

重组人骨形态发生蛋白-6 的表达、纯化及其活性分析

阳菊华 赵丽 杨爽 吴双庆 张杰 朱天慧*

(南开大学医学院医学分子遗传实验室, 天津 300071)

摘要 利用 RT-PCR 从人胎盘组织中获取 BMP-6 成熟肽的 cDNA 片段, 并克隆到表达载体 pET-15b 中, 构建 hBMP-6 成熟肽的非融合蛋白表达质粒 pET-BMP6, 转化 *E. coli* BL21(DE3) IPTG 诱导 4h 后, 工程菌高表达 rhBMP-6 成熟肽, 在 SDS-PAGE 上出现预期的新蛋白带($\approx 15\text{kD}$), 约占菌体总蛋白的 10%。表达产物以包涵体形式存在。分离和纯化的包涵体溶解于 8 mol/L 尿素, 在变性溶解状态下经阳离子交换层析, 得到目的蛋白纯度达 95% 以上。再经稀释复性后, 约 80% 的 rhBMP-6 形成同源二聚体。体外活性分析结果显示: rhBMP-6 可以提高 C3H10T1/2 细胞碱性磷酸酶活性及促进 I 型胶原、Osterix(*Osx*) 和骨钙素(*Osteocalcin*) 等成骨细胞表型转化标记基因 mRNA 的表达, 证明制备的 rhBMP-6 具有诱导非骨源性细胞分化成为成骨细胞的作用。

关键词 人骨形态发生蛋白-6 大肠杆菌 C3H10T1/2 细胞 成骨细胞表型转化标记基因

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0556-05

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)属于 TGF- β 超基因家族的成员, 目前已有约 40 个 BMPs 基因被克隆, 除 BMP-1 外, 都具有诱导间充质细胞成骨、成软骨细胞分化, 促进新骨的形成作用^[1]。在 BMPs 家族中, 体内(*in vivo*)实验表明 BMP-6 可以促进异位骨形成, 而体外(*in vitro*)实验证明 BMP-6 可促进成骨、成软骨细胞分化和诱导体外成骨的能力^[2,3]。另外, BMP-6 还受雌激素选择性上调^[4], 而雌激素在治疗妇女绝经后期原发性骨质疏松症有明显的疗效^[5]。有研究表明: BMP-6 除可临床外用治疗顽固性骨折外, 还可作为神经营养因子和再生障碍性贫血的辅助治疗^[6]。我们克隆并构建表达载体 pET-BMP6, 在大肠杆菌表达 rhBMP-6 成熟肽。经离子交换层析纯化, 获得纯度达 95% 以上的重组蛋白, 并对其诱导成骨活性进行初步的分析, 为进一步探讨 BMP-6 对原发性骨质疏松症的治疗作用及其他的生物功能的研究提供条件。

1 材料与方法

1.1 RT-PCR

提取人胎盘组织 mRNA(Quick-Prepmicro-mRNA Purification Kit, pharmacia. Co.) 以 oligo(dT)₁₈ 反转

产物作模板, PCR 扩增 hBMP-6 成熟肽 cDNA 片段(GenBank accession No. NM_001718)。为便于克隆在上、下游引物分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。上游引物: 5'-gtc accatgggacaacagagtcgtaatcgc-3'; 下游引物: 5'-ggccggctcagattagtgccatccacaagctct-3'。

1.2 表达载体构建

回收的 PCR 产物经 *Nco* I / *Xho* I 酶切后, 连接到制备好的表达载体 pET-15b 中, 连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)。采用菌落 PCR 初步筛选阳性克隆菌落, 进一步提取质粒作酶切鉴定。结果与预期吻合, 测序验证读码框的正确性。

1.3 rhBMP-6 成熟肽的诱导表达

工程菌 BL21(DE3) pET-BMP6 过夜培养物按 1:100 接种于 LB/Ampicillin(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养, 至 $OD_{600\text{nm}}$ 达 0.4 左右, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4h 后收集菌体。

1.4 rhBMP-6 成熟肽的纯化

菌体重悬于缓冲液 STE(10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT)在冰浴条件下超声破碎。沉淀用 2% 脱氧胆酸钠 4 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤^[7]。纯化的包涵体溶解于含 8 mol/L 尿素的缓冲液中, 经 CM-Cellulose 离子交换层析进

一步纯化和复性处理后,产物最终纯度达 95% 以上,真空冷冻干燥,保存于 -70°C 。

1.5 蛋白含量测定

按 Protein Assay ESL(Roche Co.) 试剂盒说明书。

1.6 细胞培养

C3H10T1/2 细胞接种于生长培养基 αMEM , 含 15% FBS 和抗生素(100 u/mL penicillin-G 和 100 μg /mL strepto-mycin) 中, 在 37°C 5% 的 CO_2 培养箱中培养。待细胞 80% ~ 90% 长满时, 换条件培养基 αMEM 含 5% FBS 和抗生素及 1000ng/mL rhBMP-6 继续培养, 并于不同时间段收集细胞, Trizol 试剂提取总 RNA, 用于成骨细胞表型转化标记基因的表达分析。为检测 rhBMP-6 对细胞碱性磷酸酶活性的影响, 按每孔 5000 细胞接种于 96 孔板, 待细胞 80% ~ 90% 长满时, 换条件培养基 αMEM 含 5% FBS 和抗生素及不同浓度的 rhBMP-6 继续培养 3 d。并以来源于真核细胞表达的 rhBMP-6 标准品(纪晓辉博士惠赠, R&D Systems, Inc.) 作对照。

1.7 成骨细胞分化标记基因的表达分析

利用 RT-PCR 检测成骨细胞分化标记基因, 包括 I 型胶原(ColI)、骨钙素(Oc) 和 Osterix (Osx) 的 mRNA 表达情况。根据 GenBank 提供的序列及 GeneRunner 软件辅助设计 PCR 引物。鼠的 I 型胶原(ColI)、骨钙素(Oc) 和 Osterix (Osx) 等基因的上游和下游引物分别是: $5' \text{-cctggttaaagatggtgcc-3'}$ (ColI 34-F) 和 $5' \text{-caccaggttcaccttgcacc-3'}$ (ColI256-R); $5' \text{-cctcagtcceccagccagatcc-3'}$ (Oc 698-F) 和 $5' \text{-cagggcagagagaggacagg-3'}$ (Oc 917-R); $5' \text{-gtcaagagtctagccaaactc-3'}$ (Osx1554-F) 和 $5' \text{-aaatgatgtgaggccagatgg-3'}$ (Osx 1677-R)。G3PDH 的引物为: $5' \text{-tgaagtcggtggaacgat-3'}$ (G51-F) 和 $5' \text{-catgtaggccatgaggtccaccac-3'}$ (G1033-R)。

20 μL 反应体系中用 500ng 总 RNA, 按下列条件进行反转录(RT): 42°C , 60min ; 95°C , 5min ; 4°C , 5min。在 25 μL PCR 反应体系中加入 5 μL 3 倍稀释的 RT 产物, 并在每个反应中加入 G3PDH 引物以扩增 G3PDH 作为模板归一化标准。PCR 反应条件为: 94°C , 30s ; 58°C , 30s ; 72°C , 1min ; 25 个循环。为进行半定量 RT-PCR 分析, 3 次独立重复实验。

每孔 10 μL PCR 产物, 2% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 用凝胶紫外成像系统成像并薄层扫描分析图像, Microsoft Excel 处理数据并作图。作图数据为 3 次均值。为归一化 RT-PCR 反应体系中 RNA/cDNA

量, 采用以下公式: $\text{CV} = \% \text{Volume of marker gene} / \% \text{Volume of G3PDH}$ 。

1.8 碱性磷酸酶活性的测定

C3H10T1/2 细胞刺激培养 3d 后, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 然后每孔加入 100 μL 碱性磷酸酶反应底物溶液(Sigma # 104 phosphatase substrate) 溶解于 15mL 50mmol/L glycine, 1mmol/L MgCl_2 , pH10.5, 37°C 孵育 20min。用 Microplate Reader 在 405nm 波长测定吸收值。所有参数取 6 次重复的平均数并用 Microsoft Excel 作图分析。

2 结果

2.1 表达载体的构建及鉴定

提取人胎盘组织 mRNA, 利用 RT-PCR 获得 hBMP-6 成熟肽的 cDNA 片段并将其连接到原核表达载体 pET-15b 中, 构建表达非融合 hBMP-6 成熟肽的载体 pET-BMP6 (Fig. 1)。对提取质粒用限制性

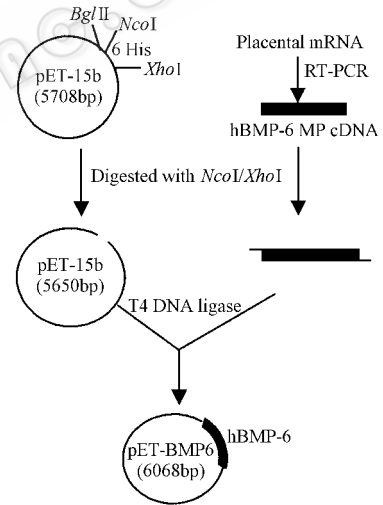


图 1 pET-BMP6 构建流程图

Fig. 1 Construction of pET-BMP6 vector

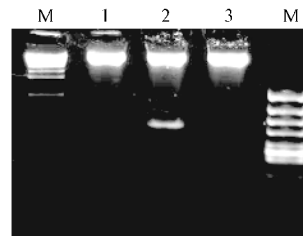


图 2 pET-BMP6 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of pET-BMP6 vectors: pET-BMP6 digested with *Bgl* II (lane1) and *Bgl* II / *Xho* I (lane2), *Xho* I (lane3) and Marker standard (M)

内切酶酶切电泳分析, 分别可切下 $\sim 500\text{bp}/5.6\text{kb}$ 大小的片段, 与预期结果相符 (Fig. 2); 最后, 测序结

果表明插入片段的碱基序列和读码框完全正确。

2.3 rhBMP-6 成熟肽的表达和纯化

BL21(DE3) pET-BMP6 经 IPTG 诱导表达 4h 后,作还原性 SDS-PAGE 电泳。与未诱导菌(Fig. 3, lane A)比较出现二条明显的诱导蛋白带(Fig. 3, lane B)。一条质量约 15kD 的蛋白带,同预期的 rh-BMP-6 成熟肽大小一致,电泳胶薄层扫描显示所表达的 15kD 蛋白约占菌体总蛋白的 10%,并以包涵体形式存在。另一条质量约 30kD,以可溶性形式存在于上清中,曾推测其可能为 rhBMP-6 成熟肽的二聚体(Fig. 3, lane C),但在对其纯化过程中,发现其不具备碱性蛋白特性,表现出酸沉淀和不能结合到阳离子介质上。而 BMP-6 成熟肽为碱性蛋白(pI 8.6)从而否定这个推测。诱导出的 30kD 新蛋白仍为未知。

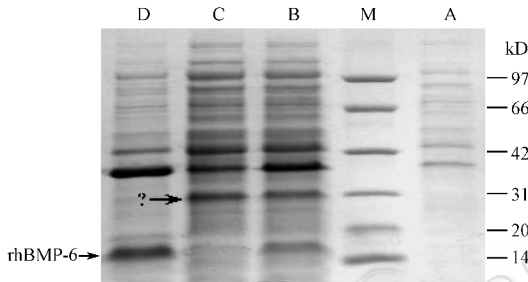


图 3 表达的 rhBMP-6 以包涵体形式存在

Fig. 3 Reduced SDS-PAGE analysis of the rhBMP-6 protein produced in *E. coli* BL21(DE3) after IPTG induction

Total protein extract from non-induced(A) and induced(B) culture ; supernatant(C) and precipitate(D) from induced culture. Positions of molecular mass markers are shown at left

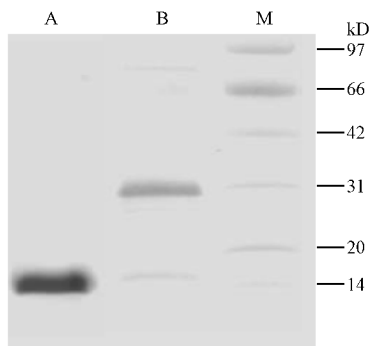


图 4 纯化 rhBMP-6 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified rhBMP-6 under reducing conditions(A) and non-reducing conditions(B)

Positions of molecular mass markers are shown at left

以包涵体形式存在的 15kD 诱导蛋白经离子交换纯化和自然缓慢透析复性后,目的蛋白最终纯度达 95% 以上(Fig. 4, lane A)。非还原 SDS-PAGE 检

测蛋白复性结果显示,约 80% 的 rhBMP-6 形成同源二聚体(Fig. 4 lane B),说明复性过程中 rhBMP-6 通过其保守的 7 个半胱氨酸形成链间二硫键,并以可溶性形式存在。真空冷冻干燥保存于 -70°C 。

2.4 表达产物的活性测定

鼠胚胎成纤维细胞 C3H10T1/2 为潜在多功能分化细胞系,能被许多细胞因子诱导向成肌细胞、脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞分化。有报道 BMP-2 和 TGF- β 能诱导 C3H10T1/2 细胞向成骨、软骨细胞分化^[8]。在成骨细胞分化和成熟过程中常表达许多成骨细胞表型转化标记基因,包括骨特异性碱性磷酸酶、I 型胶原、osterix 和骨钙素等^[5]。

为检测 rhBMP-6 的诱骨活性,我们首先分析不同浓度的 rhBMP-6 对 C3H10T1/2 细胞碱性磷酸酶活性的影响。研究结果表明:rhBMP-6 能显著提高 C3H10T1/2 细胞碱性磷酸酶的活性(Fig. 5),并表现剂量依赖性。但与真核细胞表达的标准品 rhBMP-6 比较,等剂量的活性效价低约 30% 左右。

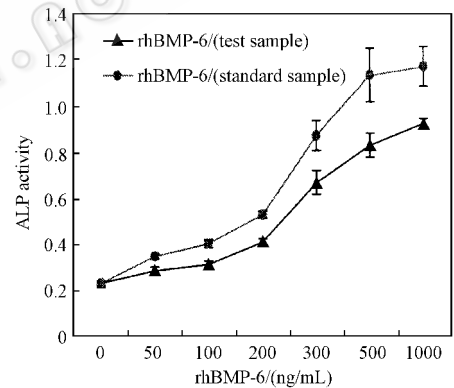


图 5 rhBMP-6 影响 C3H10T1/2 细胞的碱性磷酸酶活性

Fig. 5 The effect of rhBMP-6 on alkaline phosphatase(ALP) activity in C3H10T1/2 cells

The data expressed as the mean \pm S. D(n = 6)

同时,利用半定量 RT-PCR 分析 rhBMP-6 对 C3H10T1/2 细胞在分化中其他一些成骨细胞表型转化标记基因 mRNA 表达的影响。分析结果显示:rh-BMP-6 能够促进 C3H10T1/2 细胞的 I 型胶原、osterix 和骨钙素(osteocalcin)等基因 mRNA 表达(Fig. 6),而且不同标记基因的 mRNA 表达水平在 rhBMP-6 刺激时间段上表现一定的差异,并体现明显的时间依赖性。而在 5d 后,三个被检测的标记基因的表达水平比对照提高约 3 倍。

以上结果表明,获得的重组蛋白 rhBMP-6 具有诱导非骨源性细胞分化成为具有成骨细胞表型的细胞的作用。

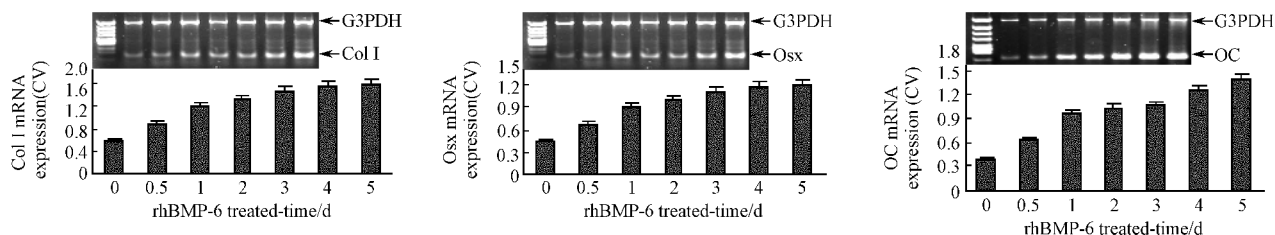


图 6 rhBMP-6 诱导 C3H10T1/2 细胞表达成骨细胞表型标记基因

Fig. 6 rhBMP-6 stimulates expression of osteoblast markers in C3H10T1/2 cells

Cells were treated with 1000ng/mL of rhBMP-6 for the indicated period of time, and RNA expression of Collagen type I (top), Osterix (middle) and Osteocalcin (bottom) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

Col I, Osx and OC RNA expression levels were normalized to G3PDH expression. The data expressed as the mean + S. D (n = 3), and the photos from one representative experiment are presented. Marker is ϕ X174-Hinc II digest.

3 讨论

hBMP-6 基因位于 6p24-23, cDNA 全长 2934bp, 开放读码框架(ORF)为 1539bp, 编码 513 个氨基酸的多肽, 包括 N-端的信号肽、中间的前肽及 C-端的成熟肽三部分。有活性的成熟肽含有 132 个氨基酸, 包括 7 个保守的半胱氨酸残基和 3 个潜在的 N-连接的糖基化位点和^[9,10]。在细胞中合成的 BMP-6 前体蛋白一旦经蛋白酶水解, 通过二硫键链间连接, 产生活性的二聚体, 并分泌到胞外^[11]。

本实验将 hBMP-6 成熟肽 cDNA 直接克隆到 pET-15b 的 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点之间, 切除了 6 个组氨酸, 从而可以避免融合 6 个组氨酸带来的负面影响, 同时, hBMP-6 成熟肽有一个明显的理化特性就是它为碱性蛋白($pI = 8.6$)^[8], 适于阳离子交换层析纯化。大肠杆菌表达的 rhBMP-6 以包涵体的形式存在, 一方面防止蛋白酶对过表达蛋白的降解, 另一方面非常有利于分离纯化。但以包涵体形式存在的过表达蛋白不具有生物活性, 只有通过体外控制条件下变性、复性来完成蛋白重折叠, 使重组蛋白具有正常生物学活性所必需的结构形式。我们采用先纯化后复性的策略, 取得比较好的效果。在复性过程中没有可见性絮状沉淀出现, 而且约 80% 的 rh-BMP-6 复性后通过链间二硫键形成同源二聚体 (Fig. 4 lane B)。除 BMP-1 外, BMPs 属于细胞分化因子, 至今尚无定量的活性测定方法, 因而无法用比活性监测其复性过程中的活性恢复情况。目前, BMP 诱骨活性一般以其体外诱导多功能性前体细胞表达碱性磷酸酶或体内异位诱导骨、软骨生成来定性判断。我们的实验结果表明纯化、复性后的 rhBMP-6 能提高 C3H10T1/2 细胞的碱性磷酸酶活性。在 rh-BMP-6 浓度达 300ng/mL 时, 碱性磷酸酶活性明显提

高, 但在等剂量的活性效价上, 我们获得的 rhBMP-6 比来源于真核细胞表达的标准品 rhBMP-6 低 30% 左右。活性低不仅与大肠杆菌缺乏糖基化系统等蛋白合成时的加工修饰有关, 而且复性过程中二硫键的错配也是一个重要的原因。

基于多功能性前体细胞分化成为具有成骨细胞表型的细胞过程中常伴随许多成骨细胞特有的表型基因的表达, 比如 I 型胶原、骨钙素和 Osterix 等^[5], 我们利用半定量 RT-PCR 分析 rhBMP-6 对 C3H10T1/2 细胞的成骨细胞分化标记基因的影响, 结果表明: rhBMP-6 能明显诱导 C3H10T1/2 细胞表达成骨细胞表型标记基因, 为 BMP 体外诱导成骨活性检测提供另一有效的手段。另外, 有报道 BMP-2 和 TGF- β 能诱导 C3H10T1/2 成软骨分化和形成三维球形结构^[10]。我们在实验中也观察到 rhBMP-6 刺激 15d 后 C3H10T1/2 细胞明显形成三维球形结构, 而对照组没有该现象。总之, 我们的实验结果表明来源于原核表达的 rhBMP-6 经纯化、复性后具有诱导非骨源性细胞分化成为成骨细胞表型的细胞的作用, 为进一步体内诱导异位成骨试验和研发辅助性治疗骨质疏松性骨折, 特别是绝经期后妇女的骨质疏松性骨折的基因工程药物提供前期基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Groeneweld E H, Burger E H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 2000, **142**: 9-21
- [2] Hughes F J, Collyer J, Stanfield M *et al*. The effects of BMP-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. *Endocrinology*, 1995, **136**: 2671-2677
- [3] Gitelman S E, Kobrin M S, Ye J Q *et al*. Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation *in vivo*. *J Cell Biol*, 1994, **126**: 1595-1609

- protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest* ,1998 , **101** : 413 – 422
- [5] GUO S F (郭世绂), LUO X Z (罗先正), QIU G X (邱贵兴), Harry K. Genant. *Osteoporosis : Basic and Clinical Aspects*. Tianjin : Tianjin Technology Publishing Company 2001
- [6] Wang Y , Chang C F , Morales M *et al.* Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia -induced brain damage in rats. *Stroke* ,2001 , **32** : 2170 – 2178
- [7] Marshak D R ,Kadonaga J T , Burgess R R *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization :A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor laboratory Press , 1996
- [8] Denker A E , Nicoll S B , Tuan R S. Formation of cartilage-like spheroids by crosass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with TGF-beta1. *J cell Biochem* , 1997 , **65** (3) : 325 – 339
- [9] Celeste A J , Iannazzi J A , Taylor R C *et al.* Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** : 9843 – 9847
- [10] Hahn G V , Cohen R B , Wozney J M *et al.* A BMP subfamily : chromosomal localization of human genes for BMP5 , 6 and 7. *Genomics* , 1992 , **14** : 759 – 762
- [11] Carl A ,Kirker-Head. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 2000 , **43** 65 – 92

Expression of Recombinant Human BMP-6 in *Escherichia coli* and Its Purification and Bioassay *in vitro*

YANG Ju-Hua ZHAO Li YANG Shuang WU Shuang-Qing ZHANG Jie ZHU Tian-Hui*

(*Medical Molecular Genetics Lab , Medical College of Nankai University ,Tianjin 300071 , China*)

Abstract To purify the recombinant human BMP-6 protein and to establish its *in vitro* bioassay method. The cDNA encoding the mature peptide of hBMP-6 protein was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) , using human placental mRNA as template , and subcloned into the high-expression vector pET-15b under the control of T7lac promoter. The resulting construct , pET-BMP6 , was then transformed into an *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) for the production of recombinant hBMP-6 protein(rhBMP-6). After 4 hours of induction by isopropyl- β -D- thiogalactoside(IPTG) , rhBMP-6(\approx 15kD) was expressed and formed inclusion bodies , contributing up to 10% of the total bacterial protein. The inclusion bodies were isolated and redissolved in 8mol/L urea , and the denatured rhBMP-6 was purified to 95% purity by CM-Cellulose 32 ion exchange chromatography(IEC). The osteoinductivity of rhBMP-6 was measured by the expression of some of the osteoblast differentiation marker genes in rhBMP-6-treated C3H10T1/2 cells as reflected by determinations of alkaline phosphatase(ALPase) activity and semi-quantitative RT-PCR. At the end of the purification process , about 80% of rhBMP-6 formed disulphide-linked homodimers after refolding during renaturation. The apparent size of the protein was 30kD on non-reducing SDS-PAGE , similar to that of the native form of hBMP-6. The enzyme assays showed that the ALPase activity was increased in a dose-dependent manner with the treatment of rhBMP-6. After the addition of 300ng/mL of rhBMP-6 , the ALPase activity of C3H10T1/2 cells increased significantly. The activity of rhBMP-6 used was comparable to about 70% of that of the standard hBMP-6 derived from eukaryotic cells. RNA extraction data also showed rhBMP-6 stimulated expression of osteoblast marker genes , including type I collagen , osteonin , and osteocalcin in a time-dependent manner. After 5 days of treatment , their level of expression was increased to 3 times that of controls. Bone morphogenetic protein (BMP)-6 , a member of the 60A subgroup of the bone morphogenetic protein (BMPs) family , plays a pivotal role in bone formation. Previous evidence showed that BMP-6 is selectively up-regulated by estrogen , suggesting its potential role in the treatment of osteoporotic fractures , especially for menopausal osteoporosis. Our present study demonstrates that the recombinant hBMP-6 produced in *Escherichia coli* is able to induce pre-osteoblastic cells to differentiate into osteoblasts *in vitro* , and analysis of mRNA expression of type I collagen , osteonin , and osteocalcin can be also a method for measuring the osteoinductivity of BMP. This provides the basis for further studies on ectopic bone formation in the body and for the development of auxiliary drugs for the treatment of osteoporotic fractures.

Key words human bone morphogenetic protein-6 ; *Escherichia coli* ; C3H10T1/2 cell line , osteoblast marker genes

Received 03-29-2003

This work was supported by Grant from the Natural Science Funds of Tianjin (No. 013608911).

* Corresponding author. Tel 86-22-23509842 ;Fax 86-22-23509842 ;E-mail zhuth@nankai.edu.cn

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