

海洋生物技术

长江江豚 TRAIL 基因的克隆、体外表达及生物学功能分析

裴丽丽^{1,2}, 章纬菁¹, 卢佳¹, 黄芳¹, 曹倩倩¹, 任文华¹

1 南京师范大学 生命科学学院 江苏省分子医学重点实验室, 江苏 南京 210046

2 南京医科大学 康达学院, 江苏 连云港 222000

裴丽丽, 章纬菁, 卢佳, 等. 长江江豚 TRAIL 基因的克隆、体外表达及生物学功能分析. 生物工程学报, 2016, 32(5): 610–620.

Pei LL, Zhang WJ, Lu J, et al. Molecular cloning, *in vitro* expression and bioactivity of TRAIL (TNFSF10) gene from finless porpoises. Chin J Biotech, 2016, 32(5): 610–620.

摘 要: 构建可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 基因的表达体系, 研究其蛋白表达产物对肿瘤细胞凋亡的影响, 为以后江豚免疫系统的研究奠定基础。通过 RT-PCR 技术从江豚 *Neophocaena phocaenoides* 血液总 RNA 中反转录扩增出肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (简称 fTRAIL) 的全长 cDNA 序列, 并将 fTRAIL 的胞外可溶性 (简称 fsTRAIL) 片段连接入表达载体 pET43.1a 中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达并纯化, Western blotting 对产物 Nus-His-fsTRAIL 蛋白进行鉴定。体外用 MTT 法、台盼蓝拒染法及流式细胞术检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 细胞和 HeLa 细胞的影响。成功构建了 fTRAIL 胞外可溶性片段 (简称 fsTRAIL) 与 pET43.1a 组成的表达载体, 并获得 Nus-His-fsTRAIL 蛋白。体外实验表明, Nus-His-fsTRAIL 蛋白能够以剂量依赖的方式抑制 Jurkat 和 HeLa 细胞的增殖并诱导其凋亡。Nus-His-fsTRAIL 表达产物具有对 Jurkat 和 HeLa 细胞体外抗肿瘤活性的作用。

关键词: TRAIL, 江豚, 细胞凋亡, Jurkat 细胞, HeLa 细胞

Received: October 10, 2015; **Accepted:** March 14, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31370401).

Corresponding author: Wenhua Ren. Tel/Fax: 86-25-85891163; E-mail: spidervenom@163.com

国家自然科学基金 (No. 31370401) 资助。

Molecular cloning, *in vitro* expression and bioactivity of TRAIL (TNFSF10) gene from finless porpoises

Lili Pei^{1,2}, Weijing Zhang¹, Jia Lu¹, Fang Huang¹, Qianqian Cao¹, and Wenhua Ren¹

¹ Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, Jiangsu, China

² Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, Jiangsu, China

Abstract: To construct soluble TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) expression system and investigate the effect of the expression product on tumor cell. It may provide valuable information for research into the immune system of the finless porpoise. The full-length cDNA of TRAIL (designated fTRAIL) was cloned from the total RNA of the finless porpoises blood using RT-PCR techniques and then the extracellular soluble fragments of fTRAIL (designated fsTRAIL) was ligated into pET43.1a. Recombinant soluble fTRAIL (pET43.1a-fsTRAIL) fused with Nus-his tag was efficiently expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and the Nus-His-fsTRAIL protein was purified. The expression of Nus-His-fsTRAIL was verified by Western blotting. *In vitro*, the effects of the purified Nus-His-fsTRAIL protein on Jurkat and HeLa cells were detected by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) assay, TrypanBlue and Flow Cytometry analysis. The expression system pET43.1a-fsTRAIL was constructed and Nus-His-fsTRAIL protein was expressed successfully. *In vitro*, the Nus-His-fsTRAIL protein was able to inhibit the proliferation and induce apoptosis of Jurkat and HeLa cells in a dose-dependent manner. The Nus-His-fsTRAIL protein has anti-tumor activity against Jurkat and HeLa cells *in vitro*.

Keywords: TRAIL, finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*), apoptosis, Jurkat cells, HeLa cells

肿瘤坏死因子 (TNF) 是 1975 年 Carswell 等发现的一种能使肿瘤细胞凋亡、坏死的细胞因子。细胞凋亡是一个内在基本的细胞程序化死亡过程, 在多细胞有机体的发展和组织稳态的维持中起着关键的作用^[1]。TRAIL 是在其序列同源性的基础上, 于 1995 年由 Wiley 首次发现^[2], 与肿瘤坏死因子配体家族的其他成员一样, TRAIL 对体外的细胞系包括一些肿瘤细胞系具有诱导细胞凋亡的作用。与其他 TNF 家族成员相比, TRAIL 具有两个特性: 一是 TRAIL 在大多数组织中都能表达, 而其他 TNF 家族成员的表达受到严格调控并在活化的细胞中暂时表达^[3]。第二, TRAIL 是一个促凋亡配体, 目前发现在一些肿瘤和炎症细胞中能够高表达,

如小儿恶性肿瘤^[4]、肾脏疾病^[5]、类风湿关节炎、骨关节炎和脊柱关节病等^[6], 但其对正常细胞无明显毒性^[7], 这意味着, TRAIL 在癌症治疗中具有潜在的治疗作用^[8-11]。TRAIL 在与其受体结合时形成三聚体, 并诱导其受体也形成三聚体而相互结合, 从而选择性地诱导肿瘤细胞发生凋亡。这些特性预示着 TRAIL 在治疗肿瘤方面有着广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、细胞和宿主菌

江豚新鲜外周血从安徽铜陵繁育中心淡水长江江豚体检期间获得; 实验用细胞系 Jurkat

细胞与 HeLa 细胞由本实验室保存；大肠杆菌 *E. coli* Top10、DH5 α 、BL21 和 pET-43.1a 由本实验室保存；pMD19-T 载体购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂

动物血液 RNA 提取试剂盒、PrimeScriptTM 1st Strand cDNA 合成试剂盒、pMD19-T 载体试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、感受态细胞制备试剂盒、蛋白 Marker、荧光定量 PCR 试剂盒、*rTaq* 酶和限制性内切酶等均购自 TaKaRa 公司；割胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒均购自 Axygen 公司；T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶、磷酸激酶和预染蛋白 Marker 等均购自 Fermentas 公司；鼠 His₆ 一抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 购自 TIANGEN 公司；FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (R&D Systems Inc., USA) 和 IPTG 购自 Promega 公司；所有引物合成及测序由上海英骏公司完成；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 江豚外周血总 RNA 的提取

使用动物血液 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit, Qiagen) 提取江豚外周血总 RNA，实验方法步骤按照试剂盒中的说明书进行。

1.2.2 江豚 TRAIL (fTRAIL) 基因的克隆

通过 BLAST，在 NCBI 数据库中获得牛 (GenBank Accession No. AC_000158.1)、羊 (GenBank Accession No. ADL27922) 和猪 (GenBank Accession No. ABV21385) 的 TRAIL 基因^[12] 根据同源性比对利用 Primer 5.0 软件^[13] 设计一对简并引物：正义引物 fTRAIL F1 和反义引物 fTRAIL F2 (表 1)。用上述简并引物进行 RT-PCR 试验。扩增参数：95 °C 5 min；35 个循环 (94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min)；最后

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer	Direction	Nucleotide sequence (5'-3')
fTRAIL F1	Forward	ATGGCCAGCTCAGCTTC CCTGC
fTRAIL F2	Reverse	TTAGCCCACGAGGAAG GCTCCA
fsTRAIL F1	Forward	CCGGAATTCACCAACG AGCTGAAGCAGATGCA
fsTRAIL F2	Reverse	CCGCTCGAGGCCAATTA AAAAGGCCCCGA

72 °C 孵育 7 min。RT-PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后，观察并记录结果。按 Axygene 公司的 DNA 胶回收试剂盒操作说明进行割胶回收约 870 bp 的 DNA 片段。

1.2.3 生物信息学分析

为克隆 fTRAIL cDNA 序列并对所得序列进行生物信息学分析，使用以下软件和网站：1) 从 NCBI 网站获得 TRAIL 基因序列、氨基酸序列，以及 fTRAIL 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF)，并对相应的氨基酸序列进行预测；2) 使用 3D-JIGSAW 和 SWISS-MODEL 服务器预测三级结构，并用 RasMol 软件查看；3) 使用 Clastal W 软件^[14] 进行多重比对分析；4) 在序列多重比对的基础上，使用 MEGA 5.0 软件中的 Maximum Likelihood 法构建系统树。

1.2.4 融合表达载体 pET43.1a-fsTRAIL 的构建

研究表明，TRAIL 的可溶型是其功能发挥的主要形式，根据 fTRAIL 的胞外可溶区 (fsTRAIL) 设计一对含有 pET43.1a 酶切位点的基因特异性引物：fsTRAIL F1 (含 *EocR* I 位点) 与 fsTRAIL F2 (含 *Xho* I 位点) (表 1)。PCR 反应程序：94 °C 5 min；35 个循环 (94 °C 30 s；56 °C 30 s；72 °C 1 min)；最后 72 °C 延伸 7 min。将 PCR 反应产物经电泳、纯化回收 PCR 产物

(870 bp 左右)。以 *EcoR* I、*Xho* I 酶切 PCR 产物与 pET43.1a 载体，然后进行 pET43.1a 载体的去磷酸化与 fsTRAIL 目的片段的磷酸化，两者进行连接反应，构建 pET43.1a-fsTRAIL 表达载体。

1.2.5 连接产物的转化、表达及纯化鉴定

原核表达载体 pET43.1a-fsTRAIL 在大肠杆菌中的表达。首先将原核表达载体 pET43.1a-fsTRAIL 转入大肠杆菌 BL21 (DE3)，挑取含表达质粒的转化菌株，于 LB 培养基 (含 Amp^r) 中，37 °C、220 r/min 培养至 A₆₀₀ 达 0.4–0.6 时，加入 1 mol/L IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L，16 °C、100 r/min 振荡培养 24 h，诱导 pET-43.1a-fsTRAIL 重组蛋白可溶性的表达。培养液在冰上超声破碎后，分离上清和沉淀，用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达。然后用镍柱亲和层析纯化可溶性重组蛋白 Nus-His-fsTRAIL，取出少量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，将其余蛋白质溶液放于 4 °C 冰箱备用。用 1× PBS (pH 8.0) 对收集的蛋白液进行透析浓缩后根据需要保存于 -70 °C。按同样的方法纯化空载体 pET-43.1a 的表达产物，即 Nus-His 标签蛋白。通过 Western blotting 鉴定纯化的蛋白表达产物。

1.2.6 重组可溶性蛋白生物活性测定

对纯化的 Nus-His-fsTRAIL 蛋白进行生物学活性检测，并以 Nus-His 标签蛋白作为对照。采用倒置显微镜及台盼蓝拒染法观察不同浓度上述两种蛋白在不同时间对白血病 T 细胞 (Junkat 细胞) 和人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞) 形态的影响；MTT 法检测在不同浓度作用下，重组蛋白对肿瘤细胞的抑制作用；经 MTT 法和台盼蓝拒染法检测后，选取适宜浓度的重组蛋白

及适宜的时间梯度，使用流式细胞术检测重组蛋白对 Junkat 细胞的促凋亡作用。

2 结果与分析

2.1 江豚全长 fTRAIL cDNA 和预测氨基酸序列分析

江豚 TRAIL 的开放阅读框为 864 bp，编码一个 288 个氨基酸的 fTRAIL 蛋白质。克隆所得全长 cDNA 序列和预测的氨基酸序列如图 1A 所示。fTRAIL 的 cDNA 序列已提交 GenBank 数据库 (GenBank Accession No. KF151167)。江豚 TRAIL 序列含预测的细胞质结构域，一个跨膜结构域 (氨基酸 18–38) 和一个由 250 个氨基酸组成的胞外结构域。它具有 TNF 结构域、一个保守的半胱氨酸残基和预测的糖基化位点。fTRAIL 是典型的 II 型跨膜蛋白 (图 1B)。在氨基酸水平上，用 Clustal 软件分析显示，江豚和马、人、狗及牛之间的序列同源性分别为 86%、79%、82% 和 80% (图 1B)。

2.2 江豚和人 TRAIL 胞外区氨基酸序列比对及其蛋白质空间结构分析

人 TRAIL (hTRAIL) 胞外区与受体结合部位为 C 端的 114–281 位氨基酸，江豚 TRAIL (fTRAIL) 胞外区与受体结合部位为 C 端的 119–289 位氨基酸，如图 2 所示，hTRAIL (114–281) 与 fTRAIL (119–289) 氨基酸序列比对，相似度为 83.3% 以上。尽管二者在氨基酸水平上存在一定的差异，但预测 fTRAIL 的胞外功能区 3D 结构 (c, d) 和 hTRAIL 胞外区 3D 结构 (a, b) 非常相似。这表明江豚的 TRAIL 与人 TRAIL 可能具有相似的生物学功能。

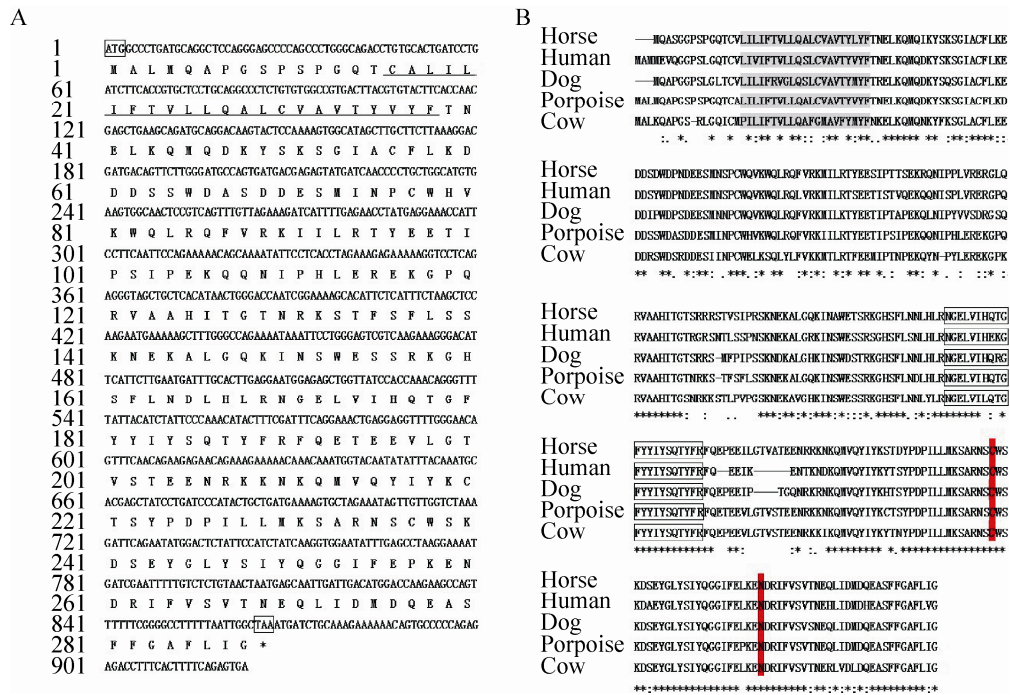


图 1 fTRAIL 基因的 cDNA 序列和氨基酸序列
 Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of fTRAIL. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequences of fTRAIL. The initiation codon and the stop codon are boxed, and the stop codon is indicated by an asterisk (*). The putative transmembrane domain is underlined. (B) Amino-acid sequence alignment of TRAIL from several species: finless porpoise, human, dog, cow, and horse were performed using Clustal W software. Identical amino acids among all sequences are indicated by “*”, whereas those with high or low similarity are indicated by “:” and “.” respectively. The putative transmembrane domain is marked by gray shadings. The TNF superfamily signature is boxed. The conserved cysteine and asparagine site are marked by red shadings.

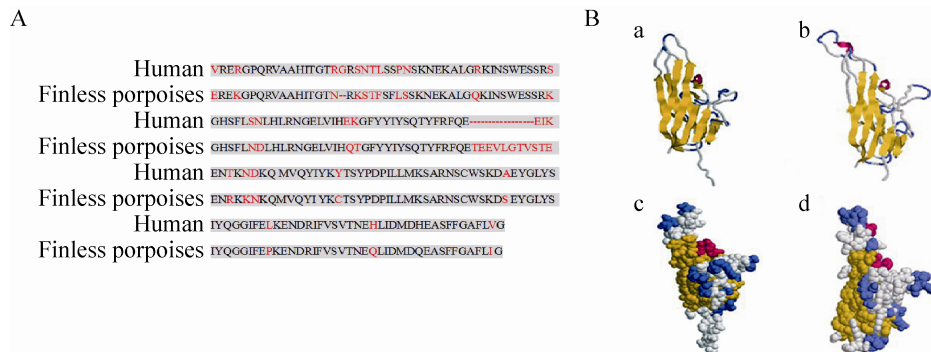


图 2 fsTRAIL (aa119-289) 与 hsTRAIL (aa 114-281) 胞外区氨基酸序列比较及其蛋白质空间结构比较
 Fig. 2 Amino acid sequence alignment and homology modelling of the fsTRAIL monomer (aa 119-289) based on the human structure (aa 114-281). (A) The amino acid sequence alignment of fsTRAIL and human sTRAIL. (B) The homology modelling of the fsTRAIL and human sTRAIL. For cartoons display and sphere display of structure models: yellow represents β strands, red represents α -helix, blue represents turns and whites represent other residues. (a) and (b) represent the cartoon display and sphere display of the 3D structure of human sTRAIL, respectively. (c) and (d) represent the cartoon and sphere displays of the 3D structure of fsTRAIL, respectively.

2.3 系统进化树分析

为确定江豚 TRAIL 基因在进化中的位置,运用 Maximum Likelihood 法构建了 20 个脊椎动物的 TRAIL 序列的系统进化树。如图 3A 所示,系统树主要分两个分支,一个是鱼类的分支,一个是哺乳类和鸟类的分支。江豚 TRAIL 与哺乳动物的偶蹄目在进化上接近,而与其他非哺乳动物的 TRAIL 序列较远。为进一步确定江豚在进化上的位置,我们又用 GILT 基因构建了系统进化树,如图 3B 所示,江豚与偶蹄目哺乳动物在进化上依然比较接近。以上结果表明江豚可能与偶蹄目哺乳动物具有共同的原始祖先。

2.4 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

为检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白的生物学活性,将重组 pET43.1a-fsTRAIL 导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。经 SDS-PAGE 检测 (图 4) 显示,在大约 90 kDa 处为目的蛋白,即 Nus-His-fsTRAIL 蛋白,经 IPTG 诱导 24 h 达到最大表达量。经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化后,收集的蛋白经 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 检测,结果见图 4。

2.5 MTT 法检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白

采用 MTT 法检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 与 HeLa 肿瘤细胞的作用。从图 5 中可以

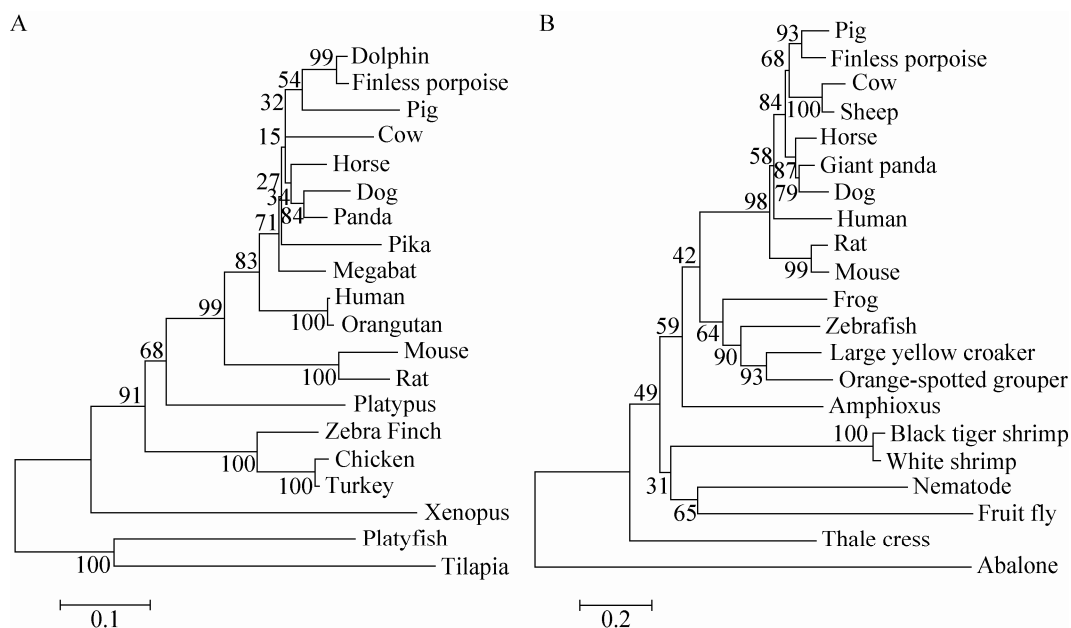


图 3 最大似然法构建系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood method using MEGA 5.0 packages and was bootstrapped 1 000 times. (A) Phylogenetic tree showing the relationship between fTRAIL DNA sequences and other identified TRAIL sequences. (B) The phylogenetic tree showing the relationship of GILT sequences from different species.

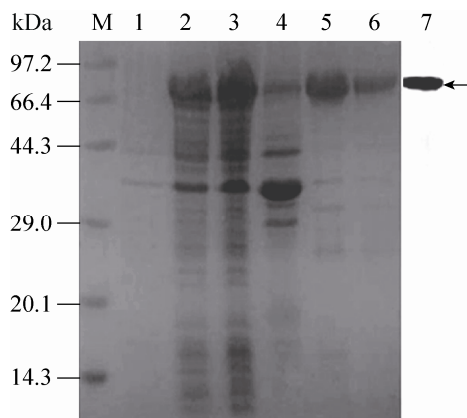


图4 SDS-PAGE 分析 Nus-His-fsTRAIL 蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of Nus-His-fsTRAIL protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3). M: low molecular weight marker. Lane 1: cell lysates of bacteria transformed with pET43.1a-fsTRAIL without IPTG induction; Lane 2: induced recombinant BL21; Lane 3: the recombinant BL21 supernatant; Lane 4: the recombinant BL21 precipitation; Lane 5: the fusion protein purified by the Ni-IDA affinity chromatography; Lane 6: the secondary chromatography from Lane 5 protein by the Ni-IDA affinity chromatography; Lane 7: the Western blotting analysis of purified Nus-His-fsTRAIL fusion protein using mAb against His6-tag. The arrow represents the location of Nus-His-fsTRAIL fusion protein.

看出,以 Nus-His 标签蛋白作为对照,在不同浓度下,Nus-His-fsTRAIL 蛋白表现出抑制细胞增殖的作用,而且这种作用呈剂量依赖性。

2.6 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 和 HeLa 细胞作用的形态观察

采用不同浓度梯度,在光学显微镜下观察 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 和 HeLa 细胞作用,并选择反应 36 h 后进行台盼蓝拒染实验。从图 6 中可以看出随着时间和浓度的增加,细胞发生了明显的破裂和死亡。

2.7 流式细胞仪检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白的促 Jurkat 细胞凋亡作用

Nus-His 标签蛋白与 Nus-His-fsTRAIL 蛋白分别对 Jurkat 细胞作用 36 h 后,进行流式细胞仪检测。结果显示,Nus-His 标签蛋白对 Jurkat 细胞作用后,在凋亡区 FITC (+)/PI(-) 检测到少量细胞 (5.67%) (图 7A); Nus-His-fsTRAIL 对 Jurkat 细胞作用后,在早期凋亡区 FITC (+)/PI(-) 检测到少量细胞 (7.71%),在晚期凋亡区 FITC (+)/PI(+) 检测到较多的细胞 (40.97%) (图 7B)。

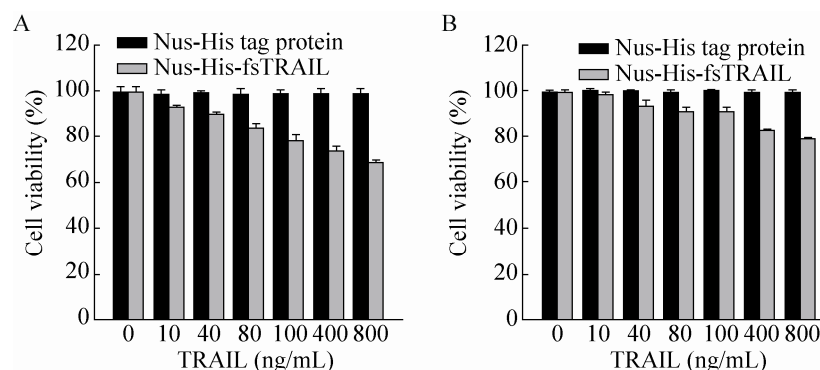


图5 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 和 HeLa 细胞活性的影响

Fig. 5 Effect of Nus-His-fsTRAIL protein on the viability of Jurkat and HeLa cell lines by MTT assay. (A) The Jurkat cells were treated with different concentrations of the Nus-His-fsTRAIL or Nus-His tag protein at indicated amounts. (B) HeLa cells were treated with different concentrations of the Nus-His-fsTRAIL or Nus-His tag protein at indicated amounts. The cell viability was examined after treatment with MTT 24 h. Each treatment was performed in triplicate. Values are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments.

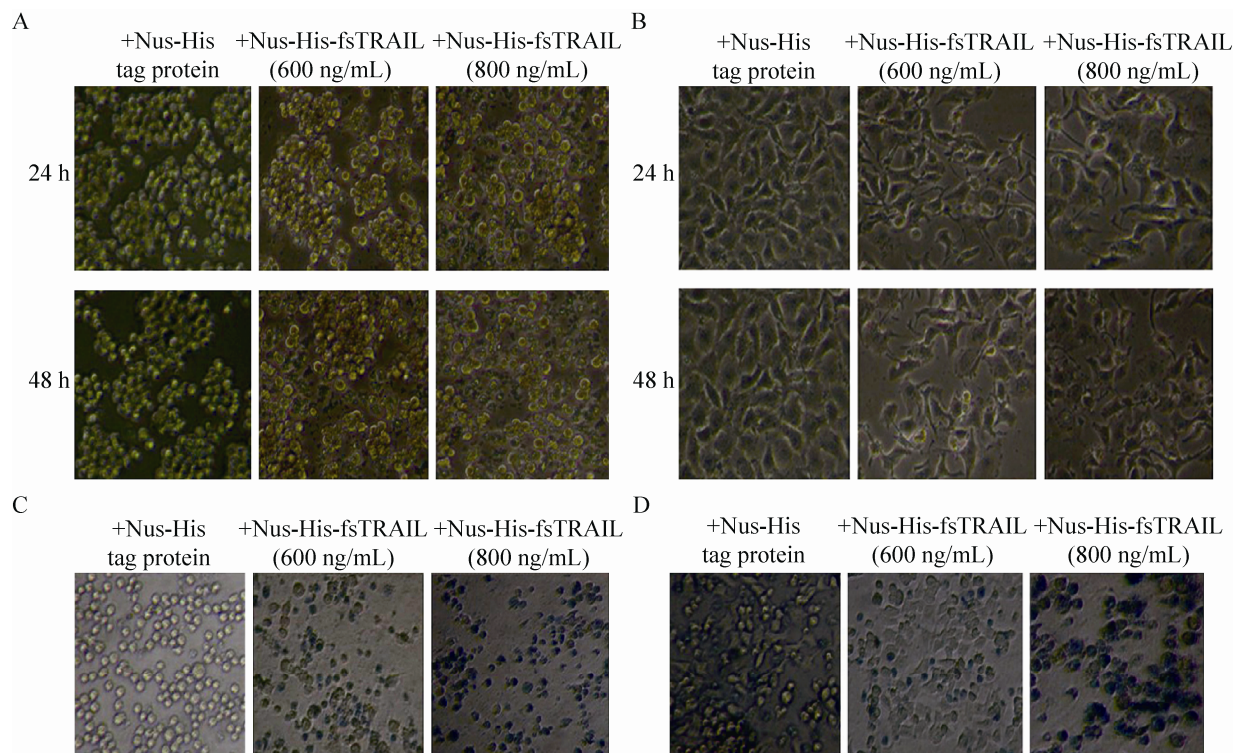


图 6 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 和 HeLa 细胞作用后形态学的改变

Fig. 6 Morphology of Jurkat and HeLa cell was visualized under a Nikon Eclipse TE2000-U inverted phase-contrast microscope (200 \times) equipped with digital camera. (A) and (B) The morphology of Jurkat cells and HeLa cells were photographed under an inverted microscope after treating with different concentrations and different time of the Nus-His-fsTRAIL protein or Nus-His tag protein at indicated amounts, respectively. (C) and (D) Jurkat cells and HeLa cells were stained by Trypan Blue after treating with different concentrations at 36 h of the Nus-His-fsTRAIL protein or Nus-His tag protein at indicated amounts, respectively.

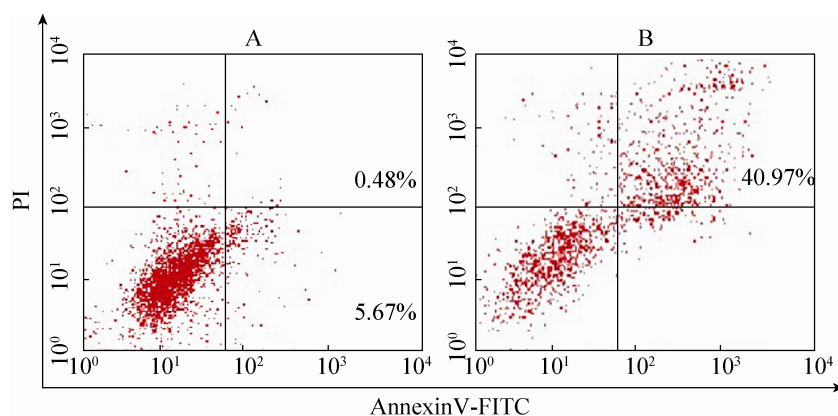


图 7 流式细胞仪检测 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 细胞的促凋亡作用

Fig. 7 The apoptotic effect of fsTRAIL on the Jurkat cell was examined by flow cytometry. (A) Jurkat cells were treated with 800 ng/mL of the Nus-His tag protein. (B) Jurkat cells were treated with 800 ng/mL of the Nus-His-fsTRAIL protein.

3 讨论

与陆生哺乳动物一样,水生哺乳动物的免疫系统包括天然免疫和适应性免疫。目前,许多脊椎动物的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的基因已成功克隆^[15-16]。然而,水生哺乳动物 TRAIL 仍未见报道。本实验成功克隆了江豚 TRAIL 的 CDS 序列并进行了测定。这是第一个被克隆并鉴定的水生哺乳动物 TRAIL 基因。克隆策略是依据江豚与其他哺乳动物序列之间的同源性进行的。

江豚 TRAIL (fTRAIL) 也具有 TRAIL 蛋白的典型特征。首先, fTRAIL 蛋白也是一个 II 型跨膜蛋白,有跨膜区且没有启动子;其次, fTRAIL 具有 N 端非保守区,而 C 端不同物种之间具有较大的保守性;第三,人 TRAIL (hTRAIL) 蛋白的 Cys230 是 TRAIL 发挥作用所必需的,通过形成分子间二硫键诱导凋亡^[17],而 fTRAIL 也具有 Cys230。据报道,鲸类与有蹄类动物(偶蹄目)非常相似^[18]。我们的研究表明,与其他氨基酸序列相比,江豚 TRAIL 与偶蹄目动物 TRAIL 比如猪有 88%相似、与牛相似度有 80% (图 2.1b)。但 fTRAIL 与非洲爪蟾和岩鸽只有 46%的相似性,与其他无脊椎动物(包括果蝇、海鞘和鲍鱼)只有 15%–20%的相似性,这也预示着 fTRAIL 可能与偶蹄目动物具有相同的祖先,可以为鲸类免疫进化的研究提供一定参考。虽然氨基酸序列比对显示 fTRAIL 序列与偶蹄目序列具有高度相似性,但在某些氨基酸位点上也存在明显差异,这表明,与陆生哺乳动物相比,鲸类哺乳动物为了适应水中的环境可能进行了某些适应性进化。

通过氨基酸序列比对构建系统进化树,获得了江豚与其他脊椎动物的亲缘关系,结果表明江豚与偶蹄目哺乳动物的亲缘关系最近。这一观点同时也被江豚同其他物种的 GILT 氨基酸序列比对所验证^[19]。

人 TRAIL 与受体结合的胞外区为 C 端的 114–281 位氨基酸,为 TRAIL 的活性部分,有一个 N-糖基化位点并有蛋白酶作用位点,可以被蛋白酶从膜上剪切下来,形成可溶性分子 sTRAIL^[8]。因此,我们将人 sTRAIL (114–281) 与江豚的 fsTRAIL (119–289) 进行了氨基酸序列比对,结果表明,它们的相似度在 83.3%以上,即与受体结合部位的氨基酸序列基本一致。通过蛋白质的 3D 结构预测分析,人 sTRAIL 与江豚的 fsTRAIL 蛋白具有类似的三维结构。重要空间结构的氨基酸是非常保守的,这表明 fsTRAIL 可能也具有人 sTRAIL 类似的功能,能够与人肿瘤细胞上的相应受体相结合,这为后续对江豚 TRAIL 胞外可溶片段的表达产物的活性检测奠定基础。此外,因为我们很难获得江豚的新鲜组织材料,TRAIL 基因在各种器官组织(心脏、肾脏、脾脏、肝脏、肺和肠等)的表达水平无法检测,但根据目前的研究表明,TRAIL 基因的 mRNA 在脾、肝和肾中有高水平表达^[20]。

为了研究 fsTRAIL 的活性,我们曾将其连接入 pET28 表达载体,并在 BL21 (DE3) 中表达。结果蛋白存在于包涵体中,包涵体复性后没有获得可溶性蛋白。为了增强蛋白的可溶性,我们将其构建入 pET43.1a 表达载体,并进行低温诱导 (16 °C),得到了较高水平的可溶性表达。

文献报道人、红鳍东方鲀或鳊鱼的 sTRAIL 能够诱导人肿瘤细胞系的凋亡^[2,20-21], 因此推测 fsTRAIL 也具有相似作用。为了检测 fsTRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 我们首先用 MTT 法检测其对 Jurkat 和 HeLa 细胞作用, 实验结果表明 Nus-His-fsTRAIL 蛋白能以剂量依赖的方式抑制细胞增殖, 不难发现 Nus-His-fsTRAIL 蛋白对 Jurkat 细胞的抑制能力强于对 HeLa 细胞的抑制能力, 这可能是由于 Nus-His-fsTRAIL 蛋白与两种细胞上 TRAIL 受体结合能力不同所致。此外, 经 Nus-His-fsTRAIL 蛋白处理后, Jurkat 和 HeLa 细胞的形态学观察以及台盼蓝染色后的形态学观察表明 fsTRAIL 可以剂量依赖的方式诱导 Jurkat 和 HeLa 细胞死亡。为了进一步确定 Nus-His-fsTRAIL 蛋白的肿瘤细胞毒理效用, 我们运用了流式细胞术进一步验证了 Nus-His-fsTRAIL 蛋白可以诱导肿瘤细胞凋亡, 而对照 Nus-His 标签蛋白则未见此效应。综上所述, 我们可以得出结论, fsTRAIL 可抑制 Jurkat 细胞和 HeLa 细胞增殖及诱导凋亡。但 fsTRAIL 能否诱发其他人类肿瘤细胞株的凋亡还有待进一步研究。

总之, 本次实验首次对水生哺乳动物 TRAIL 蛋白进行报道, 发现其在进化上与偶蹄目动物的 TRAIL 具有同源性, 也发现 fTRAIL 能抑制 Jurkat 和 HeLa 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 既为水生哺乳动物从陆生到水生的进化研究提供了依据, 也为江豚甚至是水生哺乳动物的免疫机制和物种保护的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, 267(5203): 1445–1449.
- [2] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3(6): 673–682.
- [3] Goetz FW, Planas JV, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(5): 487–497.
- [4] Gasparini C, Vecchi Brumatti L, Monasta L, et al. TRAIL-based therapeutic approaches for the treatment of pediatric malignancies. *Curr Med Chem*, 2013, 20(17): 2254–2271.
- [5] Lorz C, Benito A, Ucerro AC, et al. Trail and kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14: 3740–3749.
- [6] Mustafa MA, Mohamed UK, Bastawisy A. TNF-related apoptosis-inducing ligand levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and spondyloarthritis. *Egypt J Int Med*, 2012, 24(3): 72–78.
- [7] Yang SB, Wu XZ. Identification and functional characterization of a human sTRAIL homolog, CasTRAIL, in an invertebrate oyster *Crassostrea ariakensis*. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34(5): 538–545.
- [8] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687–12690.
- [9] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5): 361–371.
- [10] Fox NL, Humphreys R, Luster TA, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-1 and receptor-2 agonists for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(1): 1–18.
- [11] Gerspach J, Pfizenmaier K, Wajant H. Therapeutic targeting of CD95 and the TRAIL death receptors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2011, 6(3): 294–310.
- [12] Glenney GW, Wiens GD. Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis. *J*

- Immunol, 2007, 178(12): 7955–7973.
- [13] Lalitha S. Primer premier 5. Biotech Software Internet Rep, 2000, 1(6): 270–272.
- [14] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [15] Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. Cancer Biol Ther, 2012, 13(12): 1143–1151.
- [16] Chang MX, Nie P, Xie HX, et al. Characterization and expression analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 110(1/2): 51–63.
- [17] Seol DW, Billiar TR. Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity. Cancer Res, 2000, 60(12): 3152–3154.
- [18] Gatesy J. Whales and even-toed ungulates (Cetartiodactyla)//Hedges SB, Kumar S, Eds. The Timetree of Life. Oxford, UK: Oxford University Press, 2009: 511–516.
- [19] Zhou LD, Yan WL, Yang L, et al. Isolation of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) from the Yangtze finless porpoise. Dev Comp Immunol, 2013, 41(4): 652–656.
- [20] Li JF, Ai HX, Zhang J, et al. Molecular cloning, functional characterization and phylogenetic analysis of TRAIL in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. J Fish Biol, 2011, 79(3): 747–760.
- [21] Gao Y, Chang MX, Sun BJ, et al. TRAIL in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: gene and its apoptotic effect in HeLa cells. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(1): 55–66.

(本文责编 郝丽芳)