

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.03

犬新孢子虫巨噬细胞转移抑制因子(NcMIF)克隆表达与其免疫调节作用鉴定

王长江², 沈志强^{1,2}, 金婷婷², 武曰星², 刘 慧³, 曲光刚^{1*}

(1.山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600; 2.山东绿都生物科技有限公司, 山东滨州 256600; 3.华中农业大学, 湖北武汉 43000)

[收稿日期] 2017-06-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0018-06 [中图分类号] S852.7

[摘 要] 通过原核系统表达犬新孢子虫巨噬细胞转移抑制因子(NcMIF), 并对该蛋白的免疫调节作用进行分析。根据 GenBank 发表的序列, 利用分子生物学软件设计了一对特异性引物, 通过 RT-PCR 方法扩增出 NcMIF 全基因, 经测序分析后, 将 NcMIF 亚克隆到原核表达载体 pET28a(+), 然后将鉴定为阳性的重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中用 IPTG 进行诱导表达。利用 HPLC 对可溶性表达的重组 NcMIF 蛋白进行纯化, 去除内毒素, 最后对 NcMIF 的免疫调节作用进行鉴定。结果显示, NcMIF 没有明显的抗糖皮质激素的免疫抑制作用, 也没有上调巨噬细胞 TNF- α 和 NO 表达量的作用, 为进一步探究 NcMIF 的生物学功能及 MIF 在宿主免疫调节中的作用奠定了基础。

[关键词] 犬新孢子虫; 巨噬细胞转移抑制因子; 原核表达; 免疫调节

Cloning, Expression and Immunoregulatory Activities Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor Derived from *Neospora canium*

WANG Chang-jiang², SHEN Zhi-qiang^{1,2}, JIN Ting-ting², WU Yue-xing², LIU Hui³, QU Guang-gang^{1*}

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China; 2. Shandong LuDu Bio-Science and Technology Co., LTD, Binzhou, Shandong 256600, China; 3. Huazhong Agriculture University, Wuhan 430000, China)

Corresponding author: WANG Chang-jiang, E-mail: guanggangqu@163.com

Abstract: To express macrophage migration inhibitory factor (NcMIF) of *Neospora canium* by prokaryotic expression system and identify the enzyme activities of NcMIF, the NcMIF complete open reading frame (ORF) sequence was obtained based on sequences reported in the GenBank. And one pair of specific primers was designed to amplify the NcMIF gene from cDNA by using polymerase chain reaction (PCR) and the NcMIF ORF was sequenced and subcloned into pET28a(+). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and induced by IPTG. The recombinant protein was expressed in soluble way and purified by HPLC and endotoxin was removed from the recombinant protein and native proteins. Results showed that NcMIF had no effect to counter-regulate glucocorticoid activity in macrophages or to regulate TNF- α and nitric oxide production by macrophages.

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013CQ004)

作者简介: 王长江, 硕士, 从事病原源性免疫调节因子免疫调节功能的研究。

通讯作者: 曲光刚。E-mail: guanggangqu@163.com

It will establish the foundation to explore the biological function of NcMIF and its role in host immune regulation of MIF.

Key words: *Neospora canium*; macrophage migration inhibitory factor; prokaryotic expression; immunoregulatory

新孢子虫病 (Neosporiasis) 是一种原生动物性疾病,并在世界范围内广泛流行^[1]。犬新孢子虫 (*Neospora canium*) 不仅能够导致包括牛、羊、犬等孕畜流产、死胎和弱胎等严重繁殖障碍性疾病,还导致幼畜出现运动神经系统紊乱等症状,对养殖业造成极大的经济损失^[2-3]。同时,在病人血清中也有检测出新孢子虫阳性的报道^[4],因此犬新孢子虫也可能是人兽共患寄生虫病。但是迄今为止,尚未有根除犬新孢子虫的药物和有效预防犬新孢子虫的疫苗。

犬新孢子虫感染过程中,天然免疫系统中的很多成分被激活,如巨噬细胞、树突状细胞等,这些被激活的细胞会释放如 IL-2、TNF- α 等一系列细胞因子。哺乳动物的巨噬细胞转移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 作为细胞因子的一种,与机体的败血性休克有关^[5],具有调节巨噬细胞和淋巴细胞应答^[6]及内分泌的功能^[7]。它不仅能够抑制单核巨噬细胞的随机迁移和糖皮质激素的抗炎效果,而且能够抑制活化诱导的 p53 依赖性凋亡^[8]。MIF 还能够上调免疫细胞 TLR4 受体和促炎症细胞因子的表达,如 TNF- α 、IL- β 、IL-6、IL-8 和 IL-12 等,以及促进 NO 的分泌^[9]。MIF 能够在多种类型的细胞中表达,包括单核细胞、淋巴巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞^[10]。MIF 被证实能够与细胞表面的 CD74 受体结合^[11],同时也是趋化因子 CXCR2 受体非同源的配体^[12]。

研究发现,MIF 保守的 CXXC 序列是氧化还原酶作用的功能域;而 N 端第二位的脯氨酸则是互变异构酶活性的关键位点^[13]。尽管 MIF 蛋白的催化活性与生物学功能之间的关系还不是很清楚,但是抑制 MIF 的互变异构酶作用能够降低 LPS 刺激巨噬细胞产生的 TNF 的量,提高败血症模型动物的成活率^[14-15]。

近年来,许多的寄生虫 MIF 同系物被分离到,

这其中包括 *Strongyloides* MIF、*Trichinella spiralis* MIF 及 *Brugia malayi* MIF 等,并且这些 MIF 同系物具有和它们哺乳动物宿主相似的生物学功能和免疫调节作用^[16-18]。本研究克隆了 NcMIF 基因,利用大肠埃希菌进行表达并对该蛋白的免疫调节作用进行分析,为研究 NcMIF 在宿主免疫调节中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种 *E. coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 及 pMD-18T 载体购自大连宝生物工程有限公司; pET28a(+) 载体购自默克公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶及 PCR 反应试剂、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒及 DNA Marker DL2000、卡那霉素 (Kanamycin) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司产品; M - MuLV 反转录试剂盒购自 NEB 公司; BATEKE RNA 提取试剂盒购自百泰克生物公司; Western blot 发光底物购自 Thermo 公司; 实验用绵羊由山东省滨州畜牧兽医研究院繁育饲养; 其他常用试剂均为分析纯。

1.2 NcMIF 基因的克隆与测序 基于 NC1 NcMIF mRNA 序列 (NC1 NcMIF mRNA 序列 (NCLIV_042400, previously known as NC_LIV_113040, www.genedb.org), 利用分子生物学软件 PRIMER 5.0 设计出一对特异性引物, 通过 PCR 方法扩增出 NcMIF 基因。上游引物序列为 5'-ATACATATGCCAAAGTGCATGATCTAC-3', 其中在 5' 端加入 *Nde* I 酶切位点, 下游引物序列为 5'-TAAAGCTTTTAGCCAAAGGTGCGGTC-3', 其中在 5' 端加入 *Hind* III 酶切位点。采用 BATEKE RNA 提取试剂盒从犬新孢子虫中提取总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 利用 M-MuLV 反转录试剂盒合成 cDNA。以该 cDNA 为模板通过 PCR 方法扩增出 NcMIF 完整的阅读框, PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;

95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后, 连接到 pMD-18T 载体, 鉴定阳性克隆, 送上海生工测序并对测序结果进行分析比较。

1.3 NcMIF 蛋白的表达、内毒素的去除及纯化

将测序结果正确的基因片段亚克隆到 pET28a(+), 构建重组质粒 pET28a+NcMIF, 并转入大肠埃希菌 BL21(DE3), 以终浓度 1 mmol/L IPTG 37 ℃ 进行诱导表达 8 h。将诱导产物 4 ℃ 条件下 4000 ×g 离心 20 min, 取上清, 用裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, PMSF 1 mmol/L, pH8.0) 重悬细菌, -80 ℃/37 ℃ 反复冻融三次, 然后用终浓度 10 μg/mL 的 DNase/RNase 37 ℃ 消化 30 min, 然后 4 ℃ 条件下 20000 ×g 离心 20 min 取上清, 用于可溶性蛋白的纯化。

将蛋白用 Triton X-114 处理, 以去除内毒素。首先将 Triton X-114 加到上一步分离到的上清液中至 1% 的终浓度, 涡旋 10 s, 然后放置冰上 5 min, 涡旋之后 37 ℃ 孵育 10 min, 最后 20000 ×g, 38 ℃ 离心 2 min, 收集上清, 重复上述步骤 7 次, 直到内毒素浓度低于 50 EU/mg。重组蛋白 rNcMIF 经分子筛高压液相色谱法 (SECHPLC) 分离纯化, 通过 BCA 方法测定纯化后的蛋白浓度, 并通过 SDS-PAGE 对蛋白纯度和分子量进行分析。

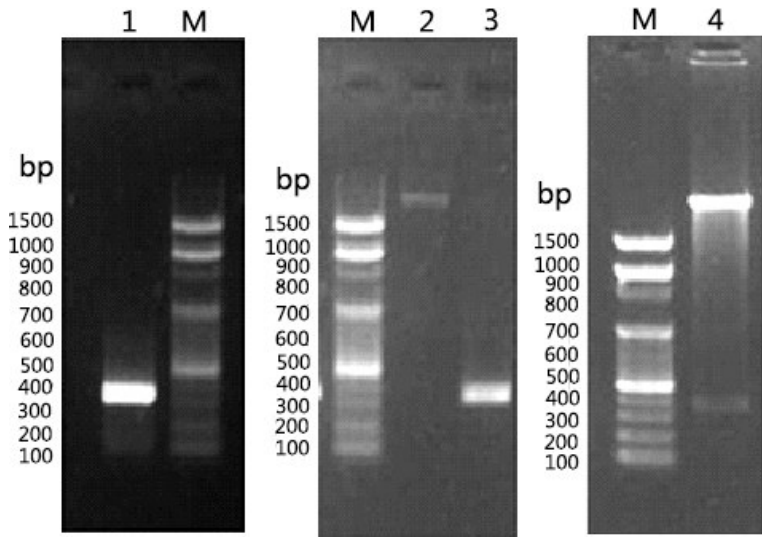
1.4 免疫印迹分析 NcMIF 样品经处理后在还原条件下用 12% SDS-PAGE 胶进行分离, 然后将蛋白转到 PVDV 膜上, 用 3% 的脱脂奶粉封闭 PVDV 膜后, 在羊抗全新孢子虫抗体 (1:200) 中室温下孵育 1 h, 然后用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗膜 5 次, 每次 5 min。将 PVDV 膜在 1:5000 的羊抗兔 IgG-HRP 二抗中室温条件下孵育 1 h, 然后用含有 0.05% Tween20 的 PBS 洗膜 5 次, 每次 5 min。用化学发光底物 (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) 进行显色并用成像仪拍照。

1.5 rNcMIF 抗地塞米松免疫抑制功能鉴定 将 500 μL 大约含有 1.5×10^5 个 RAW264.7 巨噬细胞的 DMEM 细胞培养液平铺于 48 孔细胞培养板中, 在 37 ℃, 5% CO_2 培养箱中培养 20~24 h。为判定 NcMIFs 对糖皮质激素的反向调节作用, 向含有或不含地塞米松 (DEX) 的培养基中分别加入递增浓度的 rNcMIF, 将细胞预培养 1 h, 然后加入脂多糖至终浓度 10 ng/mL, 继续培养 16 h, 收集细胞培养液上清, 4 ℃ 20000 ×g 离心 20 min。上清中的 TNF-α 和 NO 分别利用 ELISA 试剂盒 (eBioscience Inc, San Diego, CA) 和格里斯反应方法进行检测与分析。格里斯反应分析如 Straccia 等^[19] 所述, 即将 150 μL 样品加入 96 孔板中, 另外加入 20 μL 1 μmol/L 的磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Sigma, St. Louis, MO) 和 30 μL 含葡萄糖 (Sigma, St. Louis, MO)、葡萄糖磷酸脱氢酶 (Sigma, St. Louis, MO) 和硝酸还原酶的混合液。在孔中混合半小时, 然后分别加入 20 μL 1% 的磺胺和 20 μL 0.1% N-(1-萘基) 二盐酸乙二胺 (Sigma, St. Louis, MO)。孵育 5 min 后, 使用酶标仪 (Molecular Devices SpectraMax-Plus384, Ramsey, MN) 分别在 550 nm 和 650 nm 处读数。亚硝酸盐的浓度由亚硝酸钠标准曲线确定。

1.6 NcMIF 对 TNF-α 和 NO 的免疫调节作用鉴定 为了评估 NcMIF 对 TNF-α 和 NO 的免疫调节作用, RAW264.7 巨噬细胞用不同浓度的 rNcMIF 处理, 然后加入脂多糖继续培养 16 h, 收集细胞上清, 冻存于 -80 ℃ 备用, 同时设脂多糖空白组阴性对照, 上清中的 TNF-α 和 NO 含量检测方法同 1.5。

2 结 果

2.1 NcMIF 基因克隆 利用一对特异性的引物, 通过 PCR 的方法扩增到一条约 348 bp 的产物, 核酸电泳结果如图 1 所示。将测序正确的 NcMIF 亚克隆到 pET28a 表达载体, 构建重组表达质粒 pET28a-NcMIF, 并用 Nde I 和 Hind III 双酶切鉴定, 电泳结果如图 1 第 2、3 和 4 泳道所示。



M; DNA marker; 1; NcMIF PCR 产物; 2; pET28a 载体双酶切产物; 3; NcMIF PCR 双酶切产物; 4; 重组表达质粒 pET28-NcMIF 双酶切产物

M; DNA marker; 1; PCR product of NcMIF; 2: double digested production of pET28a; 3: double digested production of NcMIF;
4: double digested production of recombinant pET28-NcMIF

图 1 NcMIF PCR 扩增及重组表达载体构建、鉴定

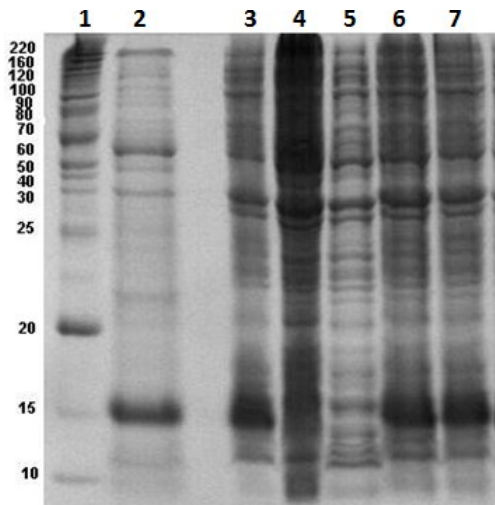
Fig 1 Amplification of NcMIF by PCR and construction and identification of recombinant expression vector

2.2 重组 NcMIF 的表达与纯化 NcMIF 重组大肠埃希菌 BL21(DE3)在 37 ℃用 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达,经过 SDS-PAGE 电泳验证,蛋白在分子量 11 kDa 处均有条带,且部分为可溶性表达。重组蛋白用 SECHPLC 进行纯化,纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定(图 2)。去除内毒素后 rNcMIF 内毒素含量低于 0.5 EU/mL。

2.3 NcMIF 的免疫印迹分析 NcMIF 免疫印迹结果表明在 11 kDa 左右出现明显的条带(图 3),说明 rNcMIF 能够与犬新孢子虫的阳性血清反应。

2.4 rNcMIF 抗地塞米松免疫抑制功能鉴定 在 RAW264.7 巨噬细胞中验证 rNcMIF 抗地塞米松免疫抑制实验结果表明,不同浓度的 rNcMIF 均没有表现出抗糖皮质激素免疫抑制作用来上调巨噬细胞 TNF-α 和 NO 产量的功能(图 4A、B)。

2.5 NcMIF 对 TNF-α 和 NO 的免疫调节作用 RAW264.7 巨噬细胞用不同浓度的 rNcMIF 处理,然后加入 LPS 继续培养 16 h,收集细胞上清,检测 TNF-α 和 NO 的含量变化,结果证明 rNcMIF 同样也没有上调巨噬细胞 TNF-α 和 NO 的表达(数据未提供)。

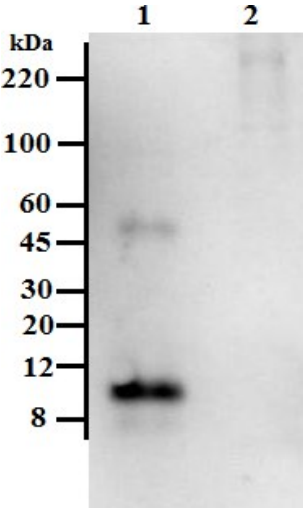


1:蛋白 Marker; 2:表达结束后超声的沉淀; 3:表达结束后超声的上清;
4:阴性对照; 5:诱导 2 h 的结果; 6:诱导 6 h 的结果;
7:诱导 8 h 的结果

1:protein marker; 2:precipitation of expression products after ultrasonication;
3:supernatants of expression products after ultrasonication; 4:negative control;
5:expression products induced within 2 h; 6:expression products induced within 6 h; 7:expression products induced within 8 h;

图 2 重组 NcMIF 蛋白在大肠埃希菌中的表达

Fig 2 Expression of recombinant NcMIF protein by *E.coli* BL21 (DE3)



1:重组 NcMIF 蛋白;2:阴性对照
1: recombinant NcMIF protein; 2: negative control

图 3 NcMIF 免疫印迹结果

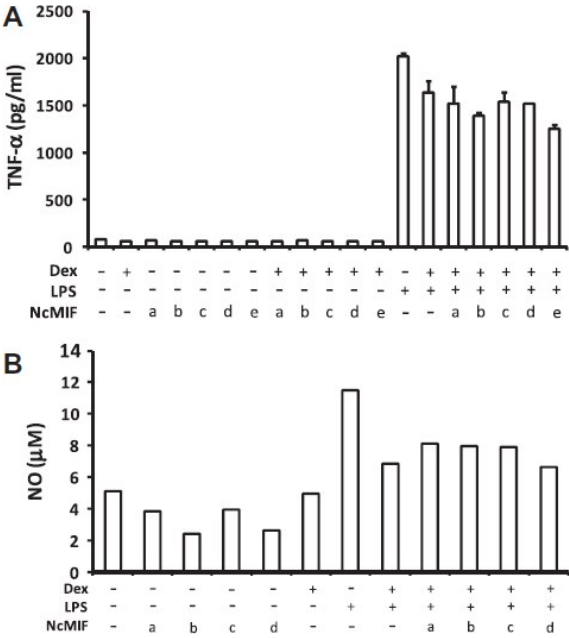
Fig 3 Western blot analysis of NcMIF

3 讨 论

研究表明,马拉布鲁线虫来源的 MIF (BmMIF-1) 与人类 MIF 一样,具有控制巨噬细胞趋化运动的功能;在体外,BmMIF-1 能够增加巨噬细胞 TNF-α 与 IL-8 的表达;在体内,BmMIF-1 又通过诱导激活的巨噬细胞产生,促使 T 细胞向 Th2 细胞分化,使宿主产生 Th2 免疫应答,最终抑制促炎症细胞因子的产生,这成为拉布鲁线虫逃避宿主免疫应答的重要手段^[20-21]。这种免疫调节作用很可能与 MIF 的氧化还原酶和互变异构酶两种酶的功能有关。

本研究首次报道了犬新孢子虫 MIF 同系物。通过分析发现,NcMIF 具有哺乳动物 MIF 高度保守的氨基酸残基,说明 NcMIF 可能具有与哺乳动物 MIF 相似的生物学活性。为进一步研究 NcMIF 的相关功能和生物学特性,本研究利用原核表达系统成功表达了可溶性的 rNcMIF,并通过 HPLC 系统对蛋白进行了纯化。通过对 rNcMIF 抗地塞米松免疫抑制功能和对 TNF-α 和 NO 的免疫调节作用进行研究,发现 rNcMIF 没有上述的免疫调节功能,由于 NcMIF 的免疫调节功能与 MIF 的氧化还原酶和互变异构酶活性密切相关,所以下一步将对 NcMIF 的酶进行鉴定。

关于 NcMIF 的其他生物学活性,以及 NcMIF



Dex:地塞米松,10 nmol/L 用于 TNF-α 检测,100 nmol/L 用于一氧化氮检测。LPS:脂多糖,200 pg/mL 用于 TNF-α 检测,10 ng/mL 用于一氧化氮检测。a 至 e 处 NcMIF 浓度分别为 0.01、0.1、1、10 和 100 ng/mL

Dex, dexamethasone at 10 nmol/L for TNFa assay and 100 nmol/L for nitric oxide assay; LPS, lipopolysaccharide at 200 pg/mL for TNFa assay and 10 ng/mL for nitric oxide assay; a through e, Nc MIF at 0.01. 0.1, 1, 10, and 100 ng/mL, respectively

图 4 NcMIF 在有或无 LPS 和 DEX 存在条件下对鼠巨噬细胞细胞系 RAW264.7 的 TNF-α (A) 和 NO (B) 产量的影响

Fig 4 Effects of NcMIF in the presence or absence of LPS and DEX on TNF-α (A) and nitric oxide (B) production by the mouse macrophage cell line, RAW264.7.

对在寄生虫感染宿主、逃避宿主免疫系统中发挥的作用有待进一步研究,为有效防控犬新孢子虫提供更多参考。

参考文献:

[1] Reichel M P, Ayanegui-Alcérrec M A, Gondim L F P, et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question[J]. International Journal for Parasitology, 2013, 43(2): 133-142.

[2] Ihara F, Nishimura M, Muroi Y, et al. Changes in neurotransmitter levels and expression of immediate early genes in brain of mice infected with *Neospora caninum*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23052.

[3] Peters M, Osmann C, Wohlsein P, et al. *Neospora caninum* a-

- bortion in a Malayan tapir (*Tapirus indicus*) [J]. *Veterinary Parasitology*, 2017, 239: 37–41.
- [4] Fereig R M, AbouLaila M R, Mohamed S G A, *et al.* Serological detection and epidemiology of *Neospora canium* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in southern Egypt [J]. *Acta tropica*, 2016, 162: 206–211.
- [5] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R A, *et al.* MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia [J]. *Nature*, 1993, 365(6448): 756–759.
- [6] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell R A, *et al.* The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 179(6): 1895–1902.
- [7] Abe R, Peng T, Sailors J, *et al.* Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(2): 747–753.
- [8] Roger T, Glauser M P, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria [J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2001, 7(6): 456–460.
- [9] Donnelly S C, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease [J]. *Molecular Medicine Today*, 1997, 3(11): 502–507.
- [10] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(10): 791–800.
- [11] Leng L, Metz C N, Fang Y, *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74 [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197(11): 1467–1476.
- [12] Bernhagen J, Krohn R, Lue H, *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(5): 587–596.
- [13] Stamps S L, Fitzgerald M C, Whitman C P. Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(28): 10195–10202.
- [14] Morand E F, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(5): 399–411.
- [15] Dabideen D R, Cheng K F, Aljabari B, *et al.* Phenolic hydrazones are potent inhibitors of macrophage migration inhibitory factor proinflammatory activity and survival improving agents in sepsis [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(8): 1993–1997.
- [16] Younis A E, Soblik H, Ajonina-Ekoti I, *et al.* Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite–host cell interface [J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(3): 279–289.
- [17] Nisbet A J, Smith S K, Armstrong S, *et al.* *Teladorsagia circumcincta*: activation-associated secreted proteins in excretory/secretory products of fourth stage larvae are targets of early IgA responses in infected sheep [J]. *Experimental Parasitology*, 2010, 125(4): 329–337.
- [18] Pastrana D V, Raghavan N, FitzGerald P, *et al.* Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor [J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(12): 5955–5963.
- [19] Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, *et al.* Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein β [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 156.
- [20] Han C, Lin Y, Shan G, *et al.* Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(10): 1524–1532.
- [21] Shao D, Zhong X, Zhou Y F, *et al.* Structural and functional comparison of MIF ortholog from *Plasmodium yoelii* with MIF from its rodent host [J]. *Molecular Immunology*, 2010, 47(4): 726–737.

(编辑:陈希)