DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.027
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1058 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1058-03

TRAIL蛋白的表达、纯化和抗肿瘤活性

李小安,房殿春,杨仕明,罗元辉 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆,400038)

提 要:目的 利用大肠杆菌表达出TRAIL蛋白,并观察分离纯化后的TRAIL蛋白的抗肿瘤活性。方法 采用$CaCl_2$法将带有TRAIL(氨基酸114—281,含六聚组氨酸尾)基因的pET-d质粒转入大肠杆菌BL21(DE3)pLysS,IPTG诱导蛋白表达;使用Ni-NTA层析柱分离纯化蛋白,SDS-PAGE和Western blot法鉴定TRAIL蛋白的表达;MTT法检测TRAIL蛋白的抗肿瘤活性。结果 我们分离纯化出分子量为20.1×10^3的蛋白,Western blot法证实为TRAIL蛋白,MTT法检测出其有较高的抗肿瘤活性,呈现出较好的时效和量效关系。结论 成功地利用大肠杆菌表达、Ni-NTA层析柱分离纯化出具有抗肿瘤活性的TRAIL蛋白,并证明其具有抗肿瘤活性。

关键词:TRAIL(肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体);大肠杆菌;抗肿瘤活性
中图法分类号:R378.21;R394.3;R73-362 文献标识码:A

Expression and purification of TRAIL protein and its antitumor activity

LI Xiao-an, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To express TRAIL protein using *Escherichia coli* and observe antitumor activity of purified TRAIL protein. **Methods** The pET-d expression plasmid containing TRAIL (amino acids 114-281, with 6-his tag) gene was transfected into *Escherichia coli* by $CaCl_2$ method, the expression of protein was induced by IPTG. Protein was purified by Ni-NTA chromatography column, and purified protein was determined by SDS-PAGE and Western blot; Antitumor activity of TRAIL protein was measured by MTT method. **Results** Results of SDS-PAGE and Western blot proved that the 20.1×10^3 protein purified was TRAIL protein MTT method showed that. TRAIL protein had high antitumor activity and good relationship of concentration-effect and time-effect. **Conclusion** TRAIL protein with antitumor activity was successfully expressed with *Escherichia coli* and purified by Ni-NTA chromatography column.

Key words: TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand); *Escherichia coli*; antitumor activity

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是最近发现的TNF家族成员之一,可诱导多种肿瘤细胞凋亡,体内实验也发现其有令人鼓舞的抗肿瘤作用[1],因此TRAIL有可能成为新的抗肿瘤药物。国外已有一些TRAIL抗肿瘤的研究报道[2,3],但国内尚少见报道。为今后进一步研究TRAIL蛋白的生理和药理作用,我们利用大肠杆菌BL21(DE3)PlysS表达TRAIL蛋白,经分离纯化后,对其活性进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料

带有TRAIL(氨基酸114—281,带六聚组氨酸尾)基因的pET-d质粒由我室购建;结肠癌细胞株SW480由本院烧伤研究所李剑明博士惠赠;大肠杆菌BL21(DE3)PlysS购自Invitrogen公司;排阻分子量为5000的硝酸纤维素脱盐柱购自PIERCE公司;Western Blot化学发光试剂盒、羊抗人TRAIL多克隆抗体购自Santa Cruz生物技术公司,Ni-NTA介质购自Qiagen公司;IPTG、咪唑、MTT购自上海生物工程技术公司;马抗山羊IgG购自北京中山生物技术有限公司;中分子量蛋白标准(14.4×10^3~97.4×10^3)购自北方同正生物技术发展公司。

1.2 方法

1.2.1 TRAIL蛋白的表达 用$CaCl_2$法[4]将带有TRAIL基因的pET-d质粒转入大肠杆菌BL21(DE3)PlysS,在含100 μg/ml氨苄青霉素和34 μg/ml氯霉素的LB培养平板上挑选单菌落。转入质粒的大肠杆菌在1 000 ml含上述抗生素的LB培养液中摇至D_λ值为0.6左右,加IPTG至终浓度为0.1 mol/L,200 r/min继续摇3.5 h,4 ℃下10 000×g离心15 min,弃上清,沉淀置于-70 ℃下保存。

1.2.2 TRAIL蛋白的分离纯化 沉淀用0.5 mmol/L的PBS(pH 8.0)重悬,加溶菌酶至1mg/ml,冰上放置30 min,注射器反复抽提后加DNaseⅠ至5 μg/ml,冰上放置15 min,4 ℃下10 000×g离心20 min,弃沉淀,上清内即含有TRAIL蛋白,取20 μl作Western blot。Ni-NTA介质与剩余的上清充分混合后装柱,用含有20~500 mmol/L咪唑的PBS(pH 8.0)洗柱,收集各组份,作SDS-PAGE分析,合并含有TRAIL的组份,脱盐柱脱盐后,-70 ℃保存。

1.2.3 SDS-PAGE 纯化后的蛋白和中分子量蛋白标准经DTT变性后,用含10%的聚丙烯酰胺的分离胶和5%的积层胶在Tris-甘氨酸缓冲系统中电泳,凝胶用考马斯亮蓝染色。

1.2.4 Western blot法鉴定TRAIL蛋白的表达 上清液、纯化

基金项目:全军"十五"科研基金资助项目(01MA172)
作者简介:李小安(1968—),男,安徽省东至县人,博士研究生,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。电话:(028)6570938
收稿日期:2001-06-28;修回日期:2001-08-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后的蛋白和中分子量蛋白标准样品进行 SDS-PAGE 电泳, 4 ℃下用湿式电泳槽转移过夜, 使凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜, 丽春红染色, 用铅笔标记分子量。PVDF 膜经 5%脱脂奶粉封闭 4 h, 羊抗 TRAIL 抗体、辣根过氧化酶标记的马抗山羊 IgG 分别孵育 1 h 后, 将膜浸入等体积混合的 Western blot 化学发光试剂 A 液和 B 液中 2 min, 暗室中将膜贴在 X 胶片上曝光数秒, X 胶片上冲洗后, 经凝胶成像系统打印。

1.2.5　MTT 法检测 TRAIL 蛋白的活性　　结肠癌 SW480 细胞用含 10%的 RPMI1640 培养液培养, 常规传代。取对数生长期细胞以 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 用 5%胎牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 按每孔 3×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 每孔终体积为 200 μl, CO_2 孵箱内培养 3 d 后加 TRAIL。①量效关系按 0、10、30、100、300、1 000、3 000 ng/ml 给予 TRAIL[5], 同时设对照, 18 h 后测值。②时效关系则每孔加 TRAIL 1 000 ng/ml, 取孵育 0、6、12、18、24、30 h 细胞分别测值, 每个时段均设对照。以上实验重复 3 次, 取平均值。测值 4 h 前每孔加 20 μl 5 mg/ml MTT, 孵育后吸去孔内上清, 每孔加 150 DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪测 D_{570} 值。细胞抑制率(Inhibition rate)=(1−实验组 D_{570}/对照组 D_{570})×100%。

2　结果

2.1　SDS-PAGE

结果可得一 20.1×10^3 左右的蛋白条带, 见图 1。

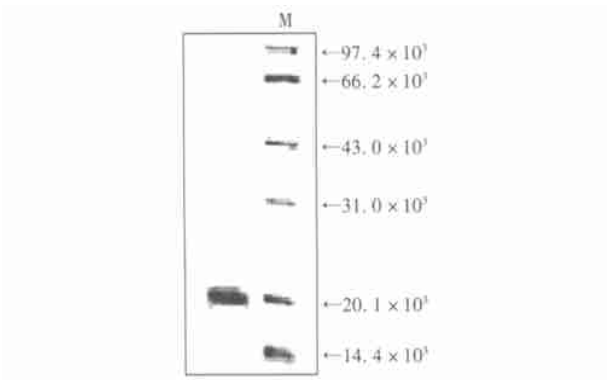


图 1　纯化后的蛋白 SDS-PAGE 分析结果

Fig 1　Result of SDS-PAGE analysis of purified soluble protein

M: Markers

2.2　Western blot 法鉴定 TRAIL 蛋白的表达

上清液和纯化后的蛋白在 20.1×10^3 处均有一阳性条带, 见图 2。



图 2　上清液和纯化后的蛋白 Western 印迹结果

Fig 2　Results of Western blot of supernatant and purified soluble protein

Lane 1, 2: Supernatant; Lane 3, 4: Purified soluble protein

2.4　MTT 法检测 TRAIL 蛋白的活性

不同剂量的 TRAIL 与结肠癌细胞 SW480 共同孵育 18 h 后, 其对细胞生长的抑制率从 10 ng/ml 的 1.24%上升至 3 000 ng/ml 的 83.09%, 其量效关系曲线近似标准的"S"形, 近似直线部分位于 100~1 000 ng/ml 之间, 见图 3。1 000 ng/ml 的 TRAIL 对细胞生长的抑制随时间的延长而增加, 从 6 h 的 34.71%到 30 h 的 83.53%。1 000 ng/ml 的 TRAIL 作用 24 h 即达到满意的效果, 其抑制率为 81.32%, 见图 4。

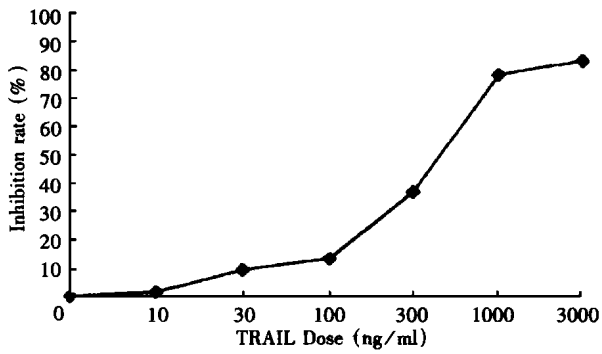


图 3　TRAIL 对结肠癌细胞 SW480 抑制率的量效关系

Fig 3　Concentration-effect relationship of TRAIL on inhibition rate of SW480 cell line

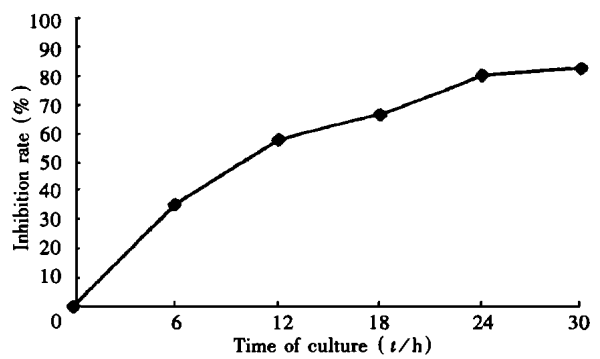


图 4　TRAIL 对结肠癌细胞 SW480 抑制率的时效关系

Fig 4　Time-effect relationship of TRAIL on inhibition rate of colon SW480 cell line

3　讨论

近几十年来, 人们对大肠杆菌的遗传特征有了充分的了解, 而且大肠杆菌的培养具有价格便宜、易于操作的特点, 从而使大肠杆菌成为表达蛋白的首选宿主。大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 是用来表达带组氨酸尾融合蛋白的 pET-d 质粒的合适宿主, 故被我们选择为工程菌。利用组氨酸残基与 Ni+结合的特点, 我们使用 Ni-NTA 作为介质进行金属螯合层析分离纯化 TRAIL 蛋白。

TRAIL 蛋白的可溶部分(氨基酸 114~281)分子量约为 20×10^3[11], SDS-PAGE 结果显示我们所纯化的蛋

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

白分子量为20.1×10³，二者基本一致。使用"单抗"TRAIL抗体进行Western blot，结果显示我们所纯化的蛋白和上清液所在泳道阳性条带均在20.1×10³处，进一步证实了我们所提的蛋白为可溶性TRAIL。

为了检测TRAIL的抗肿瘤活性，我们用MTT法研究TRAIL对结肠癌细胞系SW480的作用，结果显示，TRAIL能有效的杀死结肠癌SW480细胞，呈现出较好的量效关系和时效关系。国外也有报道[1,6]，TRAIL对包括SW480在内的多种结肠癌细胞系有较好的作用。与国外类似的结果表明我们所纯化的蛋白具有很好的抗肿瘤活性。TRAIL抗肿瘤作用主要是通过与TRAIL-R1、R2结合后导致肿瘤细胞凋亡[7,8]而实现的，MTT法检测的是活细胞数，因此，TRAIL诱导细胞凋亡的作用尚需在今后进一步研究。

尽管最近发现正常人的肝细胞对TRAIL很敏感，有可能给TRAIL的临床应用带来障碍，但Ozoren等[6]发现caspase-9的抑制剂Z-LEHD-FMK可以保护正常人的肝细胞，而不影响TRAIL对一些肿瘤细胞的杀伤作用。因此，TRAIL仍有可能成为一种很好的抗肿瘤药物。本研究成功地利用大肠杆菌表达出TRAIL蛋白，并且分离纯化出的TRAIL蛋白有较好的抗肿瘤活性，为今后TRAIL进一步开发利用提供了实验基础。

参考文献：

[1] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155—162.

[2] Walczak H, Miller R E, Ariail K, *et al*. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*[J]. Nat Med, 1999, 5(2): 157—163.

[3] Snell V, Clodi K, Zhao S, *et al*. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies[J]. Br J Haematol, 1997, 99(3): 618—624.

[4] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998.55—56.

[5] 刘昌孝, 孙瑞元 著. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999.17.

[6] Ozoren N, Kim K, Burns T F, *et al*. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. Cancer Res, 2000, 60(22): 6 529—6 265.

[7] Pan G, Ni J, Wei Y F, *et al*. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. Science, 1997, 277(5 327): 815—818.

[8] Sheridan J P, Marsters S A, Pitti R M, *et al*. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. Science, 1997, 277(5 327): 818—821.

（编辑 潘式文）

（上接1057页）

较相差显著（$P<0.05$），同样，中性粒细胞的粘附率也表现类似变化趋势。即随C5a浓度的增加，中性粒细胞与人脐静脉内皮细胞间的粘附率逐渐递增。

2.2 C5a刺激内皮细胞与P-选择素表达及中性粒细胞粘附率的时效关系

用250 nmol/L的C5a作用5 min后，P-选择素水平就明显上升（由正常时的0.319±0.02升至0.422±0.07），10 min最高达0.568±0.04，而后逐渐下降。但各时相点测值均与对照有显著差异（$P<0.05$），同样，粘附率也随作用时间延长而增加，尤以作用后15 min最高（测值为12.833±0.09，$P<0.01$），30 min时虽有下降，但显著高于对照组水平（$P<0.05$）。

3 讨论

中性粒细胞参与机体的多种炎症反应。其作用的发挥由三个步骤组成：即血液中的中性粒细胞在激活的血管内皮细胞表面缓慢滚动；中性粒细胞激活并与内皮细胞之间发生粘附；细胞变形经由血管内皮细胞间隙外移并向炎症部位游走[2]。其中，第二步是其发挥免疫功能的关键环节，涉及多种粘附分子的参与。P-选择素是一种分子量为140×10³的跨膜糖蛋白，平时存在于内皮细胞的Weibel-Palade小体及血小板α颗粒中，当内皮细胞受到组织胺、氧自由基等因素作用后数分钟便在细胞表面表达，参与炎症细胞的滚动效应的产生[3]。研究发现：预先用蛇毒因子耗竭体内补体可减轻P-选择素介导在中性粒细胞的聚集和粘附程度[4]。本实验结果显示，当用不同浓度的C5a刺激10 min时，P-选择素的表达随着C5a浓度的增加而增加，中性粒细胞粘附率也表现类似的趋势，二者存在量效关系；用250 nmol/L的C5a刺激不同时间，P-选择素的表达水平随着刺激时间的延长而升高，15 min后逐渐下降，而中性粒细胞粘附率在30 min之前逐渐升高，30 min略有下降，二者存在时效关系。中性粒细胞粘附率的下降滞后于P-选择素水平的降低，提示P-选择素可能是影响中性粒细胞与内皮细胞间粘附的重要因子之一。本实验结果对C5a过敏毒素介导的急性炎症反应的防治提供了实验依据。

关键词：C5a；P-选择素；内皮细胞粘附率
中图法分类号：R392.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Coll V B, Grau J M, Lopez S A, *et al*. Circulating soluble adhesion molecules in patients with classical polyarteritis nodosa[J]. Br J Rheumatol, 1997, 36(11): 1 178—1 183.

[2] Tedder T F, Steeber D A, Chen A, *et al*. The selectins: vascular adhesion molecules[J]. FASEB J, 1995, 9(10): 866—873.

[3] Gibbs S A, Weiser M R, Kobzik L, *et al*. P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition[J]. Surgery, 1996, 119(6): 652—656.

[4] Bless N M, Tojo S J, Kawarai H, *et al*. Differing patterns of P-selsetin expression in lung injury[J]. Am J Pathol, 1998, 153(4): 1 113—1 122.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net