DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.021
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2029-04

论著

重组人脂多糖结合蛋白的氨基末端片段在昆虫细胞中的表达、纯化及功能鉴定

葛晓冬,刘友生,王晓东,王长松,邓 军 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 以昆虫sf21、sf9细胞表达、分泌人源脂多糖结合蛋白的氨基末端片段(NH-LBP),并初步观察其生物学特性。方法 以昆虫sf21和sf9细胞于完全Grace培养基中分别扩增编码人源NH-LBP的杆状病毒,再以sf21和sf9细胞于SF-900Ⅱ无血清培养基中表达NH-LBP,并以TALON柱芯对NH-LBP进行亲和纯化,此后以Tris-Tricine电泳、毛细管电泳、流式细胞分析实验(flow cytometry analysis)、TNFa分泌实验的方法鉴定NH-LBP的纯度及生物学活性。结果 昆虫sf21和sf9细胞均能有效地扩增编码NH-LBP的杆状病毒,其中sf9细胞扩增病毒的能力为sf21细胞的1.18倍。sf21细胞成功地表达、分泌NH-LBP,并经TALON柱芯亲和纯化,其纯度达98%,NH-LBP具有明确的与脂多糖(LPS)结合的生物学活性,而sf9细胞却不能表达、分泌NH-LBP。结论 以昆虫sf21细胞分泌表达具有活性人源NH-LBP是可行的,昆虫sf9细胞可扩增编码NH-LBP的杆状病毒,但不能表达、分泌NH-LBP。

关键词:昆虫细胞;人源氨基末端脂多糖结合蛋白;无血清培养基;杆状病毒
中图法分类号:Q513.2;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Expression, purification and identification of human N terminal lipopolysaccharide binding protein by insect sf21 or sf9 cells

GE Xiao-dong, LIU You-sheng, WANG Xiao-dong, WANG Chang-song, DENG Jun (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express and secrete human N terminal lipopolysaccharide binding protein (NH-LBP) by insect sf9/sf21 cells and to investigate its biological functions. Methods Baculovirus coding NH-LBP was amplified by insect sf9/sf21 cells in Grace culture medium, and then NH-LBP was expressed and secreted by insect sf9/sf21 cells in serum-free culture medium (SF900Ⅱ), at last, NH-LBP was purified by affinity binding chromatography with TALON and certified by Tris-Tricine electrophoresis, capillary electrophoresis (CE), flow cytometric analysis, and TNFα release of human U937 cells. Results Insect sf9/sf21 cells could amplify the baculovirus coding human NH-LBP. The ability of sf9 to amplify the baculovirus was 1.18 times as high as that of sf21 cells. NH-LBP was expressed/secreted by sf21 cells and purified efficiently with TALON. The purity was over 98% and could bind to lipopolysaccharide (LPS) directly, but Sf9 cells could not express/secrete NH-LBP. Conclusion It is feasible to express and secrete human NH-LBP with activity by insect sf21 cells. Sf9 cells can't express/secrete NH-LBP though it can amplify the baculovirus coding human NH-LBP efficiently.

Key words: insect cell; human N terminal lipopolysaccharide binding protein; serum-free medium; Baculovirus

脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP),是机体在革兰阳性菌(gram-negative, G^-)感染等多种损伤因素作用下,主要由肝细胞产生的一种介导内毒素与靶细胞受体结合的应激反应蛋白[1]。LBP能显著促进脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与单核/巨噬细胞膜表面的CD14(mCD14)结合,形成LPS-LBP-mCD14复合物[2],经TLR4-MD-2-MYD88和NF-Kappa B途径,激活单核/巨噬细胞,促进炎症的发生和发展[3]。为探讨人源氨基末端脂多糖结合蛋白(NH-LBP)的生物学功能,本研究以昆虫sf21和sf9细胞分泌、表达人源NH-LBP并有效纯化、鉴定,为以NH-LBP为抗原制备基因工程抗体,研究LBP在感染患者体内的变化规律,通过抗体来抑制患者体内LBP介导的过度炎症反应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

昆虫细胞培养基Grace's insect cell culture medium(11300-043)、SF-900Ⅱ SFM(10902-088)和sf21、sf9昆虫细胞购自:购自

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271342)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271342)
作者简介:葛晓冬(1971-),男,河北省保定市人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤分子病理机制方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:刘友生,电话:(023)68754431
收稿日期:2003-08-01;修回日期:2004-04-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GIBCO (Invitrogen) 公司; Yeast extract (0127-01-7)、Tryptone (0123-01-1): 购自 DIFCO 公司; 6× His 亲和纯化 TALON 柱芯 (Cat. 8908-2): 购自 Clontech 公司。鼠抗 6× His 单克隆抗体 (No. 1922416): 购自 Roche 公司。

1.2 人NH-LBP的表达、纯化及鉴定

1.2.1 昆虫sf21、sf9细胞的培养 细胞以完全Grace培养基(0.333% yeast extract、0.035% $NaHCO_3$、0.333% lactoalbumin hydrolyate 和 0.03‰ glutamine), 于 27 ℃下培养、传代。

1.2.2 编码人NH-LBP杆状病毒的扩增及其滴度的测定 当昆虫细胞附壁率达90%时, 以1∶40体积比, 加入含有编码人源NH-LBP的杆状病毒液(由本课题组以BAC-TO-BAC杆状病毒表达系统制备[4]), 于27 ℃下扩增病毒5 d, 此后用新扩增的病毒液再次感染正常生长的昆虫细胞, 进行病毒扩增, 重复4次[5]。病毒滴度由病毒空斑实验测定: 昆虫细胞接种于6孔板(1×10^6/孔), 每孔加入不同稀释度的第4代病毒液, 感染1 h后, 吸出培养基, 加入含1% 琼脂糖凝胶的完全Grace培养基(约35 ℃), 于27 ℃下孵育5 d。加入1 ml 0.03%中性红液, 于27 ℃下放置2 h, 吸去染色液后再放置2 h, 计数每孔的空斑数。病毒滴度为空斑数X每毫升病毒液稀释倍数(即每毫升病毒的噬斑形成单位pfu/ml)。

1.2.3 人NH-LBP的表达、纯化 以第4代病毒液感染正常生长的昆虫细胞(附壁率90-95%), 感染12 h后换无血清SF-900 II培养基[6], 于27 ℃下继续孵育、表达72 h后, 回收培养基上清, 并补NaCl至终浓度300 mmol/L, 调pH 7.5, 以针对6× His的TALON亲和纯化柱芯, 分别用10、150、300 mmol/L Imidazole进行梯度洗脱、纯化, 各个洗脱峰单独回收、脱盐后冻干。

1.2.4 人NH-LBP的鉴定 ①Tris-Tricine电泳及毛细管电泳: 用12%分离胶(聚合度6%)、4%浓缩胶(聚合度3%)[7], 进行Tris-Tricine垂直电泳, 对蛋白质分子量进行测定; 用毛细管24 cm×50 μm, 进样品压20 Psi/s, 电泳10 kV, 进行毛细管电泳, 对蛋白质纯度进行鉴定。②Western Blot: 以抗6× His单克隆抗体为一抗、HRP-羊抗鼠IgG单抗为二抗, 并以DAB显色。

1.3 人NH-LBP的生物学活性研究

1.3.1 流式细胞分析实验(Flow cytometric analysis) 人源LBP氨基末端区域应具有与LPS结合的能力, 因此以Ficoll液提取人外周血单核细胞层细胞(PBMC), 以PBS洗涤并调PBMC浓度至4×10^6/ml。荧光标记的LPS(FITC-LPS, 工作浓度2.5 μg/ml)与所纯化蛋白NH-LBP(10 μg)共孵育10 min, 并以10 μg/ml人血清白蛋白作为空白对照, 此后分别加入2×10^5 PBMC, 37 ℃孵育30 min[8], 以PBS冲洗细胞2次后, PBMC用流式细胞仪检测其荧光强度, 鉴定此蛋白是否具有与FITC-LPS结合的能力。

1.3.2 TNFα分泌实验 佛波脂(PMA 10 ng/ml)诱导分化U937细胞成熟后, 用含15%新生小牛血清的RPMI1640培养基悬浮并调整浓度为1×10^6/ml, 24孔板内加入1×10^6/孔U937细胞[8]、LPS(10 ng/ml)及所纯化蛋白质NH-LBP(3.3 μg/孔), 并以LBP(3.3 μg/孔)作为对照, 在37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱中孵育, 分别于15 min至24 h共6个时相点, 吸取上清液, XH6020-4探头γ免疫记数仪放免法(西安262厂)检测TNFa含量。

1.4 统计学方法

以SPSS10.0软件进行 t 检验和正态分布检验。

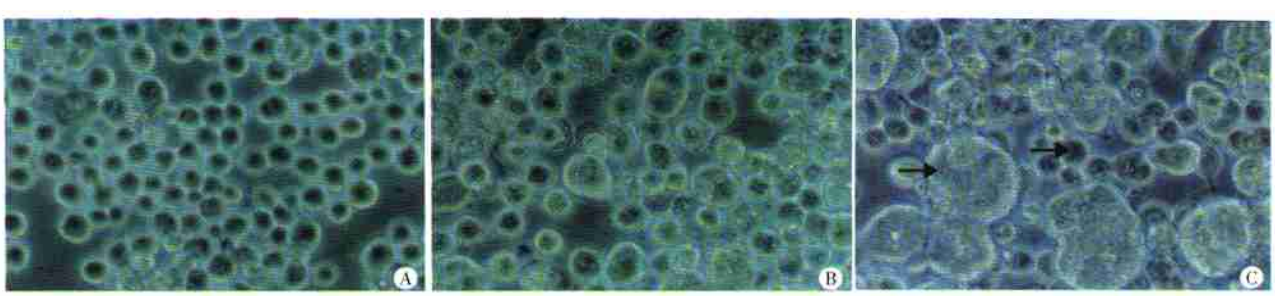
2 结果

2.1 人NH-LBP的表达、分泌

昆虫sf21、sf9细胞在完全Grace培养基中均生长迅速, 倍增时间约为24 h(图1A)。细胞感染病毒后, 24 h内出现增殖停止, 48 h后部分细胞体积稍增大, 胞浆中颗粒数明显增加(颗粒由肿胀的细胞器和成团分布的病毒体组成)[4], 细胞膜表面凸凹不平, 见伪足样突起, 感染4~5 d后细胞浮起, 部分细胞坏死破裂(图1B)。

将昆虫sf21、sf9细胞所扩增的第4轮病毒液稀释10^6倍后, 分别进行4轮病毒滴度测定。sf21、sf9细胞的病毒滴度分别为$(19.5\pm1.3)\times10^7$和$(23\pm2.6)\times10^7$, sf9细胞扩增病毒的能力为sf21细胞的1.18倍, 可见sf9细胞扩增病毒的能力稍强于sf21细胞。

在Sf-900 II培养基进行表达的sf9细胞, 镜下仅见少许细胞体积轻度增加(细胞直径增加约20%), 胞浆内颗粒数稍增多; 而进行表达的sf21细胞形态变化显著, 在感染后的第1~2天, 部分细胞体积开始迅速增大, 在感染后的第3天其细胞直径为正常生长sf21细胞的4倍, 细胞形状不规则, 胞浆内颗粒数显著增多, 在感染后的第5天其细胞直径(约120 μm)为正常生长sf21细胞(约15 μm)的8倍以上, 并有伪足状突起(图1C)。



A: sf21 cells in normal growth; B: sf21 cells in producing virus; C: sf21 cells in expression; ←: Giant cell of sf21 in expression. There are a lot of granules in the cytoplasm

图1 正常生长、扩增病毒、分泌表达时的sf21细胞 (×200)

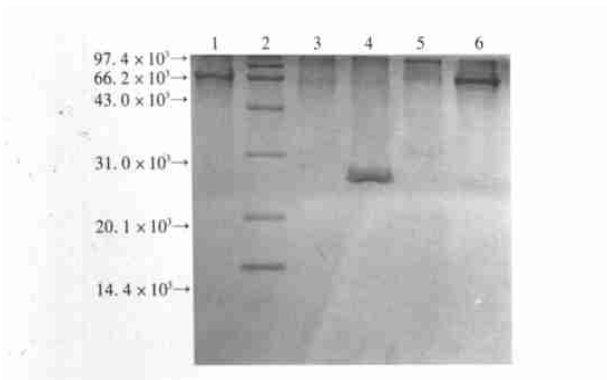
Fig 1 sf21 cell in normal growth, producing virus, expression (×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　人 NH-LBP 的纯化及鉴定

sf21 和 sf9 细胞进行了 10 轮分泌表达, 其表达上清分别以 TALON 柱芯, 经咪唑液梯度洗脱纯化, 其中 sf21 细胞表达上清的 150、300 mmol/L 咪唑洗脱峰明显高于 sf9 细胞表达上清所获得的洗脱峰。

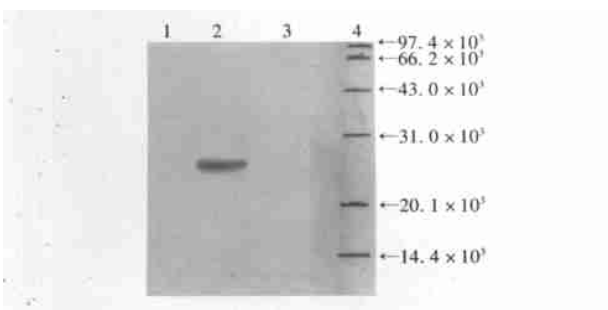
在 Tris-Tricine 电泳中, 于 sf21 细胞表达上清所获得的 150 mmol/L 咪唑洗脱峰中可见单一的蛋白质条带(图 2), 其相对分子质量(Mr)为 27×10^3, 同预计的目的蛋白的 Mr 大小一致, 共获得约 8 mg; 而在 sf9 细胞分泌上清所获得的洗脱峰中均无此条带。在 Western Blot 鉴定中, 见 sf21 细胞表达上清的 150 mmol/L 咪唑洗脱峰有一分子量为 27×10^3 的棕褐色蛋白质条带, 其余无条带出现, 提示所纯化 27×10^3 蛋白质含有 6× His, 为目的蛋白 NH-LBP(图 3)。将 NH-LBP 进行毛细管电泳, 在电泳 8 min 左右出现 1 个单一吸收峰, 测定纯度为 98%。



1: Supernatant after purification; 2: Protein marker; 3: Eluate from 10 mmol/L imidazole; 4: Eluate from 150 mmol/L imidazole; 5: Eluate from 300 mmol/L imidazole; 6: Supernatant before purification

图 2　洗脱峰及纯化前后表达上清的 SDS-PAGE

Fig 2　SDS-PAGE of eluates and expressed supernatants before and after purification



1: Eluate from 10 mmol/L imidazole; 2: Eluate from 150 mmol/L imidazole; 3: Eluate from 300 mmol/L imidazole; 4: Protein marker

图 3　洗脱峰蛋白质免疫印迹

Fig 3　Western blot analysis of eluates

2.3　人 NH-LBP 的生物学功能测定

在用人 PBMC 进行的 FACS 实验中, 可见 NH-LBP 实验组的吸收峰左移, 其荧光强度为对照组的 0.39 倍, 说明 NH-LBP 能与 FITC-LPS 结合, 抑制 FITC-LPS 与 PBMC 的结合(FITC-LPS 能与 PBMC 自发部分结合), 见图 4。

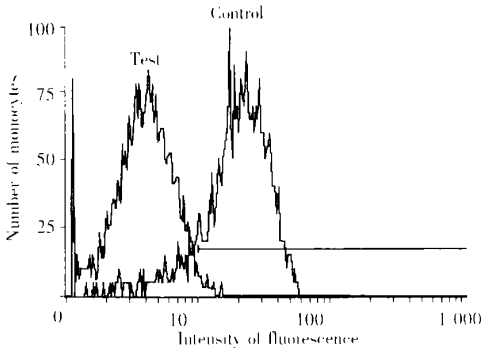


图 4　FITC-LPS 与人 PBMC 结合试验

Fig 4　Binding of FITC-LPS to human PBMC (2×10^5) with 10 μg/ml NH-LBP, or 10 μg/ml albumin

在 TNFa 分泌实验中, LPS 能直接少量与 U937 细胞结合, 促进 TNFa 的分泌, 但当加入 NH-LBP 时, TNFa 的分泌量下降; 我们之前的研究[8] 在含有完整 LBP 及 LPS 的基础上, 当加入 NH-LBP 时, TNFa 的分泌量明显下降($P<0.05$), 表明 NH-LBP 能与 LBP 竞争同 LPS 的结合, 从而减少了 LPS-LBP-mCD14 复合物的形成, 导致 U937 细胞分泌的 TNFa 量下降(图 5), 证明所制备人源 NH-LBP 具有一定的生物学活性。

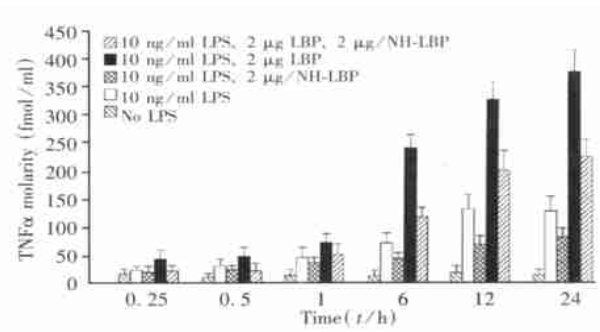


图 5　人 U937 细胞刺激后 TNFa 分泌实验

Fig 5　Release of TNF-α by human U937 cells

3　讨论

LBP 是人体内一种重要的急性期炎症反应介导蛋白质, 起着促进、加重炎症反应的生物学效应。LBP 在人体内的变化规律, LBP 在何种浓度下会导致过度炎症反应, 以及通过抗体阻断 LBP 的生物学效应来保护机体, 已成为抗炎治疗的重要研究方向, 本实验采用 sf21 昆虫细胞成功地制备了约 8 mg 人源 NH-LBP, 其纯度达 98%, 并具有明确的与 LPS 结合的生物学活性, 可满足作为抗原的要求, 为制备其单克隆抗体、研

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

究人体内 LBP 的变化规律等研究奠定了基础。

在培养昆虫细胞过程中发现：附壁法培养昆虫细胞，在细胞吹起、分瓶时，所需力量较大，细胞机械损害明显，在传代 7～8 轮后细胞出现衰老，这种现象与其它实验室所报道的昆虫细胞易衰老一致；而将部分 sf9 和 sf21 细胞置于玻璃瓶中悬浮培养，分瓶时只需将细胞团轻轻吹散，则细胞损害较弱，在传代 7～8 轮后细胞活性仍很好。证明对于昆虫细胞，其附着力虽然明显小于肿瘤细胞等，但液体的快速机械吹打对昆虫细胞是有害的，为维持昆虫细胞的高活性，应采取悬浮培养。在扩增病毒实验中，sf9 细胞扩增病毒的能力为 sf21 细胞的 1.18 倍，这与部分学者报道 sf9 细胞扩病毒力高于 sf21 细胞的结果相近。

在表达人源 NH-LBP 的过程中，sf21 细胞中会出现巨型细胞，对于此现象少见相关文献报道。在实验中，我们发现巨细胞的体积迅速增大，同时周围的其它普通细胞数量迅速减少。巨细胞是由细胞器增生而导致，还是由各个细胞之间相互融合而形成，对此还需进一步研究。实验还显示昆虫 sf9 细胞不能分泌、表达 NH-LBP，这可能有两方面的原因：一方面可能是 sf9 扩增的病毒活性不佳；另一方面可能是 sf9 能正常扩增病毒，但不能有效地转录、翻译和表达。针对第一方面的假设，本研究中以 sf9 扩增的病毒来感染 sf21，结果 sf21 在 SF-900 Ⅱ培养基中能成功分泌、表达 NH-LBP，证明 sf9 能正常扩增病毒；针对第二方面的假设，将 sf9 细胞分泌、表达后的上清，以及将 sf9 细胞体超声粉碎后的胞体蛋白质分别进行包板，并以抗 6xHis 的单克隆抗体为一抗，进行 ELISA 检测，结果为阴性，而以 sf21 细胞分泌、表达后的上清及其胞体蛋白质包板，进行 ELISA 检测，结果为阳性。综上所述，证明 sf9 能有效地扩增病毒，但不能表达该蛋白。对于一个外源的病毒体，它拥有自我的转录和翻译的启动部位，它只需要宿主细胞的转移核糖核酸、核糖体和高尔基复合体就能进行自我表达。但 sf9 只能扩增此病毒，却不能进行表达，其中的机制还有待深入研究。

本课题组以 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统制备人 NH-LBP[4]，其目的基因片段的 N 端带有信号肽序列，而昆虫 sf21 细胞具有信号肽切割、脂肪酸乙酰化、糖基化等翻译后加工的能力[9]，因此 NH-LBP 被 sf21 细胞在无血清培养基中溶解性地表达。蛋白质的可溶性表达避免了再溶这个环节，因此 NH-LBP 可具有较好的空间折叠，经流式细胞分析实验、TNFa 分泌实验证明其具有与 LPS 结合的生物学活性，与人体内全长 LBP 的氨基末端片段的生物学活性一致，满足作为抗原的要求。

在本课题中 NH-LBP 的制备效率约为 6 mg/ml，其效率明显高于一般原核细菌的制备率。人源 NH-LBP 的获得，一方面，高纯度人源 NH-LBP 可以直接注入体内，与体内的全长 LBP 竞争同 LPS 的结合，从而减少 LPS 与体内 LBP 的结合数量，减轻 LBP 介导的炎症反应；另一方面，以人源 NH-LBP 为抗原，对人源噬菌体抗体库进行筛选，制备针对人源 NH-LBP 的单克隆抗体(mAb)，将 mAb 直接注入体内，mAb 可与体内全长 LBP 的氨基末端结合，从而将编码与 LPS 结合的 LBP 氨基末端进行封闭，减少 LPS 与体内 LBP 的结合数量，减轻 LBP 介导的炎症反应，保护机体免受过度炎症反应的损害。人源 NH-LBP 的获得，为探索临床抗炎治疗开创了一个新的方向。

参考文献：

[1] Vesy C J, Kitchens R L, Wolfbauer G, *et al*. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2410－2417.

[2] Berner R, Furll B, Stelter F, *et al*. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(2): 440－445.

[3] Le Roy D, Di Padova, Adachi Y, *et al*. Critical role of lipopolysaccharide binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacterial[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2759－2765.

[4] 王晓东，刘友生，张 杰，等. 人截断型 LBP 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：637－640.

[5] Sperker B, Murdter T E, Backman J T, *et al*. Expression of active human beta-glucuronidase in Sf9 cells infected with recombinant baculovirus[J]. Life Sci, 2002, 71(13): 1547－1557.

[6] Ikonomou L, Bastin G, Schneider Y J, *et al*. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(9): 549－559.

[7] Yoon H S, Lee C S, Lee S Y, *et al*. Purification and cDNA cloning of inducible antibacterial peptides from Protaetia brevitarsis (Coleoptera)[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2003, 52(2): 92－103.

[8] 葛晓冬，刘友生，王晓东，等. 兔源内毒素结合蛋白的提取纯化及体外生物学活性研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(6)：514－518.

[9] Seo N S, Hollister J R, Jarvis D L. Mammalian glycosyltransferase expression allows sialoglycoprotein production by baculovirus-infected insect cells[J]. Protein Expr Purif, 2001, 22(2): 234－241.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net