

三叶因子 Bm-TFF2 突变体在原核体系中的 表达及促细胞迁移活性

余果宇^{1,2,#}, 向阳^{1,3,#}, 张红芸⁴, 江萍¹, 李文辉¹, 张云¹, 张勇^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 2. 昆明医学院 生物化学教研室, 云南 昆明 650500; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 昆明医学院 第一附属医院妇产科, 云南 昆明 650032)

摘要: 大蹼铃蟾三叶因子 Bm-TFF2 具有较人 TFF2 更强的促细胞迁移和抗凋亡活性。该研究利用 RT-PCR 方法扩增得到野生型 Bm-TFF2 的基因, 然后分别构建 N 端、C 端和分子中两个精氨酸突变的突变体, 最后连接表达载体产生 pET32a(+)/Bm-TFF2 突变型重组质粒, 转入大肠杆菌中, 经 37 °C 培养, IPTG 诱导, 其融合蛋白主要存在于包涵体中, 用组氨酸标签的亲合柱纯化溶解后的包涵体上清, 进一步用 RP-HPLC 纯化得到硫氧还蛋白 (TRX)/Bm-TFF2 突变型融合蛋白。通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测分析其纯度和特异性。最终, 从 1L 培养基中得到 20 mg 纯度为 95% 的三种重组突变型融合蛋白。三种突变型重组蛋白都具有剂量依赖性的促细胞迁移活性, 并且其活性无显著差异。该研究为进一步研究 Bm-TFF2 结构和功能的关系以及揭示其作用的分子机制奠定了基础。

关键词: Bm-TFF2; 突变体; 表达; 纯化; 细胞迁移

中图分类号: Q786; Q959.53

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2011)04-0379-07

Expression of Bm-TFF2 mutants in *Escherichia coli* and their cell migration-promoting activity

YU Guo-Yu^{1,2,#}, XIANG Yang^{1,3,#}, ZHANG Hong-Yun⁴, JIANG Ping¹,
LEE Wen-Hui¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Yong^{1,*}

(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China; 2. Biochemistry Section of Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650500, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650032, China)

Abstract: Bm-TFF2, a trefoil factor from the large-webbed bell toad (*Bombina maxima*), can stimulate cell migration and inhibit cell apoptosis. To study the structure-function relationship of Bm-TFF2, we constructed wild-type and mutated Bm-TFF2 plasmids and expressed recombinant proteins in *E. coli*. The wild-type Bm-TFF2 gene encoding mature peptide was obtained by RT-PCR, while the N-terminal, C-terminal and two arginine mutated Bm-TFF2 clones were constructed, and ligated into pET-32a(+) expression vectors. The fusion proteins were induced by IPTG at 37°C. The mutant Bm-TFF2 fusion proteins expressed mainly in the inclusion bodies. The mutant (TRX)/Bm-TFF2 could be purified by using Ni²⁺-chelating chromatography and reverse-phase HPLC from the inclusion body supernatant. The fusion proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The yield of mutant Bm-TFF2 fusion proteins of above 95% purity was about 20 mg/L. All three recombinant mutant proteins can promote the migration of AGS cells in a dose-dependent manner with no obvious activity difference.

Key words: Bm-TFF2; Mutant; Expression; Purification; Cell migration

收稿日期: 2011-01-05; 接受日期: 2011-05-18

基金项目: 中国科学院“西部之光”(Y102291081); “973”项目(2010CB529800); 国家基金委面上项目(30870304)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: Tel: 0871-5194279, E-mail: zhyong@mail.kiz.ac.cn

#共同第一作者(Authors contributed equally to the work)

第一作者简介: 余果宇(1972-), 女, 博士, 研究方向为胃肠肿瘤的分子生物学; 向阳(1983-), 男, 博士生, 研究方向为胃肠肿瘤的细胞生物学

三叶因子(trefoil factor, TFFs)是一类含一个或几个三叶因子结构域的分泌蛋白, 该结构域是一段 38 或 39 个氨基酸的多肽, 其中的六个半胱氨酸以 1-5, 2-4, 3-6 配对的构型方式生成三对二硫键, 从而形成典型的三叶状结构, 此结构赋予 TFFs 家族蛋白耐酸、碱和蛋白酶水解的性质, 同时也是其行使功能所必需的。人 TFFs 包括含一个三叶因子结构域、与乳腺癌相关的多肽(TFF1 或 PS2)和小肠三叶因子(TFF3 或 ITF)以及含两个结构域的解痉挛多肽(SP 或 TFF2)。TFFs 在黏膜防御、修复和再生等过程中通过促进细胞增殖、细胞迁移和对抗细胞凋亡等过程发挥重要作用(Baus-Loncar et al, 2005; Dignass et al, 1994; Oertel et al, 2001; Taupin et al, 2000)。此外, TFFs 在多种肿瘤中表达异常的事实提示, 它们广泛参与肿瘤细胞增殖、浸润和转移过程(Cook et al, 1999; Fox et al, 2007; Lalani et al, 1999; Siu et al, 2004)。同时, TFF2 表达的增加还常常相关于肿瘤的发展以及不良预后(Dhar et al, 2003; Emami et al, 2004; Katoh, 2003)。Bm-TFF2 是从大蹼铃蟾皮肤分泌物中获得的一种具有血小板激动活性的两栖类三叶因子(Zhang et al, 2005), 进一步的研究又发现天然 Bm-TFF2 以浓度依赖的方式促进人 AGS、HT-29 以及小鼠肠上皮细胞 IEC-6 的迁移, 并且 ERK1/2 活性的激活是其发挥促细胞迁移活性的关键。同时, Bm-TFF2 还具有对抗 C2-丙酰胺引发的细胞凋亡作用, 从而促进细胞的增殖。这些结果提示, Bm-TFF2 通过 MAPK 途径促进细胞迁移并抑制细胞凋亡是其发挥伤口修复功能的基础(Chatterjee et al, 2010)。在进一步对重组 Bm-TFF2 进行结构与功能研究时, 我们发现全长和单结构域的 Bm-TFF2 都具有促细胞迁移和伤口修复活性, 但抗细胞凋亡活性却是全长依赖的, 即 Bm-TFF2 的两个单结构域剪切体都无抗细胞凋亡活性(Canas et al, 2009), 提示 Bm-TFF2 的不同活性需要不同的结构基础。所以, 我们在表达了 Bm-TFF2 全长和单结构域的基础上, 利用基因工程的原理和技术, 分别构建和表达了 Bm-TFF2 的三个突变体, 并进而检测和分析了它们的促细胞迁移活性, 这为更加深入地揭示 Bm-TFF2 的结构与功能关系以及分析可能的分子作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)、表达载体

pET-32a(+)购于德国 Novagen 公司; 逆转录酶(RNAase H)、限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I、PCR 聚合酶、T4 DNA 连接酶和克隆载体 pMD-19T simple、PrimeScript Reverse Transcriptase 购于大连宝生物公司; 动物组织总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购于北京天根生物科技有限公司; QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit 为 STRATAGENE 公司产品; 组氨酸选择的镍亲合层析胶购于 Sigma; 蛋白定量试剂盒购于 Bio-Rad; 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔和山羊抗鼠血清购自美国 Santa Cruz 生物科技公司; Bm-TFF2 多克隆抗血清为实验室免疫兔所得; 三氟乙酸(TFA)、乙腈(ACN)为德国 Merck 公司产品; C4 色谱柱为大连依利特分析仪器有限公司产品; ECL 化学发光试剂盒为德国 Thermo scientific 公司产品; AGS 细胞系来自于美国的 American Type Culture Collection; Millicells 为美国 Millipore 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pET-32a(+)/突变型 Bm-TFF2 重组质粒的构建
取大蹼铃蟾皮肤组织约 20 mg, 按总 RNA 提取试剂盒说明提取组织总 RNA(TRNA), 并用分光光度计和 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和完整性。取一定量的总 RNA, 用 Oligo(dT)和 PrimeScript Reverse Transcriptase 逆转录为 cDNA。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 各突变体的引物序列见表 1。各突变体的正向引物序列都包括 *Kpn* I 酶切位点(斜体)和对应的 N 端 5 个氨基酸序列(黑体), 反向引物序列包括 *Eco*R I 酶切位点(斜体)、终止子(下划线)和相应 C 端的 5 个氨基酸序列(黑体)。N 端突变体(记为 BNM)缺乏 N 端起始的 4 个氨基酸, C 端突变体(记为 BCM)缺乏 C 端的 5 个氨基酸。以 Bm-TFF2

表 1 BM-TFF2 突变体的引物序列
Tab. 1 The primer sequences of BM-TFF2 mutants

突变体 Mutants	引物序列 Prime sequence (5'-3')
BNM	
Sence prime	tatgg <i>tac</i> ctatgagatagataac
Anti-sence prime	tatg <i>t</i> cg <u>tattcttgaggtt</u> taaa
BCM	
Sence prime	tatgg <i>tac</i> cggtttccaatctat
Anti-sence prime	tat <i>gtc</i> ga <u>ttaaagcaccata</u> ctgt
BAM	
Sence prime	tat <i>gt</i> taccggtttccaatctat
Anti-sence prime	tatg <i>t</i> cgact <u>tattcttgaggtt</u> taaa

的 cDNA 为模板, 按照 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min 获得 PCR 产物, 产物通过 TA 克隆与 pMD-19T simple 克隆载体连接形成 pMD-19T/Bm-TFF2 突变型重组质粒, 将重组质粒转化 DH5 α 。次日, 挑出经蓝白斑筛选的白色克隆并用克隆载体的通用引物 M13-47 和 RV-M 行菌落 PCR 检测。抽提阳性克隆质粒, 用 *Kpn* I/*Eco* R I 双酶切后再与相同酶切后的 pET-32a(+) 连接形成 pET-32a(+)/Bm-TFF2 突变型重组质粒, 转化 BL21(DE3) 并用表达载体的通用引物 S.Tag 和 T7-Ter 行菌落 PCR 检测生长的克隆并将阳性克隆测序。构建精氨酸突变体的(记为 BAM)正向引物序列: 5'-tgctgtttttatcagcaatcgtaacataattggtgctttaaacttaa-3'; 反向引物序列: 5'-ttaaagtttaaagcaccaaattgtattctccttgctgaaataaacagca-3'。按照 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit 进行操作并测序确认两个精氨酸已经突变为异亮氨酸和缬氨酸。再以该突变质粒为模板, 用 BAM 的引物扩增, 同上方法操作即可得精氨酸突变的表达载体。

1.2.2 重组融合蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化 分别挑取测序正确的 N 端、C 端突变以及第 44 和 45 位精氨酸各突变为异亮氨酸和缬氨酸的单克隆于 5 mL LB 培养基, 37 °C, 140 r/min 摇过夜。次日晨, 取过夜菌液 1 mL 接种到 1 L 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养瓶, 相同条件下, 摇菌液至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h。收集菌液, 8 000 g 离心 10 min 获得细胞沉淀。将沉淀悬浮于 100 mL 冰冷的含 0.3 mol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑、pH8.0 的 50 mmol/L 磷酸盐溶液中, 冰浴中用超声波细胞粉碎机(JY92-2D, 宁波新芝生物科技股份有限公司)以 350 W 工作 60 个循环(工作 6 s, 间歇 10 s)。4 °C, 15 000 g 离心 30 min, 弃上清, 收集包涵体部份并用 Equilibration Buffer(含 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L 磷酸盐溶液, pH:8.0)常温溶解 4 h, 16 000 r/min, 离心 30 min, 取上清并用组氨酸选择的镍亲和层析柱纯化。10 倍体积的 Washing Buffer(含 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L 磷酸盐溶液, pH:6.3)洗脱结合镍柱的非特异性蛋白, 最后用 Elution Buffer(含 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L 磷酸盐溶液, pH:5.0)洗脱结合在镍柱上的融合蛋白。收集洗脱液并用含 6 mol/L 尿素的生理磷酸盐溶液于 4 °C 进行梯度透析, 直至最后用无

尿素的生理磷酸盐溶液透析三次, 收集透析液超滤浓缩, 用胶浓度为 12% 的 SDS-PAGE 并行考马斯亮蓝染色分析重组融合蛋白的纯化过程。RP-HPLC 对超滤浓缩的蛋白液进一步纯化。操作如下: 选用 C4 色谱柱(Zorbax 300 SB C₄ column, 4 $\times$ 300 mm), 将样品分别上样于预先用含 0.1%TFA 的超纯水平衡好的 C4 柱, 待穿透峰流出后, 用含 0.1%TFA 的 ACN 进行线性梯度洗脱。

1.2.3 重组融合蛋白的鉴定 收集 280 nm 对应的最高洗脱峰, 抽干 TFA 和 ACN 后, 冻干和溶解样品, 蛋白定量试剂盒定量。各取等量的 TRX-BNM、TRX-BCM 和 TRX-BAM 融合蛋白行 SDS-PAGE (12%)。同时, 遵从 Western blotting 的操作过程, 将 SDS-PAGE 胶上的蛋白转印到 PVDF 膜, 分别用稀释 3 000 倍的抗 Bm-TFF2(实验室免疫家兔制备所得)以及抗 TRX 抗体(Invitrogen, USA)4 °C 反应过夜, 再用 5 000 倍稀释的山羊抗兔和山羊抗鼠血清常温下反应 1 h, 化学发光法检测重组融合蛋白的特异性。

1.2.4 突变型融合蛋白的促细胞迁移活性 用包括有 10%胎牛血清(FCS)、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM 和 Ham's F 12 (1:1)培养基于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养人胃癌上皮细胞系 AGS。待细胞生长状况良好时, 更换细胞培养液, 即用无血清的 DMEM 和 Ham's F 12(1:1)饥饿细胞 24 h, 再采用 Boyden Chamber(Chemicon, 美国)系统测定细胞迁移活性(Liu et al, 2008)。具体操作如下: 胶原(10 μ g/cm²)均匀包埋 Millicells 底部膜的上室面, 取饥饿的过夜细胞, 在每个上室里加入约 1.0×10^5 的 AGS, 下室中加入激动剂, 包括 100 nmol/L 或 200 nmol/L 重组突变型融合蛋白、10 nmol/L 的生长因子作为阳性对照, 100 nmol/L 或 200 nmol/L 重组的 TRX 作为阴性对照, 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育。18 h 后, 用枪头和棉签完全移走上室面没有迁移的细胞, 再用含 2%无水乙醇, 0.1 mol/L 硼酸(pH: 9.0)配制的 0.025%的结晶紫染色液室温下对细胞染色 30 min, 10%的乙酸洗脱结合的结晶紫, 在 586 nm 波长下读取各实验组的吸光度值, 并计算比较不同激动剂的迁移率。以上实验重复 3 次。

2 结果

2.1 pET-32a(+)/突变型 Bm-TFF2 表达质粒的构建 提取来源于大蹼铃蟾皮肤组织的总 RNA,

RT-PCR 后分别用对应的突变引物扩增得到 BAM、BNM 和 BCM 约 310 bp 的目的片段(图 1 A), 并与 pMD-19T 载体连接后转化 DH5 α 。将双酶切阳性克隆质粒所得的 BAM、BNM 和 BCM 基因片段分别连接表达载体 pET-32a(+)形成重组质粒并转化 BL21。选择测序正确的阳性克隆, 并用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 同时酶切 pET-32a(+)/BAM、BNM 和 BCM 重组质粒, 其检测结果如图 1 B 所示, 三种突变型重组质粒经双酶切后都在相对分子质量为 310bp 的位置出现条带, 表明 3 个突变体分别连接到表达载体的相应位置。

2.2 重组融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

测序方法分别检测每种 Bm-TFF2 突变体单克隆的正确性。如图 2 A 所示, BNM 的突变是 N 端缺失了 4 个起始氨基酸——GFPI; 而 BCM 的突变是 C 端缺失了 4 个终止氨基酸——KPKQ; BAM 的突变则发生在分子中第 44 和 45 位精氨酸上, 两者分别突变为异亮氨酸和缬氨酸。将测序正确的各突变体克隆分别接种于 1 L LB 培养基中, 37 °C, IPTG 诱导 4 h, 如图 2 B 所示, 2 道菌液中相对分子质量为 33 000 的位置出现一条颜色深而粗的诱导条带, 提示诱导后融和蛋白的表达量显著增加, 并且每种融和蛋白

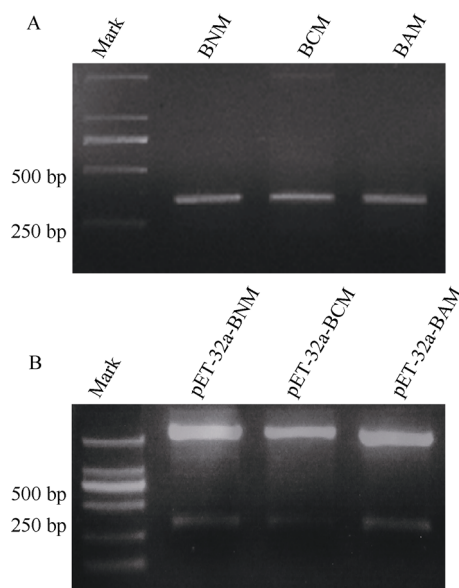


图 1 以大蹼铃蟾 cDNA 为模板扩增所得的 Bm-TFF2 突变体的 PCR 产物

Fig. 1 The identification of the Bm-TFF2 mutant recombinant plasmids by taking the cDNA of *Bombina maxima* as a template

A) Bm-TFF2 突变体的 PCR 产物; B) *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切检测构建的 Bm-TFF2/pET-32a(+)突变质粒。

A) The PCR products of Bm-TFF2 mutant fragments. B) The double digestive products of Bm-TFF2/pET-32a(+) mutant plasmids with *Kpn* I and *Eco*R I.

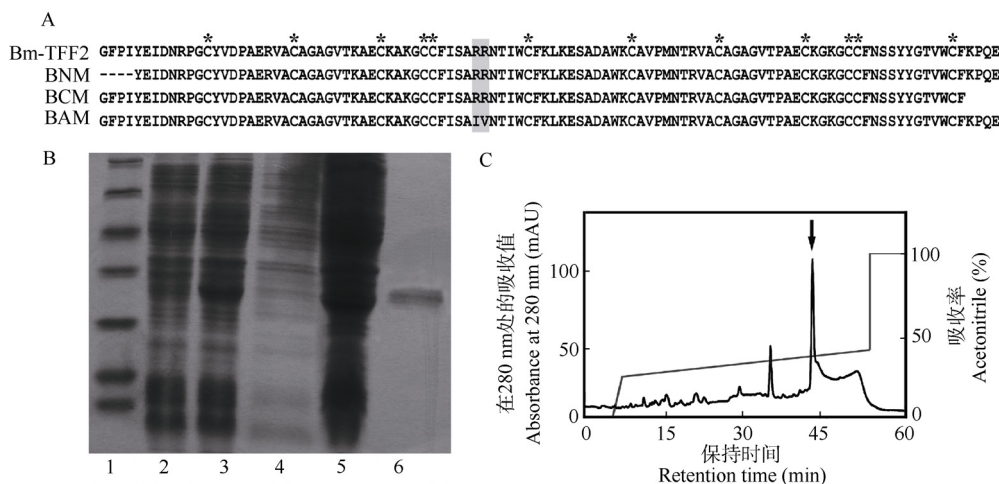


图 2 重组 Bm-TFF2 突变体的构建与纯化

Fig. 2 Expression and purification the recombinant Bm-TFF2 mutant proteins

A)野生型 Bm-TFF2、BNM、BCM 和 BAM 的氨基酸序列组成。BNM 和 BCM 在野生型 N 端和 C 端各缺少 4 个氨基酸序列。然而, BAM 则是分子中的两个精氨酸分别被异亮氨酸和缬氨酸所替代。B)SDS-PAGE 分析 TRX-BNM 的表达和纯化过程。1 道, 相对分子质量标准; 2 道, 无 IPTG 诱导的细胞裂解液; 3 道, 0.5 mmol/L IPTG 诱导的细胞裂解液; 4 道, IPTG 诱导后的细胞裂解液上清; 5 道, IPTG 诱导后的细胞裂解液沉淀; 6 道, 洗脱液洗脱包涵体结合镍亲和柱所得的融合蛋白部分。C)反向 HPLC C4 柱纯化重组蛋白 TRX-BNM。箭头所指的最高峰即为高度纯化的 TRX-BNM 融合蛋白。

A) The amino acid sequences of wild type Bm-TFF2, BNM, BCM and BAM. The N and C terminus of BNM and BCM lack of 4 amino acid residues, respectively, while in BAM the two Rs are mutated to I and V. B) SDS-PAGE analysis of the TRX-BNM expression and purification. Lane 1, the molecular weight marker; lane 2, cell lysate without IPTG induction; lane 3, cell lysate with 0.5 mmol/L IPTG induction; lane 4, cell lysate supernatant after IPTG induction; lane 5, cell lysate precipitation after IPTG induction; lane 6, the eluted fusion proteins after His-select nickel affinity column. C) Purification of recombinant TRX-BNM in a reverse-phase HPLC C4 column. The peak was the highly purified TRX-BNM fusion proteins, as indicated by an arrow.

在超声破碎后的菌液上清中含量较少(3 道), 而主要存在于菌液沉淀, 即包涵体中(4 道)。充分溶解包涵体并将离心后的包涵体上清结合组氨酸选择的镍亲和层析柱, 含 8 mol/L 尿素, pH:5.0 的磷酸盐溶液能洗脱与亲和柱结合的蛋白部分, 其纯度可达 70%(5 道)。为得到高纯度的重组蛋白, RP-HPLC 进一步纯化透析后的洗脱液, 当洗脱梯度为 70%时, 280 nm 对应的最高洗脱峰即为纯化的突变型 Bm-TFF2 重组融合蛋白, 如图 2 C 箭头所示。

2.3 重组融合蛋白的鉴定

收集各样品在 280 nm 处对应的最高洗脱峰, 抽干 TFA 和 ACN, 以及冻干和溶解样品。各蛋白样品经 SDS-PAGE 分析后都在相对分子质量为 33 k 的地方出现明显的单一条带, 其纯度高达 95%(图 3 A)。抗 Bm-TFF2 抗体(图 3 B)以及抗 TRX 抗体(图 3 C)对各重组蛋白进行 Western blotting 检测都在相对分子质量为 33 000 的位置出现特异性的反应条带, 表明纯化所得的蛋白即为原核体系构建表达的突变型 Bm-TFF2 重组蛋白。

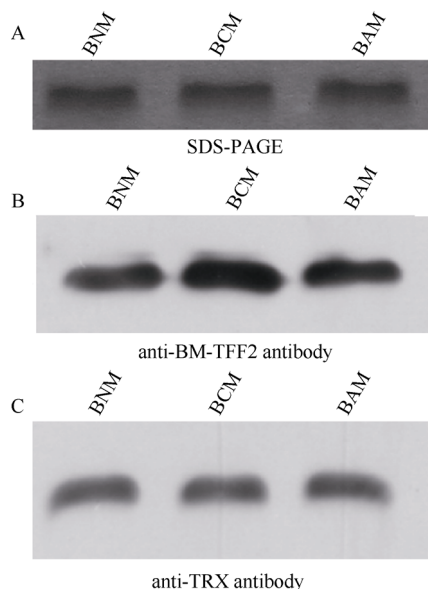


图 3 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析重组蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the recombinant proteins

A)SDS-PAGE 分析重组 TRX-BNM, TRX-BCM 和 TRX-BAM 蛋白; B)Bm-TFF2 抗体行 Western blotting 检测重组 TRX-BNM, TRX-BCM 和 TRX-BAM 蛋白的特异性; C)TRX 抗体行 Western blotting 检测重组 TRX-BNM, TRX-BCM 和 TRX-BAM 蛋白。

A) SDS-PAGE of the recombinant TRX-BNM, TRX-BCM, TRX-BAM; B) Identification of the recombinant TRX-BNM, TRX-BCM, TRX-BAM by Western blotting with anti-Bm-TFF2 antibody; C)Identification of the recombinant TRX-BNM, TRX-BCM, TRX-BAM by Western blotting with anti-TRX antibody.

2.4 突变型融合蛋白的促细胞迁移活性

促进黏膜细胞再生是三叶因子蛋白的重要功能之一(Taupin and Podolsky, 2003), 而上皮细胞的迁移又是黏膜再生的重要保障。三种突变型 Bm-TFF2 重组蛋白处理 AGS 细胞 16 h 后, 细胞迁移活性明显增强并且呈剂量依赖性, 即 100 nmol/L 和 200 nmol/L 重组蛋白的促细胞迁移活性呈逐渐增强的趋势, 并且 200 nmol/L 的细胞迁移活性大约是 100 nmol/L 的两倍。TRX 阴性对照的活性变化无统计学意义, 10 nmol/L 的阳性对照-EGF 与 TRX 相比具有显著的促细胞迁移活性(图 4)。

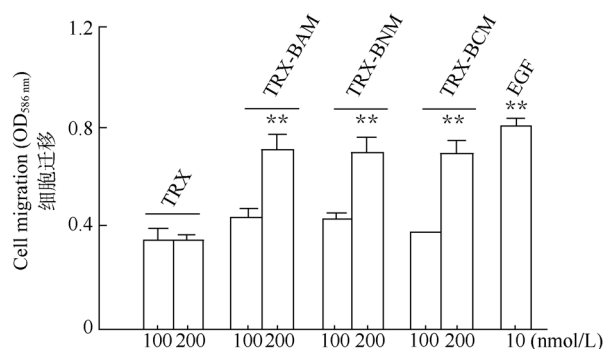


图 4 重组 Bm-TFF2 突变体的促细胞迁移活性

Fig. 4 The activity of epithelial cell migration of recombinant Bm-TFF2 mutant proteins

利用 Boyden 小室, 用不同浓度的 TRX-BNM、TRX-BCM 和 TRX-BAM 重组蛋白检测迁移活性。TRX 被用作阴性对照, EGF 被用作阳性对照。取 3 次独立实验的平均值并用均值±标准误差表示。 $P < 0.05$ 表示有差异; $P < 0.01$ 表示差异显著。

Using Boyden chamber assay, cell migration activity was stimulated by TRX-BNM, TRX-BCM, or TRX-BAM with different concentrations, TRX was a negative control and EGF was a positive control. Values represent means $\pm$ SD of three independent experiments. Significant difference ($* P < 0.05$); Extremely significant difference ($** P < 0.01$).

3 讨论

三叶因子蛋白在大蹼铃蟾皮肤中有两种存在形式。一种是由三个结构域组成的 $\beta\gamma$ -CAT 的 β 亚基, $\beta\gamma$ -CAT 是非晶状体 $\beta\gamma$ -crystallin 和三叶因子蛋白形成的复合物, 具有促细胞迁移和引发细胞凋亡的活性; 另一种是由两个结构域组成, 具有促细胞迁移和细胞增殖活性的 Bm-TFF2(He et al, 2008; Liu et al, 2008)。近期研究又发现重组 Bm-TFF2 全长以及它的两个单结构域都有促细胞迁移活性, 并且全长 Bm-TFF2 还具有抗细胞凋亡活性, 而它的两个单结构域则无此活性, 提示 Bm-TFF2 活性的发挥依赖不同的结构基础(Yu et al, 2010)。该项研究通过比较 Bm-TFF2 和人 TFF2 蛋白的氨基酸组成发

现, Bm-TFF2 在 40~50 位的氨基酸组成中由两个具有亲水性的精氨酸替代了人 TFF2 中相应位置的疏水性氨基酸, 推测两个精氨酸是其发挥生物学活性的关键, 而且这一区域又常常是 TFF 蛋白中受体/配体结合的重要部位(Polshakov et al, 1997; Zhang et al, 2005)。另外, Bm-TFF2 在其 N 端和 C 端序列组成中也出现了与人 TFF2 较大的差异。为此, 我们分别对其分子中的两个精氨酸以及 N 端和 C 端序列进行了突变并检测各种突变体的促细胞迁移活性。因此, 该项研究立足于在体外建立原核表达体系以表达 Bm-TFF2 突变体并研究其结构和功能的关系。由于原核表达体系是一种较为经济和方便的手段, 加之表达量大的优点, 所以选用 pET-32a(+) 体系在大肠杆菌中表达 Bm-TFF2 突变体。pET-32a(+) 表达重组蛋白时, 其显著的特点是其融合蛋白部份-TRX 能够增强目的蛋白的溶解性, 并且有助于分子中二硫键的正确生成(LaVallie et al, 1993; Stewart et al, 1998)。同时, 由于表达的融合蛋白带有 6 个组氨酸, 所以很容易用组氨酸标签的亲合柱来进行纯化。我们选用原核体系表达 N 端和 C 端, 分别缺失 4 个氨基酸的 TRX-BNM 和 TRX-BCM 突变体以及分子中两个精氨酸突变的 TRX-BAM 突变体(图 2 A)。在表达重组融合蛋白时, 如图 2 B 所示, IPTG 诱导后的菌液出现明显的相对分子质量为 33 000 的诱导条带, 这与先前野生型 Bm-TFF2 的表达相似, 但突变型的 Bm-TFF2 由于分子组成的改变使得诱导蛋白主要存在于菌液沉淀中, 这与野生型 Bm-TFF2 的诱导表达有所差异, 后者的诱导蛋白主要存在于菌液上清(Yu et al, 2010)。溶解的包涵体上清经组氨酸选择的亲合柱纯化后可得到纯度达 70% 的融合蛋白, 再用 RP-HPLC 进一步纯化能够使目的蛋白的纯度达 95%(图 3 A)。抗 Bm-TFF2 抗体(图 3 B)以及抗 TRX 抗体(图 3 C)证实了三种重组蛋白的特异性, 结果显示在相对分子质量为 33 000 的位置出现反应条带, 表明纯化所得的蛋白即为原核体系构建表达的突变型 Bm-TFF2 重组蛋白。在获得重组蛋白后, 我们进一步对其活性进行了分析。基于三叶因子的重要功能之一是促进黏膜细胞的再生, 而这一功能的完成与细胞迁移活性相关(Taupin & Podolsky,

2003)。同时通过促进黏膜边缘细胞的迁移来发挥伤口修复和治愈的功能(Dignass et al, 1994; Oertel et al, 2001)。因此, 我们检测了三种突变型 Bm-TFF2 重组蛋白的促细胞迁移活性。结果提示在作用浓度为 100~200 nmol/L 时, 三种突变型的 Bm-TFF2 都具有明显的促 AGS 细胞迁移活性, 并且这一活性具有剂量依赖性, 即 200 nmol/L 重组蛋白的促细胞迁移活性显著性高于 100 nmol/L, 大约是其活性的两倍。同时, 在相同浓度作用下, 无外源蛋白插入的空载体-硫氧还蛋白的促细胞迁移活性却不明显。与 TRX 相比, 10 nmol/L 的 EGF 却具有显著的促细胞迁移活性。更为有趣的是, 三种突变型重组蛋白的促细胞迁移活性之间无明显差异, 并且与重组野生型 Bm-TFF2 全长以及两个单结构域的促细胞迁移活性之间亦无显著差异。由以上结果可以推论, Bm-TFF2 的 N 端、C 端和分子中两个精氨酸的突变体, 甚至是单结构域的 Bm-TFF2 都不影响它的促细胞迁移活性, 而这一活性, 是 Bm-TFF2 发挥伤口修复功能的最基本要素之一。事实上, 三叶因子家族蛋白在胃肠道粘膜的保护和修复过程中发挥着重要功能。它们能与表皮生长因子(EGF)及转化生长因子 α (TGF α)协同作用, 参与损伤组织的上皮重建, 即促进受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面迁移覆盖, 从而促进损伤黏膜的修复(Wong et al, 1999)。ERK1/2 的磷酸化常常为细胞迁移活性所必需并且也是 TFFs 调节信号的关键(Klemke et al, 1997)。研究报道 TFFs 肽能够促进支气管上皮细胞 BEAS-2B 的迁移, 而这一活性, 是依赖蛋白激酶 C(PKC)和胞外信号调节激酶-ERK1/2 的激活, 即 ERK1/2 的磷酸化(Chwieralski et al, 2004)。

总之, 我们用原核表达体系 pET32a(+) 成功表达出三种 Bm-TFF2 的突变型重组蛋白, 并用组氨酸选择的亲合柱和 RP-HPLC 进行纯化, SDS-PAGE 和 Western blotting 检测了重组蛋白的纯度和特异性, 进而用重组蛋白检测了它们的促细胞迁移活性, 结果提示三种突变型 Bm-TFF2 重组蛋白都具有剂量依赖性的促细胞迁移活性, 并且其活性之间无明显的差异。这为揭示 Bm-TFF2 的结构和功能关系以及解释其作用的分子机制提供了有力的依据, 也为进一步开辟 TFFs 的生物制药途径奠定了基础。

参考文献:

Baus-Loncar M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T, 2005. Trefoil factor

family 2 deficiency and immune response [J]. *Cell Mol Life Sci*, 62(24):

- 2947-2955.
- Canas M, Moran Y, Rivero MB, Bohorquez A, Villegas V, Rendon Y, Ramirez E, Valderrama E, Briceno Z, Chiurillo MA, 2009. Interleukin-1 genetic polymorphism: association with gastric cancer in the high-risk Central-Western population of Venezuela [J]. *Rev Med Chil*, **137**(1): 63-70.
- Chatterjee DK, Gnanasammandhan MK, Zhang Y, 2010. Small upconverting fluorescent nanoparticles for biomedical applications [J]. *Small*, **6**(24): 2781-2795.
- Chwieralski CE, Schnurra I, Thim L, Hoffmann W, 2004. Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **31**(5): 528-537.
- Cook GA, Familari M, Thim L, Giraud AS, 1999. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response [J]. *FEBS Lett*, **456**(1): 155-159.
- Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N, 2003. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer [J]. *Lab Invest*, **83**(9): 1343-1352.
- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK, 1994. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β -independent pathway [J]. *J Clin Invest*, **94**(1): 376-383.
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C, 2004. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression [J]. *Peptides*, **25**(5): 885-898.
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Ohtani M, Jones EK, Wang TC, 2007. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 $-/-$ C57BL6 x Sv129 Helicobacter pylori-infected mice [J]. *Am J Pathol*, **171**(5): 1520-1528.
- He YY, Liu SB, Lee WH, Zhang Y, 2008. Melanoma cell growth inhibition by β γ -CAT, which is a novel non-lens β γ -crystallin and trefoil factor complex from frog *Bombina maxima* skin [J]. *Toxicon*, **52**(2): 341-347.
- Katoh M, 2003. Trefoil factors and human gastric cancer (review) [J]. *Int J Mol Med*, **12**(1): 3-9.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA, 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase [J]. *J Cell Biol*, **137**(2): 481-492.
- Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS, Koumariannou A, Playford R, Stamp GW, 1999. Trefoil factor-2, human spasmodic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells [J]. *Lab Invest*, **79**(5): 537-546.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM, 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm [J]. *Biotechnology: N Y*, **11**(2): 187-193.
- Liu SB, He YY, Zhang Y, Lee WH, Qian JQ, Lai R, Jin Y, 2008. A novel non-lens β γ -crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin and its functional implications [J]. *PLoS One*, **3**(3): e1770.
- Oertel M, Graness A, Thim L, Buhling F, Kalbacher H, Hoffmann W, 2001. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **25**(4): 418-424.
- Polshakov VI, Williams MA, Gargaro AR, Frenkiel TA, Westley BR, Chadwick MP, May FE, Feeney J, 1997. High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: a single trefoil motif protein [J]. *J Mol Biol*, **267**(2): 418-432.
- Siu LS, Romanska H, Abel PD, Baus-Loncar M, Kayademir T, Stamp GW, Lalani el N, 2004. TFF2 (trefoil family factor2) inhibits apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines [J]. *Peptides*, **25**(5): 855-863.
- Stewart EJ, Aslund F, Beckwith J, 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins [J]. *EMBO J*, **17**(19): 5543-5550.
- Taupin D, Podolsky DK, 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(9): 721-732.
- Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK, 2000. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**(2): 799-804.
- Wong WM, Poulosom R, Wright NA, 1999. Trefoil peptides [J]. *Gut*, **44**(6): 890-895.
- Yu G, Zhang Y, Xiang Y, Jiang P, Chen Z, Lee W, 2010. Cell migration-promoting and apoptosis-inhibiting activities of Bm-TFF2 require distinct structure basis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **400**(4): 724-728.
- Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(4): 1027-1033.