整细胞浓度至 1.5×10^5 /mL,取 96 孔板每孔加入 100 μ L 细胞悬液,置 37 $^{\circ}$ C 的 5% CO₂ 培养箱中培养过夜;第 2 天将 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFR II-gAD* 和 BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 后收获的上清以及 *sTNFR II-Fc* 对照品 (起始浓度为 50 μ g/mL) 分别用含 20 μ g/mL 放线菌素 D、20 U/mL TNF α 的 DMEM 培养液进行 4 倍比梯度稀释,共稀释 10 个梯度;弃去 96 孔板中 L929 细胞的上清,加入前面已倍比稀释好的 *sTNFR II-gAD* 融合蛋白上清样品和 *Gluc-gAD* 上清样品及 *sTNFR II-Fc* 对照品,每孔 100 μ L,每个梯度设 3 个复孔;同时加入含 20 μ g/mL 放线菌素 D 与 20 U/mL TNF α 的 DMEM 培养液 (两者结合杀伤性最大) 作为阴性对照。该 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L,继续培养 4 h 后,DMSO 终止培养,检测各孔的 OD₅₇₀ 值。

2 结果

2.1 重组质粒的结构

重组质粒 pAAV2neo-*sTNFR II-gAD* 和对照质粒

pAAV2neo-*Gluc-gAD* 结构如图 1 所示。其中包括 CMV 启动子、*sTNFRII* 基因、*gAD* 基因和其后的 6His 序列、牛生长激素的 polyA 加尾信号、AAV2 的倒转末端重复序列 (ITR) 以及 *Gluc-gAD* 基因。载体骨架上有新霉素抗性的 *neo* 基因, 便于转染后的 G418 加压筛选。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 用插入位点 *Kpn* I 和 *EcoR* I 双酶切得到约 7 kb 载体片段和大于 1 kb 的 *sTNFRII-gAD* 片段 (图 2A), 与预期结果一致; 用 pAAV2neo 克隆位点两端的通用引物测序表明, *sTNFRII-gAD* 序列与预期序列相同; pAAV2neo-*Gluc-gAD* 用 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切可得到一条大于 500 bp 的片段, 与 *Gluc* 555 bp 大小一致。用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 酶切可切出 *gAD* 与 BGH polyA 约接近 700 bp 的片段, 与预期一致。用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 可切出大于 1 kb 的片段, 与 *Gluc-gAD* 预期大小一致 (图 2B)。

2.3 质粒瞬时转染 BHK-21S 细胞的免疫荧光检测

重组质粒 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 转染 BHK-21S

细胞 24 h 后, 分别用抗人脂联素单抗和抗 TNFRII 单抗进行免疫荧光检测, 结果均可观察到 BHK-21S 细胞的胞浆中有很强绿色荧光 (图 3A, 3D), 提示融合蛋白 *sTNFRII-gAD* 在 BHK-21S 细胞中实现了表达; pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒转染 BHK-21S 细胞后, 用抗 TNFRII 单抗检测 (图 3E) 无绿色荧光显示, 而用抗脂联素单抗检测 (图 3B) 能够看到围绕细胞核周围的绿色荧光; 未转染质粒的阴性对照细胞分别用抗人脂联素单抗和抗 TNFRII 单抗检测 (图 3C, 3F) 均未观察到绿色荧光。

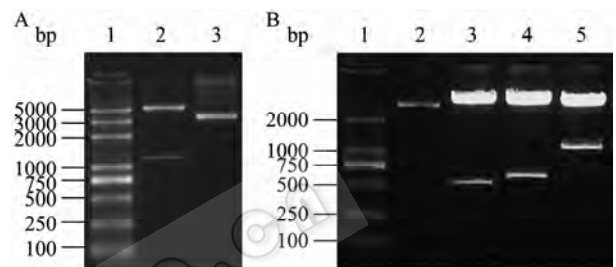


图 2 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 和 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* and pAAV2neo-*Gluc-gAD* by enzyme digestion. (A) 1: DNA marker BM 5000; 2: pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* digested with *Kpn* I and *EcoR* I; 3: pAAV2neo-*sTNFRII-gAD*. (B) 1: DNA marker BM 2000; 2: pAAV2neo-*Gluc-gAD*; 3: pAAV2neo-*Gluc-gAD* digested with *Kpn* I and *EcoR* I; 4: pAAV2neo-*Gluc-gAD* digested with *Bam*H I and *EcoR* I; 5: pAAV2neo-*Gluc-gAD* digested with *Kpn* I and *Bam*H I.

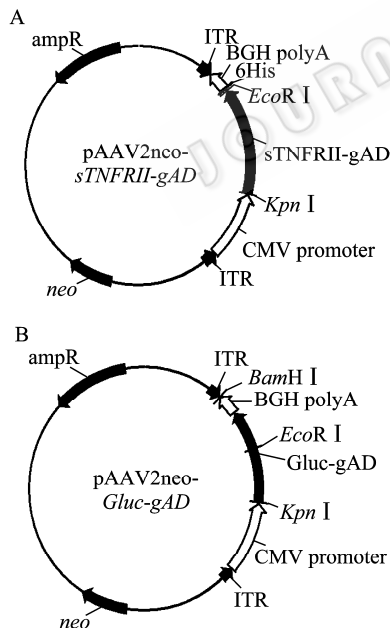


图 1 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 和 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒结构示意图

Fig. 1 Diagrams of recombinant expression vectors pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* and pAAV2neo-*Gluc-gAD*. (A) pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* vector. (B) pAAV2neo-*Gluc-gAD* vector. ITR: AAV2 inverted terminal repeat; CMV: cytomegalovirus promoter; *sTNFRII*: soluble TNF receptor II; *gAD*: globular domain of adiponectin; *Gluc*: *Gaussia* luciferase; BGH: bovine growth hormone polyA signal.

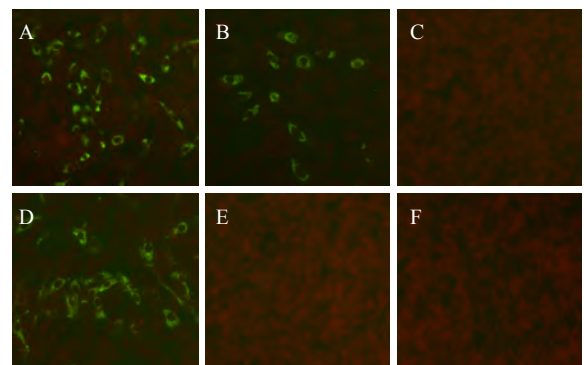


图 3 免疫荧光检测 *sTNFRII-gAD* 及 *Gluc-gAD* 在 BHK-21S 细胞中的表达

Fig. 3 Detection of *sTNFRII-gAD* and *Gluc-gAD* protein expressed in BHK-21S cells with immunofluorescence staining. (A) pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* detected by monoclonal antibody against adiponectin. (B) pAAV2neo-*Gluc-gAD* detected by monoclonal antibody against adiponectin. (C) Negative control detected by monoclonal antibody against adiponectin. (D) pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* detected by monoclonal antibody against TNFRII. (E) pAAV2neo-*Gluc-gAD* detected by monoclonal antibody against TNFRII. (F) Negative control detected by monoclonal antibody against TNFRII.

2.4 Gluc-gAD 在上清中表达

pAAV2neo-*Gluc-gAD* 质粒瞬时转染 BHK-21S 细胞 24 h 后, 用 *Gaussia* Luciferase 检测试剂盒及 ModulusTM Luminometer 发光检测仪检测上清中的 Gluc 活性 (图 4), 结果显示 Gluc 蛋白在上清中有较高表达; 而 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 转染 BHK-21S 后的检测数值与新鲜细胞培养液所测数值基本相同。该实验表明 Gluc-gAD 融合蛋白可以有效表达并分泌到上清中。

2.5 无血清培养上清中 sTNFRII-gAD、Gluc-gAD 融合蛋白的分泌表达

BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 后的上清经 100 kDa 超滤管浓缩 20 倍

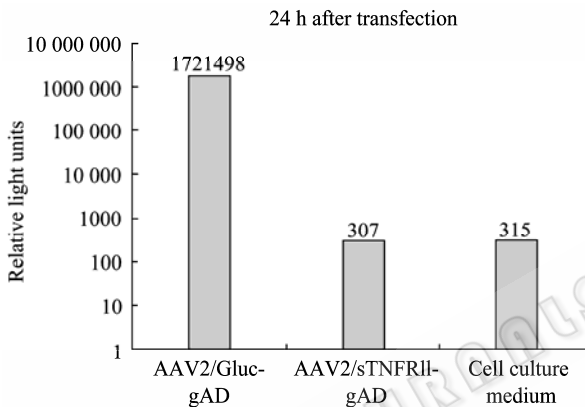


图 4 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 和 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 转染 BHK-21S 细胞后上清中 Gluc 的检测

Fig. 4 Detection of Gluc protein in supernatant of BHK-21S cells transfected with pAAV2neo-*Gluc-gAD* or pAAV2neo-*sTNFRII-gAD*.

后, ELISA 检测 sTNFRII-gAD 蛋白含量相当于 0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、SDS-PAGE 电泳及免疫印迹分析还原状态/非还原状态的 sTNFRII-gAD 融合蛋白样品 (图 5)。对于还原状态的样品, 用抗人脂联素单抗检测 (图 5B) 在约 62 kDa 处有特异性条带, 比预期的 sTNFRII-gAD 蛋白分子量 43 kDa 要大; 而用抗 TNFRII 的单抗检测 (图 5C) 则未见特异性条带。对于非还原状态的样品, 浓缩后上清除了在约 62 kDa 处与脂联素单抗及 TNFRII 单抗 (分别为图 5D, 5E) 有特异性条带外, 在小于但接近 175 kDa 处和远大于 175 kDa 处也有特异性条带, 提示 BHK-21S 细胞表达分泌至上清中的 sTNFRII-gAD 蛋白除单体外, 还有三聚体和三聚体以上的多聚体; 还原样品的 SDS-PAGE 用考马斯亮蓝染色结果 (图 5A) 显示在约 62 kDa 处有一条主带, 与相同样品经抗人脂联素单抗免疫印迹分析的条带位置一致 (图 5B), 且 SDS-PAGE 中其他杂带非常弱, 提示 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 无血清悬浮培养的上清中主要成分是 sTNFRII-gAD 融合蛋白。

此外, BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 后的上清经 100 kDa 超滤管浓缩 20 倍 (还原状态) 后进行 Western blotting 分析, 用抗人脂联素单抗检测 (图 5F-12) 显示在接近 47.5 kDa 处有特异性条带, 比阳性对照人血清样品所含的脂联素 (约 30 kDa 的分子量, 图 5F-13) 要大, 表明 Gluc-gAD 融合蛋白也能分泌到培养基上清中。

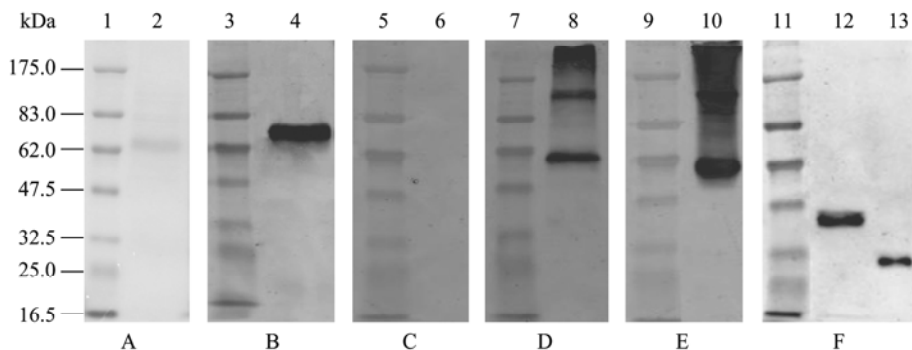


图 5 SDS-PAGE 及免疫印迹分析鉴定 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 和 BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* 无血清悬浮培养上清中 sTNFRII-gAD 融合蛋白和 Gluc-gAD 融合蛋白的表达 (已浓缩 20 倍)

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blotting analysis of sTNFRII-gAD and Gluc-gAD fusion proteins in the supernatants of serum-free cultured BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* and BHK-21S/pAAV2neo-*Gluc-gAD* (20-fold concentration). 1,3,5,7,9,11: protein marker; 2: SDS-PAGE of sTNFRII-gAD fusion protein stained with Coomassie blue; 4,6: Western blotting of reduced sTNFRII-gAD fusion protein with monoclonal antibody either against adiponectin or against TNFRII; 8,10: Western blotting of non-reduced sTNFRII-gAD fusion protein with monoclonal antibody either against adiponectin or against TNFRII; 12: Western blotting of reduced Gluc-gAD fusion protein with monoclonal antibody against adiponectin; 13: adiponectin (positive control) in the serum with monoclonal antibody against adiponectin.

2.6 sTNFRII-gAD 融合蛋白中和 TNF α 的生物活性

BHK-21S/pAAV2neo-sTNFRII-gAD 和 BHK-21S/pAAV2neo-Gluc-gAD 无血清悬浮培养 24 h 后, 收集上清, 分别检测它们对 TNF α 杀伤 L929 细胞的中和活性。sTNFRII-Fc 融合蛋白 (浓度由 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始, 4 倍比梯度稀释) 在本研究中作为拮抗 TNF α 的阳性对照。sTNFRII-Fc 融合蛋白具有中和 TNF α 的活性, 且其抑制 TNF α 杀伤 L929 细胞的活性呈剂量依赖性 (图 6B); 同理, sTNFRII-gAD 融合蛋白也能够抑制 TNF α 对 L929 细胞的杀伤作用, 并与 sTNFRII-Fc 融合蛋白有类似的梯度曲线 (图 6A)。阴性对照 Gluc-gAD 融合蛋白无中和 TNF α 的作用, 由此说明对 TNF α 的中和作用是 sTNFRII-gAD 融合蛋白所特有的。

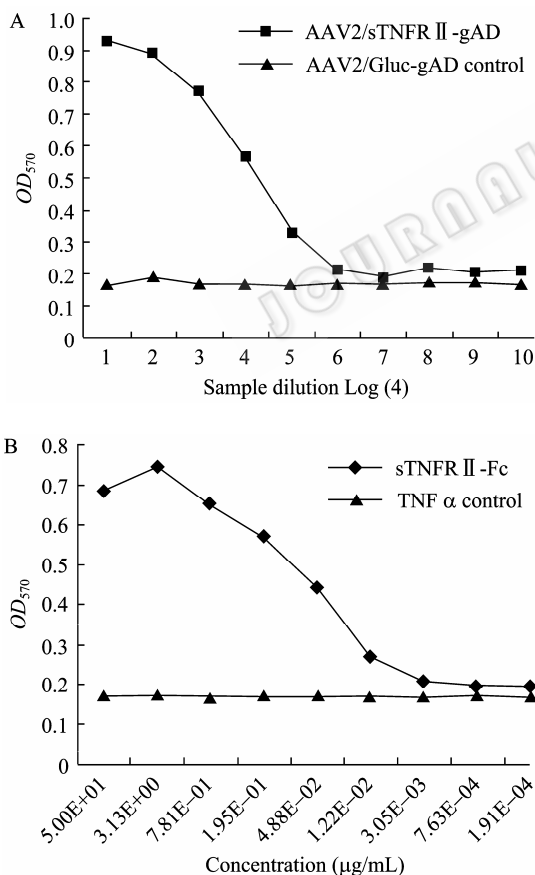


图 6 上清中 sTNFRII-gAD 融合蛋白对 TNF α 中和活性的检测

Fig. 6 TNF α -neutralizing activity of sTNFRII-gAD fusion protein in the supernatant of BHK-21S/pAAV2neo-sTNFRII-gAD serum-free culture.

3 讨论

TNF α 是一种重要的生物活性因子, 具有抗肿瘤、抗病毒、防止细菌对机体的侵害作用。然而, 过多 TNF α 的产生和释放则会破坏机体的免疫平衡, 导致自身免疫性疾病如类风湿性关节炎等的发生^[8]。TNF α 主要通过与其细胞膜上的特异性受体 (TNFR) 结合发挥生物学活性, TNFR 有 TNFRI 和 TNFRII 两种, 其胞外区域均可经剪切脱落成为 sTNFR。sTNFR 不介导信号的传导, 但仍能与 TNF α 结合, 中和 TNF α 的活性, 是 TNF α 的天然拮抗剂^[9]。商品化 Etanercept 即 sTNFRII 与 IgG 的 Fc 形成的融合蛋白, 此融合蛋白不仅延长了受体在体内的半衰期, 并且借助于 Fc 的二聚化作用使融合蛋白形成同源二聚体, 相比可溶性的 sTNFRII 单体更能有效地抑制 TNF α 的作用, 用于治疗类风湿性关节炎, 能有效缓解疼痛, 防止或明显降低关节结构的破坏, 从而改善并维持关节功能。研究表明, 成熟的 TNF α 以三聚体形式存在。因此设想, 若 sTNFRII 能形成同源三聚体, 则可能获得更高效的 TNF α 拮抗剂。

脂联素是近年来发现的脂肪细胞分泌的一种蛋白激素^[10-13], 血浆中浓度为 5~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。脂联素全长由信号肽、一段特异的氨基酸序列、胶原状区域和球状结构域 4 部分组成。gAD 为脂联素在蛋白酶裂解作用下产生, 是全长脂联素的羧基端部分。Fruebis 等研究报道, gAD 能够增强肌肉组织中脂肪酸的氧化, 其活性优于全长脂联素^[14]; Shapiro 等通过晶体结构的研究发现, 脂联素的球状区域以紧密的同源三聚体形式存在, 并且与胶原 8、胶原 9 和补体 C1q 具有相似的结构特征。全长脂联素通过其球状结构可形成紧密的同源三聚体, 继而通过其胶原状结构进一步形成更为复杂的同源多聚体, 但 gAD 的三聚体是脂联素的基本结构形式。

本研究拟借 gAD 能自发形成同源三聚体的特性, 以实现 sTNFRII 的同源三聚体化, 从而获得一种 TNF α 新型拮抗剂——sTNFRII-gAD 融合蛋白。

首先构建了 sTNFRII-gAD 融合基因, 同时还构建了分泌型 Gluc-gAD 融合基因作为对照。Gluc 为 *Gaussia* 荧光素酶 (*Gaussia luciferase*), 是海洋桡角类

生物 *Gaussia princeps* 来源的蛋白, 具有高分泌、易检测等优点, 是一种新型的荧光素报告基因^[15]。本实验构建的 *sTNFRII-gAD* 和 *Gluc-gAD* 融合基因分别采用了 *sTNFRII* 和 *Gluc* 基因天然的信号肽。将 pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 和 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 重组表达载体分别瞬时转染 BHK-21S 细胞, 用抗 TNFRII 或抗 gAD 的单克隆抗体进行免疫荧光检测分析: pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 转染细胞用上述两种抗体均检测到了阳性信号, 而 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 转染细胞仅用抗 gAD 的单克隆抗体可检测到绿色免疫荧光; 在 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 转染细胞的上清中可检测到很高的 *Gluc* 酶活性。这些结果表明 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白和 *Gluc-gAD* 融合蛋白在 BHK-21S 细胞中分别获得了有效表达; 且 *Gluc-gAD* 融合蛋白能有效地分泌到上清中。

在此基础上, 通过 G418 筛选获得稳定表达 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白和 *Gluc-gAD* 融合蛋白的细胞株。采用的表达载体 pAAV2neo 与常用的真核表达载体如 pcDNA3.1 不同之处在于: pAAV2neo 中携带了腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 来源的 2 个 ITR 序列, 使得表达载体转染细胞后在加 G418 选择培养时更容易形成稳定表达的细胞株。

为了便于以后大量制备 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白, 在获得稳定表达细胞株以后, 将培养液由原来含 10% 胎牛血清的 DMEM 换成化学成分限定的无血清、无蛋白、无肽的培养液 LK021 (北京五加和分子医学研究所有限公司)。所采用的 BHK-21S 细胞在更换培养液后细胞由原来的贴壁培养方式直接变成了悬浮培养方式, 期间不需要再次驯化。收集 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 细胞无血清悬浮培养 24 h 后的上清并经 100 kDa 膜包浓缩 20 倍后, SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色显示只有一条主带, 与抗脂联素单抗免疫印迹检测到的特异性条带位置相同, 而其他位置的蛋白条带染色很浅, 提示无血清培养后的细胞分泌到上清中的 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白较纯, 十分有利于以后的纯化。

对 BHK-21S/pAAV2neo-*sTNFRII-gAD* 无血清悬浮培养 24 h 后的上清经 100 kDa 膜包浓缩 20 倍后, 进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析发现, 含有 DTT 的

还原样品用抗 TNFRII 单抗未检测的特异性蛋白条带, 而相应的非还原样品则有特异性蛋白条带。这可能是由于采用的抗 TNFRII 的单抗只能识别 *sTNFRII* 的空间表位 (而不是线性表位) 所致。用抗脂联素的单抗进行免疫印迹检测, 则无论是还原样品还是非还原样品均检测到特异性蛋白条带, 说明所用的抗脂联素单抗识别的是 gAD 线性表位。此外, 用抗 TNFRII 单抗和抗脂联素单抗, 在非还原的 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白样品中, 除单体 (62 kDa) 的特异性蛋白条带外, 均可检测到在接近 175 kDa 处和远大于 175 kDa 处有特异性蛋白条带, 提示所表达的 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白以单体、三聚体和三聚体以上的多聚体形式存在。

为了验证 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白中起中和 TNF α 作用的只是 N 端的 *sTNFRII*, 在活性测定以 pAAV2neo-*Gluc-gAD* 融合蛋白作为阴性对照, 以 *sTNFRII-Fc* 融合蛋白作为阳性对照。活性测定结果表明, *sTNFRII-gAD* 融合蛋白具有中和 TNF α 的活性, 并与 *sTNFRII-Fc* 融合蛋白有类似的梯度曲线, 而阴性对照 *Gluc-gAD* 融合蛋白则无拮抗 TNF α 的活性。

本研究设计并构建了一种 TNF α 新型拮抗剂——*sTNFRII-gAD* 融合蛋白, 建立了无血清悬浮培养的 BHK-21S 细胞表达系统, 在细胞上清中检测到了 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白的表达且该融合蛋白以单体、三聚体和三聚体以上的多聚体形式存在, 并证实了上清中的 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白具有中和 TNF α 的活性。因此, 本研究为下一步大量制备 *sTNFRII-gAD* 融合蛋白, 以便进一步研究该融合蛋白的单体、三聚体和三聚体以上多聚体及其相应的生物功能打下了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Taylor PC, Williams RO, Feldmann M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(6): 557-563.
- [2] Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 2008, **117**(2): 244-279.

- [3] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, *et al.* Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*, 1993, **151**(3): 1548–1561.
- [4] Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem*, 1987, **562**(15): 6951–6954.
- [5] Jones EY, Stuart DI, Walker NP. Structure of tumour necrosis factor. *Nature*, 1989, **338**(6212): 225–228.
- [6] Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, 1998, **8**(6): 335–338.
- [7] Zhang Y, Gao K, Han CM, *et al.* Study on methods and requirements for quality control of recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein. *Acta Pharm Sin*, 2003, **38**(3): 165–168.
张翊, 高凯, 韩春梅, 等. 重组人肿瘤坏死因子受体-Fc 融合蛋白质控方法和标准的研究. *药学学报*, 2003, **38**(3): 165–168.
- [8] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*, 1991, **10**(13): 4025–4031.
- [9] Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, **9**(3): 497–514.
- [10] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270**(45): 26746–26749.
- [11] Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*, 1996, **120**(4): 803–812.
- [12] Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, 1996, **271**(18): 10697–10703.
- [13] Maeda K, Okubo K, Shimomura J, *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**(2): 286–289.
- [14] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30 kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(4): 2005–2010.
- [15] Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, *et al.* Codon-optimized *Gaussia luciferase* cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Ther*, 2005, **11**(3): 435–443.