文章编号:1000-5404(2006)09-0939-03

论著

重组小鼠高迁移率族蛋白B1抗菌活性研究

龚 薇,何凤田,高会广,李蓉芬,胡 颖 (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**:制备具有功能活性的重组小鼠高迁移率族蛋白B1(recombinant mouse high-mobility group box-1,rmHMGB1)并观察其抗菌活性,为深入研究HMGB1抗菌功能创造条件。**方法** 提取BALB/c小鼠脾脏总RNA,经RT-PCR扩增得到编码小鼠HMGB1的cDNA片段,序列测定正确后,构建于原核表达载体pQE-80L,转化于大肠杆菌DH5α,经IPTG诱导表达目的蛋白,再经Ni^{2+}-NTA亲和层析柱纯化后,通过试管稀释法、琼脂扩散法两种抗菌实验观察并比较rmHMGB1对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)、绿脓杆菌抗菌活性的差异。**结果** RT-PCR扩增得到了约648bp的cDNA片段,序列分析与GenBank中报道的编码小鼠HMGB1的cDNA序列一致,纯化后的rmHMGB1对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)有明确的抗菌活性,其抗菌活性强弱依次为金黄色葡萄球菌 > JM109 > ATCC25922 > DH5α,对绿脓杆菌则无抗菌活性。**结论** 利用大肠杆菌可表达重组小鼠HMGB1,所获得纯化产物对部分细菌确有抗菌活性,此研究为进一步探讨HMGB1抗菌功能的机制奠定了基础。

关键词:高迁移率族蛋白B1(HMGB1);原核表达;抗菌活性
中图法分类号:Q74;Q51;R978.16 **文献标识码**:A

Study on antibacterial activity of recombinant mouse high-mobility group box-1

GONG Wei, HE Feng-tian, GAO Hui-guang, LI Rong-fen, HU Ying (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To lay a foundation for further study on high-mobility group box-1 (HMGB1) by preparing the functional recombinant mouse high-mobility group box-1 (rmHMGB1) and observing the antibacterial activity of rmHMGB1. **Methods** The total RNA was extracted from the spleen of BALB/c mouse and the cDNA fragment encoding mouse HMGB1 was amplified by RT-PCR. After sequenced, the cDNA fragment was cloned into the prokaryotic expression vector pQE-80L. Then the recombinant vector was transformed into *E. coli*. DH5α. The rmHMGB1 was expressed by the transformed cells induced by IPTG, and was purified with Ni^{2+}-NTA chromatography. The antibacterial activity on *S. aureas*, *E. coli*. JM109, ATCC25922, DH5α and *P. aeruginosa* of the purified protein was compared by dilution in the test tubes and dispersion method. **Results** A 648 bp cDNA fragment was amplified by RT-PCR, which was consistent with the sequence encoding mouse HMGB1 reported in GenBank. The purified rmHMGB1 could inhibit the *S. aureas*, *E. coli*. JM109, ATCC25922 and DH5α efficiently *in vitro*. The antibacterial activity on the four kinds of bacterium was *S. aureas* > JM109 > ATCC25922 > DH5α. However, the rmHMGB1 showed no antibacterial function on *P. aeruginosa*. **Conclusion** The rmHMGB1 can be expressed by *E. coli*.. The purified protein possesses antibacterial activity on some bacteria, which may pave a way for further studies.

Key words: high-mobility group box-1; prokaryotic expression; antibacterial activity

高迁移率族蛋白B1(high-mobility group box-1,HMGB1)是广泛存在于真核生物细胞内的染色体结合蛋白,因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳时快速迁移而得名。它是一类进化高度保守的非组蛋白,其生物学效应主要是稳定染色体的结构并协助其功能,作为基因和组织特异性的转录调控因子参与DNA的转录、复制、修复等[1]。研究人员亦发现HMGB1可释放到细胞质甚至细胞外,发挥着调节神经细胞轴突生长、恶性肿瘤转移以及动脉粥样硬化和血管损伤后再狭窄等多种生理病理效应[2-5]。近年来人们还发现HMGB1是一种重要的"晚期"炎症介质[6,7]。

2002年Zetterstrom[8]研究小组从未得过中耳炎、扁桃体炎及其他呼吸道感染等疾病的学龄前儿童的扁桃体中分离出一种天然的能抑制黏膜炎莫拉菌、巨大芽孢杆菌等多种细菌生长的蛋白质,经氨基酸序列比对分析证实该蛋白质为HMGB1,同时原核表达的大鼠

基金项目:全军"十一五"医药卫生科研基金资助项目(06H027)
Supported by the Medical Science Research Project of the "Eleventh Five-year Plan" of PLA (06H027)
作者简介:龚 薇(1980-),女,贵州省贵阳市人,硕士研究生,主要从事肿瘤分子生物学方面研究。电话:(023) 68752947
通讯作者:何凤田,电话:(023)68752262,E-mail:tmmuhft@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-12-13;修回日期:2006-03-09

HMGB1 与天然的人 HMGB1 同样具有抑制多种细菌生长的活性。但是否小鼠 HMGB1 同样具有抗菌活性,现尚少见文献报道。为更进一步了解重组小鼠 HMGB1 的抗菌活性及初步掌握其抗菌谱,本实验通过基因工程的方法得到纯度较高的 rmHMGB1 蛋白,通过试管稀释法、琼脂扩散法两种抗菌实验观察并比较 rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)、绿脓杆菌抗菌活性的差异,旨在为更深入探讨 HMGB1 抗菌机制创造条件。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

BALB/c 小鼠购自第三军医大学实验动物中心;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 试剂盒为 Promega 公司产品;限制性内切酶及连接酶购自大连宝生生物公司;克隆质粒 pUC19、原核表达载体 pQE-80L 及大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)均由本实验室保存;金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌为第三军医大学微生物学教研室提供。

1.2 RT-PCR 扩增小鼠 HMGB1 cDNA 及序列测定

取 BALB/c 小鼠脾脏,根据 Tripure 试剂盒说明书提取小鼠脾脏总 RNA。小鼠 HMGB1 上游引物为 5′-ATGGTACCATGGGCAAAGGAGATC-3′(划线部分为 *Kpn* Ⅰ酶切位点),下游引物为 5′-CGCAAGCTTTTATTCATCATCATCATC-3′(划线部分为 *Hind* Ⅲ酶切位点)。RT-PCR 根据试剂盒说明书进行,反应完成后,取 5 μl 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶扫描仪下观察并记录结果。构建克隆载体命名为 pUC19/mHMGB1。序列测定由上海生工公司完成,并将测序结果在 NCBI 服务器上进行同源性比对。

1.3 rmHMGB1 的表达、纯化

经 DNA 序列测定正确后构建重组原核表达载体命名为 pQE-80L/ mHMGB1 转化于大肠杆菌 DH5α。挑取含阳性重组原核表达载体的单个菌落扩增培养,在 37 ℃终浓度为 0.5 mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)的条件下培养 4 h,以诱导目的蛋白的表达,离心收集细菌,按 Ni^{2+}-NTA 亲和层析柱说明书纯化 rmHMGB1。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,最后行负压冷冻抽干保存。

1.4 rmHMGB1 抗菌活性检测

试管稀释法:先将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)、绿脓杆菌菌液分别用"三线法"划 LB 琼脂平板,37 ℃培养过夜。挑取各菌单菌落入 LB 液体培养基,然后分别加入 rmHMGB1 使其在培养基中终浓度为 0、50、100、150、200、250 μg/ml,各菌设对照组,分别加入与 rmHMGB1 等体积的灭菌生理盐水,37℃,225 r/min 振荡培养,实验设 3 个复管,于 8 h 取各组菌液紫外分光光度仪测其 $D(600)$ 取其平均值。

琼脂扩散法:分别制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)、绿脓杆菌双层 LB 琼脂平板,下层均为含有 15 g/L 琼脂的 LB 培养基,待下层完全凝固后铺入约 42 ℃含 7 g/L 琼脂和 100 μl 相应菌液的 LB 培养基,待上层培养基完全凝固后用外径为 5 mm 的无菌铁环打孔,在孔中分别加入 15 μg/μl 的 rmHMGB1 10 μl,对照组加入等体积的灭菌生理盐水,实验设 3 个复孔,37 ℃培养 8 h 后观察结果并分别测抗菌环直径大小取平均值。

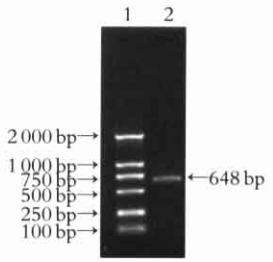
1.5 统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件进行 t 检验与多因素方差分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增及序列测定结果

经 RT-PCR 扩增得到约 648 bp 的 cDNA 片段(图 1)。将目的片段克隆于载体 pUC19 进行 DNA 序列测定,该序列与 GenBank 中报道的编码小鼠 HMGB1 的 cDNA 序列完全一致。

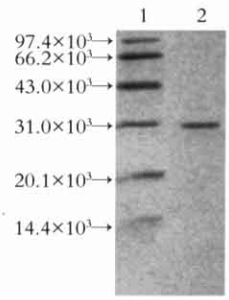


1:DNA 标准 DL2000;2:RT-PCR 扩增编码小鼠 HMGB1 的 cDNA 片段

图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 rmHMGB1 的表达、纯化

将测序正确的 cDNA 片段克隆于原核表达载体 pQE-80L 得到重组表达载体命名为 pQE-80L/mHMGB1,转化于大肠杆菌 DH5α 后,以 IPTG 诱导表达,经 SDS-GAGE 分析表明所表达的目的蛋白主要位于上清液中,而在其它组分未见明显表达。目的蛋白经 Ni^{2+}-NTA 亲和层析柱纯化及 PBS 透析后行 SDS-PAGE 结果仅在分子质量约 30 000 处见单一条带(图 2),纯化效果良好。



1:低分子量蛋白标准;2:纯化后的重组小鼠 HMGB1

图 2 SDS-PAGE 分析重组小鼠 HMGB1 纯化产物

2.3 rmHMGB1 体外抗菌活性检测

试管稀释法结果见表 1。对表 1 中数据进行统计学分析可知 rmHMGB1 和对照组(等体积灭菌生理盐水)与金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)共同培养在8 h菌液 $D(600)$ 统计学意义上有显著差异($P < 0.05$),而对于绿脓杆菌 rmHMGB1 和对照组在 8 h 菌液 $D(600)$ 无显著差异($P > 0.05$)。该结果说明 rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 JM109、ATCC25922、DH5α 有明确的抗菌活性,对绿脓杆菌则无抗菌活性。

表 1　试管稀释法分析重组小鼠 HMGB1 的抗菌活性[$D(600)$，$\bar{x}\pm s$]

细菌种类	rmHMGB1 浓度(μg/ml)											
	0		50		100		150		200		250	
	rmHMGB1	对照	rmHMGB1	对照	rmHMGB1	对照	rmHMGB1	对照	rmHMGB1	对照	rmHMGB1	对照
金黄色葡萄球菌	1.2903 ±0.0452	1.3053 ±0.029	1.0410 ±0.054	1.3803 ±0.023	0.7783 ±0.031[a]	1.1976 ±0.051	0.5981 ±0.01[a]	1.3702 ±0.092	0.3639 ±0.026[a]	1.3737 ±0.058	0.1943 ±0.009[a]	1.2433 ±0.043
大肠杆菌 JM109	1.6127 ±0.025	1.6560 ±0.071	1.2918 ±0.021	1.6394 ±0.069	1.0527 ±0.053[a]	1.6050 ±0.051	0.8454 ±0.088[a]	1.6501 ±0.061	0.4855 ±0.049[a]	1.6479 ±0.082	0.3329 ±0.050[a]	1.5634 ±0.035
大肠杆菌 ATCC25922	1.8972 ±0.029	1.7528 ±0.066	1.7335 ±0.023	1.8136 ±0.065	1.4910 ±0.051	1.6560 ±0.047	1.1435 ±0.092[a]	1.7321 ±0.058	0.9626 ±0.054[a]	1.8403 ±0.084	0.7601 ±0.043[a]	1.6655 ±0.031
大肠杆菌 DH5α	1.6379 ±0.065	1.7273 ±0.01	1.5135 ±0.061	1.6541 ±0.035	1.3643 ±0.048	1.5356 ±0.085	1.1800 ±0.057[a]	1.7136 ±0.047	1.0800 ±0.081[a]	1.7872 ±0.052	0.8788 ±0.034[a]	1.5651 ±0.036
绿脓杆菌	1.0043 ±0.044	0.9402 ±0.011	1.1079 ±0.053	0.9142 ±0.029	0.9511 ±0.033	1.1788 ±0.087	0.9701 ±0.009	1.1824 ±0.043	1.1137 ±0.020	0.9478 ±0.049	1.1623 ±0.007	1.2189 ±0.039

a：$P<0.05$，与对照组比较

琼脂扩散法结果显示：rmHMGB1 在金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(JM109、ATCC25922、DH5α)平板上均出现大小不等的抗菌环，分别测抗菌环直径取平均值如表 2 示，对照组均未见抗菌环。此结果证明 rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 JM109、ATCC25922、DH5α 均有较明显的抗菌活性，对各组抗菌环的直径数值行统计学分析证明 rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性最强，大肠杆菌 JM109 次之，大肠杆菌 ATCC25922 再次，大肠杆菌 DH5α 最弱。rmHMGB1 及对照组在绿脓杆菌平板上却未见抗菌环，测出的为圆孔直径的大小，说明 rmHMGB1 对绿脓杆菌无抗菌活性。

表 2　琼脂扩散法分析重组小鼠 HMGB1 的抗菌活性(直径/mm，$\bar{x}\pm s$)

细菌种类	rmHMGB1	对照
金黄色葡萄球菌	16.17 ±0.29[abcd]	4.83 ±0.28
大肠杆菌 JM109	13.30 ±0.26[abc]	4.93 ±0.12
大肠杆菌 ATCC25922	10.27 ±0.25[ab]	5.17 ±0.29
大肠杆菌 DH5α	7.77 ±0.25[a]	4.99 ±0.14
绿脓杆菌	5.03 ±0.19	5.10 ±0.15

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与大肠杆菌 DH5α 比较；c：$P<0.01$，与大肠杆菌 ATCC25922 比较；d：$P<0.01$，与大肠杆菌 JM109 比较

3　讨论

近年来 ZETTERSTROM 等[8]从人扁桃体中分离出的天然人 HMGB1 能抑制多种细菌的生长，原核表达的大鼠 HMGB1 也具有同样的抗菌活性。本实验经原核表达得到高纯度的 rmHMGB1，并通过一系列抗菌实验表明 rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 JM109、ATCC25922、DH5α 具有明确的抗菌活性，对绿脓杆菌则无抗菌活性，该实验结果证明重组小鼠 HMGB1 对部分细菌确有抗菌活性。rmHMGB1 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性最强，大肠杆菌 JM109 次之，大肠杆菌 ATCC25922 再次，大肠杆菌 DH5α 最弱，对绿脓杆菌则无抗菌活性，说明重组小鼠 HMGB1 对不同种属的细菌抗菌活性有明显差异，即使对不同基因型大肠杆菌也表现出不同的毒性，其原因尚不清。本实验选择了较常见的金黄色葡萄球菌属典型的革兰阳性菌，大肠杆菌、绿脓杆菌均属革兰阴性菌，其中大肠杆菌 JM109、DH5α 为常用于原核表达的工程菌，大肠杆菌 ATCC25922 为标准大肠杆菌菌株，绿脓杆菌也是假单孢菌属中一种广泛存在于自然界的条件致病菌，旨在进一步了解小鼠 HMGB1 的抗菌谱；亦有文献提示表达系统的选择对于原核表达 HMGB1 是至关重要的[6,9,10]，因此我们也选择了常用的工程菌作为实验对象。重组小鼠 HMGB1 对部分细菌的抗菌功能是明确的，但其抗菌功能的发挥究竟与哪些区域有关还亟待进一步探讨。

参考文献：

[1] YANG H, TRACEY K J. High mobility group box 1 (HMGB1)[J]. Crit Care Med, 2005, 33(12 Suppl): S472 - S474.

[2] CHOU D K, ZHANG J, SMITH F I, *et al*. Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphoterin and sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration[J]. J Neurochem, 2004, 90(6): 1389 - 1401.

[3] HUTTUNEN H J, FAGES C, KUJA-PANULA J, *et al*. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis[J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4805 - 4811.

[4] TREUTIGER C J, MULLINS G E, JOHANSSON A S, *et al*. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium[J]. J Intern Med, 2003, 254(4): 375 - 385.

[5] ABEYAMA K, STERN D M, ITO Y, *et al*. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1267 - 1274.

[6] 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.

[7] YANG H, WANG H, CZURA C J, *et al*. The cytokine activity of HMGB1[J]. J Leukoc Biol, 2005, 78(1): 1 - 8.

[8] ZETTERSTROM C K, BERGMAN T, RYNNEL-DAGOO B, *et al*. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid[J]. Pediatr Res, 2002, 52(2): 148 - 154.

[9] BIANCHI M E. Production of functional rat HMG1 protein in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1991, 104(2): 271 - 275.

[10] LEE K B, BROOKS D J, THOMAS J O. Selection of a cDNA clone for chicken high-mobility-group 1 (HMG1) protein through its unusually conserved 3′-untranslated region, and improved expression of recombinant HMG1 in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1998, 225(1 - 2): 97 - 105.

(编辑　栾　嘉)