

SCT-OGP 的融合表达与活性的初步研究

SCT-OGP Fusion Protein Expression and Its Potential Role as Osteoporosis Therapy

刘 煜^{1†} 杨小莉^{1†} 何 湘² 彭英方² 李 平² 张艳红² 马清钧² 钟 辉^{2*}
LIU Yu^{1†} ,YANG Xiao-Li^{1†} ,HE Xiang² ,PENG Ying-Fang² ,LI Ping² ,ZHANG Yan-Hong² ,MA Qing-Jun²
and ZHONG Hui^{2*}

1 武警总医院 北京 100039

2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850

1 The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces , Beijing 100039 , China

2 Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100850 , China

摘 要 根据天然鲑鱼降钙素(Salmon calcitonin ,SCT)和骨生长肽(Osteogenic Growth Peptide ,OGP)的序列 ,人工合成了 6 个 DNA 片段 ,进行退火、连接和转化后 ,获得含有 SCT 与 OGP 融合基因的 pPIC9-SCT-OGP 表达载体 ,经测序后将此重组质粒电击转化毕赤酵母 GS115 ,通过培养、筛选以及 SDS-PAGE 鉴定 ,在毕赤酵母中获得了 SCT-OGP 融合蛋白的可溶性表达 ,经分子筛纯化后在 5kD 左右可见单一条带。将此条带进行了 N 端氨基酸组分分析 ,证实此目的蛋白为 SCT-OGP 融合蛋白。MIT 法显示 SCT-OGP 融合蛋白在体外可以促进成骨细胞和成纤维细胞增殖 ,以小鼠为模型的试验显示 SCT-OGP 融合蛋白在体内可以提高碱性磷酸酶活性和降低血钙 ,表明该融合蛋白具有抑制破骨细胞的活性和刺激成骨细胞增殖的活性 ,从而提示该融合蛋白具有治疗骨质疏松症的药用潜力。

关键词 鲑鱼降钙素 ,骨生长肽 ,骨质疏松症

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0539-06

Abstract Osteoporosis is a disease of bone metabolic disorder , the incidence of which increases sharply in old people. Calcitonin(CT) is a peptide hormone containing 32 amino acid that can inhibit osteoclasts activity. Osteogenic Growth Peptide (OGP) is a peptide hormone with 14 amino acid. It is an autocrine mitogen for osteoblastic and fibroblastic cells which has anabolic activity. Six SCT and OGP DNA segments were chemically synthesized and ligated into a yeast expression vector pPIC9. The recombinant plasmid was transformed into *pichia pastoris* GS115. Finally , we got two stable SCT-OGP high expression clones after screening. Purified protein can stimulate the proliferation of osteoblastic and fibroblastic cells , and also stimulate serum ALP activity and decrease serum calcium level using mice as animal models , demonstrating its potential role in osteoporosis therapy.

Key words calcitonin , osteogenic growth peptide , osteoporosis

骨质疏松症是老年性常见疾病之一 ,目前全世界约有 2 亿人患骨质疏松 ,其发病率已跃居世界各

种常见病的第七位。骨质疏松症引起的主要后果是骨折 ,骨折不仅使国家和个人承担的医疗费用大大

Received : January 9 , 2006 ; Accepted : March 28 , 2006.

* Corresponding author. Tel : 86-10-66931821 ; E-mail : zowall@yahoo.com

† These authors contribute equally to the work.

增加,而且会导致残疾、终身丧失生活能力甚至死亡,给家庭和社会带来严重的危害。因此骨质疏松症已引起世界各国政府的重视,并且列入我国“九五”公关老年病的重点课题。目前国际上已将防止骨质疏松症预防骨折并发症,与防止高血压预防脑卒及防止高血脂预防冠心病放在同等重要地位。

本项目将具有抑制破骨细胞活性的 SCT¹¹和促进骨骼形成的 OGP^[2-5]融合表达,预测可以同时通过两个不同的方面来调节骨骼的生理状态,使骨骼向富集的方向发展,期望能够在治疗骨质疏松症方面具备良好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒: *Pichia* 酵母 GS115、大肠杆菌 DH5 α 、*Pichia* 酵母表达质粒 pPIC9 由本室保存。

1.1.2 细胞株系及实验动物: 成骨细胞取自出生 1~2d 的 Wistar 胎鼠颅骨。成纤维细胞 NIH3T3 由本室保存。1~2d 的 Wistar 胎鼠和健康成年大鼠由中科院实验动物中心提供。

1.1.3 试剂: T4DNA 连接酶、限制酶等均为华美生物工程公司产品。DNA 回收试剂盒为 Promega 公司产品。钙试剂盒(甲基麝香草酚蓝比色法)为北京北化公司产品。ALP 体外检测试剂盒为北京中生公司产品。胎牛血清以及酵母细胞培养基为 GIBCOL 及 Promega 公司产品。SDS-PAGE 所用的低分子量蛋白质 Marker(MW 2512-16949)为 Promega 产品。蛇皮透析袋(3500MWCO)为 PIERCE 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 SCT-OGP 表达载体的构建: DNA 片段由上海生工公司合成,构建过程详见结果。

1.2.2 Tris-Tricine SDS-PAGE 蛋白电泳: 配置 Tris-Tricine SDS-PAGE 三层胶系统,三层胶主要用来分离小分子量的蛋白。样品与 Tricine 上样缓冲液按 3:1 比例混匀,微量注射器上样。电泳初始电压为 30V,待样品电泳通过上层胶时,电压调至 60~70V,直至电泳完毕。

1.2.3 SCT-OGP 蛋白的表达和纯化: 常规方法制备毕赤酵母感受态,取 40 μ L 感受态加入 4 μ L 目的片段,混匀后冰浴 5min,于电击仪上转化涂 MD、MM 平板,于 30 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 2~5d,将 MD 平板上生长、MM 平板上几乎不生长的不同酵母克隆各挑少量到每个试管里,30 $^{\circ}$ C 恒温摇床,剧烈摇晃(\geq 200r/min)让细胞生长饱和(2天),然后离心去掉上清液,每管

加入 2mL BMMY 培养基重悬细胞,让细胞再生长 2d,并从第二天开始每天补加 10 \times 甲醇以诱导目的蛋白表达。从换 BMMY 第三天起每 24h 取样监测。每次取 50 μ L 上清液做 SDS 蛋白分析。获得的含目的蛋白表达上清装入蛇皮透析袋,用固体聚乙二醇(MW=10000)包埋,吸水浓缩后在 20mmol/L 的 PBS(pH7.4)透析液中 4 $^{\circ}$ C 透析。然后进行分子筛纯化,介质为 Pharmacia Sephrose 75,用平衡液充分平衡柱体积至 pH 值、电导值恒定后上样,用洗脱液进行梯度洗脱,分部收集,分装于若干小管,每管 200 μ L,于冷冻浓缩机上冷冻浓缩约 4h,最后得白色粉末,收集于一管中,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 融合蛋白的序列分析: 取适量纯化所得的蛋白冻干粉,氨基酸组分分析由军事医学科学院仪器分析中心进行分析,氨基酸测序由北大生命科学学院分析中心进行。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖: 实验细胞按一定的浓度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔体积 200 μ L。在含 12% 胎牛血清的培养基中培养过夜使细胞正常贴壁,换 2% 胎牛血清的培养基培养 24h,加入不同浓度的待测 SCT-OGP。继续培养 48h 后,每孔加入 MTT 溶液(5mg/mL)20 μ L,继续孵育 4h 终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ L DMSO,反应 15~20min,每 3~5min 混匀一次,使析出物充分溶解。在酶联免疫检测仪上测定 OD₄₉₀,所得数据与对照比较进行增殖率分析。

1.2.6 成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性检测: 在培养有成骨细胞的 96 孔培养板中,加 SCT-OGP 48h 后,用移液器吸去培养基。再用磷酸盐缓冲液洗两次。每孔加入 10 μ L 0.1% Triton X-100 轻柔吹打(小心不要产生气泡),使细胞裂解。每孔加入 100 μ L BCIP,在 37 $^{\circ}$ C 反应 30min。每孔加入 10 μ L 0.1mol/L 的 NaOH 终止反应。在酶联仪上检测 OD₄₁₀。

1.2.7 血清中 ALP 水平的测定: 根据 ALP 体外临床诊断试剂盒操作步骤进行。

1.2.8 动物实验分组如表 1。

表 1 动物实验分组设计

Table 1 Animal group

Group	Mice amount	Injection	Dose
1	3	SCT-OGP	10 μ g/100g
2	3	SCT-OGP	50 μ g/100g
3	3	SCT-OGP	150 μ g/100g
4	3	CT	20mu/100g
5	3	CT	100mu/100g
6	3	Normal saline	100 μ L

2 结果

2.1 SCT-OGP 融合蛋白的表达质粒的构建

通过 GenBank 检索 SCT 核苷酸序列, SCT GenBank 登录号为 Y00765, OGP 序列参考文献 [3], 根据 OGP 和 SCT 的序列设计 6 个核苷酸片段如下: OGP 分成 2 个片段:

O1: 5' tcgag aaaagagaggctgaagct gcgctcaagcggcagggg
agaacctctacggcttcggaggc g

Xho I

O2: 3' c ttttctcggacttcca gcgaggttcgggtcccctctt
gggagatgccgaagcctccg cttaa

Eco R I

SCT 分成 4 个片段:

C1 5' aattc tgctccaatctctacttgctgtt gggg

Eco R I

C2: 5' aagttgagtcaggaattacataagctgcaaacttaccgcgtaccaaacac
tggttctggtacacctggttaa gc

C3: 3' g acgaggttagagagatgaacgcaaga cccc ttcaactcag
tccttaattgtattcgacgttgaatgggcgcatt

C4: 3' ggttgtgaccaagaccatgtggaccaatt cgccgg

Not I

退火时连接顺序如图 1 所示:

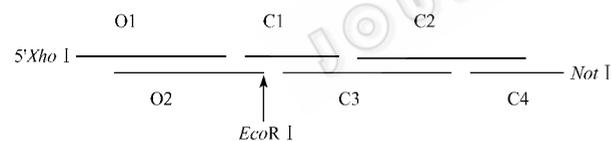


图 1 片段连接示意图

Fig. 1 Fragment ligation

为克隆需要,合成片段时在 5' 端加入 *Xho* I 酶切位点,在 SCT 和 OGP 之间加入 *Eco* R I 酶切位点,在 3' 端加入 *Not* I 酶切位点。加入 *Eco* R I 酶切位点的目的是便于分别表达降钙素和骨生长肽。为实现融合蛋白在酵母中的分泌表达,在 5' 端加入信号肽 aaaagagaggctgaagct。

将合成的上述片段浓度调整到 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $100\mu\text{L}$ 的反应体积中加入每个片段各 $1\mu\text{L}$, $10\times$ T4DNA 连接酶的 Buffer, 95°C 变性 5min, 55°C 退火 2h, 纯化后与经过 *Xho* I、*Not* I 双酶切的真核表达载体 pPIC9 连接过夜。转化重组质粒到大肠杆菌 DH5 α 中,涂 Ap⁺ 的 LB 平板,挑取阳性克隆,重组质粒经上海生工公司测序结果正确。

2.2 SCT-OGP 蛋白的表达

将测序正确的重组质粒用 *Bgl* II 酶切,回收大片段,电击转化入酵母 GS115 中,涂 MD、MM 平板, 30°C 培养 2~5d。挑取 MD 平板上生长、MM 平板上几乎不生长的菌落,于 10mL BMGY 中培养 2d 后,换 2mL BMMY 培养基,换 BMMY 第二天起每天补加 $10\times$ 甲醇,诱导其表达。从加入 BMMY 第 3 天起,每天取样,进行 Tris-Tricine SDS-PAGE 电泳。电泳完毕用 G250 染色,10% 乙酸脱色。筛选到 2 个较高水平的融合蛋白表达菌图 2 为 GS115-46 号菌株的表达产物电泳结果,目的蛋白的表达量约为细胞总蛋白的 4% 左右。相同条件培养未转化质粒的酵母为对照。

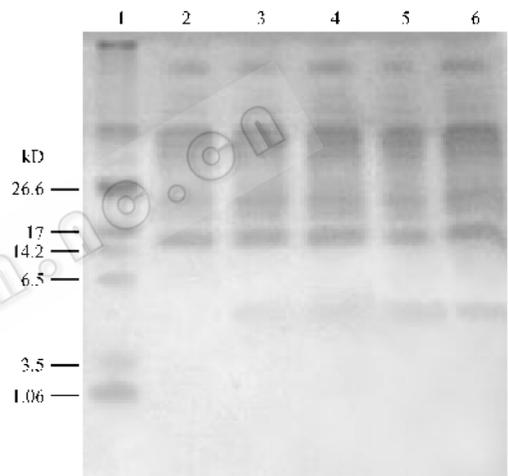


图 2 GS115-46 号菌株的表达产物

Fig. 2 GS115-46 clone expression product

1 low molecular protein marker; 2 control; 3, 4, 5, 6 SCT-OGP

2.3 SCT-OGP 蛋白的纯化

根据目的蛋白的特点即分子量较小且无市售的抗体。所以我们先用透析的方法去除盐分,再经凝胶层析来分离纯化后得到一个明显的峰,将峰吸收的回收液冷冻浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳检测,将目标产物位置的胶回收后进行氨基酸组分分析,实测得几个主要氨基酸的百分含量与理论氨基酸百分含量一致。将纯化后的产物冷冻浓缩成干粉,由北大生命科学学院对氨基端前 10 个氨基酸进行测序,结果正确。所以 GS115-46 号菌株的表达产物为目标产物 SCT + OGP 融合蛋白。

融合蛋白的序列为: EAEAALKRQGRTLYGF GGEFCSNLSSTCVLGLKLSQELHKLQTYPRNTGSGTPG, pI 值为 8.11, 分子量为 5.73kD。

2.4 SCT-OGP 融合蛋白体外活性试验

2.4.1 SCT-OGP 融合蛋白对成纤维细胞增殖的刺

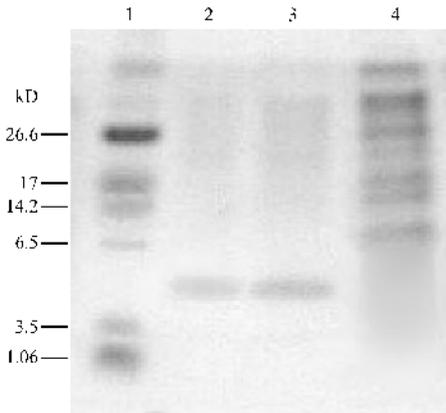


图3 纯化后的 GS115-46 号菌株的表达产物

Fig.3 Purification product of GS115-46 clone

1:marker; 2, 3: the purified sample of the clone-46 expression supernatant; 4:control.

激作用:皮肤成纤维细胞在体外培养过程中可以形成骨,并且其成骨过程中基质合成、分泌和钙盐沉积的程序与成骨细胞基本一致,符合骨组织形成的生理过程,因而成纤维细胞与成骨细胞及骨骼形成有一定关系^[6]。而成纤维细胞在体外比其它骨细胞更易培养和传代,故在实验中我们用成纤维细胞的活性实验部分代替成骨细胞和骨组织的活性实验。成

纤维细胞 NIH3T3 是一个性能稳定的细胞系,加入不同浓度的 SCT-OGP 融合蛋白,用 MTT 法检测细胞增殖情况,结果如图 4。

增殖率 = (各因子 OD_{490} - 对照 OD_{490}) / 对照 $OD_{490} \times 100\%$ 。

1、2、3 组为不同剂量的 SCT-OGP 融合蛋白以及降钙素,其中降钙素的浓度分别为 0.01、0.1 以及 1u/mL, SCT-OGP 融合蛋白的浓度分别为 2、20、200pg/mL。

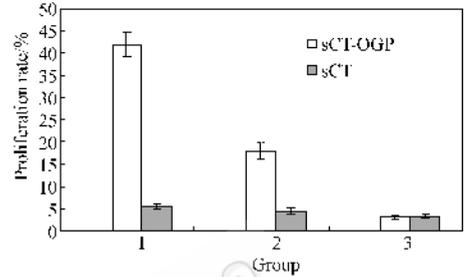


图4 SCT-OGP 融合蛋白对成纤维细胞增殖的刺激作用

Fig.4 SCT-OGP effect on fibroblast cell proliferation

2.4.2 SCT-OGP 融合蛋白对成骨细胞增殖的刺激作用:将相同密度的原代成骨细胞转接在六孔板上,加入低血清培养 6h 后,分别加入不同量的 SCT-OGP

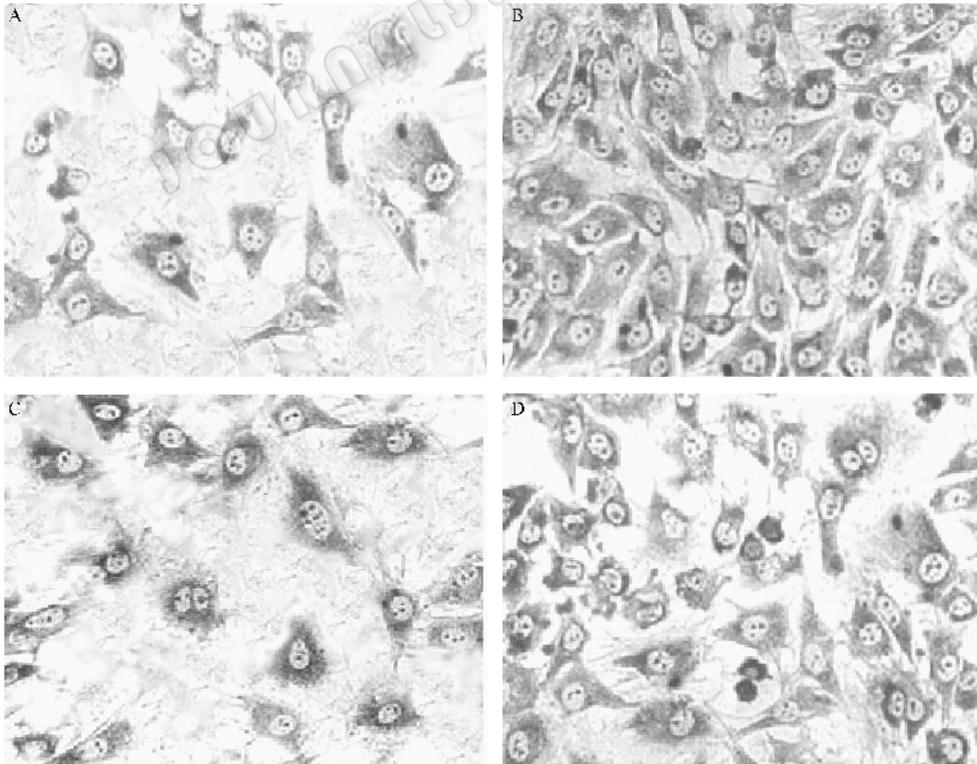


图5 SCT-OGP 融合蛋白对成骨细胞增殖的刺激作用

Fig.5 SCT-OGP effect on osteoblast cells proliferation

A: control: Cells were cultured in low FBS medium without SCT-OGP for one week;

B, C, D: cells were incubated with SCT-OGP at concentrate of 2pg/mL, 20pg/mL and 200pg/mL.

融合蛋白,培养 1 周后观察(图 5)。结果初步显示了融合蛋白在合适的浓度下对成骨细胞增殖有促进作用。

2.4.3 SCT-OGP 融合蛋白可以降低血清钙的水平:用甲基萘酚蓝比色法测定血清 Ca^{2+} 含量,结果如图 6。

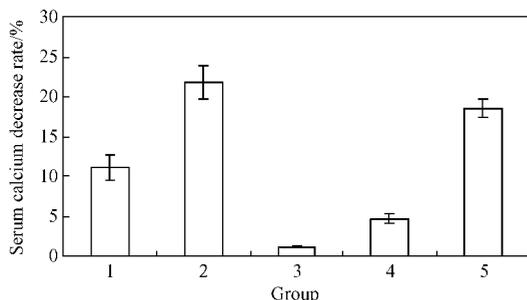


图 6 SCT-OGP 融合蛋白对血清钙水平的影响

Fig. 6 SCT-OGP effect on serum calcium level

serum calcium decrease rate =

$(\text{Control } OD_{610} - \text{Treatment group } OD_{610}) / \text{Control}$.

可以看出所有实验组血清钙含量较对照而言都有降低,在各自最佳使用浓度下 SCT-OGP 融合蛋白比降钙素能更好地抑制大鼠体内破骨细胞的活性 ($P < 0.001$),减缓溶骨速度,因而减少骨髓中的钙向血液中释放。

2.5 融合蛋白体内活性试验

动物分子参照方法中的表 1,小鼠免疫后 4h 眼球取血,将血液在 4℃ 冰箱中存放 24h 后 4℃ 离心分离得血清,以进行下一步检测。

2.5.1 SCT-OGP 融合蛋白可以提高血清 ALP 水平:

分别用 ALP 活性检测法和 ALP 体外临床诊断试剂盒检测动物注射融合蛋白后血清中 ALP 的浓度。动物试验设计如表 1,结果如图 7。

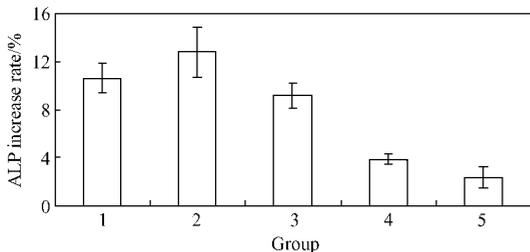


图 7 SCT-OGP 融合蛋白对 ALP 水平的影响

Fig. 7 SCT-OGP effect on ALP level

ALP increase rate =

$(\text{Treatment group } OD_{410} - \text{Control } OD_{410}) / \text{Control } OD_{410} \times 100\%$.

图 7 表明所有因子都可提高大鼠血液中 ALP 的浓度,ALP 反应的是成骨细胞的活性,所以融合蛋白表达产物号给药后可以促进成骨细胞的活性,并

且效果要好于单独降钙素给药的效果。

3 讨论

当前骨质疏松的药物治疗主要分两类,一是抑制骨骼重吸收,如雌激素、降钙素等;另一类是促进骨骼形成,如 PTH、氟化钠等。这几种治疗骨质疏松症的药物都有其优缺点。如降钙素要使用较长时间才能对骨质疏松症有较好疗效,而且一旦停止用药,治疗效果会很快消失,而雌激素类药物存在潜在的致乳腺癌的危险性,活性维生素 D 治疗效果也是药物依赖性的,停药后药效消失,PTH 则在给药方式上有待改进。因此在使用这些药物时应根据不同患者的病情和特点采取单独或联合用药的方式,连续或间歇用药,才有可能取得良好的效果。如针对雌激素类药物存在潜在的致乳腺癌的危险性,活性维生素 D 可抑制雌激素引起的乳腺癌细胞的生长并抑制其浸润及转移。根据美国一项流行病学调查表明活性维生素 D 缺乏是乳腺癌发生的危险因素,因而联合使用活性维生素 D 衍生物不仅可优化雌激素的临床效果,而且有可能消除雌激素引起乳腺癌的可能性。由于活性维生素 D 也抑制雄激素引起的前列腺细胞的增生,因此将来可能会联合口服或经皮肤应用雄激素以治疗男性骨质疏松症。降钙素、雌激素主要是抑制骨骼重吸收,OGP、活性维生素 D 主要是促进骨骼形成,PTH 主要是调节血钙平衡。而如果将抑制骨骼重吸收和促进骨骼形成的药物联合使用,将会提高治疗效果^[7,8]。

我们用基因工程的方法获得了鲑鱼降钙素和骨生长肽的融合蛋白,通过细胞实验,证实融合蛋白对成骨细胞和成纤维细胞的增殖有一定促进作用。通过大鼠血清钙及血清 ALP 浓度的检测,证实该表达的融合蛋白有降低血清钙和提高 ALP 浓度的作用。细胞实验(体外)和动物实验(体内)都证明我们表达的融合蛋白既可以抑制破骨细胞的活性,又可以促进成骨细胞的活性,正象我们所预期的那样同时通过两个不同的方面来调节骨骼的生理状态,使骨骼向富集的方向发展,这在治疗骨质疏松的药物研究中具有一定的创新,并对老年性骨质疏松症的治疗有重要的意义,具有潜在的临床应用价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yates AJ, Gutierrez GE, Garrett IR *et al.* A noncyclical analog of salmon calcitonin retains full potency without inducing anorexia in
- © 中国科学院植物研究所 1990-2015 版权所有 // journals. im. ac. cn

- [2] Bab I , Gazit D , Muhlrad A *et al.* Regenerating bone marrow produce a potent growth-promoting activity to osteogenic cells. *Endocrinology* , 1988 **123** 345 – 352
- [3] Bab I. Regulatory role of osteogenic growth peptide in proliferation , osteogenesis , and hemopoiesis. *Clinical orthopaedics and related research* , 1995 **313** 64 – 68
- [4] Bab I , Einhorn T. Regulatory role of OGP in bone formation and hemopoiesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expressin* , 1993 **3** (1) 31 – 46
- [5] Leonard J , Deftos , Brian P , First. Calcitonin as a drug. *Annals of Internal Medicine* , 1981 **95** :192 – 197
- [6] Rao HM(饶寒敏) , Xu RH(徐荣辉) , Zhu YP(朱雅萍) . The potential bone-forming characterization of human fibroblast *in vitro* . *Chinese Journal of surgery*(中华外科杂志) , 1996 **34** 585 – 588
- [7] Melton LJ. Epidemiology of hip fracture : implication of the exponential increase with age. *Bone* , 1996 **18** :1215 – 1218
- [8] Yan Qun Sun , Doreen E. Ashhurst. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing rabbits. *Cell Biology International* , 1998 **22** 313 – 319