

人干细胞生长因子- α 基因的克隆、表达及其协同 rhGM-CSF 对人脐带间充质干细胞的增殖作用

彭鑫磊^{1,2}, 马岩岩^{1,2}, 荣靖^{1,2}, 赵振岭¹, 韩波^{1,2}, 陈伟¹, 向阳飞^{1,2}, 刘秋英^{1,2},
王一飞^{1,2}, 任哲^{1,2}, 周向荣³, 陈海佳⁴

1 暨南大学生物医药研究开发基地 广东省生物工程药物重点实验室, 广州 510632

2 基因工程药物国家工程研究中心, 广州 510632

3 亚太干细胞科研中心有限公司, 中国香港

4 暨南·赛莱拉基因生物美容联合实验室, 广州 510632

摘要: 为了研究 hSCGF- α 对人脐带间充质干细胞 (Human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 的作用, 采用基因工程技术获得重组人干细胞生长因子- α (Recombinant human Stem Cell Growth Factor- α , rhSCGF- α)。针对 SCGF 基因的高 GC 含量, 采用 PCR 两步法获得 hSCGF- α 基因, 插入 pET-28a(+) 载体质粒, 构建重组质粒 pET-28a-SCGF- α , 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 获得表达菌株。低温 20 °C 诱导 24 h, 目标重组蛋白人干细胞生长因子- α 以可溶性表达为主。通过 Ni²⁺-NTA 柱纯化, 获得目标重组蛋白, 电泳谱带扫描分析蛋白纯度可达 90% 以上。以巨噬细胞/粒细胞 (Granulocyte/macrophage, GM) 集落形成实验鉴定重组蛋白的生物学活性, 并协同重组人巨噬细胞/粒细胞集落刺激因子 (Recombinant human GM-colony stimulating factor, rhGM-CSF) 研究其对人脐带间充质干细胞的影响。结果显示, 纯化的重组蛋白 rhSCGF- α 具有生物学活性; hSCGF- α 及 rhGM-CSF 对 hUCMSCs 均有刺激增殖活性, 但协同作用效果最强。

关键词: 干细胞生长因子, 人脐带间充质干细胞, 克隆, 协同作用, 集落

Cloning, expression and characterization of gene encoding human stem cell growth factor- α and its synergetic effect with rhGM-CSF on proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Xinlei Peng^{1,2}, Yanyan Ma^{1,2}, Jing Rong^{1,2}, Zhenling Zhao¹, Bo Han^{1,2}, Wei Chen¹, Yangfei Xiang^{1,2},
Qiuying Liu^{1,2}, Yifei Wang^{1,2}, Zhe Ren^{1,2}, Xiangrong Zhou³, and Haijia Chen⁴

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Biomedicine Research and Development Centre of Jinan University,

Received: November 1, 2010; Accepted: May 31, 2011

Corresponding author: Yifei Wang. Tel: +86-20-85223426; E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

Zhe Ren. Tel: +86-20-85220504; E-mail: rz62@163.com

Guangzhou 510632, China

2 National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangzhou 510632, China

3 Asia Pacific Stem Cell Science Limited, Hongkong, China

4 Jinan-sailai genetic Bio-Beauty Joint Laboratory, Guangzhou 510632, China

Abstract: To investigate the effect of hSCGF- α on human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs), we obtained hSCGF- α using genetic engineering. *hSCGF- α* gene was amplified from hUCMSCs cDNA using two-step PCR and was inserted into pET-28a(+) plasmid vector. Induced by IPTG at 20 degrees Celsius for 24 h, the fusion protein expressed in *E.coli* BL21(DE3) was mainly existing in soluble form. The recombinant hSCGF- α was purified using NI-NTA affinity chromatography and the purity was up to 90%. The colony forming test revealed that combined use hSCGF- α and rmGM-CSF (recombinant murine GM-colony stimulating factor, rmGM-CSF) had granulocyte/macrophage (GM) promoting effects on murine bone marrow GM progenitor. In addition, the results indicated that hSCGF- α and rhGM-CSF had stimulatory effect on hUCMSCs and their synergetic effect was the strongest.

Keywords: stem cell growth factor, human umbilical cord mesenchymal stem cells, cloning, synergetic effect, colony

细胞因子在造血过程中起着十分重要的调控作用, 早期造血祖细胞的增殖作用是在多种细胞因子的协同刺激作用下完成的, 这些因子主要包括集落刺激因子家族 (Colony-stimulating factors, CSFs) 和白介素类 (Interleukins, ILs), 如 SCF、flk-2/flk-3 配体、IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF 和 GM-CSF 等^[1]。人干细胞生长因子 (Human stem cell growth factor, hSCGF, 又名 LSLCL) 是一种在骨髓造血微环境中起作用的早期造血刺激因子, 具有多种生物学活性。已知人干细胞生长因子具有 2 种形式, 全长分子 hSCGF- α (成熟 mRNA 完全开放读码框 972 bp, 编码 323 个氨基酸) 和在 C 端保守的 Ca²⁺ 依赖糖识别结构域 (Calcium dependent carbohydrate recognition domain, CRD) 内缺失 78 个氨基酸的截短型分子 hSCGF- β (成熟 mRNA 长 738 bp, 编码 245 个氨基酸), 因此属于 C 型凝集素 (C-type lectin) 超家族成员^[2]。

Hiraoka 等^[3-4]在人髓系细胞 KPB-M15 上清中首先发现 SCGF, 指出 SCGF 单独对造血祖细胞作用并没有集落刺激活性, 但在半固体基础培养基中, 与促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 协同作用对红细胞系有红细胞样爆发促进活性 (Burst-promoting activity, BPA); 与粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte/macrophage (GM)

colony-stimulating factor, GM-CSF) 协同作用对 GM 祖细胞有粒细胞/巨噬细胞集落促进活性 (Granulocyte/macrophage colony-promoting activity, GPA)。

截短分子 hSCGF- β 的造血刺激活性具有严格的种属特异性, 即人源 hSCGF- β 不能协同刺激其他种属类 (如小鼠) 造血干/祖细胞的增殖; 全长分子 *hSCGF- α* 与小鼠和大鼠的 *SCGF* mRNA 同源性分别为 85.1% 和 83.3%, 对应 SCGF 蛋白分子的相似性均为 90.4%^[2]。

本实验纯化了 hSCGF- α , 发现它可以协同 rmGM-CSF 促进 GM 祖细胞集落形成; 并进一步研究了它与 rhGM-CSF 协同作用于人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs), 探讨这 2 种造血因子对 hUCMSCs 的增殖作用效果, 为进一步研究两因子对 hUCMSCs 的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol、RT-PCR 试剂盒均购自 Invitrogen 公司; primeSTAR (GC Buffer) DNA 聚合酶、核酸 Marker (1 kb、DL2 000)、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 及 T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒抽提和 DNA 回收及纯化试剂盒购自

Omega 公司; 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 一抗: 鼠抗人 SCGF 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 山羊抗鼠二抗购自 Millipore 公司; rmGM-CSF、rhGM-CSF、hSCGF- α 标准对照品 (重组人 SCGF- α) 购自 Peprotech 公司; 蛋白预染 Marker 购自 Fermentas 公司; 大肠杆菌 DH5 α 购自 Promega 公司; 表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 和载体 pET-28a (+) 质粒购自 Novagen 公司; 层析系统为 AKTA Purifier 系统购自 AKTA 公司。

1.2 hSCGF- α cDNA 的克隆

参照文献[5]原代分离、培养 hUCMSCs, P₁ 代细胞生长至 80%~90% 融合时, 每 25 cm² 培养瓶细胞加 1 mL Trizol 裂解液提取总 RNA, 立即逆转录为 cDNA。根据人 SCGF 全长基因序列 (GenBank Accession No. NM_002975), 设计 SCGF₁ PCR 引物 (表 1)。SCGF₁ 基因采用 PCR 两步法, 以 hUCMSCs cDNA 为模板, PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 1 min, 30 个循环; 68 °C 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行回收和纯化。

1.3 hSCGF- α 成熟肽编码序列的扩增

根据 hSCGF- α 成熟肽编码序列 (GenBank Accession No. AB009244.1) 设计 SCGF₂ 引物 (表 1), 由上海生工生物工程有限公司合成。SCGF₂ 上游引物中下划线部分为 Nde I 识别位点, 从后面的 GCT 开始为去掉了信号肽 (21 个氨基酸) 的 hSCGF- α 成熟肽编码序列。SCGF₂ 下游引物中下划线部分为 BamH I 识别位点, 后面的黑体 CTA 为终止密码子。以 SCGF₁ 为模板, PCR 反应参数同 1.2。电泳鉴定后回收纯化 PCR 产物。

1.4 pET-28a-SCGF- α 重组表达载体的构建及鉴定

用 Nde I、BamH I 双酶切 PCR 产物 SCGF₂ 和 pET-28a (+) 质粒, 胶回收目的片段, T4 DNA 连接酶连接, 连接物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 挑单菌落 37 °C 振荡培养, 进行菌液 PCR 鉴定; 进一步

表 1 SCGF PCR 引物

Table 1 Primers of SCGF PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SCGF ₁ forward	CAAGAGTCCAGCTTAATGCAGGCAG
SCGF ₁ reverse	GCTAGAAGGGGAAGCTCGCAGACGTA
SCGF ₂ forward	ATTTAAAACATATGGGTGCTCGGGGA GCAGAGAG
SCGF ₂ reverse	ATTGGATCCCTAGAAGGGGAAGCTCGCAG

用 Nde I、BamH I 双酶切鉴定构建的重组质粒。鉴定后的阳性质粒由上海英骏生物科技有限公司测序。

1.5 重组表达及诱导表达条件的优化

取测序正确的 pET-28a-SCGF- α 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态, 挑单菌落 37 °C 振荡培养过夜, 培养物以 5% 接种量接种液体 LB (K⁺), 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8 时加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续于 37 °C、180 r/min 振荡培养 4 h, 12% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色分析诱导表达结果。

按照以上培养条件, 培养物以 5% 的接种量, 摸索不同的诱导条件, 分别选取不同 OD₆₀₀ (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2) 时加 IPTG 诱导、不同诱导时间 (4 h、12 h、24 h) 收集菌体、不同的 IPTG 诱导浓度 (0.1~2.0 mmol/L)、不同的诱导温度 (15 °C、20 °C、37 °C) 等几方面优化诱导条件, 最终确定一个高表达条件。

1.6 重组蛋白表达存在形式的分析

取诱导表达产物, 4 °C, 9 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 沉淀重悬于 PBS (0.01 mmol/L, pH 8.0), 超声破碎菌体后离心 (4 °C, 17 000×g, 30 min), 分别取上清及沉淀, 12% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色后分析重组蛋白存在形式。

1.7 重组蛋白的可溶性纯化

根据以上确定的条件进行 1 L 中量发酵, 4 °C、9 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 按 100 g 湿菌体加 1 L PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 重悬, 超声破碎

(400 W, 工作 3 s, 间歇 6 s, 共 300 次), 4 °C、17 000×g 离心 30 min, 留取上清。

约 10 mL 体积的 Ni²⁺-NTA 填料装柱, 先用纯水洗 2~3 个柱体积, 再用 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 平衡柱子至基线。平衡后的柱子, 卸下填料, 与离心后收集的上清液冰浴搅拌 3 h, 沉淀 2 h 后装柱。用 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 洗至基线, 然后用含 40 mmol/L 咪唑的 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 洗脱杂质蛋白, 再用含 400 mmol/L 咪唑的 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 洗脱目的蛋白, 洗脱过程中每次出峰均分开收集洗脱液, 留样, 12% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色分析每步出峰时洗脱液内蛋白的情况, 目的重组蛋白脱咪唑后用 BCA 法测定蛋白浓度。

1.8 Western blotting 验证纯化出的 hSCGF- α

将纯化后的 hSCGF- α 蛋白取样进行 12% SDS-PAGE。转膜: 电泳完成后, 根据预染 Marker 指示切下目的蛋白片段, 进行转膜, 电泳 200 mA, 1 h; 封闭: 将膜取出, 放入纯水中洗过后, 加封闭液 (脱脂奶粉), 摇床 60 r/min, 1 h; 孵一抗: 倒掉封闭液后用纯净水洗净, 加一抗 (鼠抗人 SCGF 单克隆抗体, 1:3 000 稀释) 后于杂交袋中 4 °C 过夜; 孵二抗: 将膜从一抗中取出, 用 PBST 洗 3 次, 每次放置摇床上 (60 r/min) 摇 10 min, 然后孵二抗 (山羊抗鼠二抗, 1:1 000 稀释), 然后在杂交袋中摇 1 h (60 r/min); 洗膜: 取出膜, 用 PBST 洗 2 次, 每次放置摇床上 (60 r/min) 摇 10 min, 再用 PBS 洗 1 次 (60 r/min, 10 min); 显影, DAB 显色法 (增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒 (Tiangen)): 取 1×HRP 缓冲液 1 mL, 加入试剂 A、B、C 各 50 μ L 混匀, 避光下, 将膜浸没 5 min, 显色后拍照。

1.9 集落形成实验鉴定重组蛋白活性

以 Ficoll (1.083 mg/mL, Sigma 公司) 密度梯度离心法分离成体 BALA/c 小鼠骨髓单个核细胞, 计数, 调整细胞密度为 2×10^5 /mL, 细胞液与等体积的甲基纤维素半固体培养基混匀, 进行半固体集落培养。实验分为 rhGM-CSF (5 ng/mL) 组、hSCGF- α 组、混合组

和不加因子的对照组。各组设 3 个重复, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 7 d, 然后计数, 大于 50 个细胞计为 1 个细胞集落, 实验重复 3 次^[4]。

1.10 hSCGF- α 协同 rhGM-CSF 对 hUCMSCs 增殖的影响

P₁ 代 hUCMSCs 达到 80%~90% 融合, 消化, 以 5×10^4 /mL 的细胞密度铺 96 孔板, 每孔 100 μ L, 12 h 后加细胞因子, 实验分为 rhSCGF- α 组、rhGM-CSF (5 ng/mL) 组和两者协同组, 每组设 4 复孔, 并设未加因子的对照组, rhSCGF- α 在 rhSCGF- α 组和协同组中设立浓度梯度, rhSCGF- α 浓度梯度从 19 187.5 ng/mL 倍比稀释到 0.036 6 ng/mL。37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱孵育 48 h 加 MTT, 继续孵育 4 h 后加 DMSO, 570 nm 波长下测吸光度值, 实验重复 3 次。由本实验求出 rhSCGF- α 作用的最佳浓度后进行后续试验。

P₁ 代 hUCMSCs 达到 80%~90% 融合, 消化, 以 5×10^4 /mL 的细胞密度铺 24 孔板, 每孔 500 μ L, 同时加入细胞因子, 记为第 1 天, 实验分为 rhSCGF- α (0.29 ng/mL) 组、rhGM-CSF (5 ng/mL) 组和协同组, 并设未加因子的对照组, 每天取各组中的 3 孔细胞进行消化, 计数, 共计 7 d, 实验重复 3 次。

1.11 hSCGF- α 与标准对照品对 hUCMSCs 增殖作用的活性比较

P₁ 代 hUCMSCs 达到 80%~90% 融合, 消化, 以 5×10^4 /mL 的细胞密度铺 96 孔板, 每孔 100 μ L, 12 h 后加细胞因子, 实验分为 rhSCGF- α 组和标准对照品 (重组人 SCGF- α) 组, 每组设 4 个倍比稀释的浓度梯度, 即 1.17 ng/mL、0.59 ng/mL、0.29 ng/mL、0.15 ng/mL, 并设不加因子的对照组, 每组设 4 个复孔。37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱孵育 48 h 加 MTT, 继续孵育 4 h 后加 DMSO, 570 nm 波长下测吸光度值, 实验重复 3 次。

1.12 统计分析

以上所有统计实验结果均采用 SPSS 16.0 统计软件, 对所有数据进行多组均数间比较采用

One-way ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 认为具有显著意义, $P < 0.01$ 认为具有极显著意义。

2 结果与分析

2.1 *hSCGF- α* 全长基因 *SCGF₁* 及 *hSCGF- α* 成熟肽编码基因 *SCGF₂* 的 PCR 扩增

根据所设计的引物 1, 采用 PCR 两步法进行

目的片段的扩增, PCR 产物 *SCGF₁* 应包含 *hSCGF- α* 完全开放读码框 (ORF) 的 988 bp, 图 1A 显示 PCR 产物电泳检测结果与预期相符。根据引物 2, 同样采用 PCR 两步法, 以 *SCGF₁* 为模板, PCR 产物 *SCGF₂* 应包含全部 *hSCGF- α* 成熟肽编码基因的 935 bp, 图 1B 显示 PCR 产物 *SCGF₂* 电泳检测结果与预期相符。

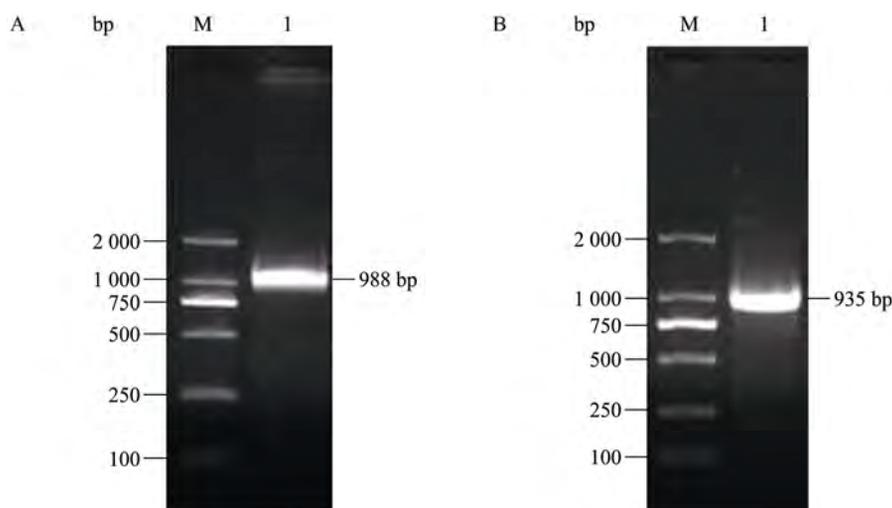


图 1 *SCGF₁* (A) 和 *SCGF₂* (B) PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR products of *SCGF₁* (A) and *SCGF₂* (B). (A) M: DL 2 000 DNA molecular marker; 1: *SCGF₁* PCR product. (B) M: DL 2 000; 1: *SCGF₂* PCR product.

2.2 pET-28a-*SCGF- α* 重组质粒的鉴定

如图 2 所示, 菌液 PCR 得到一条约 935 bp 的条带; 重组质粒经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切得到 2 条片段, 小片段约 935 bp, 大片段约 5.3 kb; 重组质粒测序结果与 GenBank (Accession No. AB009244.1) 上已发表的序列相同, 说明重组质粒 pET-28a-*SCGF- α* 构建成功。

2.3 重组子表达产物的分析及诱导表达条件的优化

重组子 pET-28a-*SCGF- α* 的表达产物经 SDS-PAGE 分析, 以检测表达状况及初步确定其表达量。从图 3 可以看出, IPTG 能够诱导重组蛋白的表达, 诱导后的产物在分子量 43 kDa 左右处有一明显染色带, 去除组氨酸标签的 *SCGF- α* 重组蛋白预

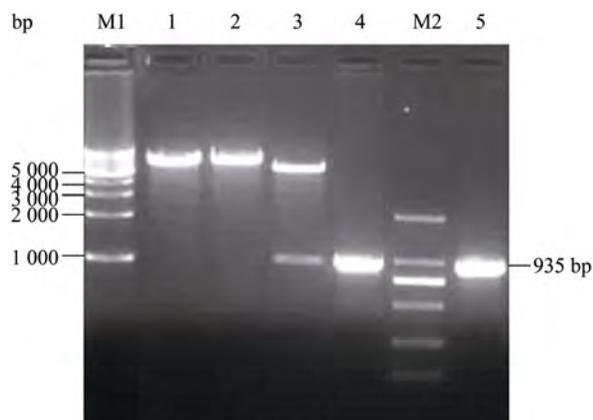


图 2 重组质粒 pET-28a-*SCGF- α* 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET-28a-*SCGF- α* . M1: 1 kb DNA molecular marker; 1: pET-28a-*SCGF- α* digested with *Nde* I; 2: pET-28a-*SCGF- α* digested with *Bam*H I; 3: pET-28a-*SCGF- α* digested with *Nde* I and *Bam*H I; 4: PCR product of pET-28a-*SCGF- α* ; M2: DL 2 000; 5: PCR product of *SCGF₂*.

测相对分子质量为 33.9 kDa, 与预计结果相符。SDS-PAGE 胶经电泳谱带扫描分析和计算其表达量, 目标重组蛋白占细菌总蛋白表达量的 30% 左右。

由图 6 可见, 37 °C 条件下, 重组子发酵诱导表达后重组蛋白以可溶性和包涵体两种形式存在。

经过不同的条件摸索发现, 不同 IPTG 浓度诱导对重组蛋白的表达量没有明显的差异 (图 3); 相同的诱导温度和 IPTG 浓度情况下, 在不同的 OD_{600} 时开始诱导, 诱导相同的时间, $OD_{600}=0.8\sim 1.2$ 左右时, 重组蛋白表达量相对较高 (图 4); 当 $OD_{600}=$

0.8~1.2 时, 加 IPTG 最终浓度为 0.1 mmol/L 开始诱导, 分别在 37 °C、20 °C、15 °C 诱导 4 h、12 h、24 h, 检测目的蛋白的表达, 结果表明, 20 °C 诱导 24 h, 目标重组蛋白的表达量最高 (图 5), 且主要为可溶性表达 (图 6)。

最终选择一个重组蛋白以可溶性表达且表达量相对高的诱导条件 (图 6): 表达菌接种量为 5%, K^+ (工作浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 °C、180 r/min 摇菌, 当 $OD_{600}=0.8\sim 1.2$ 时加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 20 °C 诱导 24 h 收集菌体。

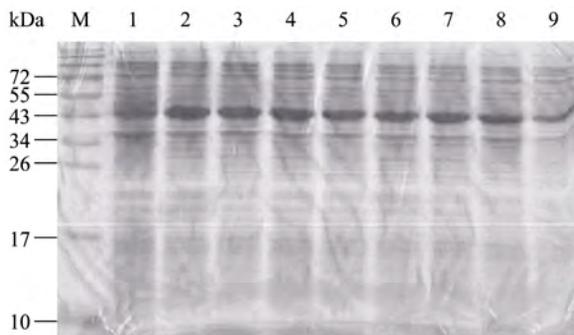


图 3 SDS-PAGE 分析不同的 IPTG 浓度诱导重组蛋白的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression induced by IPTG at different concentrations. M: protein marker; 1: uninduced; 2-9: IPTG induced at concentrations of 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol/L, respectively.

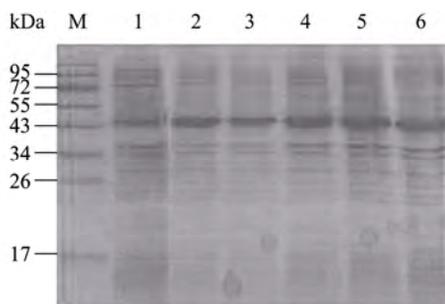


图 4 SDS-PAGE 分析在不同的 OD_{600} 时诱导重组蛋白的表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression at different OD_{600} . M: marker; 1: uninduced; 2-6: induced when OD_{600} at 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2, respectively.

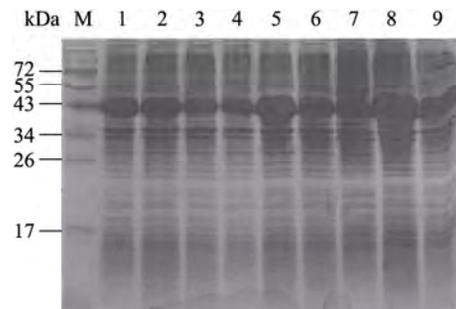


图 5 SDS-PAGE 分析在不同温度、诱导不同时间诱导重组蛋白的表达

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression induced at different temperature and different time. M: marker; 1, 4, 7: induced for 4 h, 12 h and 24 h at 37 °C, respectively; 2, 5, 8: induced for 4 h, 12 h and 24 h at 20 °C, respectively; 3, 6, 9: induced for 4 h, 12 h and 24 h at 15 °C, respectively.

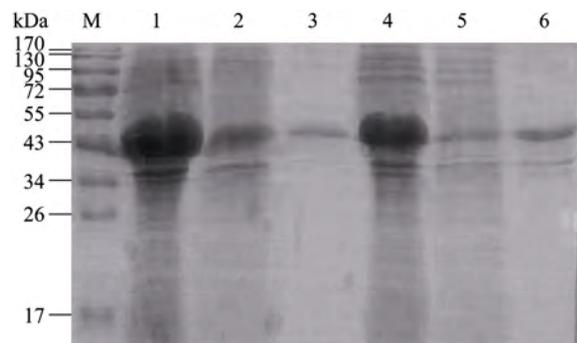


图 6 SDS-PAGE 分析目标重组蛋白可溶性表达情况

Fig. 6 Solubility analysis of fusion protein by SDS-PAGE. M: marker; 1: induced for 24 h at 20 °C; 2: induced supernatant at 20 °C for 24 h; 3: induced precipitate at 20 °C for 24 h; 4: induced for 24 h at 37 °C; 5: induced supernatant at 37 °C for 24 h; 6: induced precipitate at 37 °C for 24 h.

2.4 hSCGF- α 重组蛋白的纯化

通过 400 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱后, 12% SDS-PAGE 分析, 可以明显看到在 43 kDa 左右处有单一的目标条带 (图 7), 电泳谱带扫描分析表明蛋白纯度可达 90% 以上。洗脱液通过脱咪唑, 去除洗脱液中高浓度的咪唑, 以便于后续细胞试验。通过 BCA 法测定蛋白浓度后, 计算 1 L 菌液(菌体湿重约 (5.60 ± 0.44) g) 可以纯化出目的蛋白约 6.14 mg。

2.5 Western blotting 鉴定纯化的 hSCGF- α

如图 8 显示, Western blotting 显色后在 43 kDa 左

右有一单一条带, 与 SDS-PAGE 结果相符, 表明本实验纯化出的蛋白是所需要的目的蛋白 hSCGF- α 。

2.6 hSCGF- α 重组蛋白的活性检测

结果表明, 不加 2 因子的对照组没有集落形成; hSCGF- α 单独对小鼠单核细胞不能形成集落; 如图 9 所示: rmGM-CSF 单独作用能形成集落, 但集落形成较少; rmGM-CSF (5 ng/mL) 与 hSCGF- α 协同作用形成的集落数目, 随着 hSCGF- α 浓度增加而增加, 但到达高浓度 500 ng/mL 后, 集落数目下降。

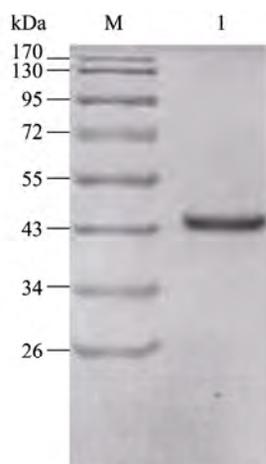


图 7 12% SDS-PAGE 鉴定纯化的目标重组蛋白

Fig. 7 Purified fusion protein identified by 12% SDS-PAGE. M: protein marker; 1: purified fusion protein.

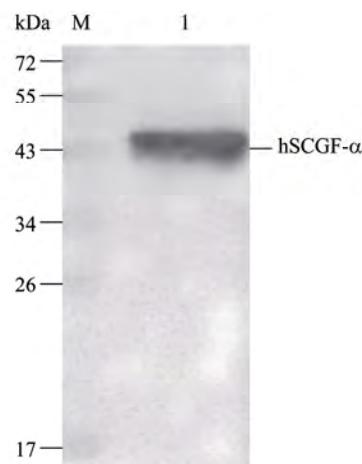


图 8 Western blotting 鉴定纯化的 hSCGF- α

Fig. 8 Identification of the purified hSCGF- α by Western blotting. M: protein marker; 1: purified fusion protein.

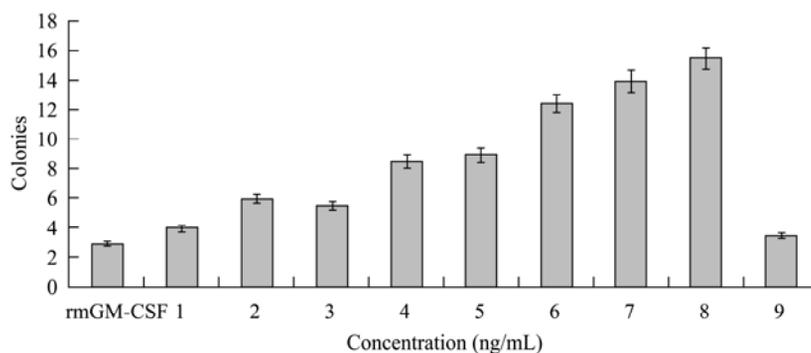


图 9 hSCGF- α 、rmGM-CSF 协同刺激 BALA/c 小鼠单核细胞形成 GM-Colonies

Fig. 9 Synergetic effect of hSCGF- α and rmGM-CSF on mouse monocyte cytophagic cell. rmGM-CSF: rmGM-CSF(5 ng/mL), solely; 1-9: rmGM-CSF(5 ng/mL) together with hSCGF- α 3.9 ng/mL, 7.8 ng/mL, 15.6 ng/mL, 31.3 ng/mL, 62.5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL and 1 000 ng/mL, respectively.

2.7 hSCGF- α 重组蛋白对 hUCMSCs 的增殖作用

MTT 实验得出, hSCGF- α 协同 rhGM-CSF 对 hUCMSCs 作用的 IC_{50} 为 $(17.15 \pm 2.97) \mu\text{g/mL}$, 在 hSCGF- α 0.29 ng/mL 时增殖能力最强; 通过 2 次实验统计结果表明, hSCGF- α (0.29 ng/mL) 组、rhGM-CSF (5 ng/mL) 组和协同组与不加因子的对照组 (Control) 之间都有极显著性差异 ($P < 0.01$); hSCGF- α 、rhGM-CSF 及协同组对 hUCMSCs 均有增殖刺激作用, 但是协同作用最强 (图 10)。

2.8 hSCGF- α 与标准对照品对 hUCMSCs 增殖作用的活性比较

如图 11 所示, 4 个不同的浓度组中 hSCGF- α 和标准对照品对 hUCMSCs 的增殖作用没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

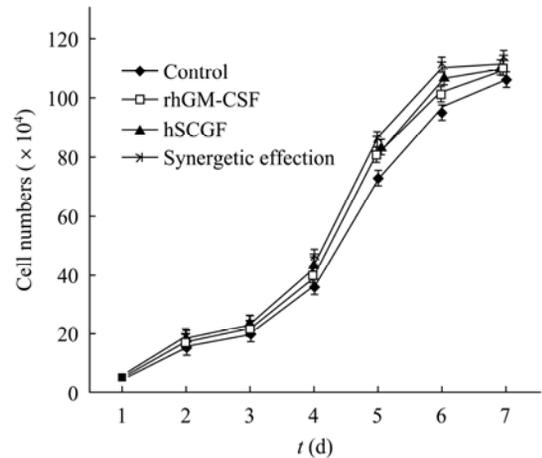


图 10 hSCGF- α 、rhGM-CSF 及协同对 hUCMSCs 的增殖作用

Fig. 10 Synergetic proliferation of hSCGF- α and rhGM-CSF on hUCMSCs. Control: rhGM-CSF(0 ng/mL), hSCGF- α (0 ng/mL); rhGM-CSF: rhGM-CSF(5 ng/mL); hSCGF: hSCGF- α (0.29 ng/mL); synergetic effect: hSCGF- α (0.29 ng/mL) together with rhGM-CSF(5 ng/mL).

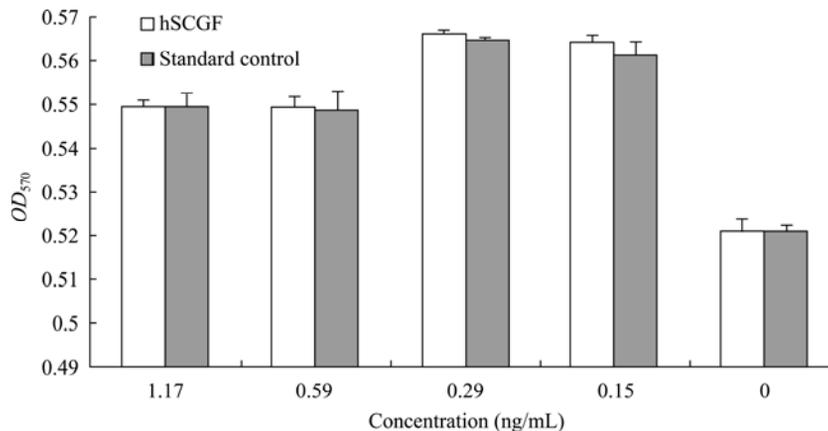


图 11 hSCGF- α 与标准对照品对 hUCMSCs 增殖作用的活性比较

Fig. 11 hSCGF- α compared with standard control on proliferation to hUCMSCs.

3 讨论

脐带由中胚层发育而来, 是胎儿时期连接胎儿和母体的索状结构, 外由羊膜包被, 内有两条动脉和一条静脉及血管周围富含蛋白多糖和黏多糖的组织组成^[6]。分娩后的脐带一直都被当废弃物丢弃,

近年来因寻求更多来源的成体干细胞而受到关注。造血干细胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 作为一种重要的生物或细胞治疗, 尽管已取得了很好的临床疗效, 但由于供源不足、不能在体外大量扩增等方面原因使得 HSCT 的应用仍受多方面的限制。从发育生物学的角度分

析, 间充质干细胞和造血干细胞均起源于中胚层未分化的间充质, 在造血微环境中两者之间存在紧密的联系^[7]。在造血系统中, 骨髓间充质干细胞可以分化为造血细胞, 而脐带间充质干细胞与骨髓间充质干细胞性能上很相近^[8-9]。因此, 在血液病治疗上, 脐带间充质干细胞具有替代骨髓间充质干细胞和造血干细胞的潜力。但是, 脐带间充质干细胞要想发挥这样的作用, 首先必须解决如何在体外快速大量的扩增及控制其分化。

hSCGF- α 编码成熟 mRNA 完全开放读码框的基因从人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) cDNA 中 PCR 获得, 但由于 *hSCGF* 基因 GC 含量高达 69.75%, 普通 PCR 酶无法获得 *hSCGF* 基因, 本研究利用 TaKaRa 公司生产的 DNA 聚合酶 primeSTAR (GC Buffer), 针对高 GC 含量模板采用 PCR 两步法获得 *hSCGF- α* 基因。目的基因 *SCGF₂* 在表达载体 pET-28a(+)-His 中的插入位点位于 6 \times His 标签和凝血酶位点之后, 因此在利用镍离子柱纯化后, 还可以在纯化后的蛋白中加入凝血酶切除 6 \times His 标签, 但公认 6 \times His 标签的存在并不影响重组蛋白的活性, 因此本实验在做后续试验中并未切除。虽然本实验使用的 pET 系统中含有 T7lac 强启动子, 在 IPTG 的诱导下可以高水平表达, 但是在 37 °C 诱导下, 目标重组蛋白只能部分可溶性表达。本实验在诱导条件的优化过程中, 采用降低诱导温度 (20 °C 诱导)、延长诱导时间 (诱导 24 h), 使目标重组蛋白实现大部分可溶^[10-12]。*hSCGF- α* 活性检测结果表明, *hSCGF- α* 单独对造血祖细胞作用不能形成集落, 与 rmGM-CSF 协同作用, 随着浓度的增大, 集落形成增加, 即具有浓度依赖性, 但是到达 500 ng/mL 后, 随着浓度的增加, 可能由于 *hSCGF- α* 的高浓度毒性作用, 集落形成数目下降。*hSCGF- α* 与 rhGM-CSF 对 hUCMSCs 的增殖都有影响, 其中协同作用更强, 有极显著性差异, 因此后续试验中, 将进一步研究 *hSCGF- α* 与其他因子的协同作用效果。同时 Hiraoka 等^[4]又指出, 在造血微环境中, SCGF 可能作为原始

造血祖细胞和间质细胞之间转化的中介物 (Mediator)。那么, *hSCGF- α* 在与其他因子的协同下, 能否促使 hUCMSCs 转化为造血细胞, 需要哪些必要的条件。出于这样的目的, 我们将进一步探索在各种细胞因子 SCGF、SCF、GM-CSF、bFGF 等协同下对 hUCMSCs 的作用效果。

REFERENCES

- [1] Hiraoka A, Sugimura A, Seki T, et al. Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding a novel human growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7577-7582.
- [2] Mio H, Kagami N, Yokokawa S, et al. Isolation and characterization of a cDNA for human, mouse, and rat full-length stem cell growth factor, a new member of C-type lectin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(1): 124-130.
- [3] Hiraoka A, Ohkubo T, Fukuda M. Production of human hematopoietic survival and growth factor by a myeloid leukemia cell line (KPB-M15) and placenta as detected by a monoclonal antibody. *Cancer Res*, 1987, 47(19): 5025-5030.
- [4] Hiraoka A, Yano Ki K, Kagami N, et al. Stem cell growth factor: *in situ* hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and *in vitro* proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. *Hematol J*, 2001, 2(5): 307-315.
- [5] He SQ, Luo ZY, Liu QY, et al. Isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and differentiation into adipocytes and osteoblasts. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2010, 14(14): 2492-2496.
何绍清, 罗振宇, 刘秋英, 等. 人脐带间充质干细胞分离培养及向脂肪与成骨细胞的分化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(14): 2492-2496.
- [6] Sobolewski K, Bańkowski E, Chyczewski L, et al. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate*, 1997, 71(1): 11-21.
- [7] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010, 466(7308): 829-834.
- [8] Chen X, Gao SJ, Li W, et al. Study on hematopoietic

differentiation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow *in vitro*. Chin J Lab Diagn, 2008, 12(12): 1533-1537.

陈晓, 高素君, 李薇, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向造血细胞分化的研究. 中国实验诊断学, 2008, 12(12): 1533-1537.

- [9] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. Methods Cell Biol, 2008, 86: 101-119.
- [10] Li YX, Xie Y, Zhu LJ, et al. Optimization of cloning and expression of β -glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. Chin J Biotech, 2009, 25(4): 542-548.
李永仙, 谢焱, 朱林江, 等. 淀粉液化芽胞杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆及表达. 生物工程学报, 2009, 25(4): 542-548.
- [11] Chen W, Han B, Qian CW, et al. Expression, purification and activity determination of cyanovirin-N. Chin J Biotech, 2010, 26(4): 538-544.
陈伟, 韩波, 钱垂文, 等. 蓝藻抗病毒蛋白-N 基因的克隆、表达、纯化及活性鉴定. 生物工程学报, 2010, 26(4): 538-544.
- [12] Lü FX, Lu ZX, Bie XM, et al. Fusion expression of fibrinolytic enzyme gene *PPFE-I* from endophytic *Paenibacillus polymyxa* in *Escherichia coli* and activity analysis. Chin J Biotech, 2010, 26(8): 1128-1134.
吕凤霞, 陆兆新, 别小妹, 等. 内生多粘类芽胞杆菌纤溶酶基因 *PPFE-I* 在大肠杆菌中融合表达及活性分析. 生物工程学报, 2010, 26(8): 1128-1134.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

干细胞及其分化细胞彩色图谱

郑月茂, 张翊华, 张雅蓉 著

开本: 16 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-031971-5 ¥ 88.00

内容简介

本图谱主要展示了编著者多年来科研积累的 252 幅干细胞及其分化细胞彩色图片, 同时展示了其他科研人员有关胚胎干细胞、诱导型多能干细胞、造血干细胞和神经干细胞及其分化细胞的图片 6 幅。本书介绍了各类干细胞的特性、分离培养和诱导分化。



郑月茂
张翊华 张雅蓉 编著

干细胞及其分化细胞
彩色图谱



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目