

## • 基础研究 •

## 人髓系细胞触发受体-1 模拟多肽的筛选和鉴定

杨其霖 黄红川 张彦峰 何为群 刘晓青 黎毅敏

**【摘要】** 目的 寻找能特异性与人髓系细胞触发受体-1(TREM-1)蛋白结合并抑制其传导通路的多肽。方法 克隆、表达和纯化 TREM-1 功能区蛋白,并以之为诱饵蛋白,筛选随机噬菌体展示肽库。经过 4 轮生物淘洗,通过 ELISA 方法和单核细胞 ELISA 方法分析噬菌体克隆与 TREM-1 蛋白的亲合力。化学合成模拟多肽,检测其对盲肠结扎穿刺(CLP)小鼠的治疗效果。结果 成功找到 5 种噬菌体克隆,ELISA 法和细胞 ELISA 均阳性。应用化学方法合成的模拟多肽 HYGMTHPNTMSH 能降低 CLP 小鼠的死亡率。结论 模拟多肽 HYGMTHPNTMSH 对脓毒症小鼠有保护作用。

**【关键词】** 髓系细胞触发受体-1;模拟多肽;筛选随机噬菌体展示肽库

## Screening and identification of human triggering receptor expressed on myeloid cells-1 mimetic peptides

YANG Qilin, HUANG Hongchuang, ZHANG Yanfeng, et al

the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China

**【Abstract】** Objective To find mimetic peptides which bind specifically with triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and inhibit the TREM-1 pathway. Methods The functioning region of TREM-1 protein was cloned, expressed and purified. With the recombinant protein of TREM-1 as the target molecule, the mimetic peptides were screened from a random phage display peptide library. Four rounds of biopanning were carried out, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and monocyte cell ELISA were used to evaluate the binding between the phage clone and TREM-1. Then, chemical synthesis of the mimetic peptide was carried out, and its therapeutic effect on cecal ligation and puncture (CLP) in mice was investigated. Results Five phage clones from the fourth round of biopanning were selected at random, all of them were positive in sandwich ELISA and monocyte cell ELISA. Administration of the chemically synthesized mimetic peptide HYGMTHPNTMSH reduced the mortality of CLP mice. Conclusion Mimetic peptide HYGMTHPNTMSH can protect the mice with sepsis from death.

**【Key words】** triggering receptor expressed on myeloid cells-1; mimetic peptide; screening random phage display peptide library

脓毒症(sepsis)是非心血管疾病危重患者最重要的死亡原因之一。但脓毒症的发病机制以及病理过程目前尚未明确<sup>[1]</sup>。Bouchon 等<sup>[2]</sup>于 2000 年发现的髓系细胞触发受体-1(triggering receptor expressed on myeloid cells-1, TREM-1)为这方面的研究开拓了一个新的视野。TREM-1 属于免疫球蛋

白超家族成员,选择性地表达于中性粒细胞、巨噬细胞和成熟的单核细胞表面,其通路在炎症的发生、发展中起着重要的作用,而过度激活则可以引起脓毒症的发生<sup>[2, 3]</sup>。本研究从临床肺部感染患者的外周白细胞中获得 TREM-1 功能区的 cDNA 分子,构建重组质粒,在大肠杆菌中可溶性表达及纯化。以重组的 TREM-1 功能区分子为靶蛋白,对随机噬菌体 12 肽库进行筛选,以期得到能够和 TREM-1 特异性结合并抑制其传导通路的模拟多肽,并以此为基础进行脓毒症发病机制和药物开发研究。

## 1 材料与方法

1.1 材料 收集肺部感染患者外周血 2 ml,

收稿日期:2008-03-03

基金项目:广东省自然科学基金资助课题(资助号:06022087)

作者单位:510120 广州市,广州医学院第一附属医院呼吸疾病研究所 ICU

作者简介:杨其霖,男,1981 年 12 月生,湖北宜昌人,在读硕士研究生

通讯作者:黎毅敏 Tel:020-83337750, E-mail:lymin98@gmail.com

EDTA 抗凝处理,加入 8ml 红细胞裂解液,室温作用 10min,3000r/min 离心 3min,取沉淀,计数备用。Trizol 试剂(Invitrogen 公司)、逆转录酶(Promega 公司)、镍柱(Novagen 公司)、RT-PCR System (TaKaRa 公司)、PCR Markers (TaKaRa 公司)、随机噬菌体展示文库(NEB 公司)、多肽合成(广州华拓公司)、质粒 PET-28a,大肠杆菌 BL21 (本室保存)等。昆明小鼠购自南方医科大学动物试验中心。

**1.2 RNA 提取和 RT-PCR** 以 Trizol 提取外周血白细胞的总 RNA,并进行逆转录反应。根据 Genbank 中 Bounchon 等提交的序列与 PCR 引物设计的基本原则,结合原核载体 PET-28a 的酶切位点,设计扩增对应 TREM-1 蛋白第 187~386 位的羧基端蛋白,上游引入 BamH I 酶切位点,下游引入 XhoI 酶切位点。上游引物为 Primer1: 5'-CCG-GATCCGAAGCTCCGAGCTGCAAC-3'。上游引物为 Primer2: 5'-GGCTCGAGAGAATTCTCATT-GGAGC-3'。PCR 反应条件为: 94℃ 5min 预变性, 94℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 40s, 30 循环, 72℃ 5min 充分延伸,反应结束,取 PCR 产物行 1% 琼脂糖电泳。

**1.3 克隆及鉴定** 将琼脂糖电泳的目的条带进行回收纯化,产物行 BamH I 和 XhoI 双酶切,酶切片段回收后和 PET-28a 片段按 5:1 摩尔比混合,加入 T4 连接酶和连接缓冲液于室温连接过夜,连接产物转化感受态细菌 DH5 $\alpha$  转化后进行质粒扩增,质粒小量制备,限制性内切酶酶切及鉴定重组克隆质粒,送公司测序。将测序正确的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中。

**1.4 重组蛋白 TREM-1 功能区的诱导表达和纯化** 挑取含重组质粒 PET-28a-TREM-1 的大肠杆菌 BL21,接种于含卡那霉素的 LB 培养基,37℃ 扩增细菌 12h,1:200 稀释菌液,继续培养至吸光度(A)=0.6,加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷使其终浓度为 100mmol/L,并于 15℃ 下诱导 8h。离心,沉淀重悬,加入溶菌酶,超声破碎菌体,离心,取上清与镍柱冰上混匀 30min,离心弃上清,把镍柱填充入层析柱中,洗柱 2 次后,用含咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白。SDS-PAGE 分析纯化结果。

**1.5 特异性结合噬菌体的生物淘选** 按照 NEB 随机噬菌体展示文库说明书进行 4 次噬菌体生物淘洗。并且将第 4 次淘洗产物进行铺板,挑取 10 个单克隆。

**1.6 ELISA 鉴定特异性结合的阳性噬菌体克隆** 以 100mg/L 的 TREM-1 融合蛋白 200 $\mu$ l 包被 96 孔

酶标板,4℃ 孵育过夜。磷酸缓冲溶液+吐温-20 (PBST) 洗板 3 次,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1h。PBST 洗板 3 次后加入 PBST 稀释到  $10^{10}$  的噬菌体,37℃ 保温 1h。PBST 洗涤 6 次,加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 单克隆抗体,37℃ 反应 1h。PBST 洗涤 6 次。加入四甲基联苯胺(TMB)显色,磷酸终止反应,测定 490nm 波长吸光度( $A_{490nm}$ )。用野生噬菌体作为阴性对照,牛血清白蛋白(BSA)为空白对照。以检测噬菌体 A 值(S)与阴性对照 A 值(N)的比值(S/N) $\geq 2.1$  判断为阳性。

**1.7 细胞 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆** 取健康成年人外周血 20ml,淋巴细胞分离液分离外周单个核细胞,以 1640 培养基稀释到细胞数为  $10^5$ /ml,取每孔 200 $\mu$ l 加入 96 孔细胞培养板,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 2h,弃上清,利用单核细胞贴壁的特性去除淋巴细胞并洗涤 3 次。加封阻液作用 1h。加入稀释到  $10^{10}$  的噬菌体,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中作用 1h。PBST 洗涤 5 次,4% 甲醛固定 15min,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 噬菌体单克隆抗体,37℃ 作用 1h。PBST 洗涤 6 次。加入 TMB 显色,磷酸终止反应,测定  $A_{490nm}$ 。加 BSA 为空白对照,以排除非特异性吸附的影响,加入野生噬菌体为阴性对照。以待测噬菌体 A 值(S)与阴性对照 A 值(N)的比值(S/N) $\geq 2.1$  判断为阳性。

**1.8 阳性克隆对活化单核细胞炎症因子释放的抑制作用** 按上述方法分离单核细胞,在其培养基中加入 1mg/L 脂多糖,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h,用野生噬菌体包被作为阴性对照,BSA 作空白对照。按照 ELISA 试剂盒说明检测上清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的含量。

**1.9 动物模型和分组** 选用昆明种小鼠 30 只,雌雄各半,体质量 18~22g。随机分为盲肠结扎穿孔组(cecal ligation and puncture, CLP 组),治疗组和假手术组各 10 只。CLP 组小鼠经 1% 戊巴比妥麻醉后,经下腹部正中切口,取出盲肠,在其根部结扎并以 21 号针头对穿两孔,挤出肠内容物少许,然后放回盲肠,缝合腹壁后 2h 皮下注射生理盐水 0.6ml。治疗组操作与 CLP 相同,缝合腹壁后 2h 予以生理盐水溶解的 0.05g/L HYGMTHPNTMSH 多肽 0.6ml 皮下注射。假手术组仅找出盲肠不作穿孔,其他操作同 CLP 组。

**1.10 统计学方法** 采用 Fisher 确切概率法进行统计,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 总 RNA 的提取 从肺部感染患者外周血白细胞中提取的总 RNA 可看到明显的 28S、18S、5S 条带(图 1)。

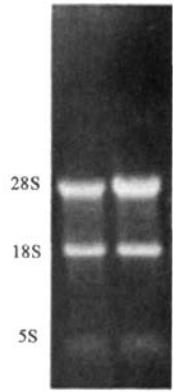
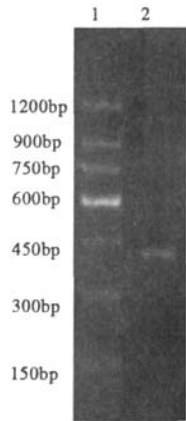


图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

2.2 RT-PCR 以肺部感染患者外周血白细胞总 cDNA 为模板,上下游引物进行 RT-PCR ,产物经琼脂糖凝胶电泳可见有约 408bp 特异性条带出现,与理论值一致(图 2)。

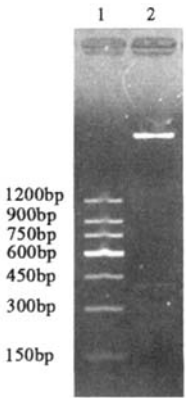


1:DNA Marker, 2 :TREM-1 408bp

图 2 TREM-1 功能区的 RT-PCR 电泳分析

2.3 PET28a-TREM-1 的酶切鉴定与测序分析 PET28a-TREM-1 经 BamH I 和 XhoI 双酶切后得到片段与预期片段一致(图 3)。PET28a-TREM-1 送公司测序。得到长度为 399bp 序列,序列用 BLAST 软件分析比较发现与已知 GeneBank TREM-1 序列一致(图 3)。

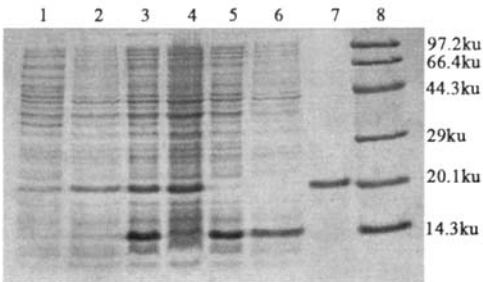
2.4 TREM-1 功能区蛋白的表达,纯化和鉴定 重组质粒 PET-TREM-1 经 IPTG 诱导后于 21ku 处产生一条明显条带,部分以可溶形式存在于菌体裂



1 ;DNA Marker,2:BamHI和 XhoI双酶切 PET28a-TREM-1

图 3 PET28a-TREM-1 的酶切鉴定

解上清中,利用镍柱通过金属螯合亲和层析进行纯化,从大肠杆菌菌体的裂菌液上清中纯化出了可溶形式的 6-his 融合 TREM-1 功能区蛋白。纯化的融合蛋白透析除去咪唑,应用 Bradford 法定量分析表明表达水平约为 2g/L,总共回收纯化融合蛋白约 40mg(图 4)。



1:诱导前,2:诱导后,3:大肠杆菌裂解后上清,4:大肠杆菌裂解后沉淀,5:过柱液体,6:洗柱液,7:纯化蛋白,8:Marker (14.3ku 处为溶菌酶)

图 4 重组质粒 PET-TREM-1 经 IPTG 诱导后蛋白的表达 纯化 SDS-PAGE 电泳图

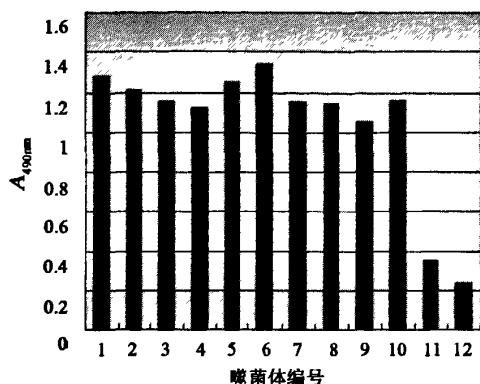
2.5 筛选随机噬菌体肽库 在 4 轮筛选中,保持包被的 TREM-1 蛋白浓度及投入噬菌体的量恒定。结果显示产率逐轮提高,第 4 轮的产率是第 1 轮的 142 倍。与 TREM-1 特异结合的噬菌体得到了明显富集(表 1)。

表 1 从噬菌体 12 肽库中筛选 TREM-1 特异性结合短肽

| 淘洗次数 | 投入噬菌体数(pfu)        | 洗脱噬菌体数(pfu)       | 噬菌体产率(%)              |
|------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| 1    | $2 \times 10^{11}$ | $8.4 \times 10^4$ | $4.2 \times 10^{-7}$  |
| 2    | $2 \times 10^{11}$ | $2.1 \times 10^5$ | $1.05 \times 10^{-6}$ |
| 3    | $2 \times 10^{11}$ | $6.6 \times 10^6$ | $3.3 \times 10^{-5}$  |
| 4    | $2 \times 10^{11}$ | $1.2 \times 10^7$ | $0.6 \times 10^{-4}$  |

## 2.6 ELISA 鉴定噬菌体与 TREM-1 的亲合力

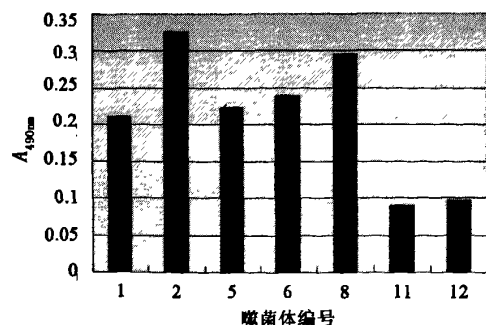
利用夹心 ELISA 对第 4 轮筛选后随机挑选的 10 个噬菌体克隆(图 5 的 1~10 号)进行鉴定以筛选出可与 TREM-1(100 $\mu$ g/L)结合的阳性克隆,同时利用 BSA 包被平行孔作对照排除非特异性吸附的影响(图 5 的 11 号),并以野生噬菌体为阴性对照(图 5 的 12 号)。结果显示,1~10 号噬菌体克隆均与 TREM-1 具有较强的结合能力,与所设空白对照和阴性对照的 A 值之比均  $>2.1$  ( $S/N > 2.1$ ),阳性率为 100%。



1~10:阳性噬菌体克隆,11:BSA,12:野生噬菌体

图 5 噬菌体克隆与 TREM-1 的亲合力

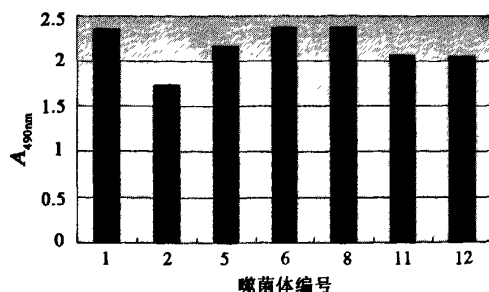
**2.7 细胞 ELISA 结果** 根据测序结果,选取 1、2、5、6、8 号噬菌体进行细胞 ELISA 检测,结果如图 6 所示,5 种噬菌体均能够和单核细胞特异性结合( $S/N > 2.1$ ),其中 2 号和 8 号噬菌体结合能力最高。



1、2、5、6、8:阳性噬菌体克隆,11:BSA,12:野生噬菌体

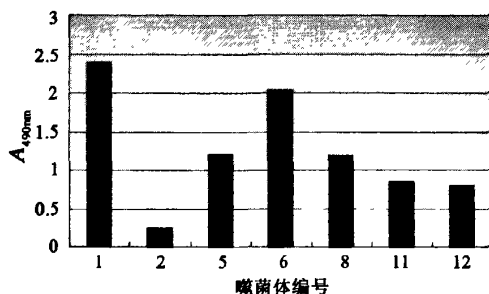
图 6 噬菌体克隆与单核细胞的亲合力

**2.8 阳性克隆对活化单核细胞炎症因子释放的作用** 如图 7、8 所示,2 号噬菌体克隆能轻度抑制 TNF- $\alpha$  的释放,并明显抑制 MCP-1 的释放。对 2 号噬菌体测序得知其表达多肽为 HYGMTHPNTMSH。



1、2、5、6、8:噬菌体编号,11:BSA,12:野生噬菌体

图 7 噬菌体对脂多糖活化的单核细胞 TNF- $\alpha$  释放的作用



1、2、5、6、8:噬菌体编号,11:BSA,12:野生噬菌体

图 8 噬菌体对脂多糖活化的单核细胞 MCP-1 释放的作用

**2.9 CLP 小鼠生存率比较** CLP 组小鼠 24h 和 48h 生存率分别为 30% 和 0%,而多肽治疗组 24h 和 48h 生存率为 60% 和 50%,假手术组小鼠无死亡。CLP 组小鼠和多肽治疗组 24h 和 48h 生存率都较假手术组低,多肽治疗组 24h 生存率和 CLP 组无显著差异( $P > 0.05$ ),而 48h 的生存率则明显较 CLP 组高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

随着对 TREM-1 功能研究的不断深入,越来越多的实验数据证实了 TREM-1 在炎症反应的触发及放大过程中起到重要作用。Bouchon 等<sup>[2,3]</sup> 将小鼠的 TREM-1 的细胞外区和人的免疫球蛋白- $\gamma$  (IgG1)Fc 段合成融合蛋白(mTREM-1/Fc),再应用到菌毒血症的动物模型中,结果发现该蛋白降低了 TNF- $\alpha$  的浓度,降低了小鼠的死亡率。值得注意的是 mTREM-1/Fc 融合蛋白并未完全抑制炎症因子的产生,以致机体抗感染能力下降,而只是通过竞争抑制降低炎症反应的程度,注射 mTREM-1/Fc 融合蛋白后机体产生的炎症细胞因子对细菌感染仍有控制力。由于这些特点,TREM-1 在控制过度炎症反应性疾病的研究领域中倍受重视。毫无疑问,TREM-1 将是调节过度炎症反应的一个很有价值

的潜在靶分子。

TREM-1 属于免疫球蛋白家族的跨膜受体,接受外来信号而被激活,激活后可通过多种信号传导途径如 Lyn, AKT, Jak2 途径引起炎症因子的释放<sup>[4]</sup>。TREM-1 的主要功能区位于 N 端由二硫键构成的“V”型免疫球蛋白类似结构中<sup>[5,6]</sup>。本研究利用分子生物学方法,克隆并在大肠杆菌中表达了其功能区,虽然由 PET-28a 载体表达蛋白上会添加 6 个组氨酸标签,但对其生物学功能的影响极小<sup>[7]</sup>。因此,本研究以此为诱饵蛋白,利用随机噬菌体展示肽库技术,筛选出与 TREM-1 蛋白高亲和力的模拟短肽,阻断其蛋白信号传导通路。

随机噬菌体表面展示技术是一种非常有效的多肽筛选技术,即将外源多肽的基因克隆到噬菌体基因组中,与噬菌体外膜蛋白融合表达,展示在噬菌体颗粒的表面。由于外源蛋白或多肽的基因型和表型统一在同一噬菌体颗粒内,通过表型筛选就可以获得它的编码基因<sup>[8,9]</sup>。

脓毒症以炎症细胞特别是单核细胞的活化为起点,在各种炎症细胞的不断激活和各种炎症因子的大量释放中不断进展并加重,而 TREM-1 在这种级联放大机制中发挥了重要作用<sup>[2,3]</sup>。临床总结表明,外周血 sTREM-1(可溶性 TREM-1,能够竞争性结合 TREM-1 的天然配体结合而不产生生物学活性)水平增高和脓症患者生存率呈正相关<sup>[10]</sup>。在动物内毒素模型中,注射 mTREM-1/Fc 融合蛋白或者使用 siRNA 沉默 TREM-1 的表达均能抑制 TREM-1 传导通路,从而减少炎症因子的释放并提高实验动物的生存率<sup>[11,12]</sup>。

本研究显示,多肽 HYGMTHPNTMSH 能在体外直接、特异地与单核细胞高效结合,并阻断 TREM-1 蛋白与其天然配体的相互作用,抑制其通路的激活,减少炎症因子的释放、减轻炎症反应。细胞因子 ELISA 结果也显示该多肽能在一定程度上抑制 TNF- $\alpha$  和 MCP-1 的释放。在动物实验中,笔者采用化学方法合成了多肽 HYGMTHPNTMSH,发现其能显著减少 CLP 小鼠 48h 的死亡率。笔者计划进一步验证该多肽分子对脓毒症的治疗作用,并继续检测其他筛选出的噬菌体多肽的生物学活性。

致谢:感谢中山大学黎孟枫教授和李俊教授在分子生物学实验中对本研究工作的指导和帮助。

#### 参考文献

- [1] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, 420:885-891.
- [2] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*, 2000, 164:4991-4995.
- [3] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*, 2001, 410:1103-1107.
- [4] Fortin CF, Lesur O, Fulop TJ. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int Immunol*, 2007, 19:41-50.
- [5] Radaev S, Kattah M, Rostro B, et al. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Structure*, 2003, 11:1527-1535.
- [6] Kelker MS, Foss TR, Peti W, et al. Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J Mol Biol*, 2004, 342: 1237-1248.
- [7] Carson M, Johnson DH, McDonald H, et al. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007, 63(Pt 3):295-301.
- [8] Cheadle C, Ivashchenko Y, South V, et al. Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24034-24039.
- [9] Stockman BJ, Bannow CA, Miceli RM, et al. Chemical shift differences between free and Fab-bound peptide correlate with a two-stage selection of peptide sequences from a random phage display library to delineate critical and non-critical residues for antibody recognition. *Int J Pept Protein Res*, 1995, 45:11-16.
- [10] Mahdy AM, Lowes DA, Galley HF, et al. Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves *de novo* protein synthesis. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13:492-495.
- [11] Aoki N, Zganiacz A, Margetts P, et al. Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection. *Infect Immun*, 2004, 72:2477-2483.
- [12] Gibot S, Massin F, Marcou M, et al. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur J Immunol*, 2007, 37:456-466.