文章编号:1000-5404(2005)19-1931-04

论著

人 HMGB1 的制备及功能鉴定

邢效如[1*],何凤田[1*],杨朝辉[1],李蓉芬[1],郑英如[2],高会广[1],黎 松[3],张 艳[1],张 立[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042;[3] 匹兹堡大学,匹兹堡市,滨夕法尼亚州 15261,美国)

提 要:目的 在克隆人 HMGB1(high mobility group box-1)全长 cDNA 的基础上,用大肠杆菌进行表达并鉴定其生物学活性。**方法** 用 RT-PCR 方法扩增人 HMGB1 cDNA,克隆至载体 pUC19 行序列测定后,再构建于原核表达载体 pQE-80L 并转化大肠杆菌 DH5α,以 IPTG 诱导 HMGB1 蛋白表达,Ni^{2+}-NTA 和多粘菌素 B 亲和层析柱进行纯化后,用培养的人单核细胞系 THP1 检测重组蛋白活性。**结果** 构建了人 HMGB1 蛋白的重组表达质粒 pQE-80L/HMGB1,获得了纯度约 96% 的纯化蛋白产物,该蛋白能刺激 THP1 细胞产生 TNF-α。**结论** 成功制备了具有生物学活性的人 HMGB1 蛋白纯品,为进一步的功能研究奠定了基础。

关键词:HMGB1;原核表达;纯化;TNF-α

中图法分类号:Q513.1;Q785;Q786 **文献标识码**:A

Preparation and functional identification of human high mobility group box-1 protein

XING Xiao-ru[1*], HE Feng-tian[1*], YANG Zhao-hui[1], LI Rong-fen[1], ZHENG Ying-ru[2], GAO Hui-guang[1], LI Song[3], ZHANG Yan[1], ZHANG Li[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, China; [3]University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA15261, USA)

Abstract: Objective To clone the cDNA encoding human HMGB1, express it in E. coli, and identify its biological activity. **Methods** Human HMGB1 cDNA was amplified by RT-PCR and cloned into vector pUC19. After sequence analysis, the cDNA was ligated into prokaryotic expression vector pQE-80L and induced by IPTG to express HMGB1. The protein was purified with Ni^{2+}-NTA chromatography and polymyxin B affinity column. To identify the function of purified protein, the product was co-cultured with THP1 cells. **Results** Recombinant expression plasmid pQE-80L/HMGB1 was constructed successfully. After purification, the protein purity reached 96%. The recombinant HMGB1 stimulated THP1 to secrete TNF-α. **Conclusion** The highly purified HMGB1 was obtained successfully, which showed biological activity. These results lay the foundation for further research on the function of human HMGB1.

Key words: HMGB1; prokaryotic expression; purification; TNF-α

HMGB1 是哺乳类细胞中含量丰富的核蛋白,分子量为 30×10^3[1]。在细胞核内,HMGB1 主要与 DNA 结合,参与细胞复制、DNA 修复、DNA 重组、类固醇激素调控及基因转录调节等重大生命活动[2]。在细胞外,HMGB1 是近年发现的重要致炎因子,是脓毒症中的晚期致炎介质[3]。进一步的研究表明,胞外 HMGB1 还与神经发育、肿瘤转移、动脉粥样硬化、血管损伤后再狭窄[4]以及类风湿性关节炎有关[5]。因此,获得具有良好生物学活性的人 HMGB1,并对其病理生理作用进行深入研究显得尤为重要。

本实验利用 RT-PCR 方法从人扁桃体组织中扩增 HMGB1 cDNA,经序列测定后,构建原核高效表达载体 pQE-80L/HMGB1,以 IPTG 诱导该蛋白表达,经 Ni^{2+}-NTA 层析柱及多粘菌素 B 柱纯化后,观察纯化蛋白刺激人单核细胞系 THP1 分泌 TNF-α 水平,为进一步的研究奠定基础。

作者简介:邢效如(1966-),男,山西省定襄县人,硕士研究生,主治医师,主要从事分子改建及神经系统疾病方面的研究。电话:(023)68775198

* 对本工作有同等贡献

通讯作者:何凤田,电话:(023)68752262,E-mail:hefengtian@163.net

收稿日期:2005-03-10;修回日期:2005-04-05

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人新鲜扁桃体组织取自临床手术切除的扁桃体；RPMI1640培养基及Tripure RNA提取试剂为Roche公司产品；PCR引物由上海生工公司合成；RT-PCR及PCR纯化试剂盒为Promega公司产品；限制性内切酶购自大连宝生物公司；质粒pUC19购自华美公司；人单核细胞系THP-1、大肠杆菌DH5α及原核表达载体pQE-80L均由本室保存；抗-His单抗、多粘菌素B层析柱和Ni^{2+}-NTA层析系统购自德国Qiagen公司；辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG为华美公司产品。

1.2 细胞总RNA的提取

取人新鲜扁桃体组织，采用Tripure试剂盒提取细胞总RNA，操作按说明书进行。

1.3 RT-PCR扩增人HMGB1 cDNA

根据GenBank中编码人HMGB1的cDNA序列，设计1对特异性引物。上游引物为：5′-GCGGTACCATGGGCAAAGGAGATCCT-3′（划线部分为*Kpn* Ⅰ酶切位点），下游引物为5′-GCAAGCTTTTATTCATCATCATCATC-3′（划线部分为*Hind* Ⅲ酶切位点）。RT-PCR按试剂盒说明进行，RNA 5 μl（约1 μg），5×反应缓冲液10 μl，上、下游引物各2 μl（各1 μmol/L），dNTP 1 μl（每种为10 mmol/L），25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl，AMV反转录酶1 μl（5 U），*Tfl* DNA聚合酶1 μl（5 U），双蒸水26 μl，总反应体积为50 μl，48 ℃ 45 min；94 ℃预变性2 min，然后94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，40个循环，最后68 ℃延伸7 min。反应完成后，取5 μl RT-PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳，在凝胶扫描仪下观察结果。

1.4 序列测定

将RT-PCR产物及载体pUC19经*Hind* Ⅲ + *Kpn* Ⅰ酶切后，用纯化试剂盒进行回收，16 ℃连接12 h，将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞，经蓝、白筛选获得阳性重组子，提取质粒，经*Hind* Ⅲ + *Kpn* Ⅰ进行酶切鉴定，获得重组质粒pUC19/HMGB1，然后由上海生工公司进行序列测定。

1.5 重组原核表达载体的构建

经DNA测序证实后，以*Hind* Ⅲ + *Kpn* Ⅰ酶切pUC19/HMGB1质粒，回收目的片段并连接于原核表达载体pQE-80L。将重组原核表达载体转化至大肠杆菌DH5α，经质粒提取和酶切鉴定得到重组原核表达载体pQE-80L/HMGB1。

1.6 重组人HMGB1蛋白的诱导表达

挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于LB培养液中，37 ℃，200 r/min振荡培养过夜，次日以1%接种到5 ml LB培养液中，37 ℃，振荡培养至$D(600)$为0.8时，加IPTG至终浓度为1 mmol/L，继续培养4 h。

1.7 SDS-PAGE

按照参考文献[6]进行。取上述培养液1 ml，1 000 × *g* 离心1 min，沉淀加100 μl上样缓冲液，100 ℃煮10 min，取15 μl上样行SDS-PAGE电泳后，考马斯亮蓝染色。

1.8 重组人HMGB1蛋白的Western blot鉴定

按一抗说明书进行。诱导表达的产物先行SDS-PAGE，然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜（NC膜）上，取下NC膜短暂漂洗后用丽春红染膜，待蛋白marker条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干，用记号笔标记蛋白marker各条带，继而经漂洗去除丽春红，然后依次经5%脱脂奶粉室温封闭1 h，与抗-His单抗孵育1 h，与HRP标记的山羊抗小鼠IgG孵育1 h，每步完成后均严格洗膜，最后加DAB避光显色。

1.9 Ni^{2+}亲和层析柱纯化表达蛋白

将含重组质粒pQE-80L/HMGB1的表达菌株接种于500 ml LB中大量表达（方法同1.6），离心收集细菌，超声破碎菌体，离心沉淀包涵体，收集上清（经SDS-PAGE分析表明所表达的目的蛋白主要位于上清），将上清过Ni^{2+}-NTA树脂层析柱；用Wash buffer（50 mmol/L NaH_2PO_4、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L咪唑 pH 8.0）洗柱，直至$D(280)$小于0.01；再用Elution buffer（50 mmol/L NaH_2PO_4、300 mmol/L NaCl、250 mmol/L咪唑 pH 8.0）洗脱目的蛋白；透析去除盐分。

1.10 多粘菌素B层析柱纯化重组蛋白

为了排除LPS对实验的影响，将经Ni^{2+}柱纯化的目的蛋白再经多粘菌素B层析柱纯化，从而得到纯化的重组人HMGB1蛋白。分别经SDS-PAGE和薄层扫描分析纯化蛋白的纯度，经紫外分光光度计检测蛋白浓度，最后冻干保存。

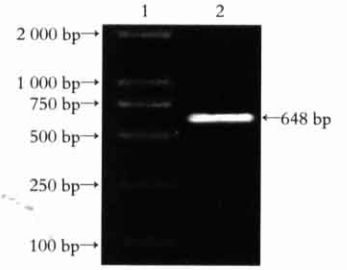
1.11 生物学活性检测

按照参考文献[7]进行。人THP1细胞系在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中培养传代4次至对数生长期，调整细胞数为5×10^9/L，培养于24孔细胞培养板中。表达的纯化HMGB1经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后分别加入24孔细胞培养板中，使终浓度为0.1、1、10、20、50 μg/ml，每组均设4个复孔。24孔细胞培养板置37 ℃，5% CO_2孵箱培养，于6 h分别收取HMGB1刺激孔及对照孔细胞培养上清，1 000 r/min离心后，取上清，用ELISA法检测其TNF-α含量。对只含pQE-80L载体的细菌，同样进行IPTG诱导和Ni^{2+}-NTA、多粘菌素B层析柱纯化步骤，以所获得的产物作阴性对照。

2 结果

2.1 人HMGB1 cDNA的克隆及序列测定

经RT-PCR扩增人HMGB1 cDNA，得到约648 bp的DNA片断（图1），将该片断克隆于载体pUC19进行DNA序列测定，其结果与GenBank中报道的编码人HMGB1 cDNA序列完全一致。



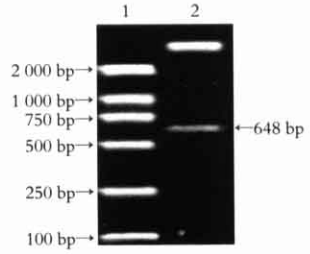
1：DNA marker DL2000；2：Human HMGB1 cDNA

图1 RT-PCR结果

Fig 1 Gel electrophoretic analysis of RT-PCR product

2.2　重组原核表达载体的构建

pQE-80L/HMGB1 经酶切后,可见大小约 648 bp 的目的片段,表明重组原核表达载体构建成功(图 2)。



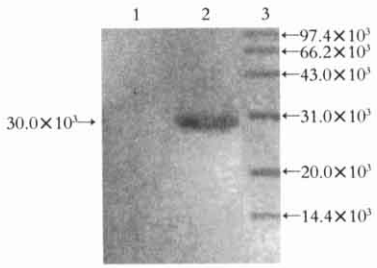
1: DNA marker DL2000; 2: pQE-80L / HMGB1 by *Hind* Ⅲ + *Kpn* Ⅰ

图 2　重组载体的酶切鉴定

Fig 2　Restriction enzyme digestion of the recombinant vector

2.3　重组蛋白的诱导表达及鉴定

携带 pQE-80L/HMGB1 重组质粒的 DH5α 菌株,经 IPTG 诱导后表达了重组目的蛋白,其相对分子量约为 30 000。Western blot 分析显示,经诱导的菌体裂解物与抗-His 单抗反应,在相对分子量约 30 000 处出现单一条带,而未经诱导的菌体则无此反应,说明所表达的重组蛋白确实是目的蛋白,结果见图 3。



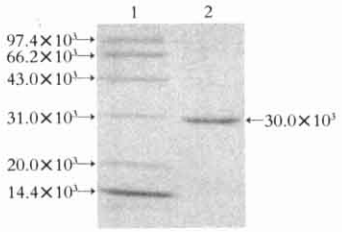
1: Negative control; 2: Recombinant protein HMGB1; 3: Protein marker

图 3　重组蛋白的免疫印迹分析

Fig 3　Western blot analysis of recombinant protein

2.4　表达蛋白的纯化

表达蛋白经 Ni^{2+}-NTA、多粘菌素 B 亲和柱纯化后行 SDS-PAGE,结果在电泳谱中呈单一条带,见图 4,说明目的蛋白得到较高程度的纯化,薄层扫描分析纯度达 96%。



1: Protein marker; 2: pQE-80L / HMGB1 / DH5α in 4 h after induction with IPTG

图 4　纯化产物的 SDS-PAGE

Fig 4　SDS-PAGE analysis of purified protein

2.5　生物学活性检测

经重组 HMGB1 刺激后,THP1 细胞可以分泌 TNF-α,且随 HMGB1 浓度的增高 TNF-α 的分泌量也增高,呈显著的剂量依赖性关系(图 5)。而阴性对照组则未检测到 TNF-α 分泌。

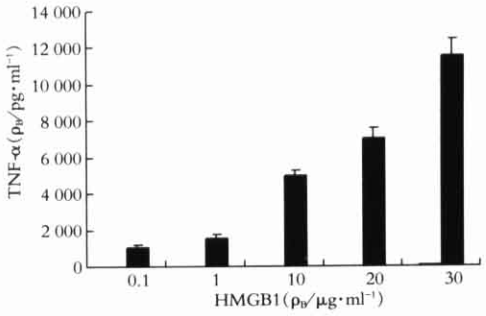


图 5　重组 HMGB1 诱导 THP1 细胞产生 TNF-α

Fig 5　Recombinant HMGB1 stimulates THP1 to release TNF-α

3　讨论

人 HMGB1 蛋白基因定位于染色体 13q12 带,由 215 个氨基酸组成,其 N 端富含带阳电荷的赖氨酸并呈碱性,有 2 个约 80 氨基酸残基组成的"L"型结构域,分别是 A box(1 - 85aa)和 B box(88 - 162aa),它们是非特异性 DNA 结合区;其 C 端富含带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸,又称为酸性尾端(acidic tail),此区可与其它蛋白相互作用来调节 HMGB1 与 DNA 的亲和力[7]。业已证实,HMGB1 可经 2 条途径向细胞外转移:一是由活化的单核/巨噬细胞主动分泌;二是从坏死、损伤的细胞被动释放[1]。HMGB1 至少有 1 个细胞表面受体:晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, ARGE),通过与之结合而激活大鼠平滑肌细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞内 MAP 激酶途径[8]。细胞外 HMGB1 具有多种病理生理作用,但对其功能研究尚处于起步阶段,许多问题亟待解决,如 HMGB1 是否确实参与脓毒症的病理过程?其参与肿瘤转移、动脉粥样硬化、血管损伤后再狭窄及类风湿性关节炎的确切机制与意义是什么?因此,制备具有生物学活性的人 HMGB1,对其功能进行深入的研究有着重要的意义。

实验中利用的原核表达载体 pQE-80L 是一种高效表达载体,其表达的目的蛋白量可达细菌蛋白总量的 50%,表达蛋白的 N 端带有 6-His tag,便于纯化和检测。该载体还能表达 lac 抑制子,在 IPTG 诱导前可抑制目的蛋白的表达,因而适用于表达毒性蛋白。为此,本实验选择了该载体进行人 HMGB1 的表达,表达量达到菌体总蛋白的 40%,这就为获取足量的重组人

HMGB1 提供了方便。为排除 LPS 对实验的影响，将经 Ni^{2+}-NTA 层析柱纯化的目的蛋白再经多粘菌素 B 亲和柱纯化，得到了高纯度的重组蛋白。经初步检测，证实了重组人 HMGB1 可刺激 THP1 细胞分泌 TNF-α。这些结果的取得为进一步研究人 HMGB1 的功能奠定了基础。

参考文献：

[1] Palumbo R, Bianchi M E. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(6): 1165 -1170.

[2] Bonaldi T, Langst G, Strohner R, *et al*. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding[J]. EMBO J, 2002, 21(24): 6865 -6873.

[3] Wang H, Bloom O, Zhang M, *et al*. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425): 248 -251.

[4] 王忠堂，姚咏明，盛志勇. 高迁移率族蛋白 B1 的细胞核外作用[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(4)：673 -678.

[5] Andersson U, Erlandsson Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis[J]. J Intern Med, 2004, 255(3): 344 -350.

[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 382 -386.

[7] Andersson U, Wang H, Palmblad K, *et al*. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes[J]. J Exp Med, 2000, 192(4): 565 -570.

[8] Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, *et al*. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1[J]. Mol Med, 2003, 9(1 -2): 37 -45.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1927 页）

部组织软化，粘连得到充分松解，增强关节的稳定性。每天 1 次，每次 30 min，2 周为 1 疗程。

1.2.4 功能锻炼 ①端提运膝法：取仰卧位，将患肢膝关节由屈曲至伸膝位，并逐渐抬高而后再将膝关节屈曲，反复进行功能锻炼，即主动锻炼和被动治疗相结合，同时加强股四头肌锻炼，以增强股四头肌肌力，防止肌肉萎缩。②和膝摇摆法：取站立半屈膝位，双手环抱膝关节，腰臀部微向前屈，分别按顺时针方向摇摆数圈[2]，再按逆时针方向摇摆，使髌骨环形运动以滑利关节。然后将小腿用力向后蹬，将膝关节伸直，反复进行锻炼，以不疲劳为宜。

1.3 疗效标准

优：症状完全消失，膝关节功能恢复正常。良：膝关节功能接近正常，无疼痛及肿胀，行走自如，下蹲稍差。好转：膝关节稍有疼痛感，伴有轻微肿胀及活动受限，蹲起不便。差：症状与体征无改善。

2 结果

本组 60 例，按疗效评定标准为：优 42 例，占 70%；良 8 例，占 13.3%；好转 6 例，占 10%；差 4 例，占 6.7%。总有效率达 93.3%。

3 讨论

慢性膝关节滑膜炎多由外伤或慢性劳损所致。膝关节创伤后，滑膜充血肿胀，产生大量积液，其中含有血浆、红白细胞、吞噬细胞及纤维素[3]，随着积液的增多关节内压力增高，造成静脉及淋巴回流障碍，使滑膜组织代偿性吸收降低。当关节内酸性代谢产物堆积[4]，则使渗出液酸性变，长期刺激滑膜导致炎性反应。如果延误治疗或失治，关节滑膜则因长期慢性刺激和炎症反应而逐渐增厚，纤维化，引起粘连，影响膝关节正常活动。

玻璃酸钠是治疗膝关节骨性关节炎和滑膜炎较为理想的药物，它具有改善滑液组织炎性反应，提高滑液中玻璃酸钠含量，恢复关节滑液流变学的特性，可减轻滑膜炎症，缓解关节疼痛，改善关节功能且疗效持久。玻璃酸钠关节腔注射后迅速附着于关节表面，重新形成生物屏障，缓冲和润滑了关节软骨，从而起到保护作用，阻止了软骨基质降解酶对基质的损害，营养了软骨[5]，促进滑膜组织水肿消退，减少渗出，有利于滑膜组织无菌炎症的吸收。

祖国医学认为膝为筋之府，慢性膝关节滑膜炎属于"筋伤"、"痹症"范畴。根据中医气血理论，气与血之间关系是相互作用，相互影响。气为血之帅，血为气之母，气行则血行，气滞则血瘀。伤后元气耗损，逐渐由实转虚，风寒湿邪乘虚侵袭，痹阻于膝关节。内服膝痛灵具有滋补肝肾、益气活血、利水消肿之功效，有较好的消炎、止痛、解痉、退肿的作用。手法按摩以缓解为主，旨在疏通气血，消肿止痛。适宜的制动减少刺激，可使患膝得到充分休息，加速组织的修复，股四头肌锻炼，对增强下肢循环，防止肌肉萎缩，解除关节粘连，促进关节功能恢复与保持其稳定性具有重要作用，从而使淤血得化，疼痛得消，功能恢复。但本研究排除合并半月板撕裂、关节内游离体、前后交叉韧带损伤等需进行关节腔手术的患者。

关键词：膝关节慢性滑膜炎；玻璃酸钠；综合疗法

中图法分类号：R684.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 齐振熙. 点穴合四妙汤加味治疗膝关节创伤性滑膜炎 45 例[J]. 中国中医骨伤科杂志，1997，5(2)：25 -26.

[2] 李国衡. 膝关节慢性创伤性滑膜炎的治疗[J]. 中国中医骨伤科杂志，1987，3(3)：43 -44.

[3] 徐王湖，张铁钢，王 芳，等. 老年运动医学[M]. 北京：中国科学技术出版社，1998. 173 -174.

[4] 孙盛举. 膝关节创伤性滑膜炎的综合治疗[J]. 中国中医骨伤科杂志，1998，4(4)：19 -20.

[5] 田松云. 玻璃酸钠关节内注射治疗老年性膝关节骨性关节炎[J]. 中医正骨，1999，11(11)：20.

（编辑 栗 嘉）