

重组人骨形态发生蛋白 2 在 CHO 细胞中的表达、鉴定及活性分析 Expression, Characterization and Biological Activity Analysis of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 in CHO Cells

张道永¹, 杨 爽¹, 吕树军¹, 闫继东¹, 朱天慧^{1, 2*}

ZHANG Dao-Yong¹, YANG Shuang¹, LÜ Shu-Jun¹, YAN Ji-Dong¹ and ZHU Tian-Hui^{1, 2*}

1 南开大学医学院分子遗传学实验室, 天津 300071

2 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071

1 Laboratory of Medical Molecular Genetics, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 Key Laboratory of Bioactive Material, Ministry of Education of China, Nankai University, Tianjin 300071, China

摘 要 构建真核表达载体 pCDNA3.1(+)-hBMP-2, 与质粒 pSV2-dhfr 共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 以含有 700 µg/mL G418 的 IMDM 进行选择培养, 筛选抗性克隆, 并用 MTX 扩增, 提高 rhBMP-2 的表达量。收集的 rhBMP-2 蛋白进行 Western blot 检测, 还原蛋白样品电泳产生一条大小约为 18 kD 的特异性条带, 非还原蛋白样品电泳产生一条大小约为 30 kD 的特异性条带, 提示表达的 rhBMP-2 是经过糖基化修饰的, 且以同源二聚体形式分泌表达。单细胞分离培养得到 14 株 rCHO(hBMP-2) 单克隆细胞株, ELISA 法检测 rhBMP-2 表达水平, 最高可达 7.83 µg/24 h/10⁶ cells。活性分析结果表明, 表达的 rhBMP-2 具有很强的生物学活性。

关键词 人骨形态发生蛋白 2, CHO, 共转染, C2C12, 碱性磷酸酶

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0968-05

Abstract Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) is a member of the BMPs family, its osteoinductive capacity has already been demonstrated. We tried to express hBMP-2 in CHO cell. In this study, we inserted hBMP-2 cDNA into vector pCDNA3.1(+) to construct hBMP-2 eukaryotic expression vector pCDNA3.1(+)-hBMP-2. Recombinant Chinese hamster ovary (rCHO) cell line expressing high-level recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) was constructed by co-transfecting the expression vectors pCDNA3.1(+)-hBMP-2 and plasmid pSV2-dhfr into dihydrofolate reductase (dhfr)-deficient CHO cells and the subsequent gene amplification in medium containing stepwise increments in methotrexate level such as 0.1 and 1 µmol/L. Western blot analyses showed a specific band of about 18 kD in reduced sample lane and a specific band of about 32 kD in non-reduced sample lane, this indicated that rCHO cells secret rhBMP-2 as a homodimeric glycoprotein form. Finally, we obtained a single clone cell strain expressing a high level (7.83 µg/24 h/10⁶ cells) of rhBMP-2 tested by ELISA. Biological activity of rhBMP-2 was tested by the induction of alkaline phosphatase (ALP) activity in C2C12 cells. We treated C2C12 with different concentration of rhBMP-2 condition medium (CM) for 5 d. The results showed that the rhBMP-2 could significantly increase the ALP activity of C2C12.

Key words human bone morphogenetic protein 2, CHO, co-transfect, C2C12, ALP

Received: May 18, 2006; Accepted: August 7, 2006.

This work was supported by a grant from the Tianjin Natural Science Foundation (No. 05YFJMJC01800).

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

天津市自然科学基金资助 (No. 05YFJMJC01800)

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins , BMPs)属于转化生长因子(Transformation growth factor ,TGF) β 超家族的成员。到目前为止 ,已经发现的 BMP 成员多达 40 余个 ,除 BMP-1 外的其他 BMPs 均具有诱导间充质细胞向成骨细胞和成软骨细胞分化的能力 ,可以诱导异位骨形成 ,修复骨质缺损 ,促进骨折愈合^[1]等。BMP-2 是 BMP 家族重要的一员 ,具有很强的诱导成骨的活性 ,能够单独在体内诱导骨形成 ,因此已被应用于骨折愈合、脊柱融合术^[2]、整形外科以及牙齿组织工程^[3]等众多临床应用中。本实验用全长序列的 hBMP-2 cDNA 构建了真核表达载体 pCDNA3.1(+)-hBMP-2 ,将其与质粒 pSV2-dhfr 共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞 ,经过 G418 选择性培养 ,MTX 压力扩增以及单细胞分离培养 ,获得了稳定、高效表达 rhBMP-2 成熟肽的单克隆细胞株。对细胞株的培养基蛋白进行的初步活性测定表明 ,培养基中所含的可溶性 rhBMP-2 具有很强的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 CHO-dhfr⁻ (CRL-9096 ;ATCC)购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所 ,以 IMDM 培养基培养(GIBCOBRL 公司) ,并在其中添加 10^{-4} mol/L 的次黄嘌呤和 1.6×10^{-5} mol/L 的胸苷(均购自 Sigma 公司)以及 10% 透析过的胎牛血清(购自天津市灏洋生物制品有限公司)。本实验涉及的细胞均是在含有 5% CO₂ 37℃ 的细胞培养箱中培养。

1.2 真核表达质粒的构建

以本实验室原有已构建的含有 hBMP-2 cDNA 全长序列(GenBank accession No. NM_001200)的质粒 pCDNA6A-hBMP-2 为模板 ,通过 PCR 反应扩增得到全长序列 hBMP-2 的 cDNA ,并将其连接至表达载体质粒 pCDNA3.1(+)中 ,构建了真核表达质粒 pCDNA3.1(+)-hBMP-2。为方便克隆 ,在上下游引物中分别引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点。

上游引物 :
5'-GCTGATCCACCAATGGTGGCCGGGACCCGCTGTC -3'
下游引物 :
5'-GCGTCTCGAGCTAGCGACACCCACAACCCCTCCAC -3'
连接反应的产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,采用菌落 PCR 的方法筛选阳性菌落 ,并进一步提取质粒 DNA 进行酶切鉴定 ,鉴定结果与预期吻合 ,测

序结果表明读码框完全正确。

1.3 转染及筛选阳性克隆

将构建好的质粒 pCDNA3.1(+)-hBMP-2 以及 pSV2-dhfr 按照摩尔比 5 : 1 混合 ,用脂质体 Lipofectamine2000(购自 Invitrogen 公司)共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞 ,同时用空载质粒 pCDNA3.1(+)和 pSV2-dhfr 共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞作为对照。细胞转染 24h 后更换新鲜的 IMDM 选择培养基(含 10% 的 FBS , 700 μ g/mL 的 G418)培养 ,每 3 天换 1 次液 ,直至细胞克隆形成。

1.4 氨甲蝶呤的加压培养

将步骤 1.3 中形成的所有克隆用细胞消化液 Trypsin-EDTA(购自 GIBCO 公司)消化下来 ,接种到细胞培养皿中混合培养 ,待细胞生长达到 90% 的密度后 ,1 : 6 接种到新的细胞培养皿中 ,并在选择培养基中加入氨甲蝶呤(MTX)(购自 Sigma 公司) ,使其终浓度达到 0.1 μ mol/L。约 2 个星期后可见抗性克隆出现 ,将所有克隆消化下来 ,混合培养 ,细胞生长状况正常后 ,再以同样的程序用 1 μ mol/L 的 MTX 扩增转化子 ,最终得到能够在 1 μ mol/L 的 MTX 中正常生长的重组 CHO 细胞的混合克隆株 ,我们命名为 rCHO(hBMP-2) ,对照组细胞我们命名为 rCHO(C)。

1.5 Western blot 鉴定 rhBMP-2

将 rCHO(hBMP-2)和 rCHO(C)分别接种到细胞培养皿中 ,待细胞达到 90% 的密度后 ,换用无血清培养基培养(不加 MTX)2d 后收集细胞培养液。按照参考文献 [4] 上的三氯乙酸沉淀法提取细胞培养液中的蛋白。提取的蛋白用 Tris-Tricine 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及 Western blot 进行分析鉴定。将样品分别用含有 DTT 和不含 DTT 的加样缓冲液混合 ,和 Rainbow Marker 一起在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳 ,然后电转移到硝酸纤维素膜上 ,用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭过夜。分别用一抗 anti-BMP-2(购自 R&D 公司)单克隆抗体和带有辣根过氧化物酶的二抗 anti-mouse IgG(购自 Promega 公司)孵育 2h ,然后与 ECL 试剂反应并曝光。

1.6 rhBMP-2 的表达量检测

参照《组织培养和分子细胞学技术》^[5]所述的方法对 rCHO(hBMP-2)细胞混合克隆进行单细胞分离培养 ,得到了 14 株单克隆细胞株。将这 14 株单克隆细胞株接种到 96 孔板 ,细胞生长达到 90% 的密度后更换新鲜培养基 ,24h 后收取培养液上清 ,用 hBMP-2 ELISA Kit(购自武汉博士德公司)检测培养液上清中 hBMP-2 的浓度 ,同时用 CCK-8 试剂盒(购

自日本同仁化学研究所)测定各孔细胞数 根据结果计算出各单克隆细胞株的 rhBMP-2 表达量。

1.7 rhBMP-2 的生物学活性检测

有文献报道^[6] ,鼠成肌细胞系 C2C12 在 BMP-2 的刺激培养下 ,由成肌分化转变成成骨分化 ,而碱性磷酸酶是成骨细胞的标志酶。我们用不同浓度的 rhBMP-2 条件培养基刺激培养 C2C12 ,通过测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ,ALP)的活性变化来分析 rhBMP-2 的生物学活性。

1.7.1 条件培养基的制备 :将 rCHO(hBMP-2)和 rCHO(C)分别接种于含有 10% FBS 和 1μmol/L MTX 的 IMDM 培养 ,待细胞生长达到 90% 的密度后 ,换用不含血清的 DMEM 培养(不加 MTX) ,24h 后收集细胞培养液 ,4000g ,4℃ 离心 5min ,取上清分装于 1.5mL 离心管 , - 70℃ 保存 ,使用时与正常培养基按比例混合使用。

1.7.2 碱性磷酸酶活性的测定 :将收集的 rCHO(hBMP-2)及 rCHO(C)细胞的培养液上清分别以 5%、10% 和 20% 的比例添加到 DMEM 中 ,并同时添加 FBS ,使 FBS 的终浓度达到 5% ,以此混合培养基培养 C2C12 细胞 ,并以只含 5% FBS 的 DMEM 培养 C2C12 细胞作为对照 ,每 2 天换 1 次液。刺激培养 5d 后 ,先用 CCK-8 试剂检测各孔在 450 nm 处的 OD 值 ,再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次 ,每孔加入 50μL 碱性磷酸酶反应底物溶液(4 片 Sigma # 104phosphatase substrate 溶解于 15mL 50mmol/L glycine , 1mmol/L MgCl₂ , pH10.5) ,室温孵育 20min。用 Microplate Reader 在 405 nm 波长测定 OD 值 ,结果除以使用 CCK-8 试剂测定的 OD 值以标准化 ALP 结果。每组样品取 6 个复孔的平均值作图。

2 结果

2.1 rhBMP-2 真核表达载体的构建和鉴定

以质粒 pCDNA6A-hBMP-2 为模板 ,进行 PCR 反应 ,扩增 hBMP-2 cDNA ,再将 PCR 产物插入质粒 pCDNA3.1(+)中 ,得到 hBMP-2 的真核表达载体 pCDNA3.1(+)-hBMP-2(图 1)。对提取的质粒进行限制性内切酶酶切 ,电泳 ,可切下得到约 1.2kb/ 5.4kb 大小的片段 ,与预期结果相符(图 2) ,测序结果证实插入片段的碱基序列和读码框完全正确。

2.2 Western blot 鉴定 rhBMP-2 在 CHO 细胞中的表达

将 rCHO(hBMP-2)和 rCHO(C)细胞分别接种于细胞培养皿中 ,细胞生长达到 90% 的密度后更换成

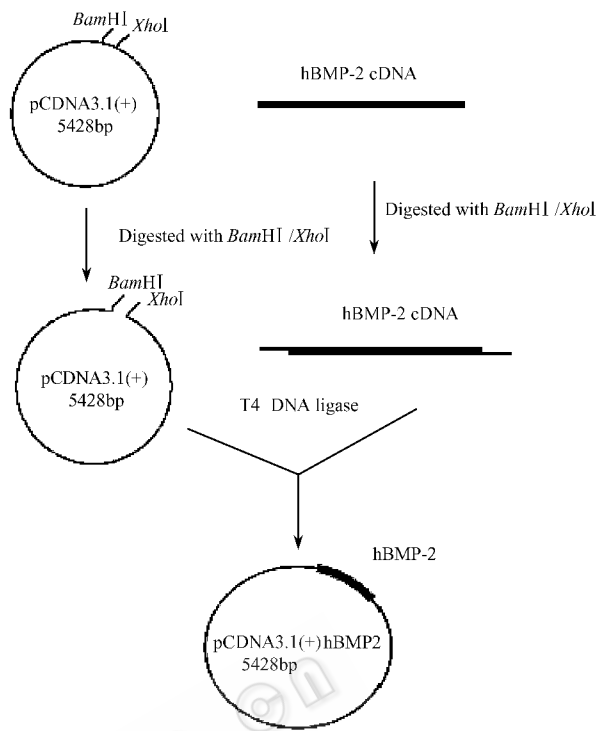


图 1 hBMP-2 表达载体 pCDNA3.1(+)-hBMP-2 的构建流程图

Fig.1 Flowchart of construction of recombinant hBMP-2 expression vector pCDNA3.1(+)-hBMP-2

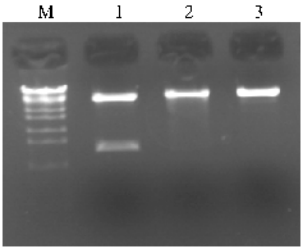


图 2 pCDNA3.1(+)-hBMP-2 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of pCDNA3.1(+)-hBMP-2 vectors pCDNA3.1(+)-hBMP-2 digested with BamH I /Xho I (lane1) and BamH I (lane2) , Xho I (lane3) and marker standard (M) .

Marker standard is λ-EcoT14 digest.

不含血清的 DMEM 继续培养 48h 后收集培养液 ,三氯乙酸沉淀法提取培养液蛋白。将提取的蛋白样品用含有 DTT 和不含 DTT 的加样缓冲液混合 ,Tris-Tricine 电泳及 Western blot 鉴定(图 3)。结果显示在还原和非还原的样品泳道中分别出现大小约为 18kD 和大小约为 30kD 的两条特异性蛋白条带 ,而 rCHO(C)培养液上清中提取的蛋白样品却没有相应的条带 ,表明 rCHO(hBMP-2)分泌表达 rhBMP-2 蛋白。根据 hBMP-2 的氨基酸组成计算可知 ,没有经过翻译后修饰的 hBMP-2 蛋白大小约为 13kD ,由此推测表达的 rhBMP-2 是经过糖基化等翻译后修饰

的,且以同源二聚体的形式分泌到培养基中的。

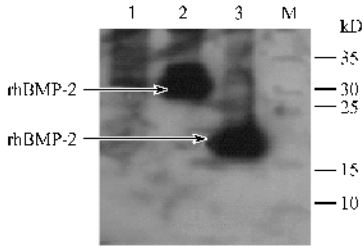


图3 Western blot 鉴定 rhBMP-2 的表达

Fig.3 Western blot analysis of rhBMP-2

1 :reduced protein sample extracted from rCHO(C) culture as control ; 2 : non-reduced protein sample extracted from rCHO(hBMP-2) culture ; 3 : reduced protein sample extracted from rCHO(hBMP-2) culture ; M : Rainbow marker. Approximately 40 μ g of medium protein was loaded in lane 1 , lane 2 and lane 3.

2.3 rhBMP-2 的表达量检测

我们通过单细胞分离培养的方法得到了 14 株 rCHO(hBMP-2)的单克隆细胞株 ,ELISA 法检测其表达量(表 1)。结果显示 ,我们获得了高效表达 rhBMP-2 的 rCHO(hBMP-2)单克隆细胞株 ,表达量最高可达 7.83 μ g/24 h/10⁶ cells。

表 1 各单克隆细胞株的 rhBMP-2 表达水平

Table 1 The expression level of rhBMP-2 in different cell clones

Cell strain	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]
Expression level of rhBMP-2 (μ g/24h/10 ⁶ cells)	6.11	4.91	6.16	5.60	4.07	4.34	6.17
Cell strain	8 [#]	9 [#]	10 [#]	11 [#]	12 [#]	13 [#]	14 [#]
Expression level of rhBMP-2 (μ g/24h/10 ⁶ cells)	7.27	5.57	6.00	5.68	7.83	3.60	4.71

2.4 rhBMP-2 的生物学活性检测

我们用分别含有 5%、10% 和 20% rCHO(hBMP-2)细胞 24h 培养液的条件培养基刺激培养 C2C12 ,并以只含 5% FBS 的 DMEM 培养 C2C12 细胞作为对照 ,同样用 rCHO(C)细胞的 24h 培养液制成条件培养基培养 C2C12。5d 后检测碱性磷酸酶活性(图 4)。结果显示 ,以 rCHO(hBMP-2)细胞培养液制成的条件培养基培养的 C2C12 细胞中碱性磷酸酶活性与对照组相比有显著升高 ,且表现出明显的剂量依赖型 ,而以 rCHO(C)细胞培养液制成的条件培养基培养的 C2C12 细胞中碱性磷酸酶活性却没有变化 ,这表明表达的 rhBMP-2 具有很强的生物学活性。

3 讨论

BMP-2 是 BMP 家族重要的一员 ,具有广泛的生物学功能 ,特别是其很强的诱导成骨活性已经在临

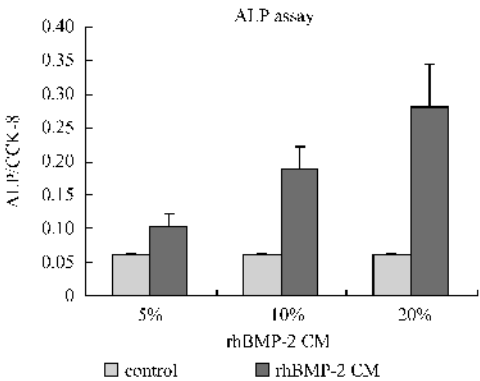


图4 rhBMP-2 影响 C2C12 细胞的碱性磷酸酶活性

Fig.4 Biological activity of rhBMP-2 tested by the induction of alkaline phosphatase(ALP) activity in C2C12 cells

We treated C2C12 with different concentration of rhBMP-2 condition medium(CM)(5% ,10% and 20%) for 5 d took the untreated C2C12 as control. The ALP assay results were normalized by CCK-8.The result shows that the rhBMP-2 can significantly increase the ALP activity of C2C12.

床前和临床实验中被证实。有临床研究表明 rhBMP-2 完全可以替代骨移植用于脊柱融合术中 ,在某些情况下 ,BMP-2 成功诱导融合的效率还要优于自体骨移植 ,而且在许多融合手术的应用中 ,BMP-2 都被证明是有效的^[7]。BMP-2 已经成为一个很有治疗应用前景的生物小分子。

hBMP-2 基因位于 20p12 ,cDNA 全长 1547bp ,开放读码框(ORF)为 1191bp ,共编码 396 个氨基酸 ,在 hBMP-2 前肽中有 4 个保守的双碱性氨基酸残基的酶切位点 ,REKR ,可以在蛋白酶的作用下产生一个只有 114 个氨基酸的成熟肽。该成熟肽分子量约为 13kD ,pI 为 7.9 ,含有 7 个绝对保守的半胱氨酸残基和 1 个潜在的糖基化位点。在细胞中合成的 BMP-2 前体蛋白经过蛋白酶水解后 ,以有活性的同源二聚体形式分泌到胞外。

本实验尝试用 CHO 作为宿主细胞来表达 rhBMP-2。CHO(dhfr⁻)是缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 ,是表达外源真核基因的最佳宿主 ,外源蛋白容易在 CHO 细胞中合成并分泌到培养基中 ,表达蛋白的折叠及二硫键的形成几乎与天然蛋白质相同 ,已有多种蛋白在 CHO 细胞中获得成功表达^[8-10]。我们把全长序列的 hBMP-2 cDNA 克隆到真核表达载体 pCDNA3.1(+)中 ,并转染到 CHO 细胞中 ,使其能进行足够的翻译后修饰 ,这样我们得到的重组蛋白就会有高的生物学活性。以 MTX 扩增系统为手段 ,大量地增加整合到宿主细胞染色体上的 hBMP-2 基

因的拷贝数,借以大幅度的提高 rhBMP-2 蛋白的表达量。实验结果显示我们通过基因工程技术,建立了稳定分泌表达 rhBMP-2 同源二聚体的单克隆细胞株,且经多次冻存和复苏仍然具有稳定分泌外源蛋白的能力。活性检测表明 rhBMP-2 蛋白具有很强的生物学活性,为进一步开发成为可用于临床治疗的生物技术药物提供了技术支持与可能。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hots G, Herr G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials-current and future clinical applications. *Int J OralMaxillofac Surg*, 1994, **23**: 413 - 420
- [2] Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 247 - 252
- [3] Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(9): 1025 - 1032
- [4] Marshak DR, Kadonaga JK, Burgess RR *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996
- [5] E 袁 鄂征). Technology of Tissue Culture and Molecular Cytology. 2nd ed, Beijing: Beijing Press, 1997
- [6] Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 1994, **127**: 1755 - 1766
- [7] Sandhu HS. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine*, 2003, **28**: S64 - S73
- [8] Zou Z, Sun PD. Overexpression of human transforming growth factor-beta1 using a recombinant CHO cell expression system. *Protein Expr Purif*, 2004, **37**(2): 265 - 272
- [9] Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK *et al.* Stable expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoforms by CHO cells. *Clin Chim Acta*, 2002, **326**(1-2): 113 - 122
- [10] Hwang Su-Jeong, Choi Han-Ho, Kim Kyung-Tae *et al.* Expression and purification of recombinant human angiopoietin-2 produced in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*, 2005, **39**(2): 175 - 183

番茄红素的功能与开发

含番茄红素的果蔬颇多,如番茄(西红柿)、西瓜、石榴等等,这类“素”的功能作用已引起国内外研究者与企业家的关注。因为(1)它是一种强抗氧化剂,特别是源于生物的番茄红素具有抑制突变、降低核酸损伤、减少心血管病和防癌抗癌之功效;(2)索取该“素”的原料颇为广泛,如番茄等果蔬,除传统育种技术能生产番茄外,太空育种技术、转基因技术以及微生物技术育种也得到实际应用,因而在提高产量和产品质量,扩大该“素”的生产规模方面还有着巨大的潜力;(3)番茄红素作为一种医疗保健品应用面广泛,使这个行业充满着巨大的商机。

关于番茄红素的研究成果,主要有以下几方面:

(1)保加利亚有几家研究所联合培育出有自家特色的番茄新品种,番茄红素和 β -胡萝卜素含量极高,且比普通番茄更甜,因而可广泛用于儿童保健产品的开发;(2)俄罗斯西伯利亚一家研究所通过转基因技术研发一种抗艾滋病和“乙肝”的“工程西红柿”,将其制成粉末状食物,通过试验鼠饲喂验证,发现鼠血液中有高含量抗体,试验鼠器官黏膜表面也有抗体。若能将其制成“食用疫苗”或片剂且对人体有效的话,那将会因其不用冷藏、不用注射、感染风险低、易于规模生产等诸多优越性,而更有希望被用于人类。(3)中科院遗传与发育研究所研究人员通过太空育种途径培育出番茄红素含量高、遗传性状稳定的高产番茄新品种,其“素”含量高于普通番茄3倍,性状稳定于4代。(4)可通过微生物发酵法生产番茄红素。如一种布拉霉(*Blakeslea crispera*)发酵生产番茄红素,在发酵液中添加1%烟草废弃物,发酵110h,收获番茄红素约62~80mg/100mL;一种引入欧氏杆菌的番茄红素合成基因于蛋白假丝酵母内构建的“工程假丝酵母”发酵生产番茄红素758 μ g/g(菌体干重)、八氢番茄红素407 μ g/g(干重);另一种浅红链霉菌突变株发酵6天产番茄红素0.5g(干重)/L。如果微生物发酵生产番茄红素的产品质量与天然产品能相比拟的话,那发酵途径可一年四季实行生产,为产品产业化开辟了新途径。(5)基于番茄红素防病、治病的多种功能作用,我国一家药业公司将番茄红素研制成软胶囊产品,已商品化投入市场,这种“胶囊”服用后易被人体吸收,可充分发挥其抗氧化作用,其清除体内自由基的功效优于胡萝卜素和维生素E高达100倍,该“素”还可有效防治因衰老、免疫力下降而引发的各种疾病。

总之,多途径培育高含量番茄红素的果蔬,从中索取“素”产品,并将其商品化、产业化将成为一个新的热点,相信不久的将来,现代生物技术将更多地应用于番茄红素的开发。

(柯 为)