

赵 蕾, 李 辉, 覃水平, 等. 猪 TGF- β II 型受体胞外域的表达及生物活性验证[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(7): 1268-1275.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.07.013

猪 TGF- β II 型受体胞外域的表达及生物活性验证

赵 蕾¹, 李 辉², 覃水平³, 李碧侠², 戴超辉², 赵为民², 付言峰², 邓彦飞¹, 程金花²

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530005; 2. 农业农村部种养结合重点实验室/江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 3. 广西壮族自治区环江毛南族自治县东兴镇农业技术推广站, 广西 环江 547117)

摘要: 转化生长因子 β II 型受体(TGF II R)是 TGF- β 家族的主要受体。现有研究发现,TGF- β I 在家畜繁殖活动中起着负调控作用,因此我们提出通过重组 TGF II R 胞外域蛋白质竞争性结合体内 TGF- β I 以改善家畜繁殖性能的新思路。首先,对猪 TGF II R 胞外域蛋白质编码序列进行密码子优化并进行人工合成,将合成的基因片段插入原核表达载体 pET-32a(+)中。然后,将重组表达载体转入 BL21(DE3)表达菌株中,并筛选合适的乳糖诱导浓度、诱导时间,以获得最高表达效率。再然后,对重组蛋白质进行纯化、复性及质谱鉴定。最后,通过体外细胞试验对重组蛋白质的生物活性进行测定。结果表明,在培养温度为 37 ℃、培养时间为 8 h、乳糖诱导质量浓度为 2.0 g/L 的条件下,可以诱导重组蛋白质的高表达,用 8 mol/L 尿素对包涵体蛋白质进行溶解,再以生理盐水为透析液透析 24 h 后,可以获得纯度达 80% 以上的重组猪 TGF II R 胞外域蛋白,用该重组蛋白质处理猪颗粒细胞后,可显著抑制 TGF- β I 诱导的信号分子 Smad3 的磷酸化水平。可以看出,本研究中表达的重组猪 TGF II R 胞外域蛋白质具有较好的生物活性。研究结果可为进一步研究和开发有利于提高猪繁殖效率的产品奠定工作基础。

关键词: 转化生长因子 β II 型受体(TGF II R); 原核表达; TGF- β I; 生物活性

中图分类号: S828.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)07-1268-08

Expression of porcine TGF- β type II receptor in extracellular domain and validation of its biological activity

ZHAO Lei¹, LI Hui², QIN Shuiping³, LI Bixia², DAI Chaohui², ZHAO Weimin², FU Yanfeng², DENG Yanfei¹, CHENG Jinhua²

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Protection and Utilization Platform of Agricultural Germplasm Resources in Jiangsu Province, Nanjing 210014, China; 3. Guangxi Zhuang Autonomous Region Huanjiang Maonan Autonomous County Dongxing Town Agricultural Technology Extension Station, Huanjiang 547117, China)

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 江苏农业科技自主创新基金项目[CX(22)3197]; 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGS(2021)102]; 国家自然科学基金项目(32272883); 江苏省自然科学基金项目(BK20211140); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-PIG-35)

作者简介: 赵 蕾(1999-), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 主要从事动物繁殖调控研究。(E-mail) 1291741160@qq.com

通讯作者: 程金花, (E-mail) 20090016@jaas.ac.cn

Abstract: Transforming growth factor- β I type II receptor (TGF II R) is the main receptor of TGF- β family. Existing studies have shown that TGF- β I plays a negative regulatory role in livestock reproduction activities. Therefore, we proposed a new idea to improve the reproductive performance of livestock by competitively binding TGF- β I *in vivo* with recombinant TGF II R extracellular domain protein. In order to verify it, this study first optimized the codon of porcine TGF II R extracellular domain and syn-

thesized it artificially. The synthesized gene fragment was inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a(+). Then, the recombinant expression vector was transferred into BL21(DE3) expression strain, and suitable lactose induction concentration and induction time were screened to obtain the highest expression efficiency. The recombinant protein was purified, regenerated and identified by mass spectrometry. Finally, the bioactivity of the recombinant protein was determined by *in vitro* cell experiment. The results showed that the high expression of recombinant protein was induced at 37 °C, 6 h, 2.0 g/L lactose, the inclusion body protein was dissolved by 8 mol/L urea, and the recombinant porcine TGF II R protein with a purity of more than 80% was obtained after dialysis with normal saline for 24 h. After treatment of porcine granulosa cells with the recombinant protein, the phosphorylation level of Smad3 induced by TGF- β 1 was significantly inhibited, which indicated that the recombinant porcine TGF II R protein expressed in this study had good biological activity. In conclusion, this study lays a foundation for further research and development of products suitable for improving the reproductive efficiency of pigs.

Key words: transforming growth factor- β 1 type II receptor (TGF II R); prokaryotic expression; TGF- β 1; biological activity

转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是 TGF- β 家族的重要成员之一^[1]。在动物体内, TGF- β 1 可通过自分泌、旁分泌及内分泌等方式来调节细胞的增殖分化及凋亡^[2-3], 因此它在维持机体正常发育和体内稳态中起着重要作用。此外, 现有研究发现, TGF- β 1 也在调控家畜的繁殖活动中发挥重要作用。

TGF- β 1 调控家畜的繁殖活动可从多个方面得到体现。首先, TGF- β 1 可以调控类固醇激素的分泌。前人研究发现, TGF- β 1 浓度在卵泡液中与雌二醇浓度呈负相关, 表明 TGF- β 1 可以抑制卵泡颗粒细胞产生雌激素; 体外试验也取得了类似结果, 即用 TGF- β 1 处理体外培养的颗粒细胞可显著抑制雌二醇的分泌^[4]; TGF- β 1 还可抑制黄体细胞、孕酮合成主要相关基因的表达, 并抑制孕酮合成^[5]。其次, TGF- β 1 可通过抑制颗粒细胞黄体化及胞外基质的重构、抑制黄体血管形成等方式影响黄体发育^[6-7]。再次, TGF- β 1 可以通过降低细胞活力、诱导促凋亡因子的表达来影响卵泡发育及颗粒细胞的增殖与凋亡^[8]。最后, TGF- β 1 还可以通过抑制胎盘滋养层细胞的迁移和侵袭, 使胚胎着床失败或流产^[9-11]。综上所述, 机体内 TGF- β 1 的水平受到严格的调控, 一旦失调会造成繁殖障碍。受到上述研究结果的启发, 我们认为 TGF- β 1 可能是一种抑制家畜繁殖活动的因子, 并提出通过抑制 TGF- β 1 的信号转导来改善家畜繁殖性能的新思路。

TGF- β 的信号转导依赖其分布于细胞表面的跨膜糖蛋白受体^[12]。TGF- β 受体分为 3 种 (TGFB I R、TGFB II R 和 TGFB III R), 其中 TGF- β 1 II 型受体 (TGF II R) 在 TGF- β 1 信号的接收和产生中发挥着

关键作用, 即 TGF- β 家族配体与膜上相应的 II 型受体结合并诱导其磷酸化, 随后募集 I 型受体形成复合物, 并催化其激酶活性, 随后 I 型受体招募并活化下游的 Smad2/3。活化的 Smad2/3 与 Smad4 结合后形成异聚复合物并转移至细胞核内, 该异聚复合物在其他辅因子的帮助下与靶基因的启动子结合而发挥转录调控作用, 最终调节下游靶基因的表达^[13-14]。因此, TGF II R 是 TGF- β 配体的主要接收元件和信号产生元件, 对 TGF- β 家族功能的发挥起着关键作用。

鉴于 TGF- β 1 在家畜繁殖活动中的负调控作用, 我们提出用重组 TGF II R 胞外域蛋白质竞争性结合体内 TGF- β 1, 以达到阻断或降低其信号转导的目的, 最终改善家畜繁殖性能。具体而言, 本研究拟用原核表达系统表达重组猪 TGF II R 胞外域蛋白质, 并对其进行纯化和生物活性验证, 从而为进一步研究和开发适用于提高猪繁殖效率的新产品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株、质粒及试剂 原核表达载体 pET-32a(+)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株购自擎科生物科技股份有限公司, 质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技股份有限公司, 乳糖、LB 液体培养基预混粉剂、琼脂粉、氨苄青霉素 (Amp)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液 (Tris-HCl)、尿素、咪唑、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 制备试剂盒 (分离胶含量为 10%、12%、15%)、考马斯亮蓝染色液、生

理盐水、ddH₂O、脱色液、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、氯乙酰胺(CAA)、胰蛋白酶、肽段抽提液(ACN/formic acid)、二甲基亚砜(DMSO)、胎牛血清、75%乙醇、DMEM/F12 培养基、抗生素、苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白抑制剂、蛋白质裂解液、5×蛋白质上样缓冲液、限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I、脱脂奶粉、一抗稀释液、加入吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)、增强型化学发光试剂(ECL)发光液等均购自碧云天生物科技有限公司。

1.1.2 Luria-Bertani (LB) 培养基的配制 按 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 氯化钠的量称取药品并加水溶解,调节溶液的 pH 值至 7.0,并定容至 1 L,固定培养基需另加入琼脂(总含量为 20 g/L),配制好培养基后高压灭菌。

1.1.3 包涵体洗涤溶液、结合溶液 按照 50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、1 mol/L 尿素或 2 mol/L 尿素或 3 mol/L 尿素的浓度称取药品并加水溶解,调节 pH 值至 8.0,配制包涵体洗涤缓冲液。按照 20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、8 mol/L 尿素的浓度称取药品并加水溶解,调节 pH 值至 7.5,配制包涵体结合缓冲液。

1.2 试验方法

1.2.1 基因合成及重组表达载体的制备 用在线蛋白质跨膜结构域预测工具 TMHMM 2.0 对从 GenBank 中查询的猪 TGF II R 氨基酸序列(编号:XP_020927152.1)进行预测,找出蛋白质的胞外域,并剔除信号肽序列。随后对编码胞外域的序列进行密码子优化并进行化学合成。在 5'端添加 *Bam* H I 酶切位点,在 3'端添加终止密码子、*Xho* I 酶切位点,通 *Bam* H I、*Xho* I 将相应基因克隆至载体 pET-32a(+)上,并通过质粒提取试剂盒获得重组质粒 pET-32a(+)-TGF II R 备用。

1.2.2 重组蛋白质的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

将重组 pET-32a(+)-TGF II R 转化至 BL21(DE3)菌株中,用移液枪吸取 100 μL 菌液,使用涂布玻璃棒将菌液均匀涂布于 LB 固体培养基上,于 37 ℃培养过夜。待长出单菌落后,挑取单菌落接种于添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行过夜扩大培养。当 OD_{600} 为 0.6~0.8 时,加入乳糖并在摇床上诱导重组猪 TGF II R 蛋白的表达,诱导用的乳糖质量浓度梯度为 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L,诱导温度为 37 ℃。取诱导后的菌液,用 PBS 重悬后

超声破碎 30 min,离心并收集上清液和沉淀。按照上清液:沉淀=4:1(体积比)加入 5×蛋白质上样缓冲液,在 95 ℃、10 min 条件下使其充分变性,取 10 μL 变性溶液进行上样电泳。电泳结束后,用考马斯亮蓝快速染色液染色 15~20 min,再用蒸馏水脱色至背景清晰。

1.2.3 重组蛋白质的纯化及 SDS-PAGE 检测 按照方法 1.2.2 优化的最佳诱导条件和诱导步骤进行重组猪 TGF II R 蛋白的扩大培养,将诱导好的菌液于 8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 PBS 重悬后,用超声波破碎仪进行破碎洗涤,参数如下:功率 200 W,工作时间 2 s,工作间隙 2 s,共持续 2 min。用超声波进行破碎处理后对液体进行离心并收集沉淀,再重复 1 次 PBS 洗涤的步骤后,分别用 1 mol/L、2 mol/L、3 mol/L 包涵体洗涤溶液并重悬沉淀,再用超声波破碎仪(功率 200 W,工作时间 2 s,工作间隙 2 s,共持续 2 min)进行破碎洗涤,离心并收集沉淀。重复上述步骤 6 次后,用 8 mol/L 尿素将包涵体溶解。

将重组猪 TGF II R 蛋白溶液装入处理好的透析袋中,以生理盐水作为透析液,于 4 ℃透析 12 h,更换 1 次透析液后继续透析 12 h,至尿素不再渗出,确保此时重组蛋白质处于可溶解状态,表明已获得纯化的重组猪 TGF II R 蛋白溶液。

与此同时,收集每次尿素洗涤后的重悬溶液及纯化的蛋白质样品,按照 4:1(体积比)加入 5×蛋白质上样缓冲液,在 95 ℃、10 min 条件下使其充分变性,取 10 μL 变性后的溶液进行电泳,电泳结束后用考马斯亮蓝快速染色液染色 15~20 min,再用蒸馏水脱色至背景清晰。

1.2.4 质谱检测 用手术刀切割电泳凝胶上的样品蛋白质条带,用玻璃棒将样品捣碎后分别加入 ddH₂O、脱色液、乙腈振荡 5 min,离心并去除上清液。加入三(2-羧乙基)膦(TCEP)、氯乙酰胺(CAA)于 60 ℃孵育 30 min,进行还原烷基化反应。加入乙腈振荡 5 min,随后离心去除上清液,再真空抽干。按照样品体积加入适量胰蛋白酶,于 37 ℃孵育并振荡过夜进行酶切。第 2 d 加入肽段抽提液(ACN/formic acid),超声处理 10 min,离心后取上清液,真空抽干。使用 C₁₈ 脱盐柱脱盐,真空抽干后于 -20 ℃冻存,准备上机检测。

1.2.5 重组蛋白质生物活性的检测 从屠宰场收

集形态正常的卵巢,依次在 37 ℃ 生理盐水溶液、75%乙醇中清洗后抽取卵泡液,离心并收集颗粒细胞,在含有 10%胎牛血清、1%三抗的 F12 培养基中悬浮后接种于 12 孔板中,再将其置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。将纯化的重组猪 TGF II R 蛋白过滤除菌后,与 TGF- β 1 在培养箱中提前孵育 4 h(使重组 TGF II R 蛋白与 TGF- β 1 充分结合)。将猪颗粒细胞随机分为对照、TGF- β 1 处理组、重组猪 TGF II R 蛋白处理组,重组猪 TGF II R 蛋白与 TGF- β 1 共孵育处理组。提前将重组蛋白与 TGF- β 1 在 37 ℃ 培养箱中共孵育 4 h,随后对所有处理组的猪颗粒细胞同时进行加药处理,45 min 后收集细胞,提取蛋白质,每孔细胞加入 120 μ L 含 1% PMSF 的胞蛋白裂解液,于冰上裂解 30 min 后加入 5 \times 蛋白质上样缓冲液,在 95 ℃ 处理 10 min,使其充分变性。

每组取 10 μ L 蛋白质样品上样,经 SDS-PAGE 后,用半干转移法转移蛋白质至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂奶粉于室温封闭 1 h 后,分别用 p-Smad3、Smad3 一抗于 4 ℃ 孵育过夜,用 TBST 溶液洗涤后,在室温下加入与 p-Smad3、Smad3 一抗对应的二抗孵育 1 h,再用 TBST 溶液洗涤,配制并吸取适量增强型化学发光试剂(ECL)覆盖于蛋白质条带上,通过化学发光成像仪(LAS-4000)进行拍摄,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参蛋白质。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

GenBank 中收录的猪 TGF II R 共有 567 个氨基酸残基,用 TMHMM 2.0 在线软件对 TGF II R 进行跨膜结构分析,结果发现,第 1~160 个氨基酸属于蛋白质的胞外域,并且第 1~23 个氨基酸属于信号肽部分(图 1)。因此,我们选择第 24~159 个氨基酸进行表达研究。

通过人工化学合成法合成密码子优化后的序列,得到编码猪 TGF II R 基因的胞外域蛋白质编码 DNA 片段。将该 DNA 片段经 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切处理后连接至同样经过双酶切处理的 pET-32a(+)载体上,经 *E.coli* DH5 α 转化、筛选、扩增,最终获得用于原核表达的 pET-32a(+)-TGF II R 质粒。将重组质粒用 *Bam* H I/*Xho* I 进行双酶切鉴定,分别得到长度为 2 000 bp、5 000 bp 的片段,与预期大小一致(图 2),表明质粒 pET-32a(+)-TGF II R 构建成功。

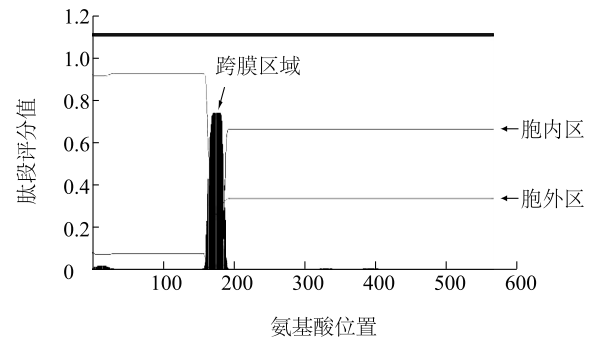
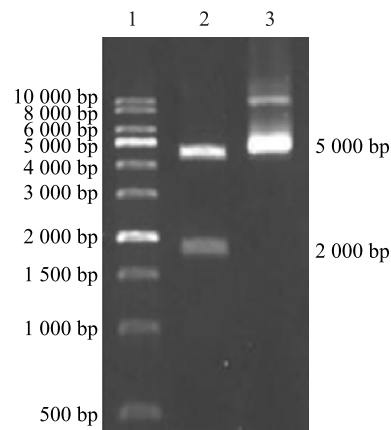


图1 猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)胞外域结构分析结果

Fig.1 Analysis results of porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) extracellular domain



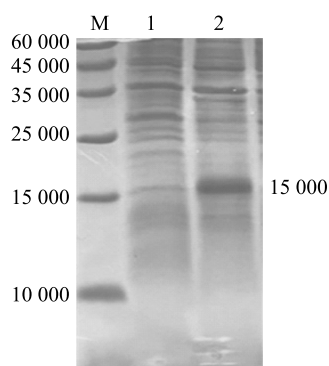
泳道1:Marker;泳道2:经 *Bam* H I/*Xho* I 双酶切的 pET-32a(+)-TGF II R;泳道3:未经 *Bam* H I/*Xho* I 双酶切的 pET-32a(+)-TGF II R。

图2 猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)胞外域重组表达载体的鉴定结果

Fig.2 Identification of recombinant expression vector of porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) in extracellular domain

2.2 重组蛋白质的 SDS-PAGE 检测

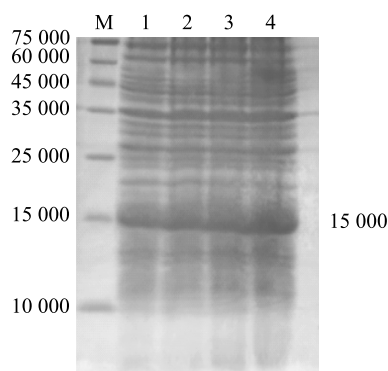
将重组表达载体转化到表达菌株 BL21 (DE3) 中,经乳糖诱导后进行 SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色结果显示,以蛋白质相对分子量为 10 000~180 000 的 Maker 作为参照,可见相对分子量约为 15 000 的包涵体蛋白质得到成功表达(图 3 中的第 2 泳道)。分别用 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L 乳糖对包涵体蛋白质进行诱导表达,结果发现,包涵体蛋白质表达效率最高的诱导质量浓度为 2.0 g/L(图 4 中的第 4 泳道)。当以 4 h、5 h、6 h、7 h、8 h 的乳糖诱导时间分别诱导蛋白质表达发现,8 h 的诱导效果最佳(图 5 中的第 10 泳道)。



M:Marker;泳道 1:重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白上清液的重悬液;泳道 2:重组猪 TGF II R 蛋白沉淀的重悬液。

图 3 pET-32a(+)-转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)诱导表达的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果

Fig.3 Results of pET-32a(+)-transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) induced expression of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)



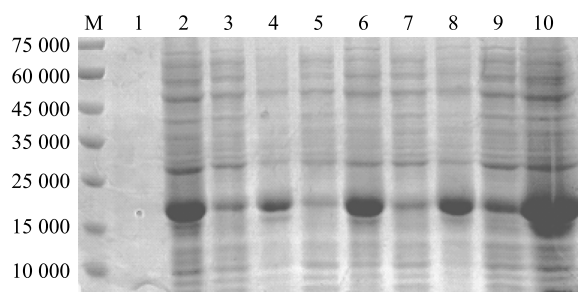
M:Marker;泳道 1~4:乳糖诱导浓度依次为 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L 重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白沉淀重悬液。

图 4 重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白乳糖诱导浓度梯度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果

Fig.4 Results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of recombinant porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) protein lactose induced concentration gradient

2.3 重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白胞外域的纯化和复性

对分离提取的包涵体进行多次清洗后,用 8 mol/L 尿素将其溶解,然后对其进行复性处理,并对复性后的蛋白质进行电泳分析。重组蛋白质的考马

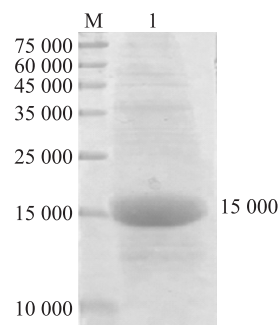


M:Marker;泳道 1、3、5、7、9:诱导时间分别为 4 h、5 h、6 h、7 h、8 h 的重组猪 TGF II R 蛋白上清液;泳道 2、4、6、8、10:诱导时间分别为 4 h、5 h、6 h、7 h、8 h 的重组猪 TGF II R 沉淀重悬液。

图 5 重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白乳糖诱导时间梯度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果

Fig.5 Results of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of time gradient induced by recombinant porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) protein lactose

斯亮蓝染色结果(图 6)显示,泳道中出现相对分子量约为 15 000 的蛋白质条带,与预期相对分子量为 15 000 的重组猪 TGF II R 蛋白大小相符,且纯度达 80% 以上。由此可见,本试验获得了纯度较高且溶解度良好的重组猪 TGF II R 胞外域蛋白质。



M:Marker;泳道 1:纯化后的重组猪 TGF II R 蛋白。

图 6 重组猪转化生长因子 β 1 II型受体(TGF II R)蛋白纯化后的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果

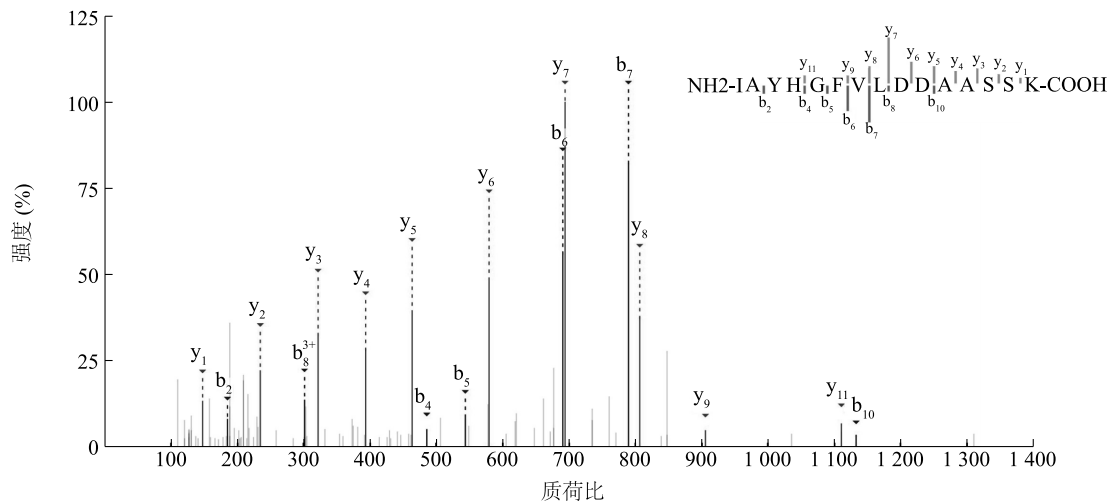
Fig.6 Results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after purification of recombinant porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) protein

2.4 重组蛋白质的质谱鉴定结果

为了证明所表达的蛋白质是猪 TGF II R 蛋白,将上述试验中相对分子量为 15 000 左右的蛋白质电

泳条带切下进行质谱鉴定,并对质谱鉴定试验得到的肽段序列进行 BLAST 比对分析。如图 7 所示,

pET-32a(+)-TGF II R 经乳糖诱导后表达的蛋白质确实为重组猪 TGF II R 蛋白。



$y_1 \sim y_9$ 、 y_{11} 、 b_2 、 $b_4 \sim b_8$ 、 b_{10} 表示不同肽段;图上方为鉴定的肽段结果。

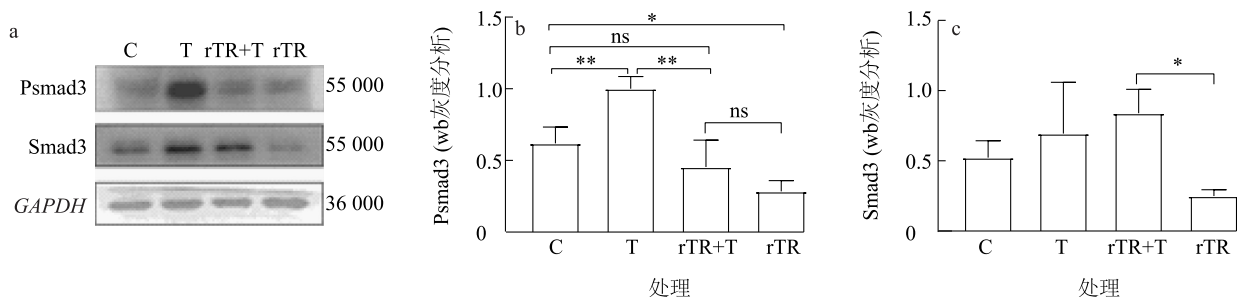
图 7 重组猪转化生长因子 β I 型受体 (TGF II R) 蛋白的质谱鉴定结果

Fig.7 Identification of recombinant porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) protein by mass spectrometry

2.5 重组 TGF II R 胞外域蛋白质的生物活性检测

目前已知 TGF- β 1 活性中最主要且最直观的表现是与其受体 TGF II R 结合并催化其下游信号分子 Smad2、Smad3 的磷酸化。因此,要鉴定本研究制备的重组猪 TGF II R 蛋白是否具有生物活性,主要是要证明其是否能与 TGF- β 1 结合。换言之,要证明重组猪 TGF II R 蛋白是否可以与细胞表面的天然 TGF II R 竞争性结合 TGF- β 1,从而抑制细胞内

Smad2、Smad3 的磷酸化。Western blotting 检测结果 (图 8) 表明,用 TGF- β 1 处理后,猪颗粒细胞中的 Smad3 磷酸化水平升高;当用重组猪 TGF II R 蛋白与 TGF- β 1 共孵育处理猪颗粒细胞时,Smad3 的磷酸化水平相较于 TGF- β 1 单独处理显著下降。上述研究结果表明,重组猪 TGF II R 蛋白可以与 TGF- β 1 结合,从而影响 Smad3 的磷酸化水平,该重组蛋白质具有生物学活性。



a: 利用 Western blot 检测各组细胞中磷酸化 Smad3 蛋白的水平变化;b: 各处理组细胞中磷酸化 Smad3 蛋白的条带灰度分析;c: 各处理组细胞中 Smad3 蛋白的条带灰度分析。C: 空白组;T: 转化生长因子 (TGF)- β 1 处理组;rTR+T: 重组猪 TGF II R 蛋白与 TGF- β 1 共孵育处理组;rTR: 重组猪 TGF II R 蛋白处理组。Smad3 为信号分子;Psmad3 为磷酸化的 Smad3;GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 为内参蛋白。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示无显著差异。

图 8 重组猪转化生长因子 β I 型受体 (TGF II R) 蛋白处理猪颗粒细胞对 Smad3 磷酸化水平的影响

Fig.8 Effects of recombinant porcine transforming growth factor β 1 type II receptor (TGF II R) protein on Smad3 phosphorylation in porcine granulosa cells

3 讨论

TGF II R 是 TGF- β 家族中多个成员共用的受体,通过与 TGF- β 配体结合并诱导磷酸化来进行信号转导^[12]。大量研究发现,TGF II R 通过影响 TGF- β 信号转导,从而在抑制肿瘤发生的过程中发挥关键作用。TGF II R 可以作为 GA 结合蛋白 A (GABPA) 的直接靶点而激活 TGF- β 信号转导,从而发挥对肿瘤的抑制作用^[15]。除了抑制肿瘤,TGF II R 还在调节颗粒细胞凋亡与女性生育能力中发挥着关键作用,作为去泛素酶 *USP9X* 的新底物和间接转录靶点,参与组成包括 TGF- β 信号通路在内的功能性微调节网络^[16]。TGF II R 对于颗粒细胞的作用在猪的研究中也有报道,Yang 等^[17]发现,TGF II R 是猪颗粒细胞凋亡的关键抑制因子,且 TGF II R 可以作为靶点发挥作用以启动新生小鼠卵巢中的原始卵泡发育并维持原始卵泡静止^[18]。很多研究发现,TGF II R 可以在不同物种中通过 TGF- β 信号转导从而影响卵巢颗粒细胞的凋亡。因此,阻断 TGF- β 信号的传导可能是一种改善母猪卵泡发育、提高繁殖效率的有效治疗手段。

然而在目前的研究中,阻断 TGF- β 家族的信号转导常用小分子抑制剂和 siRNA 干扰的方法^[19]。小分子抑制剂作为一种化合物,虽然具有高效的特点,但在动物活体中使用时存在毒性较大、给药繁琐和成本较高等缺点。而 siRNA 干扰是目前的研究中常用的一种较为有效的方法,但是在很多时候只能进行体外细胞试验,动物活体试验也存在与小分子抑制剂类似的困难。鉴于此,结合前人研究结果,我们提出了利用重组 TGF II R 蛋白竞争性结合体内 TGF- β 以阻断家族的信号转导的方法。目前 Gao 等^[20]构建了人的包含抗 PD-L1 抗体、TGF II R 胞外域的多功能融合蛋白质,在小鼠模型中,可免疫抑制 TGF- β 信号转导从而抑制肿瘤的增殖。但是,目前尚未有研究发现单独重组猪 TGF II R 蛋白的表达能够阻断 TGF- β 信号转导,并且缺乏利用重组蛋白质进行动物试验的相关研究。

因此,本研究构建了猪 TGF II R 的原核表达载体,通过在大肠杆菌中进行表达后,提取并纯化重组猪 TGF II R 蛋白,并对其活性进行验证。首先,在感受态细胞 BL21DE3 中转入原核质粒,用终质量浓度为 2.0 g/L 的乳糖诱导,于 37 °C 培养过夜以成功表达重组猪 TGF II R 包涵体蛋白。表达成功后,于冰上超声破碎细菌,离心后弃上清液,用 PBS 及包涵体洗涤

溶液多次重悬沉淀并用超声波洗涤沉淀,随后用生理盐水对沉淀进行透析处理 24 h,SDS-PAGE 结果显示,蛋白质的纯化效果较好,猪 TGF II R 重组蛋白质的纯度达 80% 以上,且处于稳定的可溶解状态。通过质谱鉴定,确定所表达的蛋白质为猪 TGF II R 重组蛋白质。

与真核表达系统相比,以大肠杆菌为表达载体的原核表达系统,具有成本较低、生长速度快等特点,并可在较短时间内表达出大量目的蛋白质。本研究主要实现的是重组猪 TGF II R 蛋白的包涵体蛋白质表达,虽然包涵体蛋白质需要用高浓度的尿素进行变性后复性,具有步骤复杂、可能存在影响蛋白质活性及复性率的因素等问题,但是对获得的重组猪 TGF II R 蛋白在细胞水平上进行验证发现,本研究获得了具有生物活性的重组猪 TGF II R 蛋白。

本研究成功表达了纯度较高、处于稳定可溶状态的猪重组 TGF II R 蛋白,并分为对照组、TGF- β 1 处理组、猪重组 TGF II R 蛋白与 TGF- β 1 共孵育处理组、猪重组 TGF II R 蛋白处理组来进行猪颗粒细胞水平的验证。结果显示,猪重组 TGF II R 蛋白可以结合 TGF- β 1,且 smad3 的磷酸化水平显著下调,表明本试验用原核系统构建的猪重组 TGF II R 蛋白具有活性,可以竞争性阻断 TGF- β 1 信号来改善母猪卵泡发育,为进一步研究和开发适用于提高母猪乃至其他家畜繁殖效率的产品奠定了工作基础。

参考文献:

- [1] CHU Y L, XU Y R, YANG W X, et al. The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia [J]. *Aging*, 2018, 10 (3): 305-321.
- [2] LI Q Q, DU X, WANG L F, et al. TGF- β 1 controls porcine granulosa cell states: a miRNA-mRNA network view [J]. *Theriogenology*, 2021, 160: 50-60.
- [3] GILCHRIST R B, RITTER L J, MYLLYMAA S, et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation [J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119 (18): 3811-3821.
- [4] BAI L, CHU G Y, WANG W S, et al. BAMBI promotes porcine granulosa cell steroidogenesis involving TGF- β signaling [J]. *Theriogenology*, 2017, 100: 24-31.
- [5] ZHENG X F, PRICE C A, TREMBLAY Y, et al. Role of transforming growth factor-beta1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells [J]. *Reproduction*, 2008, 136 (4): 447-457.
- [6] LI H, CHANG H M, LIN Y M, et al. TGF- β 1 inhibits microvas-

- cular-like formation by decreasing VCAM1 and ICAM1 via the up-regulation of SNAIL in human granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021, 535: 111395.
- [7] MARONI D, DAVIS J S. TGFB1 disrupts the angiogenic potential of microvascular endothelial cells of the corpus luteum[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(14): 2501-2510.
- [8] ROSAIRO D, KUYZNIEREWICZ I, FINDLAY J, et al. Transforming growth factor-beta: its role in ovarian follicle development [J]. *Reproduction*, 2008, 136(6): 799-809.
- [9] POLLHEIMER J, VONDRA S, BALTAYEVA J, et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2597.
- [10] ADU-GYAMFI E A, DING Y B, WANG Y X. Regulation of placenta-tion by the transforming growth factor beta superfamily[J]. *Biology of Reproduction*, 2020, 102(1): 18-26.
- [11] LI Y, YAN J H, CHANG H M, et al. Roles of TGF- β superfamily proteins in extravillous trophoblast invasion[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2021, 32(3): 170-189.
- [12] NICKEL J, TEN DIJKE P, MUELLER T D. TGF- β family co-receptor function and signaling[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2018, 50(1): 12-36.
- [13] LIU L, LI Q Q, YANG L, et al. SMAD4 feedback activates the canonical TGF- β family signaling pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(18): 10024.
- [14] SHI L B, ZHOU F, ZHU H Y, et al. Transforming growth factor beta1 from endometriomas promotes fibrosis in surrounding ovarian tissues via Smad2/3 signaling[J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 97(6): 873-882.
- [15] FANG Z Q, ZHANG N, YUAN X T, et al. GABPA-activated TGFB2 transcription inhibits aggressiveness but is epigenetically erased by oncometabolites in renal cell carcinoma[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1): 173.
- [16] YANG L, WANG S Q, PAN Z X, et al. TGFB2 is a novel substrate and indirect transcription target of deubiquitylase USP9X in granulosa cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2022, 237(7): 2969-2979.
- [17] YANG L, DU X, LIU L, et al. miR-1306 mediates the feedback regulation of the TGF- β /SMAD signaling pathway in granulosa cells[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 298.
- [18] YANG S H, WANG S, LUO A Y, et al. Expression patterns and regulatory functions of microRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse Ovary1[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(5): 126.
- [19] YANG M M, QIN C, TAO L L, et al. Synchronous targeted delivery of TGF- β siRNA to stromal and tumor cells elicits robust anti-tumor immunity against triple-negative breast cancer by comprehensively remodeling the tumor microenvironment[J]. *Biomaterials*, 2023, 301: 122253.
- [20] GAO Z Z, LI C, CHEN G, et al. Optimization strategies for expression of a novel bifunctional anti-PD-L1/TGFB2-ECD fusion protein [J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 189: 105973.

(责任编辑:徐 艳)