

重组人干细胞因子的研究

吴 军 巩 新 唱韶红 赵志虎 左从林* 马清钧**

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 利用基因工程的方法制备了高纯度的人干细胞因子,并对制备的重组人干细胞因子的结构和生物活性进行了研究。结果表明 rhSCF 在磷酸盐缓冲液中以非共价的二聚体形式存在,其精确分子量、质量肽谱、氨基酸组成及 N 端、C 段序列等均与理论值一致,二硫键位置正确。rhSCF 单用或与 rhG-CSF 合用,对猴外周血造血祖细胞有明显的动员作用。

关键词 干细胞因子,基因表达,造血生长因子

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0698-07

干细胞因子(Stem Cell Factor, SCF)是一种重要的造血生长因子,它是 1990 年分别由 William DW, Zsebo KM, Huang EW 为首的三个不同实验小组几乎同时发现的^[1-3],是原癌基因 c-kit 产物的一个胞外配体。根据其刺激细胞生长、结合受体特性分别被称为干细胞因子(Stem Cell Factor)、Steel 因子(Steel Factor)、kit 配体(Kit Ligand)等。hSCF 有膜型和可溶型两种活性形式,膜型 SCF 由胞外区、疏水跨膜区和胞内区三部分组成,可溶型的 SCF 是膜型 SCF 在 165/164 位经蛋白酶促降解而成的,它包含了膜型 SCF 胞外区的主要部分。hSCF 含有 N-连、O-连糖基,但大肠杆菌表达的非糖基化 hSCF 具有生物活性,说明糖基对其生物活性影响不大。在生理状态下,SCF 的活性形式为非共价的二聚体,当 SCF 与其酪氨酸激酶受体 KIT 作用时,双价的 SCF 先以其一个结合位点与 KIT 结合,诱导 KIT 构型发生改变,产生内源二聚体化位点,引起 KIT 的二聚体化,双价 SCF 的另一个结合位点与二聚体化 KIT 的另一个位点结合,稳定了 KIT 二聚体, KIT 的二聚体化激活了其酪氨酸激酶活性,从而引发一系列的级联反应。

SCF 主要作用于早期多能干细胞、祖细胞,同时对晚期成熟血细胞也有作用。它能刺激造血祖细胞

的扩增,并且与其它造血生长因子如 G-CSF、GM-CSF、EPO、IL-3、IL-6、IL-11 及 TPO 等联合应用具有明显的协同作用^[4-7]。SCF 在造血祖细胞动员及再生障碍性贫血等的血液病的治疗上具有良好的应用前景^[8-10]。我们应用基因工程构建了表达 rhSCF 的工程菌,制备了 rhSCF,并对其结构与生物功能进行了研究。

1 材料和方法

1.1 重组人干细胞因子制备

1.1.1 工程菌株 :*E. coli* DH5 α (pMG604),表达载体为 pBV220,由 P_LP_R-C₁₈₅₇ 启动子控制人工合成的 hSCF 基因表达,本所赵志虎博士构建^[11]。

1.1.2 工程菌培养 :挑单菌落于 50mL LB 培养基中,摇床 30℃ 150r/min 培养 10~12 h,按 0.2%(V/V)接种量将上述活化菌种接 15 只装有 100 mL LB 的种子摇瓶,摇床 30℃ 150 r/min 培养 10~12 h,按 5%(V/V)接种 30 L 发酵罐,30℃ 培养 6 h,42℃ 诱导 6 h,离心收集菌体。

1.1.3 重组人干细胞因子纯化 :菌体以 1:10(W/V)的体积用缓冲液稀释后超声破菌,离心收集包涵体,用 8 mol/L 尿素变性后,稀释复性。复性液经阴离子

收稿日期 2003-04-04,修回日期 2003-08-13。

基金项目 国家“八六三”高技术重大专项基金资助(No. Z18-03-30)。

* 北京昭衍新药研究中心。

** 通讯作者。Tel&Fax 86-10-88272563;E-mail:Qingjunma@sohu.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

交换层析、疏水层析和反相层析纯化,及离子交换脱溶剂,获得纯化的 rhSCF。

1.2 RP-HPLC 分析

HP1050 高压液相色谱仪, C8 柱(4 mm × 250 mm, 中科院大连化学物理所), A: 含 0.1% TFA 的纯水; B: 含 0.1% TFA 的色谱纯乙腈(天津四友公司), 梯度洗脱 0 → 50 min, A 100% → 10%, B 0% → 90%。

1.3 分子量分析

质谱法: Q-TOF2 ESI-MS/MS (Micromass) 质谱仪。

还原和非还原 SDS-PAGE: 15% 分离胶, 分子量标准购自 Promega 公司。

凝胶 HPLC 法: PE LC-235 高压液相色谱仪, TSK2000 色谱柱。Sigma 公司蛋白分子量标准, 流动相为 100 mmol/L pH7.0 的磷酸盐。

1.4 质量肽谱

样品酶解方法: 胰蛋白酶(Sigma 公司, TPCK 处理), 用 0.6 mol/L 的 NH_4HCO_3 (pH8.7) 配成 0.1 mg/mL, 100 μL 2 mg/mL 的样品 + 10 μL 胰蛋白酶, 37℃ 酶切 24 h。用 Tofspec 反射式基质辅助激光解吸附飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS) 和 Zabspec 快原子轰击磁质谱仪(FAB-MS) 分析。

1.5 N-末端氨基酸序列分析

SDS-PAGE 后转硝酸纤维素膜, Edman 降解法测定。

1.6 C-末端氨基酸序列分析

羧肽酶酶解-氨基酸分析法: 3 mg 样品溶于 2 mL 0.2 mol/L N-甲基马琳乙酸缓冲液, 加入 60 μg 羧肽酶 Y 37℃ 保温酶解, 定时取出酶解液, 用美国 Beckman 121MB 氨基酸自动分析仪分析游离氨基酸。

1.7 氨基酸组成分析

样品处理方法: 酸水解、碱水解、过甲酸氧化, 分析柱为日立 # 2622 SC, 缓冲液流速 0.4 mL/min。仪器为日立 L-8500 氨基酸分析仪。

1.8 生物活性分析

1.8.1 TF-1 细胞分析: rhSCF 样品, 及购自 GIBCO 公司的 rhSCF 活性参考品, 分别用无血清培养基(本所细胞工程实验室陈昭烈教授惠赠)在 96 孔板上作倍比稀释, 每孔加样 100 μL , TF-1 细胞培养在含 10% 新生牛血清和 10 ng/mL GM-CSF 的 1640 培养基中, 使用前, 先用不含血清和 GM-CSF 的 1640 培养基洗细胞 4 次, 用无血清培养基稀释至浓度为 $4 \times 10^5/\text{mL}$, 取 100 μL 细胞/孔加入上述 96 孔板, 于 37℃、5% CO_2 条件下培养 40 ~ 48 h 左右, 每孔加

20 μL MTT, 再培养 5 h 后, 加入 20% SDS 80 μL , 溶解后在酶联仪上测 A_{570} 。

1.8.2 人骨髓 CFU-GM 培养法: 取外科手术截下的人正常肋骨, 用 RPMI1640 培养液冲出骨髓细胞, 用比重为 1.077 的淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 计数细胞数。培养体系包括 RPMI1640 培养液、马血清(30%)、琼脂(0.25%)、各种浓度的细胞因子(1 ~ 200 ng/mL 的 rhSCF、1 ~ 200 ng/mL 的 rhSCF 加 50 ng/mL 的 rhIL-3、rhIL-3(50 ng/mL)对照、rhGM-CSF(150 ng/mL)对照), 骨髓细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$)。培养用直径为 30 mm 的平皿, 每皿 1 mL, 每浓度 4 皿。37℃ 5% CO_2 培养 7 d, 计数 CFU-GM 集落数。

1.8.3 rhSCF 皮下注射对恒河猴外周血祖细胞的动员作用, 及动员后收集的外周血回输 ^{60}Co 照射猴后, 对其白细胞恢复的作用: 5 ~ 7 kg 的恒河猴(军事医学科学院动物中心提供, 合格证号为 BDW95002)分成 5 组, 每个试验组 5 只, 每天分别皮下注射生理盐水、rhSCF 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、rhG-CSF 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、rhSCF 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + rhG-CSF 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、rhSCF 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + rhG-CSF 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。于试验第 4、6、8 天采血分离外周血单个核细胞进行 CFU-GM、CFU-mix 集落培养^[4]。以对照组的集落数为 100%, 各组的集落数以相对于对照组的百分比值表示。

采集动员第 8 天的猴外周血 20 mL/kg 液氮冻存。猴饲养一个月以上, 使其血液学和血生化指标恢复正常, 然后施以 650 ~ 700 rad ^{60}Co 照射, 回输采集的自体外周血细胞, 并每天给予 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rhG-CSF 治疗, 以照射前的 WBC 为 100%, 观察照射后 WBC 的变化。

2 结 果

2.1 rhSCF 制备

E. coli DH5 α (pMG604) 培养 6 h 菌体密度达到 $OD_{600} = 3.2$, 升温诱导 6 h 后, 菌体密度为 $OD_{600} = 11$, rhSCF 表达水平为 42%, 表达量为 780 mg/L, 表达产物以包涵体形式存在(图 1)。菌体用缓冲液重悬, 超声波破菌, 经包涵体洗涤和溶解变性, 得到纯度为 82% 的 rhSCF 变性液, 用缓冲液稀释复性过夜。复性液经阴离子柱直接吸附浓缩和初纯化、疏水层析和反相层析精细纯化, 再通过阴离子交换溶剂, 获得了纯化的 rhSCF(图 2), 每 6 L 培养物的 rhSCF 制备量达 1.54 g, 回收率为 38%。产物经 RP-HPLC 分析纯度大于 98%(图 3)。

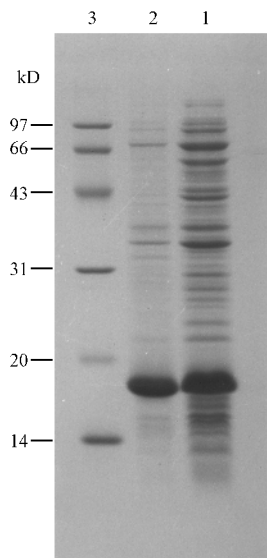


图 1 30L 发酵的 DH5α (pMG604) 的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of DH5α (pMG604) fermentation in 30L bioreactor

1. DH5α (pMG604) induced for 5h ; 2. Inclusion body 3. Marker

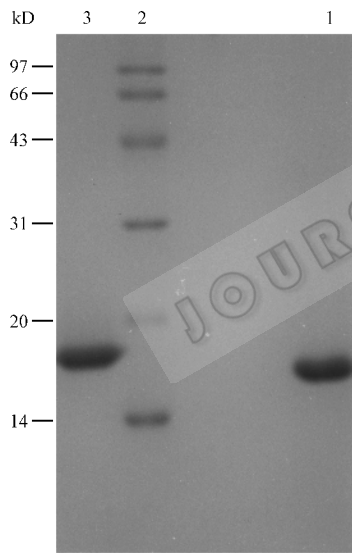


图 2 rhSCF 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of purified rhSCF

1. 5μg unreduced rhSCF 2. Marker 3. 5μg reduced rhSCF

2.2 分子量测定

Q-TOF2 测定 rhSCF 分子量为 18584.00D (图 4), 根据 rhSCF 氨基酸序列计数的理论分子量为 18588.44D。hSCF 含有两对分子内二硫键, 每形成一对二硫键时, 两个半胱氨酸残基各脱去一个 H 原子, 因而复性的 rhSCF 理论分子量应为 18584.40D, 可见 rhSCF 分子量测定值与复性的 rhSCF 理论分子量完全吻合。而以磷酸盐缓冲液为流动相的凝胶 HPLC 分析表明, rhSCF 的分子量明显大于 19 kD, 约

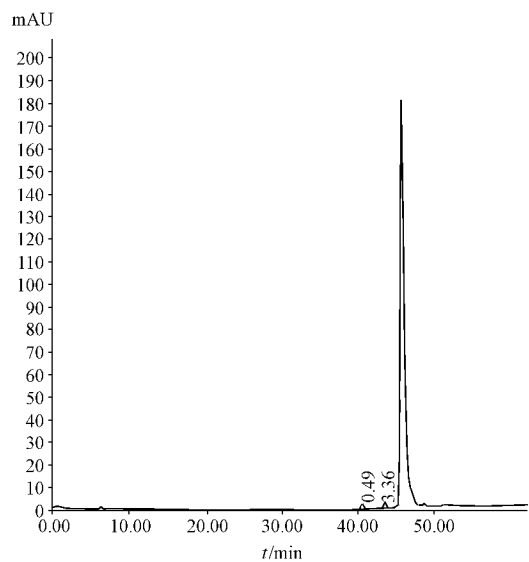


图 3 rhSCF 的 RP-HPLC 分析

Fig. 3 RP-HPLC of purified rhSCF

为 35.5 kD。这说明在磷酸盐缓冲液中, rhSCF 是以二聚体形式存在。非还原 SDS-PAGE 和还原 SDS-PAGE 分析表明 rhSCF 在有 SDS 存在条件下, 无论是否有还原剂, 均以单体形式存在, 说明其分子间没有二硫键。这些结果表明 rhSCF 在磷酸盐缓冲液中是以非共价的二聚体形式存在的。文献报道非共价二聚体形式是 hSCF 的天然活性形式, SCF 正是通过其二聚体形式来稳定其受体 KIT 的二聚化的, 后者的二聚化是激活其酪氨酸激酶活性, 从而引发一系列级联反应的前提。

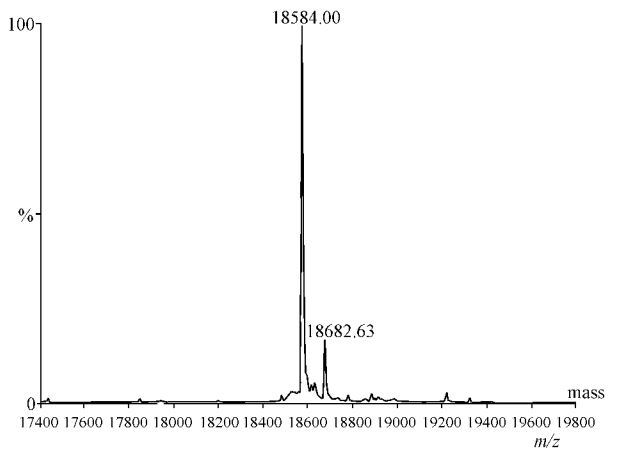


图 4 rhSCF 质谱分析

Fig. 4 Mass spectra of rhSCF

2.3 质量肽谱分析

将 rhSCF 经胰蛋白酶降解后, 采用快原子轰击质谱 (FAB-MS) 测定分子量较小的肽段 (300 ~ 1500 D) (图 6), 基质辅助激光解吸附飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定分子量较大的肽段 (1000 ~ 10000 D) (图 7)。

6000D(图 7),实验测得肽段的分子量与根据序列计算的分子量一致(表 1),说明 rhSCF 的一级结构是正确的,而且在 MALDI-TOF-MS 测定结果中,发现了由分子内二硫键将两个肽段连接形成的产物,T1 + T9 和 T7 + T18,由于前面已经证明 rhSCF 不存在分子间二硫键,因而这两个二硫键相连的片段来源于同一分子 rhSCF,这与天然 hSCF 的二硫键位置(T1cys⁴-T9cys⁸⁹、T7cys⁴³-T18cys¹³⁸)完全相符,说明 rh-SCF 的二硫键是正确的。

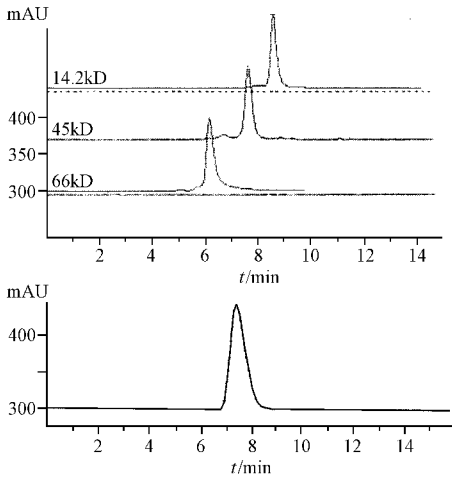


图 5 凝胶排阻 HPLC 分析测定 rhSCF 分子量
Fig.5 Molecular weight analysis by Gel-HPLC

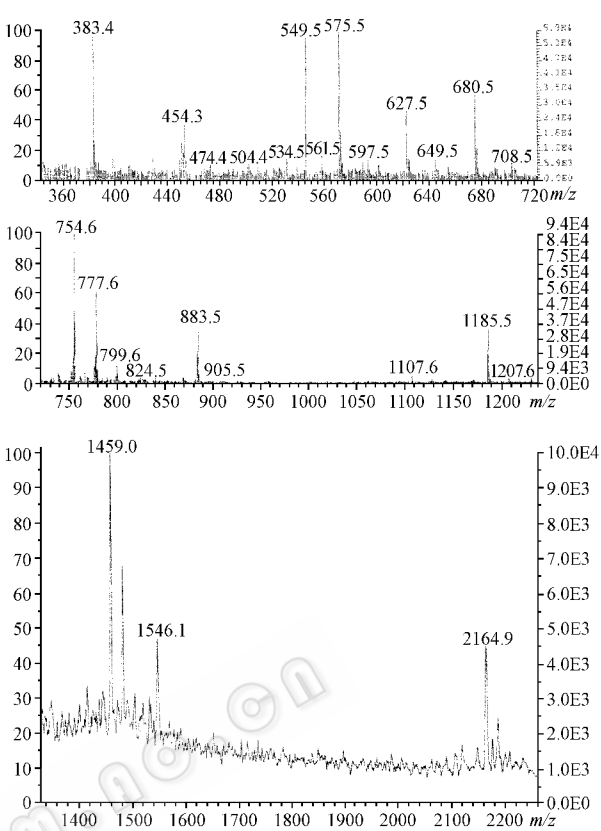


图 6 快原子轰击质谱(FAB-MS)测定肽段分子量
Fig.6 Mass spectra of peptides by FAB-MS

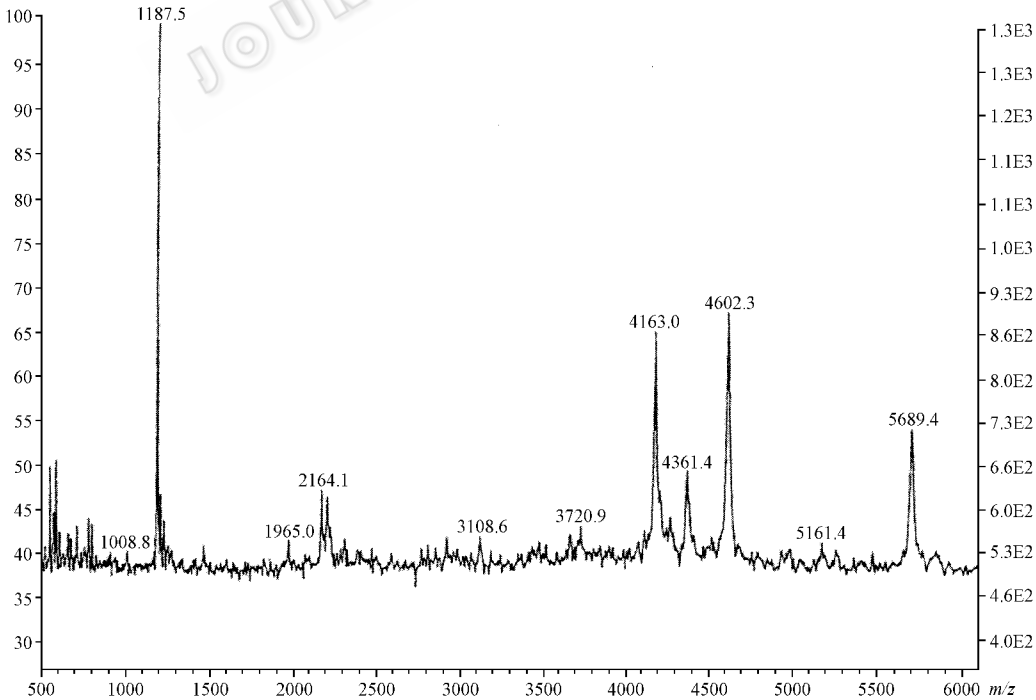


图 7 基质辅助激光解吸附飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定肽段分子量
Fig.7 Mass spectra of peptides by MALDI-TOF-MS

表 1 rhSCF 胰蛋白酶裂解肽片段分子量测定值和预测值比较
Table 1 The comparison of peptide mass of rhSCF cleaved by trypsin

Peptide fragment	Amino acid residue	Predicted molecular weight/D	Detected molecular weight/D	Difference	Method
T1	1-6	707.9	708.5	0.08%	I *
T2 ***	7-8	288.3	-	-	
T3	9-14	673.8	680.5	1.0%	I
T4	15-18	461.5	454.3	1.6%	I
T5	19-25	753.9	754.6	0.09%	I
T4-T5	15-25	1215.4	1207.6	0.6%	I
T6	26-32	883.1	883.5	0.05%	I
T5-T7	19-63	5129.1	5161.4	0.6%	II **
T6-T7	26-63	4375.2	4361.4	0.3%	II
T8	64-79	1787.0	-	-	
T9	80-92	1458.7	1459.0	0.02%	I
T10	93-97	563.6	561.5	0.04%	I
T11	98-100	374.4	-	-	
T12 ***	101-101	146.2	-	-	
T13	102-104	380.4	383.4	0.8%	I
T14	105-109	584.6	575.5	1.7%	I
T15	110-118	1185.4	1185.5	0.01%	I
T16	119-122	548.6	549.5	0.03%	I
T17	123-128	679.8	681.5	0.2%	I
T1 + T9 ****	(1-6)+(80-92)	2166.6	2164.1	0.1%	I
T7 + T18 ****	(33-63)+(129-149)	5692.5	5689.4	0.05%	II

* FAB-MS ; ** MALDI-TOF-MS ; *** Too small in molecular weight ; **** Two fragments connected by disulfide bond

2.4 N-末端氨基酸序列分析

用 Edman 降解法 ,测定 rhSCFN-端 15 个氨基酸残基序列为 :MEGICRNRVTNNVKD ,除在 N 端多一个甲硫氨酸外 ,其余与天然的 hSCFN 端序列一致 ,说明其 N-末端是完整的(图略)。

2.5 C-端部分氨基酸序列分析

用羧肽酶降解 rhSCF 样品 ,取不同降解时间的样品进行氨基酸分析 ,测定样品的 C-端为 Val-Ala-COOH ,与天然 hSCF 一致 ,说明其 C-末端也是完整的(图略)。

2.6 氨基酸组成分析

rhSCF 经水解后 ,由氨基酸分析仪分析 ,其氨基酸组成的测定值与理论值相符。

2.7 生物活性

制备的 rhSCF 与 购自 GIBCO 公司的 rhSCF 相似 ,对人红白血病细胞株 TF-1 具有明显的刺激作用 ,其半数有效剂量为 16ng/mL(图 8)。rhSCF 单用或与 rhIL-3 合用对人骨髓造血祖细胞(CFU-GM、CFU-mix)的克隆形成具有明显的刺激作用(图 9)。

恒河猴体内试验表明 ,rhSCF 单用或与 rhG-CSF

合用对造血祖细胞具有明显的动员作用 ,且具有明显的量效关系(图 10)。用 rhSCF(150μg/kg)与 rhG-CSF(20μg/kg)动员的自体外周血回输亚致死剂量 ⁶⁰Co 照射的恒河猴 ,对其照射引起的白细胞减少症具有治疗作用 ,表现为 WBC 下降幅度小、低点持续时间短、恢复快(图 11)。

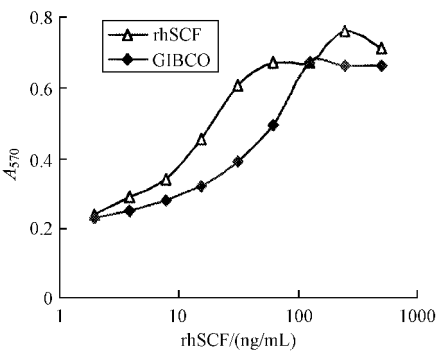


图 8 rhSCF 对 TF-1 细胞的作用

Fig.8 Activity of rhSCF toward TF-1 Cell

3 讨 论

rhSCF 在大肠杆菌中是以包涵体形式表达 ,包

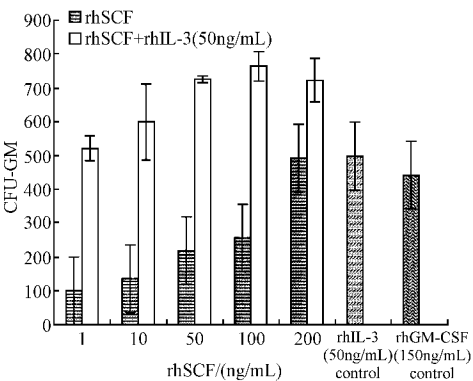


图 9 rhSCF 单用或与 rhIL-3 合用对
人骨髓 CFU-GM 形成的作用

Fig.9 The effect of rhSCF or rhSCF synergy with rhIL-3 on
the generation of CFU-GM from human bone marrow cells

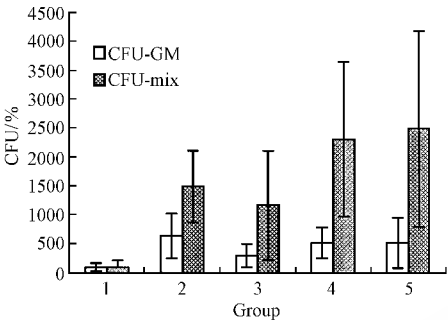


图 10 rhSCF 单用或与 rhG-CSF 合用给予猴 对猴外
周血单个核细胞中 CFU-GM、CFU-mix 的作用

Fig.10 The effect of rhSCF or rhSCF synergy with rhG-CSF on
CFU-GM、CFU-mix in PBMC of Monkey

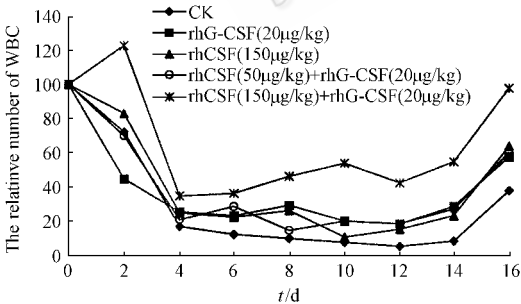


图 11 rhSCF 单用或与 rhG-CSF 合用动员的猴自体外周血，
对猴亚致死剂量照射引起的血细胞减少症的治疗作用

Fig.11 The effect of self blood which was mobilized by rhSCF or
rhSCF synergy with rhG-CSF on the leucopenia caused by
sublethal irradiation in monkey

涵体形式表达的重组蛋白需要经过变性、复性、纯化等过程，这些过程可能使蛋白产生二硫键错配、部分降解、缺失、修饰等。即使是可溶性表达的重组蛋白，由于在肽链翻译后，其在细胞内进行的折叠、氧化、加工等过程中，及以后的纯化过程中，酶及各种

物理、化学因素都可能使蛋白结构产生缺陷。因而虽然表达重组蛋白的核苷酸序列完全正确，仍不能保证所制备的重组蛋白的正确性，还必须对制备的重组蛋白进行结构鉴定。考虑到可能引起重组蛋白结构缺陷的主要原因，应着重分析其是否发生降解、缺失、修饰，及二硫键位置、寡聚体等。同时由于许多肽因子天然来源非常有限，难以得到高纯度的样品作为对照，因而大多数的重组蛋白结构分析主要是与理论值对照。重组蛋白的结构分析可以有各种方法，如精确分子量、肽谱、序列分析、氨基酸组成分析和生物活性分析等。

本研究制备的 rhSCF 的精确分子量测定值与该蛋白的理论质量的差异小于 1D，因而可以初步判定 rhSCF 未发生降解、缺失、修饰等，因为这些改变引起的质量改变均远大于 1D。N-末端、C-末端分析结果进一步表明 rhSCF N-末端、C-末端结构完整。质量肽图是蛋白质的一种“指纹图谱”，是鉴别蛋白和结构分析的重要方法，rhSCF 的质量肽谱涵盖了 85% 以上的序列，并且证明其分子内两对二硫键的位置正确。天然的人干细胞因子是一种糖蛋白，其活性形式是一种非共价的二聚体形式。大肠杆菌表达的非糖基化蛋白是否能形成这种非共价的二聚体形式^[12]，以及是否具有相应的生物活性，是其是否具有应用价值的关键。分析结果表明制备的 rhSCF 在磷酸盐缓冲液中以非共价的二聚体形式存在，并对 TF-1 细胞和造血祖细胞有明显刺激作用，这说明糖基化与否并不影响 rhSCF 二聚体的形成，也不影响其主要生物活性。上述结果说明，rhSCF 具有与天然 hSCF 相似的结构和生物活性。

REFERENCES(参考文献)

[1] Williams D E , Eisenman J , Baird A *et al* . Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene . *Cell* ,1999 63 (2) :167 - 174

[2] Zsebo K M , Wypych J , McNiece I K *et al* . Identification , purification and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium . *Cell* ,1990 63 (2) :195 - 201

[3] Huang E , Nocka K , Beier D R *et al* . The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor , the gene product of the W locus . *Cell* , 1990 63 (2) :225 - 233

[4] Tsujino Y , Wada H , Misawa M *et al* . Effects of mast cell growth factor , interleukin-3 , and interleukin-6 on human primitive hematopoietic progenitors from bone marrow and cord blood . *Exp Hematol* , 1993 , 21 (10) :1379 - 1386

[5] Kamijo T , Koike K , Nakazawa Y *et al* . Synergism between stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor on cell

- proliferation by induction of cyclins. *Cytokine*, 2002, **19**(6):267 – 275
- [6] Macioce G, Pace A, Ziegler B *et al.* Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood*, 1995, **86**(10):3725 – 3736
- [7] van de Ven C, Ishizawa L, Law P *et al.* IL-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34⁺ cell population from cord blood vs. adult bone marrow. *Exp Hematol*, 1995, **23**(12):1289 – 1295
- [8] Stiff P, Gingrich R, Luger S *et al.* A randomized phase 2 study of PBPC mobilization by stem cell factor and filgrastim in heavily pre-treated patients with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*, 2000, **26**(5):471 – 481
- [9] Wadhwa P D, Lazarus H M, Koc O N *et al.* Hematopoietic recovery after unrelated umbilical cord-blood allogeneic transplantation in adults treated with *in vivo* stem cell factor (R-MetHuSCF) and filgrastim administration. *Leuk Res*, 2003, **27**(3):215 – 220
- [10] Duarte R F, Franf D A. The synergy between stem cell factor (SCF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): molecular basis and clinical relevance. *Leuk Lymphoma*, 2002, **43**(6):1179 – 1187
- [11] ZHAO Z H (赵志虎), CAO C (曹诚), ZHANG J H (张京生) *et al.* Recombinant human stem cell factor. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 1998, **18**(2):25 – 28
- [12] Arakawa T, Yphantis D A, Lary J W *et al.* Glycosylated and unglycosylated recombinant stem cell factors are dimeric and have extensive regular second structure. *J Biol Chem*, 1991, **266**:18942

Study of Recombinant Stem Cell Factor

WU Jun GONG Xin CHANG Shao-Hong ZHAO Zhi-Hu ZUO Cong-Lin MA Qing-Jun*

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*)

Abstract Stem cell factor is an important hematopoietic growth factor. In this study, the human stem cell factor was produced by recombinant *E. coli* and the structure and biological activity of the recombinant stem cell factor (rhSCF) was studied. It was indicated that the rhSCF was a univalent dimer in phosphate buffer and had the correct mass spectra, mass peptides spectra, composition of amino acid, N-terminal sequence, C-terminal sequence and intrachain disulfide linkages, rhSCF alone or synergy with rhG-CSF could mobilize hematopoietic progenitors to blood in monkey.

Key words stem cell factor, gene expression, hematopoietic growth factor

Received: 04-04-2003

This work was supported by Grant from "863" National High Technology Research & Development Program of China (No. Z18-03-30).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931808; Fax: 86-10-88272563; E-mail: Qingjunma@sohu.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>