

人角质化细胞生长因子-2 基因的克隆、表达 及产物的纯化、鉴定

吴斌文² 段招军^{1*} 李武平¹ 陈 勇¹ 吕宏亮¹ 衣作安¹
张成海¹ 林菊生³ 王家骅³ 侯云德¹

¹(中国疾病预防控制中心病毒控制所病毒基因工程国家重点实验室 ,100052 北京)

²(广东省人民医院东病区消化内科 广东省老年医学研究所 ,510080 广州)

³(华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 ,430030 武汉)

摘 要 用高表达菌株 BL-21codon plus compentent cells 表达重组人角质化细胞生长因子(hKGF-2)蛋白并初步纯化和检测其活性。通过 RT-PCR 从流产胎儿肺组织中钓取 hKGF-2cDNA ,将其克隆入 pBV220 载体质粒。在大肠杆菌 BL-21codon plus compent cells 中表达 hKGF-2 蛋白。采用亲和层析和离子交换层析分离纯化 ,以细胞增殖实验测定表达蛋白的生物活性。结果显示 ,hKGF-2 蛋白在 BL21 中得到高效表达 ,hKGF-2 蛋白能刺激 NIH3T3 细胞的增殖 ,具有显著的促有丝分裂活性。

关键词 人角质化细胞生长因子-2 ,克隆和表达 ,纯化 ,鉴定

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0461-04

成纤维细胞生长因子(FGF)是一类对中胚层和神经外胚层来源的多种细胞具有营养和促分裂作用的多肽 ,迄今发现该家族由 21 种同源多肽组成^[1] ,有 4 种 FGF 受体。角质化细胞生长因子(keratinocyte growth factor ,KGF)是 FGF 家族成员之一 ,包括 KGF-1(FGF-7)和 KGF-2(FGF-10) ,KGF-1 蛋白和 KGF-2 蛋白具有 57% 的同源性^[2]。它们共同结合于上皮细胞 FGF-2 III b 受体^[3] ,KGF-2 还与上皮细胞 FGF-1 III b 受体结合^[4]。人 KGF-2(hKGF-2) cDNA 由 624 个核苷酸组成 ,编码 208 个氨基酸 ,与鼠 KGF-2 具有高度的同源性(95.6%)^[5]。

hKGF-2 具有广泛的生理功能 ,在胚胎发育、组织的修复、神经的再生、血管的生成和肿瘤发展中具有重要作用^[6,7]。KGF-2 基因敲除小鼠证明该分子的功能是调节脑、肺和肢体的发育^[8,9]。Ohuchi H^[10]等进一步证明在 KGF-2 缺失的小鼠的表型与 FGFR2b 缺失小鼠具有很好的相关性 ,包括脑、肺、肢体、甲状腺、垂体、涎腺的缺失 ,对牙齿、肾脏、毛囊和消化器官的产生也有影响。这些结果显示 ,KGF-2 作为 FGFR2b 的主要配体参与小鼠多器官的发育。KGF-2 还具有显著促有丝分裂作用^[11] ,参与组织的修复。

hKGF-2 具有广泛的临床应用 ,有希望用于溃疡性结肠炎、静脉溃疡、粘膜炎和伤口愈合的临床治疗。有关 KGF-2

在溃疡性结肠炎中作用的研究报告尚未见报导 ,但在小肠溃疡研究表明 ,重组 KGF-2 可促进小鼠急性慢性小肠溃疡的愈合^[12,13]。在 DSS 和放射性肠炎中 ,PGE2 发挥关键的粘膜保护作用 ,对胃肠道粘膜完整和自稳 ,PEG2 具有重要的调节作用^[14,15]。KGF-2 可使 COX-2 基因表达上调 ,从而刺激 PGE2 的产生 ,阻断有害物质对小肠的损害和促进小肠粘膜的愈合^[16]。进一步研究表明 ,KGF-2 通过促进受损粘膜周围有活力的表皮细胞向受损部位快速迁移 ,从而修复受损粘膜 ,且无明显毒性和致纤维化作用^[13]。显示该因子极具潜力的临床应用价值。此外 ,重组 KGF-2 外用于伤口 ,可显著提高 breaking strength 和胶原含量 ,促进伤口愈合^[17]。肿瘤病人需大量的化疗或化疗和放疗联合应用 ,常累及口腔和胃肠道黏膜 ,导致疼痛、溃疡和出血。目前尚无有效治疗方法。KGF-2 有可能成为有效的治疗药物 ,增强肿瘤患者对放、化疗的耐受能力。

KGF-2 的研究进展非常迅速。Emoto 等^[18]1997 年克隆了人 KGF-2 ,2000~2001 年美国 Human Genome Science 公司产品 Repifermin(KGF-2)已获准进行用于溃疡性结肠炎、静脉溃疡、粘膜炎和伤口愈合的 II 期临床试验。为了进一步研究 KGF-2 蛋白的功能和作用机理以及进一步开发 ,我们克隆了

收稿日期 2003-10-29 ,修回日期 2004-02-13。

基金项目 国家高技术与计划(863)资助项目(No.2001A215281)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-63578845

KGF-2 的 cDNA ,于大肠杆菌中高效表达 ,并进行了纯化与活性测定。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、细胞、主要试剂及实验标本

pBV220 温控表达载体为我室构建 ,*EcoR* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司 ;hKGF-2 特异性 PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成 ;肝素-Sepharese CL-6B 购于 Pharmacia 公司 ;快速 PCR 产物纯化试剂盒、总 RNA 提取 Trizol 试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 GIBCO 公司 ;质粒 DNA 快速提取试剂盒购自博大公司 ;BL21-CodonPlus Compent Cells 购自 Stratagene 公司 ;NIH3T3 细胞由本室保存 ;流产胎儿肺组织由北京医科大学第三医院妇产科提供。

1.2 hKGF-2 cDNA 的克隆

取流产胎儿肺组织约 0.2g ,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 经逆转录得到 cDNA 以此为模板 ,hKGF-2 特异性引物采用 oligle 软件设计 ,5' 端引物 CGGAATTCATGCAAGCCCTTG-GTCAGGACAT ,3'端引物 CGG GATCCTATTATGAGTGATCCACCA ,进行 PCR 回收 PCR 产物 ,克隆入 T 载体。

1.3 重组 pBV220-hKGF-2 质粒的构建

用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒 ,将外源 DNA 片段次级克隆入 pBV220 质粒。对重组 pBV220-hKGF-2 质粒内的外源基因进行序列测定。

1.4 hKGF-2 基因在大肠杆菌中表达

经酶切和测序鉴定重组质粒 ,转化入 $CaCl_2$ 处理的大肠杆菌 BL-21 菌株 ,涂 LB 平板(Ap 50mg/mL ,Cl 50 mg/mL)37℃ 过夜培养 ,结果获得大量阳性转化子。挑克隆于 5mL LB 培养液(Ap 50mg/mL ,Cl 50 mg/mL)37℃ 培养过夜 ,次日于 42℃ 升温表达 4h。并于 6L 发酵液中放大。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

取 200 μ L 表达菌 ,6000 \times g 离心 5 min ,弃上清 ,加入 25 μ L pH6.8 Tris-HCl 缓冲液 ,重新悬浮菌体 ,加入 6 \times 载样液 5 μ L ,煮沸 10 min ,冰上放置 5 min ,取适量进行 SDS-PAGE ,考马斯亮蓝染色后观察。

1.6 hKGF-2 的分离与纯化

离心收集 BL-21 表达菌 ,TE 重悬 ,超声破碎细胞 15 min。10 000 r/min 离心 2 min。取上清液直接上平衡好的肝素-Sepharese CL-6B 亲和层析柱(平衡缓冲液 :10mmol/L Tris-HCl buffer ,pH7.0 0.15mol/L NaCl) ,用平衡缓冲液洗至基线 ,再用含 0.6mol/L NaCl 洗除杂蛋白 ,最后用 1.2mol/L NaCl 将 hKGF-2 洗下。透析脱盐后 ,上阳离子交换柱 ,用含 0.6mol/L NaCl 平衡缓冲液洗脱 ,即得纯品。

1.7 表达产物的活性测定

用含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养液在 96 孔板内培养 NIH3T3 细胞 ,每孔约 5×10^4 个细胞 ,37℃ 培养 24 h。加入纯

化的 BL-21 表达产物 100 μ L ,同时设立阴性对照、空白对照。采用 MTT 法测定 NIH3T3 细胞的增殖情况。

2 结果与讨论

2.1 hKGF-2 cDNA 的克隆

自流产胎儿肺组织提取总 RNA ,将其逆转录成 cDNA。用 2 个 hKGF-2 特异性引物做 PCR。取 PCR 产物做 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,扩增的 cDNA 片段大小约 500bp ,与预期的片段长度相符(图 1)。

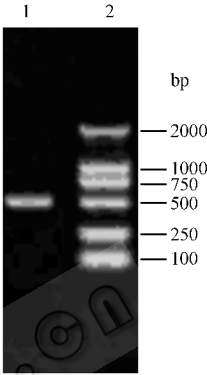


图 1 hKGF-2 特异性 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Electrophoretic analysis of hKGF-2cDNA
1 : RT-PCR product ; 2 : DL2 000 DNA marker

2.2 重组 pBV220-hKGF-2 质粒的构建

将得到的特异性 cDNA 克隆入 pBV220 质粒 ,*EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定筛选阳性重组质粒(图 2)。对重组 pBV220 质粒中的外源片段进行测序鉴定 ,与已发表的 hKGF-2 cDNA 的序列完全相符。

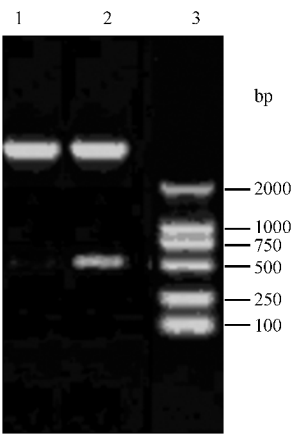


图 2 重组 pBV220-hKGF-2 质粒的酶切鉴定

Fig.2 Enzyme analysis of recombinant pBV220-hKGF-2 plasmid
1 recombinant pBV220-hKGF-2 plamid ; 2 recombinant plamid digested with *EcoR* I and *Bam*H I ; 3 :DL 2000 DNA marker

2.3 hKGF-2 基因在大肠杆菌中表达及产物的纯化

用 pBV220-hKGF-2 重组质粒转化大肠杆菌 ,筛选阳性克隆进行培养 ,42℃ 诱导表达。细胞裂解物的 SDS-PAGE 结果

显示 经诱导的大肠杆菌裂解物经考马斯亮蓝染色 ,在凝胶上于 20kD 处形成的一条明显的蛋白条带 ,与预期结果相符。并证实该蛋白未形成包涵体 ,经超声破碎 ,于上清中可溶性表达 经肝素亲和层析和离子交换层析进一步纯化(图 3)。经紫外分光检测 ,获得了每升发酵液约 84mg hKGF-2 的表达水平。

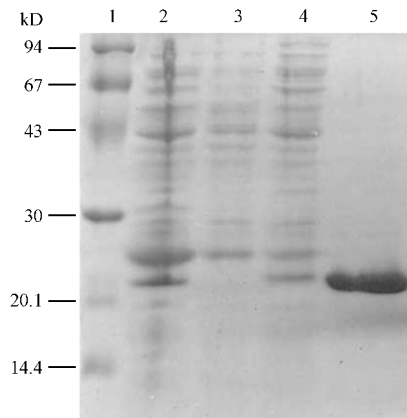


图 3 hKGF-2 在 BL21 中表达产物及纯品的 SDS-PAGE 分析鉴定

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed protein of pBV220-hKGF-2 / E. Coli BL21

1 :protein marker 2 ̳induced ;3 ̳uninduced ;

4 :ultrasonic-treated supernatant protein ;5 ̳purified rhKGF-2

2.4 纯化 hKGF-2 的活性测定

纯化的 hKGF-2 通过 MTT 法测定其活性(图 4)。结果表明 ,重组 hKGF-2 对 NIH3T3 细胞具有明显的促有丝分裂作用。表明 hKGF-2 基因在大肠杆菌菌株 BL21 上成功地实现了表达 ,可满足对 hKGF-2 研究的需要。由于 hKGF-2 具有极高的临床应用价值 ,本研究为进一步开发提供了实验依据。

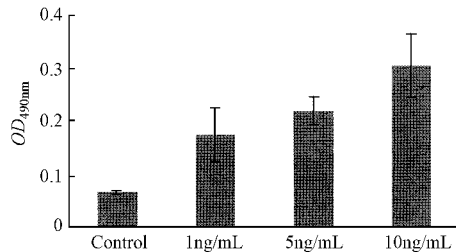


图 4 纯化 hKGF-2 的活性测定

P < 0.001 与对照组相比

Fig.4 The mitogenic activity of purified hKGF-2

P < 0.001 compared with control

REFERENCES(参考文献)

[1] Nishimura T ,Nakatake Y ,Konishi M *et al.* Identification of a novel FGF ,FGF21 preferentially expressed in live. *Biochim Biophys Acta* , 2000 , **1492** :203 – 206

[2] Jimenez PA , Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerate

wound healing in incision wounds. *J Surg Res* ,1999 **81** :238 – 242

[3] Igarashi M ,Finch PW ,Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor(FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor(FGF-7) . *J Biol Chem* ,1998 **95** :537 – 543

[4] Lu W ,Luo Y ,Kan M *et al.* Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* ,1999 **274** :12827 – 12834

[5] Yamasaki M ,Miyake A ,Tagashira S *et al.* Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* ,1996 **271** :15918 – 15921

[6] McKeehan WL ,Wang F , Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family : diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol.* 1998 **59** :135 – 176

[7] Lu Weiqin ,Luo Yongde ,Kan Mikio *et al.* Fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem* ,1999 **274** :12827 – 12834

[8] Min H ,Danilenko DM ,Scully SA *et al.* FGF-10 is required for both limb and lung development and exhibit striking similarity to Drosophila branchless. *Gene Dev* ,1998 , **12** :3156 – 3161

[9] Sekine K ,Ohuchi H ,Fujiwara M *et al.* FGF-10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* ,1999 **21** :138 – 141

[10] Ohuchi H ,Hori Y ,Yamasaki M *et al.* FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 ̳b in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 **277** :643 – 649

[11] Marchese C ,Felici A ,Visco V *et al.* Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* ,2001 **116** :623 – 628

[12] Miceli R ,Hubert M ,Santiago G *et al.* Efficacy of keratinocyte growth factor-2 in dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *J Pharmacol Exp Ther* ,1999 **290** :464 – 471

[13] Han DS ,Li FL ,Holt L *et al* Keratinocyte growth factor-2(FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 **279** :G1011 – G1022

[14] Cohn SM ,Schloeman S ,Tessner T *et al.* Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* ,1997 **99** :1367 – 1379

[15] Newberry RD ,Stenson WF ,Lorenze RG. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat Med* ,1999 **5** :900 – 906

[16] Jobin C ,Mortreau O ,Han DS *et al.* Specific NF-̳B blockade selectively inhibits tumor necrosis factor-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology* ,1998 **95** :537 – 543

[17] Jimenez PA ,Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res* ,1999 **81** :238 – 242

[18] Emoto H ,Tagashira S ,Mattei MG *et al.* Struction and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem* ,1997 **272** :23191 – 2319

Cloning , Expression of Human Keratinocyte Growth Factor and Its Purification and Identification

WU Bin-Wen² DUAN Zhao-Jun^{1*} LI Wu-Ping¹ CHEN Yong¹ LÜ Hong-Liang¹ YI Zuo-An¹

ZHANG Cheng-Hai¹ LIN Ju-Sheng³ WANG Jia-Long³ HOU Yun-De¹

¹(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering , Institute of Virus Prevention and Control ,
Chinese Center of Disease Control , Beijing 100052 ,China)

²(East Department of Gastroenterology , Institute of Geratology , Guangdong Provincial People 's hospital , Guangzhou 510080 , China)

³(Institute of Liver Disease , Tongji Hospital , Tongji Medical College , Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430030 ,China)

Abstract To clone KGF-2 gene , get hKGF-2 protein and determine its activity . The cDNA of human KGF-2 was isolated from fetal lung by RT-PCR and cloned into pBV220 plasmid . The recombinant pBV220-hKGF-2 plasmid was transformed into *E . coli* (BL21) , induced at 42℃ for the expression of hKGF-2 . Recombinant human KGF-2 was purified from the ultrasonic-treated BL21 by heparin-Sepharose CL-6B treated column chromatography and cation exchange column chromatography . MTT method was used for the determination of its biological activity . SDS-PAGE showed that rhKGF-2 was expressed in *E . coli* BL21 as soluble protein of ~20kD . The rhKGF-2 protein can stimulate the proliferation of NIH3T3 cells significantly from 1 ng/mL to 10 ng/mL . hKGF-2 cDNA was cloned and highly expressed in *E . coli* BL21 and the purified rhKGF-2 showed the mitogenic activity on NIH3T3 cells .

Key words KGF-2 , cloning and expression , purification , identification

Received : 10-29-2003

This work was supported by Grant from National High Technology Research and Development Program of China(863)(No.2001A215281) .

* Corresponding author . Tel 86-10-63578845