文章编号:1000-5404(2008)01-0001-04

论著

重组融合蛋白 rTMP-GH 对体外培养巨核细胞增殖的影响

许 杨[1],王军平[1],赵景宏[2],粟永萍[1],陈 芳[1],申明强[1],陈 默[1],王 崧[1],开 丽[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:**目的** 探讨 TPO 模拟肽(thrombopoietin mimetic peptide, TMP)与人生长激素(growth hormone, GH)的重组融合蛋白 rTMP-GH 对体外培养巨核系细胞增殖的影响,以及对血小板生成有显著调控作用的球蛋白转录调节因子(globin transcription factor-1, GATA-1)表达的调控作用。**方法** 体外培养 Dami 细胞,100 ng/ml 的重组融合蛋白 rTMP-GH 作用 7 d 后,观察巨核细胞集落形成能力,分析 rTMP-GH 对 Dami 细胞增殖的影响。同时,采用 Western blot 和 RT-PCR 方法分别检测 Dami细胞中 GATA-1 的蛋白水平和 mRNA 表达变化,探讨 rTMP-GH 对巨核细胞生成血小板的调节作用。**结果** rTMP-GH 处理后 Dami 细胞的集落形成能力显著增强,转录因子 GATA-1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调,其调节作用明显强于空白对照组和 GH 组。**结论** rTMP-GH 能够刺激巨核细胞增殖分化和上调 GATA-1 的表达,具有促进血小板生成的作用。

关键词:rTMP-GH;Dami 细胞;增殖;GATA-1
中图法分类号:R331.143;R341;R394.2 **文献标识码**:A

Effects of a new recombinant fusion protein rTMP-GH on proliferation of megakaryocytes *in vitro*

XU Yang[1], WANG Jun-ping[1], ZHAO Jing-hong[2], SU Yong-ping[1], CHEN Fang[1], SHEN Ming-qiang[1], CHEN Mo[1], WANG Song[1], KAI Li[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of rTMP-GH, a recombinant fusion protein of thrombopoietin mimetic peptide (TMP) and human growth hormone (GH), on the proliferation and thrombocytopoiesis of cultured megakaryocytes. **Methods** After being treated with 100 ng/ml of rTMP-GH for 7 d, Dami cells, a kind of megakaryocyte cell line, were analyzed by observing the numbers of colony forming unit. Meanwhile, Western blotting and RT-PCR were applied to detect the expression changes of globin transcription factor-1 (GATA-1), which is a main regulator of thrombocytopoiesis in megakaryocytes. **Results** The numbers of colony forming unit were markedly increased in cultured Dami cells incubated with rTMP-GH. Compared with normal control and GH treatment groups, both the mRNA and protein levels of GATA-1 were up-regulated significantly in Dami cells treated with rTMP-GH. **Conclusion** rTMP-GH has a strong ability to promote the proliferation and thrombocytopoiesis of megakaryocytes.

Key words: thrombopoietin mimetic peptide-growth hormone; Dami cells; Proliferation; GATA-1

血小板减少症在临床上较为常见,目前用于救治血小板减少症的特效药物不仅种类少,而且还存在各种明显的缺点。巨核细胞是血小板生成的前体细胞,调控巨核细胞的增殖分化是促进血小板生成的最有效手段[1]。血小板生成素(thrombopoietin, TPO)又称巨核细胞生长发育因子(megakaryocyte growth and development factor, MGDF)或血小板生长因子(TSF),是巨核细胞-血小板系统最重要的调控因子和促进血小板生成的最主要的细胞因子。它通过与其受体 c-Mpl 结

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)(2007AA02Z152);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(06G076);全国博士学位论文作者专项资金(200362)
Supported by the National "863" High-tech Development Plan of China (2007AA02Z152), the Key Scientific Research Project of "Eleventh Five-year Plan" of PLA (06G076) and the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200362)
作者简介:许 杨,女,四川省成都市人,硕士研究生,主要从事药物开发和药物活性方面的研究。电话:(023)68753661
通信作者:王军平,电话:(023)68752283,Email:wangjunp@yahoo.com
收稿日期:2007-06-15;修回日期:2007-08-20

合而刺激巨核细胞增殖与分化，并促进血小板的生成和释放，控制循环血中血小板的数量和功能[2]。TPO模拟肽（thrombopoietin mimetic peptide，TMP）是一种与天然TPO的生物学活性相似但又与其完全不同源的短肽，体外实验显示TMP与c-Mpl受体有很高的亲和力[3]。新近，本室通过基因重组技术将TMP与具有显著促进多系造血干/祖细胞增殖与分化能力的重组人生长激素（recombinant human growth hormone，rh-GH）进行融合，在大肠杆菌中表达制备出一种重组融合蛋白——rTMP-GH。初步研究结果表明，融合蛋白rTMP-GH在体内具有明显的骨髓组织偏向分布特性，提示TMP发挥了一定的靶向巨核细胞作用[4]。本研究拟通过体外实验，进一步分析该融合蛋白刺激巨核细胞增殖和调控血小板生成的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

促血小板生成融合蛋白——rTMP-GH由本所自行制备，重组人生长激素（商品名：赛高路）为深圳科兴生物公司产品，总RNA提取液、RT-PCR一步法试剂盒购自TaKaRa公司，蛋白提取液、ECL化学发光试剂盒购自Pierce公司，山羊抗人GATA-1多克隆抗体、小鼠抗人β-actin单克隆抗体，辣根酶标记兔抗山羊IgG，辣根酶标记兔抗小鼠IgG购自Santa Cruz。Dami细胞引自上海细胞生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 Dami细胞培养 常规方法复苏Dami细胞，采用RPMI1640培养基+10%小牛血清，在5% CO_2、100%湿度、37℃条件下进行培养，每2～3天换液1次。收集对数生长期细胞，离心洗涤后进行细胞计数，并按3×10^3/ml转接至24孔板中，每孔200 μl。分别加入终浓度为100 ng/ml的rTMP-GH、GH继续培养7 d后进行集落计数和总RNA及蛋白提取。

1.2.2 巨核细胞集落计数 在倒置显微镜下观察并计数细胞集落数。按照国内外通用的标准：≥3个细胞组成的巨核细胞集落形成单位（CFU-MK）定为一个普通集落，≥40个细胞并含有2～3个集落中心所组成的巨核细胞爆式集落形成单位（BFU-MK）定为一个爆式集落。

1.2.3 Western blot分析Dami细胞GATA-1蛋白水平的表达变化 细胞分组及培养方法同前，按Pierce蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白，采用Bradford法测定总蛋白浓度。灌注10%分离胶和5%积层胶，各取总蛋白40 μg行SDS-PAGE，电泳结束后电转印2 h到PVDF膜。PVDF膜4 ℃封闭过夜（0.5% BSA，0.01 mol/L PBS），分别加入山羊抗人GATA-1多克隆抗体（1∶500），小鼠抗人β-actin抗体（1∶500），37 ℃孵育2 h，PBST（0.01 mol/L PBS，0.02% Tween）洗膜10 min×3，分别加入辣根酶标记兔抗羊IgG（1∶6 000），辣根酶标记兔抗小鼠IgG（1∶6 000），37 ℃孵育1 h，PBST洗膜15 min×4，最后ECL显色。显色结果通过凝胶成像分析系统进行扫描，并分析各条带吸光度值×面积（Int×mm^2）。

1.2.4 RT-PCR检测Dami细胞GATA-1mRNA的表达变化 提取Dami细胞总RNA，采用一步法RT-PCR扩增GATA-1目的片段。GATA-1的PCR引物序列分别为：上游引物为5′-CAGTAAACGAGCAGGTACTC-3′，下游引物为5′- CATAAAGCCACCAGCTGGTC-3′，所扩增目的片段理论大小为256 bp。β-actin的PCR引物序列分别为：上游引物为5′-GACCTGACTGACTACCTCATG-3′，下游引物为5′-CACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3′，所扩增目的片段理论大小为500 bp。反应体系如下：模板0.35 μg，上、下游引物各1 μl，dNTP 4 μl，10×buffer 5 μl，$MgCl_2$（25 mmol/L）10 μl，Rnase inhibitor酶（40 U）1 μl，AMV Rnase XL酶（5 U）1 μl，AMV optimized *Taq*酶（5 U）1 μl，加Rnase free水至50 μl。反应条件：50 ℃ 30 min，94 ℃ 2 min，94 ℃变性30 s，56 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，进行25个循环。RT-PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统观察并分析电泳结果。

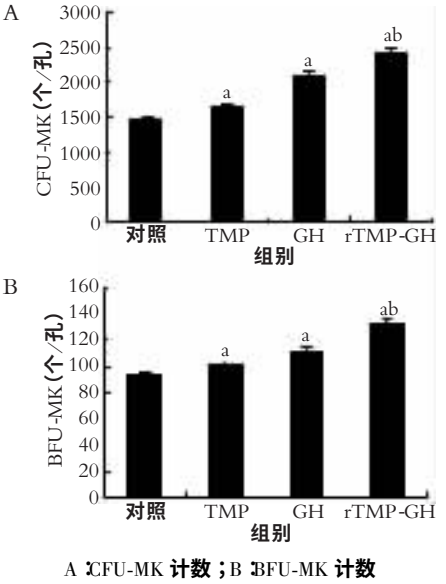
1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析，组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 rTMP-GH对Dami细胞集落形成能力的影响

在Dami细胞培养体系中分别加入终浓度为100 ng/ml的rTMP-GH，GH和TMP，并培养7 d后，行巨核细胞集落计数，结果表明：与空白对照组相比，rTMP-GH组，GH组和TMP组的CFU-MK和BFU-MK均明显增加（图1）（$P<0.01$），而且rTMP-GH的作用更加突出。提示rTMP-GH具有较强的促进巨核细胞集落形成能力。



A：CFU-MK计数；B：BFU-MK计数

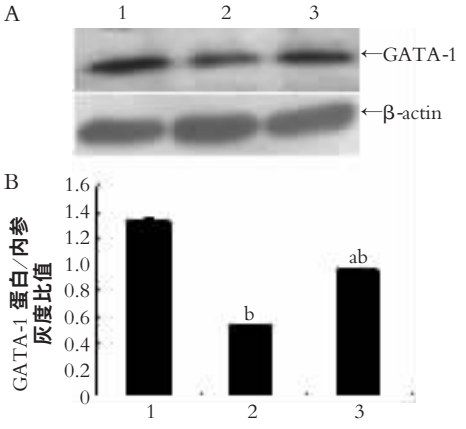
a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与GH组比较

图1 rTMP-GH作用7 d后dami细胞CFU-MK和BFU-MK计数（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

2.2 rTMP-GH诱导Dami细胞GATA-1蛋白水平的表达变化

在rTMP-GH和GH刺激作用后7 d，免疫印迹方法检测各组Dami细胞中GATA-1蛋白的表达水平，结果显示：与空白对照组

比较,rTMP-GH 和 GH 均能显著提高 Dami 细胞中 GATA-1 蛋白的表达水平,图像分析各样品与内参 β-actin 的灰度比值,结果表明组间差异具有显著性($P<0.01$);而与 GH 组相比,rTMP-GH 上调 GATA-1 蛋白表达的作用更明显($P<0.01$)(图 2)。



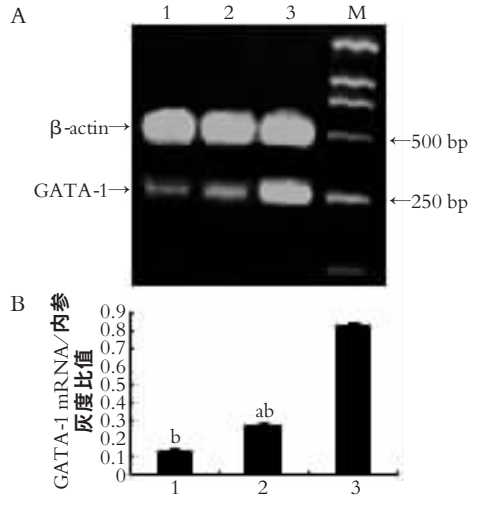
1:rTMP-GH 组;2:对照组;3:GH 组

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 rTMP-GH 组比较

图 2　免疫印迹检测 dami 细胞中 GATA-1 蛋白的表达(A)和相应 GATA-1 蛋白与内参表达的灰度比值统计学分析(B)

2.3　rTMP-GH 对 Dami 细胞 GATA-1 mRNA 表达的影响作用

为了进一步探讨 rTMP-GH 和 GH 作用于 Dami 细胞后 GATA-1 蛋白表达升高的原因,我们通过半定量 RT-PCR 对 GATA-1的 mRNA 表达变化进行了分析。电泳结果显示(图 3A),在 256 bp 和 500 bp 处均可见 DNA 条带,其大小分别与所预计的 GATA-1 和内参 β-actin 的 PCR 产物大小相一致,表明 RT-PCR 扩增获得成功。与空白对照组相比,rTMP-GH 和 GH 作用后 Dami 细胞中 GATA-1 mRNA 表达水平更高($P<0.01$)(图 3B),而且 rTMP-GH 较 GH 作用更强,表明 rTMP-GH 可以显著促进 Dami 细胞中 GATA-1 的转录,提示 GATA-1 蛋白水平的升高可能主要与其转录生成增强有关。



1:对照;2:GH;3:rTMP-GH;M:DNA 标准

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 rTMP-GH 组比较

图 3　rTMP-GH 对 Dami 细胞GATA-1 mRNA 的表达(A)及 GATA-1 mRNA 与内参表达的灰度比值统计学分析(B)

3　讨论

巨核细胞的生成主要由 TPO 调节,TPO 通过与巨核细胞/巨核祖细胞表面血小板生成素受体——c-Mpl 特异性结合,从而刺激造血干细胞向巨核系细胞分化,并特异地促进巨核祖细胞增殖、分化,以及巨核细胞的成熟与释放血小板,是巨核细胞-血小板系统最重要的调控因子[1]。但是,由于通过基因工程制备并聚乙二醇化的 rhMGDF 在临床试用过程中发现它会产生严重的中和性 TPO 抗体,造成内源性 TPO 活性受阻,从而导致血小板进一步减少[5]。鉴于此,人们想到了寻找 TPO 模拟物或者类似物[6]。美国学者 Cwirla 等[3] 通过噬菌体表面展示技术筛选到了一种仅有 14 个氨基酸残基组成的,与天然 TPO 的生物活性相似的短肽,称之为 TPO 模拟肽,它虽与 TPO 不同源,但与 TPO 受体 c-Mpl 却有很高的亲和力,而且也显示出一定的促巨核细胞增殖分化作用。在我们的实验中也得到了证实。

近年来,包括本实验室在内的一些国内外研究小组发现,hGH 除了具有促生长、免疫调节等生理功能外,还表现出很强的刺激巨核/巨核祖细胞增殖分化和促进血小板生成的作用[7,8]。新近,我们通过基因重组技术将 TMP 与 rhGH 进行融合,在大肠杆菌中表达制备出了一种新型融合蛋白——rTMP-GH。我们希望通过融合,在 TMP 引导下 rhGH 可以靶向聚集于巨核/巨核祖细胞周围,从而显著提高后者在促巨核细胞增殖分化和血小板生成时的生物利用度,降低用量、减轻毒副反应;另外,与 rhGH 融合,不仅使 TMP 能够通过基因工程方法进行制备,而且还可使其半衰期显著延长。已有的实验结果显示,该融合蛋白具有突出的骨髓组织偏向分布特性,说明 TMP 在其中发挥了靶向引导作用[4]。

Dami 细胞是从白血病患者骨髓中分离的巨核系细胞株,该细胞具有巨核细胞的表面标志物,如 GPⅡb/Ⅲa、GPIb、vwf,并且表面表达有 TPO 受体 c-Mpl,能够被诱导增殖和分化而产生血小板,是体外研究巨核细胞生长发育及其调控的较理想模型[9]。我们的实验显示,与 GH 和 TMP 一样,rTMP-GH 也能够刺激 Dami 细胞增殖,所形成的 CFU-MK 和 BFU-MK 较对照组明显增加,而且其作用优于单纯 GH 组和 TMP 组。巨核细胞要产生血小板,必须分化成熟,文献[10]报道球蛋白转录因子 1(globin transcription factor 1, GATA-1)是巨核细胞和红细胞基因转录生成的重要调节因子,能够调控细胞的自我复制,诱导巨核细胞细胞质成熟,促进血小板的生长发育等。GATA-1 是 GATA 家族中的一种锌指蛋白,其靶基因是 c-Mpl,结合位点为 T/AGATAA/G,含有

2个锌指结构,为结合DNA所必需。Kacena和Muntean等[11,12]研究表明GATA-1主要作用于巨核细胞发育的早中期阶段,在巨核细胞细胞质成熟和产生颗粒方面起着重要的调节作用。在本实验中我们发现,rTMP-GH可以显著上调Dami细胞中GATA-1蛋白水平的表达,而RT-PCR结果则证实rTMP-GH主要是通过促进GATA-1的转录生成来上调其表达。rTMP-GH对GATA-1的显著上调作用进一步表明该重组融合蛋白具有促进巨核细胞分化、成熟和血小板生成的作用。

总之,通过本实验初步证实,我室自行研制的重组融合蛋白rTMP-GH具有显著促进巨核细胞增殖、分化和血小板生成的作用,值得进一步研发和进行体内动物实验研究。

参考文献:

[1] Deutsch V R, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production[J]. Br J Haematol, 2006, 134(5): 453-466.

[2] Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, *et al*. A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis[J]. Blood, 2006, 107(11): 4300-4307.

[3] Cwirla S E, Balasubramanian P, Duffin D J, *et al*. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine[J]. Science, 1997, 276(5319): 1696-1699.

[4] 邵 波, 艾国平, 王军平, 等. 新型升血小板因子静脉注射在小鼠体内的靶向性实验研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(18): 1679-1680.

[5] Li J, Yang C, Xia Y, *et al*. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin[J]. Blood, 2001, 98(12): 3241-3248.

[6] Bussel J B, Kuter D J, George J N, *et al*. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP[J]. N Engl J Med, 2006, 335(16): 1672-1681.

[7] Hanley M B, Napolitano L A, Mccune J M. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1170-1179.

[8] Carlo-Stella C, Di-Nicola M, Milani R, *et al*. Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 171-178.

[9] Briquet-Laugier V, El-Golli N, Nurden P, *et al*. Thrombopoietin-induced Dami cells as a model for alpha-granule biogenesis[J]. Platelets, 2004, 15(6): 341-354.

[10] Balduini C, Pecci A, Loffredo G, *et al*. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis[J]. Thromb Haemost, 2004, 91(1): 129-140.

[11] Kacena M A, Gundberg C M, Horowitz M C. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells[J]. Bone, 2006, 39(5): 978-984.

[12] Muntean A G, Crispino J D. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development[J]. Blood, 2005, 106(4): 1223-1231.

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)01-0004-01

昆布多糖硫酸酯抑制结肠癌细胞增殖

邓学萍 (重庆市渝北区第二人民医院防疫保健科,重庆 401147)

现行用于治疗结肠癌的化疗药物都存在一定的缺陷,昆布多糖硫酸酯(laminarin sulphate,LAMS)是一具有多种生物功能的多糖酯[1]。现报告LAMS对抑制体外培养人结肠癌细胞株(human colon carcinoma cell line, LOVO)细胞的增殖、诱导凋亡及有关基因表达的影响,为LAMS用于治疗结肠癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

LOVO细胞购自上海细胞所。

1.2 实验药物

昆布多糖硫酸酯由重庆市普外科重点实验室参照文献[2]从海带提取制备,多糖酯含量30%。使用时用生理盐水稀释成32 μg/ml(使结肠癌细胞IC_{50}的平均浓度),0.22 μl孔径滤器过滤。

1.3 主要试剂

TUNEL(POD)试剂盒产自德国Boehtinger Mannheim公司,Bcl-2抗体、发光试剂盒均产自美国Santa Craze公司。

1.4 主要仪器

垂直电泳仪,CO_2培养箱,电转仪,图像分析系统。

1.5 LAMS对LOVO细胞增殖抑制试验

取对数生长期LOVO细胞(一式三份),以含新生牛血清的1640培养液稀释成1×10^5/ml,置96孔培养板每孔200 μl。37 ℃、5% CO_2培养12 h。实验孔分别加LAMS 5 μl、10 μl、20 μl,一式三份。继续培养12 h,加5 mg/ml MTT液20 μl,继续培养4 h。小心吸弃上清液200 μl,加二甲亚砜200 μl,震荡5 min,600 nm测吸光度值。对照孔不加LAMS,其余同实验孔。

(下转14页)

作者简介 邓学萍,女,重庆市人,主管护师,主要从事医疗卫生防疫管理方面的研究。电话:(023)86889197

收稿日期 2007-05-24 修回日期 2007-08-10