论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0636-04

人源 LL-37 杀菌多肽的改建及原核细胞中表达

葛晓冬,刘友生,杨艳丽,邹 佳 (第三军医大学西南医院病理研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 改良人源杀菌肽 LL-37 的氨基酸序列,提高其杀菌力,并在原核细菌中表达。**方法** 应用蛋白质分析软件(Anthepro 5.0、SWISS-MODEL 等),对人源杀菌肽 LL-37 的氨基酸序列进行二维、三维结构及理化特性分析,将其中部分氨基酸残基进行替换,提高其正电荷,并以人源杀菌肽 LL-37 的基因序列为模板,进行相应的 DNA 序列替换,转入表达载体 pET-28a(+)于杆菌 BL21(DE3)中表达、纯化,并初步研究其抗菌性。**结果** 在维持 LL-37 空间构象不变的基础上,将 Glu^{16}、Asp^{26}、Glu^{36}分别替换为 Gln^{16}、Asn^{26}、Gln^{36},其静电荷由 pH 7.4 时的 +5.8 提高到 +9.0,并且其多肽 N 端疏水、C 端亲水的特性不变。通过 Touch-Down PCR 法,成功获得改良 LL-37 多肽的 DNA 序列,并将重组质粒 pET-28a(+)-rLL-37 在杆菌 BL21(DE3)中表达,改良 LL-37 多肽成功由强离子交换柱芯 Macro-Prep High S 纯化,并对 G^+、G^-菌具有一定的抗菌力。**结论** 将杀菌肽 LL-37 多肽进行氨基酸残基替换并以原核细胞进行融合型表达是可行的,为改良 LL-37 的大量制备及杀菌活性研究奠定了基础。

关键词: 人源杀菌肽 LL-37;蛋白质融合表达;强离子交换层析

中图法分类号: Q516; Q591.2; Q78 **文献标识码**: A

Reconstruction and expression of human cathelicidin LL-37 in procaryotic cell

GE Xiao-dong, LIU You-sheng, YANG Yan-li, ZOU Jia (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To reconstruct the proteinic sequence of human cathelicidin LL-37 to increase the bactericidal activity of LL-37 and to express the reconstructed LL-37 (rLL-37) in bacterium. **Methods** The two dimensional structure, three dimensional structure and chemical characteristic of LL-37 were analyzed by Soft Ware Anthepro 5.0 and SWISS-MODEL. Without the three dimensional changes of LL-37, some negative amino acids of human cathelicidin LL-37 were replaced by positive amino acids and the positive charge of LL-37 was increased. According to the proteinic sequence changes of rLL-37, the DNA sequence of rLL-37 was reconstructed by Touch-Down PCR and recombined with vector pET-28a (+), thus rLL-37 was expressed in *E. coli*. BL21 (DE3) by the induction of IPTG and was purified by chromatography. **Results** Glu^{16}, Asp^{26}, Glu^{36} of LL-37 were replaced by Gln^{16}, Asn^{26}, Gln^{36} and the static charge of LL-37 was increased from +5.8 to +9.0 at pH 7.4. The DNA sequence of rLL-37 was reconstructed and inserted into vector pET-28a (+), the rLL-37 was expressed in *E. coli*. BL21 (DE3) and purified by strong cation exchange supports Macro-Prep High S successfully. The rLL-37 was proved by the means of inhibitory zone to be able to kill Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. **Conclusion** It is feasible to reconstruct human cathelicidin LL-37 and express the protein in bacteria by fusion, which make it possible to produce more rLL-37 and study its biological function deeply.

Key words: human cathelicidin LL-37; confluent expression of protein; strong cation exchange chromatography

临床抗生素的广泛大量使用,导致严重的病菌耐药性问题。杀菌肽为一类广泛存在于许多生物中的内源性杀菌多肽。其 N 端富含碱性氨基酸残基,带有较强正电荷[1,2];C 端含疏水区,能直接插入细胞膜脂质双分子层,形成离子通道,通过"打洞"方式[3-5],使细菌死亡。目前国内窦非等[6,7]以大肠杆菌融合表达了 Ceropin 中的 CMIV 和 X 多肽,它们在体外具有较强的杀菌力。

人类唯一的 cathelicidin gene 所编码的蛋白质为 hCAP18 (human cationic antimicrobial protein 18),其中 $hCAP18_{104-140}$为长 37 个氨基酸残基的多肽 LL-37,具

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400426);西南医院创新基金资助项目(2002)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400426) and the Scientific Research Funds for Innovation by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002)

作者简介:葛晓冬(1971-),男,河北省保定市人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤病理学与蛋白质工程方面的研究,发表论文 7 篇。电话:13708362206

通讯作者:刘友生,电话:(023) 68757431, E-mail: Youshengliu660@hotmail.com

收稿日期:2005-11-28;修回日期:2006-01-24

有杀菌力，但 LL-37 在 135 ~ 145 mmol/L NaCl 的条件下失去杀菌力，另一方面 LL-37 的杀菌力也相对较弱，这是因为 LL-37 只拥有 +5.8 的净电荷，相对于猴、猪、鼠体内的同源蛋白的 +8 ~ +9 的净电荷低，因此杀菌力也较它们弱。最新从恒河猴中分离出的杀菌肽 RL-37 与人源 LL-37 同源性很高，但它具有 +8 的净电荷，其杀菌力也较 LL-37 强[8]。最近国外学者将 LL-37 的带负电荷的氨基酸残基全部进行替换，将 LL-37 的净电荷提高至 +11[9]，则杀菌力增强，并在175 mmol/L NaCl 的条件下保持杀菌力，但失去了与 LPS 结合的能力。本课题对 LL-37 进行改良，以计算机进行空间模拟，在维持其 α-螺旋结构的基础上，部分替换 LL-37 中带负电荷的氨基酸残基，将净电荷提高至 +9，增强其杀菌力，并维持与 LPS 的结合力，使其在 135 ~ 145 mmol/L NaCl 的条件下具有较强的杀菌力。

在本研究中，改良的 LL-37 将采用融合肽形式在原核细胞 BL21(DE3)中表达，当以凝血因子 Xa(FXa)酶切除 N 端的引导序列时，则 LL-37 的 N 端(带正电荷)碱性多肽区暴露，恢复其杀菌力。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂来源

强离子交换柱芯 Macro-Prep High S 购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司，pMD18-T 载体、*Ex Taq* 酶、*Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、Fxa 裂解试剂盒购自 TaKaRa 生物工程有限公司，BL21 菌、载体 pET-28a(+)及抗 6×His mAb(1922416)购自 ROCHE 公司，PCR 引物由上海生工合成。

1.2　人源杀菌肽 LL-37 的序列的改良及分析

应用蛋白质分析软件(Anthepro 5.0、SWISS-MODEL 等)进行二维、三维结构及理化特性分析，将其中部分氨基酸残基进行替换，提高正电荷。

1.3　人源改良杀菌肽 LL-37 的构建

1.3.1　编码改良杀菌肽 LL-37 的 DNA 序列的获得　　N 端引物：5′- AATATCGAAGGTCGCCTGCTGGGAGATTTCTTCAGAAAATCTAAGGAGAAGATCGGAAAGCAGTTCAAGAGAATCGTT -3′(含 *Sac* Ⅰ 酶切位点)，C 端引物：5′- TCTATTACTCTGAGTTCTAGGAACCAGATTTCTCA GGAAGTTCTTGATTCTTTGAACGATTCTCTTGAACTGCTT -3′(含 *Hind* Ⅲ 酶切位点)。以 Touch-Down PCR 法进行扩增。PCR 条件为：1 个循环(94℃ 2 min)、2 个循环(94 ℃ 40 s、65 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s)、1 个循环(72 ℃ 2 min)。

1.3.2　改良杀菌肽表达质粒的构建　　将改良杀菌肽 LL-37 的 DNA 序列经 1.7% 凝胶电泳、纯化，以连接试剂盒(DNA ligation Kit Ver 2.0, TaKaRa)连接入 pMD18-T 载体(16 ℃ 连接 3 h)，转入感受态 DH5α 菌中，铺 LB 板(含 X-gal 0.04 mg/ml、IPTG 0.024 mg/ml、Amp 0.1 mg/ml)进行蓝白斑筛选。白色单菌落进行测序，测序正确的单菌落进行扩增、抽提质粒，并进行双酶切(*Sac* Ⅰ 及 *Hind* Ⅲ 在中盐条件下，于 37 ℃ 切 3 h)、凝胶电泳和纯化。纯化后的目的片段与同样处理的载体 pET-28a(+)连接，转入 DH5α 菌中，铺 LB 板(含 Amp 20 mg/ml)进行抗性筛选，阳性菌落进行测序鉴定，正确的单菌落进行扩增、抽提质粒，并将质粒电转入表达菌 BL21(DE3)中。

1.4　改良杀菌肽 LL-37(rLL-37)的表达及纯化

将含有目的质粒的 BL21(DE3)菌在 *D*(600) 0.6 ~ 0.8 时，以 IPTG 1 mmol/L 诱导在 LB 培养基中表达，表达时间为 3、6、9、12 h，寻找最佳表达时间点，并与空 BL21(DE3)菌及含有空载体 pET-28a(+)菌进行比较。将表达 BL21 菌进行反复冻融、溶菌酶处理及超声粉碎，提取其可溶性蛋白质及包涵体。将可溶性蛋白质及溶解后的包涵体分别以强离子交换柱芯 Macro-Prep High S 进行梯度纯化，条件为：平衡液 1 × PBS 液(含 NaCl 10 mmol/L pH 8.4)，洗脱 A、B、C、D 液分别为含 NaCl 220、350、500、1 000 mmol/L 的 1 × PBS 液。各个洗脱蛋白质峰分别回收、脱盐、冻干并进行 Western blotting 等鉴定。

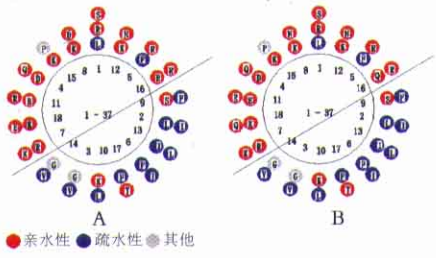
1.5　改良杀菌肽 LL-37(rLL-37)杀菌活性的初步研究

按文献[10]的方法，将融合表达的 rLL-37 以 FXa 进行酶切，并调 NaCl 浓度至 140 mmol/L、pH 为 7.4，进行抑菌圈试验。

2　结果

2.1　人源杀菌肽 rLL-37 的序列的改良及分析

将原人源 LL-37 多肽序列：LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES 替换为 LLGDFFRKSKEKIGKQFKRIVQRIKNFLRNLVPRTQS，rLL-37 的阳电荷明显提高，其正电荷由 pH 7.4 下的 5.8 提高到 9.0，等电点由 11.1 提高到 12.3，并保持了 LL-37 多肽的螺旋结构(图 1)、三维结构及 N 端亲水极性和 C 端疏水极性不变。



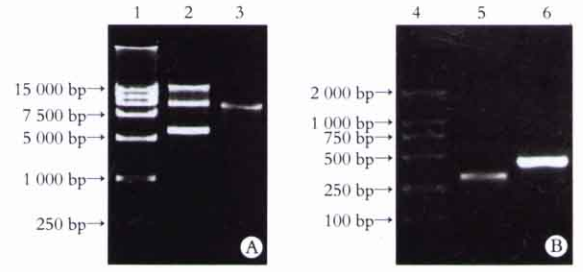
A：LL-37；B：rLL-37

图 1　人源 LL-37 多肽及改良后人源 LL-37 多肽的螺旋结构

2.2　改良杀菌肽 rLL-37 的 DNA 序列的构建

采用 Touch-Down PCR 方法，获得了目的 DNA 序列(长约 140 bp)，将其转入 T 载体及表达载体 pET-28a(+)中，获得含目的片段的质粒 pET-28a(+)-rLL-37，经凝胶电泳鉴定(图 2 第 2 带)，其长度约为 5 500 bp，与设计的含目的片段质粒的长短相近(为 5 488 bp)，将质粒以 *Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 进行双酶消化，切下长约 140 bp 的片段，与设计的 rLL-37 的碱基序列长度相等。进一步以质粒 pET-28a(+)-rLL-37 和空质粒 pET-28a(+)为模板，以引物(T7 promoter primer 和 T7 terminator primer)进行 PCR 扩增，分别获得长为 437 bp 和 318 bp 的条带(图 2

第5、6带),证明pET-28a(+)/human rLL-37含有外源片段,经DNA序列测定证明DNA序列正确。

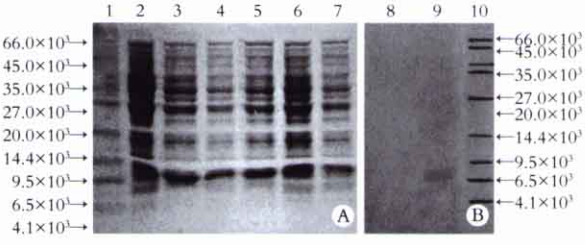


A:目的片段酶切鉴定;B:目的片段PCR鉴定
1:DNA标准;2:重组质粒pET-28a(+)-rLL-37(从菌体内抽出,含线型、环型、超螺旋3种状态);3:重组质粒pET-28a(+)-rLL-37以*Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ进行消化;4:DNA标准;5:以质粒pET-28a(+)为模版,用T7启动子和T7终止子为引物进行PCR扩增;6:以pET-28a(+)-rLL-37为模版,用T7启动子和T7终止子为引物进行PCR扩增

图2 含目的片段质粒pET-28a(+)-rLL-37的酶切及PCR鉴定

2.3 改良杀菌肽LL-37多肽的表达及纯化

含目的片段的重组质粒pET-28a(+)-rLL-37在杆菌BL21(DE3)中用IPTG诱导表达,发现表达第9小时的表达量最高(图3第5带),表达出相对分子量约为8.1×10^3的融合蛋白质(含载体部分片段及改良LL-37多肽),与预期值相同。将空BL21菌和含目的质粒的BL21菌诱导表达后,进行针对6×His的Western blotting鉴定,可见含目质粒的BL21菌蛋白中有黄色条带,其相对分子量约为8×10^3,证明为外源表达蛋白质(图3第9带)。将表达的可溶性蛋白质以强离子交换柱芯Macro-Prep High S进行离子交换梯度纯化,发现在以220 mmol/L NaCl洗下的蛋白质中含有融合表达的rLL-37片段,并以FXa进行酶切。

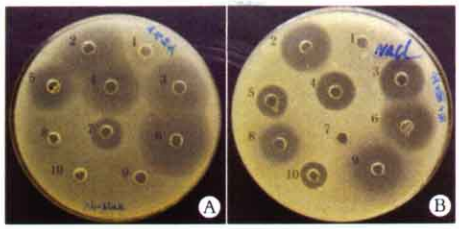


A:蛋白质Tricine-SDS-PAGE;B:蛋白质Western blotting
1:蛋白质标准;2:空BL21以IPTG诱导表达后的全菌蛋白;3-6:含pET-28a(+)-rLL-37的BL21以IPTG诱导表达3、6、9、12 h的全菌体蛋白;7:含空质粒pET-28a(+)的BL21菌以IPTG诱导表达后的全菌蛋白;8:空BL21菌体蛋白的Western blotting;9:含pET-28a(+)-rLL-37的BL21菌以IPTG诱导表达9 h的全菌体蛋白;10:转PVDF膜后蛋白质标准

图3 蛋白质Tricine-SDS-PAGE及Western blotting鉴定

2.4 改良杀菌肽rLL-37的初步杀菌活性检测

抑菌圈试验证实rLL-37肽抗生素对革兰阴性菌XL1-blue和革兰阳性菌金黄色葡萄球菌都具有较好的抑菌力。rLL-37对金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的抑菌作用明显优于氨苄青霉素,对XL1-blue菌的抑菌作用明显优于克林霉素(图4)。



A:G^-大肠杆菌XL1-blue;B:G^+菌金黄色葡萄球菌
1:0.9% NaCl对照;2-5:0.5、0.25、0.125、0.062 5 μg/ml rLL-37;6:琥乙红霉素0.5 μg/ml;7:氨苄青霉素0.5 μg/ml;8:左氧氟沙星0.5 μg/ml;9:万古霉素0.5 μg/ml;10:克林霉素0.5 μg/ml

图4 rLL-37对金黄色葡萄球菌及G^-大肠杆菌XL1-blue的杀菌试验

3 讨论

本试验成功地应用蛋白质分析软件(Anthepro 5.0及SWISS-MODEL),对人源杀菌肽进行了二维、三维结构及其理化特性分析,将其中部分氨基酸残基进行替换($Glu^{16}\rightarrow Gln^{16}$、$Asp^{26}\rightarrow Asn^{26}$、$Glu^{36}\rightarrow Gln^{36}$),其阳电荷由pH 7.4下的5.8提高到9.0,等电点由11.1提高到12.3,并且其N端亲水、C端疏水及螺旋结构的特性不变,在抑菌研究中,已证明改良rLL-37多肽在135~145 mmol/L NaCl的条件下具有明确的杀菌性,而LL-37不具有,说明通过计算机分析是可行的。我们还需详尽的研究rLL-37的抗菌谱和生物学活性,并研究其与内毒素(LPS)结合力的改变。

通过将目的片段放入表达载体pET-28a(+)中进行融合性表达,细菌BL21(DE3)能比较正常生长和表达融合目的蛋白质,证明在融合蛋白质中改良rLL-37的杀菌力受到一定的抑制,对表达宿主菌无严重的直接杀伤作用。强离子交换柱芯Macro-Prep High S对表达的可溶性融合蛋白质进行了有效的纯化,纯化的融合蛋白质经FXa酶切后,将改良rLL-37多肽释放,rLL-37多肽具有较强的杀菌力,证明这种利用杆菌表达杀菌肽的方法是可行的。

融合表达的rLL-37多肽其N端带有载体pET-28a(+)所编码的6×His,因此我们曾尝试以针对6×His的TALON亲和纯化柱芯(Cat. 8908-2, Clontech)对融合蛋白进行纯化,但发现无法进行有效的纯化,融合蛋白质不与柱芯结合,分析原因可能是融合多肽在pH 7.4时仍带有约8.3的阳电荷,因此与TALON柱芯上

的CO^{2+}相排斥，影响了融合多肽中的6×His肽序列与CO^{2+}结合，从而无法有效纯化。

我们计划在此研究的基础上，在编码rLL-37多肽的DNA序列的N端加上1个负电荷的多肽（pH 7.4时净电荷为 - 5.0）序列，并使用编码带负电荷引导蛋白的表达载体pET-30a(+)（pH 7.4时所编码引导蛋白净电荷约为 - 2.0）进行融合表达，使得融合多肽的电荷由pH 7.4下的9.0降到2.0，利于采用TALON亲和纯化柱芯进行纯化。另一方面，由于融合蛋白净电荷的降低，必将进一步降低rLL-37多肽对表达宿主菌BL21的损害，从而有可能进一步提高rLL-37多肽的制备效率。

参考文献：

[1] HANCOCK R E, DIAMOND G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences [J]. Trends Microbiol, 2000, 8(9): 402 - 410.

[2] LEHRER R I, GANZ T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides [J]. Curr Opin Hematol, 2002, 9(1): 18 - 22.

[3] HASE K, ECKMANN L, LEOPARD J D, *et al*. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium [J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 953 - 963.

[4] NIYONSABA F, IWABUCHI K, SOMEYA A, *et al*. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis [J]. Immunology, 2002, 106(1): 20 - 26.

[5] NIZET V, OHTAKE T, LAUTH X, *et al*. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection [J]. Nature, 2001, 414(6862): 454 - 457.

[6] 袁榴娣，窦 非，梁玉璞，等. 含有FXa切割位点的抗菌肽X在大肠杆菌中的融合表达[J]. 生物工程学报，2000，16(3)：411 - 414.

[7] 窦 非，谢 维，董雪吟，等. 抗菌肽CMIV末端结构对其活性的影响[J]. 中国科学（C辑），2000，30(1)：59 - 64.

[8] NAGAOKA I, KUWAHARA-ARAI K, TAMURA H, *et al*. Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions [J]. Inflamm Res, 2005, 54(2): 66 - 73.

[9] BOWDISH D M, DAVIDSON D J, SCOTT M G, *et al*. Immunomodulatory activities of small host defense peptides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5): 1727 - 1732.

[10] HASE K, MURAKAMI M, IIMURA M, *et al*. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori* [J]. Gastroenterology, 2003, 125(6): 1613 - 1625.

[11] SCHALLER-BALS S, SCHULZE A, BALS R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(7): 992 - 995.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2006)07-0639-01

个案与短篇

^{32}P胶体治疗舌根部血管瘤1例

罗朝学，李前伟，黄定德，陈 杰 （第三军医大学西南医院核医学科，重庆 400038）

患者，女，23岁，近2年来，常吞咽困难，咽异物感，偶有咯血，自疑有食管或肺部肿瘤，多方求医治疗无效。2002年8月到我院就诊，X线胸片未见异常，后到耳鼻喉科，喉镜检查发现其舌根部有一暗红色包块，约1.5 cm×1.5 cm大小，诊断为混合型血管瘤。患者不愿手术，激光治疗也不便施行。耳鼻喉科遂推荐患者到我科诊治，经认真检查后，医师认为可用^{32}P胶体注射治疗。用注射器准确吸取^{32}P磷酸铬胶体0.3 ml（555 kBq/0.1 ml），取药后，将针头折弯，在耳鼻喉科医师协助下，严格无菌操作。由于注射过程中患者屡有恶心，经多次尝试，终于完成了瘤体内多点分层注射。干棉签止血后，交代注意事项，患者随后离院。4个月后复查，患者吞咽困难症状减轻，咯血症状消失，检查见原瘤体明显缩小，变平，颜色变淡。同前法继续^{32}P胶体注射治疗2次后，患者自觉症状完全消失，查体见血管瘤部位除颜色较周围略深外，已与周围平齐。经2年随访，患者未觉明显不适，原瘤体尚有少许色素沉着，临床认为痊愈。

讨论

血管瘤是一种多发病、常见病，通常长在体表，但也有部分病例长在特殊部位。治疗方法可选择手术、激光、冷冻、注射硬化剂、热凝固疗法、电灼、同位素敷贴等[1]。^{32}P半衰期为14.3 d，发射纯β线，该射线生物效应高，穿透力弱，在组织内最大射程3.8 ~ 8.0 mm，对瘤体照射剂量大，使瘤体血管纤维化，对周围组织照射剂量小。另外，放射性胶体颗粒大，不易被吸收，不会造成远处扩散。采用^{32}P胶体作表浅血管瘤注射治疗，具有疗效好、疗程短、无创伤、不复发、不留瘢痕、无不良反应等优点。在人体一些特殊部位（如巩膜、眼睑、鼻尖、舌、唇、足跟等）更显示出其优越性。舌根部血管瘤少见，我们与耳鼻喉科协作，通过^{32}P胶体行局部注射治疗3次，成功治愈了该例患者。值得注意的是，特殊部位血管瘤行^{32}P胶体瘤体治疗时，应邀请相关专科医生到场协助，以免发生意外。

关键词：^{32}P胶体；舌根；血管瘤
中图法分类号：R739.86 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张奇亮. 敷贴治疗核医学[M]. 济南：济南出版社，2004：35.

（编辑 汪勤俭）

作者简介：罗朝学（1971 - ），男，四川省南充市人，硕士，讲师，主要从事肿瘤核医学诊断与治疗方面的研究。电话：(023)68765434

收稿日期：2006-02-18；修回日期：2006-03-07