

# 小鼠干扰素- $\gamma$ 诱生单核因子在昆虫细胞中的高效表达及其血管生成抑制作用\*

张德新<sup>1)\*\*</sup> 吴 静<sup>1)</sup> 杨静华<sup>2)</sup> REUVEN RABINOVICI<sup>2)</sup> 樊代明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 第四军医大学全军消化疾病研究所, 西安 710032;

<sup>2)</sup> Departments of Surgery, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA)

**摘要** 干扰素- $\gamma$  诱生单核因子(monokine induced by interferon- $\gamma$ , MIG, CXCL9)是一种具有趋化 T 淋巴细胞 NK 细胞的 CXC 趋化因子家族成员之一. 通过 RT-PCR 技术从小鼠脑组织中克隆了小鼠 MIG cDNA, 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统构建了 MIG 重组杆状病毒, 并在 Tn-5B1-4 昆虫细胞内将其进行了表达, 最后对表达产物进行了纯化和活性鉴定. 结果显示: 小鼠 MIG 蛋白在 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统中可得到高效分泌性表达; 分泌到培养上清中的重组 MIG 蛋白经 S-Sepharose 纯化后得到的 MIG 蛋白纯度约为 90%, 产量为 10 mg/L; 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析中该蛋白质分子质量显示为 14.4 ku 左右; 该纯化蛋白在体外具有诱导 CTLL-2 淋巴细胞钙离子内流和抑制血管内皮细胞迁移和增值的活性, 在鸡胚尿囊膜实验中小鼠重组 MIG 具有抑制新血管生成的功能. 实验表明, 在杆状病毒系统中高效表达的小鼠重组 MIG 蛋白具有抑制内皮细胞迁移、增殖和血管生成活性, 为今后进一步研究其血管生成抑制活性的机理和将其应用于肿瘤血管抑制实验建立了基础.

**关键词** CXC 趋化因子, 干扰素- $\gamma$  诱生单核因子, 杆状病毒, 重组蛋白, 血管生成

**学科分类号** Q718

新血管生成是哺乳动物体内许多重要的生理和病理过程的一个重要组成部分. 研究血管生成的机理并通过抑制血管生成来治疗血管生成相关性疾病, 如肿瘤、视网膜血管增生等, 已成为当今生物治疗中的一个热点. 趋化因子是一类具有趋化粒细胞、淋巴细胞和单核巨噬细胞的碱性小分子蛋白. 近年来的研究发现, 人 CXC 趋化因子家族中的一些成员具有血管生成刺激或抑制活性<sup>[1]</sup>. 其中干扰素- $\gamma$  诱生单核因子 (monokine induced by IFN- $\gamma$ , MIG, CXCL9) 为一种主要由单核巨噬细胞所分泌、具有趋化 T 淋巴细胞和 NK 细胞功能的 CXC 趋化因子<sup>[2,3]</sup>. 近来的研究发现, 人 MIG 在体外具有抑制血管内皮细胞迁移、抑制由碱性成纤维因子诱发的兔角膜血管生成的活性<sup>[3,4]</sup>. 有学者试图用原核表达系统对人 MIG 进行表达, 但由于产量较少、活性低, 不能用于实验性治疗. 小鼠 MIG 基因虽已经被克隆, 但有关其活性特别是血管生成抑制活性的研究极少. 为进一步研究 MIG 的血管抑制活性并探讨将其运用于血管抑制疗法中的可行性, 有必要获得大量具有生物活性的 MIG 纯化蛋白. 本研究采用了杆状病毒表达系统在粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) BTI-TN-5B1-4 昆虫细胞中高效表达了分泌性 MIG 蛋白并进行了纯化, 并对其进

行了内皮细胞迁移、增殖等抑制活性和血管生成抑制活性进行了测定.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、细胞株、质粒.** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 DH10BAC 购自美国 Life Technologies 公司; 小鼠 T 淋巴细胞系 CTLL2 和小鼠微血管内皮细胞系 bEnd.3 从美国 ATCC 获得; *sf-9* 和 High-Five™ 昆虫细胞系购自美国 Invitrogen 公司; Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统为 Life Technologies 产品.

**1.1.2 试剂.** 引物、TRIZOL 试剂、SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase、胎牛血清、Cellfectin、Sf-900 II SFM 和 High Five™ 无血清培养液均为美国 Life Technologies 公司产品; Goat anti-mouse MIG polyclonal antibody (1:500)、Rabbit anti-goat-HRP 购自美国 Santa Cruz

\*国家自然科学基金资助项目(39800156, 30371337).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 029-68855516, Fax: 029-82539041

E-mail: dx66@163.com

收稿日期: 2005-04-22, 接受日期: 2005-05-30

Biotechnologies; Vent DNA Polymerase 购自美国 Promega 公司; Poly(A) Pure™ mRNA Purification Kit 购自美国 Ambion 公司; Sequi-Blot™ PVDF 购自美国 Bio-Rad; ECL 化学发光试剂盒、S-Sepharose 购自美国 Amersham Pharmacia; Calcium Green-1/AM 购自美国 Molecular Probe; 24 孔 Transwell 细胞培养板购自美国 Corning-Costar 公司, 限制性内切酶、连接酶购自美国 New England Biolabs. QIAquick Gel Extraction Kit 和质粒提纯试剂盒为美国 Qiagen 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR.** 根据 GenBank 中的小鼠 MIG 全长 cDNA 序列, 设计其 PCR 扩增引物. 其上游引物为 GGATGGATCCCACTCCAACAACGTGACTCAATAG, 下游引物为 GGATGAATTCGTCTCTTATGTAGTCTTCCGAAC, 在上、下游引物的 5' 端分别引入了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. 取刚刚处死的小鼠脑组织 2 g, Trizol 试剂按说明书进行总 RNA 提取. 随后用 Poly(A) Pure™ mRNA Purification Kit 从总 RNA 中提纯 mRNA. 取 0.5 µg 小鼠脑组织 mRNA, 用 SuperScript II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase 根据使用说明书进行 cDNA 第一链合成. 取 1 µl cDNA 为模板、前述人工合成寡核苷酸为引物, 采用 Vent DNA Polymerase 进行高保真 PCR 扩增. 扩增条件为 94℃ 变性 3 min; 循环参数: 94℃ 30 s, 62℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延长 10 min. 取 5 µl PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 鉴定 PCR 产物的大小.

**1.2.2 重组质粒的克隆和鉴定.** 从凝胶中回收 MIG PCR 产物并进行纯化. 将纯化 MIG PCR 产物和穿梭质粒 pFASTBAC 1 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶进行酶切, 再用 T4 连接酶进行连接并转化感受态大肠杆菌 DH5α, 构建重组质粒 pFAST-MIG. 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶进行酶切鉴定, 并用 ABI377 测序仪测序验证序列的正确性.

**1.2.3 重组质粒的转座和重组 Bacmid 的提纯.** 将 5 µl 1mg/L pFAST-MIG 以热休克法转化 100 µl DH10BAC 感受态细菌, 在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 X-GAL 的 LB 平皿上进行筛选; 48 h 后当大部分菌落长到直径约 1~2 mm 时, 将平皿转入 4℃ 冰箱内继续放置 24 h. 挑取白色菌落, 接种于含有卡那霉素、庆大霉素、四环素的 LB 培养基中进行扩增培养. 按产品说明书中推荐的

方法提纯重组 Bacmid, 然后在 0.5% 琼脂糖凝胶中电泳 12 h 鉴定重组 Bacmid 的大小.

**1.2.4 *sf*-9 细胞的转染及重组病毒收集.** 在 6 孔培养板中加入对数生长期的 *sf*-9 细胞, 然后将重组 Bacmid 用 Cellfectin 按 Bac-To-Bac 说明书转化 *sf*-9 细胞, 48 h 后收集感染上清. 取 20 µl 初次感染上清接种于长有 8×10<sup>6</sup> 个 *sf*-9 细胞的 T-75 培养瓶中, 28℃ 培养 72 h 进行病毒扩增, 取少量上清按说明书推荐的方法进行病毒滴度测定.

**1.2.5 重组蛋白的表达及纯化.** 在 1L 塑料培养瓶中, 以悬浮方式培养 200 ml 对数期 High Five™ (2×10<sup>6</sup>/ml) 继而接种已测定滴度的重组杆状病毒, 使感染时的 *MOI* 值为 5~10. 28℃ 下以 130 r/min 培养 48 h. 吸取培养液, 冰上冷却 10 min, 4℃ 下以 1 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清, 用等量的 PBS 稀释后上 S-Sepharose 阴离子交换层析柱, 经 PBS 流洗后, 分别用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱. 在 4℃ 下将洗脱液用 PBS 进行充分透析, 分装并置于 -70℃ 冻存备用.

**1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析.** 取少量 MIG 洗脱液, 分别用 2× 上样缓冲液进行等量稀释, 然后在 15% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电泳结束后用考马斯亮蓝进行染色. 用上述方法首先进行 SDS-PAGE, 然后将凝胶中的蛋白质转印到孔径为 0.2 µm 的 Sequi-Blot™ PVDF 膜上 (Bio-Rad 公司), 一抗为 Goat anti-mouse MIG polyclonal antibody (1: 500), 二抗为 Rabbit anti-goat-HRP (1: 5 000), 采用 ECL 发光试剂盒检测信号强度.

**1.2.7 重组蛋白纯度测定.** 将上述重组 MIG 蛋白洗脱液的 SDS-PAGE 凝胶用激光密度扫描仪进行密度扫描, 可以得到 MIG 蛋白在 S-Sepharose 离子交换树脂纯化后在不同的洗脱组中所占的百分比, 进而计算出重组 MIG 蛋白的纯度.

**1.2.8 钙离子细胞内流实验.** 在 37℃ 含有 5% 二氧化碳的孵箱中将 CTLL2 培养于含有 10% 胎牛血清、50 U/ml 青霉素、50 mg/L 链霉素、0.05 mmol/L 二巯基丙醇、10 U/ml RPMI1640 和 10 U/ml IL-2 的 RPMI 1640 培养基中. 将 8×10<sup>6</sup> 细胞悬浮于 2 ml 含有 5 µmol/L Calcium Green-1/AM 的上样缓冲液 (136 mmol/L NaCl, 48 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 g/L 葡萄糖和 20 mmol/L HEPES) 中, 在孵箱中培养 20 min, 在不含 Calcium Green-1/AM 的上样缓冲液中洗涤细胞 2 次, 然后重悬于该上样缓

冲液中并调整细胞浓度为  $4 \times 10^6/\text{ml}$ . 向 Petri dish 中加入 0.5 ml 细胞悬液, 在室温下放置 5 min, 然后在荧光显微镜下进行观察. 在计算机显示的视野中选择 10 ~ 20 个贴壁不动的细胞, 加入 10  $\mu\text{l}$  MIG 蛋白溶液(1 g/L), 每间隔 5 s 进行一次拍照, 入射光为 490 nm, 在 520 nm 处纪录细胞内荧光强度的变化. 用 Axon Workbench 2.1 荧光图像软件进行数据分析.

**1.2.9 内皮细胞趋化抑制实验.** 将小鼠 bEnd.3 血管内皮细胞在 1% 明胶处理过的培养瓶中进行培养. 主培养基为 Ham's F12K, 内含 2 mmol/L L- 谷氨酸盐, 1.5 g/L 碳酸钠, 0.1 g/L 肝素和 0.04 g/L 内皮细胞生长刺激物(EGCS), 10% 胎牛血清. 首先在 37°C 下用 10 g/L 人 Fibronectin 包被 24 孔 Transwell (Corning Costar Corp) 的培养内套膜表面培养 1 h (该膜用聚碳酸酯制成, 上有众多的直径为 8  $\mu\text{m}$  的微孔), 在培养皿下层培养孔中加入 0.5 ml 含有 0.5% FBS 的 Ham's F12K 培养基, 在其中加入重组人 FGF, 使终浓度为 10  $\mu\text{g/L}$ . 在试验组加入重组 MIG 蛋白, 在对照组加入相同体积的 PBS; 用相同的培养基重悬 bEnd.3 血管内皮细胞, 使终浓度为  $5 \times 10^5/\text{ml}$ ; 将 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液加入内套筒中, 放入 37°C 孵箱中培养 4 h, 取出内套筒, 吸走培养液, 用棉花擦去内套筒底膜上表面的细胞, 将套筒底膜下表面用甲醇固定, 用吉姆萨染色后, 在显微镜下 (100 倍) 计数每个膜在 6 个高倍镜视野内染色的细胞核数量, 计算迁移细胞的平均数, 并与对照进行比较, 结果用 Student's *t*- 试验进行统计学处理<sup>[5]</sup>.

**1.2.10 小鼠内皮细胞增殖抑制实验.** 用上述小鼠微血管内皮细胞系 bEnd.3 进行内皮细胞增殖抑制实验, 在 6 孔培养板中加入 1 ml 含  $2 \times 10^5$  个 bEnd.3 细胞的 DMEM, 内含 4 mmol/L L- 谷氨酸盐、1.5 g/L 碳酸钠、4.5 g/L 葡萄糖和 10% 胎牛血清, 再加入重组人 FGF, 使终浓度为 2  $\mu\text{g/L}$ . 在不同试验组中加入 rmMIG, 在 37°C 下培养 24 h 后加入 200  $\mu\text{l}$  MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) 溶液, 孵育 4 h 后, 吸出上层培养液, 再加入 1.5 ml DMSO, 在 490 nm 处读取溶液的 A 值, 最后计算内皮细胞的增殖率<sup>[6]</sup>. 每个样品共设 3 个重复孔, 实验共重复 3 次.

**1.2.11 鸡胚尿囊膜分析.** 选取已孵化 7 天的莱杭鸡卵 20 枚, 在每枚鸡蛋的气室处打一个直径约为 1.5 cm 的孔, 显露尿囊膜及其中走行的血管, 在已

高压消毒的 Whatman 滤纸片上, 点上含 20  $\mu\text{g}$  MIG 重组蛋白的 PBS 或等体积的 PBS, 分别放于 10 只鸡卵的鸡胚尿囊膜的表面, 封闭鸡卵表面的孔后, 在 37°C 湿润的环境中, 孵育 48 h 后, 计数纸片下的新生血管数量, 并用 Student's *t*- 试验进行统计学检验.

## 2 结 果

### 2.1 小鼠 MIG cDNA 的克隆及鉴定

经过反转录和特异引物 PCR 放大, 成功地扩增出一条大小为 450 bp 的条带. 将 MIG PCR 产物纯化、酶切后定向克隆于 pFASTBAC-1 载体中后, 经过测序, 显示所得到的小鼠 MIG 的 cDNA 序列与 GenBank 中所登录的序列一致. pFASTBAC-MIG 重组质粒示意图见图 1, MIG 的测序结果见图 2.

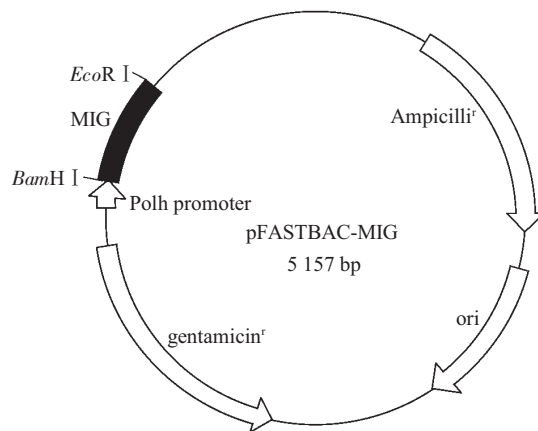


Fig.1 Schematic representation of recombinant plasmid pFASTBAC-MIG

### 2.2 重组 Bacmid 的鉴定

将 pFASTBAC-MIG 转导大肠杆菌 DH10BAC 后, 经过蓝白筛选挑选白色菌落. 经过扩增后用改进的质粒提纯法进行 Bacmid 提取, 在 0.5% 的琼脂糖中进行电泳, 结果显示, 在 23 kb 后存在一条电泳条带, 大小符合重组 Bacmid 的大小.

### 2.3 小鼠 MIG 重组蛋白的表达、纯化和检测

将小鼠重组 MIG 的 Bacmid 转染 *sf*-9 昆虫细胞 72 h 后, 吸取部分转染上清, 加入悬浮生长的 HIGH-FIVE™ 细胞培养液中, 48 h 后收集培养液上清, 经过 S-Sepharose 层析柱吸附后, 用含有 0.2~1.5 mol/L NaCl 的 PBS 进行梯度洗脱, 洗脱液经 PBS 透析后进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹 (Western-blot) 分析. 在 0.6~1.0 mol/L NaCl 洗脱液中

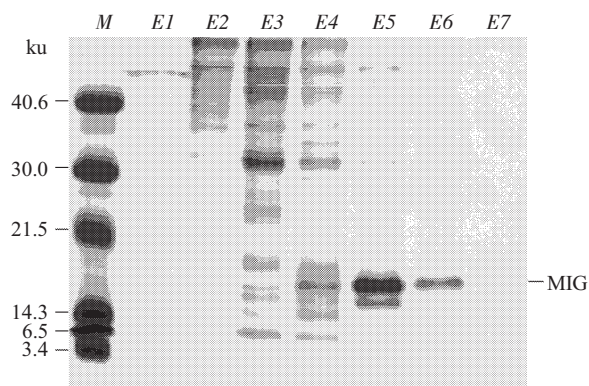
```

1      ATGAAGTCCGCTGTTCTTTTCCTTTTGGGCATCATCTTCTGGAGCAGTGTGGAGTTCGA
1      M K S A V L F L L G I I F L E Q C G V R
61     GGAACCTAGTGATAAGGAATGCACGATGCTCTGCATCAGCACCAGCCGAGGCACGATC
21     G T L V I R N A R C S C I S T S R G T I
121    CACTACAAATCCCTCAAAGACCTCAAACAGTTTGCCCAAGCCCAATTGCAACAAAAC
41     H Y K S L K D L K Q F A P S P N C N K T
181    GAAATCATTGCTACACTGAAGAACGGAGATCAAACCTGCCTAGATCCGGACTCGGCAAT
61     E I I A T L K N G D Q T C L D P D S A N
241    GTGAAGAAGCTGATGAAAGAATGGGAAAAGAAGATCAACCAAAAGAAAAGCAAAAGAGG
81     V K K L M K E W E K K I N Q K K K Q K R
301    GGGAAAAACATCAAAGAACATGAAAAACAGAAAACCCAAACACCCCAAGTCGTCGT
101    G K K H Q K N M K N R K P K T P Q S R R
361    CGTTCAAGGAAGACTACATAA
120    R S R K T T *
    
```

**Fig.2 Sequencing result from pFASTBAC-MIG and the predicted amino acid sequence for mouse MIG**

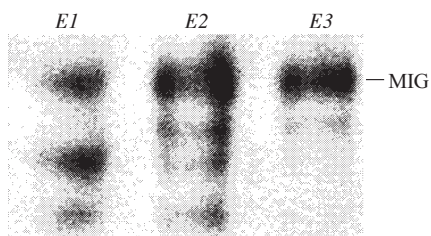
Underlined region represents secretion signal.

可见数条大小约为 14.4 ku 的条带，即为重组小鼠 MIG 蛋白，以 1.0 mol/L 处的重组蛋白含量为最高 (图 3); Western blot 分析也显示了多条蛋白质条



**Fig.3 SDS-PAGE of the bound proteins eluted with step-wise NaCl gradient**

High-Five cells were infected with MIG recombinant baculovirus for two days and the supernatant was collected and applied to S-Sepharose. The protein was eluted with 0.2~1.5 mol/L NaCl and subjected to 18% SDS-PAGE. *M*: Molecular mass markers; *E1*~*E7*: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mmol/L NaCl.



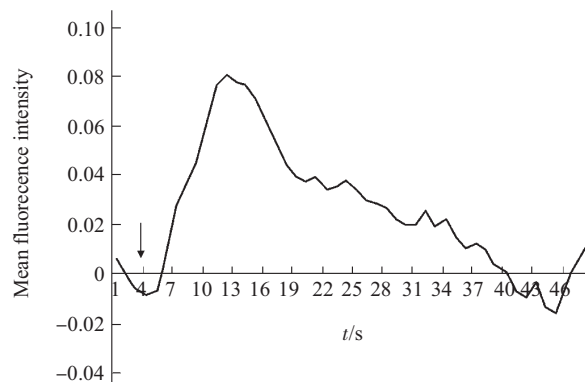
**Fig.4 Western blot analysis of purified recombinant mouse MIG**

Recombinant mouse MIG protein produced by Bac-To-Bac baculovirus expression system was purified on S-Sepharose column, separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane (0.2  $\mu$ m) and probed with anti-MIG monoclonal antibody. *E1*~*E3*: 0.8, 1.0, 1.2 mmol/L NaCl.

带，主要集中在 15 ku 左右，结果见图 4. 经激光透射扫描后，计算出 MIG 蛋白的纯度约为 80%.

## 2.4 小鼠 MIG 重组蛋白对 T 淋巴细胞的活性测定

采用小鼠 CTLL2 细胞作为靶细胞，取少量 MIG 重组蛋白进行 T 淋巴细胞钙离子细胞内流测定. 结果表明，小鼠 MIG 重组蛋白在浓度为 0.02 g/L 时，就可显著地诱发 CTLL2 细胞的钙离子内流，从而表明小鼠 MIG 重组蛋白具有生物活性，结果见图 5.

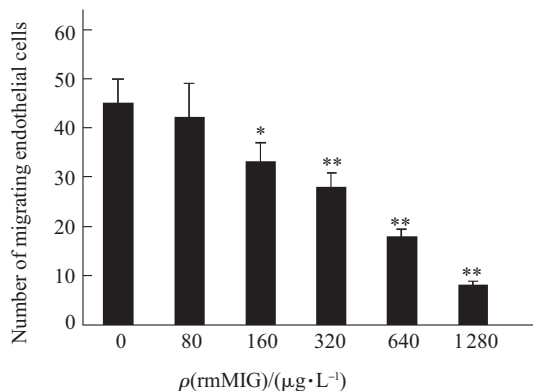


**Fig.5 Recombinant mouse MIG protein elicits transient elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  in CTLL2 mouse cytotoxic T cell line**

CTLL2 cells were loaded with Calcium Green-1/AM and stimulated with rmMIG at the indicated time (arrow head) at a final concentration of 1 g/L. The relative fluorescence change was recorded at 520 nm and the data were analyzed by Axon Workbench 2.1 software. Five seconds after addition of rmMIG, the intracellular calcium concentration began to increase and peaked at 15 s and then dropped gradually to the unstimulated level.

## 2.5 小鼠 MIG 重组蛋白对内皮细胞和血管生成的活性测定

**2.5.1** 重组小鼠 MIG 蛋白抑制 bFGF 诱导的血管内皮细胞趋化. 利用小鼠微血管细胞系 bEnd.3 在 Transwell 中进行的趋化实验表明, 重组小鼠 MIG 蛋白在浓度为 160  $\mu\text{g/L}$  时就可显著地抑制人重组 bFGF 诱发小鼠微血管内皮细胞的迁移( $P < 0.05$ ), 这种抑制活性随着小鼠 MIG 蛋白剂量的增加而增加(图 6).

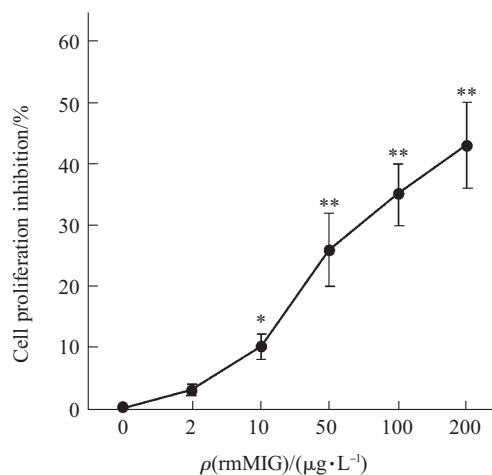


**Fig.6 Inhibition of bFGF induced endothelial cell migration by mouse recombinant MIG**

bEnd.3 endothelial cells were seeded in the upper wells and human recombinant bFGF (10  $\mu\text{g/L}$ ) and rmMIG were added into the lower wells. Migration of bEnd.3 endothelial cells was significantly reduced in the presence of rmMIG at 160  $\mu\text{g/L}$  or higher (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

**2.5.2** 小鼠 MIG 抑制小鼠微血管内皮细胞增殖. 小鼠 MIG 蛋白是否具有抑制内皮细胞增殖的能力还不为人所知, 本研究利用小鼠微血管细胞系 bEnd.3 进行 24 h 细胞增殖抑制实验. 结果显示, 小鼠 MIG 蛋白在浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  时就可明显抑制人重组 bFGF 诱发的小鼠内皮细胞增殖( $P < 0.05$ ), 抑制率约为 45%, 而且抑制效果具有剂量依赖性. 当小鼠 MIG 蛋白浓度为 200  $\mu\text{g/L}$ , 抑制效率约为 70% (图 7).

**2.5.3** 小鼠重组 MIG 蛋白诱导的鸡胚尿囊膜血管生成. 利用 7 日龄受精鸡卵进行的尿囊膜血管生成抑制实验(CAM Assay)表明, 在加入重组 MIG 蛋白后, 实验组的平均血管分支数目为  $3.4 \pm 0.6$ , 而对照组的分支数为  $5.8 \pm 1.2$ , 二者有显著差别( $P < 0.05$ ), 表明重组小鼠 MIG 蛋白对鸡胚尿囊膜内新生血管具有明显的抑制作用.



**Fig.7 Inhibition of mouse bEnd.3 endothelial cell proliferation by rmMIG**

Recombinant mouse MIG protein was added to bEnd.3 endothelial cells at various concentrations in the presence of 2  $\mu\text{g/L}$  of human recombinant bFGF. The proliferation of bEnd.3 cells was determined by MTT assay after 24 h incubation. The inhibition of bEnd.3 endothelial cell proliferation by rmMIG was dose-dependent. The inhibition was significant at 10  $\mu\text{g/L}$  of rmMIG or higher (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

## 3 讨 论

由于近年来的研究发现了 CXC 趋化因子 MIG 越来越多的功能, 人们对 MIG 的研究又重新重视起来. 起初人们只注意到了 MIG 的 T 淋巴细胞、NK 细胞趋化活性, 在这些细胞表面发现了 CXC 分子 IP-10 和 MIG 的受体 CXCR-3. 后来 Strieter 等<sup>[4,7]</sup>发现人 MIG 蛋白具有抑制 bFGF 诱导体内血管生成的作用, 并把 CXC 趋化因子根据在 CXC 的 N 端有无 ELR 而分为两类因子. ELR<sup>+</sup>分子包括 IL-8 等, 具有血管生长刺激活性, 而 ELR<sup>-</sup>分子包括 IP-10、MIG 等, 具有血管生成抑制功能. 近来的研究发现, IL-12 和 IFN- $\gamma$  介导体内肿瘤血管抑制作用是通过 CXC 趋化因子 IP-10 和 MIG 介导的<sup>[8]</sup>. 目前已证实, 在人内皮细胞表面也存在 CXCR3 受体, 可介导 IP-10 和 MIG 的作用<sup>[9]</sup>. 但 CXCR3 介导这种作用是抑制了内皮细胞的迁移还是增殖仍存在着争论. Luster 等<sup>[10]</sup>的研究表明, IP-10 可抑制内皮细胞的增殖, Angiolillo 等<sup>[8]</sup>的研究则表明 MIG 或 IP-10 可抑制内皮细胞的迁移. 本研究首次研究证实小鼠 MIG 对于小鼠 bEnd.3 细胞同时具有增生抑制活性和内皮细胞迁移抑制活性. 利用哺乳动物细胞进行研究时表明, 基因工程人 MIG 或 IP-10 蛋白在哺乳动物细胞内成熟、分泌过程中其 C 端可被

降解, 使 MIG 蛋白质被降解为分子质量相近的若干片段, 这些片段都具有生物活性, 但以分子质量大者活性最为显著<sup>[1]</sup>. 本实验的 Western blot 及 SDS-PAGE 皆显示, 在 14.4 ku 的主条带附近, 存在着一些分子质量相近的次要条带, 表明小鼠 MIG 在昆虫细胞表达的过程中也可能存在着 C 端降解. 杆状病毒表达系统具有表达的高效性和对表达的蛋白质进行有效的翻译后加工的优点, 不需要变性和复性, 也没有内毒素污染问题, 是国外被广泛用来表达活性蛋白的真核表达系统. 趋化因子是一种碱性小蛋白质分子, 且需要在翻译后进行加工修饰并去除分泌信号而分泌到细胞外起作用. 预测的小鼠全长 MIG 蛋白在 N 端带有长度为 20 个氨基酸的分泌信号, 在分泌到细胞外的过程中, 分泌信号必须被识别和切除, MIG 才能变成具有活性的分子. 既往高效表达有活性的分泌蛋白一直是个难题, 首先重组蛋白的分泌信号不易被宿主细胞识别, 而且切割效率不高. 在本研究所采用的表达系统中, 小鼠 MIG 分泌信号可在昆虫细胞内被有效地识别, 并被正确切割, 产生了大小符合预期的蛋白质. 在普通的昆虫表达系统中, 在鉴定重组病毒时一般需要较长的时间进行重组克隆鉴定, 而且需要经验丰富的实验人员识别正确的重组病毒克隆<sup>[11]</sup>. 本实验通过采用美国 Life Technologies 公司的 Bac-To-Bac 系统<sup>[12]</sup>, 在 DH10Bac 工程菌中提前通过细菌的转座功能, 将目的基因与杆状病毒的骨架进行重组, 通过蓝白克隆鉴定, 提取重组 Bacmid, 然后转染 *sf-9* 昆虫细胞产生重组病毒, 大大地缩短了产生重组杆状病毒所需要的时间并减少了工作量. *sf-9* 细胞是一种常用的昆虫细胞系, 它来源于草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) IPLB-Sf21-AE. Hive Five<sup>TM</sup> 细胞是一种来源于粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) (BTI-TN-5B1-4) 的一种昆虫细胞系, 具有高效表达分泌型蛋白的功能<sup>[13]</sup>. 在常规的昆虫或其他表达系统中表达分泌型蛋白时, 一般产量较低且分泌到细胞外的蛋白质容易降解. 本课题在培养两种昆虫细胞时采用的都是无血清培养基, 这不仅可使重组蛋白的表达量增高, 而且由于培养基内含有很少的杂质蛋白, 方便和简化了下游的纯化工作, 不用 HPLC 进行二次纯化就可得到纯度很高的重组蛋白. 在以往的研究中主要以人的 MIG, 而对小鼠的 MIG 系统研究较少, 但有研究表明, 小鼠的 MIG 功能与人的 MIG 功能不完全一致<sup>[14]</sup>. 人 MIG 蛋白由于具有内皮细胞抑制作用而被

应用于一些体外的抗肿瘤生物治疗中<sup>[15-17]</sup>. 但由于种属的差异, 在实验治疗阶段, 需要大量具有活性的小鼠 MIG 蛋白进行体内作用机理研究. 而且也有研究表明, 通过基因转染而由哺乳动物细胞分泌表达的 CXC 趋化因子, 由于产量少而不足以产生血管生成抑制效应及趋化淋巴细胞和 NK 细胞<sup>[18]</sup>. 本研究所完成的小鼠 MIG 的高效表达, 为今后进一步研究 MIG 在血管生成, 特别是肿瘤血管生成中的作用提供了一定的基础.

## 参考文献

- 1 Belperio J A, Keane M P, Arenberg D A, *et al.* CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 2000, **68** (1): 1~8
- 2 Farber J M. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (14): 5238~5242
- 3 Liao F, Rabin R L, Yannelli J R, *et al.* Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med*, 1995, **182** (5): 1301~1314
- 4 Strieter R M, Polverini P J, Arenberg D A, *et al.* The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock*, 1995, **4** (3): 155~160
- 5 Arenberg D A, Polverini P J, Kunkel S L, *et al.* *In vitro* and *in vivo* systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 1997, **288**: 190~220
- 6 Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, *et al.* Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods*, 2003, **273**(1~2): 83~101
- 7 Strieter R M, Polverini P J, Kunkel S L, *et al.* The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 27348~27357
- 8 Angiolillo A L, Sgadari C, Tosato G. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **795**: 158~167
- 9 Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, *et al.* Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest*, 2001, **107** (1): 53~63
- 10 Luster A D, Greenberg S M, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med*, 1995, **182** (1): 219~231
- 11 King L A, Possee R D. *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*. London: Chapman & Hall, 1992. 5~42
- 12 Luckow V A, Lee S C, Barry G F, *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1993, **67** (8): 4566~4579
- 13 Ishii K, Yamagami S, Tanaka H, *et al.* Full active baculovirus-expressed human monocyte chemoattractant protein 1

- with the intact N-terminus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **206** (3): 955~961
- 14 Park M K, Amichay D, Love P, *et al.* The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen *in vivo*. *J Immunol*, 2002, **169** (3): 1433~1443
  - 15 Addison C L, Arenberg D A, Morris S B, *et al.* The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. *Hum Gene Ther*, 2000, **11** (2): 247~261
  - 16 Sadari C, Farber J M, Angiolillo A L, *et al.* Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis *in vivo*. *Blood*, 1997, **89**: 2635~2643
  - 17 Tannenbaum C S, Tubbs R, Armstrong D, *et al.* The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol*, 1998, **161**(2): 927~932
  - 18 Wang Y Q, Wada A, Ugai S, *et al.* Expression of the Mig (CXCL9) gene in murine lung carcinoma cells generated angiogenesis-independent antitumor effects. *Oncol Rep*, 2003, **10** (4): 909~913

## Large Scale Production and Purification of Murine Chemokine Monokine Induced by IFN-gamma (MIG, CXCL9) in Insect Cells and Its Angiostatic Effects\*

ZHANG De-Xin<sup>1)\*\*</sup>, WU Jing<sup>1)</sup>, YANG Jing-Hua<sup>2)</sup>, REUVEN RABINOVICI<sup>2)</sup>, FAN Dai-Ming<sup>1)</sup>

<sup>(1)</sup>*Institute for Digestive Diseases, Xijing Hospital, the 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China;*

<sup>(2)</sup>*Department of Surgery, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA)*

**Abstract** Monokine induced by interferon- $\gamma$  (MIG, CXCL9) is a CXC chemokine which chemoattracts lymphocytes or neutrophils. Recent studies suggest that some members of CXC family, such as PF-4 and IL-8, CRG-2 and MIG also possess angiogenic or angiostatic properties. Recombinant mouse MIG protein were produced and purified and test its biological effects on endothelial cells. Mouse MIG cDNA was PCR amplified from mouse brain and cloned into pFASTBAC 1 vector in Bac-To-Bac baculovirus expression system. The recombinant mouse MIG Bacmid was introduced into High-Five (Tn-5B1-4) insect cells. After 48~72 h of incubation, the supernatant was collected and the MIG protein was purified by S-Sepharose. The yield of MIG was 10 mg/L and the purity is 90%. The MIG protein migrated as several bands on SDS-PAGE with the main band at 14.4 ku and was further confirmed by Western blot analysis. Functional assays demonstrated that purified mouse MIG protein not only elicited influx of calcium in mouse cytotoxic T cell lines but also inhibited both mouse endothelial cell migration and proliferation in a dose dependent manner. Thus, mouse MIG protein is not only a potent chemoattractant for lymphocytes but also an anti-angiogenic factor, which has important implications for angiogenesis-related diseases, such as tumor. It is the highest yield of recombinant mouse protein production described in the literature so far. The availability of large amount of purified active mouse MIG protein produced from baculovirus expression system has paved the way for the further studies of its *in vivo* angiostatic functions in mice.

**Key words** CXC chemokines, monokine induced by interferon- $\gamma$  (MIG), baculovirus, recombinant protein, angiogenesis

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39800156, 30371337).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-29-68855516, Fax: 86-29-82539041, E-mail: dx66@163.com

Received: April 22, 2005 Accepted: May 30, 2005