文章编号:1000-5404(2006)08-0753-04

论著

甘氨酸/丝氨酸置换146位半胱氨酸对sBAFF功能的影响

黄 刚,何凤田,李蓉芬,高会广,陈麟凤,张 立,胡大强 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨甘氨酸/丝氨酸置换146位半胱氨酸对sBAFF功能的影响,为深入探讨sBAFF的功能和机制奠定基础。**方法** 采用一步反向PCR法,将编码sBAFF第146位半胱氨酸(Cys)的核苷酸序列置换为甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的编码序列,测序正确后,亚克隆到高效原核表达载体pQE-80L;以IPTG诱导表达,SDS-PAGE和Western blot检测表达产物,Ni^{2+}-NTA柱层析纯化目的蛋白;最后经MTT法检测其促B淋巴细胞增殖活性。**结果** 经一步反向PCR扩增后均得到459 bp的DNA片段,经测序分析表明分别为sBAFF第146位半胱氨酸残基点突变为甘氨酸和丝氨酸的序列,目的蛋白在大肠杆菌中得到高效表达。活性检测证实其能明显刺激B淋巴细胞系Raji细胞增殖,与正常sBAFF相比,置换为丝氨酸后活性升高,置换为甘氨酸后活性无明显改变。**结论** 在原核表达时,通过置换146位半胱氨酸为丝氨酸可明显提高sBAFF的活性,为进一步探讨sBAFF的功能机制奠定了基础。

关键词: TNF家族的B细胞激活因子(BAFF);cDNA克隆;原核表达;蛋白纯化;细胞活化
中图法分类号: Q51;Q517;Q785 **文献标识码:** A

Influence of Gly/Ser replacing Cys at 146 site on soluble B cell activating factor function

HUANG Gang, HE Feng-tian, LI Rong-fen, GAO Hui-guang, CHEN Lin-feng, ZHANG Li, HU Da-qiang (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of Gly/Ser replacing Cys at 146 site on soluble B cell activating factor (sBAFF) function. **Methods** Glycine and Serine replaced the N-146 amino acid residue by one-step opposite direction PCR. After sequenced, the cDNA was cloned into the prokaryotic expression vector pQE-80L. The mutants were expressed in *E. coli.* induced by IPTG and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The protein was purified with Ni^{2+}-NTA chromatography. The activity of the purified proteins was assayed by MTT. **Results** Two 459 bp DNAs were amplified by one-step opposite direction PCR, which were the two-locus mutants at N-146 of human sBAFF. The recombinated human sBAFF mutants were highly expressed in *E. coli.*. The purified protein could efficiently activate the Raji cells. As compared with normal sBAFF, high activity was observed in the mutants with replaced Ser, but not in that with replaced Gly. **Conclusion** In prokaryotic expression, Ser replacing Cys obviously improves the activity of sBAFF, which may pave the way for further studies of sBAFF function.

Key words: B cell activating factor; cDNA cloning; prokaryotic expression; protein purification; activation of lymphocytes

B细胞激活因子(B cell activating factor, BAFF),是TNF超家族成员[1,2],全长285个氨基酸,主要表达于髓样单核细胞系,其受体表达在B细胞膜表面。BAFF有膜结合型和可溶性两种形式,可溶性形式由蛋白酶在133位氨基酸水解形成,为其发挥功能的主要区域,二者生物学活性基本一致。生理情况下,BAFF可诱导B淋巴细胞增殖、分化、存活延长及刺激免疫球蛋白分泌[1,3]。在病理情况下,BAFF过表达与系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎(RA)及干燥综合征(Sjögren's syndrom, SS)等多种自身免疫性疾病的发生和发展有密切关系,其水平与这些疾病的严重程度相关[4-6]。因此,研究BAFF结构和功能的关系对于阐明BAFF的生理、病理作用机制有着重要意义。在制备sBAFF时,有报道将146位Cys置换为Val可提高其活性[7],但如果置换成Gly、Ser结果会如何呢?鉴于此,本研究对此进行了探讨。结果表明,将146位Cys置换为Ser可明显提高其活性,而置换成Gly后其活性改变不明显。该实验结果为深入研究BAFF的功

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370319, 30400187);重庆市自然科学基金资助项目(2005BB5029)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370319, 30400187) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5029)
作者简介: 黄 刚(1979-),男,四川省达州市人,硕士研究生,助教,主要从事分子设计改建方面的研究。电话:(023)68752263
通讯作者: 何凤田,电话:(023)68752262, E-mail:hefengtian66@yahoo.com.cn
收稿日期: 2005-10-19;**修回日期:** 2005-12-25

能和采用原核系统制备高活性的 sBAFF 创造了条件。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

PCR 引物由上海生工公司合成;PCR 突变试剂盒为大连宝生生物公司产品;PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品;限制性核酸内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ及 T_4 连接酶购自大连宝生生物公司;质粒 pUC19/sBAFF(含 $BAFF_{134\text{-}285}$ cDNA)、大肠杆菌 DH5α 以及原核表达载体 pQE-80L 由本室保存;抗 His 单抗和 Ni^{2+}-NTA 层析系统购自德国 Qiagen 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 为北京中杉公司产品;胎牛血清为 GiBco 公司产品;MTT 为 Promega 公司产品。

1.2 sBAFF 突变体 cDNA 的克隆

根据 GenBank 中编码人 sBAFF 的 cDNA 序列,以本室构建的质粒 pUC19/sBAFF 为模板,在欲突变部位的两侧沿相反方向设计特异的一步反向 PCR 引物,以替换编码 146 位半胱氨酸的核苷酸序列为甘氨酸(GGG)、丝氨酸(TCC),上游引物依次为 5′-GGGTTGCAACTGATTGCAGAC- 3′, 5′-TCCTTGCAACTGATTGCAGAC- 3′(划线部分为甘氨酸、丝氨酸目的突变序列),下游通用引物为 5′-GTCTTGAGTGACTGTTTCTTC- 3′。按 PCR 突变试剂盒的说明进行一步反向 PCR 扩增,分别点突变第 146 位半胱氨酸为甘氨酸(G)、丝氨酸(S)。反应完成后,取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳观察并记录结果。其余 PCR 产物行胶回收存 -20 ℃。

1.3 序列测定

将胶回收的一步反向 PCR 产物按突变试剂盒说明进行平末端磷酸化、连接后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选获得阳性重组子,提取质粒,经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切鉴定获得重组质粒,阳性质粒分别命名为 pUC19/ sB-G, pUC19/sB-S,序列测定由上海博亚公司完成。

1.4 高效表达质粒的构建

经测序证实后,以 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ酶切质粒 pUC19/sB-G、pUC19/sB-S 及高效原核表达载体 pQE-80L,回收目的片段并连接,再转化至大肠杆菌 DH5α,经质粒提取和酶切鉴定,得到重组原核表达质粒 pQE-80L/sB-G, pQE-80L/sB-S。

1.5 蛋白的诱导表达及 Western 鉴定

挑取含重组原核表达质粒 pQE-80L/sB-G, pQE-80L/sB-S 的单菌落于 3 ml LB 培养液中,37 ℃振荡过夜培养,次日以 1% 接种到 5 ml 含 Ap 的 LB 中继续振荡培养至 $D(600)$ 为 0.6 ~ 0.8 时,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 ℃继续培养 4 h,诱导目的蛋白的表达。诱导表达的产物经 SDS-PAGE 分析,然后以 Western blot 检测:将 SDS-PAGE 产物半干法电转移至硝酸纤维素膜上,然后依次经 3% BSA 室温封闭 2 h,抗-His 单抗(稀释 1 000倍)孵育 1 h,洗涤后加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(稀释 500 倍)孵育 1 h,洗膜后加 DAB 避光显色。其间每步完成后均严格洗膜。

1.6 重组蛋白的分析及纯化

将小量表达的蛋白离心后收集细菌,对细菌进行超声破碎后,再离心并分别收集上清液和含包涵体的沉淀,取小量煮沸后分别行常规 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达部位及表达水平。

将含重组质粒 pQE-80L/sB-G、pQE-80L/sB-S 的表达菌在含 Ap 的 500 ml LB 大量表达(方法同 1.5),离心收集细菌、超声碎菌后,离心沉淀包涵体。先用缓冲液 A(8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH_2PO_4、0.01 mol/L Tris-HCl pH 8.0)裂解包涵体,裂解上清过 Ni^{2+}-NTA 层析柱,再依次用缓冲液 A 和缓冲液 B(8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH_2PO_4、0.01 mol/L Tris-HCl pH 6.3)洗柱,直至 $D_{(280)}$ 小于 0.001;最后用缓冲液 C(含 250 mmol/L 咪唑的缓冲液 B)洗脱目的蛋白。对收集的目的蛋白行 SDS-PAGE 分析,并采取逐步降低尿素浓度的方法,透析除去纯化蛋白溶液中的尿素,使变性的目的蛋白在此过程中自然复性,从而得到纯化的重组人 sB-G、sB-S 蛋白。经 SDS-PAGE 电泳分析纯化蛋白纯度,再经紫外分光光度计检测蛋白浓度,最后冻干保存。

1.7 sBAFF 突变体的生物学活性检测

培养非何杰金氏淋巴瘤 Raji 细胞至对数生长期时,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将淋巴细胞稀释成 1×10^5/ml 悬液,按每孔 100 μl 细胞悬液和 4 μl anti-IgM 加入 96 孔细胞培养板,然后分别加入不同浓度的 sBAFF、sB-G 和 sB-S(终浓度依次为 0 μg/μl、0 μg/μl + 4 μl anti-IgM、0.5 μg/μl、1.0 μg/μl、2.0 μg/μl、4.0 μg/μl、8.0 μg/μl、16 μg/ml),以无关蛋白二氢叶酸还原酶(DHFR)为对照,每组设 3 个复孔,37 ℃、5% CO_2 培养 50 h,最后用 MTT 法检测蛋白活性。

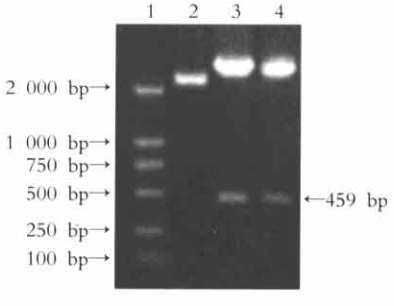
1.8 统计学方法

采用单因素方差分析及均数间多重比较及相关分析。

2 结果

2.1 一步反向 PCR 法获得 sBAFF 第 146 位氨基酸残基突变体

采用一步反向 PCR 法扩增后,经质粒提取和酶切鉴定均得到 459 bp 的 DNA 片段(图 1)。序列测定结果表明各序列依次为将 sBAFF 146 位半胱氨酸突变为甘氨酸(G)、丝氨酸(S)后的序列,与实验设计完全一致。



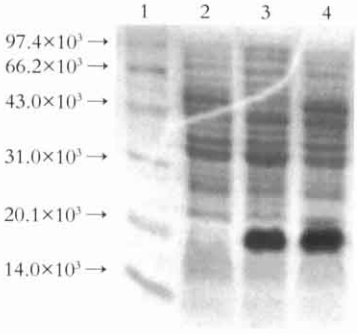
1: DNA 标准 DL2000; 2: 质粒 pUC19; 3,4: 重组质粒 pUC19/ sB-G、pUC19/ sB-S /经 *Kpn* Ⅰ + *Hind* Ⅲ酶切

图 1 质粒 pUC19/sB-G、S 酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 重组人 sBAFF 突变体的原核表达及鉴定

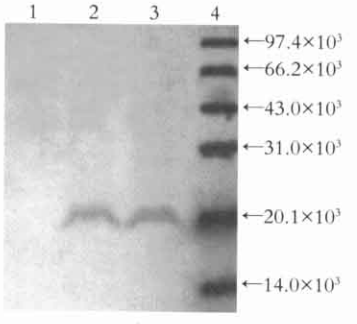
将构建成功的重组原核表达质粒 pQE-80L/sB-G、pQE-80L/sB-S,转化至大肠杆菌 DH5α 后,以 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE,结果显示所表达的目的蛋白相对分子质量约为 20×10^3(图 2),在菌体内主要以包涵体形式存在。凝胶扫描显示 sB-G、sB-S 目的蛋白表达量依次占菌体总蛋白的 36.8%, 38.2%,表明 sB-G, sB-S 在大肠杆菌中获得了高效表达。Western blot 鉴定显示,经 IPTG 诱导的含重组表达质粒 pQE-80L/

sB-G、pQE-80L/sB-S 的菌体裂解物均能与抗 His 单抗特异性反应，在分子量约 20×10^3 处呈现单一条带，结果如图 3。



1：低分子量蛋白标准；2：pQE-80L/ DH5α 中经 IPTG 诱导 4 h 后；3,4：pQE-80L/sB-G，pQE-80L/sB-S 在 DH5α 经 IPTG 诱导 4 h 后

图 2　SDS-PAGE 分析 sBAFF 突变体的表达



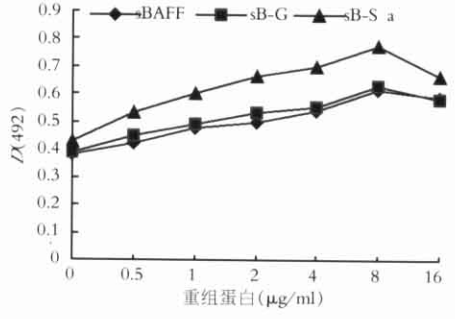
1：pQE-80L/ DH5α 经 IPTG 诱导 4 h 后；2，3：pQE-80L/sB-G，pQE-80L /sB-S 在 DH5α 中经 IPTG 诱导 4 h 后；4：低分子量蛋白标准

图 3　Western blot 分析 sBAFF 突变体的表达

2.3　目的蛋白的纯化及功能鉴定

表达蛋白经 Ni^{2+}-NTA 层析纯化及分步透析复性[8]后行 SDS-PAGE，结果仅在分子量约 20×10^3 处见单一条带。

MTT 实验所得结果如下（图 4），表明所制备的重组人 sB-S 具有明显刺激 Raji 细胞的生物学活性且高于野生型 sBAFF（$P<0.05$），sB-G 具促增殖活性但与 sBAFF 活性无明显差距，而阴性对照、无关蛋白 DHFR 及单独加入抗 IgM 的细胞无明显促增殖活性。



a：$P<0.05$，*vs* sBAFF

图 4　MTT 法检测 sBAFF、sB-G、sB-S 的生物学活性

3　讨论

TNF 超家族成员 BAFF 作为一种配体蛋白，通过与其受体结合而发挥生物学作用，当它们与相应的受体结合后，诱导 B 淋巴细胞增殖、分化、存活延长及刺激 IgA、IgG 等分泌，产生生物学效应。研究表明，BAFF 缺乏与免疫功能低下有关，例如在 BAFF 缺陷小鼠，外周 B 细胞显著减少，几乎没有成熟滤泡型和边缘带脾细胞生成，剩余的 B 细胞大多与 T1 过渡型 B 细胞类似，几乎完全没有即将发育为 B 细胞的 T2 表型细胞，同时能够再循环的成熟 B 细胞群消失[9,10]；另一方面，BAFF 过表达则与自身免疫性疾病有关[4]。通过对 BAFF 结构分析，BAFF 在 N 端第 146、232、245 位有 3 个半胱氨酸残基，后两个半胱氨酸残基形成链内二硫键，第 146 位半胱氨酸残基为游离半胱氨酸，该游离半胱氨酸在蛋白表达翻译后进行折叠时，可能会与 232 或 245 位半胱氨酸残基形成二硫键错配，改变蛋白质的结构而影响 sBAFF 的功能。有学者证实，将第 146 位半胱氨酸残基突变为缬氨酸后，得到的蛋白活性较野生型 sBAFF 明显升高[7]。如果突变成其他氨基酸后，sBAFF 的活性会如何呢？鉴于以上原因，为进一步探讨 BAFF 的结构与其功能关系，我们将 sBAFF N 端第 146 位半胱氨酸残基突变为两个空间位阻小的柔性氨基酸：非极性疏水性的甘氨酸和极性中性的丝氨酸，以探索研究其功能。实验结果表明，突变体蛋白 sB-G、sB-S 均具有较高的生物学活性。其中重组蛋白 sB-S 的促细胞增殖活性高于野生型 sBAFF 蛋白，而重组蛋白 sB-G 的促细胞增殖活性与野生型 sBAFF 蛋白无明显差异，其是否与这两个氨基酸结构及性质有关还需进一步证实。将 146 位半胱氨酸残基替换为其他氨基酸对 sBAFF 活性是否有改变尚需进一步确证。

目前，对 BAFF 的结构与其功能关系的研究是一热点，而在 BAFF 与肿瘤形成和发展的关系方面少有报道，考虑到分离 B 淋巴细胞过程较烦琐并且不易得到纯的 B 细胞，而影响实验结果的准确性，因此在检测重组蛋白活性时我们选取了非何杰金氏淋巴瘤 Raji 细胞[11]。本研究结果，为进一步揭示 sBAFF 结构与功能及作用机制的关系提供了新的资料，亦为制备高活性重组人 sBAFF 奠定了初步基础。

参考文献：

[1] ZHANG X, PARK C S, YOON S O, *et al*. BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors [J]. Int Immunol, 2005, 17(6): 779 - 788.

[2] MUKHOPADHYAY A, NI J, ZHAI Y, *et al*. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that acti-

vates apoptosis, nuclear factor - kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(23): 15978 - 15981.
[3] ROLINK A G, TSCHOPP J, SCHNEIDER P, *et al*. BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(7): 2004 - 2010.
[4] RAMANUJAM M, DAVIDSON A. The current status of targeting BAFF/BLyS for autoimmune diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(5): 197 - 202.
[5] MACKAY F, SIERRO F, GREY S T, *et al*. The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases[J]. Curr Dir Autoimmun, 2005, 8: 243 - 265.
[6] MARIETTE X, ROUX S, ZHANG J, *et al*. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(2): 168 - 171.
[7] CHEN G, PENG S, ZHOU M, *et al*. Construction and function of two Cys146-mutants with high activity, derived from recombinant human soluble B lymphocyte stimulator[J]. J Biochem (Tokyo), 2004, 136(1): 73 - 79.
[8] 吉 清, 钟小林, 高会广, 等. B细胞活化因子的纯化和复性参数的优化研究[J]. 重庆医学, 2005, 34(1): 87 - 89.
[9] KHARE S D, SAROSI I, XIA X Z, *et al*. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3370 - 3375.
[10] WANG H, MARSTERS S A, BAKER T, *et al*. TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice[J]. Nat Immunol, 2001, 2(7): 632 - 637.
[11] KLEIN B, TARTE K, JOURDAN M, *et al*. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells[J]. Int J Hematol, 2003, 78(2): 106 - 113.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)08-0756-01

^{131}I合并局部激素注射治疗甲亢伴胫前粘液性水肿1例

罗朝学,黄定德,刘开元 (第三军医大学西南医院核医学科 重庆,400038)

1 临床资料

患者,女性,53岁。因多食易饥、心悸胸闷、畏热多汗、消瘦乏力6个月,于2002年5月在外院诊为"甲亢",规则服用抗甲状腺药物2年后症状消失,遂自行停药。4个月后上述症状再度出现,来我院就诊。查体:消瘦貌,颜面及双眼睑无明显浮肿,双眼轻度突,甲状腺Ⅱ度,质软,表面光滑,未触及结节及震颤,心率108次/min,律齐,皮肤潮热,双手细震颤(+)。双小腿胫前可见弥漫性水肿,较正常皮肤略黄,边界较清楚,表面凹凸不平,毛孔粗大,皮肤增厚变粗,桔皮样外观,压之无凹陷,无压痛。右小腿胫前可见一约5 cm×4 cm大小暗紫色包块,明显高于周围皮肤,质稍硬,无压痛,非凹陷性,无破溃,皮温不高,皮肤感觉无异常。实验室检查(括号内为我院正常参考值):T_3 7.07(0.5~2.2) ng/ml, FT_3 56.36(3.2~9.3) pmol/L, T_4 282.22(50~126) nmol/L, FT_4 >120(8.56~25.8) pmol/L, TSH<0.15(0.34~5.6) μIU/L。甲状腺吸碘功能试验:3 h 33.2%, 24 h 68.7%, 96 h 71.5%。甲状腺显像:甲状腺体积明显增大,血供丰富,摄取功能增强,未见明显占位征象。诊断:甲亢(Graves'病)伴胫前黏液性水肿,予口服泼尼松30 mg/d,地塞米松20 mg局部皮下多点、多方向、分层注射,隔日1次。我科予患者口服^{131}I 4.5 mCi,服药前交代注意事项,同时予以口服他巴唑、心得安、利可君片辅助治疗。两周后患者双小腿水肿减轻,包块缩小,颜色变淡。泼尼松、地塞米松逐渐减量,3个月后双小腿水肿消失、包块进一步消退。此后,每月门诊随诊1次,观察1年,水肿未复发,包块略有缩小。6个月后,患者所有甲亢症状消失,除突眼无明显改善外,其余体征恢复正常,各检查指标在正常范围,提示甲亢治愈。

2 讨论

^{131}I治疗甲亢,一次治愈率超过80%,有效率在95%以上,复发率仅为1%~4%,仅少数患者需第2次治疗[1],因此在美国,凡年龄大于21岁的甲亢患者,均首选^{131}I治疗[2]。但如^{131}I用量过大,会导致甲低这一并发症;如用量偏小,则甲亢不能彻底治愈。本例患者经我科治疗后,甲亢获得痊愈,表明用药适当。胫前黏液性水肿(pretibial myxedema, PM)病例相对较少,起病隐袭,无特异性,为首发或唯一症状时容易误诊[3]。因此对以浮肿为主要表现的患者应详细询问病史,充分考虑多个诊断,给予全面、系统的检查,排除心、肝、肾疾病。甲亢患者PM发生率约为5%,临床上较为少见[2]。其发生机制尚不完全清楚,临床上缺乏特效治疗方法,因而水肿伴发的斑块或包块可长期存在。因我科无病房,患者住皮肤科,既便于治疗粘液性水肿,也便于在^{131}I治疗后出现意外时及时救治。皮肤科利用激素的抗炎、免疫抑制作用治疗患者胫前黏液性水肿,经随访1年余,疗效较理想,表明该措施有效,现仍在随访中。值得注意的是,激素能加速局部蛋白分解、引起局部皮肤变薄和肌肉萎缩,因此不宜长期使用,同时还应加强保护局部皮肤,避免感染和外伤。

关键词:碘放射性同位素;激素;Graves'病;黏液性水肿
中图法分类号:R817.5 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 尹伯元. 临床核素治疗学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 77.
[2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 729 - 733.
[3] 姚永明. 甲状腺功能亢进性水肿19例误诊分析[J]. 临床误诊误治, 1999, 12(5): 337.

(编辑 张大春)

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:2006-03-03;修回日期:2006-04-01