

重组人趋化因子 RANTES 基因融合表达产物活性分析

杨瑞仪, 冯丽玲, 曾庆平*

(广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405)

摘要 为研制基于病毒受体的抗艾滋病毒感染基因药物,将重组人趋化因子 RANTES 基因导入大肠杆菌中表达谷胱甘肽 S-转移酶(GST)-RANTES 融合蛋白,并回收携带末端延伸肽(TEP)的 RANTES 修饰蛋白. 荧光免疫化学分析表明,2 种非天然 RANTES 蛋白均显示对人外周血淋巴细胞的结合活性. 暗示在细胞表面可能已发生 RANTES 与 CCR5 之间的相互作用. 2 种修饰 RANTES 蛋白都能使人外周血细胞的过氧化物酶活性显著升高,提示这 2 个人造蛋白可能仍存在对淋巴细胞的趋化性诱导.

关键词 趋化因子,基因表达,受体结合,艾滋病
中图分类号 Q78,Q96

Fused Expression and Activity Analysis of Recombinant Human γ -Chemokine RANTES Gene

YANG Rui-yi, FENGLi-ling, ZENG Qing-ping*

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract To prepare a viral receptor-based genetic medicine against infection of AIDS virus, the recombinant human γ -chemokine RANTES gene was introduced into *E. coli* for expressing a glutathione S-transferase (GST)-RANTES fusion protein, and recovering a terminal extension peptide (TEP)-containing modified RANTES protein. The fluorescent immunochemical analysis showed that both non-natural RANTES proteins demonstrated binding activities to human peripheral blood lymphocytes, implying an interaction between RANTES and CCR5 on the cell surface might have occurred. Furthermore, two forms of modified RANTES proteins were able to enhance the peroxidase activity of human peripheral blood cells, suggesting that chemotaxis induction for lymphocytes in these two artificial proteins could be still present.

Key words chemokine, gene expression, receptor binding, AIDS

趋化因子(chemokine)是一类低分子量(8~10 kD)的诱导分泌性细胞因子,它们可通过结合细胞表面的趋化因子受体(如 CCR5 和 CXCR4 等)而诱发致炎性免疫应答^[1]. 最近发现,趋化因子受体还是艾滋病毒感染人体细胞的辅助受体(co-receptor),其中 CCR5 是 M 嗜性毒株(R5 病毒)感染巨噬细胞的辅助受体;CXCR4 是 T 嗜性毒株(X4 病毒)感染 T 细胞的辅助受体^[2]. 人趋化因子 RANTES 和 SDF-1 等结合 CCR5 和 CXCR4 后,通过封闭艾滋病毒入侵细胞的通道及下调 CCR5 与 CXCR4 在细胞外的表达,可阻断艾滋病毒对细胞的感染^[3]. 同时还发现,高加索人种中的 CCR5 缺陷型(CCR5-32)对艾滋病毒感染具有抗性^[4]. 由此可见,人趋化因子在艾滋病预防及辅助治疗中具有潜在应用价值.

我们在人 RANTES 基因克隆、测序和体外表达的基础上^[5],利用大肠杆菌表达重组 RANTES 基因,获得了 GST-RANTES 融合蛋白与 TEP-RANTES 修饰

收稿日期:2002-01-31,接受日期:2002-04-08

国家自然科学基金(No. 39870725)和广东省自然科学基金(No. 980642)资助项目

*联系人 Tel: 020-86591233-2422; Fax: 020-86373516

E-mail: tmbio@gzhtcm.edu.cn

杨瑞仪,女,1972 年 5 月生,硕士,助理研究员

Received: January 31, 2002; Accepted: April 8, 2002

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39870725) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 980642)

* Corresponding author Tel: 020-86591233-2422, Fax: 020-86373516

E-mail: tmbio@gzhtcm.edu.cn

蛋白.初步证实,2种非天然 RANTES 对人外周血细胞均表现受体结合活性与趋化诱导活性,为今后利用重组 RANTES 预防和治疗艾滋病打下了一定的基础.

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

含有 RANTES 基因的 pT-RAN 质粒载体由本室构建^[6].大肠杆菌表达载体 pGEX-2TK 及其宿主菌 BL21 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司.

1.2 基因扩增与质粒构建

以 pT-RAN 为模板,用分别预设 *Bam*H 和 *Eco*R 切点的引物(5'-GGATCCATGICCCCATATTCCTCG3 与 5'-GAATTCCTAGCTCATCTCCAAAGA-3),按 94 °C,30 s,55 °C,30 s,72 °C,1 min,35 循环扩增人 RANTES 基因.将 pGEX-2TK 质粒与 RANTES 基因扩增片段分别用 *Bam*H 和 *Eco*R 消化,经凝胶电泳、回收、纯化、连接和转化后,挑选氨苄青霉素抗性菌落并提取重组质粒进行酶切鉴定.

1.3 诱导表达及产物纯化

将工程菌置于 2YT 培养基(添加 100 mg/L 氨苄青霉素)中,30 °C 培养至 A_{600} 1.0,加入 IPTG(终浓度 1.0 mmol/L),继续培养 3~4 h,离心收集菌体,重悬于 PBS 中,加入溶菌酶(0.1 mg/ml),反复冻融 10 次,裂解菌体,12 000 r/min 下离心 10 min,收集上清液.将含有融合蛋白的上清液用 MicroSpin™ GST Purification Module(Amersham Pharmacia Biotech 公司)过柱,离心除去未结合杂蛋白,PBS 洗两次.用谷胱甘肽洗脱缓冲液收集 GST-RANTES 蛋白.按每 mg 融合蛋白加入 1 U 凝血酶,于 22 °C 消化 16 h,离心收集 TEP-RANTES 裂解蛋白.

1.4 Western 印迹杂交

将 RANTES 及其修饰蛋白进行 15% SDS-PAGE,电转硝酸纤维素膜和 Western 印迹杂交.用封闭液在 37 °C 封闭 30 min,洗膜,加入羊抗人 RANTES(C19)抗体(Santa Cruz)(1:1000),37 °C 结合 30 min,洗膜,加入 HRP 标记的马抗羊 IgG(Jakson Immno Res)(1:1000),37 °C 结合 30 min,洗膜,DAB 显色鉴定表达产物.

1.5 荧光免疫化学分析

由正常人全血分离外周血细胞,用 10%胎牛血清 RP1640 重悬,分别加入 500 ng 重组人 RANTES 标准品(Intergen,68 肽,纯度 98%)、GST-RANTES 和 TEP-RANTES,阴性对照加等体积 PBS 稀释液,离心

收集细胞,PBS 重悬,经制片、固定、温育和洗涤后,依次加入羊抗人 RANTES(C19)抗体(Santa Cruz)(1:1000)和 FITC 标记的兔抗羊 IgG(北京鼎国)(1:50)(等体积 PBS 与 1:5000 伊文斯蓝稀释),50%缓冲甘油封片,在荧光显微镜下观察结合荧光抗体的细胞并拍照.

1.6 过氧化物酶活性分析

参照文献[7]修改.用 PBS 将分离的人外周血细胞稀释成 2×10^6 /ml,按每孔 50 μ l 细胞悬液加至 96 孔板中,然后在孔内各加入待测样品(500 ng/ml),并设置标准品对照(500 ng/ml)和阴性对照(加入等体积 PBS 稀释液).将培养板置于 37 °C 温育 30 min,按下述步骤检测过氧化物酶活性:每孔加入 TritonX-100 至终浓度 0.8%,于 37 °C,45 min 裂解细胞,离心,各取 50 μ l 上清加至酶标板,用底物显色,在 450 nm 波长处测定各孔的吸光值.

2 结果

2.1 重组表达载体构建与酶切鉴定

经 PCR 获得的修饰性 RANTES 基因的扩增片段长度为 222 bp.该片段不含 RANTES 基因的信号肽编码序列,但包含引物序列在内(Fig. 1).

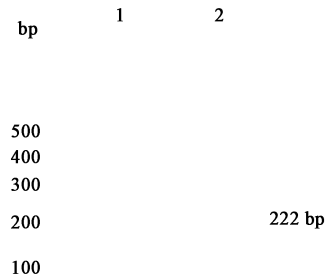


Fig. 1 A modified fragment of human RANTES gene amplified by PCR

1. 100 bp ladder; 2. Amplified fragment

人 RANTES 基因的实际长度为 276 bp,共编码 91 个氨基酸残基,其中包括 23 个氨基酸残基的信号肽和 68 个氨基酸残基的成熟蛋白.

将扩增片段经 *Bam*H 和 *Eco*R 切点克隆至 pGEX-2TK 质粒的多克隆位点中,构建重组表达载体 pGST-RAN,然后进行双酶切鉴定,结果如 Fig. 2 所示.

pGST-RAN 中的 RANTES 基因与 GST 基因在同一启动子(*tac* 启动子)控制下,可表达 GST-RANTES 融合蛋白,后者经凝血酶水解后,可产生 TEP-RANTES 修饰蛋白.经凝血酶消化的 TEP-RANTES 共由

78 个氨基酸残基组成,包括 RANTES 成熟蛋白及其上游的凝血酶裂解位点序列(二肽)、激酶识别位点序列(五肽)和间隔三肽.其序列为 Gly-Ser-Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Gly-Ser-Met.

1 2 3 4 5

← RANTES gene

Fig. 2 Identification of pGST-RAN by enzyme digestion

1. pGST-RAN; 2. *EcoR* digest of pGST-RAN; 3. *EcoR* + *BamH* digests of pGST-RAN; 4. *EcoR* digest of pGEX-2TK;
5. Amplified fragment

2.2 纯化表达产物分析

将纯化的 GST-RANTES 与 TEP-RANTES 经 Western 印迹杂交进行检测,结果如 Fig. 3 所示.

从以上杂交图谱可见,TEP-RANTES 与 RANTES

(A)

的分子量(8 kD)十分接近,而 GST-RANTES 则较大,其中 GST 的分子量为 26 kD.

1 2 3

← GST-RANTES

RANTES →

← TEP-RANTES

Fig. 3 Detection of RANTES fusion proteins by Western blotting

1. Standard RANTES (200 ng); 2. GST-RANTES(100 ng);
3. TEP-RANTES (200 ng)

2.3 免疫荧光化学分析

为了验证 GST-RANTES 与 TEP-RANTES 是否能与人外周血淋巴细胞表面的 CCR5 受体结合,将标准 RANTES、GST-RANTES 和 TEP-RANTES 分别与细胞温育,通过荧光免疫化学分析对其受体结合活性进行检测,结果如 Fig. 4 所示.

(B)

(D)

Fig. 4 Ligand-receptor binding activity assay

- A. Negative control; B. Positive control (500 ng RANTES); C. GST-RANTES (500 μg); D. TEP-RANTES (500 ng)

结果显示,阳性对照(RANTES 标准蛋白)、GST-RANTES 和 TEP-RANTES 处理者均可见荧光抗体标记细胞,而阴性对照(等体积 PBS 稀释液)则无荧光抗体标记细胞.这一结果表明,RANTES、GST-RANTES 和 TEP-RANTES 都具有受体结合活性,RANTES 修饰并不对配基-受体的相互作用产生显著影响.

2.4 过氧化物酶活性分析

趋化因子诱导细胞趋化时,中性粒细胞表达的过氧化物酶将增加^[7].由 Table 1 测定结果可见,在相同浓度(500 ng/ml)下,GST-RANTES 和 TEP-RANTES 的趋化活性都比标准品低($P < 0.05$),GST-RANTES 和 TEP-RANTES 的趋化活性则无显著差异($P > 0.05$).

Table 1 Chemotactic activity of RANTES, GST-RANTES and TEP-RANTES

Sample	$A_{450}(\bar{x} \pm s)$
RANTES	1.122 \pm 0.109
GST-RANTES	0.741 \pm 0.020
TEP-RANTES	0.750 \pm 0.032
GST	0.446 \pm 0.027
Negative control	0.403 \pm 0.047

3 讨论

RANTES、SDF-1 等趋化因子作为艾滋病毒感染的拮抗剂可能在艾滋病的预防和治疗中发挥重要作用,尤其是目前仍未研制出有效的疫苗,有关这方面的研究备受重视.然而,天然趋化因子的致炎性副作用必须予以消除,以达到既阻断艾滋病毒感染又不诱发炎症反应的目的.为此,有人采用人疱疹病毒 8(HHV8) 编码的趋化因子类似物(vMIP-)作为天然 RANTES 的拮抗剂,结果 vMIP- 在结合趋化因子受体的同时并不诱导炎症作用^[8].对于大肠杆菌表达的含有氨基末端延伸肽的修饰性 RANTES 是否具有受体结合活性与炎症激活能力,至今未见报道.

我们的初步研究结果表明,无论 GST-RANTES 或 TEP-RANTES 都能象天然 RANTES 一样与外周血淋巴细胞表面受体 CCR5 结合,而末端大段多肽的融合或延伸并不影响其结合作用,暗示二者具有封闭细胞表面艾滋病毒附着位点的潜在能力.同时,致炎性测定结果显示,GST-RANTES 和 TEP-RANTES 的趋化活性均低于天然 RANTES,表明修饰性 RANTES 的趋化作用受到氨基末端延伸肽的显著影响.经末端修饰的截短型 RANTES (9-68)^[9,10]、蛋氨酸-RANTES^[11]和氨基氧戊烷-RANTES^[12]可作为拮抗剂与前单核细胞系 THP-1 结合,但却不刺激其趋化活性,包括钙动员或酶释放等.至于 GST-RANTES 和 TEP-RANTES 为何仍保留部分趋化活性,是否与其分子结构中存在完整的 RANTES 有关,则尚待进一步研究.

参考文献 (References)

- 1 Baggiolini M, Beatrice D, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, 1997, **15**: 675 ~ 705
- 2 Doms R W, Peiper S C. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*. 1997, **235**: 179 ~ 190
- 3 Michael N L, Moore J P. HIV-1 entry inhibitors: evading the issue. *Nat Med*, 1999, **5**: 740 ~ 742
- 4 Premack B A, Schall T J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med*, 1996, **2**: 1174 ~ 1178
- 5 曾庆平,杨瑞仪,冯丽玲,符林春. 人 RANTES 基因克隆及其体外表达. 生物工程学报 (Zeng Qing-ping, Yang Rui-yi, Feng Li-ling, Fu Lin-chun. Cloning and *in vitro* expression of human RANTES gene. *Chin J Biotech*). 2001, **17**: 349 ~ 351
- 6 曾庆平,杨瑞仪,冯丽玲,符林春. 人 RANTES 基因克隆与测序. 中国性病艾滋病防治 (Zeng Qing-ping, Yang Rui-yi, Feng Li-ling, Fu Lin-chun. Cloning and sequencing of human RANTES gene. *J China AIDS/STD Prev Cont*). 2000, **14**: 245 ~ 247
- 7 孙卫民,王惠琴编著. 细胞因子研究方法论. 北京:人民卫生出版社 (Sun Wei-min, Wang Gui-qin. *Methodology of Cytokine Research*. Beijing: People's Medical Publishing House), 1999: 140 ~ 141
- 8 Kledal T N, Rosenkilde M M, Coulin F, Simmons G, Johnson A H, Alouani S, Power C A, Lutichau H R, Gerstoft J, Clapham P R, Clark-Lewis I, Wells T N C, Schwartz T W. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science*, 1998, **277**: 1656 ~ 1659
- 9 Gong J-H, Uguccioni M, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I. RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 10521 ~ 10527
- 10 Ylisastigui L, Vizzavona J, Drakopoulou E, Paindavoine P, Calyo C F, Parmentier M, Guckman J C, Vita C, Benjouad A. Synthetic full-length and truncated RANTES inhibit HIV-1 infection of primary macrophages. *AIDS*, 1998, **12**: 977 ~ 984
- 11 Proudfoot A E I, Power C A, Hoogewerf A J, Montjovent M-O, Borlat F, Offord R E, Wells T N C. Extension of recombinant RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 2599 ~ 2603
- 12 Simmons G, Clapham P R, Picard L, Offord R E, Rosenkilde M M, Schwartz T W, Buser R, Wells T N C, Proudfoot W E I. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*, 1997, **276**: 276 ~ 279