

人骨形成蛋白-2 C 端 102 肽的诱骨活性

张 斌 蒲 勤 朱帮福 陈南春 陈苏民*

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 西安 710033)

摘 要 为分析更短的 hBMP-2 C 端肽是否具有诱骨活性,寻求新型的有诱骨活性的基因工程 hBMP-2 产品。利用温度诱导的大肠杆菌表达系统表达肽段长度为 102 个氨基酸的 hBMP-2 C 端肽及其 Cys 的突变体。表达产物经纯化复性后,植入小鼠肌袋模型中测试其诱骨活性。获得了能稳定表达 hBMP-2 C 端肽的工程菌,测序结果与预期的序列完全一致。表达产物以包涵体形式存在,表达量占细胞总蛋白的 30%。产物经纯化复性后,小鼠肌袋模型测试结果表明:hBMP-2 102 肽仍具有诱骨活性,而将 C 端第一位 Cys 突变的 102 肽诱骨活性丧失。实验表明:比 hBMP-2 成熟肽(114 个氨基酸)更短的 C 端 102 肽仍具有良好诱骨活性,这 102 肽 N 端第一个 Cys 对其诱骨活性可能是必需的。

关键词 人骨形成蛋白-2, 102 肽, 诱骨活性

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0678-05

骨形成蛋白^[1] (Bone morphogenetic protein, BMP) 是属于 TGF- β 超家族的成员,目前已有 20 个人骨形成蛋白(hBMP)基因被克隆。其中 hBMP-2 和 hBMP-4 最为相似,对其结构和功能研究最多。BMP 在胚胎时期骨组织分化发育、成年骨损伤修复、胚胎发育期中胚层的诱导和分化、造血组织的发育以及神经系统的发育和修复等方面都起着重要作用^[2-5],因而 BMP 有很好的临床应用前景。在真核细胞中表达和纯化的 rhBMP-2 在美国已完成 III 期临床。本研究组曾经研究过利用大肠杆菌表达不同长短的 hBMP-2 的肽段及其复性方法,发现:不同长度的羧端肽均具有不同程度诱骨活性^[6]。在上述工作的基础上,本研究在大肠杆菌中表达了 102 肽的 hBMP-2 (BMP-2t),作为对照,同时表达突变了此 102 肽 N 端的第一位 Cys 的 102 肽(BMP-2m),经纯化和复性后,测试其诱骨活性,以探索其结构与诱骨活性之间关系,期望为获得更好的新型基因工程 hBMP-2 提供依据,为深入研究 hBMP-2 生物活性的分子机制和临床应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与工具酶: *E. coli* DH5 α 由本教研

室保存,含 hBMP-2 全长 cDNA 的质粒为本室扩增克隆^[6],表达质粒 pDH 由本实验室构建并保存,限制性内切酶、核酸修饰酶、连接酶、Taq 酶等主要试剂购于 Biolabs 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计:计算机辅助设计 hBMP-2 C 端 102 肽和突变的特异性引物,以含完整 hBMP-2 cDNA 的克隆质粒为模板进行 PCR,PCR 引物为:

BMP-2 102 肽引物 5' C TTTAAATG AGC TGT AAG AGA CAC CC
ser cys

BMP-2 突变引物 5' GTTAAATG AGC TCT AAG AGA CAC CCT TTG
ser ser

BMP-2 反向引物 5' AACTGCAGTTACTAGCCACACCCAC

在正向引物加上起始码(ATG)及 *Dra* I (TTTAA)酶切位点,在反向引物加上强双终止码(TA-ATAA)和 *Pst* I (CTGCAG)酶切位点,并将半胱氨酸(cys)突变为丝氨酸(ser)。采用双循环 PCR,循环参数:94 $^{\circ}$ C 30s-68 $^{\circ}$ C 1 min,循环 25 次。

1.2.2 表达载体构建:回收 PCR 产物,经 *Dra* I 和 *Pst* I 双酶切后连接入制备好的表达载体 pDH 中,转化 *E. coli* DH5 α 。根据温度诱导结果挑选阳性克隆。

1.2.3 蛋白的诱导表达:过夜培养的细菌,次日按 2%转接后,32 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 为 0.6 左右,转入 42 $^{\circ}$ C

收稿日期:2001-06-11,修回日期:2001-08-21。

基金项目:全军医学科研基金重点课题基金资助(96Z045)。

* 通讯作者。 Tel:86-29-3376599; E-mail: chensm@fmmu.edu.cn

水浴中快速振摇 4h 后收菌。

1.2.4 序列测定:序列测定在 ABI 310 DNA 自动测序仪上进行。

1.2.5 目的蛋白的纯化与复性:诱导后的工程菌经过化学和超声联合裂菌,所得包涵体分别用 2% 的 DOC、2mol·L⁻¹ 尿素洗涤后,溶解于含 8mol·L⁻¹ 尿素的缓冲液中,经复性处理后,再经过 Q-Sepharose 离子交换层析进一步纯化,产物最终纯度达 95% 以上^[7]。

1.2.6 诱骨活性测定:将复性产物以不同剂量植入小鼠肌袋内,12d 后作组织学切片,HE 染色,光镜观

察。

1.2.7 计算机理化参数及二级结构分析:相关软件来自 EXPASY 网站。蛋白参数分析方法为:Multi-Ident;二级结构预测方法为 HNN(Guerneur,1997)。

2 结 果

2.1 理化性质的计算机分析

从计算机分析的结果预测,BMP-2 的 102 肽及突变的 102 肽,其半衰期明显增加,等电点降低,不稳定指数减小,由不稳定状态变为稳定状态 (Table 1)。

表 1 三种 hBMP-2 的理化参数

Table 1 physiochemical parameters of BMP-2,BMP-2t,BMP-2m

| | Number of amino acids | Molecular weight | pI | Half-life (1) | Half-life (2) | Half-life (3) | Negatively charged residues | Positively charged residues | Instability index |
|--------|-----------------------|------------------|------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Bmp-2 | 114 | 12904.8 | 8.21 | 0.8h | 10min | 10h | 11 | 13 | 43.48 |
| Bmp-2t | 102 | 11415.0 | 5.6 | 1.9h | > 20h | > 10h | 11 | 7 | 38.52 |
| Bmp-2m | 102 | 11398.9 | 5.6 | 1.9h | > 20h | > 10h | 11 | 7 | 37.21 |

Half-life(1):mammalian reticulocytes, *in vitro*; Half-life(2):yeast, *in vivo*; Half-life(3): *Escherichia coli*, *in vivo*

2.2 二级结构的计算机分析

利用 Expasy 网站上蛋白质二级结构分析软件分析成熟肽、102 肽、突变体的二级结构,发现 102 肽的二级结构并未改变,而突变体的二级结构与成熟肽的二级结构则完全不同 (Fig.1)

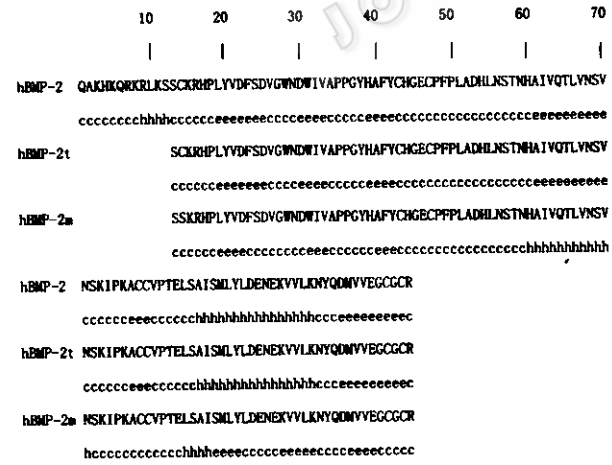


图 1 3 种 hBMP-2 的二级结构计算机分析结果
Fig.1 Secondary structure of three kinds of hBMP-2
h. Alpha helix; e. Extended strand; c. Random coil

2.3 表达载体的鉴定与测序

首先获得了编码人骨形成蛋白-2 102 肽和突变体的基因并将其克隆到大肠杆菌表达载体 pDH 上 (Fig.2),对提取质粒用 *Bgl*II + *Hind*III (可切下 600bp

的片段)酶切电泳分析 (Fig.3);再经自动测序仪测序证实得到的基因正确无误。获得表达质粒 pDHB2t (hBMP-2 102 肽)、pDHB2m (hBMP-2 102 肽突变)。

2.4 目的蛋白的获得

以 *E. coli* DH5 α 为宿主菌。进行温度诱导表达,经 42℃ 4h 诱导,在 SDS-PAGE 上各出现一条新蛋白带,分子量与预期的一致,表达量占菌体总蛋白的 30%,主要以包涵体形式存在 (Fig.4)。

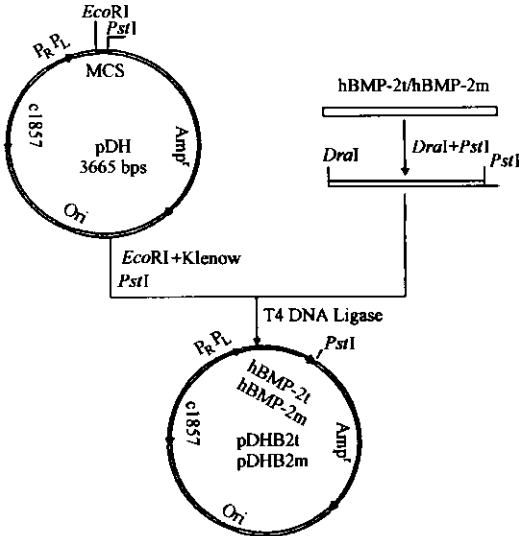


图 2 hBMP-2 102 肽和突变体的表达载体构建
Fig.2 Construction of expressed plasmids pDHB2t and pDHB2m

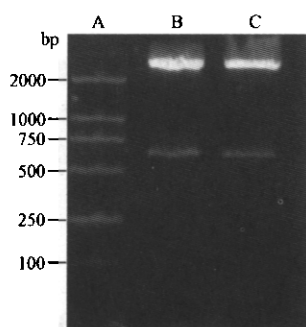


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Electrophoresis of recombinant plasmids digested by *Bgl* II + *Hind* III

A. Marker; B. pDHB2t digested with *Bgl* II + *Hind* III;
C. pDHB2m digested with *Bgl* II + *Hind* III

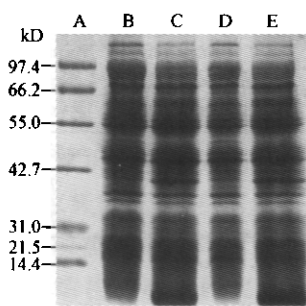


图 4 重组质粒诱导后的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE Analysis of recombinant plasmids expressed from *E. coli*

A. Protein marker; B. Cell lysate of non-induced *E. coli* containing pDHB2t; C. Cell lysate of induced *E. coli* containing pDHB2t; D. Cell lysate of non-induced *E. coli* containing pDHB2m; E. Cell lysate of induced *E. coli* containing pDHB2m

2.5 目的蛋白的纯化与复性

经离子交换纯化后,目的蛋白最终纯度经薄层扫描达到 95% 以上 (Fig. 5)。复性结果获得了可溶

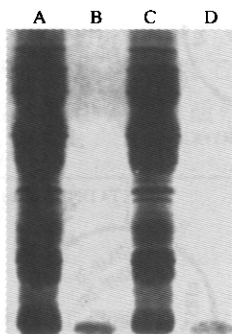


图 5 重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE Analysis of purified recombinant proteins

A. Cell lysate of induced *E. coli* containing pDHB2t;
B. Purified rhBMP-2t; C. Cell lysate of induced *E. coli* containing pDHB2m; D. Purified rhBMP-2m

性蛋白,分别命名为 rhBMP-2t (hBMP-2 102 肽)、rhBMP-2m (hBMP-2 102 肽突变)。

2.6 表达产物的活性测定

102 肽的 pDHB2t 表达产物经复性后与胶原复合植入小鼠腓肠肌内,12d 后取样,做组织学切片观察,发现肌肉组织中有软骨细胞生成,表明良好的诱骨活性 (Fig. 6A)。而植入 102 肽的 pDHB2m 产物的小鼠肌肉组织中无明显组织学变化 (Fig. 6B),表明其诱骨活性丧失。

3 讨 论

hBMP-2 cDNA 编码的前体蛋白由 N 端的信号肽、中间的前肽和 C 端的成熟肽构成,必须经过翻译后加工,切去信号肽和前肽,并进行糖基化修饰,方可成为成熟的 hBMP-2。hBMP-2 的活性形式应为二聚体形式,而二聚体的形成则依赖于 hBMP-2 内的半胱氨酸。hBMP-2 的成熟肽由 114 个氨基酸组成:C 端保守区内的 7 个半胱氨酸的位置在 BMPs 中高度保守^[8],1999 年, Scheufler 等人通过 x-ray 衍射的方法获得了 hBMP-2 的晶体结构,每个 hBMP-2 单体内有一半胱氨酸结,其结构基础是由 6 个半胱氨酸形成的三对链内二硫键。这种半胱氨酸结同样存在于转化生长因子 (TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3),血管内皮生长因子 (VEGF),血小板衍生生长因子 (PDGF), β 神经生长因子 (β NGF),脑源性的神经营养因子 (BDNF) 中^[9]。这一结果为 hBMP-2 的深入研究奠定了基础,为什么 hBMP-2 存在广泛的生物学活性,与这半胱氨酸结之间有没有什么联系,还有待进一步的研究。

本研究设计分别表达 hBMP-2 C 端 102 个氨基酸的肽段,并把保守区内的第一个半胱氨酸 (Cys78) 突变成丝氨酸。其目的在于研究短于 hBMP-2 成熟肽的 C 端肽是否有诱骨活性,同时期望获得新型基因工程产品。由于目前国际上没有公认的 BMP 定量活性测定方法,而公认的活性测定方法为小鼠肌袋实验。实验结果证明,经复性后 hBMP-2 102 肽仍具有诱骨活性,这说明,hBMP-2 成熟肽 N 端的部分序列对其诱骨活性影响不大;而当进一步将 102 肽内的第一个半胱氨酸突变掉时,经复性处理的蛋白却没有诱骨活性。这说明,hBMP-2 成熟肽的第一个保守的半胱氨酸对维持三对二硫键的完整性,对其诱骨活性可能是重要的,突变将导致其诱骨活性的丧失。利用蛋白质二级结构分析软件分析成熟肽、102 肽、突变体的二级结构,发现 102 肽的二级结

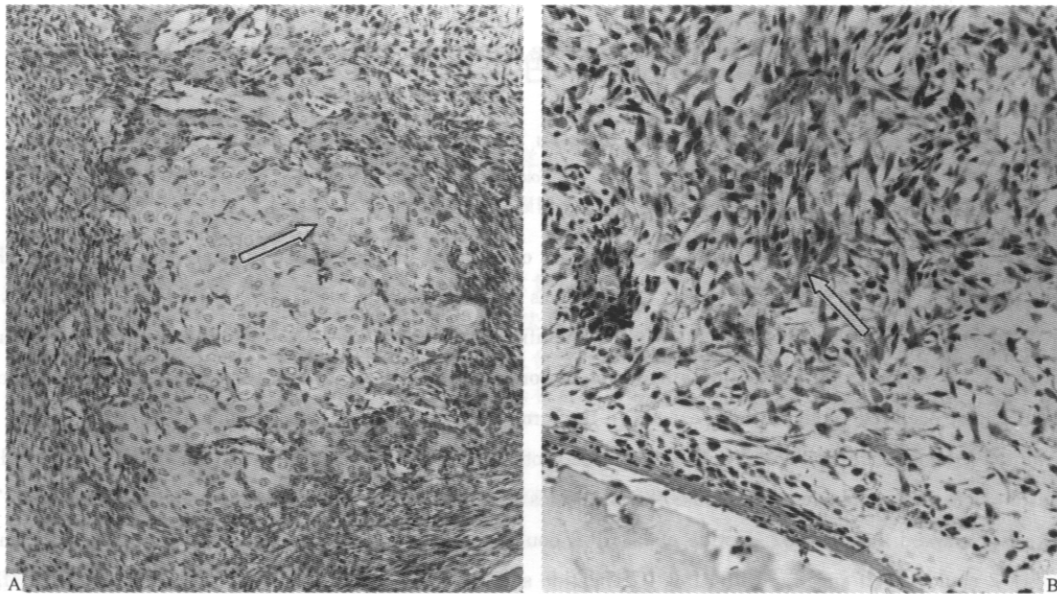


图 6 hBMP-2 102 肽植入后组织学检查结果

Fig. 6 Photomicrographs of histological sections of mouse implants of rhBMP-2/2m

A. 12 days, formation of cartilage cells and matrix; B. 12 days, no cartilage formation of rhBMP-2m

构与成熟肽相比并未改变,从而可以形成正确的二聚体构象;而突变体的二级结构与成熟肽的二级结构则完全不同,这也许可以解释其活性为何丧失。同时对照他们的理化参数,似乎 102 肽的各项指标要优于成熟肽;但这毕竟是计算机分析的结果,还需要实验结果加以证实。

利用基因工程技术生产 hBMP-2,具有低成本和可大规模生产的优点,为将来的临床应用奠定了基础。我们研究组已初步探索出 BMP 的活性定量测定方法,有关 102 肽与 BMP-2 成熟肽活性的对比研究正在进行中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wozney J M, Rosen V, Celeste A J *et al.* Novel regulation of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988, **242**: 1528 ~ 1534
- [2] Edward H Riley, Joseph M Lane, Marshall R *et al.* Bone morphogenetic protein-2. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1996, **324**: 39 ~ 46
- [3] Hay E, Hott M, Graulet A M *et al.* Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem*, 1999, **72**(1): 81 ~ 93
- [4] Hattori A, Katayama M, Iwasaki S *et al.* Bone morphogenetic protein-2 promotes survival and differentiation of striatal GABAergic neurons in the absence of glial cell proliferation. *J Neurochem*, 1999, **72**(6): 2264 ~ 2271
- [5] Yoshida K, Bessho K, Fujimura K *et al.* Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. *J Dent Res*, 1999, **78**(9): 1505 ~ 1510
- [6] Liu Xinpian(刘新平), Chen Sumin(陈苏民), Chen Nanchun(陈南春) *et al.* Construction and application of a dicistronic expression vector. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 1996, **23**(2): 156 ~ 59
- [7] Pu Qin(蒲勤), Chen Nan-Chun(陈南春), Chen Su-Min(陈苏民) *et al.* High expression of recombinant hBMP-2 mature peptide in *E. coli*. *Journal of the Fourth Military Medical University*(第四军医大学学报), 1998, **19**(1): 8 ~ 10
- [8] Celeste A J, Iannazzi J A, Taylor R C *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 9843 ~ 9848
- [9] Scheufler C, Sebald W, Hulsmeyer M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 1999, **287**: 103 ~ 115

Bone-Inducing Activity of Human Bone Morphogenetic Protein-2 102 Peptide

ZHANG Bin PU Qin ZHU Bang-Fu CHEN Nan-Chun CHEN Su-Min*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract To analyze the bone-inducing activity of C terminal of hBMP-2 and get a new recombinant product of hBMP-2, the gene encoding 102 aa of hBMP-2 mature peptide C terminal was cloned and expressed in *E. coli* and the first Cys was mutated with Ser. The fragments encoding the target peptide were amplified and cloned into heat-inducible expression vector pDH and transformed into *E. coli* DH5 α . After induction, a new protein band appeared on the SDS-PAGE. The expressed products amounted to 30% of the total bacterial protein, which existed in the form of inclusion body. The products of bacterial lysates were purified through the ion-exchange chromatography. The denatured proteins were dialysed and diluted directly into the refolding buffer. The renatured products were implanted into mouse thigh muscles to analyze their bone-inducing activity respectively. The results of histological assay showed that the 102 peptide of hBMP-2 could ectopically induce formation of bone, while the mutated 102 peptide of hBMP-2 could not. It suggested hBMP-2 102 peptide still had bone-inducing activity. The first Cys of hBMP-2 mature peptide might be necessary for integrity of three pairs of disulfide bond, and also essential for bone-inducing activity of hBMP-2.

Key words human bone morphogenetic protein-2(hBMP-2), 102 peptide, bone-inducing activity

Received: June 11, 2001

This work was supported by grant from Medical Science Foundation of PLA(96Z045)

* Corresponding author. Tel: 86-29-3376599; E-mail: chensm@fmmu.edu.cn