

• 农业生物技术 •

家蚕 EGFR 配体的鉴定和验证

王菲, 董世峰, 宋亮, 夏庆友

西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

王菲, 董世峰, 宋亮, 等. 家蚕 EGFR 配体的鉴定和验证. 生物工程学报, 2017, 33(2): 261–271.

Wang F, Dong SF, Song L, et al. Identification and characterization of epidermal growth factor receptor ligands in *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 261–271.

摘要: 表皮生长因子受体 (EGFR) 是广泛存在于后生动物中的多功能受体, 其配体的种类、活化方式、配体与 EGFR 之间的相互作用以及激活的信号通路在哺乳动物中研究得较为深入。而非脊椎动物中, EGFR 配体在各物种间差异较大, 目前缺乏对除果蝇以外的其他昆虫 EGFR 配体的认识。通过同源比对、结构域预测、mRNA 翻译起始序列分析和系统进化树构建, 在家蚕中鉴定到 2 个 EGFR 的配体, 命名为 BmEGF-1 和 BmEGF-2。BmEGF-1 与果蝇 Spitz 有较高的同源性和一致的 Rhomboid 识别序列, BmEGF-2 为 Vein 的同源分子。经原核表达和纯化获得了 BmEGF-1 胞外区段, 利用 Sf9 细胞分泌 BmEGFR 胞外区段, 并通过 pull-down 实验验证了两者之间存在相互作用。在 BmE 细胞中表达 BmEGF-1 后, 通过 Western blotting 检测到 ERK 和 p38 MAPK 的磷酸化水平增强, 说明其不仅能激活经典的 ERK 信号通路, 还可能通过 p38 MAPK 信号通路参与其他生理过程, 为进一步研究 EGFR 配体在家蚕中的生物学功能提供了参考。

关键词: 家蚕, 表皮生长因子受体, 配体, 蛋白互作, 信号通路

Identification and characterization of epidermal growth factor receptor ligands in *Bombyx mori*

Fei Wang, Shifeng Dong, Liang Song, and Qingyou Xia

State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a multi-functional receptor distributed throughout the metazoa. Study on its ligands so far remained mainly on mammals, including how ligands are processed into active forms, their

Received: July 18, 2016; **Accepted:** September 20, 2016

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114600), Basic Research Program of Chongqing Municipality (No. CSTC2014JCYJA80010).

Corresponding author: Qingyou Xia. Tel: +86-23-68251996; Fax: +86-23-68250099; E-mail: xiaqy@swu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114600), 重庆市基础与前沿研究计划项目 (No. CSTC2014JCYJA80010) 资助。

interaction with EGFR, and the signaling pathway they induce. However, in invertebrates, ligands are more divergent among species. Currently, except for *Drosophila*, less is known about the insect EGFR ligands. Here, we identified two EGFR ligands in *Bombyx mori* by homology search, domain prediction, analysis of the potential translation initiation sequence and construction of phylogenetic tree, termed as BmEGF-1 and BmEGF-2. BmEGF-1 shows the greatest similarity to *Drosophila* Spitz and their Rhomboid-recognition motifs are highly identical. BmEGF-2 is a homolog to *Drosophila* Vein. Then we purified BmEGF-1 extracellular domain expressed in *E. coli*, and performed pull-down assay with BmEGFR extracellular domain secreted by Sf9 cells. The result confirmed their interaction. Lastly, we found the phosphorylation level of ERK and p38 MAPK was elevated after expression of BmEGF-1 in BmE cells, which suggested that BmEGF-1 is not only able to activate the canonical ERK signaling pathway, but may participate in other cellular processes by inducing p38 MAPK signaling pathway. Our study provides reference to further study of the biological function of BmEGF in silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*, epidermal growth factor receptor, ligand, protein-protein interaction, signaling pathway

普遍存在于后生动物中的表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 具有调控细胞增殖、迁移和分化的功能, 参与包括器官发育、机体生长和生殖、创口修复等一系列重要的生理过程, 因此 EGFR 及其配体之间的相互作用和由此激活的信号通路, 是后生动物尤其是哺乳动物中研究得最为广泛和深入的受体-配体组合之一。

哺乳动物 EGFR 有 7 个配体, 分别是 EGF、transforming-growth factor- α (TGF α)、amphiregulin (AR)、betacellulin (BTC)、heparin-binding EGF (HB-EGF)、epiregulin (EPR) 和 epigen, 组成 EGF 相关蛋白家族 (EGF-related protein family)^[1]。该家族成员均为 I 型跨膜蛋白, 其胞外区具有一个或多个 EGF 基序; 该基序由 35–40 个氨基酸残基组成, 其中 6 个半胱氨酸残基遵循保守的排列方式, 即 CX₇CX₃₋₅CX₁₀₋₁₂CXCX₈C, 并形成 3 个链内二硫键 C1-C3、C2-C4 和 C5-C6。EGFR 配体胞外区段经由锚定在细胞质膜上的解整合素金属蛋白酶 ADAM (A disintegrin and metalloprotease) 裂解而释放, 从而结合 EGFR 并激活下游信号通路^[2]。

与哺乳动物相比, 非脊椎动物 EGFR 配体的数目较少, 物种间的变异度较大。例如在秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans* 中仅发现 1 个 EGFR 配体, Lin-3^[3]; 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中则鉴定到 5 个, 分别为 Spitz、Keren、Gurken、Vein 和 Argos^[4]。其中 Argos 并非与果蝇 EGFR (DER) 直接结合, 而是与 Spitz 形成复合体后使其无法与 DER 相结合从而阻止了 Spitz 对 EGFR 信号通路的激活, 因此 Argos 并非一个典型的 EGFR 配体^[5]; 而在同为双翅目的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中则未鉴定到 Keren 和 Gurken^[6]。实际上 Spitz、Keren 和 Gurken 均为哺乳动物 TGF α 的同源分子, 特别是 Spitz 与 Keren 在进化上具有较近的亲缘关系, 因此 Keren 也曾一度被命名为 Spitz-2; 而 Vein 则为哺乳动物 neuregulin 的同源分子。作为 DER 的配体, 这些分子均具有 1 个 EGF 基序; 除 Vein 是以分泌蛋白的形式合成外, 其余分子均为 I 型跨膜蛋白, 而其胞外区的裂解方式与哺乳动物 EGFR 配体大相径庭。以 DER 的主要激活配体 Spitz 为例, 内质网膜上的 Spitz 在 Star 蛋白的协助下转运到高尔基体, 并在此由 7 次

跨膜丝氨酸蛋白酶 Rhomboid (Rho) 裂解后被运输和释放到细胞外。

EGFR 为受体型酪氨酸激酶,其胞外区段具有 2 个配体结合结构域 (L 结构域) 以及 2 个富含半胱氨酸的结构域 (CR 结构域),该 4 个结构域的排列方式从 N 端开始为 L1-CR1-L2-CR2,胞内区段包含酪氨酸激酶结构域 (TK 结构域) 以及对分子活性具有关键作用的 C 末端酪氨酸残基^[7]。L 结构域一旦与配体结合后即促使 EGFR 胞外区段发生构象变化,暴露 CR 结构域中的二聚化位点从而导致 EGFR 的二聚化。随着二聚体的形成,其胞内 TK 结构域转变为活化构象,C 末端特定酪氨酸残基发生磷酸化,招募多种信号分子,激活不同的信号传递通路,其中一条重要的通路为 Ras/ERK 信号通路^[8]。该通路始于具有 SH2 (Src homology 2) 结构域的 Shc 和 Grb2 结合到 EGFR 磷酸化的酪氨酸序列上,并与鸟苷酸交换因子 Sos 形成复合体活化 Ras, Ras 随后活化 Raf, 最终激活 ERK。该信号通路是 EGF-EGFR 发挥绝大部分生理功能所必需的。另外,对于某些类型的细胞,如肠道上皮细胞和卵巢颗粒细胞瘤细胞,EGF 等配体激活 p38 MAPK 信号通路,从而促使肠道上皮细胞在伤口愈合过程中由增殖转而迁徙以及肿瘤细胞的转移^[9-10]。

目前,对果蝇以外的其他昆虫 EGFR 配体的认识较少,其类型和功能均未知。本研究从鳞翅目昆虫的模式生物——家蚕入手,通过多序列比对和结构域分析鉴定家蚕 EGFR 配体,通过检测候选蛋白是否与家蚕 EGFR (BmEGFR) 存在互作以及是否激活家蚕细胞 MAPK 信号通路来验证其作为配体的功能,为更深入研究这些蛋白在家蚕个体发育和生殖中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

实验所用家蚕品种为大造,由西南大学家蚕基因库提供。实验所用家蚕胚胎细胞系 BmE,由本实验室保存;无血清培养基培养的 Sf9 细胞系购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

RNase 抑制剂和反转录试剂盒均购自 Promega 公司; Total RNA Kit 购自 OMEGA 公司; Tubulin 抗体、HRP 标记山羊抗小鼠抗体、HRP 标记山羊抗兔抗体、DEPC 水、彩色预染蛋白质分子量标准均购自碧云天公司; His 标签抗体、HA 标签抗体、磷酸化 ERK 和 p38 MAPK 抗体均购自 Sigma 公司; X-tremeGENE HP DNA 细胞转染试剂购自 Roche 公司; Grace 昆虫细胞培养基、Sf-900™ III 无血清培养基 (SFM)、Cellfectin 转染试剂和 ECL 化学发光检测试剂盒均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 家蚕 EGFR 配体的生物信息学分析

从 NCBI 下载黑腹果蝇 Spitz (GenBank Accession No. NP_599118)、Keren (NP_524129)、Gurken (NP_476568)、Vein (NP_523942) 和 Argos (NP_524107) 的序列,并在 NCBI 和家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://www.silkdb.org/silkdb/>) 中进行 BLAST 搜索和比对,用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对候选分子进行功能域预测。采用 MEGA 6.0 软件构建系统发生树,选择 Neighbor-Joining 进化分析法,以 JTT matrix-based 模式进行 Bootstrap 检测 1 000 次。采用的序列包括光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* AgSpitz (JAB60801)、冬尺蠖蛾 *Operophtera brumata* ObSpitz (KOB78754)、梭鱼草蜂 *Dufourea novaeangliae* DnSpitz (KZC07024)、

埃及伊蚊 *Aedes aegypti* AeSpitz (XP_001660618)、家蝇 *Musca domestica* MdSpitz (XP_005182447)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* TcKeren (EFA01327)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* AaKeren (JAC09959)、茄科果实蝇 *Bactrocera latifrons* BI_Gurken (JAI51163)、铜绿蝇 *Lucilia cuprina* LcGurken (KNC29771)、冬尺蠖蛾 ObVein (KOB67206)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* AgVein (XP_001237118)、人 *Homo sapiens* HsTGF α (NP_003227)。

1.3 BmEGF-1 的克隆、表达和纯化

1.3.1 BmEGF-1 的克隆和表达载体构建

取胚胎期第 5 天的蚕卵，液氮研磨后，用 Trizol 法提取总 RNA，用反转录试剂盒反转录为 cDNA。根据生物信息学分析鉴定到的家蚕 EGFR 配体 (BmEGF-1, NCBI 登录号为 XP_004926209) 的编码序列和结构特征，设计引物 BmEGF-1-F、BmEGF-1-R 和 BmEGF-1_{act}-F、BmEGF-1_{act}-R (表 1)，经 PCR 扩增分别得到编码 C 端带有 HA 标签的 BmEGF-1 及其胞外区段的核酸序列。PCR 反应条件为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延

伸 1 min，30 个循环；72 °C 再延伸 7 min，12 °C 保存。PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切后分别连接到真核表达载体 pSL1180 和原核表达载体 pGEX-4T-1 中，并予以测序验证。

1.3.2 BmEGF-1 胞外区段的原核表达

将重组质粒 pGEX-4T-1-BmEGF-1_{act} 转化到大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 表达菌种中，筛选阳性克隆并接种到加有氯霉素和氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，在 37 °C 培养至 OD_{600} 达到 0.8，用 0.15 mmol/L 的 IPTG 在 16 °C 诱导 20 h 或在 37 °C 诱导 4 h 后，收集菌体，用结合缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 重悬，并用超声波破碎，离心分离上清和沉淀，SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。

1.3.3 BmEGF-1 胞外区段的纯化

确定原核表达的最适温度后，经扩大培养收集超声波破碎的上清，与 GST 填料 4 °C 孵育 4 h，用结合缓冲液清洗 3 次，用 0.10、0.25、0.50、1、2、5 和 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽缓冲液进行梯度洗脱，SDS-PAGE 检测纯化的效果。用 10 kDa 超滤管对洗脱蛋白进行脱盐处理，并置换到磷酸缓冲液 PBS 中，用 Bradford 法测定蛋白浓度。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequences (5'-3')
BmEGF-1-F	<u>CGCGGATCC</u> ATGCGAGCAAAGGA TTCCTGTT
BmEGF-1-R	TTGCGGCCGCCTAAGCGTAGTCTG <i>GGACGTCGTATGGGTAGT</i> GCGGCTGGTGCGAAACG
BmEGF-1 _{act} -F	<u>CGCGGATCC</u> ATGCCGCAGCCCCA ACCG
BmEGF-1 _{act} -R	TTGCGGCCGCCTAAGCGTAGTCTG <i>GGACGTCGTATGGGTACACATA</i> CGAGTTGTCCAGGTCC
BmEGFR _{ECD} -F	AAGGATCCATGGTGCCTGCTCGTGCCCTT
BmEGFR _{ECD} -R	TTGCGGCCGCTCAATGGTGATGG TGATGATGTTGTT CATCAAAATATATTTTA

The *Bam*H I and *Not* I recognition sites are underlined, the HA tag sequence is in italic, the His tag sequence is in bold.

1.4 BmEGFR 胞外区段的真核表达

1.4.1 BmEGFR 胞外区段的真核表达载体构建

取 5 龄第 3 天家蚕幼虫脂肪体,液氮研磨后,用 Trizol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA。根据 *BmEGFR* (XM_004929742) 的序列以及所编码蛋白质的结构特征,设计引物 BmEGFR_{ECD}-F 和 BmEGFR_{ECD}-R (表 1),经 PCR 扩增得到编码 C 端带有 His 标签的 BmEGFR 胞外区段 (BmEGFR_{ECD}) 的核酸序列。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 再延伸 7 min, 12 °C 保存。PCR 产物连接到 pEASY-T5 Zero 载体,经测序验证的阳性克隆用 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切后,插入到 pSL1180 载体中,用于真核细胞表达。

1.4.2 细胞转染

将 Sf9 细胞 (1×10^6 个/孔) 接种于 6 孔板中,在 27 °C 用无血清培养基培养 24 h 后,按照 Cellfectin 转染试剂操作说明转染 4 μ g DNA。转染 48 h 后,收集培养基用于 pull-down 试验。

1.5 Pull-down 试验

将 200 mL 转染 pSL1180-BmEGFR_{ECD} 的 Sf9 细胞培养基与 Ni-NTA 琼脂糖珠 4 °C 孵育 4 h,用 PBS 清洗 3 次,加入 2 μ g 纯化的 BmEGF-1 胞外区段孵育 5 h 后再用 PBS 清洗 5 次,将 Ni-NTA 琼脂糖珠重悬于 SDS-PAGE 上样缓冲液,并煮沸 10 min,离心取上清用于 Western blotting 检测。

1.6 Western blotting 检测

对 pull-down 试验结果的检测,样品经 SDS-PAGE 电泳和转膜后,用 5% 的脱脂奶粉封闭

1 h 后,用 HA 抗体或 His 抗体室温孵育 1 h, TBST (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Tween 20) 清洗 3 次后用 HRP 标记的羊抗小鼠抗体室温孵育 1 h,再用 TBST 清洗 5 次,最后用 ECL 化学发光检测试剂进行显色反应。

对磷酸化蛋白的检测,使用 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂在 BmE 细胞中转染 pSL1180-BmEGF-1, 24 h 后与未转染的 BmE 细胞混合培养 8 h。用细胞裂解液 (100 mmol/L HEPES-NaOH, 300 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 20% 甘油, 2% TX-100 (W/V), 1% 脱氧胆酸钠, 0.2% SDS pH 7.5) 裂解细胞后提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定法测定蛋白浓度。蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳和转膜后,用 5% 的 BSA 封闭 1 h 后,用一抗 (磷酸化 ERK 兔多抗、磷酸化 p38 MAPK 兔多抗或 Tubulin 小鼠单克隆抗体) 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次后用相应二抗 (HRP 标记山羊抗兔抗体或 HRP 标记山羊抗小鼠抗体) 室温孵育 1 h,再用 TBST 清洗 5 次,最后用 ECL 化学发光检测试剂进行显色反应。

2 结果与分析

2.1 家蚕 EGFR 配体的鉴定和结构域分析

BLAST 搜索和比对的结果显示,NCBI 登录号为 XP_004926209 的分子与果蝇 Spitz、Keren 和 Gurken 具有较高的同源性,其序列相似度分别达到 43%、42% 和 28%,所包含的 EGF 结构域的序列相似性分别为 66%、66% 和 56%;而登录号为 XP_012545622 的分子与果蝇 Vein 具有 25% 的序列相似度,其 EGF 结构域序列相似度达到 40%。未鉴定到 Argos 的同源分子。

对 XP_004926209 进行功能域预测发现,除

EGF 结构域以外,其 N 端和 C 端均具有一个跨膜结构域 (TM),因此该分子结构域组成与果蝇 Spitz、Keren 和 Gurken 有所不同;而迄今为止,未见 EGFR 配体为两次跨膜分子的报道。对该分子的 mRNA 进一步分析发现,其 mRNA 包含 2 个潜在的翻译起始 ATG,属同一开放阅读框,间隔 132 个核苷酸 (图 1A)。如果从第 1 个翻译起始 ATG 开始翻译,产生长度为 217 个氨基酸的蛋白质,即 XP_004926209;如果从第 2 个翻译起始 ATG 开始翻译,则产生长度为 173 个氨基酸的蛋白质。第一翻译起始 ATG 5'端序列为 gccg,在已确定的家蚕基因翻译起始位点中未见 -3 位置为 c 的 ATG,且具有翻译起始序列为 cxxATG 的基因在家蚕细胞中的翻译效率较低^[11]。而第 2 个翻译起始 ATG 5'端序列为 gaaa,符合家蚕基因翻译起始位点 5'端序列的统计规律,因此该分子很可能从第二潜在翻译起始 ATG 开始翻译。对由此产生的长度为 173 个氨基酸的蛋白质进行结构域分析,发现其 N 端具有 1 段信号肽 (SP),C 端具有 1 个 TM,与果蝇 Spitz、Keren 和 Gurken 的结构域组成一致,为一次跨膜蛋白,将其命名为 BmEGF-1 (图 1B),该分子与 SilkDB 中编号为 BGIBMGA012584-PA 的蛋白质序列相同。XP_012545622 则与果蝇 Vein 的结构域组成相同,N 端具有 SP,其后依次为 IGc2 和 EGF 结构域,为分泌型蛋白质,命名为 BmEGF-2 (图 1C)。通过系统进化分析,进一步明确了 BmEGF-1 与 Spitz 和 Keren 具有高度的序列相似度,是人类 TGF α 的同源分子,而 BmEGF-2 则与 Vein 具有较高的同源性 (图 1D)。并且 Spitz 在各物种间的序列变异度远低于 Vein,这也说明了 Spitz 功能的高度保守性。

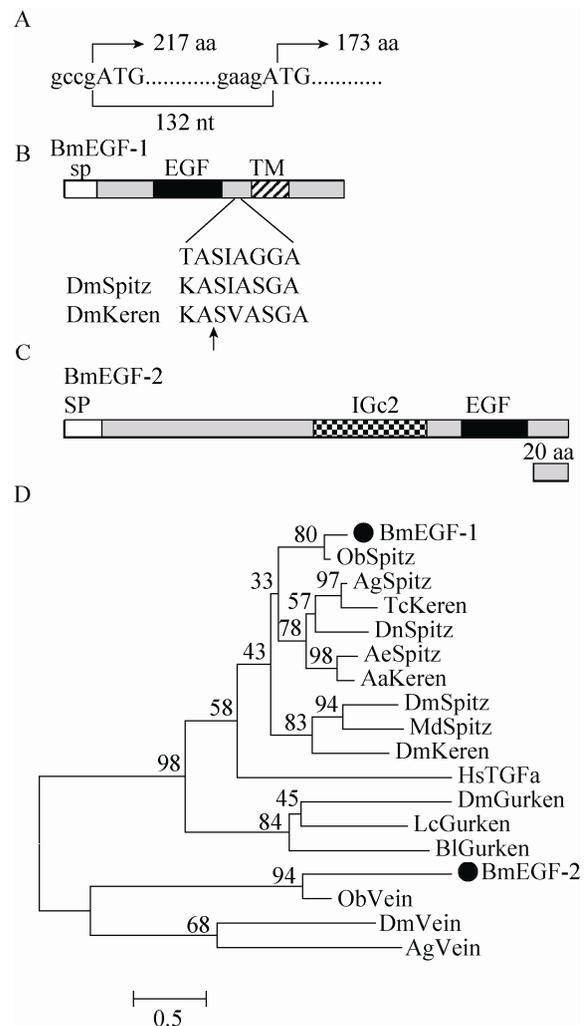


图 1 家蚕 EGFR 配体的序列、结构域和系统进化分析

Fig. 1 Sequence, domain and phylogenetic analysis of silkworm EGFR ligands. (A) Sequence analysis of two potential translation initiation sites. (B) BmEGF-1 domain prediction and Rho-recognition motif analysis. Arrow indicates the cleavage site by Rho. (C) BmEGF-2 domain prediction. (D) A phylogenetic tree of EGFR ligands from different species.

果蝇 Spitz、Keren 和 Gurken 均由 Rho 酶切后分泌到胞外,其近跨膜区的氨基酸残基组成 Rho 特异性识别序列^[12-13]。其中 Spitz 和 Keren 近跨膜区序列分别为 KASIASGA 和

KASVASGA, Gurken 则差异较大, 而 BmEGF-1 近跨膜区序列为 TASIAGGA, 与前两者具有高度一致性, 因此推测此序列能够被 Rho 所识别, 并在特定位置裂解 (图 1B)。

2.2 BmEGF-1 胞外区段的原核表达和纯化

为表达经 Rho 酶切后所产生的 BmEGF-1 胞外区段 (BmEGF-1_{act}), 截取 SP 序列之后以及 Rho 酶切位点前的 BmEGF-1 部分序列 (从 40 到 106 位氨基酸), 构建了 GST 重组蛋白表达载体。在 16 °C 和 37 °C 下分别进行诱导表达后, SDS-PAGE 电泳检测发现 GST-BmEGF-1_{act} 重组蛋白在 16 °C 诱导条件下, 主要以可溶性蛋白的形式表达, 而在 37 °C 诱导条件下, 则以包涵体的形式表达, 分子量大小约为 35 kDa (图 2A)。虽然在 37 °C 诱导条件下, 重组蛋白的表达量较在 16 °C 诱导条件下产生的多, 但为方便纯化和后续实验, 采用了 16 °C 的诱导条件进行了扩大培养。经不同浓度的还原型谷胱甘肽洗脱液进行梯度洗脱后, 对流出液进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明 5 mmol/L 和 10 mmol/L 洗脱液中有较纯的目的蛋白 (图 2B)。

2.3 BmEGF-1 和 BmEGFR 相互作用的检测

EGFR 配体与 EGFR 之间的相互作用仅涉及到 EGFR 胞外区段, 因此为检测 BmEGF-1 是否能结合 BmEGFR, 我们克隆了 BmEGFR 的胞外区 (BmEGFR_{ECD}) 并在其 C 端加上 6×His 标签, 其总长度为 2 367 bp, 所编码蛋白质的理论分子量大小约为 88 kDa, 具有 2 个典型的 EGFR L 结构域和 2 个 CR 结构域及其排列方式。因在原核表达体系中该蛋白稳定性较差, 对后续实验有较大影响, 遂采用了 Sf9 真核表达体系。因仍保留 BmEGFR 自身的信号肽, BmEGFR_{ECD}

表达后即分泌到细胞培养基中。为避免传统培养基中大量血清杂蛋白的影响, 采用了无血清培养基。EGFR 存在多个糖基化位点^[14], 在 Sf9 细胞中表达的 BmEGFR_{ECD} 可能存在糖基化修饰, 导致所表达的蛋白质分子量将比理论分子量大。通过银染可检测到转染了 pSL1180-BmEGFR_{ECD} 表达载体的细胞将 BmEGFR_{ECD} 分泌到培养基中, 其分子量大于 100 kDa (图 3A)。根据 His 标签进行 Western blotting 检测, 证明其确实为目的蛋白 (图 3B)。

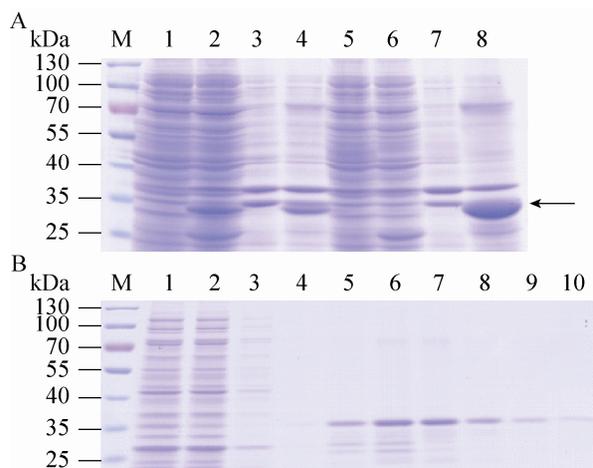


图 2 GST-BmEGF-1_{act} 的原核表达和纯化检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expression and purification of GST-BmEGF-1_{act} recombinant protein. (A) SDS-PAGE analysis of the expression of GST-BmEGF-1_{act}. M: protein molecular weight standard; 1-4: production of GST-BmEGF-1_{act} at 16 °C; 5-8: production of GST-BmEGF-1_{act} at 37 °C; 1,5: supernatant without IPTG induction; 2,6: supernatant with IPTG induction; 3, 7: cell pellet without IPTG induction; 4, 8: cell pellet with IPTG induction. Arrow indicates GST-BmEGF-1_{act} induced by IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of the purified proteins. M: protein molecular weight standard; 1: supernatant of cell lysates; 2: flow-through from the supernatant bound to GST resin; 3-9: elution by reduced glutathione of different concentrations; 3: 0 mmol/L; 4: 0.1 mmol/L; 5: 0.25 mmol/L; 6: 0.5 mmol/L; 7: 1 mmol/L; 8: 3 mmol/L; 9: 5 mmol/L; 10: 10 mmol/L.

利用 His 标签将 BmEGFR_{ECD} 结合到 Ni-NTA 琼脂糖珠上, 并与纯化的 BmEGF-1_{act} 重组蛋白 (该蛋白 C 末端具有 HA 标签) 孵育, 经多次清洗后检测 BmEGF-1_{act} 和 BmEGFR_{ECD} 是否具有互作。Pull-down 实验结果显示, 虽然 EGFP(增强绿色荧光蛋白)和 BmEGFR_{ECD} 均能借 His 标签与 Ni²⁺之间的亲和力结合到 Ni-NTA 上, 但仅在结合了 BmEGFR_{ECD} 的 Ni-NTA 上检测到 BmEGF-1_{act}, 说明两者之间存在相互作用。

EGFR 配体与 EGFR 结合后, 即激活包括 MAPK 在内的一系列信号通路。为进一步检测 BmEGF-1 是否具有激活胞内信号通路的功能, 在无内源性 BmEGF-1 表达的 BmE 细胞中转染 pSL1180-BmEGF-1 载体, 利用其 C 端的 HA 标签对其表达进行了 Western blotting 检测(图 5A)。结果显示, 转染 12 h 后在细胞中检测到分子量约为 20 kDa 的蛋白质, 符合 BmEGF-1 的理论分子量。转染 24 h 后, 该蛋白的表达量

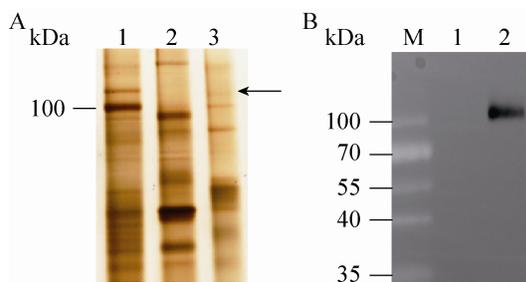


图 3 BmEGFR_{ECD} 的真核表达和检测

Fig. 3 Eukaryotic expression of BmEGFR_{ECD}. (A) SDS-PAGE analysis of BmEGFR_{ECD} in Sf9 cell culture medium detected by silver staining. 1: medium of untransfected cells; 2: medium of cells expressing EGFP (enhanced green fluorescent protein); 3: medium of cells expressing BmEGFR_{ECD}. Arrow indicates BmEGFR_{ECD}. (B) Detection of BmEGFR_{ECD} by His tag antibody. M: protein molecular weight standard; 1: medium of untransfected cells; 2: medium of cells expressing BmEGFR_{ECD}.

明显增加; 且能检测到多个裂解中间产物, 其中分子量约为 8 kDa 的产物含量较高, 推测该产物可能为经 Rho 酶切后的跨膜区和胞内片段。虽然没有直接检测到 BmEGF-1 的胞外区, 但该酶切产物的出现表明胞外区片段的产生。转染 36 h 和 48 h 后, BmEGF-1 和裂解产物的表达量无显著增加。

BmE 细胞本身具有内源性 BmEGFR 的表达^[15], 因此我们将转染并表达 BmEGF-1 的细胞与未转染的 BmE 细胞混养 (混养比例为 1 : 10), 检测细胞内 p38 MAPK 和 ERK 的磷酸化水平是否变化。结果表明, 两者的磷酸化水平均显著升高 (图 5B)。

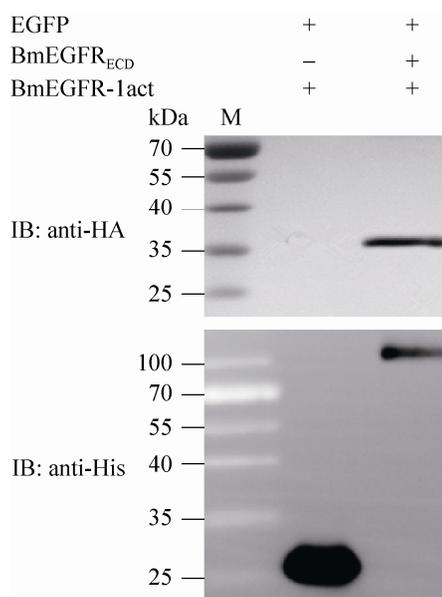


图 4 Pull-down 实验检测 BmEGFR_{ECD} 和 BmEGF-1_{act} 之间的相互作用

Fig. 4 Detection of the interaction between BmEGFR_{ECD} and BmEGF-1_{act} using pull-down assay. M: protein molecular weight standard; IB: immune-blotting.

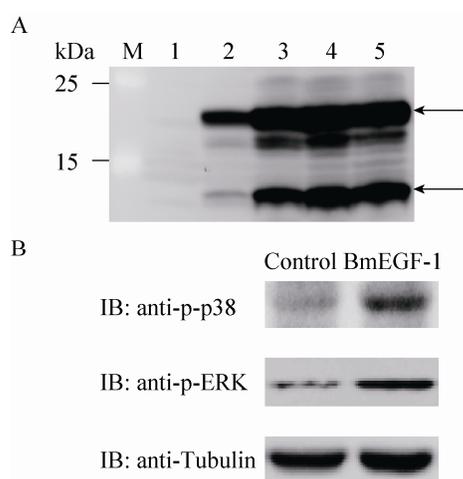


图5 BmEGF-1的真核表达和磷酸化MAPK的检测
Fig. 5 Detection of BmEGF-1 expression and MAPK phosphorylation in BmE cells. (A) Expression of BmEGF-1 in transfected BmE cells. M: protein molecular weight standard; 1: lysate of untransfected cells; 2: lysate of transfected cells harvested at 12 h after transfection; 3: lysate of transfected cells harvested at 24 h after transfection; 4: lysate of transfected cells harvested at 36 h after transfection; 5: lysate of transfected cells harvested at 48 h after transfection. Arrows indicate uncleaved and cleaved BmEGF-1 respectively. (B) Phosphorylation of p38 MAPK and ERK. Cells transfected with empty pSL1180 vector was used as control. IB: immunoblotting.

3 讨论

本研究通过同源序列比对和分析,在家蚕中鉴定到2个EGFR配体,其中BmEGF-1与果蝇Spitz有较高的同源性和一致的Rho识别序列,BmEGF-2为Vein的同源分子。虽然在果蝇中,Spitz、Keren、Gurken和Vein这4种EGFR配体的功能存在一定的组织特异性,例如Gurken仅在卵巢生殖细胞中表达且对于卵母细胞的极性形成具有重要作用^[16],Vein则对于翅原基的发育是必需的^[17],但也有研究认为这四

者的功能可能存在冗余,例如在合适的浓度下Spitz可挽救*vein*突变体的表型^[18],在眼的发育中Spitz和Keren可相互替代^[19]。因此对于BmEGF-1和BmEGF-2在家蚕发育中的作用,需要具体到各个不同的组织或器官予以深入研究。

在S2细胞和果蝇个体中,若没有Rho和Star的共表达,Spitz无法被酶切产生胞内区段(包含跨膜区)和释放胞外区段,Keren的酶切则能在一定程度上不依赖于Rho和Star,尽管该酶切效率较低^[20]。我们在BmE细胞中检测到BmEGF-1经酶切后的跨膜区和胞内片段,说明BmE细胞中有内源性Rho和Star的表达,或者BmEGF-1也和果蝇Keren类似,其酶切可不依赖于Rho和Star。

和果蝇Spitz类似,BmEGF-1激活ERK,表明其具有典型的EGFR配体的功能。有意义的是,与此同时我们还检测到p38 MAPK磷酸化水平的升高。在哺乳动物细胞中,由EGFR配体激活的p38 MAPK调控细胞增殖和迁徙行为之间的平衡,但在果蝇中尚无此类报道。但对昆虫中一类和EGF空间结构相似而序列却全然不同的活性肽的研究发现,这类活性肽通过EGFR激活p38 MAPK信号通路,促进抗菌肽的产生和浆细胞的延展^[15, 21-22]。BmEGF-1是否也具有相似的功能,需要对其所激活的转录因子或诱导表达的相关基因做进一步研究。

另外,为检测EGFR配体和EGFR之间的互作,大多数研究采用原核表达并纯化EGFR某一个或几个胞外结构域^[23-24]。而EGFR胞外区富含半胱氨酸残基,存在大量的分子内二硫键,在原核表达系统中通常以包涵体的形式产生或较易降解。在验证果蝇Gurken和DER的

结合时,采用了酵母表达 DER 的胞外片段和 Far-Western blotting 实验,但其中仍涉及变复性过程^[25]。为确保蛋白具有正确的构象和活性,我们采用了无血清培养的 Sf9 细胞表达 BmEGFR 胞外区段和 pull-down 实验验证 BmEGFR 与 BmEGF-1 之间的相互作用。该表达体系虽然有利于蛋白质活性的维持,但表达量低,是后续大量蛋白纯化的制约因素,未来将采用杆状病毒表达体系予以改善。

4 结论

通过生物信息学分析,在家蚕中鉴定到 2 个 EGFR 配体, BmEGF-1 和 BmEGF-2。通过 pull-down 实验验证了 BmEGF-1 的胞外区段与 BmEGFR 胞外区段相结合,并通过检测细胞内 ERK 和 p38 MAPK 的磷酸化证明了 BmEGF-1 能激活 MAPK 信号通路,从而确定 BmEGF-1 能作为 BmEGFR 的配体起作用,为进一步研究该分子在家蚕发育和生殖中的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*, 2009, 218(3): 460–466.
- [2] Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, et al. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci*, 2008, 99(2): 214–220.
- [3] Hill RJ, Sternberg PW. The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. *Nature*, 1992, 358(6386): 470–476.
- [4] Shilo BZ. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res*, 2003, 284(1): 140–149.
- [5] Klein DE, Nappi VM, Reeves GT, et al. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature*, 2004, 430(7003): 1040–1044.
- [6] Stein RA, Staros JV. Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol Biol*, 2006, 6: 79.
- [7] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2010, 141(7): 1117–1134.
- [8] Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18): 5268–5272.
- [9] Frey MR, Golovin A, Polk DB. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44513–44521.
- [10] Wang C, Lv XM, Jiang C, et al. Transforming growth factor alpha (TGF α) regulates granulosa cell tumor (GCT) cell proliferation and migration through activation of multiple pathways. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e48299.
- [11] Tatematsu KI, Uchino K, Sezutsu H, et al. Effect of ATG initiation codon context motifs on the efficiency of translation of mRNA derived from exogenous genes in the transgenic silkworm, *Bombyx mori*. Springerplus, 2014, 3: 136.
- [12] Urban S, Freeman M. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell*, 2003, 11(6): 1425–1434.
- [13] Strisovsky K, Sharpe HJ, Freeman M. Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell*, 2009, 36(6): 1048–1059.
- [14] Stroop CJ, Weber W, Gerwig GJ, et al. Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology*, 2000, 10(9): 901–917.
- [15] Song L, Wang F, Dong SF, et al. Paralytic peptide activates insect humoral immune response via epidermal growth factor receptor. *Peptides*, 2015,

- 71: 20–27.
- [16] Neuman-Silberberg FS, Schüpbach T. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell*, 1993, 75(1): 165–174.
- [17] Schnepf B, Grumblin G, Donaldson T, et al. Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev*, 1996, 10(18): 2302–2313.
- [18] Austin CL, Manivannan SN, Simcox A. TGF- α ligands can substitute for the neuregulin Vein in *Drosophila* development. *Development*, 2014, 141(21): 4110–4114.
- [19] Brown KE, Kerr M, Freeman M. The EGFR ligands Spitz and Keren act cooperatively in the *Drosophila* eye. *Dev Biol*, 2007, 307(1): 105–113.
- [20] Reich A, Shilo BZ. Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *EMBO J*, 2002, 21(16): 4287–4296.
- [21] Ohnishi A, Oda Y, Hayakawa Y. Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 37974–37979.
- [22] Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, et al. Insect cytokine paralytic peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28635–28642.
- [23] Zhou Y, Zhang J, Jin H, et al. Prokaryotic expression and refolding of EGFR extracellular domain and generation of phage display human scFv against EGFR. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(8): 737–743.
- [24] Xu LH, Hong A, He XH. On-column refolding and purification of human EGF receptor L2 domain inclusion body overexpressed in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2005, 21(4): 597–603 (in Chinese). 徐丽慧, 洪岸, 何贤辉. 人 EGF 受体 L2 结构域在大肠杆菌中表达、包涵体柱上复性及纯化. *生物工程学报*, 2005, 21(4): 597–603.
- [25] Shmueli A, Cohen-Gazala O, Neuman-Silberberg FS. Gurken, a TGF- α -like protein involved in axis determination in *Drosophila*, directly binds to the EGF-receptor homolog Egfr. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 732–737.

(本文责编 陈宏宇)