

角质细胞生长因子-2 与核糖体蛋白 L22 相互作用的发现及在哺乳动物细胞中的验证*

白秉学 徐东刚** 王金凤 彭善云 邹民吉 范明**

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 通过聚合酶链式反应从人胎肝 cDNA 文库中钓取 KGF-2 cDNA, 构建诱饵蛋白载体 pAS2-1-KGF-2 并对其自身转录激活活性进行鉴定, 利用酵母双杂交系统筛选人胎肝 cDNA 文库, 挑选双阳性克隆. DNA 序列分析和同源检索显示, 所获候选蛋白为人核糖体蛋白 L22 (RPL22). 将 KGF-2 和候选蛋白分别克隆至哺乳动物细胞双杂交的 BD、AD 质粒中, 共同转染 COS-7 细胞, 通过 CAT 分析验证了 KGF-2 和候选蛋白之间的相互作用. 为阐明 KGF-2 作用的分子机制提供有益线索.

关键词 角质细胞生长因子-2, 相互作用蛋白, 酵母双杂交, 哺乳动物细胞双杂交, 核糖体蛋白 L22

学科分类号 Q71

角质细胞生长因子-2 (keratinocyte growth factor-2, KGF-2) 也叫成纤维细胞生长因子-10 (fibroblast growth factors-10, FGF-10), 是成纤维细胞生长因子家族的一员. 人 KGF-2 为由 208 个氨基酸残基组成的碱性单链蛋白, 分子质量约为 24 ku, 其 N 端有约 40 个氨基酸残基的信号肽序列^[1]. KGF-2 最显著的功能是能特异性地促进上皮细胞的增殖、分化和迁移, 对脊椎动物多种组织和器官的发生、发育也起着重要的调控作用^[2]. 目前对临床上多种疾病 (如溃疡愈合等) 的治疗有很好的应用前景. KGF-2 有两种细胞膜表面受体: 低亲和力受体 FGFR1 IIIb 和高亲和力受体 FGFR2 IIIb, 后者仅在上皮细胞中表达, KGF-2 特异的促上皮细胞增殖作用主要是通过 FGFR2 IIIb 来介导的. KGF-2 与受体结合后, 促使受体胞内的 C 端酪氨酸残基磷酸化, 磷酸化的受体具有酪氨酸蛋白激酶活性, 并与一系列靶蛋白发生作用, 引发信号级联反应, 从而发挥其生物学功能^[3,4]. Bagai 等^[5]用亚细胞结构分级和蛋白质印迹证实 KGF-2 还存在核转位现象, 但目前其核转位的途径和在细胞内的作用方式还不清楚. 我们利用酵母双杂交系统从人胎肝 cDNA 文库中筛选 KGF-2 的相互作用蛋白, 并在哺乳动物细胞中验证它们的相互作用, 为阐明 KGF-2 作用的分子机制提供有益的线索.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酵母菌株 Y190 购自美国 Clontech 公司; *E. coli*

DH5 α Genotype: supE44, tacU169 (lacZM15), hsdR17, recA1, endA1, gyr96, thi-1, rel, 为本室保存; COS-7 细胞为本室保存; T 载体为美国 Promega 公司产品; pAS2-1、pACT-2、pCL1、pVA3-1、pTD1-1、pLAM5'-1、pM、pVP16、pG5CAT 为美国 Clontech 公司产品.

1.2 酶、生化试剂及培养基

*Bam*H I、*Eco*R I、*Nde* I、*Bgl* II、*Pfx* DNA 多聚酶、T4DNA 连接酶和质粒提取试剂盒均购自美国 Promega 公司; MATCHMAKER Two-Hybrid System 2、Human Fetal Hepatic MATCHMAKER cDNA Library 为美国 Clontech 公司产品; FAST CAT 2900 试剂盒为 Molecular Probes 公司产品; 3-AT、玻璃珠购自 Sigma 公司; YPD、SD 及各类缺陷培养基为 Clontech 公司产品; 1640 培养基、Lipofectamine 转染试剂和胰酶购自 GIBCO 公司.

1.3 引物设计

通过检索 GenBank, 根据已报道的 KGF-2 基因序列, 用 Primer5.0 软件设计针对成熟 KGF-2 cDNA 序列的特异性引物, 为方便克隆, 在上、下游引物序列的 5'端分别加入 *Nde* I 和 *Bam*H I 的切点, 具体为 F: 5' CACGCATATGGGTCAGGACAT-GGTGTC 3', R: 5' CGGGATCCTTATGAGTGTACC-

* 国家自然科学基金资助项目 (30271480).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931087, E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-05-18, 接受日期: 2004-06-08

ACCATGGAAGA 3'; AD 质粒测序引物为 F: 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC 3', R: 5' GTGAACTTGGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT 3', 由上海博亚生物技术公司合成。

1.4 KGF-2 cDNA 的克隆

从人胎肝 cDNA 文库中克隆 KGF-2 cDNA. 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min. 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶分离, 按试剂盒说明回收目的片段, 并将片段克隆至 T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆送上海博亚生物技术公司测序。

1.5 诱饵蛋白载体的构建及鉴定

用 *Nde* I 和 *Bam* H I 双切 pT-KGF-2 和 pAS2-1, 分别回收酶切后的 KGF-2 片段和 pAS2-1 载体, 经 T4 DNA 连接酶连接构建诱饵蛋白表达质粒 pAS2-1-KGF-2, 并转入 *E. coli* DH5 α , 提取质粒后利用双酶切和 PCR 进行筛选和鉴定。

1.6 KGF-2 自身转录激活活性的鉴定

将构建好的 pAS2-1-KGF-2 质粒转入感受态酵母 Y190 中, 观察酵母在缺陷培养基上的生长情况, 并通过 β -半乳糖苷酶分析, 来确定 KGF-2 是否具有转录激活活性。

1.7 双杂交系统对文库的筛选和鉴定

利用转入了 pAS2-1-KGF-2 质粒的 Y190 制备感受态酵母, 然后转化胎肝细胞 cDNA 文库质粒, 通过 SD/-Trp-Leu-His 营养缺陷培养基和 β -半乳糖苷酶分析, 对转化的酵母进行筛选。用玻璃珠法从酵母菌中提取质粒, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取 AD 质粒并进行 PCR 和 *Bgl* II 酶切鉴定。

1.8 双阳性克隆的序列分析和同源检索

双阳性克隆交由上海博亚生物技术公司进行核苷酸序列分析。测序结果通过 INTERNET 进行同源性对比分析, 以美国国立生物信息中心 (NCBI) 的 BLAST 作为检索工具, 对比数据库为 NCBI 的 NR 库, 检索工具采用 BLASTN。

1.9 哺乳动物细胞双杂交系统融合表达载体的构建和鉴定

根据 pM 载体多克隆位点设计 KGF-2 的引物, 分别在上下游引物的 5' 端引入 *Eco* R I 和 *Bam* H I 切点, 以 pT-KGF-2 质粒为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切后, 用 T4DNA 连接酶克隆至经同样双切后的 pM 载体上。转化 *E. coli* DH5 α , PCR 和酶切鉴定。根据 pVP16 载体多克隆位点设计候选蛋白的 PCR 引物, 分别在上

下游引物的 5' 端引入 *Eco* R I 和 *Bam* H I 切点, 以 AD 质粒为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切后, 用 T4DNA 连接酶克隆至经同样双切后的 pVP16 载体上。转化 *E. coli* DH5 α , PCR 和酶切鉴定。

1.10 细胞培养和质粒的共转染

在 25 cm² 培养瓶中培养 COS-7 细胞, 具体条件为: 含双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂。长到 80% ~ 90% 时, 利用 GIBCO 公司的 Lipofectamine 转染试剂将构建的两种质粒、对照组质粒和报道基因 pG5CAT 共转染到 COS-7 细胞。实验组: pM-KGF-2/pVP16-候选蛋白; 对照组: pM-KGF-2/pVP16, pM/pVP16-候选蛋白; 阴性对照: pM 53/pVP16-CP; 阳性对照: pM3-VP16, pM53/pVP16-T。实验方法参照产品说明书。

1.11 氯霉素乙酰转移酶分析

将贴壁细胞用胰酶消化, 用培养基吹打下来, 按 Molecular Probes 公司 FAST CAT 2900 试剂盒的说明书对其进行氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 分析, 分析所得样本上样于硅胶薄层层析板上进行薄层色谱分析。

2 结 果

2.1 KGF-2 cDNA 的获得及序列分析

以人胎肝 cDNA 文库为模板, 用上下游引物进行 PCR 扩增, 获得了 527 bp 的 cDNA 片段 (图 1), 将该片段克隆至 T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 用 PCR 和酶切筛选阳性克隆。经上海博亚生物技术公司进行测序, 结果与 GenBank 中报道的 KGF-2 序列完全一致 (图 2)。

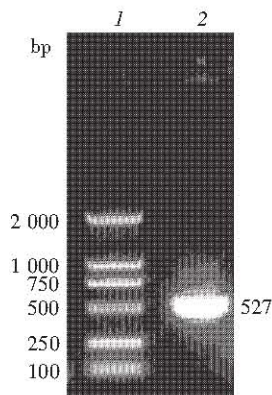


Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR products of KGF-2 cDNA

1: DL2000 DNA marker; 2: Fragments of KGF-2 cDNA.

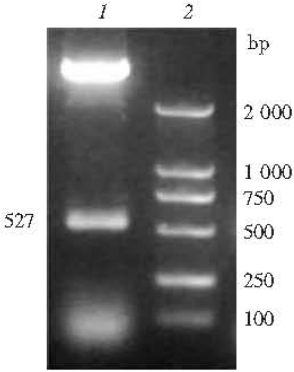


Fig. 2 Restriction analysis of pT-KGF-2
1: pT-KGF-2 digested with *Nde* I and *Bam*H I ;
2: DL2000 DNA marker.

2.2 诱饵蛋白载体构建、鉴定及转录激活活性分析
酶切后所获 KGF-2 片段与 pAS2-1 进行连接，连接产物转化 *E. coli* DH5 α ，对转化子提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定（图 3）。

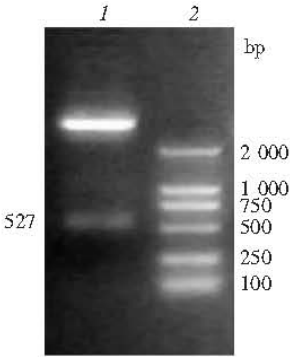


Fig. 3 Restriction analysis of pAS2-1-KGF-2
1: pAS2-1-KGF-2 digested with *Nde* I and *Bam*H I ;
2: DL2000 DNA marker.

将 pAS2-1-KGF-2 转入酵母宿主 Y190 中，同时作阳性（pCL1、pTD1-1/pVA3-1）和阴性对照（pTD1-1/pLAM5'-1）以确保双杂交系统的正确性（图 4）。结果表明，转化了 pAS2-1-KGF-2 的 Y190 在 SD/-Trp 上生长良好，但在 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His 平板上不能生长。从 SD/-Trp 上挑选生长良好的菌落作 β -半乳糖苷酶（ β -gal）分析，菌落在 8h 后不变蓝，表明单独的 KGF-2 没有转录激活活性，可用于下一步的文库筛选（图 5）。

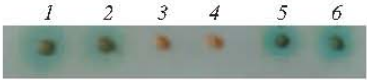


Fig. 4 β -gal assays of positive and negative control plasmids
1, 2: pCL1; 3, 4: pTD1-1/pLAM5'-1; 5, 6: pTD1-1/pVA3-1.

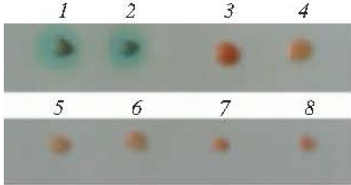


Fig. 5 Analysis of transcription activity of pAS2-1-KGF-2
1, 2: Positive control; 3, 4: Negative control; 5 ~ 8: pAS2-1-KGF-2.

2.3 cDNA 文库的筛选和双阳性克隆的获得及鉴定
大规模转化文库质粒，涂 SD/-Leu-Trp-His 平板，30 $^{\circ}$ C 倒置培养，约 4 ~ 7 天长出菌落，挑选生长良好的单菌落，进行 β -半乳糖苷酶分析，8 h 内变蓝者为阳性。对双阳性克隆进行酶切鉴定，结果显示，双阳性克隆两个 *Bgl* II 切点之间长约 550 bp。然后，将所筛选的双阳性克隆再次分别单独及与 pAS2-1-KGF-2 共转化酵母宿主 Y190， β -半乳糖苷酶活性分析结果显示，单独的候选蛋白 AD 质粒转化结果为阴性，表明单独的候选蛋白不具转录激活活性；而共转化组的鉴定结果为阳性，表明候选蛋白在酵母细胞中确实存在与 KGF-2 之间的相互作用（图 6）。

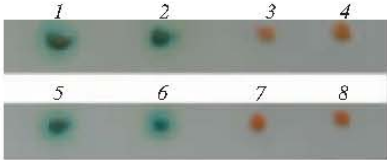


Fig. 6 β -gal assays of candidate AD plasmid
1, 2: Positive control; 3, 4: Negative control; 5, 6: Cotransformation with candidate AD plasmid/pAS2-1-KGF-2; 7, 8: Transformation with candidate AD plasmid.

2.4 阳性克隆的序列分析及同源检索
将所获得的阳性 AD 质粒进行 DNA 序列分析和同源检索，结果为：候选蛋白与人核糖体蛋白 L22（RPL22）之间的同源性高达 100%。目前

RPL22 的一级结构已经清楚, 它含有 3 个结构域 (N 结构域、I 结构域和 C 结构域) 和一个经典的核定位信号. RPL22 合成后能从细胞质转运至细胞核参与核糖体的组装^[6].

2.5 哺乳动物细胞双杂交系统融合表达载体的构建和鉴定

将扩增的 KGF-2 片段经双酶切后与 pM 连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒, *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 发现基因片段大小完全正确 (图 7). 将候选蛋白基因扩增后与 pVP16 连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒, *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 发现基因片段大小与预期相一致 (图 8).

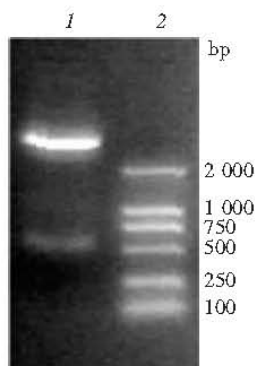


Fig. 7 Restriction analysis of pM-KGF-2

1: pM-KGF-2 digested with *EcoR* I and *Bam*H I ;
2: DL2000 DNA marker.

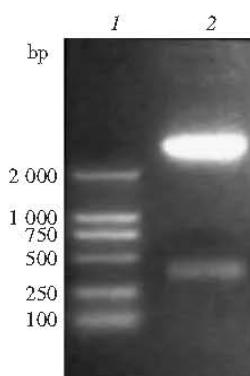


Fig. 8 Restriction analysis of pVP16-candidate gene

1: DL2000 DNA marker; 2: pVP16-candidate gene digested with *EcoR* I and *Bam*H I .

2.6 细胞共转染和 CAT 分析

用薄层色谱法对转染了 KGF-2 和候选蛋白的 COS-7 细胞进行 CAT 分析. CAT 分析的基本原理为: 如果诱饵蛋白与候选蛋白能发生相互作用, 则

可激活报告基因 CAT, 表达氯霉素乙酰转移酶. 在细胞抽提物中加入乙酰 CoA 和氯霉素, 在氯霉素乙酰转移酶的作用下, 产生乙酰氯霉素和二乙酰氯霉素. 采用薄层色谱即可检测到这两种产物 (图 9), 图 9-1 为标准参照物; 图 9-2 为阴性对照, pM 53 编码的 p53 蛋白和 pVP16-CP 编码的多形瘤病毒外壳蛋白之间无相互作用; 图 9-3, 9-4 为诱饵蛋白、候选蛋白单转化组, 它们在单独存在时都不具有转录激活活性, 不能激活报告基因; 图 9-6 为阳性对照, pM3-VP16 编码 GAL4DNA-BD 和 VP16 AD 的融合蛋白, 因而具有很强的转录激活活性, CAT 表达水平高; 图 9-7 为阳性对照, pM 53 编码的 p53 蛋白和 pVP16-T 编码的 SV₄₀ 大 T 抗原之间存在相互作用, 能激活 CAT 基因; 图 9-5 为实验组, 阳性结果显示, 候选蛋白不仅在酵母细胞而且在哺乳动物细胞中都能与 KGF-2 发生相互作用, 也进一步说明二者相互作用的真实可靠性, 表明我们极有可能发现了一个新的与 KGF-2 存在相互作用的蛋白质.

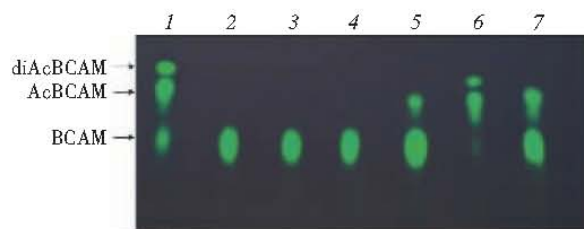


Fig. 9 CAT assay of cotransfection with pM-KGF-2 and pVP16-candidate gene

1: Reference standard; 2: Cotransfection with pM 53/pVP16-CP; 3: pM-KGF-2/pVP16; 4: pM/pVP16-candidate gene; 5: pM-KGF-2/pVP16-candidate gene; 6: pM3-VP16; 7: pM53/pVP16-T.

3 讨 论

KGF-2 具有显著的促进上皮细胞增殖、分化的生物活性. 目前有两种可能的机制来解释这一现象: 一是 KGF-2 作为第一信使, 使其细胞膜表面受体 FGFR2 IIIb 磷酸化而引发的经典途径; 二是 KGF-2 进入细胞核, 通过核转位来实现其生理功能^[5]. 目前对 KGF-2 是如何进入细胞乃至细胞核知之甚少. 利用酵母双杂交系统来研究 KGF-2 的相关或相互作用蛋白将有助于阐明其作用的分子机制. 通过对人胎肝 cDNA 文库进行筛选, 我们得到了与 KGF-2 有相互作用的候选蛋白. 通过 DNA 序

列分析和同源检索确定候选蛋白为人核糖体蛋白 L22 (RPL22), 它是真核细胞 60 S 核糖体亚基的组成成分, 由 128 个氨基酸残基组成, 分子质量为 14.7 ku^[7], 其生理功能目前还不十分清楚. 通过对不同物种的 RPL22 一级结构进行对比后, 发现该蛋白质在生物进化过程中高度保守. RPL22 含有三个结构域, 分别是位于 N 端第 1~9 位的 N 结构域, 位于内部第 80~93 位含两个 KKYLK 重复序列的 I 结构域, 和位于 C 端第 120~128 位由 9 个酸性氨基酸组成的 C 结构域. 核糖体蛋白是在细胞质中合成的, 必须转运到细胞核内才能参与核糖体的组装, 目前已经清楚 RPL22 的这一过程是由其自身序列所调控的. a. RPL22 从胞质向胞核运输依赖于自身内部的一个经典的核转位序列 (nuclear localization sequence, NLS), 该序列由位于第 13~16 位的 4 个赖氨酸残基组成; b. RPL22 进入核仁则依赖于 I 结构域; c. RPL22 能否与 28 S rRNA 结合组装成核糖体有赖于 N 结构域的存在^[6].

我们利用哺乳动物细胞双杂交系统对候选蛋白和 KGF-2 之间的相互作用进行了验证. 结果显示, 候选蛋白和 KGF-2 不仅在酵母体内存在相互作用, 在哺乳动物细胞中同样存在相互作用, 进一步说明了 RPL22 和 KGF-2 之间存在相互作用的可靠性. 通过对 KGF-2 的一级结构进行分析后并未发现核转位序列, 因此和 RPL22 结合可能是其进入细胞核的方式之一. RPL22 在细胞中参与核糖体的组

装、运输, 蛋白质翻译等生理过程^[8], 因此推测, KGF-2 可能通过与 RPL22 的相互作用间接地影响这些过程. 相互作用蛋白的发现, 对进一步了解 KGF-2 的生物学功能有重要意义. 但它们在人体内的作用、它们之间相互作用的结构基础以及这些相互作用的生物学意义都需要进一步研究和证实.

参 考 文 献

- 1 Emoto H, Tagashira S, Mattei M G, *et al.* Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem*, 1997, **272** (37): 23191~23194
- 2 Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, *et al.* FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 III b in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **277** (3): 643~649
- 3 Miki T, Fleming T P, Bottaro D P, *et al.* Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science*, 1991, **251** (4989): 72~75
- 4 Pirvola U, Bradley S D, Liang X Q, *et al.* FGF/FGFR-2 (III b) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J Neurosci*, 2000, **20** (16): 6125~6134
- 5 Bagai S, Rubio E, Cheng J F, *et al.* Fibroblast growth factor-10 is a mitogen for urothelial cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (26): 23828~23837
- 6 Chang S N, Lin C H, Lin A, *et al.* An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar licalization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22. *FEBS Lett*, 2000, **484** (1): 22~28
- 7 Chan Y L, Wool I G. The primary structure of rat ribosomal protein L22. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1260** (1): 113~115
- 8 Zhao W F, Bidwai A P, Glover C. Interaction of casein kinase II with ribosomal protein L22 of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **298** (1): 60~66

Interaction Between Human Ribosomal Protein L22 and Keratinocyte Growth Factor-2 and Its Identification in Mammalian Cell Line *

BAI Bing-Xue, XU Dong-Gang**, WANG Jin-Feng, PENG Shan-Yun, ZOU Min-Ji, FAN Ming**

(Institute of Basic Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract The cDNA encoding keratinocyte growth factor-2 was isolated from human fetal liver cDNA library and subsequently cloned into the bait protein plasmid pAS2-1. The positive clone was obtained from human fetal liver cDNA library screened by yeast two-hybrid system. After sequence analysis and homology comparison, the candidate protein was identified as human ribosomal protein L22. KGF-2 and the candidate proteins were separately cloned into BD and AD plasmid of mammalian two-hybrid assay and cotransfected into COS-7 cell line. The interaction between KGF-2 and the candidate protein was identified by CAT assay.

Key words keratinocyte growth factor (KGF-2), interacting protein, yeast two-hybrid, mammalian two-hybrid, ribosomal protein L22 (RPL22)

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30271480).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931087, E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

Received: May 18, 2004 Accepted: June 8, 2004