

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.036

白介素 24 融合蛋白的表达、纯化和促伤口愈合功能的鉴定

于偌萱¹, 周虹¹, 梁朋^{1,2}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 生物治疗国家重点实验室, 成都 610064)

摘要: 本研究通过优化小鼠白介素 24 (mIL-24) 基因序列, 构建以 Fc-tag 为标签的 mIL-24-Fc 融合蛋白. 对 CHO 进行 MTX 分级加压筛选, 获得了稳定、高表达 mIL-24-Fc 蛋白的阳性克隆, 同时优化了 CHO 细胞无血清驯化与稳定表达蛋白体系. 经 protein A 亲和层析纯化 mIL-24-Fc 蛋白并利用 AP binding 实验检测生物学活性后, 小鼠皮内注射 mIL-24-Fc 蛋白和伤口愈合实验证明: 注射 mIL-24-Fc 蛋白后, 小鼠表皮产生 2~3 层细胞增生, 伤口愈合速度加快.

关键词: 白介素 24; protein A; 银屑病; 伤口愈合

中图分类号: Q511 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0436-05

Expression, purification and identification of wound healing function of Interleukin-24 fusion protein

YU Ruo-Xuan¹, ZHOU Hong¹, LIANG Peng^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. State Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610064, China)

Abstract: In this study, the mIL-24-Fc fusion protein tagged with Fc-tag was constructed by optimizing the sequence of murine interleukin 24 (mIL-24) gene. The stable and high expression of mIL-24-Fc protein was screened at different concentrations of MTX, and the serum-free cell culture technique and stable expression system of CHO cells were optimized. MIL-24-Fc fusion protein was purified by protein A affinity chromatography and confirmed by AP binding assay. The result showed that after intradermal injections of mouse, a large number of keratinocytes showed two to three proliferation and in wound-healing process, epidermal hyperplasia was promoted and wound healing process was accelerated by mIL-24-Fc.

Keywords: Interleukin-24; Protein A; Psoriasis; Wound-healing

1 引言

白介素 24 (Interleukin-24, IL-24) 是 Jiang 等^[1]于 1995 年利用消减杂交技术从人的终末分化黑素瘤细胞中分离鉴定到, IL-24 基因在黑素瘤细胞中高表达并可促进黑素瘤细胞的分化. IL-

24 基因与 IL-10 家族 (IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24、IL-26) 基因位置相似, 结构类似. 同时, IL-24 与 IL-19、IL-20 享有共同受体 IL-20R1/IL-20R2; IL-24 与 IL-20 同样也能和 IL-22R1/IL-20R2 结合^[2,3], 因此把他它归为白介素家族一员.

白介素家族成员与银屑病息息相关. 银屑病是

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(81171955)

作者简介: 于偌萱(1991-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质化学及基因工程. E-mail: anitayu1991@foxmail.com

通讯作者: 梁朋. E-mail: liangpeng@scu.edu.cn

存在于普遍人群中的最主要的慢性炎症性皮肤病^[4]. IL-10对银屑病具有一定抑制作用,它能抑制IL-24诱导分泌的Th1型细胞因子.同时,He和Liang^[5]的IL-24转基因小鼠实验结果表明,IL-24转基因小鼠与IL-20、IL-22转基因小鼠有相同的特征如新生胎致死、表皮增生和角化细胞异常分化等现象.这表明了IL-24能诱发银屑病.基于IL-24及其受体在体内的表达模式,研究人员认为IL-24信号通路最主要的生理功能是与伤口愈合时表皮增生功能有关^[6,7].

本研究初步探讨了mIL-24诱发银屑病样病症的表型和对伤口愈合的促进作用.首先,根据密码子的简并性优化了小鼠IL-24基因序列,构建了带Fc标签的真核表达质粒.经转染CHO细胞后筛选得到阳性克隆细胞,通过氨甲蝶呤(MTX)加压获得高表达mIL-24-Fc重组蛋白的克隆.为了适应后续实验的要求,我们通过无血清培养基驯化培养并大量生产mIL-24-Fc重组蛋白,应用protein A亲和层析柱得到mIL-24-Fc纯化样品.经过mAbscreen、AP binding法以及小鼠实验等证明了mIL-24-Fc重组蛋白的生物学活性,我们的结果为进一步对IL-24的研究提供了一定线索.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 质粒、细菌菌株、细胞株 pUC57-mIL-24质粒购于南京金斯瑞(GenScript)生物科技有限公司;Fc-Tag质粒、GH2感受态、中国仓鼠卵巢细胞CHO(dhfr)细胞株均来自于GenHunter公司.

2.1.2 主要试剂 rTaq DNA聚合酶、限制性内切酶、DNA连接酶购自Takara公司;质粒提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒均来源于Omega公司;MTX购自Sigma公司;IMDM培养基、SFM无血清培养基购于Hyclone公司;透析胎牛血清来自Bovogen公司;FuGENE6转染试剂购自Roche公司;其他试剂均为国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 构建表达载体 将基因合成后得到的pUC57-mIL-24质粒,经双酶切连接到Fc-Tag载体上,再将连接产物转入GH2感受态细胞,通过氨苄青霉素和四环素抗性筛选阳性克隆.通过Fc-Tag载体上特异性引物L-AP(5'-gaa ccc act gct tac tgg c-3')和R-Fc(5'-tca ggg tet tcg tgg ctc acg-3')PCR和测序对该重组质粒进行鉴定.

2.2.2 细胞稳定转染 将CHO细胞接种于含10%胎牛血清及1×HT的IMDM培养基中,依据FuGENE6转染试剂说明书将重组质粒mIL-24-Fc转染CHO细胞,以及不转质粒的负对照.72h后将培养基换为不含HT但含10%胎牛血清的IMDM选择培养基.每3d换一次液,利用MTX梯度加压以及有限稀释法获得高产的单克隆,并扩大培养.

2.2.3 mIL-24-Fc蛋白CHO细胞株无血清驯化

取500 nM MTX加压条件下筛选得到的mIL-24-Fc高表达单克隆细胞于P100细胞培养板中扩大培养,至贴壁生长密度达到90%左右,弃去细胞培养上清,加入1 mL有血清的IMDM(HT-)培养基和9 mL SFM培养基,于37℃静置培养24 h,保留1 mL细胞培养液于P100细胞培养板内,并重新加入9 mL SFM培养基;在剩余细胞培养液中吸取6 mL于50 mL的灭菌离心管中,P100细胞培养板中的细胞继续于37℃静置培养24 h后,重复以上操作三次,分别可得到第1~4d的悬浮细胞培养液样品;每日吸取至离心管内的悬浮细胞于37℃ 190 r/min条件下振荡培养,每24 h取样一次检测细胞生长情况,保持离心管内的细胞密度在0.25-2 million个/mL.待细胞的生长速度能够达到每24 h增长一倍时,即可扩大培养并保种.

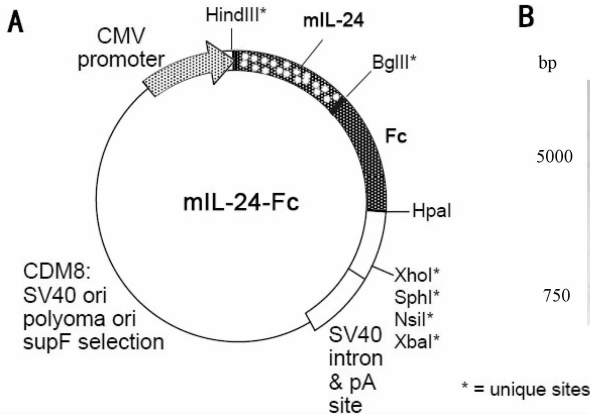
2.2.4 亲和层析法纯化mIL-24-Fc蛋白 收集阳性克隆的无血清培养基,5000r/min离心5min去除杂质,根据HiTrapTM MabSelectTM SuRe(1 mL)填料载量,用1 mL的protein A beads填料进行装柱后,将30 mL目的蛋白培养基用AKTA prime plus系统进行亲和层析纯化.

2.2.5 AP-binding染色实验 以Endo180-Fc(GenHunter)融合蛋白作为阳性对照,用配体-受体结合染色法检测mIL-24-Fc活性.分别取mIL-24-Fc和Endo180-Fc融合蛋白的纯化样品20 μg与5×蛋白上样缓冲液混合,沸水浴5 min,用10%的SDS-PAGE凝胶中电泳分离蛋白,然后进行转膜、封闭.分别以1 U/mL的AP、IL-20R2-AP和AP-collagen三种带有AP标签的融合蛋白于室温孵育90 min, PBST洗涤3次,每次5 min;最后,同时加入AP assay reagent S底物反应试剂进行显色.

2.2.6 mIL-24-Fc动物实验 选取6只8周龄以上体重约25 g的公鼠,3只作为PBS对照组,另外3只为实验组. mIL-24-Fc纯化蛋白浓度为2.5 mg/mL,注射剂量为100 μg/次,因此每次小鼠皮内注射40 μL的mIL-24-Fc或等量PBS,早晚各

一次,连续注射 6d 后,取注射部位皮肤,置于 10% 的甲醛溶液中固定 24 h,经石蜡包埋获得小鼠背部皮切片,通过 HE 染色后观察小鼠背部组织。

同样选取 6 只 8 周龄以上体重约 25 g 的公鼠,3 只作为 PBS 对照组,另外 3 只为实验组。将 6 只小鼠进行背部脱毛处理后用眼部手术剪挖出孔径相当的伤口 2 个/只。腹腔注射 mIL-24-Fc 100 μ g /只或等体积的 PBS 溶液,早晚各一次,每 3 天拍照,连续注射 9 天后,取注射部位皮肤,置于 10% 的甲醛溶液中固定 24 h,经石蜡包埋获得小



鼠背部皮切片,通过 HE 染色后观察小鼠背部组织。

3 结果

3.1 mIL-24-Fc 重组质粒的构建及鉴定

优化后的 mIL-24 基因约为 700 bp,将基因合成后得到的 pUC57-mIL-24 质粒,用 hind III 和 Bgl II 限制内切酶双酶切连接到 Fc-Tag 载体上(图 1A)。其测序结果与插入基因序列完全一致,同时用 Fc-Tag 载体上特异性引物 L-AP 和 R-Fc 进行质粒 PCR 鉴定(图 1B),得到相当大小的 PCR 产物。

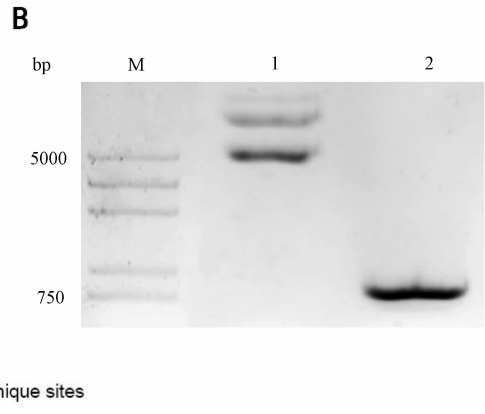


图 1 mIL-24-Fc 质粒的构建

(A)mIL-24-Fc 质粒结构示意图;(B)mIL-24-Fc 重组质粒 PCR 鉴定结果. 目的条带大小约为 700 bp.

Fig. 1 Construction of mIL-24-Fc Plasmid

(A) plasmid structure diagram of mIL-24-Fc. (B) PCR product of mIL-24-Fc. The purpose objective strap size is 700 bp.

3.2 mIL-24-Fc 蛋白纯化

mIL-24 蛋白的 C 端融合了 Fc-Tag,因此 mIL-24-Fc 蛋白样品可以通过 protein A 亲和层析柱进行亲和层析,再将纯化蛋白超滤至 PBS 缓冲液中保存,再用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离纯化前的样品、穿透液中的样品和纯化后的样品,考马斯亮蓝染色分析结果表明,原液中的杂蛋白经 protein A 亲和层析柱纯化后得到高纯度的洗脱回收液,同时穿透液中未见目的蛋白,说明目的蛋白均挂上了层析柱(图 2)。

3.3 AP binding 染色 mIL-24-Fc 蛋白

AP binding 染色是利用受体-配体的特异性结合原理,Fc-Tag 的配体与带有 AP-Tag 的受体结合后,可用 AP 的底物 reagent S 显色. mIL-24-Fc 的特异性受体为 IL-20R2-AP,用 Endo180-Fc 作为负对照,它的特异性受体为 AP-collagen. 当用 AP 同时孵育 mIL-24-Fc 和 Endo180-Fc 时,显色 10min 均无颜色;用 AP-collagen 同时孵育 mIL-24-Fc 和 Endo180-Fc 时,显色 10min, mIL-24-Fc 无色,而 Endo180-Fc 显色. 用 IL-20R2-AP 同时孵

育 mIL-24-Fc 和 Endo180-Fc 时,显色 10min, mIL-24-Fc 显色,而 Endo180-Fc 无色(图 3)。

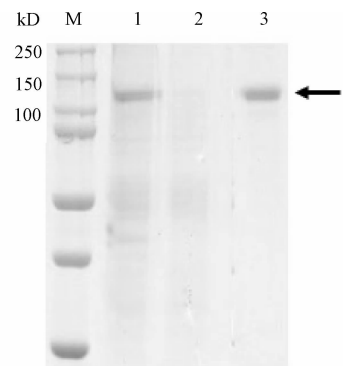


图 2 mIL-24-Fc 蛋白纯化

第一泳道为原液样品,第二泳道为穿透液样品,第三泳道为纯化样品. 目的蛋白大小为 130kD 左右.

Fig. 2 Purification of Protein mIL-24-Fc
Lane 1: cleared soluble protein fluid. Lane 2: flow-through fraction from Protein A column. Lane 3: Elution profile of mIL-24-Fc. mIL-24-Fc: 130kD.

3.4 mIL-24-Fc 蛋白促进小鼠表皮增生

小鼠皮内注射 mIL-24-Fc 或 PBS,早晚各一次,共计六天. 至实验结束时,可见 mIL-24-Fc 注射

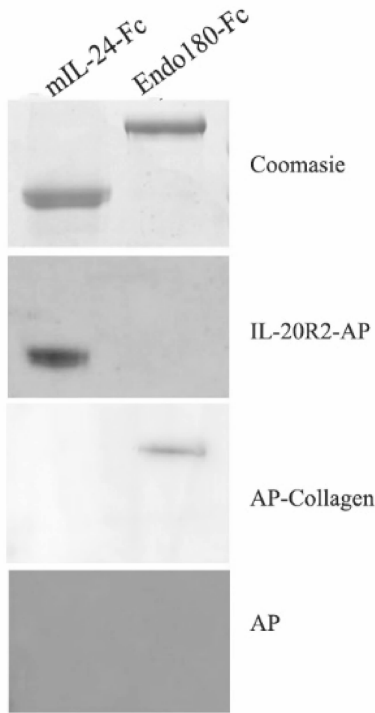


图 3 mIL-24-Fc 纯化样品生物活性检测
用 AP-collagen 和 IL-20R2-AP 分别识别 Endo180-Fc 和 mIL-24-Fc 蛋白, 使目标蛋白生成可见的蓝紫色。

Fig. 3 Bioassay of Protein mIL-24-Fc
AP-collagen and ILR2-AP can respectively identify Endo180-Fc and mIL-24-Fc protein. The AP binding make the target protein to generate visible violet.

部位皮肤红肿, 经 HE 染色实验观察, 两组小鼠的表皮组织厚度都不是均匀地, 其角化细胞均有单层或多层分布, 它们最薄的表皮部位均为 1~2 层角化细胞, 我们在这里分别选取 PBS 和 mIL-24-Fc 实验组中最厚的表皮部位进行比较, 如图 4 所示, PBS 对照组表皮组织中最厚的部位具有 2~3 层角化细胞, 而 mIL-24-Fc 实验组表皮组织中最厚的部位具有 5~6 层角化细胞, 且增厚的表皮范围较广, 表明在小鼠皮内注射 mIL-24-Fc 融合蛋白可以诱导小鼠的角化细胞增生。

3.5 mIL-24-Fc 蛋白促进小鼠伤口愈合

小鼠腹腔注射 100 μg /只 mIL-24-Fc 或等量 PBS, 从 Day 0 开始拍照观察直至 day 9. 图 5 表明, Day 3 开始, PBS 组和实验组伤口均缩合, PBS 组伴有出血但实验组已止血. Day 5 开始 PBS 结痂, 而实验组痂已退去表皮恢复平整. Day 9 开始实验组伤口已变小, 而实验组还是痂期。

4 讨 论

银屑病的主要病理改变是表皮增生, 角质化和真皮炎细胞浸润. 白介素 10 家族在银屑病中的地位暗示了白介素 24 研究的可观性. mIL-24 在原核表达系统中表达为包涵体, 变性复性困难, 本实验

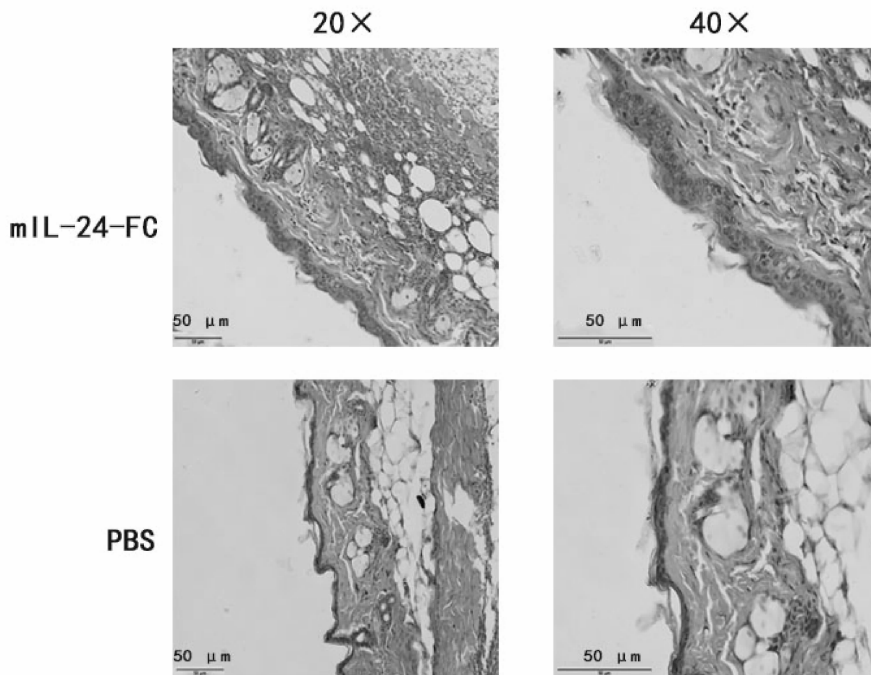


图 4 mIL-24-Fc 实验小鼠背皮 HE 染色. 分别于 20 \times 和 40 \times 物镜下观察结果
Fig. 4 HE Staining of Mouse Skin. Viewed under 20 \times and 40 \times lens

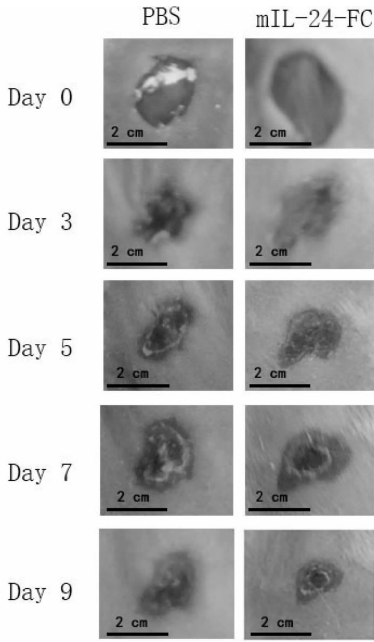


图 5 注射 mIL-24-Fc 伤口的愈合情况

Fig. 5 mIL-24-Fc treatment promoted faster wound healing in vivo

Representative photos are shown

优化了 CHO 细胞真核表达系统^[8], 通过无血清培养技术对蛋白进行修饰表达, 并可通过 MTX 加压筛选高表达细胞, 对后期纯化非常有益, 简便快捷. 王等^[9]提出的模型中采用 200 μg /次剂量, 而我们的 mIL-24-Fc 半衰期短, 约为 2.6 h, 因此必须多次少量注射. 同样, 我们的小鼠模型能诱发相应的银屑病病状, 表皮红肿增生, 同时还具有一定促愈合作用支持了 IL-23 调控的银屑病症状^[10], 也可作为人银屑病研究的样本^[11]. Andoh 等^[12]发现, 在炎性肠病患者炎性黏液中 IL-24 mRNA 表达升高. 在炎性肠病的机制研究中发现, IL-24 可以激活 JAK1/STAT-3/SOCS3 这个级联反应, 这说明 IL-24 在炎性肠病的生物学功能同相关细胞因子信号传导途径有关. 这认证了 IL-24 在组织中的修复作用.

一些研究者认为, IL-24 与抑癌有一定关联^[13]. 他们认为 IL-24 在不影响正常细胞的情况下, 有一定广谱抗肿瘤的活性, 对多种来源的肿瘤细胞均有一定抗性^[14]. 这也将成为我们后期讨论的目标.

参考文献:

[1] Jiang H, Lin J J, Su Z Z, *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [J]. *Oncogene*, 1995, 11(12): 2477.
 [2] Wang M, Liang P. Interleukin-24 and its receptors

[J]. *Immunology*, 2005, 114: 166.
 [3] Wang M, Tan Z, Zhang R, *et al.* Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7341.
 [4] Liu Y, Krueger J G, Bowcock A M. Psoriasis: genetic associations and immune system changes [J]. *Genes Immun*, 2007, 8(8): 1.
 [5] He M, Liang P. IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1793.
 [6] Soo C, Shaw WW, Freymiller E, *et al.* Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7 [J]. *J Cell Biochem*, 1999, 74(1): 1.
 [7] Kreis S, Philippidou D, Margue C, *et al.* IL-24: a classic cytokine and/or a potential cure for cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A): 2505.
 [8] 马登俊, 陈金武, 吴传芳. 人凝血因子 VII 在 CHO/G44 细胞中的表达 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 52(3): 673.
 [9] 王琼玉, 张爱军, 马慧群, 等. 腺病毒介导的 PML 基因对银屑病样小鼠模型的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(3): 432.
 [10] Romer J, Hasselager E, Norby PL, *et al.* Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 121: 1306.
 [11] Chan J R, Blumenschein W, Murphy E, *et al.* IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis [J]. *J Exp Med*, 2006, 203: 2577.
 [12] Andoh A, Shioya M, Nishida A, *et al.* Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease [J]. *J Immunol*, 2009, 183(1): 687.
 [13] Huang E Y, Madireddi M T, Gopalkrishnan R V, *et al.* Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties [J]. *Oncogene*, 2001, 20(48): 7051.
 [14] Caudell E G, Mumm J B, Poindexter N, *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol*, 2002, 168(12): 6041.