

文章编号: 1673-3851 (2012) 04-0584-05

融合蛋白 sCAR-TSP-1 原核表达纯化及诱导白血病细胞 K562 凋亡的研究

梁天祥, 谌贺宽子, 陈 磊, 武 虎, 唐 斌

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 根据 thrombospondin-1(TSP-1)氨基酸序列(RFYVVMWK),以已有的腺病毒受体 sCAR 为模板,将 8 个氨基酸对应基因核苷酸通过 PCR 扩增于 sCAR 之后,得到 sCAR-TSP-1,连接到表达载体 pQE30 上,转化大肠杆菌 M15 后获得工程菌。该菌株经 IPTG 诱导后,高效表达出带有组氨酸标签以包涵体形式存在的融合蛋白 sCAR-TSP-1。包涵体经过尿素变性溶解、PBS 稀释复性、Ni 离子亲和层析柱纯化,获得目的蛋白。SDS-PAGE 分析表明,有一条明显的特异性蛋白条带。同时细胞实验结果表明融合蛋白 sCAR-TSP-1 对白血病细胞 K562 有明显凋亡作用。

关键词: TSP-1; sCAR-TSP-1 融合蛋白; 原核表达; 白血病细胞

中图分类号: Q789

文献标识码: A

0 引 言

白血病(leukemia)是造血系统的恶性肿瘤,是严重危害人类身体健康的恶性疾病之一^[1]。Cox-sackie and adenovirus receptor(sCAR)为柯萨奇病毒腺病毒体外受体^[2],它可与 5 型腺病毒结合,从而介导 5 型腺病毒感染白血病细胞。由于白血病细胞表面大多不表达或较低地表达柯萨奇病毒腺病毒受体,限制了白血病的治疗。TSP-1(thrombospondin-1)是一种促使癌细胞凋亡的蛋白。本课题根据白血病细胞表面表达 CD47,而正常细胞表面 CD47 表达量相对较少的特点^[3],将其作为特异性清除白血病细胞的理想靶点^[4-5],此靶点还应用于心血管等多种疾病的治疗^[6]。CD47 又叫整合素相关蛋白(integrin-associated protein,IAP),其功能与整合素相关。CD47 在白血病细胞表面具有较高的表达,而正常细胞 CD47 表达较低。白血病细胞通过表达 CD47 来逃避巨噬细胞的吞噬,其作用机制是 CD47 与巨噬细胞表面 SIRP α 结合,产生抑制性信号,从而逃避吞噬。

通过原核表达纯化出能够特异靶向白血病细胞的 sCAR-TSP-1 蛋白,该蛋白羧基端可以与白血病细胞表面的 CD47 整联,以达到靶向并有效感染白血病细胞的作用。本课题构建的融合蛋白 sCAR-TSP-1,体外实验表明此蛋白能够达到抑制白血病细胞增殖,并诱导其凋亡,且对正常细胞杀伤作用较小^[7-8]。

1 材 料

1.1 载体、菌及细胞

pQE30 载体、大肠杆菌 M15 购自雷诺公司,大肠杆菌 DH5 α 、Beas-2B 细胞为浙江理工大学生命科学学院实验室保存。sCAR 为本实验室构建。K562 为浙江大学血液病研究所提供。

1.2 试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA Ligase、DNA Marker(TaKaRa 公司);IPTG、BSA、蛋白 Marker、rTaq、RNaseA(Fermentas 公司);Ni-NTA His \cdot Bind Resin(MERCK/Novagen 公司)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst33342 凋亡试剂、二甲基亚

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30801379);浙江理工大学科研启动基金项目(1016834-Y)

作者简介: 梁天祥(1986-),男,山西大同人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因病毒治疗研究。

通讯作者: 唐 斌,电子邮箱: tangbin1111@yahoo.com.cn

砒(DMSO)、蛋白酶抑制剂(Protein Cocktail)(Sigma 公司),细胞裂解液(碧云天公司),胎牛血清、RPMI1640、DMEM(GIBCO 公司)。

2 方 法

2.1 pQE30-sCAR-TSP-1 重组表达载体的构建

根据 TSP-1 氨基酸序列(RFYVVMWK)^[9],以已有的病毒受体 sCAR 为模板来扩增此 8 个氨基酸序列。以 sCAR 上游片段作为上游引物,将 TSP-1 的 8 个氨基酸对应核苷酸作为下游引物,并在引物两端分别加上 *Hind* III 酶切位点,引物序列如下:上游为 5'-CCCAAGCTTATGGCGCTCCTGCTG-3',下游为 5'-CGCTTTTATGTTGTGATGTG-GAAGTAAAAGCTTCCC-3'。扩增产物经 *Hind* III 酶切后,再用 DNA 回收试剂盒回收,即获得带有 *Hind* III 酶切位点的 TSP-1 基因片段,回收产物与经相同酶切回收的约 3.5 kb 的表达载体 pQE30 片段在 T4 DNA Ligase 作用下连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 菌株,挑取阳性克隆培养后提取质粒,进行 PCR 鉴定,再进行 *Bam*H I 酶切鉴定。重组质粒 pQE30-sCAR-TSP-1 由上海英骏公司测序,验证其序列正确性。

2.2 融合蛋白 sCAR-TSP-1 在大肠杆菌 M15 中的诱导表达

将鉴定正确的重组质粒 pQE30-sCAR-TSP-1 转化表达菌 M15,挑取阳性单克隆培养,经 0.8 mmol/L IPTG 诱导表达,收集诱导 6h 的菌体,超声破碎,离心(4℃,12 000 r/min,15 min)。同时以不含目的基因的 pQE30 质粒做同样处理作为对照组做 SDS-PAGE 分析。

2.3 pQE30-sCAR-TSP-1 包涵体的溶解、复性及亲和层析纯化

经 SDS-PAGE 分析,sCAR-TSP-1 融合蛋白表达并以包涵体形式存在。大量诱导表达后,离心收集菌体,用 PBS(8 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,1.44 g/L Na₂HPO₄,0.24 g/L KH₂PO₄(pH7.4)悬浮,冰浴条件下超声裂菌,离心(4℃,12 000 r/min,15 min),回收的沉淀即为粗制包涵体。包涵体溶于裂解缓冲液(8 mol/L urea,0.1 mol/L Sodium phosphate buffer,10 mmol/L Tris-HCl,pH8.0)中,室温搅拌溶解 1 h,离心(4℃,12 000 r/min,30 min),收集上清。采用 PBS 稀释复性方法进行蛋白复性。将收集的复性蛋白上清经孔径为 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,加到预先用结合缓冲液(50 mmol/L Sodium phosphate buffer,

0.3 mol/L NaCl,10 mmol/L imidazole,pH8.0)平衡过的填有 Ni-NTA His-bind 基质的柱里,用 10 倍柱体积的洗涤缓冲液(50 mmol/L Sodium phosphate buffer,0.3 mol/L NaCl,20 mmol/L imidazole,pH8.0)洗柱,最后用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液(50 mmol/L Sodium phosphate buffer,0.3 mol/L NaCl,20 mmol/L imidazole,pH8.0)对目的蛋白进行洗脱。收集液用 PBS 作为透析液除去目的蛋白中的咪唑。将纯化的蛋白进行 12%的 SDS-PAGE 分析。透析后得到的纯化复性蛋白经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,用 BCA 法测蛋白浓度,保存于-20℃。

2.4 MTT 毒性实验

收集对数生长期的白血病细胞和人正常肺上皮细胞 Beas-2B,按 10⁴/孔接种到 96 孔板中,设 sCAR-TSP-1 蛋白不同浓度梯度处理组,对照组和调零组,对照组只加细胞不做任何处理,调零组加入等体积 10%FBS 的 1640 培养液。置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h 后,分别用 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 μ g/ μ L 的 sCAR-TSP-1 融合蛋白共孵育细胞,每组各设 6 个复孔。培养 4 d 后,每孔加入 20 μ L 的 MTT(5 mg/mL),37℃孵育 4 h,在酶标仪上测定 A₅₇₀。计算细胞存活率[细胞存活率=(处理组 A 值-调零组 A 值)/(对照组 A 值-调零组 A 值)×100%]。

2.5 凋亡细胞染色实验:Hoechst 33342 染色

收集对数生长期的 K562 细胞按 2×10⁶ cells/well 植入 6 孔培养板,10%FBS RPMI-1640 培养基 2 mL/well,加药组分别加入 5 μ g 和 10 μ g 融合蛋白 sCAR-TSP-1,对照组加等量的 PBS,37℃,5%CO₂ 培养 48 h 后,每孔加入 1 mg/mL 的 Hoechst 33342 染料 5 μ L,继续在 37℃,5%CO₂ 培养箱中孵育 30 min,置于荧光倒置显微镜下观察细胞核的变化并拍照。

2.6 统计学处理

采用 Excel2007 和 Sigma Plot 数据统计软件,所有定量实验均在同样条件下重复 3 次。各组数据以“均值±标准差”表示, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

3 实验结果

3.1 pQE30-sCAR-TSP-1 重组表达载体的构建及鉴定

以 sCAR 质粒为模板,PCR 扩增 TSP-1 基因片段,并将扩增的片段 sCAR-TSP-1 用 *Hind* III 切下,正向插入 pQE30 的 *Hind* III 酶切位点之间,构建 pQE30-sCAR-TSP-1。电泳结果显示与 sCAR-

TSP-1 基因片段 777 bp 大小一致;核苷酸测序结果证明序列和读码框正确且正向连接,表明 pQE30-sCAR-TSP-1 重组质粒构建成功。

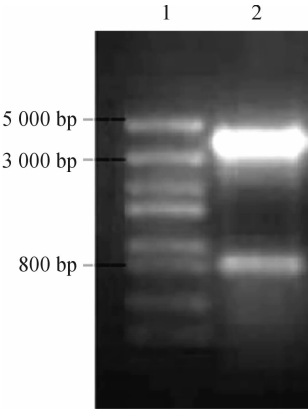
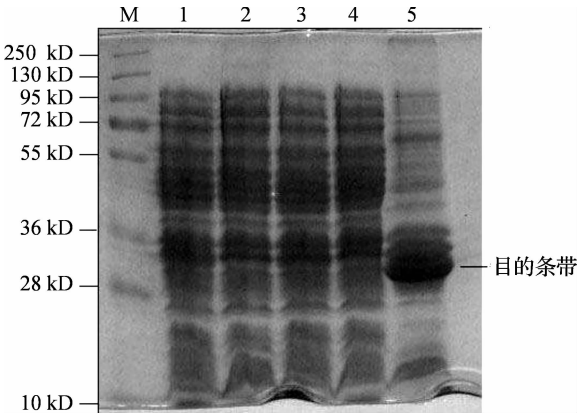


图 1 pQE30-sCAR-4N1 重组质粒鉴定结果
注:连接转化成功的 pQE30-sCAR-TSP-1 用 *Hind* III 酶切鉴定,1 为 marker III 条带,2 上端为载体 pQE30 : 3 500 bp,下端为目的片段 sCAR-TSP-1 : 777 bp

3.2 sCAR-TSP-1 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

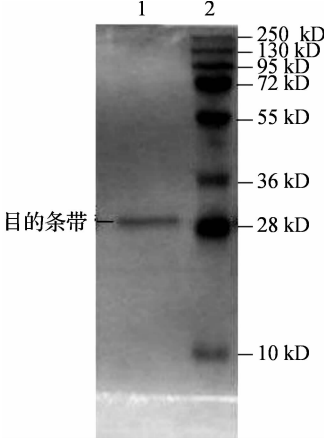
将鉴定正确的质粒 pQE30-sCAR-TSP-1 转化表达宿主菌 M15,挑取阳性单克隆培养,经 0.8 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后,收集菌体,超声破碎,重组质粒 pQE30-sCAR-TSP-1 菌体经 IPTG 诱导后收集菌体裂解离心后,取适量上清和沉淀进行 12% 的 SDS-PAGE 分析,以确定目的蛋白的存在形式。同时空载体 pQE30 做同样处理作为对照组。沉淀样品电泳结果显示在 28kD 附近出现一条明显表达的蛋白条带,与目的蛋白大小相当,而上清和空载体未出现明显表达条带,证明目的蛋白的存在形式是包涵体(图 2)。



M: 蛋白分子量 Marker;
1,2. IPTG 诱导空载体 pQE30 总蛋白;
3,4. pQE30-sCAR-TSP-1 经 IPTG 诱导后表达超声破碎后上清;
5. pQE30-sCAR-TSP-1 经 IPTG 诱导表达后超声破碎后沉淀
图 2 重组质粒 pQE30-sCAR-4N1 在 M15 菌株中表达的 SDS-PAGE 结果

3.3 sCAR-TSP-1 包涵体蛋白的溶解、复性及 Ni 离子亲和层析纯化

包涵体用 8 mol/L 尿素变性溶解,离心取上清,用 PBS 稀释复性蛋白,复性蛋白经 Ni-NTA His-bind 螯合亲和层析柱纯化,再利用咪唑置换,洗脱下特异结合的蛋白。洗脱蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 分析表明,纯化的表达产物在 28kD 附近有一条特异蛋白带与目的蛋白大小一致,浓度为 514.531 8 $\mu\text{g/mL}$ (图 3)。复性的目的蛋白用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。



1. 纯化后目的蛋白条带, 2. 蛋白只是 Marker
图 3 融合蛋白 sCAR-4N1 包涵体复性纯化后的 SDS-PAGE 胶

3.4 MTT 法进行融合蛋白 sCAR-TSP-1 处理组细胞毒性检测

分别以 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 sCAR-TSP-1 融合蛋白作用于 K562 细胞和 Beas-2B,在 4 d 后用 MTT 法检测细胞存活率。结果显示,不同浓度的融合蛋白作用后,细胞生长呈现浓度依赖性。通过 Sigma Plot 绘图软件分析(图 4),结果表明,当 sCAR-TSP-1 融合蛋白达到 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,处理 4 d 后,能够有效地抑制 K562 细胞的增殖,且对正常细胞 Beas-2B 伤害较小,为最佳浓度。

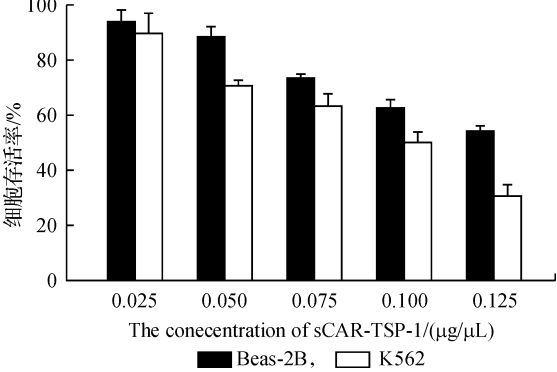
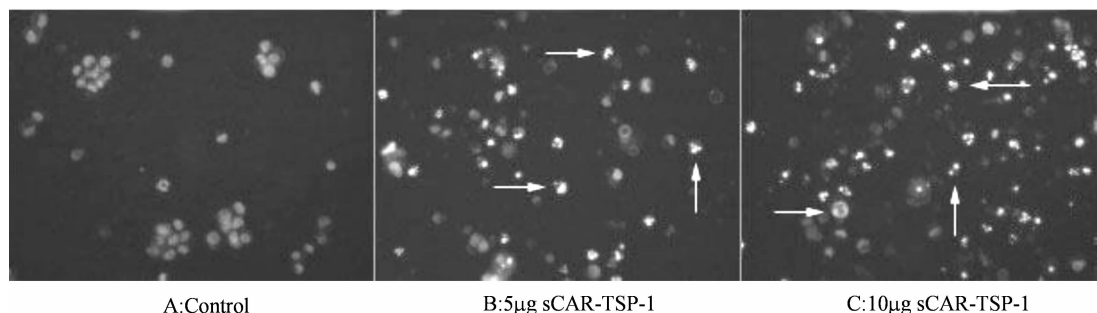


图 4 MTT 法检测细胞存活率

3.5 凋亡细胞染色实验:Hoechst 33342 染色

分别以 5 μg 和 10 μg 融合蛋白(终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)sCAR-TSP-1 作用 K562 细胞 48 h 后,加入 Hoechst 33342,孵育 30 min,在荧光

显微镜下观察细胞核的变化。如图 5 所示,加入 5 μg 和 10 μg 融合蛋白 sCAR-TSP-1 后的 K562 细胞核萎缩明显。表明发生了明显的凋亡,而对照组细胞核正常。



A. Control, B. 加入 5 μg 融合蛋白 sCAR-TSP-1 后的 K562 细胞, C. 加入 10 μg 融合蛋白后的 K562 细胞

图 5 Hoechst 染色检测融合蛋白对白血病细胞的凋亡作用

4 讨论

本课题中融合蛋白 sCAR-TSP-1 的 N 末端融合了与 Ni^{2+} 具有高亲和结合特性的 6 个组氨酸标签,因此便于蛋白的纯化。实验发现,sCAR-TSP-1 在 pQE30/M15 表达系统中表达量高且主要以包涵体形式存在。先将包涵体在 8 mol/L 尿素中变性,而后分别先复性再纯化和先纯化再复性,结果发现先复性再纯化的蛋白,产量大损失小且纯度高。用 PBS 稀释复性,复性蛋白再利用 Ni 离子亲和层析对复性蛋白进一步纯化。此外,在洗脱过程中,咪唑量的不同会大大影响纯化结果,在本实验中,当咪唑量为 20 mM 时,洗脱效果最佳,纯化后蛋白条带最单一最清晰。

目前针对 TSP-1 这种蛋白在癌细胞凋亡领域中的作用存在着多种观点,有研究指出,它在不同细胞系中,扮演着不同的角色,即凋亡和抗凋亡的作用在不同细胞中发挥的作用不同^[10]。有研究指出,在分化不良的滤泡甲状腺癌细胞中,当用抗肿瘤药物处理此细胞时,TSP-1 有抗凋亡作用。近来更多学者更倾向于它对癌细胞的凋亡作用。Friedl P 等指出,TSP-1 的羧基端可与细胞表面的 CD47 形成整联蛋白,从而导致细胞凋亡,这与本课题实验吻合,结果证明它对白血病细胞有着明显的凋亡作用,当 sCAR-TSP-1 融合蛋白达到 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,能够有效地抑制 K562 细胞的增殖,且对正常细胞 Beas-2B 伤害较小,效果较好。

研究发现,细胞癌变和转移等过程很可能与细胞膜表面糖蛋白及糖链结构变化有关^[11-12],而且肿瘤的恶性分化的程度越高,则 CAR 的表达越低^[13],

这大大限制了腺病毒的有效传递,进而限制临床应用^[14]。本课题中纯化的融合蛋白 sCAR-TSP-1, sCAR 部分可与 5 型腺病毒的 fiber 结合,TSP-1 可与白血病细胞表面的 CD47 结合,可使腺病毒有效靶向白血病细胞,从而提高对白血病治疗目的专一性^[15]。此外,sCAR-TSP-1 增强腺病毒感染白血病细胞的效果还有待于进一步验证,而且,对于白血病的裸鼠模型是否有明显抑制肿瘤的作用也有待进一步研究。未来,sCAR-TSP-1 可以作为一个连接腺病毒和白血病细胞的桥梁,其提高腺病毒治疗白血病疗效的潜力,将为很多应用奠定基础。

参考文献:

- [1] 李春丽,赵娜,张王刚. 白血病干细胞研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2007, 20(4): 252-255.
- [2] 范良生,陈刚,马丁. 柯萨奇-腺病毒受体在肿瘤发生发展机制中的研究进展[J]. 癌症, 2009, 76(3): 333-336.
- [3] Chen Gang, Xie Li, Liu Bao-rui. Stem cell-targeted therapy-a new strategy for cancer treatment[J]. Chinese Journal of Oncology, 2008, 30(11): 801-803.
- [4] Ying Kang, Song Mei-yin. Research on physiological function of CD47 [J]. Journal of Experimental Hematology, 2003, 11(4): 437-440.
- [5] Majeti R, Chao M P, Alizadeh A A, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. Cell, 2009, 138(2): 286-299.
- [6] Frazier W A, Roberts D D, Isenberg J S. CD47: a new target in cardiovascular therapy [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(4): 615-621.
- [7] Maile L A, David R. Clemmons. integrin-associated pro-

tein binding domain of thrombospondin-1 enhances insulin-like growth factor-I receptor signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation Research*, 2003, 93(6): 925-931.

[8] Maile L A, Clemmons D R. Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 8955-8960.

[9] Rath G M, Schneider C, Dedieu S, et al. The C-terminal CD47/IAP-binding domain of TSP-1 prevents campothecin and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 17(63): 1125-1134.

[10] Sargiannidou I, Zhou J, Tuszyński G P, The role of thrombospondin-1 in tumor progression[J]. *Exp Biol Med*, 2001,226: 726-733.

[11] Guzman M L, Rossi R M, Karnischky L. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, 105(11): 4163-4169.

[12] Manzke O, Russello O, Leenen C. Immunotherapeutic strategies in neuroblastoma; antitumoral activity of deglycosylated Ricin A conjugated anti-GD2 antibodies and anti-CD3xanti-GD2 bispecific antibodies[J]. *Med Pediatr Oncol*, 2001, 36(1): 185-189.

[13] Li G Y, Zou D S, Zhou L H. Expression and purification of recombinant human cyclin D1 in E coli BL21 [J]. *Journal of Anshan University*, 2010, 12(2): 839-843.

[14] Pilobello K T, Mahal L K. Lectin microarrays for glycoprotein analysis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 14(2): 193-203.

[15] 杨福冬, 何明生. 白血病干细胞分子调控机制及靶向治疗[J]. *中华内科杂志*, 2008, 47(6): 515-518.

Prokaryotic Expression and Purification of sCAR-TSP-1, and Induced Apoptosis in Leukemic Cells k562

LIANG Tian-xiang, SHEN-HE Kuan-zi, CHEN Lei, WU Hu, TANG Bin
(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: According to thrombospondin-1(TSP-1) amino acid sequence(RFYVVMWK), to the adenovirus receptor sCAR as template, the 8 amino acids corresponding gene nucleotide amplified by PCR from sCAR, sCAR-TSP-1, connected to the expression vector pQE30, is transformed into E. coli M15 obtained after engineering bacteria. The strain induced by IPTG, efficient expression with histidine label in the form of inclusion body of the fusion protein sCAR-TSP-1. Inclusion body after urea denaturation dissolved, PBS dilution refolding, Ni ion affinity chromatography purification, and obtains the target protein. SDS-PAGE analysis shows, there is an obvious specificity protein band. At the same time, the experimental results show that the fusion protein in sCAR-TSP-1 cells of leukemia cell K562 has obvious apoptosis.

Key words: TSP-1; fusion protein sCAR-TSP-1; prokaryotic expression; leukemic cell

(责任编辑: 许惠儿)