

人的类硫氧还蛋白还原酶活性的测定及其对细胞凋亡的影响

金 鉴 周 彦 胡晓燕 石 宁 韩春雨

许彩民 强伯勤 袁建刚 彭小忠**

中国医学科学院基础医学研究所, 协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室,
国家人类基因组北方研究中心, 北京 100005

摘要 对人的类硫氧还蛋白基因(*hTRXL*)进行了 Northern 印迹法鉴定的基础上表达了该基因产物, 并对 *hTRXL* 蛋白的功能进行了研究. *hTRXL* 胰岛素还原酶活性实验显示全长 *hTRXL* 和其 N 端结构域(*hTRXL-N*)都具有胰岛素还原酶活性; C 端区域(*hTRXL-C*)不具有胰岛素还原酶活性. 将含有 *hTRXL* 基因的重组质粒转染乳癌细胞系 MCF-7, 该细胞对于药物引起的细胞凋亡较未转染 *hTRXL* 的 MCF-7 对照细胞更为敏感.

关键词 类硫氧还蛋白 胎脑 淋巴瘤细胞 细胞凋亡

硫氧还蛋白(TRX)最早是作为大肠杆菌核苷酸还原酶的电子供体被发现的, 它对大肠杆菌的 DNA 复制起了重要作用. 此后, 人们相继发现了 TRX 在大肠杆菌中的其他重要作用, 如 TRX 是 T7 DNA 聚合酶复合体中不可缺少的亚基^[1], 并在丝状噬菌体 M13 和 f1 的成熟过程中起作用^[2, 3]等. 在真核生物中, TRX 同样具有重要的生理生化功能. 与在原核生物中相似, 真核生物 TRX 也起着电子供体的作用^[4]; 除此之外, 它还能帮助和促进含有二硫键的蛋白的折叠^[5]; 通过修饰一些重要转录因子, 如 NF- κ B 和 AP-1 等以调节它们的活性^[6, 7]; TRX 还是一种有效的抗氧化剂, 能保护细胞免受氧化压力^[8]. 除了上述方面, 近年来关于硫氧还蛋白在体内外对细胞生长的促进和对细胞凋亡的抑制作用的研究也越来越成为热点. 据文献报道, 将重组的人 TRX 加入无血清的合成培养基中培养的肿瘤细胞株中, 几天后能观察到细胞的明显增殖^[9]; 而稳定转染了人的 TRX cDNA 后的 WEHI7.2 细胞在细胞质硫氧还蛋白表达量增加的同时, 细胞生长得到明显增强, 且对药物诱导的细胞凋亡具有了明显的抗性^[10]. 不仅如此, 人们还发现活性中心突变的

TRX 能作为正常的 TRX 的竞争性抑制剂抑制细胞的生长并促进细胞的凋亡. 已有的研究成果, 使人们有可能将硫氧还蛋白作为抗癌药物开发的靶点之一, 通过抑制硫氧还蛋白系统来抑制硫氧还蛋白依赖的细胞增殖^[11].

人的类硫氧还蛋白基因(human thioredoxin-like gene, *hTRXL*)是本实验室选用不同发育阶段的人胎儿脑组织, 应用差异显示 PCR(DDRT-PCR)及 cDNA 文库筛选的方法分离出的具有差异表达特征的全长 cDNA (GenBank 登录号 AF051896). 该 cDNA 长 1230 bp, 含有一个 867 bp 的开放阅读框, 一个 132 bp 的 5' 非编码区和一个 231 bp 的 3' 非编码区, 编码一个含 289 个氨基酸的蛋白质. 该蛋白质 N 端的 105 个氨基酸残基与人的硫氧还蛋白(*hTRX*)有 42% 的同源性, 而且这个区域还包含有硫氧还蛋白家族进化上高度保守的活性位点序列(Cys-Gly-Pro-Cys). 然而, 关于剩余 184 个氨基酸的 C 端区域尚无法在目前公共数据库中查到相关信息. Northern 印迹法结果显示该基因的表达在不同发育阶段上存在明显差异^[12]. *hTRXL* 融合表达产物的还原酶活性检测及其 N 端结构域三维晶体结构

2001-12-10 收稿, 2002-03-11 收修改稿

* 国家“八六三”、“九七三”项目(G199805102)和国家自然科学基金资助项目(批准号: 39830070)

** 联系人, E-mail: yuanjg@east.net.cn

的测定(结果待发表),直接有力地确证了 hTRXL 是硫氧还蛋白家族成员这一假设。

目前认为哺乳动物的硫氧还蛋白家族共包括 3 个成员^[13]: 硫氧还蛋白-1(12 ku); 位于线粒体中的硫氧还蛋白-2(18 ku)以及分子质量较大的类硫氧还蛋白 hTRXL(32 ku)。在上述 3 种硫氧还蛋白中对 hTRXL 的了解最少,而有关其 C 端区域的特性和功能,目前在国内外还未见有任何报道。

因此值得特别指出的是,无论是 DDRT-PCR 的结果还是从不同发育阶段胎脑 RNA Northern 印迹法结果来看,我们的实验都明显地提示 hTRXL 可能与胎儿大脑的发育密切相关。因此,有必要进一步鉴定其生化特性并从其对细胞生长、凋亡作用的角度来研究 hTRXL 蛋白可能的生理功能。

1 方法

1.1 蛋白的纯化

将 hTRXL cDNA 全长编码区及其 N 端区域(编码 1~105 位残基, hTRXL-N)和 C 端区域(编码 106~289 位残基, hTRXL-C)分别克隆到 pGEX-4T-3 质粒(Amersham Pharmacia Biotech)中。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 中,并按常规方法培养和诱导表达目的蛋白,超声破菌获得细胞抽提物。GST 融合蛋白采用 Amersham Pharmacia 生物技术公司的谷胱甘肽-Sepharose 亲和层析柱及 PBS(pH 7.4)缓冲系统进行纯化。用预冷的 3 倍柱床体积 PBS 缓冲液平衡谷胱甘肽-Sepharose 亲和柱后,4℃ 下将细菌裂解液上柱。用 50~80 倍柱床体积的 PBS 缓冲液缓慢冲洗层析柱,并用考马斯亮蓝 G250 检测流出液直至没有蛋白流出为止。用 PBS 溶解凝血酶(thrombin),使其终浓度达 30 U/mL 后,与层析柱内介质等体积加入层析柱,混匀,4℃ 振荡进行柱上酶切 14 h 得纯化后的 hTRXL, hTRXL-N 和 hTRXL-C 蛋白。

1.2 胰岛素还原活性的测定

600 μ L 反应体系中含有 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 100 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 900 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 2 mmol/L EDTA, 0.13 mmol/L 牛胰岛素(Sigma)及 5 mmol/L 纯化蛋白。其中,牛胰岛素在实验前加入。加入 1 mmol/L DTT 混匀启动还原反应,立即置于紫外分光光度计下,每隔 1 min 记录 650 nm 波长下的光吸收值。方法详见文献[14]。

1.3 MCF-7 细胞转染

将 hTRXL 的编码区全长 cDNA 序列、N 端结构域及 C 端区域的 cDNA 序列用 EcoR I 酶切后连接到 pcDNA3.1/Zeo 载体上。鉴定插入方向后,提取质粒,用于转染。在 37℃, 5% CO₂ 条件下,将 MCF-7 细胞(乳腺癌细胞系)于含有 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基中培养。以常规方法进行转染,获得瞬时表达的 MCF-7 细胞。转染 48 h 后,用胰蛋白酶对细胞进行消化。然后以浓度为 200 μ g/mL 的 Zeocin(GIBCOBRL)对细胞进行筛选培养,从而获得稳定转染的细胞克隆。

1.4 稳定整合克隆的 Southern 印迹法鉴定

取 30 μ g MCF-7 细胞基因组 DNA 用 EcoR I 酶切 12~14 h。将 DNA 纯化后,进行琼脂糖凝胶电泳,并按常规方法转移至 Hybond-N⁺ 尼龙膜。以 ³²P 标记的 hTRXL 全长 cDNA 为探针,与经过预杂(预杂交液: 50% 甲酰胺、5× SSC, 5× Denhardt 溶液, 30 mmol/L 磷酸缓冲液、200 μ g/mL 变性鲑精 DNA)的尼龙膜进行杂交,在 42℃ 杂交 18~20 h(杂交液: 50% 甲酰胺、5× SSC, 5× Denhardt 溶液, 30 mmol/L 磷酸缓冲液、100 μ g/mL 变性鲑精 DNA 和 10% 硫酸葡聚糖)。用 2× SSC/0.1% SDS 和 0.5× SSC/0.1% SDS 在 55℃ 各洗 30 min, -70℃ 放射自显影 3~6 d。

1.5 稳定转染细胞克隆的细胞凋亡分析

将未转染的 MCF-7 对照细胞和稳定转染 hTRXL, hTRXL-N 及 hTRXL-C 的细胞以 3×10^5 细胞/100 mL 密度种植于 DMEM 培养基中,培养 24 h。细胞换液后加入 5 ng/mL 和 1.5 μ g/mL 的佛波酯和离子霉素,于 37℃, 5% CO₂ 条件下继续培养 48 h。离心收集 10^6 个细胞,4℃ 70% 乙醇固定过夜。PBS 洗细胞后,加入 20 μ g/mL 的碘化丙啶(PI)和 0.25 μ g/mL 的 RNaseA, 37℃ 作用 30 min。用流式细胞仪进行分析。

2 结果和讨论

2.1 hTRXL 全长蛋白及其 N 端和 C 端蛋白片段的纯化

将 hTRXL 全长 cDNA、N 端编码 1~105 位氨基酸的 cDNA 及 C 端编码 106~289 位氨基酸的 cDNA 序列分别克隆至 pGEX-4t-3 载体上,得到 E. coli 原核表达产物。GST 融合蛋白在经凝血酶酶

切后得到纯化蛋白. 结果见图1.

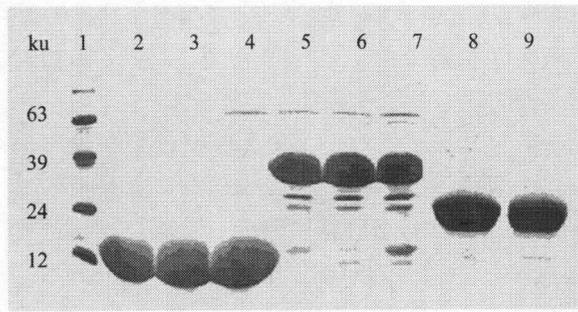


图1 全长 hTRXL 和 hTRXL-N 的纯化结果

1, 蛋白分子质量标准; 2~4, hTRXL-N;
5~7, 全长 hTRXL; 8~9, hTRXL-C

2.2 人的类硫氧还蛋白的胰岛素还原活性

利用 Holmgren 的胰岛素还原实验^[14]来检测 hTRXL 还原活性. 我们选用了 *E. coli* 和人源的硫氧还蛋白(hTRX)作阳性对照, 分别测试了全长 hTRXL, N 端结构域 hTRXL-N, C 端结构域 hTRXL-C 的胰岛素还原酶活性. 结果发现, 全长 hTRXL 和 hTRXL-N 都具有胰岛素还原酶活性, 且其活性高于人源的硫氧还蛋白(hTRX)而低于 *E. coli* 硫氧还蛋白; 而 hTRXL-C 不具有胰岛素还原酶活性(图2).

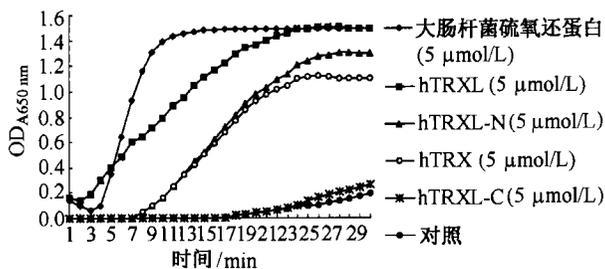


图2 几种硫氧还蛋白家族成员及 hTRXL 结构域的胰岛素还原酶活性测验

实验结果表明, 人的类硫氧还蛋白的酶活功能区位于其 N 端结构域, 这与我们进行序列分析的结果完全一致.

2.3 稳定整合克隆的筛选及 Southern 印迹法鉴定

pcDNA3.1/Zeo 真核载体含有 Zeocin 的抗生素筛选标记, 便于稳定表达克隆的筛选. pcDNA3.1/Zeo-hTRXL 转染 MCF-7 细胞以后, 通过抗性基因的筛选, 共得到 3 个阳性细胞克隆, 编号分别为 B2, C2, D2. 将各细胞克隆的 DNA 与 hTRXL 全长 cDNA 进行 Southern 印迹法鉴定, 检测目的基因

在细胞基因组内的整合, 结果见图3.

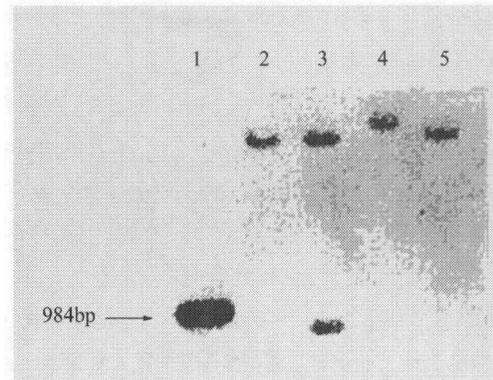


图3 pcDNA3.1-hTRXL 重组细胞克隆的 Southern 印迹法鉴定

1, hTRXL 线性 cDNA 片段; 2, 未转染的 MCF-7 细胞基因组 DNA;
3, 细胞克隆 B2; 4, 细胞克隆 C2; 5, 细胞克隆 D2.

2.4 稳定转染的细胞克隆的凋亡分析

将未转染的 MCF-7 细胞和筛选得到的带有重组质粒的 MCF-7 阳性细胞克隆 B2 用佛波酯和离子霉素诱导细胞凋亡. 诱导 48 h 后, 未诱导的 MCF-7 对照细胞和未诱导的细胞克隆 B2 凋亡细胞都为 7%; MCF-7 对照细胞的凋亡细胞为 32%; 而 B2 克隆的凋亡细胞为 63%. 根据结果我们可以初步断定, hTRXL 在细胞内起到促进细胞凋亡的作用.

另外, 在获得了 pcDNA3.1/Zeo-hTRXL-N 和 pcDNA3.1/Zeo-hTRXL-C 的稳定转染 MCF-7 细胞克隆后, 我们用同样的方法对其进行了凋亡分析. 但未见两者与对照细胞有明显的差异. 因此我们得出以下结论: 只有 hTRXL 全长蛋白才具有促进细胞凋亡的功能, 无论其 N 端和 C 端都没有独立的促进凋亡的功能.

在生化特性基本相同的情况下, 本文所揭示的 hTRXL 的细胞生物学功能与已知人的硫氧还蛋白正好相反. 如果上述结果得到进一步确证, hTRXL 所特有的尚不为人所知的 C 端结构域无疑将成为该领域研究的新的焦点.

参 考 文 献

- 1 Mark D F, et al. *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 780
- 2 Russel M, et al. Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 29
- 3 Lim C J, et al. Thioredoxin is the bacterial protein encoded by fip that is required for filamentous bacteriophage f1 assembly. *J Bacteriol*, 1985, 161: 799

- 4 Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 237
- 5 Lundstrom J, et al. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem*, 1990, 265: 9114
- 6 Meyer M, et al. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J*, 1993, 12: 2005
- 7 Schenk H, et al. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 1672
- 8 Spector A, et al. The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J Biol Chem*, 1988, 263: 4984
- 9 Gasdaska J R, et al. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Dif-*
- fer, 1995, 6: 1643
- 10 Baker A, et al. Thioredoxingene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, 1997, 57: 5162
- 11 Powis G, et al. Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, 1998, 111-112: 23
- 12 周彦, 等. 一个新的人类硫氧还蛋白基因的克隆. *科学通报*, 1999, 44: 1307
- 13 Powis G, et al. The role of redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Bio Med*, 2000, 29: 312
- 14 Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem*, 1979, 254: 9627

“大气环流季节变化及其年际变动的分析”取得突出成果

气候的年际变化是短期气候预测的主要对象之一。年际气候变动是通过大气环流季节变化的异常而表现出来的。大气环流季节变化的根本原因是到达地表面的太阳辐射量的季节变化，而大尺度海陆分布、海洋环流、冰雪过程、陆地表面过程等因素也对大气环流的季节变化及季节内变动有显著影响。因此，大气环流的季节及年际变化是十分重要而又非常复杂的科学问题，是气候可预测性研究的核心科学问题之一。

由中国科学院大气物理研究所曾庆存院士主持的科学基金“九五”重点项目“大气环流季节变化及其年际变动的分析”，则是通过分析大气环流季节变化及其年际变动的动力学过程和物理成因，并利用气候数值模式的模拟，为进行季度、跨季度以及年际气候预测提供理论基础和方法。

经过4年的努力，项目在以下几个方面取得突破性进展：

(1) 提出了季节度以及由季节度定义的季风区，研究了季节划分、季节突变及其年际变化，得到了一系列结果。如：季节变化最早出现在平流层，再由平流层逐渐下传；近地面层热带和两极季节转换也较早，并逐渐向中纬度和向上传播；在低空，季节变化先始于寒区。通过分析还发现了季节突变的三维空间结构，等等。

(2) 基于变分最优插值原理，设计建立了我国第一个(目前也是惟一的)可业务使用的全球海洋资料同化分析系统；建立并改进了 ENSO 预报模式，并进行了系统的评估检验；在此基础上，开展了多次实时的热带太平洋海温预报，并将预报结果提供给汛期旱涝趋势的季节和年际预测使用，效果达到国际水准。

(3) 在原攀登计划发展的 IAP NCP-I 模式的基础上，在模式本身、初值形成、集合预测和订正等方面又作了系统的改进，定型为 IAP NCP-II，用于实时预测，成为国家短期气候预测的重要参考。用 IAP NCP-II 基本准确地预测出从 1998~2001 年每年我国的多雨区和重要干旱少雨区的形势，可以较好地预报出我国北方地区的持续性干旱，以及江淮地区的大范围旱涝形势。

(4) 发现了大气季节内振荡强度的年际变化存在着明显的全球同步特征，并存在显著的年代际变动，而且它与 ENSO 的相互关系还存在着年代际或更长时间尺度的变动。

(5) 开展了东亚大气环流和气候的可预测性以及预测因子的敏感性研究，发现南半球马斯克林高压(亦称为印度洋副高)和澳大利亚高压的变化对东亚夏季风有显著影响；我国华南地区春季土壤湿度异常偏湿可以导致我国长江中下游的夏季风降水异常偏多。提出了一种可以提高预测准确度的模式预测结果的修正方案。

(供稿：罗云峰 周小刚)