

研究报告

人生长激素基因在哺乳动物培养细胞中的导入与表达

沈孝宙 杨卫民 彭红

(中国科学院动物研究所生殖生物学开放研究室, 北京)

李建民 姜凡一

(南开大学生物系, 天津)

将小鼠金属硫蛋白 I (MT-I) 启动子置换人生长激素 (hGH) 基因的启动子, 构建 MT-hGH 嵌合基因。当与疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因 (tk) 的质粒共转染小鼠 L-tk⁻ 细胞, 在 tk⁺ 转化细胞中所整合的 MT-hGH 基因可被重金属镉诱导。获得可表达和分泌 hGH 的细胞株, 其中一株 hGH 的产率为 2.5 μg/10⁶ 细胞/24h。所产生的 hGH 分子量为 22000 道尔顿, 表明小鼠 L-tk⁺ 细胞株能对外源 hGH 基因所产生的 mRNA 进行正确的加工并能删除激素原的信号肽。

关键词 人生长激素; 金属硫蛋白启动子; 基因表达

人生长激素 (hGH) 是脑下垂体前叶合成和分泌的一种蛋白质激素, 含 191 个氨基酸, 分子量 22000 道尔顿。hGH 对人体的生长有着密切的关系。在临床上 hGH 可用于治疗垂体性侏儒症, 促进创伤组织 (如烧伤、骨折) 的恢复, 也可用于改善老年性胃萎缩的症状和治疗出血性溃疡。

长期以来, hGH 是从人垂体中分离制取的, 因来源困难, 价格十分昂贵, 在应用上受到限制。所以在国际上, hGH 是遗传工程的主要产品之一。但目前用遗传工程生产的 hGH 是通过细菌发酵系统以融合蛋白表达的, 在肽链的 N 末端多为甲硫氨酸, 与天然 hGH 分子的 N 末端不同。近几年已有一些实验室尝试用哺乳动物细胞系统表达人或牛的 GH^[1,2], 其目的在于一方面希望能获得 N 末端无甲硫氨酸的天然 GH 分子, 另一方面也是为了发展一个更安全的表达系统。人们预测, 到本世纪 90 年代, 临床治疗用的遗传工程产品将从细菌发酵生产过渡到用动物细胞进行生产^[3]。目前, 法国巴斯德研究所利用哺乳动物细胞

表达 hGH 已获欧洲专利^[4]。

本研究的目的是通过改变 hGH 基因原有的启动区, 以适于在非垂体细胞中表达。通过导入小鼠 L 细胞, 分析重组质粒的整合状态和表达水平, 以期获得大量表达 hGH 的细胞株。

材料与方法

(一) 材料

1. 主要试剂: 限制性内切酶、DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolab's 公司; DMEM 培养液和胎牛血清为美国 Gibco 产品; hGH 放射免疫药盒由北京市神经外科研究所提供; α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) 购自英国 Amersham 公司。

本文于 1987 年 9 月 4 日收到。

本研究蒙中国科学院动物研究所张致一教授支持。实验室部分设备承美国洛克菲勒基金会 (Rockefeller Foundation) 资助。质粒 pGH₄, pXMT 和 pAGO 分别由美国 Alabama 大学 V. Kidd 博士、瑞士分子生物学研究所 F. Weber 博士及法国巴斯德研究所 M. -L. Michel 博士提供。贾雅丽协助技术工作。特此一并致谢。

2. 细胞株: 小鼠 L-tk⁻ 细胞和人 HeLa 细胞用 F-10 培养液培养(含 10% 胎牛血清), 但在用磷酸钙共沉淀进行外源基因转化时, 用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)。

(二) 方法

1. 重组质粒的构建: pGH4 质粒 DNA 经 Eco RI 和 Bam HI 酶水解, 再用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离出 2.1 kb 的片段, 其中含 hGH 基因完整的编码区(5 个外显子和 4 个内含子)及 3' 端侧翼区。Bam HI 酶正好可去掉 hGH 基因的启动区(图

1)。

pXMT 质粒 DNA 经 Eco RI 和 Bgl II 酶水解, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离 0.7 kb 的片段。其中含小鼠金属硫蛋白(MT)基因的启动区(图 1)。

将上述无启动区的 hGH 基因和小鼠 MT 启动子与事先用 Eco RI 酶切开的 pSV2_{neo} 载体连接, 再转化大肠杆菌 HB101。获得的嵌合质粒, 其中 hGH 基因的启动区被小鼠 MT 启动子所取代。它在 pSV2_{neo} 载体中具有两种不同的插入方向(图 2); 其转录方向与载体 SV40 早期区的转录方

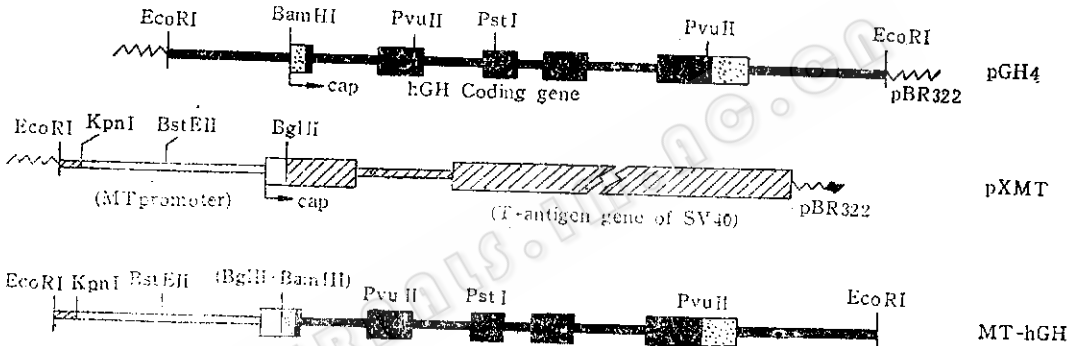


图 1 MT-hGH 嵌合基因的结构

Fig. 1 The structure of the MT-hGH chimeric gene

含小鼠 MT-1 基因启动子的 EcoRI-Bgl II 片段与 hGH 基因的 BamHI-Eco RI 片段(无 5' 启动区)融合。

The Eco RI-Bgl II fragment containing the promoter of mouse MT gene was fused with Bam HI-Eco RI fragment of hGH gene deleted 5' promoter.

▬ hGH 基因的转译区 (Translational regions of hGH gene)

▨ hGH 基因的非转译区 (Non-translational regions of hGH gene)

▩ SV₄₀ 的 T 抗原基因 (T-antigen gene of SV₄₀)

□ MT 基因的非转译区 (Non-translational regions of MT gene)

向相同 (pSMGH2) 或相反 (pSMGH1)。

2. pSMGH 质粒在 HeLa 细胞中的暂时性 (transient) 表达: L 细胞和 HeLa 细胞分别在 28cm² 培养瓶中进行单层培养至 50—80% 汇合 (confluence), 再用磷酸钙沉淀法⁽⁵⁾将 7μg/320μl pSMGH1 或 pSMGH2 DNA 感染细胞。在 37℃ 保温 20—40min, 然后加入含 3% 小牛血清的 DMEM 培养液培养 12h。吸去培养液, 用 25% 二甲亚砜 (DMSO) 在室温处理细胞 2

min, 吸去 DMSO 溶液, 洗涤细胞, 继续在 F-10 培养液中培养 36h。最后用放射免疫分析测定在培养液中 hGH 的分泌量。

3. pSMGH 和 pAGO 在 L-tk⁻ 细胞中的共转染: pSMGH1 或 pSMGH2 DNA 3.5μg, 分别与载体小牛胸腺 DNA 3.5μg, pAGO DNA 0.3μg 混合, 以磷酸钙沉淀法感染 L-tk⁻ 细胞, 方法同上。所不同的是在 DMSO 处理后, 细胞在 F-10 培养液中培养 24h, 然后按 1:4 扩大培养。经

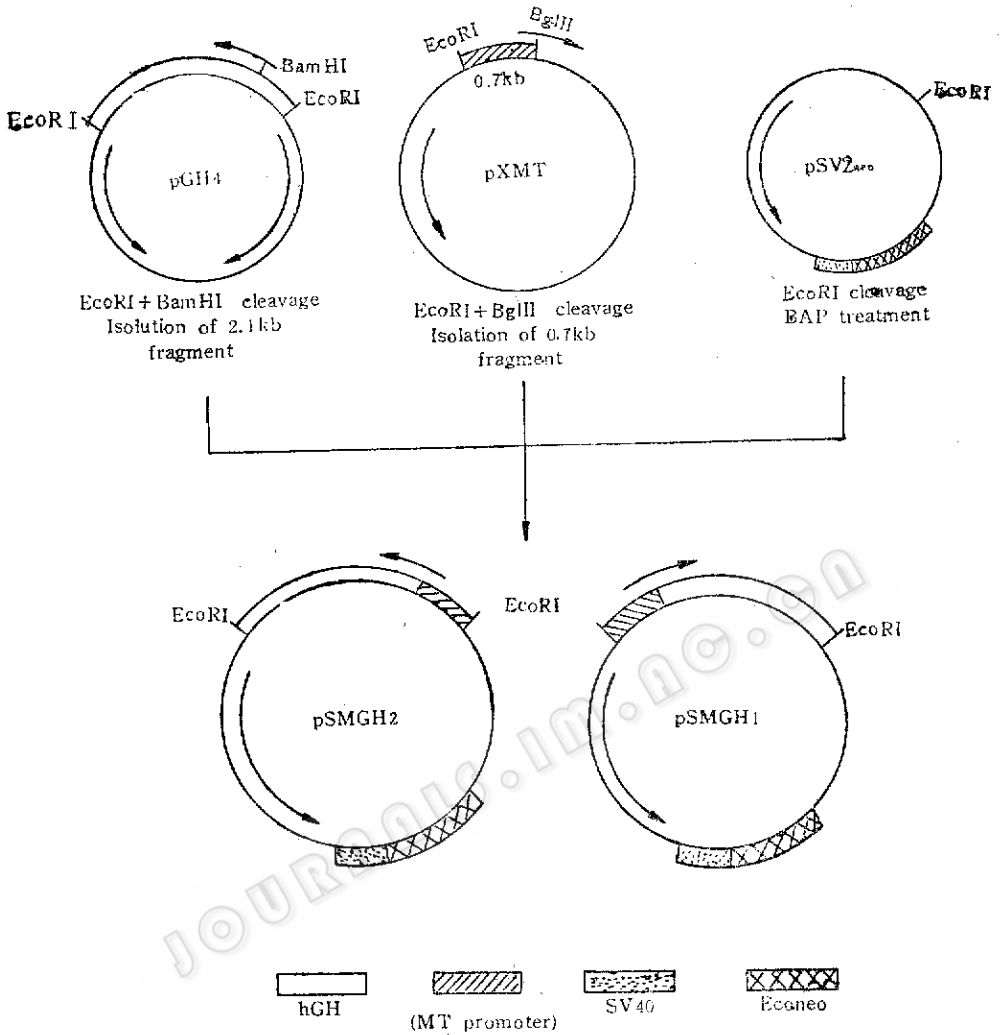


图 2 含MT-hGH嵌合基因的表达质粒pSMGH的构建
 Fig. 2 Construction of the plasmid pSMGH containing MT-hGH chimeric gene which could be expressed in mammalian cells

24h后更换HAT选择培养液 (F-10培养液含次黄嘌呤15μg/ml, 氨基嘌呤1μg/ml, 胸腺嘧啶核苷 5μg/ml)。以后每3天更换一次选择培养液, 直至出现转化的细胞集落。最后用细胞集落分离筒分别取出转化的单株细胞, 扩大培养后进行分析。

4. Southern印迹分析: hGH 基因探针的标记用缺口转译法^[6]。细胞 DNA 抽提后用Eco RI酶处理, 电泳分离。印迹转移及杂交按Comb所述^[7], 以pGH4(经

Hind III酶切成线状, 长6.9kb) 作基因拷贝数的标准。

5. hGH的定量测定: 用双抗体放射免疫分析法。测定前培养液进行稀释。

6. hGH的Western印迹分析: 含hGH的培养液用 15% 聚丙烯酰胺凝胶-SDS电泳分离, 然后按Harry等人的方法^[8]将凝胶上的蛋白质用电转移法转至硝酸纤维素滤膜上, 再依次与抗 hGH血清和¹²⁵I-hGH反应, 最后进行放射自显影。

结 果

(一) pSMGH1和 pSMGH2 在培养细胞中的暂时性表达

实验目的在于通过一种快速的基因表达系统,分析重组的MT启动子的功能,同时还可研究外源hGH基因插入pSV2_{neo}质粒载体中的方向的不同对表达的影响。实验用pSMGH1和pSMGH2分别转染 HeLa细胞或L细胞。发现两种类型的细胞都可以表达hGH,并且能将hGH分泌到细胞外。在HeLa细胞,外源hGH基因的暂时性表达(在诱导状态下约为100ng/ml)明显高于L细胞(在诱导状态下约为6—10ng/ml)(图3)。在重组质粒中,若插入基因的转录方向与SV40早期区转录方向相反时(pSMGH1),则其转录效率高于转录方向相同的重组质粒(pSMGH2)(图3)。

(二) hGH基因在 L-tk⁻细胞中的整合与表达

为了建立可以持久表达hGH的细胞株,我们将pSMGH1和pSMGH2分别与含tk基因的pAGO质粒共转化小鼠L-tk⁻细胞,通过HAT选择培养基选出tk⁺转化细胞100余株。分析了其中47株转化细胞hGH的分泌,发现除1株测不出有hGH的分泌外,其余都在不同程度上能表达hGH(20—900ng/ml),有9株转化细胞hGH的分泌量超过200ng/ml(表1)。从表1可以看到pSMGH1和pSMGH2两种质粒整合到受体细胞染色体后,它们在各细胞株中所表达的hGH的量差异甚大,以致很难评价这两种质粒在表达能力上的区别。

利用Southern印迹分析,对4株表达hGH较高的转化株进行嵌合基因整合状态和基因拷贝数的分析测定。由于用于转化的MT-hGH嵌合基因长度为3kb,两端为

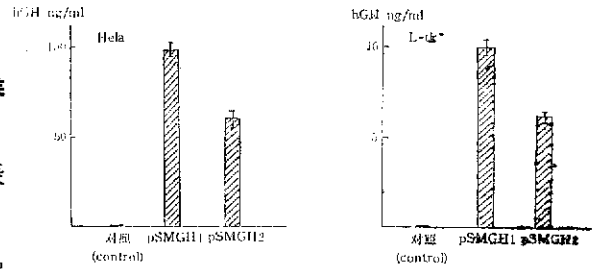


图3 pSMGH质粒在HeLa细胞和L-tk⁻细胞中的暂时性表达

Fig. 3 Transient expression of plasmids pSMGH1 and pSMGH2 in HeLa and L-tk⁻ cells

细胞(1×10^6)用3.5 μ g的pSMGH1或pSMGH2 DNA分别转染,在含2 μ mol/L CdCl₂的培养液中培养36h后,用放射免疫分析测定培养液中hGH的含量

Cells(1×10^6) were transfected respectively with 3.5 μ g pSMGH1 or pSMGH2 and cultured for 36 h in the media containing 2 μ mol/L CdCl₂.

Eco RI位点,因此几种表达hGH的L-tk⁺转化细胞的染色体DNA也用Eco RI酶处理,再进行电泳分离。在Southern印迹图谱上可以观察到DNA经酶处理后主要的杂交带仍处在3kb附近(图版I-1)。说明大部分MT-hGH基因是以头尾成串相连而整合到宿主染色体上,且未发生明显的重排。但整合的基因拷贝数在不同细胞株中,则有明显不同,少则在1—3拷贝之间(如L₂₋₅和L₂₋₈),多则达100拷贝以上(如L₁₋₄)。外源基因整合的拷贝数与其表达水平之间并无相关性。

(三) 重金属镉对整合状态的MT启动子的诱导作用

实验研究了4株表达hGH的转化细胞对镉诱导的反应。当培养液中含有1 μ mol/L的CdCl₂时,多数转化细胞株hGH的分泌量可提高1倍左右(图4)。说明当外源MT启动子整合到宿主染色体中,MT启动子不但能保留对其下游基因转录的调节功能,而且也保留着对重金属的反应性。

表1 pSMGH不同转化株hGH的分泌水平

Table 1 Excretion of hGH by different pSMGH transformants

pSMGH ₁ 转化株 (transformants)		pSMGH ₂ 转化株 (transformants)	
No.	ng hGH/ml	No.	ng hGH/ml
L ₁₋₁	670	L ₂₋₁	900
L ₁₋₂	650	L ₂₋₂	620
L ₁₋₃	440	L ₂₋₃	590
L ₁₋₄	200	L ₂₋₄	230
		L ₂₋₅	210

每个转化细胞株用 1×10^6 细胞, 经 $2 \mu\text{mol/L}$ 氯化镉诱导20h。

Cells (1×10^6) from each transformant strain were induced by $2 \mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for 20 h

(四) hGH在转化细胞中的分泌

对L-tk⁺转化细胞hGH的分泌曲线进行了测定。从图5可以看到hGH在转化细胞内可以持续地分泌到胞外培养液中。但在培养48h后, 如不更换培养液, hGH的分泌会受到明显的抑制。此时若更换新培养液, 则转化细胞仍可继续分泌hGH。从图5还可看到, 具有 10^6 数量的L-tk⁺转化细胞(L₂₋₂)在4天的培养过程中, 在镉的诱导下可累计分泌 $10 \mu\text{g}$ 左右的hGH。

(五) 表达产物的鉴定

为了对L-tk⁺转化细胞所分泌的hGH进行分子量测定, 实验将含有hGH的培养液经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后作Western印迹分析, 结果证明小鼠L-tk⁺转化细胞所分泌的hGH在分子量上与天然hGH相同, 均为22000道尔顿(图版I-2)。

讨 论

近些年将外源hGH基因导入培养细胞表达hGH已有一些报道。最初Pavlaki₅等人^[6]于1981年用完整的SV40病毒载体

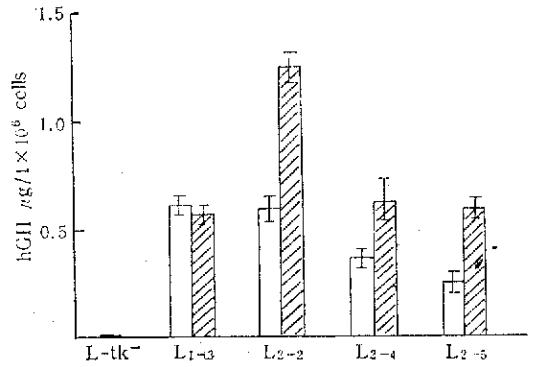


图4 镉对pSMGH转化株分泌hGH的诱导作用
Fig.4 Induction of excretion of hGH by cadmium in pSMGH transformants

细胞(1×10^6)经 $1 \mu\text{mol/L}$ 氯化镉诱导20h, 后用放射免疫测定培养液中的hGH含量

Cells (1×10^6) were induced for 20 h with $1 \mu\text{mol/L}$ CdCl₂ and determined for hGH in media by radioimmunoassay

■ add Cd²⁺ □ no Cd²⁺

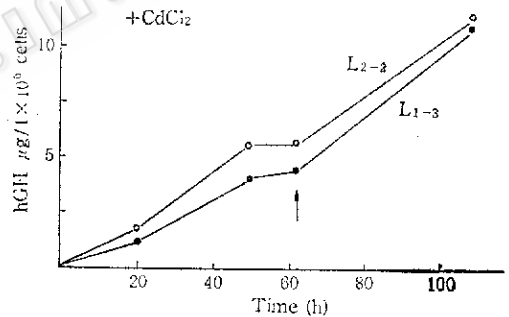


图5 转化株L₂₋₂和L₁₋₃在培养液中hGH积累的时间曲线

Fig.5 Time course of hGH accumulation in the media by the transformants L₂₋₂ and L₁₋₃

Arrow indicated that cultivation liquid was exchanged

在猴肾细胞中表达hGH证明哺乳动物非垂体细胞可以正确表达hGH, 也能去除信号肽, 且hGH也可分泌到胞外。但完整的SV40病毒最终会裂解其受纳细胞(permissive cell), 因而无法建立细胞株。随后, Robins等人^[10]用小鼠L-tk⁻细胞作受体, 导入hGH基因组DNA, 建立了能表达hGH的细胞株, 但表达效率很低。

这是由于作者使用的是 hGH 原有的启动子,而这类启动子在正常生理条件下只在脑下垂体嗜酸性细胞中表达。Lupker 等人^[1]则将 hGH 的 cDNA 置于 SV40 早期启动子的控制之下,在该病毒的受纳细胞——猴肾细胞中获得了较高的表达(约 $1\mu\text{g}/10^6$ 细胞/24h)。

我们将小鼠 MT 启动子取代 hGH 基因的启动子,再导入小鼠 L-tk⁻ 细胞。由于 MT 基因是所谓的“当家”(housekeeping) 基因,在任何组织中都能表达。实验结果证明在 MT 启动子控制下的 hGH 基因在小鼠 L 细胞中可以有较高的表达能力($2.5\mu\text{g hGH}/10^6$ 细胞/24h)。整合在小鼠 L 细胞染色体上的外源 MT 启动子仍可被重金属诱导。这就提供了一个可诱导的表达系统,用于在任何哺乳动物培养细胞中表达外源基因。

我们和上述几个实验室一样,均发

现在各转化细胞之间, hGH 的表达水平相差很大。Lupker 等人曾推测有两种原因:一是由于基因的拷贝数不同;另一是由于外源基因插入的位点不同而影响表达水平^[1]。我们测定了外源 hGH 基因在某些细胞中整合的拷贝数,看到 hGH 表达的强弱与 hGH 基因整合的拷贝数并无直接的关系。显然,外源基因在染色体上整合的位置是其表达强弱的关键。

本实验用 hGH 结构基因转化小鼠 L 细胞,所得到的 hGH 产物,其分子量为 22000 道尔顿。最近我们又通过亲和层析纯化 L 细胞所表达的 hGH 蛋白,经 dansyl 荧光分析,证明 N 末端氨基酸与天然 hGH 的 N 末端氨基酸相同,均为苯丙氨酸(作者待发表资料)。这就充分说明,在 L 细胞中,外源基因在表达时可以正确地进行外显子-内含子剪接及信号肽的自动删除。

参 考 文 献

- [1] Lupker, J.H. et al.: *Gene*, 24:281, 1983.
- [2] Ramabhadran, T.V. et al.: *Gene*, 38:111., 1985.
- [3] Swartz, R.: *Genetic Engineering News*, 5:16, 1985.
- [4] *Mcgraw-Hill's Biotechnology Newswatch*, Feb. 18, 1985, p.7.
- [5] Graham, F.L. and Van der Eb, A.J.: *Virology*, 54:536, 1973.
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p.109.
- [7] Comb, M. et al.: *DNA*, 2:213, 1983.
- [8] Harry, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350, 1979.
- [9] Pavlakis, G.N. et al.: *Ibid.*, 77:7398, 1981.
- [10] Robins, D.M. et al.: *Cell*, 29:623, 1982.

INTRODUCTION AND EXPRESSION OF HUMAN GROWTH HORMONE GENE IN MAMMALIAN CELLS

Shen Xiaozhou Yang Weimin Peng Hong

(Laboratories of Reproductive Biology Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)

Li Jianmin Jiang Fanyi

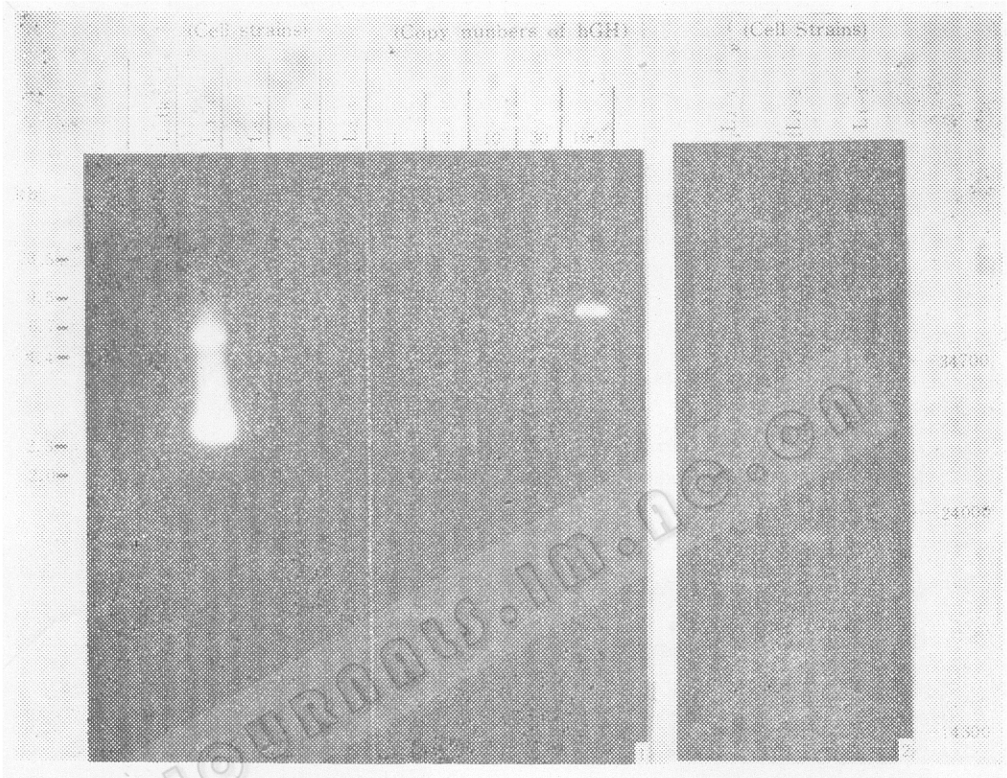
(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

A chimeric gene(MT-hGH)was constructed in which the promoter of human growth hormone(hGH) gene was replaced with mouse metallothionein-I (MT)promoter. Mouse L-tk⁻ cells were co-transfected with MT-hGH gene and pAGO plasmid containing HSV tk gene. The MT-hGH chimeric gene integrated on the chromosomes of transformed cells could be induced by heavy metal (Cd⁺⁺). Most of L-tk⁺ cell strains produce and excrete hGH into the medium. One such cell strain (L₂₋₄) excrete hGH up to 2.5 μg per 1×10⁶ cells per 24 hrs. The molecular weight of the excreted hGH is 22000 daltons. It indicates that the mRNA of hGH in mouse L-tk⁺ cells can be processed accurately and the signal peptide fragment of prohormone can also be removed.

Key words

Human growth hormone; mouse metallothionein promoter; gene expression; L cells

Shen Xiaozhou et al.: Introduction and expression of human growth hormone gene in mammalian cells Plate I



1. pSMGH转化的小鼠细胞DNA的Southern印迹分析探针用含 hGH 基因组序列的质粒 pGH₄ (6.9kb) Southern blot analysis of pSMGH transformed mouse cellular DNA digested with Eco RI The probe used was plasmid pGH₄ (6.9kb) which contains hGH genomic sequence

2. pSMGH转化株胞外分泌蛋白的Western印迹分析的放射自显影图谱
Autoradiogram of Western blot of the proteins in the media from pSMGH transformants