

人白细胞介素 12 在昆虫细胞中的表达

沈 惠 李昌麟 林明群 张宗梁 申庆祥*

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

摘 要 人白细胞介素 12(hIL-12)是一种异源二聚体细胞因子,由 p40 和 p35 两个亚基通过二硫键连接而成。首先构建了两个表达载体 pVL1392-hp40 和 pVL1393-hp35,并分别与线性化多角体病毒基因组 DNA 共转染昆虫细胞株 Sf9,用目视法筛选出重组病毒 AcNPV-hp40 和 AcNPV-hp35。利用 PHA 激活的人淋巴细胞增殖试验,在条件培养液中检测到重组 hIL-12 的生物活性,表达量约为 $1.5 \sim 2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞。经实时 BIA 和 Northern blot 分析,hp35 和 hp40 两亚基在昆虫细胞中获得表达。非还原条件下的 Western blot 结果显示,重组 hIL-12 的表观分子量为 76kDa,hp40 同源二聚体的表观分子量为 92kDa。重组 hp40 具有明显抑制 hIL-12 生物活性的作用。

关键词 人白细胞介素 12 实时 BIA 杆状病毒表达系统 共表达 昆虫细胞

学科分类号 Q 789

天然杀伤细胞刺激因子(NKSF)又称白介素-12(IL-12),是由活化的巨噬细胞在应答胞内微生物病原过程中产生的一种新型的细胞因子。它是由一条重链 p40 和一条轻链 p35 通过共价键结合而成的异源二聚体^[1,2]。IL-12 诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ 和其它细胞因子,且 IL-12 可以提高活化的 NK 细胞和 T 细胞的增殖活性以及 NK 细胞的细胞毒性。抗原存在时,IL-12 和 IL-2 诱导产生的 IFN- γ 可以促使原始 T 细胞向 Th1 细胞发育,并促使已分化的 Th1 细胞增殖和分泌 IFN- γ ^[3-5]。因此,IL-12 是一座沟通先天性抵抗力和后天获得性免疫力的桥梁。

IL-12 具有广泛的生物功能,可调节 Th1/Th2 应答反应,提高 Th1 免疫应答,影响淋巴细胞增殖和细胞毒活性,对各种病原菌引起的感染性疾病有显著的治疗效果^[6-8],在抗肿瘤生成和转移中起重要作用^[9,10]。IL-12 还与一些免疫病状的发生有关,包括内毒素引发的休克和一些与 Th1 细胞异常有关的自身免疫性疾病。所以,IL-12 的拮抗剂也许在治疗免疫紊乱的疾病中存在潜力^[11]。

完整的 hIL-12 分子是由两个不同的亚基组成的,只有在同一表达系统中同时表达这两个亚基,并使它们进行正确地装配,才有可能获得具有生物活性的 IL-12。所以,我们利用杆状病毒表达载体系统(BEVS),在昆虫细胞中表达重组 hIL-12。

1 材料与方法

1.1 材料

* 联系人。现地址:上海市计划生育科学研究所,上海 200032。

表达型载体 pVL1392 和 pVL1393 (Autographa californica 核多角体病毒(AcNPV),由 Texas A & M 大学 M. D. Summers 教授提供。昆虫细胞株 Spodoptera frugiperda(Sf9) 购自 American Type Culture Collection(ATCC),BaculoGold™ 线性化多角体病毒基因组 DNA 购自 PharMingen 公司。含 hp35 和 hp40 cDNA 的质粒 pBS-hp35 和 pBS-hp40 由 Hoffmann-La Roche 公司协议提供,其中 pBS 为质粒 pBluescript(SK)的简称。DNA 限制酶和修饰酶为 Promega 公司产品。无血清昆虫细胞培养基 Sf-900II SFM 为 Gibco BRL 公司产品。ECL 显色试剂盒和 α - 32 P]dATP 为 Amersham 公司产品;hIL-12 及大鼠抗 hIL-12 单抗(2A4-1)均由 Hoffmann-La Roche 馈赠。

1.2 方法

1.2.1 表达型质粒的构建和重组病毒的筛选:用 Xba I 和 Sma I 双酶切质粒 pBS-hp40 获得 hp40 cDNA 片段,并经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,克隆入表达型质粒 pVL1392 的 Xba I 和 Sma I 位点,构建表达型质粒 pVL1392-hp40。用 Pst I 酶切质粒 pBS-hp35,按上述方法将此片段克隆入 pVL1393 的 Pst I 位点,构建表达型质粒 pVL1393-hp35。两个表达型质粒分别与 BaculoGold™ 线性化病毒基因组 DNA 共转染昆虫细胞^[12]。用目视法筛选获得分别含 hp40 和 hp35 cDNA 的重组病毒 AcNPV-hp40 和 AcNPV-hp35。

1.2.2 重组 hIL-12 的生物活性和表达量的测定:按文献^[13]方法进行。

1.2.3 实时(Real-time)生物分子相互作用分析(BIA)检测重组 hIL-12 及其亚基在昆虫细胞中的表达:按文献^[14]方法偶联单抗,将重组病毒 AcNPV-hp35 和 AcNPV-hp40(1:1)共感染过的 Sf9 细胞的条件培养液,经超离心(100 000×g)后的上清液,以昆虫细胞条件培养液作为阴性对照,并以野生型病毒感染过的昆虫细胞的上清液作模拟物(mock),各取 40 μ l,用 Biosensor 检测,阳性对照为 100ng hIL-12 标准品。另外,重组病毒 AcNPV-hp35 和 AcNPV-hp40 分别感染昆虫细胞的条件培养液,经超离心的上清液,取 40 μ l 样品用于检测。阳性对照为表达重组 hIL-12 的上清液。

1.2.4 表达产物的免疫印迹分析:样品在还原和非还原条件下,经 SDS-PAGE 后,转移至硝酸纤维素膜上,依次加入第一抗体和第二抗体进行反应,用 ECL 显色系统进行显色^[15]。

1.2.5 hp35 和 hp40 mRNA 的检测(Northern blot):总 RNA 的提取参见 Gibco BRL 公司随抽提试剂 TRIZOL® 所提供的方法,探针标记的方法参考 Boehringer Mannheim 公司随 Random Primer Labelling Kit 所附方法,Northern blot 的步骤与方法详见文献^[16]。

1.2.6 重组 hp40 对 hIL-12 生物活性的影响:AcNPV-hp40 感染昆虫细胞的条件培养液经稀释后,与 0.2ng/ml hIL-12 标准品混匀,以此作为待测样品,利用 PHA 激活的人淋巴细胞增殖试验测定重组 hp40 对 hIL-12 生物活性的影响,对照组为相应稀释度的含 0.2ng/ml hIL-12 的野生型病毒感染上清液。

2 实验结果

2.1 表达型质粒的构建

用 Xba I 和 Sma I 双酶切所构建的质粒 pVL1392-hp40,可获得 1028bp 片段,证明 hp40 cDNA 已克隆入质粒 pVL1392 中。用 EcoRI 酶切后出现 750bp 和 259bp 两个片段。

说明 hp40 cDNA 已正向克隆入质粒 pVL1392 中。hp35 cDNA 全长 1100bp,其中含有 201bp 的 5'端非翻译区,在第 100-102bp 处有 ATG 密码子(称为第一个 ATG),在第 202-204 的 ATG 为 IL-12 的起始密码,第 184~189bp 处为 Pst I 位点。在构建 pVL1393-hp35 时将 hp35 的 Pst I 片段(922bp)克隆入 pVL1393 的 Pst I,这样去除了 5'端非翻译区的可能作为起始密码的 ATG。用 Pst I 酶解 pVL1393-hp35,可获得 922bp 的片段。用 EcoRI 酶解后出现 630bp 和 255bp 片段,用 BamHI 酶解后出现 460bp 片段,说明去掉第一个 ATG 的 hp35 cDNA 已正向克隆入质粒 pVL1393 中。

2.2 重组 hIL-12 在昆虫细胞中的表达

将重组病毒 AcNPV-hp35 和 AcNPV-hp40 同时感染 Sf9 细胞,条件培养液具有明显地促进 PHA 激活的人淋巴细胞增殖作用,而在这两种重组病毒单独感染 Sf9 细胞和野生型病毒感染 Sf9 细胞的条件培养液中,均检测不到生物活性(图 1)。说明重组 hIL-12 在昆虫细胞中已表达成功,表达量约为 $1.5 \sim 2 \mu\text{g}/10^6$ 细胞。

2.3 实时 BIA 检测重组 hIL-12 及其亚基的表达

2.3.1 hp35 和 hp40 两亚基表达的检测:生物传感器(Biosensor)是由 Pharmacia biosensor AB 公司利用表面等离子体质子共振(Surface plasmon resonance, SPR)的旋光现象来检测生物分子间在真实时间(Real-time)内的相互作用的原理而发明的一种新型生物检测器。利用 BIA 技术,将配基或抗体固定在感应片(chip)的表面,由于被固定的分子能与相应的受体或抗原专一性地结合,并在检测器中反映出来,用共振单位(RU)变化值(ΔRU)表示 ΔRU 值与专一性结合的蛋白量成正比, ΔRU 值越大,结合的蛋白量越多。在我们的实验中,将大鼠抗 hIL-12 单抗与感应片表面的葡聚糖耦联。耦联的抗体能与 hIL-12 相互作用,从而可以检测 hIL-12 的表达情况。检测后通过简单的溶液洗脱使与感应片上抗体结合的抗原洗脱下来,再生的感应片可以进一步用于检测。耦联好的感应片可以反复使用几百次,这样能在含大量的非特异性的蛋白混合液中直接进行检测,无需经过纯化。

单独感染重组病毒 AcNPV-hp35 的细胞上清液上样后无明显 RU 值变化($\Delta\text{RU} = 360$) (图 2,峰 I),而单独感染重组病毒 AcNPV-hp40 的细胞上清液上样后 RU 值变化明显($\Delta\text{RU} = 2272$) (图 2,峰 II),两亚基共表达 hIL-12 的 RU 值变化也很大($\Delta\text{RU} = 2029$) (图 2,峰 III)。说明 hp40 肯定已有表达。从本实验及 Western blot 的结果可推测该单抗结合 hIL-12 是通过结合 hp40 来实现的。

2.3.2 重组 hIL-12 的检测:重组病毒 AcNPV-hp35 和 AcNPV-hp40 共感染细胞的上清液上样后, RU 值变化显著($\Delta\text{RU} = 2660$)。阳性对照 hIL-12 的 ΔRU 为 3180,阴性对照和

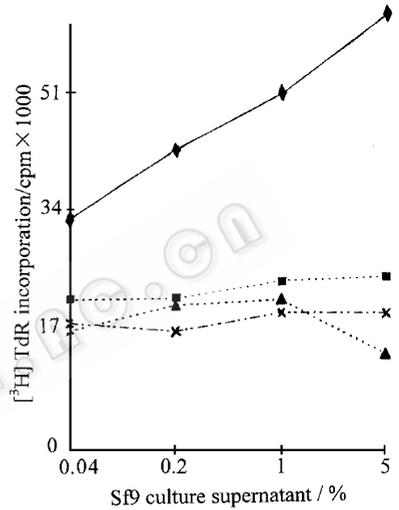


图 1 重组 hIL-12 及其亚基的生物活性测定
Fig. 1 Biological activities of recombinant hIL-12 and its subunits
◆ hIL-12; ■ hp35 only;
▲ hp40 only; × mock

单独感染重组病毒 AcNPV-hp35 的细胞上清液上样后无明显 RU 值变化($\Delta\text{RU} = 360$) (图 2,峰 I),而单独感染重组病毒 AcNPV-hp40 的细胞上清液上样后 RU 值变化明显($\Delta\text{RU} = 2272$) (图 2,峰 II),两亚基共表达 hIL-12 的 RU 值变化也很大($\Delta\text{RU} = 2029$) (图 2,峰 III)。说明 hp40 肯定已有表达。从本实验及 Western blot 的结果可推测该单抗结合 hIL-12 是通过结合 hp40 来实现的。

模拟物的 RU 值无明显变化, ΔRU 分别为 -326 和 185,故推测重组 hIL-12 在昆虫细胞中有表达。

2.4 hp35 和 hp40 mRNA 的 Northern 印迹分析

重组病毒 AcNPV-hp35 和 AcNPV-hp40 共感染昆虫细胞的总 RNA,分别与³²P 标记的 hp35 cDNA 和 hp40 cDNA 探针杂交,在相应位置均有杂交信号(图 3),此实验结果证明 hp35 和 hp40 在昆虫细胞中已获得表达。

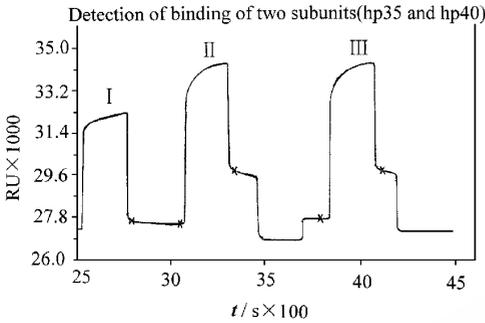


图 2 实时 BIA 检测重组 hp35 和 hp40 的表达

Fig.2 The real-time BIA assay of expression of recombinant hp35 and hp40

- I .Culture supernatant of insect cells infected by AcNPV-hp35
- II .Culture supernatant of insect cells infected by AcNPV-hp40
- III .Conditioned medium containing recombinant hIL-12

2.5 免疫印迹(Western blot)分析结果

重组 hIL-12 在非还原条件下的 Western blot 结果呈现 2 条印迹,分子量分别约为 92kDa 和 76kDa(图 4A),其中 76kDa 的带是重组 hIL-12,另一条 92kDa 的条带可能为 hp40 的二聚体 (K p40)₂。同时在还原条件下,Western blot 的结果显示一条分子量约为 36kDa 的条带(图 4B),此条带是 hp40。

2.6 重组 hp40 对 hIL-12 生物活性的影响

从图 5 中可以看出,表达重组 hp40 的上清液具有明显地抑制 PHA 激活的人淋巴细胞增殖作用,而且抑制作用随浓度的递增而增强。

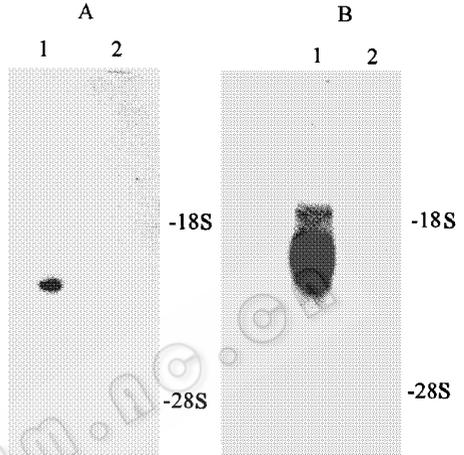


图 3 重组病毒共感染昆虫细胞中, hp35 和 hp40 mRNA 的 Northern 印迹分析

Fig.3 Northern blotting analysis of hp35 and hp40 mRNA from the insect cells co-infected by recombinant viruses

Northern blotting analysis of hp35 mRNA (A) and hp40 mRNA (B). Probes were ³²P - labelled hp35 cDNA and hp40 cDNA respectively.

- 1. 10μg of total RNA from insect cells co-infected by recombinant viruses
- 2. 10μg of total RNA from insect cells infected by wild type viruses

3 讨 论

利用 BEVS 表达的重组外源蛋白可以正确折叠,形成正确的二硫键和寡聚化。它还可以使绝大多数蛋白进行正确的翻译后修饰,包括 N-和 O-连接的糖基化、磷酸化、酰

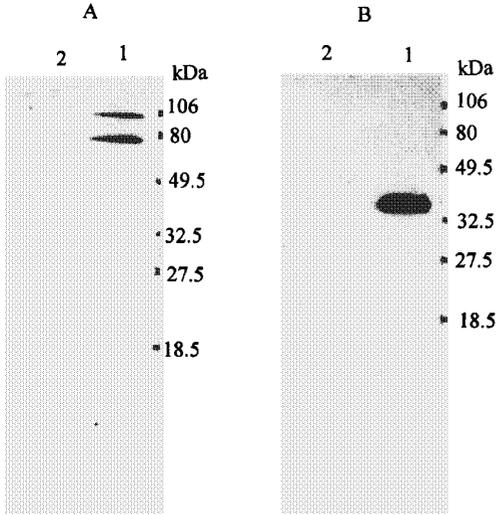


图 4 重组 hIL-12 的免疫印迹分析

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant hIL-12

Western blot analysis of recombinant hIL-12 under non-reducing condition (A) and reducing condition (B)

1. Culture supernatant of insect cells co-infected by recombinant viruses
2. Culture supernatant of insect cells infected by wild type viruses

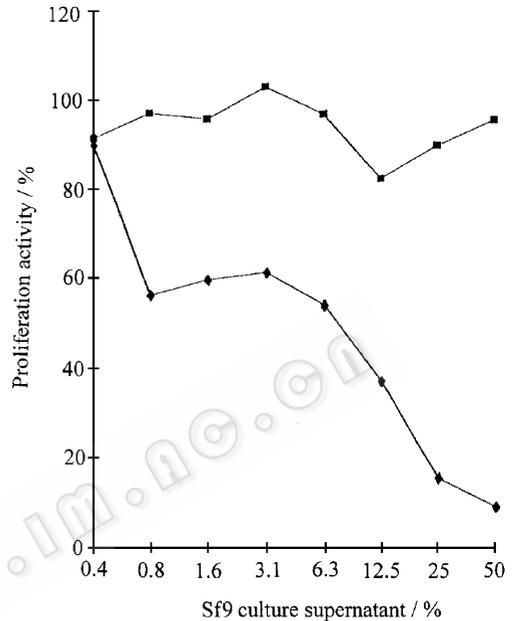


图 5 重组 hp40 对 PHA 激活的人淋巴细胞增殖作用的影响

Fig. 5 The effects of recombinant hp40 on proliferation of PHA-activated human lymphocytes

◆ hIL-12 + hp40 ; ■ hIL-12 + mock

胺化、羧基甲基化和信号肽的去除等等作用。这些修饰作用往往与蛋白质在天然细胞环境下所进行的修饰完全一致,从而使得重组产物与其相应的天然产物在结构和功能上都非常地相似^[12]。此外, BEVS 适合多基因的同时表达,该系统可以在单个被感染的昆虫细胞中表达。这对那些必须以二聚体或多聚体形式才表现出生物活性的蛋白复合物来说,无疑是个福音,而且表达出来的蛋白复合物可以以适当方式组装^[17]。再者,通常情况下,该系统所表达的重组产物与其相应的天然产物所处的细胞亚单位(Compartment)相同。正是基于 BEVS 上述独特的优越性,我们很自然地选择 BEVS 作为 hIL-12 的表达系统。

在 hp35 cDNA 的翻译起始位点的上游-102-100 位处还有一个可能的起始密码子 ATG, 尽管 Wolf 等人在 COS 细胞中表达重组 hIL-12 时,发现该 ATG 对产生具有生物活性的重组 hIL-12 无重大影响^[18],但是,在我们实验中却得到了截然相反的结果。保留该 ATG 的重组病毒与重组病毒 AcNPV-hp40 同时感染昆虫细胞的上清液无促进 PHA 激活

的人淋巴细胞增殖作用,而去掉该 ATG 的重组病毒与 AcNPV-hp40 共感染昆虫细胞后,表达产物明显地具有促进 PHA 激活的人淋巴细胞增殖作用。由于 hp35 和 hp40 共表达是维持分泌型 hIL-12 生物活性所必需的,而任何一个亚基的单独表达均不具有生物活性^[19],所以可以推测,在昆虫细胞表达系统中,保留该 ATG 会影响 hp35 亚基的表达效率,从而不能与 hp40 进行正确装配,再加上单独 hp40 本身不具有生物活性,因此利用 BEVS 表达重组 hIL-12 时必需对 hp35 cDNA 上的第一个 ATG 进行改造,或去除或致变。

从实验结果分析,单独感染重组病毒 AcNPV-hp40 的昆虫细胞培养液可以抑制 hIL-12 对 PHA 激活的人淋巴细胞的增殖作用,说明重组 hp40 与 hIL-12 竞争结合人淋巴细胞上的 hIL-12 受体,从而阻断 hIL-12 的生物功能,推测 hp40 上存在与受体结合的 domain。然而,只有当 hp40 亚基与另一个蛋白分子(hp35 或 hp40)结合后,才能使 hp40 的构型发生改变,将其与受体结合的位点暴露出来,在受体存在时就可以与之结合,因此单独的 hp40 单体是不具有抑制作用的。虽然两种二聚体分子都能与受体产生特异性结合,但是只有异源二聚体分子 hIL-12(hp70)与受体结合后,才能介导细胞内的信号传导,产生一定的生物功能。据报道,鼠 IL-12 的 p40 亚基所形成的同源二聚体能与异源二聚体形成的鼠 IL-12 相拮抗,抑制鼠 IL-12 对鼠脾脏细胞的增殖作用,而且它与受体的亲和力与鼠 IL-12 相当^[20]。但是,从我们的实验结果分析,产生拮抗作用的 hp40 同源二聚体的量是 hp70 量的 5~10 倍,可见, hp40 同源二聚体与受体的亲和力较 hp70 的低。

参 考 文 献

- 1 Kobayashi M, Fitz L, Ryan M *et al.*. *J Exp Med*, 1989, **170**: 827~846
- 2 Stern A S, Podlaski F J, Hulmes J D *et al.*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 6808~6812
- 3 Manetti R, Parronchi P, Giudizi M G *et al.*. *J Exp Med*, 1993, **177**: 1199~1204
- 4 Hsieh C, Macatonia S E, Tripp C S *et al.*. *Science*, 1993, **260**: 547~549
- 5 Murphy E E, Terres G, Macatonia S E *et al.*. *J Exp Med*, 1994, **180**: 223~231
- 6 Heinzel F P, Schoenhaut D S, Jerko R M *et al.*. *J Exp Med*, 1993, **177**: 1505~1509
- 7 Gazzinelli R T, Hieny S, Wynn T A *et al.*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6115~6119
- 8 Sypek J P, Chung C L, Mayor S E H *et al.*. *J Exp Med*, 1993, **177**: 1797~1802
- 9 Nastala C L, Edington H D, McKinney T G *et al.*. *J Immunol*, 1994, **53**: 1697~1706
- 10 Brunda M J, Luistro L, Warriar R R *et al.*. *J Exp Med*, 1993, **178**: 1223~1230
- 11 Mattner F, Fischer S, Guckes S *et al.*. *Eur J Immunol*, 1993, **23**: 2202~2208
- 12 Gruenwald S, Heitz J. *Baculovirus Expression Vector System Procedures and Methods Manual* (2nd Eds), Pharmingen, 1993
- 13 Gately M K, Chizzonite R. In Coligan J E (eds), *Current Protocols*, New York: 1992, 6. 16. 1~6. 16. 8
- 14 BiocoreTM Instrument Handbook, 1994, Pharmacia Biosensor AB
- 15 ECLTM Western Blotting Protocols, 1995, Amersham International Plc
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd eds), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 17 Belyaev A S, Roy P. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 1219~1223
- 18 Wolf S F, Temple P A, Kobayashi M *et al.*. *J Immunol*, 1991, **146**: 3074~3081
- 19 Gulber U, Chua A O, Schoenhaut D S *et al.*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4143~4147
- 20 Gillessen S, Carvajal D, Ling P *et al.*. *Eur J Immunol*, 1995, **25**: 200~206

Expression of Human Interleukin 12(hIL-12) in Insect Cells

Shen Hui Li Changlin Lin Mingqun Zhang Zongliang Shen Qingxiang
(*Shanghai Institute of Cell Biology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031*)

Abstract Human interleukin-12(hIL-12) is a heterodimer cytokine ,which consists of two disulfide-linked subunits p40 and p35. This paper reports the expression of hIL-12 using Baculovirus Expression System in insect cells. We firstly constructed two expression vectors pVL1392-hp40 and pVL1393-hp35 and then they were used to co-transfect the insect cells(Sf9) separately with linearized polyhedrosis virus genomic DNA. Two kinds of recombinant viruses Ac NPV-hp40 and AcNPV-hp35 were visually screened out. Biological activity of the recombinant hIL-12(rhIL-12) was detected in the conditioned medium using proliferation assay of PHA-activated human lymphocytes and the expression level was about $1.5 \sim 2 \mu\text{g}/10^6$ cells. The results of real-time Biomolecular Interaction Analysis(BIA) and Northern blot demonstrated that the subunits of rhIL-12 ,hp35 and hp40 were expressed successfully in the insect cells. The apparent molecular weights of rhIL-12 and hp40 homodimer were 76kDa and 92kDa under non-reducing conditions of Western blot ,respectively. The recombinant hp40 can significantly inhibit the biological activity of hIL-12.

Key words hIL-12 ,real-time BIA ,baculovirus expression system ,co-expression insect cells