论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0298-04

信号肽重组 hβD2 在 A549 细胞中表达纯化及抗菌活性测定

张 青,杜剑平,陈正堂 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 通过构建在 A549 细胞中高表达人防卫素 hβD2 的表达体系,获得人源化 hβD2。**方法** 构建 pLNCX2-CEA 信号肽-hβD2 成熟肽逆转录病毒表达载体,经逆转录包装细胞 PT67 包装后获得含融合基因的侵袭性病毒,该病毒感染宿主细胞 A549 后将融合基因整合入宿主基因组中,收集培养基上清,分离纯化获得目的蛋白 hβD2,测定目的蛋白的抗菌活性。**结果** 收集转染有融合基因的 A549 细胞培养基上清,经 Western Blot 和质谱仪分析,纯化后的目的蛋白为 hβD2,具有较强的抗菌活性。**结论** 将 CEA 信号肽重组 hβD2 基因转染 A549 细胞后,细胞具有表达分泌型 hβD2 的功能。

关键词:hβD2;融合基因;蛋白表达

中图法分类号:Q516;Q784 **文献标识码**:A

Expression, purification and identification of recombinant signal peptide of human β-defensin 2 in A549 cells

ZHANG Qing, DU Jian-ping, CHEN Zheng-tang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct high expression system for obtaining human β-defensin 2 (hβD2) in human lung cancer cell line A549. **Methods** A recombinant retrovirus expression vector pLNCX2-CEA (signal peptide)-hβD2 (mature peptide) was constructed, and then the retrovirus vector was transfected into PT67 cells by DOTAP. After screening and amplification of single clones by G418, the virus was used to infect A549 cells. A549 cells were also screened by G418, and the cell clones resistant to G418 were obtained. Expression of hβD2 was detected by Western blot analysis. **Results** A recombinant retrovirus expression vector pLNCX2-CEA-hβD2 was constructed successfully. hβD2 with high level of expression was obtained in A549 cells transfected with the expression vector. **Conclusion** Human lung cancer cell line A549 can be used for high expression of hβD2 with gene engineering technology.

Key words: human β-defensin 2; fusion gene; protein expression

本研究将 CEA 信号肽和 hβD2 成熟肽基因片段连接成重组融合基因片段,通过逆转录病毒表达载体,将重组融合基因片段整合到肺腺癌细胞 A549 基因组中,收集转染细胞培养基上清后纯化目的蛋白并检测,探索在肺腺癌细胞 A549 中表达 hβD2 的可行性,为研究开发费用低廉的 hβD2 进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与培养基 含 CEA 全长基因片段的 pBluescript SK-CEA 质粒由加拿大 N. Beauchemin 博士惠赠,含 hβD2 基因片段的 pBluescript SK- hβD2 质粒由美国 Liu Lide 博士惠赠。Retro-X System 试剂盒购自 BD Bioscience 公司,其中包括:pLNCX2 逆转录病毒载体,逆转录病毒包装细胞 PT67,A549 细胞购自上海细胞所,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠球菌、绿脓杆菌由西南医院中心实验室提供,大肠杆菌 DH5α(本科室保存)。

1.1.2 主要试剂 PCR 引物由上海生物工程技术公司合成,限制性内切酶、dNTPs、pfu Taqmei 酶等均购自 MBI 公司,胎牛血清购自 PAA。低分子量蛋白质标志物购自重庆多泰制药有限公司,Tricine 购自 Sigma 公司,hβD2 一抗(兔抗人 hβD2 抗体)购自 Alpha Dignostic International 公司。超速离心管(milipore 公司)。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪(Bio-Rad 公司),Air tech 细胞超净工作台(苏州净化器厂),DNA 电泳仪和蛋白电泳仪(Bio-Rad 公司),ABI437 蛋白质自动测序仪(ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组逆转录病毒载体构建

1.2.1.1 融合基因构建

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170404)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170404)

作者简介:张 青(1964-),男,湖北省黄石市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事急性肺损伤和核素治疗方面的研究,现在第三军医大学新桥医院核医学科,发表论文 24 篇。电话:(023)68755639

收稿日期:2004-10-19;修回日期:2005-01-26

PCR 引物设计：以含 CEA 全长基因片段的 pBluescript SK-CEA 质粒为模版，设计引物克隆 CEA 信号肽全长片段，并分别在两引物的 5′端加入酶切位点，便于 CEA 信号肽插入 pBluescript SK-hB2 质粒 hβD2 的上游。

P1：5′-ATAGAGCTCATGGAGTCTCCCTCGG-3′

（正向引物）下划线部分序列分别为 *Sac* Ⅰ酶切位点

P2：5′-TTTGGATCCGGCAGTGGTGGGCGGGTTC-3′

（反向引物）下划线部分序列分别为 *Bam*H Ⅰ酶切位点

Sac Ⅰ/*Bam*H Ⅰ双酶切分别双酶切 pBluescript SK-hβD2 质粒和 PCR 产物片段，T4 DNA 连接酶 16 ℃过夜连接 pBluescript SK-hβD2 质粒酶切后大片段及 PCR 产物片段。连接产物转入 DH5α 感受态细胞中，于含氨苄青霉素的 LB 平板上 37 ℃培养过夜。基因测序送上海生工进行。以下构建载体的方法相同。

1.2.1.2　表达载体的构建　　设计引物克隆 hβD2 成熟肽基因片段，并在上下游端分别引入 *Bam*H Ⅰ酶切位点和 *Eco*R Ⅰ酶切位点及各 3 个保护性碱基。

上游引物 P1：5′-TTAGGATCCGGTATAGGCGATCCTG-3′

下游引物 P2：5′-AATGAATTCTCATGGCTTTTTGCAG-3′。

*Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点可以方便 hβD2 成熟肽基因片段正确插入到 pBluescript SK-CEA-hβD2 质粒中 CEA-EK 的下游多克隆位点，达到 hβD2 成熟肽基因替换 pBluescript SK-CEA-hβD2 质粒中 hβD2 全基因片段的目的。

1.2.1.3　重组逆转录病毒表达载体 pLNCX2-CEA-hβD2（成熟肽）的构建及筛选

根据融合基因 CEA 信号肽-hβD2 成熟肽序列，设计引物：

上游引物 P3：5′-TTCAAGCTTATGGAGTCTCCCTCGG-3′

下游引物 P4：5′-AACGTCGACTCATGGCTTTTTGCAGC-3′

Hind Ⅲ和 *Sal* Ⅰ酶切位点，可以方便融合基因构建入 pLNCX2 多克隆位点中。

1.2.2　重组逆转录病毒载体转染 A549 细胞及表达

1.2.2.1　重组逆转录病毒载体转染　　采用脂质体 DOTAP 将重组逆转录病毒表达载体 pLNCX2-CEA-hβD2 转染逆转录包装细胞 PT67，操作步骤按说明书进行，G418 筛选单克隆及扩增单克隆后，用 NIH3T3 细胞测定病毒滴度，收集符合转染要求的病毒上清，转染 A549 细胞，G418 筛选单克隆及扩增单克隆。

1.2.2.2　目的蛋白溶液的收集及 ELISA 检测　　采用无血清培养基培养抗性 A549 细胞，培养 3 d 后收集培养基上清，作下一步的目的蛋白的分离纯化。双抗体夹心法检测整合有融合基因的 A549 细胞培养基上清、未转染 A549 的培养基上清、转染空病毒 A549 培养基上清中目的蛋白的表达情况。

1.2.3　目的蛋白 hβD2 的分离纯化

1.2.3.1　硫酸铵分级沉淀　　收集 A549 细胞培养上清，在缓慢搅拌下加入固体硫酸铵使之达到 5% 饱和度（4 ℃），离心分离沉淀和上清（10 000 r/min，4 ℃）。重复上述操作使硫酸铵饱和浓度分别按 5% 的浓度梯度增加，收集各浓度梯度上清液和沉淀，沉淀以 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 溶解并检测抗菌活性，选取最高抗菌活性的沉淀，进行下一步的分离。

1.2.3.2　凝胶过滤层析　　使用 Sephadex G-50 凝胶柱，柱长 1 cm，内径 26 mm，以 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 缓冲液平衡后上样，以同样的缓冲液洗脱，流速 1 ml/min，分部收集峰值洗脱液，收集的洗脱液检测抗菌活性。经截留值为 3×10^3 的超滤离心管脱盐、浓缩，并测各峰值抗菌活性。

1.2.3.3　离子交换层析　　使用交换柱为 Hiprep16/10CMFF，以 20 mmol/L TrisHCl 平衡，pH 8.0，以 0～1 mol/L NaCl /20 mmol/L TrisHCl（pH 7.2）梯度洗脱，流速为 3 ml/min。分部收集，测定洗脱液的 $D(280)$，见出现峰值后收集。经截留值为 3×10^3 的超滤离心管拖盐、浓缩，并测各峰值抗菌活性。

1.2.4　Western Blot 和质谱仪检测目的蛋白

1.2.4.1　分子量测定　　采用 Tris-Tricine 缓冲液系统进行目的蛋白的电泳，常规电泳，考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.4.2　抗菌活性检测　　以大肠杆菌为指示菌，采用平板生长抑制法，对分离的 hβD2 进行功能测定。最小抑菌浓度（MIC）的测定采用二倍比稀释法进行。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS10.0 作单因素方差分析和均数间比较。

2　结果

2.1　融合基因克隆入 pLNCX2 多克隆位点

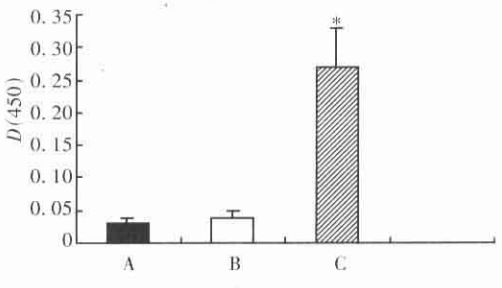
用试剂盒提供的引物测序，DNAstar 软件分析，结果如下：

ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCT
GGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCG
CCCACCACTGCC**GGATCC**GGTATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTT
AAGAGTGGAGCCATATGTCATCCAGTCTTTTGCCCTAGAAGGTATAA
ACAAATTGGCACCTGTGGTCTCCCTGGAACAAAATGCTGCAAAAAG
CCA***TGA***

黑体斜体 ATG 和 TGA 分别是融合基因的起始密码子和终止密码子，下划线部分是 *Bam*H Ⅰ序列，之前 CEA 信号肽序列，之后是 hβD2 成熟肽序列。

2.2　ELISA 检测结果

从图 1 中可见，整合有融合基因的 A549 细胞培养基上清、未转染 A549 的培养基上清、转染空病毒 A549 培养基上清结果有显著性差异，其中对照组中出现的光吸收值是由于实验过程中杂蛋白封闭不完全所导致。



A：Control；B：Blank group；C：Transfected group；*：$P<0.05$，*vs* A

图 1　ELISA 检验 A549 细胞培养基上清目的蛋白

Fig 1　The fusion protein determined by ELISA in culture stromal supernatant of A549 cell

2.3 目的蛋白纯化

2.3.1 硫酸铵分级沉淀 以大肠杆菌为指示菌作细菌平板抑制实验，追踪硫酸铵沉淀产物中目的蛋白的含量。随硫酸铵饱和度的逐渐提高，蛋白质沉淀物抑菌活性逐渐增强，并在60%饱和度下所得蛋白质活性达最强，因此，在60%硫酸铵饱和浓度下所得的沉淀中所含的hβD2浓度最高。

2.3.2 凝胶凝胶层析 将60%硫酸铵饱和度所得蛋白质沉淀溶解，上Sephadex G-50凝胶柱，洗脱曲线见图2。该步层析有两个大峰，第一峰具有较强抑菌活性，合并第一峰洗脱液，以超滤离心管进行浓缩。

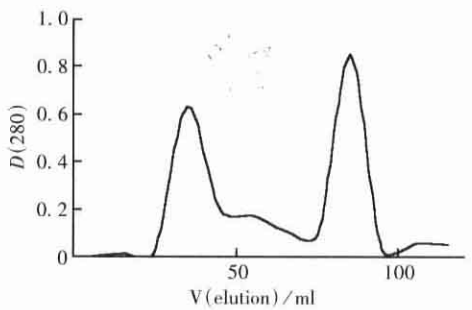


图2 凝胶层析洗脱曲线

Fig 2 The gel-separated chromatographic curve of hβD2

2.3.3 离子交换层析 将凝胶分离的蛋白浓缩液，上样于Hiprep16/10CMFF离子交换柱，洗脱曲线见图3。该步层析得2个峰，分别进行抑菌活性测定，显示第2峰洗脱液具有较强的抗菌活性，以超滤离心管进行浓缩。最终，纯化后目的蛋白浓度为580 μg/ml。

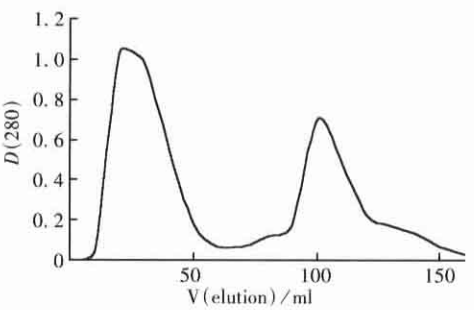


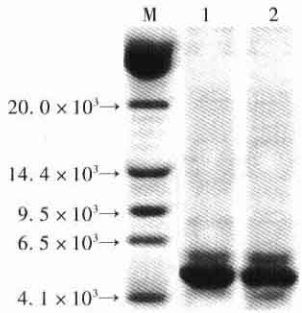
图3 离子层析洗脱曲线

Fig 3 The ion chromatographic curve of hβD2

2.4 目的蛋白检测

2.4.1 Western Blot检测结果 在Tris-Tricine缓冲条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示，最终分离纯化的目的蛋白为成分较为单一的蛋白，分子质量约为4.6×10^3，与预期的分子量相符，见图4。免疫印记显示，纯化的蛋白是hβD2。

2.4.2 hβD2 N末端氨基酸序列测定 对重组hβD2进行N端氨基酸残基序列分析，共分析15个氨基酸，结果为：VFGGIG-DPVTCLKSG。该结果与融合基因片段中hβD2成熟肽N端所对应的蛋白质序列完全吻合，证实纯化的目的蛋白就是融合基因所表达的蛋白。



M: Marker; 1, 2: Purified hβD2

图4 蛋白电泳显示纯化后hβD2

Fig 4 SDS-PAGE analysis of purified hβD2

2.4.3 hβD2抗菌谱测定 纯化后的hβD2对临床上常见的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、白色念珠球菌均有较强的杀菌作用，对这4种病菌的最低抑菌浓度(MIC)分别是36.3、36.3、72.5、72.5 mg/L。

3 讨论

抗菌肽是广泛存在于自然界生物体内的一种抗菌物质，hβD2 (humanβ Defensin-2)是人体上皮组织分泌的的一种抗菌肽，具有重要的抗菌作用[1~3]。文献[4]报道，采用基因工程技术，以大肠杆菌、酵母菌等表达体系细胞体外合成抗菌肽，但目前常用的生物工程的表达体系细胞：大肠杆菌、酵母、杆状病毒/昆虫细胞和哺乳动物细胞，对合成抗菌肽(如hβD2)而言，或多或少存在一些问题，如hβD2只能在大肠杆菌的包涵体中表达，酵母细胞的修饰功能尚现不足，而杆状病毒/昆虫细胞和哺乳动物细胞均是终末分化细胞，外源基因导入宿主细胞后只能在一代或几代中表达。如果用肿瘤细胞作为表达体系细胞，其优点：①肿瘤细胞本身是一种真核细胞，它具有真核细胞对所表达蛋白的一切修饰功能；②肿瘤细胞能无限传代。

正常情况下，hβD2只在呼吸道上皮和皮肤中分泌表达，肿瘤细胞不表达hβD2蛋白[5]。Horton等[6]将干扰素-ω基因通过疱疹病毒转入黑色素瘤UM449细胞，其上清液有抗病毒和抗肿瘤增殖作用。用逆转录病毒将HBV基因介导入人肝癌细胞，能稳定表达制备人乙型肝炎表面抗原蛋白[7]。以上研究提示利用人肿瘤细胞作为表达体系细胞可以表达外源性目的基因，获得具有生物学活性的目的蛋白或多肽。肠道肿瘤细胞及某些其他肿瘤细胞具有高表达分泌型CEA(human carcinoembryonic antigen)特性[8]，因此可以推论：在这些高分泌CEA的肿瘤细胞中必然存在高效转录和翻译CEA基因的分子生物学机制。信号肽是存在于所有分

泌蛋白、部分膜蛋白和溶酶体蛋白的 N-末端的共同序列，该序列与多肽链的识别、转运入内质网密切相关。体外实验显示，将信号肽附加到正常存在细胞液中的球形蛋白 N-末端时，导致该球形状蛋白分泌到细胞外。在本实验中，将 CEA 信号肽与 hβD2 成熟肽基因片段连接成融合基因，通过逆转录病毒表达载体将融合基因整合到高表达 CEA 的 A549 细胞中，尝试利用 CEA 信号肽基因片段作为增强宿主细胞高分泌表达 hβD2，解决宿主肿瘤细胞对 hβD2 不表达的问题，试图在宿主肿瘤细胞中达到高表达分泌型蛋白 hβD2 的目的。

外源性融合基因 CEA 信号肽 hβD2 成熟肽基因片段经用逆转录病毒包装细胞包装，整合入宿主肿瘤细胞基因组，是一种稳定性转染，外源性融合基因不会随肿瘤细胞的分裂而在子代细胞中丢失。因此，外源性基因会一直在子代中继续表达，解决外源基因转染常规真核表达体系细胞后不能无限传代，表达外源性基因的难题。

实验的结果表明，整合有人重组 CEA 信号肽-hβD2 成熟肽融合基因片段的 A549 细胞表达分泌型 hβD2，表达的 hβD2 具有较强的抗菌活性，说明转染的肿瘤细胞 A549 可作为表达体系细胞表达某些特殊活性的蛋白如 hβD2，为基因工程合成人源化 hβD2 提供了一条新的途径。

参考文献：

[1] Schroder J M. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 56(1-2): 32 - 46.

[2] Hoover D M, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 39021 - 39026.

[3] Yang D, Chertov O, Bykovskaia S N, *et al*. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6[J]. Science, 1999, 286(5439): 525 - 528.

[4] 吴映雅，刘飞鹏，周天鸿，等. 抗菌肽与碱性成纤维细胞生长因子基因的融合及其在酵母中的表达[J]. 生物工程进展，1998，18(5)：11 - 15.

[5] Schroder J M, Harder J. Human beta-defensin-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(6): 645 - 651.

[6] Horton H M, Hernandez P, Parker S E, *et al*. Antitumor effects of interferon-omega: *in vivo* therapy of human tumor xenografts in nude mice[J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 4064 - 4068.

[7] 古柏燕，任　红. HbsAg 在不同真核表达载体中的表达[J]. 中华肝脏病杂志，1999，7(2)：98 - 100.

[8] Osaki T, Tanio Y, Tachibana I, *et al*. Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene[J]. Cancer Res, 1994, 54(20): 5258 - 5261.

（编辑　薛国文）

（上接 290 页）

2.2　详细记录引流液的性状与量

术后引流液多为暗红色陈旧性积血，如引流管持续流出新鲜、不凝固的血液，应考虑有再出血的发生，立即报告医生，及时处理。予持续开放引流管，保持引流管通畅，出血多时置引流袋低于头位以利引流。

2.3　神经系统症状体征的观察

根据格拉斯哥昏迷计分法（GCS）准确判断病人的昏迷程度。术后患者意识障碍加重，神经系统查体出现新的阳性体征，清醒患者转为昏迷，出现瞳孔一侧或两侧散大，对光反射迟钝或消失等均强烈提示发生了再出血。

2.4　心肺功能的监护

术后保持气道通畅，予多功能心电监护持续监测心率、呼吸频率、血氧饱和度。病人的呼吸超过 30 次/min，常提示脑缺氧及颅内压增高；病人呼吸慢、心率慢、血压升高，也是脑内压增高的表现，以上两种情况均应高度怀疑再出血。

2.5　心理和生活护理

稳定病人情绪，保持大小便通畅，常规导泻可口服果导片，指导病人在排便时用力吸气，必要时予小量低压保留灌肠；尿潴留时导尿等措施均有利于稳定病人的血压。尽早恢复流质饮食，肠道营养配方，实施胃肠道营养，以保护、维持胃肠粘膜屏障，减少消化道出血的发生，预防肠道细菌移位及肠道菌群失调的发生[5]。

3　讨论

高血压脑出血颅内血肿微创清除术后再出血的原因是多方面的。掌握手术的适应症，周密的手术方案，准确的定位，规范的操作，术前做好再出血的准备，术后密切观察病人的意识、瞳孔、血压、神经系统的症状和体征的变化，早期发现、早期诊断、尽早采取相应的有效的处理措施是避免和减少再出血的重要环节。

关键词：脑出血；微创术；再出血；护理

中图法分类号：R473.74　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱晓波，魏全枝，白雁明. 颅内血肿微创清除术后再出血的临床研究[J]. 中国与神经疾病杂志，2003，20(3)：272.

[2] 胡长林，吕涌涛，李志超. 颅内血肿微创清除技术规范化治疗指南[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2003：3.

[3] 黎介寿. 肠外瘘[M]. 第2版. 北京：人民军医出版社，2003：9.

[4] 鲜继淑，李冬红，毕国玲. 急性脑血管并发症的分析及护理[J]. 中国实用护理杂志，2004，20(2)：24 - 25.

（编辑　王　红）