

# 巨噬细胞移动抑制因子诱导血管生成相关基因的表达

单志新, 余细勇, 林秋雄, 邓春玉, 刘媛, 蔡施霞, 谭虹虹, 符永恒, 林曙光  
(广东省人民医院 医学研究中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究巨噬细胞移动抑制因子(MIF)对人血管内皮细胞表达血管生成相关基因的诱导作用。【方法】通过亚克隆, 构建原核表达质粒 pET22b-MIF, 并转化入工程菌 BL21(DE3)。用 Ni-亲和柱分离纯化 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导表达的重组 MIF。用巨噬细胞移动抑制试验鉴定复性的重组 MIF 的活性。分别用 0、30、60、120 ng/mL 的重组 MIF 处理人血管内皮细胞 12 h, 通过 Real-time 定量 PCR 检测人血管内皮细胞中 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$ 、PDGF- $\alpha$  的 mRNA 表达。用体外血管生成试验检测重组 MIF 诱导人血管内皮细胞的成管腔作用。【结果】正确构建了重组质粒 pET22b-MIF。经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌中以包涵体形式表达出重组 MIF。复性的重组 MIF 对巨噬细胞移动的抑制水平达 30% ( $P < 0.05$ )。重组 MIF 能特异地诱导 HVECs 中 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$ 、PDGF- $\alpha$  表达, 并能特异地诱导人血管内皮细胞形成管腔结构。【结论】在大肠杆菌中成功表达出 MIF, MIF 能特异地诱导人血管内皮细胞中血管生成相关基因的表达。

**关键词:** 巨噬细胞移动抑制因子; 分子克隆; 人血管内皮细胞; 定量 PCR; 基因表达

中图分类号: Q78, R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0617-05

## Role of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor in Promoting Genes Expression Involved in Angiogenesis

SHAN Zhi-xin, YU Xi-yong, LIN Qiu-xiong, DENG Chun-yu, LIU Yuan, CAI Shi-xia, TAN Hong-hong,  
FU Yong-heng, LIN Shu-guang

(Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the potential role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in promoting angiogenic gene expression in human umbilical vascular endothelial cells (HVECs). 【Methods】 Using sub-cloning technique, the prokaryotic MIF expression plasmid pET22b-MIF was constructed. The MIF gene was induced by IPTG to express 6His-tag fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by HisTrap affinity columns. The collected recombinant MIF (rMIF) was renatured and the bioactivity of rMIF was tested by macrophage migration inhibition assay (MMI). The HVECs were incubated with 0, 30, 60, and 120 ng/mL rMIF for 12 h, and VEGF<sub>165</sub>, FGFR<sub>3</sub>, MMP9, TGF- $\alpha$  and PDGF- $\alpha$  mRNA expression were determined by real-time quantitative PCR test. Using *in vitro* angiogenesis assay, the tube formation of HVECs induced by MIF was tested. 【Results】 pET22b-MIF was constructed correctly and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The rMIF was successfully expressed in *E. coli* in inclusive bodies. The result of MMI assay showed that the renatured rMIF inhibited the macrophage cells migration at the rate of 30% ( $P < 0.05$ ). The results of real-time quantitative PCR revealed that MIF specifically promoted VEGF<sub>165</sub>, FGFR<sub>3</sub>, MMP9, TGF- $\alpha$  and PDGF- $\alpha$  genes expression in HVECs. The result of *in vitro* angiogenesis assay showed that MIF specifically induced tube formation of HVECs. 【Conclusion】 rMIF is successfully expressed in *E. coli* and rMIF can promote angiogenic factors expression in HUVECs.

**Key words:** macrophage migration inhibitory factor; molecular cloning; quantitative PCR; human vascular endothelial cell; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(6):617-621]

收稿日期: 2005-6-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300421, 30271287); 广东省自然科学基金资助项目 (015015, 33189); 广东省科技计划项目 (202B601202); 广东省卫生厅科研基金资助项目 (B2003002)

作者简介: 单志新(1972-), 男, 黑龙江方正人, 医学博士, 副研究员. 余细勇, 通讯作者. E-mail: zhixinshan@yahoo.com.cn;

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)能够抑制巨噬细胞游走,引起巨噬细胞在迟发型变态反应中浸润、聚集<sup>[1]</sup>。MIF参与多种自身免疫和炎症疾病的病理过程,包括关节炎<sup>[2]</sup>、肾小球肾炎<sup>[3]</sup>、革兰氏阳性和革兰氏阴性脓毒症<sup>[4]</sup>以及动脉粥样硬化<sup>[5]</sup>等。近期研究发现,阻断MIF活性可使动脉粥样硬化斑块的细胞组成向稳定型转化,即斑块内巨噬细胞及泡沫细胞含量降低,平滑肌细胞含量增加<sup>[6]</sup>。由于血管生成与粥样硬化斑块的不稳定性有关<sup>[7]</sup>,那么,在通过阻断MIF活性而增加斑块的稳定性的过程中,是否还存在对血管生成的抑制作用呢?为了证实这一推测,我们将研究MIF在体外对血管生成因子表达的诱导作用。我们在本文中报道,利用原核表达载体pET22b(+)在大肠杆菌中表达带有6His标签的重组MIF蛋白(rMIF),以及将复性后的rMIF处理人血管内皮细胞(HVECs),检测HVECs中VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$ 和PDGF- $\alpha$  mRNA表达水平。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞株

质粒pET22b(+), *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3), 巨噬细胞株18SC, 人血管内皮细胞(EA.hy926)均本室保存。

### 1.2 内切酶、抗体和其它试剂

*Bam*H I, *Xho* I, dNTPs, pfu *Taq* DNA聚合酶, Hotstart *Taq* DNA聚合酶, DNA连接酶反应液, IPTG购自TaKaRa公司。DNA胶提取试剂盒购自Qiagen公司。鼠抗MIF抗体由蓝辉耀教授惠赠。羊抗鼠IgG-HRP购自Santa Cruz公司。HisTrap亲和柱购自Amersham Pharmacia公司。Lipofectamine2000 DNA, TRIzol reagent, RT-PCR试剂盒购自Invitrogen。SYBR Green I购自SIGMA公司。体外血管生成检测试剂盒购自CHEMICON公司。

### 1.3 表达载体pET22b-MIF的构建

根据已构建的pGBKT7-MIF上人MIF cDNA序列<sup>[8]</sup>和pET22b(+)上多克隆位点序列,设计并合成1对PCR引物:上游, 5'-ATTGGATCCCATGCGATGTTTCATCGTAAAC-3', (*Bam*H I);下游, 5'-GCCCTCGAGGGCGAAGGTGGAGTTGTT-3', (*Xho* I)。以质粒pGBKT7-MIF为模板, 扩增MIF cDNA。

用*Bam*H I和*Xho* I分别酶切MIF cDNA和pET22b(+)载体, 纯化酶切产物并做连接反应, 构建重组表达载体pET22b-MIF。将连接产物转化感受态*E. coli* DH5 $\alpha$ 。提取筛选的阳性克隆质粒DNA, 行酶切、PCR扩增和测序鉴定。

### 1.4 重组MIF在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达

将重组质粒pET22b-MIF转化工程菌BL21(DE3)。挑取单个克隆接种于2 $\times$ YT(Amp<sup>+</sup>)培养基中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养至A<sub>600</sub>为0.8~1.0。以1 mmol/L的IPTG于37 $^{\circ}$ C继续诱导培养3~4 h。收集细胞, 分别加入融菌酶至100  $\mu$ g/mL, DNAase I至5  $\mu$ g/mL, 在冰浴中超声破菌, 取上清做SDS-PAGE。以鼠抗MIF单抗为一抗, 羊抗鼠IgG-HRP为二抗, 对表达上清做Western blot。用ECL+plus Western blot检测试剂为底物, 曝光X线片, 显色、定影。

### 1.5 重组MIF的纯化和活性分析

用8 mol/L的脲溶解以包涵体形式表达的重组MIF, 用整合Ni<sup>2+</sup>的HisTrap亲和层析柱纯化重组MIF, 再用10 ku的超过滤离心管浓缩重组MIF。采用Bradford法测定溶解在PBS中的重组MIF的浓度。将rMIF缓慢稀释到包含5 mmol/L的GSH和1 mmol/L GSSG的Tris·Cl缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C放置18 h进行复性。

通过巨噬细胞移动抑制试验<sup>[9]</sup>, 利用巨噬细胞(18SC)来测定复性后的重组MIF的活性, 当抑制率大于25%时表示具有生物活性。

### 1.6 实时定量RT-PCR

用含体积分数10%小牛血清的DMEM培养人血管内皮细胞。将细胞铺6孔培养板, 当细胞丰度达80%后, 去血清饥饿24 h。分别用0、30、60、120 ng/mL的重组MIF孵育12 h。用Trizol试剂提取人血管内皮细胞总RNA, 用反转录试剂盒制备cDNA第一链, 通过Real-time定量PCR检测基因mRNA表达水平。Real-time RT-PCR条件如下: 95 $^{\circ}$ C 1 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 于每个循环结束时测定每孔SYBR Green I吸光值。反应结束后对PCR产物做55 $^{\circ}$ C到95 $^{\circ}$ C的融解曲线分析, 12 $^{\circ}$ C终止反应。所用PCR引物如下: 扩增人GAPDH引物(5'-TCCATGACA ACT TTG GTA TCG T-3'和5'-GTGGGC CAT GAG GTC CAC-3'), 扩增VEGF<sub>165</sub>引物(5'-ATG AAC TTT CTG CTG TCT TG-3'和5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC A-3'), 扩增FGFR3引物

(5'-ACG ACC TGT ACA TGA TCA TG-3'和 5'-AGC AGG TCG TGG GCA AAC A-3'),扩增 MMP9 引物 (5'-GTT CGA CGT GAA GGC GCA-3'和 5'-AGG ATG TCA TAG GTC ACG TA-3'),扩增 TGF- $\alpha$  引物 (5'-ATG TGT CTG CCA TTC TGG G-3'和 5'-TGA GTG GCA GCA AGC GGT-3'),扩增 PDGF- $\alpha$  引物 (5'-CAT TTA CGA GAT TCC TCG GA-3'和 5'-ATC CGG ATT CAG GCT TGT G-3')。

### 1.7 体外血管生成试验

将 50  $\mu$ L 的 ECMatrix 胶铺 96 孔板,37  $^{\circ}$ C 放置 1 h 使胶凝固。将 100  $\mu$ L 含  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  的 HVECs 铺在凝胶上,分别用 50 ng/mL MIF,2 ng/mL VEGF,2 ng/mL BSA 处理细胞 10 h。显微镜( $\times 200$ )下拍照,记录结果。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件进行数据分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用组间  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒 pET22b-MIF 的鉴定

酶切分析结果显示,MIF cDNA 已插入原核表达载体 pET-22b (图 1)。DNA 测序结果显示,MIF cDNA 序列正确,与文献报道一致<sup>[8]</sup>,已正确插入 pET-22b 上的多克隆位点。本文所报道的 MIF cDNA 已在 GenBank 数据库登录,登录号: AF469046。

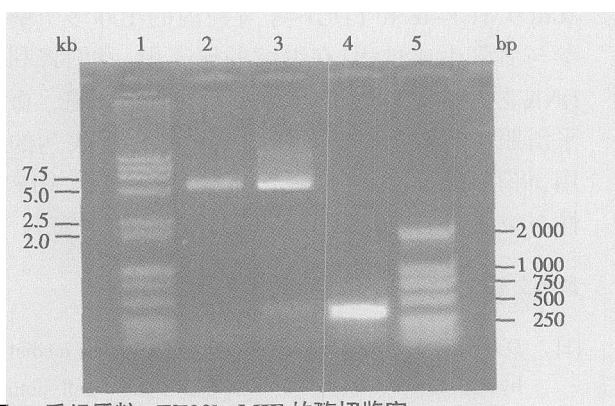


图 1 重组质粒 pET22b-MIF 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction identification of recombinant plasmid pET22b-MIF

Lane 1: DL2 000+15 000 DNA marker; Lane 2: pET-22b digested by BamH I +Xho I; Lane 3: pET22b-MIF digested by BamH I +Xho I; Lane 4: PCR product of MIF cDNA; Lane 5: DL2 000 DNA marker

### 2.2 重组 MIF 的表达和纯化

SDS-PAGE 电泳结果显示,经 IPTG 诱导的含 pET22b-MIF 的工程菌能表达特异的 15 ku 的重组蛋白,而且主要以包涵体形式存在。Western blot 显示,表达的重组蛋白可被 MIF 单抗识别,这表明该重组蛋白即是重组 MIF。将重组 MIF 溶解在 8 mol/L 尿素溶液中,利用 Ni<sup>2+</sup>螯合的 HisTrap 柱,得到纯化的含 6His 标签的重组 MIF (图 2)。

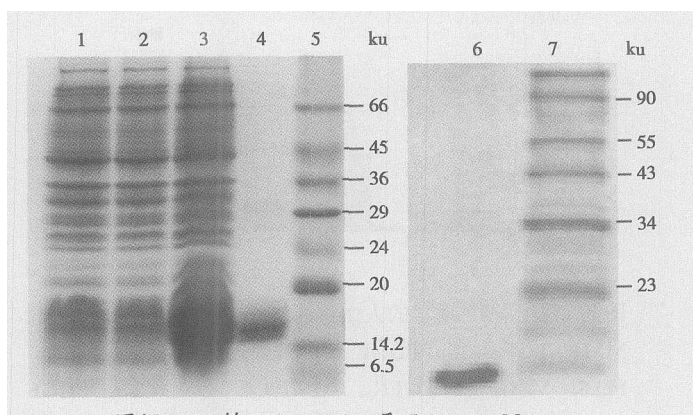


Fig. 2 重组 MIF 的 SDS-PAGE 和 Western blot

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant MIF

Lane 1: Total protein of induced bacterial cells; Lane 2: Total protein of uninduced bacterial cells without pET-22b-MIF; Lane 3: Total protein of induced bacterial cells containing pET-22b-MIF; Lane 4: Purified rMIF protein; Lane 5: Molecular weight marker; Lane 6: Total protein of induced bacterial cells identified by anti-MIF mono-Ab; Lane 7: Molecular weight marker

### 2.3 复性的重组 MIF 的活性鉴定

巨噬细胞移动抑制试验结果显示,同空白对照组相比,菌液上清(50  $\mu$ g/L)对巨噬细胞的抑制率达 20%,而复性的重组 MIF (50  $\mu$ g/L)对巨噬细胞的抑制率达 30% ( $n=3, P < 0.05$ )。

### 2.4 人血管内皮细胞中血管生成因子基因的表达

Real-time 定量 PCR 结果显示,同对照组相比,30 ng/mL 的重组 MIF 能特异地诱导 HVECs 中 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$  和 PDGF- $\alpha$  基因的表达 ( $P < 0.05$ ),60 ng/mL 的重组 MIF 也能特异地诱导 HVECs 中 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$  和 PDGF- $\alpha$  基因的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 3)。

### 2.5 重组 MIF 促 HVECs 的血管生成作用

血管生成试验显示,在空白组和 BSA 对照组未见 HVECs 聚集成管腔结构,而 VEGF 和 MIF 处理组,HVECs 能聚集成明显的管腔结构(图 4)。

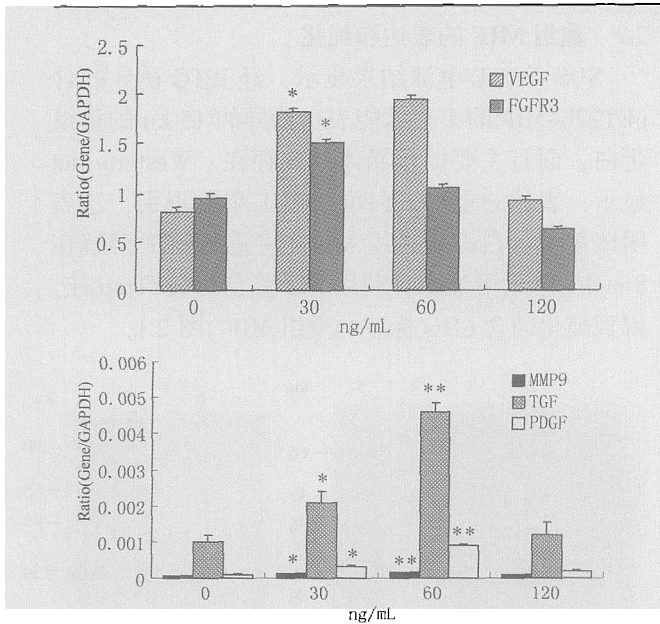


图3 重组 MIF 诱导的人血管内皮细胞中 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$  and PDGF mRNA 表达

Fig.3 VEGF<sub>165</sub>, FGFR<sub>3</sub>, MMP9, TGF- $\alpha$  and PDGF mRNA expression induced by rMIF in HVECs

A,B shows VEGF<sub>165</sub>, FGFR<sub>3</sub>, MMP9, TGF- $\alpha$  and PDGF- $\alpha$  mRNA expression in HVECs separately. Each bar represents the  $\bar{x} \pm s$  for 4 tests, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with control (0 ng/mL)

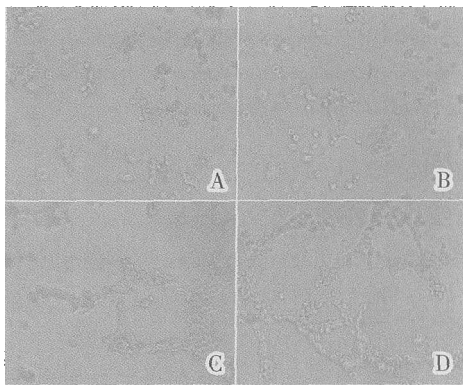


图4 利用人血管内皮细胞的体外血管生成试验

Fig. 4 *In vitro* angiogenesis assay using HVECs (200 $\times$ )

A,B,C,D shows HVECs treated with PBS, 2 ng/mL BSA, 2 ng/mL VEGF, and 50 ng/mL MIF, respectively

### 3 讨论

我们在本实验中利用工程菌 BL21(DE3)以包涵体形式表达出了带有 6His 的 rMIF。在前期研究中,我们利用 pGEX-4T-1 表达系统在大肠杆菌中表达出了可溶性的重组蛋白 GST-MIF。由于 GST-

MIF 携带有 26 ku 的 GST 标签,需要使用价格昂贵的凝血酶去除。我们利用 pET-22b-MIF 表达系统表达的 6His-MIF,6His 不会影响 rMIF 活性,不必用酶消化去除。MMI 检测结果显示复性的 rMIF 具有生物活性,可以用来进行 MIF 的生物学功能研究。

我们前期的研究发现,在以高脂喂养的兔发生动脉粥样硬化进程中,内源性的内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和泡沫细胞均有 MIF mRNA 和蛋白的表达,血管细胞中 MIF 的上调表达可能在动脉粥样硬化的启动和发展过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。研究表明,发生动脉粥样硬化的冠状动脉内膜病变部位,可以见到血管新生现象,并且新生血管的检出率随着病变的发展而逐渐增多,尤其是在 VI 型病变中达到 100%<sup>[10,11]</sup>。新生血管的内皮细胞可以表达更多的黏附分子,从而趋化更多的炎性细胞进入斑块的肩部,导致斑块去稳定<sup>[7]</sup>。

研究发现,鼻咽原发癌组织中,癌细胞 MIF 与 VEGF 表达以及癌组织中微血管密度(IMD)计数均显示正相关关系,提示 MIF 可能是影响肿瘤性微血管生成和癌细胞 VEGF 表达的重要因素<sup>[12]</sup>;MIF 还能上调神经细胞癌中 IL-8 和 VEGF 的表达<sup>[13]</sup>。本研究发现,MIF 能在体外特异地诱导 HVECs 表达血管生成因子,并能诱导 HVECs 形成特异的管腔结构。因此,MIF 诱导的血管生成可能是导致斑块不稳定性的又一重要方面。由于内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞都是动脉粥样硬化斑块的组成细胞,目前已确认包括 VEGF<sub>165</sub>、FGFR<sub>3</sub>、MMP9、TGF- $\alpha$  和 PDGF- $\alpha$  等在内的 100 多个基因参与血管生成过程;在继续的研究中,我们将利用 DNA 芯片技术在体外研究 MIF 对内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞中血管生成因子表达的作用,将利用兔动脉粥样硬化模型,研究抑制 MIF 活性对斑块内的血管生成和斑块稳定性的影响。

#### 参考文献:

- [1] David JR. Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(1): 72-7.
- [2] Weiser WY, Temple PA, Witee-Giannotti JS. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989,86(19):7522-26.
- [3] Leech M, Metz C, Hall P, et al. Macrophage migration

- inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids[J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(8):1601-8.
- [4] Lan HY, Mu W, Yang N, *et al.* *De novo* renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(4):1119-27.
- [5] Bozza M, Satoskar AR, Lin G, *et al.* Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis[J]. *J Exp Med*, 1999, 189(2):341-6.
- [6] Lin SG, Yu XY, Chen YX, *et al.* *De novo* expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits[J]. *Circ Res*, 2000, 87(12):1202-8.
- [7] Schober A, Bernhagen J, Thiele M, *et al.* Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2004, 109(3):380-5.
- [8] O'Brien K, McDonald TO, Chait A, *et al.* Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content[J]. *Circulation*, 1996, 93 (4): 672-82.
- [9] 单志新,余细勇,林秋雄,等. 细菌-酵母穿梭表达质粒 pGBKT7-MIF 的构建和转化 [J]. *中山医科大学学报*, 2002,23(5):333-5.
- [10] Thurman GB, Stull HB, Miller PJ, *et al.* Utilization of purified human monocytes in the agarose droplet assay for measuring macrophage migration inhibitory factor [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2):41-5.
- [11] Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries [J]. *J Pathol*, 1999, 188(2): 189-96.
- [12] Depre C, Havaux X, Wijns W. Neovascularization in human coronary atherosclerotic lesions [J]. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 1996, 39(3): 215-20.
- [13] 李智,林素暇,梁惠珍,等.巨噬细胞移动抑制因子与鼻咽癌微血管生成和淋巴结转移的关系[J].*中山大学学报(医学科学版)*, 2005,26(1):24-8.

(编辑 黄小延)

(上接第 611 页 from page 611)

行为,它们与新生血管形成之间的关系,还有待今后更多的研究来探讨。环缩酚酞的药理效应可能非常复杂,在不同的条件下所表现出来的效应不一定相同,以后需要进一步的研究来阐明其药理效应。

## 参考文献:

- [1] 梁小玲,高汝龙,李绍珍,等.生长因子在玻璃体视网膜增殖膜中的免疫组化研究[J].*中山医科大学学报*,1998, 19(4):356-8.
- [2] Liang X, Tang S, Li C, *et al.* Platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor immunolocalized in proliferative retinal diseases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(2): 144-7.
- [3] Shen J, Liang X, Campochiaro P, *et al.* Deficiency of neuropilin 2 suppresses VEGF-induced retinal neovascularization[J]. *Mol Med*, 2004, 10(1-6): 12-8.
- [4] Oshima Y, Liang X, Campochiaro P, *et al.* Intraocular gutless adenoviral-vectored VEGF stimulates anterior segment but not retinal neovascularization [J]. *J Cell Physiol*, 2004, 199(3):399-411.
- [5] Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, *et al.* Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 697-707.
- [6] 梁小玲,刘汉生,陈浩宇,等.环缩酚酞抑制小鼠血管增殖性视网膜病变的研究[J].*中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(6): 532-5.
- [7] 梁小玲,陈浩宇,黄永盛,等.环缩酚酞抑制 VEGF 介导的小鼠血-视网膜屏障破坏[J].*中华眼底病杂志*, 2004, 20 (6): 352-4.
- [8] Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, *et al.* Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis[J]. *Q J Nucl Med*, 2003, 47(3): 149-61.

(编辑 刘清海)