论著

文章编号:1000-5404(2013)23-2536-06

一种具有双嗜性功能融合蛋白FN/CDH的制备及其促粘附、成骨生物活性鉴定

向 强[1],张 瑗[2],崔 翔[2],王加旭[2],刘明华[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院急救部[1];400047 重庆,第三军医大学新桥医院骨科[2])

[摘要] **目的** 构建一种具有同嗜性和异嗜性细胞粘附功能的重组融合蛋白FN/CDH,验证其对人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cell,hMSCs)的促粘附、成骨效能。**方法** 以纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和钙粘附蛋白11(CDH11)作为前体分子,通过生物信息学分析了解其结构序列与功能基团。采用"同源模建"作为分子模拟策略确定FN和CDH11功能片段的接合方式。常规PCR扩增FNⅢ7-10和CDH11 EC1-2基因片段后应用重叠延伸PCR(splice-over-extension PCR, SOE-PCR)进行基因拼接。将融合基因插入原核表达载体pET-22b构建重组载体,重组载体转化表达菌株Rsoetta-gami(DE3),实现rFN/CDH的诱导表达,蛋白纯化。免疫印迹确定融合蛋白种属,离心促粘附实验和成骨诱导验证rFN/CDH体外生物活性。**结果** 成功构建了pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2融合基因原核表达载体,获得了rFN/CDH的可溶性表达,纯化后rFN/CDH的纯度达到96%。初步验证了各个融合蛋白表达属性的准确性,证实rFN/CDH具有良好的促进成骨细胞粘附的生物活性。将有成骨分化潜能的hMSCs在rFN/CDH涂层的TCPS表面进行成骨诱导培养,以早期成骨标志物Alkaline phosphatase(ALP)和晚期标志物Osteocalcin(OCN)作为评价指标,提示rFN/CDH具有良好的促进细胞成骨分化的生物活性。**结论** 成功进行了rFN/CDH融合蛋白的原核表达、纯化和鉴定,嵌合蛋白的粘附活性在一定程度上实现了对FN和CDH11功能的叠加,rFN/CDH具有"促粘"和"促成骨"的双重生物活性,可作为一种理想的仿生修饰分子进行生物界面的构建。

[关键词] 纤维连接蛋白;钙粘附蛋白;间充质干细胞;粘附;成骨分化
[中图法分类号] R322.71; R341; R394-33 [文献标志码] A

Preparation of FN/CDH amphotropic recombinant protein and its capacity in promoting osteoblastic adhesion and ossification

Xiang Qiang[1], Zhang Yuan[2], Cui Xiang[2], Wang Jiaxu[2], Liu Minghua[1] ([1]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400047, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of an amphotropic recombinant protein of fibronectin module Ⅲ7-10/cadherin 11 EC1-2 (rFN/CDH) on cell adhesion and differentiation in human mesenchymal stem cells (hMSCs). **Methods** FN and CDH11, as two pre-molecules of our objective recombinant protein, were analyzed bioinformatically to acquire the structural sequences and functional groups. The functional fragments of FN and CDH11 were integrated using a homology modeling strategy. The fragments of FNⅢ7-10 and CDH11 EC1-2 were spliced by SOE-PCR and then inserted into the expression plasmid of pET-22b to construct a reconstructed vector. After transforming the vector into Rsoetta-gami (DE3) strain and optimizing the experimental parameters, rFN/CDH was induced to express using IPTG and then purified. Further, Western blotting was employed to verify the protein. While, centrifugal cell adhesive assay and osteoblastic induction were used to determine the bioactivity of the protein *in vitro*. **Results** The prokaryotic expression vector pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2 encoding the objective fusion gene was successful constructed. The rFN/CDH protein was in soluble expression, with the purity reaching 96%, and identified to have the accuracy of the individual expression of fusion protein properties. Additionally, cell centrifugal adhesive assay demonstrated that the tissue-culture treated polystyrene (TCPS) coated with rFN/CDH adhered more hMSCs with differentia-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171691)
[通信作者] 刘明华,E-mail:jjbicu@sohu.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130922.1724.002.html(2013-09-22)

tion potential of osteoblasts, as compared to single FN and CDH. Alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin (OCN) gene/protein expression, as the early and late markers for osteoblastic differentiation, indicated that rFN/CDH further promoted ALP activity and OCN gene expression. **Conclusion** A prokaryotic expression vector encoding rFN/CDH fusion gene is successfully constructed, and the fusion protein is purified and identified. The obtained rFN/CDH possesses excellent capacity in promoting osteoblastic adhesion and ossification, which achieves the functional integration of FN and CDH11. It can be used as an ideal construction of biomimetic modification of molecular for biological interface.

[**Key words**] fibronectin; cadherin; mesenchymal stem cell; adhesion; osteoblastic differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171691). Corresponding author: Liu Minghua, E-mail: jjbicu@sohu.com

纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是一种以二聚体形式存在于血浆、体液等细胞外基质(extracellularmatrix, ECM)中的糖蛋白,主要功能涉及细胞迁移/粘附、创面愈合、胚胎形成、血液凝固等病理/生理过程。研究表明:FN在成骨过程中急剧增高,与成骨细胞的结合显著强于其他ECM蛋白[1]。钙粘附蛋白(cadherin, CDH)是一种钙离子依赖的,主要参与细胞间连接,为多种细胞间通讯提供桥梁结构的通讯分子。CDH11,又称成骨细胞特异性CDH(osteoblastic cadherin, OB-CDH),是特异表达于成骨细胞表面的一种CDH的亚型分子,可通过"同嗜"效应,介导骨形成并维持微环境中不同种骨细胞的相互通讯和对话,发挥生物学作用[2]。本研究旨在设计和制备一种兼有FN和CDH功能特点的双嗜性粘附分子,构建仿生学生物界面,进而增强种子细胞在材料界面的成骨性能。首先通过同源模建策略、基因克隆/拼接技术、蛋白表达/纯化技术,设计和制备了FN和CDH两种蛋白功能基序的嵌合式融合蛋白(recombinant fibronectin/cadherin chimera, rFN/CDH)。并在rFN/CDH涂层的Tissue-culture treated polystyrene (TCPS)表面进行细胞离心粘附和成骨诱导分化等实验,评价rFN/CDH对骨种子细胞的粘附、增殖和分化的体外影响,为组织工程表面仿生微环境的建立,仿生化组织工程骨的构建、开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

FNⅢ7-10 cDNA由美国杜克大学医学中心Horald P. Ericsson教授馈赠,CDH11 cDNA由日本东京大学Masatoshi Takeichi教授馈赠,pET22b表达载体(Novagen,德国),PCR相关试剂:*Pfu*高保真酶、*Taq*酶、dNTP混合物(MBI,美国),DNA限制性内切酶*Sal*Ⅰ、*Not*Ⅰ,T_4 DNA连接酶(MBI,美国),质粒小抽试剂盒(Omega,美国),DH5α感受态细胞(Tiangen,中国),Rosetta-gami(DE3)改良菌株(Novagen, 德国),山羊抗6×his多克隆抗体(Santa Cruz, 美国),HRP标记的兔抗羊单克隆抗体(北京中杉,美国),ALP检测试剂盒(建成,中国),SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa,中国),小鼠MC3T3-E1成骨细胞株中科院上海细胞库)。对rFN/CDH融合基因/蛋白的生物信息学系统分析,采用标准DNA和载体操作技术克隆FNⅢ7-10和CDH11 EC1-2基因片段,由上海生工技术有限公司合成PCR引物,SOE-PCR引物设计策略与合成见表1。

表1 SOE-PCR引物设计

基因	序列	产物大小(bp)
FNⅢ7-10	上游(P3):5′-AAGGAAAAAAGCGGCCGCT-GTTCGGTAATTAATGGA-3′	1 158
	下游(P4):5′-GACAACCCACCAAAGGGT-TCTGGTTCTGGTTCTCCATTGTCTCCACCA-3′	
CDH11 EC1-2	上游(P1):5′-TGGTGGAGACAATGGAGAAC-CAGAACCAGAACCCTTTGGTGGGTTGTC-3′	844
	下游(P2):5′-ACGCGTCGACATGAAG-GAGAACTACTGT-3′	
rFN/CDH	上游(P1):5′-AGGAAAAAAGCGGCCGCTGT-TCGGTAATTAATGGA-3′	1 965
	下游(P4):5′-ACGCGTCGACATGAAG-GAGAACTACTGT-3′	

1.2 方法

1.2.1 rFN/CDH融合基因的克隆、拼接 以pET15b/FNⅢ7-10和pBluescript SKⅡ(+)/CDH11重组质粒为模板,采用常规PCR的策略,对FNⅢ7-10和CDH11 EC1-2基因进行克隆。采用降落(Touchdown)PCR的方法对FNⅢ7-10和CDH11 EC1-2的PCR产物进行基因拼接。首先在一个较低的退火温度下使解聚的FNⅢ7-10和CDH11 EC1-2的DNA链在内侧引物P2和P3的引导下,沿重叠区域形成互补结构;然后在一个较高的退火温度下,以整个拼接的DNA链为模板,在外侧引物P1和P4的引导下对整个基因进行指数倍和特异性扩增,并对DNA片段进行分离和回收。

1.2.2 pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2表达载体的构建 分别将FNⅢ7-10、CDH11 EC1-2和FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2片段插入pET22b多克隆位点构建3种重组质粒:pET22b-FNⅢ7-10、pET22b-CDH11 EC1-2和pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2,理论长度分别为6 681、6 367、7 488 bp。构建完成后将重组质粒转化DH5α感受态细胞培养扩增,将单菌落在Amp(+)的LB培养基中扩大培养,提取质粒进行*Sal*Ⅰ和*Not*Ⅰ双酶切鉴定,并对重组质粒进行DNA测序鉴定。

1.2.3 rFN/CDH融合蛋白的表达、纯化、属性鉴定 向100 μL Rosetta-gami(DE3)感受态细胞内分别加入pET22b-FNⅢ7-10、pET22b-CDH11 EC1-2和pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2重组

质粒DNA 10 μL进行诱导表达(30 ℃,IPTG母液至终浓度为0.4 mmol/L、150 r/min诱导培养1~12 h),离心6 000 r/min,10 min,收菌,超声裂菌,将全菌蛋白、上清液、沉淀分别取样进行SDS-PAGE分析目的蛋白的表达形式。再将rFN/CDH融合蛋白的6×his标签纯化,进行rFN/CDH融合蛋白的免疫印迹(Western blot)鉴定。

1.2.4 人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cell, hMSCs)的分离培养 从健康成人志愿者髂前上棘穿刺收集骨髓3 mL,PBS液洗涤,离心1 000 r/min,5 min,收集细胞。弃上清及脂肪层,收集沉淀,PBS液3 mL重悬细胞,将细胞悬液加入等体积的percoll细胞分离液上,2 000 r/min低温离心2 min,收集白膜层的单个核细胞。PBS液洗涤、离心(1 000 r/min,5 min)2次,弃上清。加入含10% FBS的DMEM/F12培养基重悬细胞,按10^5~10^6/mL接种于无菌50 mL培养瓶内。37 ℃、50% CO_2、饱和湿度恒温细胞培养箱内培养24 h,弃去未贴壁细胞,加入含10% FBS的DMEM/F12培养基,在恒温细胞培养箱内培养。每日观察细胞生长情况,待细胞生长至3~6代、融合率达70%~80%时即可用以成骨诱导分化实验。

1.2.5 rFN/CDH融合蛋白的促粘附活性 按照梯度浓度的方法确定rFN/CDH融合蛋白发挥促粘附活性的最佳浓度范围,观察其对成骨细胞的促粘附作用。实验分为PBS空白对照组、FN阳性对照组、CDH阳性对照组、rFN/CDH实验组。向96孔培养板内加入梯度稀释的融合蛋白rFN/CDH(融合蛋白稀释为0、1、1.25、2.5、5、20、40 μg/mL的工作溶液)及其空白、阳性对照液100 μL/孔,4 ℃冰箱孵育过夜。次日弃上述溶液,加入85 ℃热变性的1% BSA溶液,4 ℃冰箱孵育过夜。将20代之前的生长融合至70%~80%的MC3T3-E1成骨细胞制成10^5/mL的单细胞悬液。将0.5 mg/mL的Hoechst 33342液加入单细胞悬液,使其终浓度为5 μg/mL。冰浴20 min。将标记后细胞以100 μL/孔的体积(即10^4/孔)加入96孔培养板各预处理孔内,暗室避光操作。将上述培养板置入平板离心机卡槽,4 ℃,100 r/min离心5 min。采用360 nm和465 nm双波长酶标仪读取各孔荧光值。荧光倒置显微镜下观察各孔细胞粘附情况,拍摄记录。共测荧光值3次,前2次反映10^4个细胞的总荧光强度,第3次为翻转离心后的荧光强度,反映实际粘附细胞的荧光强度。计算粘附细胞数量:粘附细胞数(/孔)=实际粘附细胞荧光强度×10 000/细胞总荧光强度。

1.2.6 rFN/CDH融合蛋白的促成骨作用 ALP活性测定:取成骨诱导培养10 d的hMSCs常规方法消化、离心1 000 r/min,5 min,收集细胞至无菌EP管,加入细胞裂解液(10 mmol/L Tris/HCl + 1 mmol/L $MgCl_2$, pH 7.4)各100 μL,吹打混匀。反复-70 ℃急冻和37 ℃融化3次,超声破碎(功率400 W,超声时间5 s,间隙10 s,次数30次),彻底裂解细胞。12 000 *g*,1 ℃低温离心15 min,收集上清用以后续检测。ALP活性=(测定管吸光度-空白管吸光度)×标准管含酚量/[(标准管吸光度-空白管吸光度)×反应时间×蛋白浓度]。OCN基因表达分析:通过实时荧光定量-逆转录PCR(Realtime RT-PCR)的方法对成骨晚期标志物OCN的基因表达水平进行鉴定。先行hMSCs总RNA的提取,在NCBI基因库GenBank中检索人来源OCN,设置GAPDH为内参照。根据Realtime PCR的要求,设计扩增片段长度100~200 bp的引物对。引物信息见表2。利用逆转录试剂盒提供的通用引物Oligo dT Primer和Random 6 mers将提纯的mRNA逆转录为cDNA,并行定量分析。以上述得到的cDNA为模板,在上下游引物的引导下扩增靶基因片段,采用ABI7500系统的"相对定量"方法(Relative Quantitation)。反应结束后确认扩增曲线和溶解曲线,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析法进行相对定量分析:ΔCt=目的基因Ct值-GAPDH Ct值,-ΔΔCt=正常对照组ΔCt平均值-各样品ΔCt,$2^{-\Delta\Delta Ct}$反映各样品相对正常对照组样品目的基因的相对表达水平。

表2 用于OCN实时定量分析的引物设计

靶基因	引物序列	产物长度(bp)
OCN	上游:5′-GGCAGCGAGGTAGTGAA-3′	147
	下游:5′-CTGAAAGCCGATGTGGT-3′	
GAPDH	上游:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′	159
	下游:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′	

1.3 统计学分析

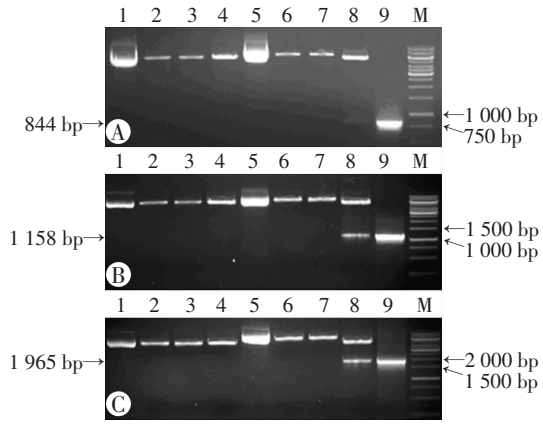
数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行独立样本*t*检验。

2 结果

2.1 pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2表达载体的构建及重组体鉴定

构建的3种重组质粒转化DH5α感受态细胞培养扩增,并进行鉴定。

2.1.1 双酶切实验 将含重组子的阳性菌落在Amp(+)的LB培养基中扩大培养,提取质粒进行*Sal* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切鉴定,插入了FNⅢ7-10、CDH11 EC1-2和FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2片段的重组质粒均可切出预期大小的片段,分别位于约800、1 100、1 900 bp处(图1),与844、1 158、1 965 bp的理论值相符。说明重组载体构建初步成功。



1:pET22b空质粒;2:pET22b+*Sal* Ⅰ单酶切;3:pET22b+*Not* Ⅰ单酶切;4:pET22b+*Sal* Ⅰ+*Not* Ⅰ双酶切;5:重组质粒;6:重组质粒+*Sal* Ⅰ单酶切;7:重组质粒Ⅰ单酶切;8:重组质粒+*Sal* Ⅰ+*Not* Ⅰ双酶切;9:菌落PCR产物;M:DNA标准;A:pET22b-CDH11 EC1-2;B:pET22b-FNⅢ7-10;C:pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2

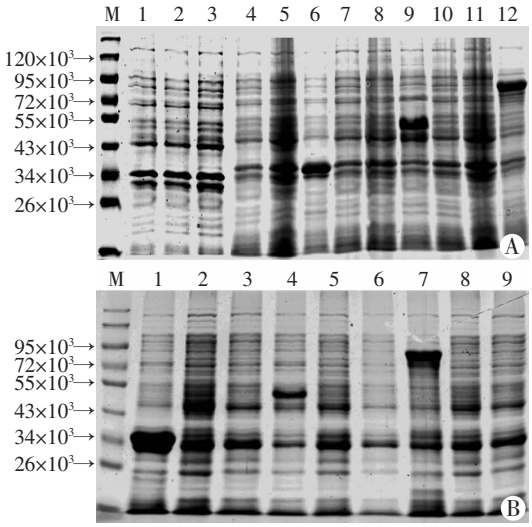
图1 3种重组质粒的酶切和PCR鉴定

2.1.2 DNA测序 各靶基因片段按预期要求插入pET22b载体,插入方向、碱基种类、阅读框均正确(除pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2重组质粒在1 023位出现一个无意突变gaa→

gag,Glu→Glu)。测序结果与 GenBank 中公布的相应基因序列均吻合。

2.2 rFN/CDH 融合蛋白的表达、属性鉴定

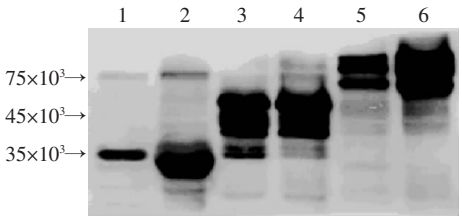
2.2.1 rFN/CDH 在 Rosetta-gami(DE3)中的诱导表达 分别收集重组菌体裂解产物的上清和沉淀(包涵体),利用 SDS-PAGE 进行表达形式分析,结果表明:rFN/CDH 在上清(图 2A)和沉淀(图 2B)中均有高效表达,且位于约 80×10^3 处,与理论值(75×10^3)相符。



A:rFN/CDH,阳性对照 FNⅢ7-10,CDH11 EC1-2,阴性对照 pET22b 的包涵体表达形式 M:蛋白标准;1~3:未诱导 pET22b 的表达;4~6:诱导 0 h CDH11 EC1-2(35×10^3)的表达;7~9:FNⅢ7-10(50×10^3);10~12:rFN/CDH(80×10^3)诱导 4~6 h 的表达;B:rFN/CDH 及 FNⅢ7-10 和 CDH11 EC1-2 的可溶性表达形式 M:蛋白标准;1~3:未诱导 CDH11 EC1-2(35×10^3)的表达;4~6:FNⅢ7-10(50×10^3)诱导 0 h 的表达;7~9:rFN/CDH(80×10^3)诱导 4~6 h 的表达

图 2 rFN/CDH 在 Rosetta-gami(DE3)中的诱导表达

2.2.2 Western blot 法鉴定 rFN/CDH 融合蛋白的属性 rFN/CDH、FNⅢ7-10 和 CDH11 EC1-2 均如预期估计,在约为 75×10^3、45×10^3、35×10^3 处产生杂交条带,验证了各个融合蛋白表达属性的准确性。见图 3。

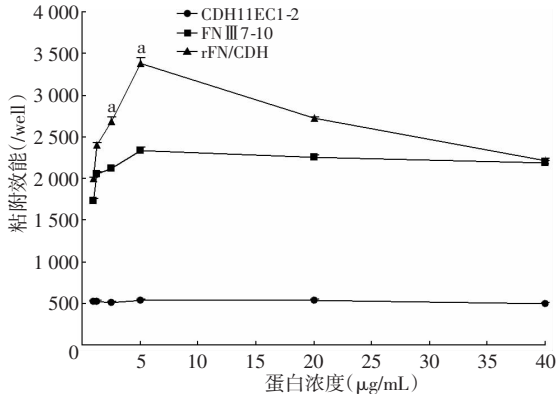


1~2:可溶性和包涵体 CDH 杂交条带位于约 35×10^3 处;3~4:可溶性和包涵体 FN 杂交条带位于约 45×10^3 处;5~6:可溶性和包涵体 rFN/CDH 杂交条带位于约 75×10^3 处

图 3 rFN/CDH 融合蛋白的免疫印迹分析

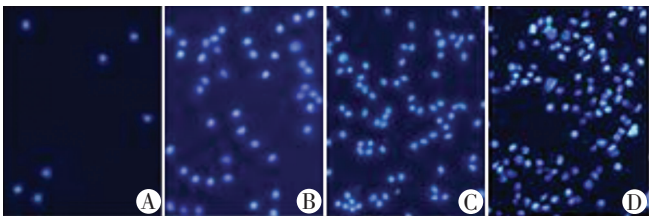
2.3 rFN/CDH 融合蛋白的促粘附活性

与 PBS 空白对照组相比,在 rFN/CDH 实验组,FN 阳性对照组和 CDH 阳性对照组涂层的 TCPS 表面,成骨细胞株 MC3T3-E1 的粘附数量均有显著增加;rFN/CDH 涂层的 TCPS 表面对成骨细胞株 MC3T3-E1 的吸附作用最为强烈,0~40 μg/mL 融合蛋白 rFN/CDH 均明显高于阳性对照组。0~10 μg/mL 呈现粘附效能-浓度正相关;浓度依赖趋势提示 rFN/CDH 的适宜作用浓度为 5 μg/mL,此浓度下 rFN/CDH 对 MC3T3-E1 的吸附作用较单独 FN 或 CDH 作用高出 40% 和 192%($P<0.05$);rFN/CDH 具有良好的促进成骨细胞粘附的生物活性。见图 4、5。



a:$P<0.05$,与 CDH11 EC1-2 和 FNⅢ 7-10 比较

图 4 rFN/CDH 促进 MC3T3-E1 粘附效能-浓度曲线



A:Hoechst 标记的 MC3T3-E1 在 PBS 空白对照;B:CDH 阳性对照(5 μg/mL);C:FN 阳性对照(5 μg/mL);D:rFN/CDH 实验组(5 μg/mL)

图 5 倒置荧光显微镜下观察 rFN/CDH 的促粘附活性 (×200)

2.4 rFN/CDH 融合蛋白的促成骨作用

2.4.1 rFN/CDH 融合蛋白影响 hMSCs 成骨诱导后 ALT 酶活力 ALP 酶活力在 hMSCs 诱导 10 d 后即有变化。在 rFN/CDH(5 μg/mL)处理的 TCPS 表面,ALP 酶活力最高为 14.46±0.46,分别较 CDH 阳性对照组(9.09±0.12)和 FN 阳性对照组(10.64±0.37)增加 59% 和 34%($P<0.05$)。提示 rFN/CDH 较 CDH 和 FN 具有更好的促进早期发生成骨分化的作用。

2.4.2 rFN/CDH 融合蛋白影响 hMSCs 成骨诱导后 OCN 基因表达 在 rFN/CDH(5 μg/mL)处理的 TCPS 表面,OCN mRNA 表达水平是 CDH 和 FN 阳性对照组的 1.69 倍和 2.27 倍($P<0.05$)。提示 rFN/CDH 可更好地促进和启动 hMSCs 成骨相关基因 OCN 的表达上调,rFN/CDH 具有良好的促进细胞成骨分化的生物活性,用 rFN/CDH 涂层的 TCPS 表面对干细胞朝成骨方向分化具有显著影响。

3 讨论

骨种子细胞在支架材料界面的高效粘附和靶向分化是骨修复性能的关键,但目前采用的多种界面改造手段由于所选择的靶分子作用单一、活性有限,修饰方

法的负面作用等严重限制了细胞-界面-骨组织的生物和力学整合。本研究旨在通过设计和合成一种双嗜性粘附分子增强种子细胞在材料界面的成骨性能。我们在诸多粘附分子和信号因子中,筛选了 FN 和 CDH11 作为嵌合蛋白的功能前体分子。

FN 在骨发生过程中扮演了重要角色,是 ECM 微环境中含量最高,且与成骨细胞的结合能力强于其他 ECM 蛋白的一种组分。FN-整合素结合不仅使粘附增强、细胞伸展、细胞骨架组织和黏着斑形成,而且可活化黏着斑激酶(FAK)、桩蛋白、Src 等信号分子,激活 MAPK、JUK 等信号通路,从而调节细胞生长和分化[1]。其优越的促粘附效能已被越来越多的研究证实并被应用于界面修饰。故 FN 在研究中可承担通过"异嗜"方式增强细胞粘附的功能单位。

受 FN"异嗜"效应的启发,我们认为细胞粘附不仅是细胞与基质间的机械聚集,而且可触发细胞内和细胞间的一系列变化从而引起信号传递、功能协调。而钙粘附蛋白可以通过"同嗜性"方式增强同种细胞之间的精密协调,并形成多种细胞间连接以促进局部毗邻细胞间的通讯。因此,我们在前期工作中了解和考察了一种具有"同嗜"效应的粘附分子,即 CDH11 的生物学作用。CDH11 与成骨功能紧密相关,在 MC3T3-E1 细胞培养 1 周后 CDH11 表达增加伴 ALP 活性上调,提示在成骨分化期两者具有协同性表达机制[2-3]。Kudo 等[4]发现 CDH11 可直接调控 MSCs 向骨细胞和软骨细胞的分化,提示 CDH11 可能是成骨分化的刺激因素或协同刺激因素。故 CDH11 在本研究中可承担通过"同嗜"方式增强成骨的功能单位。

我们前期研究发现,将脂质体介导的 CDH11 cDNA 转染体外分离培养的 BMSCs,行成骨诱导发现细胞表达更高的 ALP 活性和 OCN 染色阳性率[5]。而 BMSCs 在 CDH11 涂布的同种异体脱钙骨基质材料表面正常增殖,且表现为更高的粘附数和上架率,及成骨分化程度(ALP 活性和 OCN 免疫组化染色阳性率)[6]。进一步实验表明:利用 CDH11 转染的兔 BMSCs 复合胶原海绵修复骨缺损时,CDH11 基因早期上调性表达,并于术后 4 周即可发现骨缺损区有新骨生成[7]。以上结果提示 CDH11 是一种有优越潜能的仿生修饰分子,对其的深入研究可能会在组织修复和再生领域发挥重要意义。

基于此,我们预期获得一种具有粘附和成骨双重功能的蛋白分子,但关键的问题是如何实现对 FN 和 CDH 基因的拼接,使得 FN 和 CDH 片段在空间构象上避免相互竞争和牵制,从而得到有生物功能的融合蛋白。为解决这一问题,我们着重预测和探讨了不同重组条件下融合蛋白的高级结构,以此作为设计有生物功能的融合蛋白的主要依据。本研究采用同源建模的方法实现 FN 和 CDH11 融合蛋白分子模拟,发现 N-terminal-CDH11 EC1-2-$(GlySer)_3$-FNⅢ7-10 这一构架结构较适合 FNⅢ7-10 和 CDH11 EC1-2 的基因拼接。在该状态下,FN 和 CDH11 两者均较好地模拟了各自的天然结构,在空间构象上,FNⅢ7-10 呈"棒状"结构,其关键基序 RGD 和 PHSRN 位于同一平面并向外突出,便于和 INT 等分子作用[8]。CDH11 EC1-2 暴露于分子整体外部,便于和相邻的 EC1-2 交叉结合形成有功能的二聚体形式[9]。以此种重组框架,我们获得了融合蛋白的氨基酸序列,进行后续的生物信息学分析并得到了微克级、高纯度[$D(260)/D(280) = 1.8 \sim 2.0$]、全长近 2.0 kb 的 FN/CDH 融合基因。

生物信息学提示 rFN/CDH 融合蛋白在原核系统主要以包涵体形式表达,我们采取多种措施力求蛋白的可溶性表达。首先,通过对融合基因的酶切位点分析,我们筛选了 *Sal* Ⅰ和 *Not* Ⅰ两个酶切位点插入融合基因,进而构建了全长约 7.5 kb 的 pET22b-FNⅢ7-10/CDH11 EC1-2 重组载体。双酶切反应及 DNA 测序结果均显示插入序列完全正确,适于后续的转化反应。其次,在表达菌的选择上,我们选择了改良的 *E. coli.* 系统 Rosetta-gami(DE3),通过与 BL21 中的诱导表达比较,结果证实了 Rosetta-gami(DE3)用以真核蛋白表达的有效性和适宜性。再次,对 rFN/CDH 融合蛋白在 Rosetta-gami(DE3)表达系统内的各种诱导条件进行了优化,其中包含 IPTG 浓度、初始诱导 OD 值、诱导时间、诱导温度等。最终发现 0.4 mmol/L IPTG 浓度,0.5~0.6 重组菌对数生长值,30 ℃和 4~6 h 诱导有利于 rFN/CDH 的生成。SDS-PAGE 结果显示尽管有大量包涵体形成,仍然有近一半的融合蛋白是以可溶性形成产生,利用 Ni-NTA 金属离子层析纯化使得蛋白纯度达到 96% 以上,免疫印迹结果亦提示重组质粒在 Rosetta-gami(DE3)中的表达无确属一种 FNⅢ7-10 和 CDH11 EC1-2 的嵌合蛋白。这一高效、特异、准确表达为后期功能实验奠定了基础。

本融合蛋白的功能验证分为粘附和成骨两个方面进行。采用目前广泛使用的离心促粘附实验进行粘附的检测,该方法可通过简单的低速离心促进细胞表面受体与粘附分子的作用,从而短时间内实现细胞在材料表面的粘附,且有效控制非特异性结合[10]。实验结果表明嵌合蛋白的粘附活性在一定程度上实现了对 FN 和 CDH11 功能的叠加,促粘性能大幅度提高。在成骨的检测中筛选了 ALP 和 OCN 两个经典指标,以 hMSCs 为骨种子细胞,利用 DXM + β-GP + Vit-C 的化学诱导方案进行成骨诱导分化实验,亦取得积极的阳性结果,ALP 酶活性和 OCN 基因表达上调,证实了早

期的成骨分化。由此证明:如前期预测,rFN/CDH 的确具有“促粘”和“促成骨”的双重生物活性,可作为一种理想的仿生修饰分子进行生物界面的构建。

参考文献:

[1] Mousa S A. Cell adhesion molecules: potential therapeutic and diagnositic implications[J]. Mol Biotechnol, 2008, 38(1): 33 - 40.
[2] Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity [J]. Genes Dev, 2000, 14(10): 1169 - 1180.
[3] Hulpiau P, van-Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(2): 349 - 369.
[4] Kii I, Amizuka N, Shimomura J, *et al*. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(11): 1840 - 1849.
[5] 向强, 邓聪颖, 陈庆海, 等. Cad-Ⅱ基因转染的 hMSCs 在异种骨基质材料上的粘附和增殖研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(5): 383 - 386.
[6] 向强, 邓聪颖, 张远, 等. 成骨细胞特异性钙黏蛋白涂布脱钙骨基质材料对 BMSCs 黏附及成骨分化能力的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(5): 602 - 605.
[7] 向强, 邓聪颖, 郑文杰, 等. Cad-Ⅱ基因转染的兔骨髓间充质干细胞自体移植术后的表达研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(1): 49 - 51.
[8] Redick S D, Settles D L, Briscoe G, *et al*. Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis[J]. J Cell Biol, 2000, 149(2): 521 - 527.
[9] Patel S D, Ciatto C, Chen C P, *et al*. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity[J]. Cell, 2006, 124(6): 1255 - 1268.
[10] Avila G, Misch K, Galindo-Moreno P, *et al*. Implant surface treatment using biomimetic agents[J]. Implant Dent, 2009, 18(1): 17 - 26.

(**收稿**:2013-06-17;**修回**:2013-08-24)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2013)23-2541-01

个案与短篇

不典型胚胎发育不良性神经上皮瘤 2 例

陈 明[1],李 凤[2],韩福刚[1],舒 健[1] (646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院:放射科[1],神经内科[2])

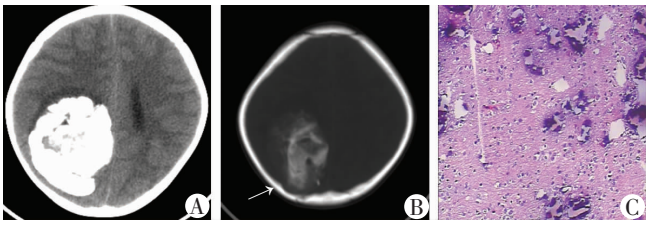
[**关键词**] 胚胎发育不良性神经上皮瘤;CT;MRI
[**中图法分类号**] R730.264 [**文献标志码**] B

胚胎发育不良性神经上皮瘤(dysembryoplastic neuroepithelial tumors,DNET)是一种少见的良性混合性神经元-神经元胶质细胞肿瘤[1],通常具有典型的临床表现和影像学特点,手术切除预后良好。现报告 2 例不典型 DNET。

1 临床资料

病例 1:患者,女性,5 岁,因“头痛、呕吐 1 d,昏迷 3 h”于 2012 年 4 月 6 日入我院。头颅 CT 平扫示右侧枕顶叶巨大团块状高密度影,大小约为 5.4 cm×7.2 cm,边界较清,其内见团块状不规则钙化,密度不均,CT 值 108 ~ 313 Hu,病灶周围见少许弧形稍低密度影;右侧侧脑室后角推挤、受压,右侧侧脑室颞角扩张、积水,中线结构明显向左移位,环池变窄、显示不清。病灶邻近右侧顶骨骨质吸收变薄(图 1A、B)。查体不能配合,实验室检查未见异常。急诊手术所见:右侧顶枕叶皮层区混杂密度肿块,质硬,大小约为 6.0 cm×7.0 cm,部分与周围脑组织分界不清,其内不均匀团块状钙化,肿瘤血供尚可。术后患者因呼吸衰竭死亡。免疫组化:EMA(-),GFAP(部分+),Ki-67(+ <3%),NF(+),Syn(+),Vim(部分+)。病理诊断:胚胎发育不良性神经上皮瘤(图 1C)。

病例 2:患者,男性,15 岁,因“1 个月前出现左下肢乏力伴行走不稳,症状逐渐加重 1 d”于 2013 年 5 月 26 日到我院门诊就诊,患者无头痛呕吐、肢体抽搐,脑膜刺激征阴性。门诊 CT 平扫示右侧顶叶见一大小约 5.5 cm×5.0 cm 的类圆形低密度区,密度均匀,CT 值约 15 Hu,病灶边界清楚,周围可见轻度水肿带,中线结构轻度左偏。入院后头颅 MRI 示右侧顶叶见一类圆形长 T_1、长 T_2 异常信号影,大小约 4.9 cm×5.5 cm×5.1 cm,分界较清,FLAIR 呈稍高信号,DWI 呈低信号,病灶周围伴轻度水肿带,增强扫描囊壁边缘见小结节状、环状明显强化影,囊内容物未见强化(图 2)。手术所见:右侧顶叶皮层区见一大小约为 5 cm×5 cm×6 cm 的囊性病灶,分界清楚,质地软如黏液胶冻样,表面血管稀疏,穿刺引流出淡黄色黏液约 25 mL。患者手术治愈后出院。免疫组化:EMA(-),GFAP(+),Ki-67(+ <1%),NF(+),Syn(部分+),Vim(+)。病理诊断:胚胎发育不良性神经上皮瘤。



A:头颅 CT 平扫 右侧枕顶叶不均匀团块状钙化,病灶边界清楚,周围无明显水肿;B:骨窗示病灶邻近右侧顶骨骨质吸收变薄(箭头);C:胚胎发育不良性神经上皮瘤病理学观察(HE ×200) 特异性胶质神经元成分,钙质丰富,少数单个神经元漂浮在黏液样基质中

图 1 病例 1 头颅 CT 表现及病理学观察

(下转 2558 页)

[**通信作者**] 韩福刚,E-mail:8311hfg@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.1036.016.html(2013-10-14)