

梅花鹿 *Thymosin beta 10* 基因的原核表达、 活性鉴定和多克隆抗体制备

褚文辉¹ 张伟¹ 赵海平¹ 王大涛¹ 李春义^{1,2*}

(1. 中国农业科学院 特产研究所/特种经济动物分子生物学国家重点实验室/吉林省鹿茸工程研究中心, 长春 130012;
2. 长春科技学院, 长春 130600)

摘要 为研究梅花鹿 *Thymosin beta 10* 基因(*Tβ10*) 在鹿茸快速生长过程中的作用, 利用 Gateway 技术构建梅花鹿 *Tβ10* 基因的原核表达载体—pDEST17-*Tβ10* 并诱导表达, 对融合蛋白进行功能检测及多克隆抗体制备。结果表明: 1) 获得了 190 bp *Tβ10* 基因开放阅读框序列, 并获得重组表达载体 pDEST17-*Tβ10*。2) pDEST17-*Tβ10* 在宿主 BL21-SI 中诱导表达条件为 0.3 mol/L NaCl 诱导 2 h, 获得产物的最终浓度为 0.5 mg/mL。3) 制备的 *Tβ10* 蛋白多克隆抗体血清效价在 10⁵ 之上, 该抗体可以特异性结合天然和原核表达的 *Tβ10* 蛋白。4) 离体检测发现, *Tβ10* 融合蛋白一方面可以促进人脐静脉内皮细胞增殖, 另一方面可以抑制鹿茸前成软骨区细胞的增殖。综上所述, 本研究获得了具有生物活性的 *Tβ10* 融合蛋白, 并制备了高度特异性的梅花鹿 *Tβ10* 蛋白多克隆抗体, 为深入研究 *Tβ10* 基因的生物学功能奠定了基础。

关键词 梅花鹿; *Thymosin beta 10*; 原核表达; 鹿茸; 多克隆抗体

中图分类号 S825 文章编号 1007-4333(2018)11-0072-08 文献标志码 A

Prokaryotic expression, activity testing and polyclonal antibody preparation of *thymosin beta 10* gene of sika deer

CHU Wenhui, ZHANG Wei, ZHAO Haiping, WANG Datao, LI Chunyi*

(1. Institute of Special Animal and Plant Sciences/State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals/Deer Antler Engineering Research Center of Jilin Province, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130012, China;
2. Changchun Science University, Changchun 130600, China)

Abstract To investigate the role of *thymosin beta 10* (*Tβ10*) gene during the rapid growth process of antler, a prokaryotic *Tβ10* gene expression vector was constructed by using Gateway technology to test *Tβ10* fusion protein activities and produce polyclonal antibody. The results showed that: 1) The complete open reading frame (ORF) of *Tβ10* (190 bp) was inserted into the expression vector pDEST17 via LR cloning reaction which was named as pDEST17-*Tβ10*. 2) The concentration of fusion *Tβ10* protein could reach 0.5 mg/mL yielded from host cells BL21-SI under the induction with 0.3 mol/L NaCl for 2 hours. 3) The titer of *Tβ10* polyclonal antibody researched 10⁵ which could bind to natural or fusion *Tβ10* protein in Western blot assay. 4) *In vitro* assay revealed that *Tβ10* protein could promote proliferation of HUVEC but inhibited antler pre-cartilaginous cells. In conclusion, the *Tβ10* fusion protein and obtained high titer polyclonal antibody was purified, which would lay a solid foundation for the study of biological functions of *Tβ10* gene.

Keywords sika deer; *thymosin beta 10*; prokaryotic expression; antler; polyclonal antibody

收稿日期: 2017-02-15

基金项目 吉林省自然科学基金项目(20170101032JC, 20170101003JC); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010342018028)

第一作者: 褚文辉, 助理研究员, 博士, 主要从事鹿茸活性物质与鹿茸来源生物新材料研究, E-mail: chuwenhui@caas.cn

通讯作者: 李春义, 研究员, 博士, 主要从事鹿茸干细胞与再生生物学研究, E-mail: lichunyi1959@163.com

胸腺素 $\beta 10$ (Thymosin beta 10, T β 10) 是一种保守且分子量较小的肌动蛋白结合因子, 广泛存在于多种动物的器官中。研究表明, T β 10 基因在众多的肿瘤中均高表达, 并且与肿瘤的发生、转移、以及恶化分级等有关^[1-3]。此外, T β 10 还与血管的生成高度相关, 介导炎症发生以及早期器官发育等^[4-6]。鹿茸的顶端为鹿茸的生长中心, 驱动着鹿茸的快速生长, 某些鹿种的鹿茸最快生长速度可达 2 cm/天, 能够接近肿瘤细胞的生长速度, 而鹿茸的组织结构却井然有序丝毫没有癌变的迹象^[7-8]。另一方面, 鹿茸是富含血管的软骨/骨复合物, 血管的生长速度与鹿茸的生长速度同步, 以保证鹿茸快速生长的营养需求^[9-12]。利用 MALDI 蛋白质组成像技术分析鹿茸顶端的蛋白组成与分布, 发现尖部的前成软骨与软骨层之间的过渡区域中 T β 10 蛋白高表达^[13]。本课题组前期构建鹿茸顶端抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization) 文库时发现 (数据未发表), 鹿茸顶端中 T β 10 基因高表达。T β 10 在肿瘤和鹿茸生长中心均高表达, 肿瘤和鹿茸均能快速生长且富含血管, 但肿瘤与鹿茸却截然不同。肿瘤无序生长危害机体健康, 鹿茸有序生长是鹿的重要附属器官。因此, T β 10 很可能参与调控鹿茸细胞的快速增殖及血管生成, 进一步研究 T β 10 基因在鹿茸中的作用, 可以揭示鹿茸快速生长不发生癌变, 以及鹿茸软骨血管化机理。目前关于鹿茸 T β 10 对鹿茸生长调控等的研究尚未见报道, 且目前只有人源的 T β 10 蛋白抗体, 尚无鹿源 T β 10 抗体产品, 因此, 本研究拟对 T β 10 蛋白进行定位和定量分析, 通过构建梅花鹿 T β 10 基因的原核表达载体并在大肠杆菌中诱导表达, 纯化并获得 T β 10 融合表达蛋白, 初步检测 T β 10 蛋白的活性, 制备多克隆抗体, 为深入研究 T β 10 基因在鹿茸生长和快速增殖过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

梅花鹿 (*Cervus mandchuricus*) 鹿茸由中国农业科学院特产研究所农业部野生生物观测站提供, 品种为“双阳梅花鹿”。新西兰大白兔, 体重约 3 kg 由中国农业科学院特产研究所试验基地提供。

RNA 提取试剂盒、穿梭载体 pDONRTM201、表达载体 pDEST17、低分子量 Marker、BP clonase 和 LR clonase 购自 Life tech 公司; DNA maker 购

自 Takara 公司; 小分子量 Marker 购自 Thermo 公司; Ripa 蛋白裂解液、彩色预染蛋白 Marker 购自碧云天公司; 纯化介质 Ni-NTA Agarose 购自 Qiagen 公司; PVDF 膜 (0.22 μ m) 购自密理博公司; 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司; E-CL 标记的羊抗兔抗体购自 Abcam 公司; ECL 显示试剂盒购自 Thermo 公司; 感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21-SI 购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自大连美仑生物; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 T β 10 目的基因克隆

无菌环境中, 利用全自动小磁珠破碎仪破碎鹿茸尖部, 按照 Life tech 的 PureLink™ RNA 提取试剂盒方法提取鹿茸总 RNA 测定浓度后备用。使用 Takara 公司 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。取 cDNA 模板, 通过 PCR 扩增获得目的片段, 反应条件为: 94 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环。PCR 产物经回收、纯化后冰箱保存待用。所用引物如下:

上游 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGGCAGACAAGCCCGACATGG-3';

下游 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACCTTTGCTTGCTTCTCCTGCTC-3'。

1.2.2 T β 10 基因表达载体的构建

首先, 根据 Life Tech 公司 Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix 试剂盒说明书进行 BP 克隆反应: PCR 产物 (60 ng/ μ L) (2 μ L) 和 pDONR201 质粒 (150 ng/ μ L) (1 μ L), TE buffer (8 μ L), BP 反应 buffer (4 μ L) 和 BP 克隆酶 (2 μ L) 置于一个 EP 反应管中, 25 °C 孵育 60 min 加入 2 μ L 蛋白酶 K 溶液, 37 °C 孵育 10 min 终止反应, 产物取 1 μ L 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取重组穿梭载体命名为 pDONR-T β 10。

其次, 根据 Life Tech 公司 Gateway™ LP Clonase™ II Enzyme mix 试剂盒说明书进行 LP 克隆反应: pDONR-T β 10 (92 ng/ μ L) (1.5 μ L) 以及表达质粒 pDEST17 (150 ng/ μ L) (1.0 μ L), TE (8.0 μ L) 和 LR 克隆混合酶 (2.0 μ L), LR 反应 buffer (4.0 μ L), 25 °C 孵育 60 min 后加入 2.0 μ L 蛋白酶 K 37 °C 孵育 10 min 终止反应。将 1.0 μ L LR 产物转移至 50.0 μ L BL21-SI 感受态细胞中, 鉴定成功后将该

质粒命名为 pDEST17-T β 10。

1.2.3 菌株的诱导表达

将含有 pDEST17-T β 10 的 BL21-SI 细胞接种至 30 ℃ 预热的无 NaCl 培养基中(氨苄 100 μ g/mL), 30 ℃ 培养直至 OD 600 为 0.7。加入 NaCl 使其终浓度为 0.3 mol/L 以诱导蛋白表达。分别离心收集培养 0、1 和 2 h 的细菌, 加入裂解重悬液并超声裂解(400 W, 超声 10 s, 间隔 10 s, 重复 60 次), 12 000 g 离心 10 min 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳分析不同时间点上重组蛋白在上清和沉淀中的表达情况。

1.2.4 蛋白纯化及 Western blot 分析

取 250 mL 诱导表达后菌液离心收集后用 8.0 mL 裂解液重悬, 加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 冰上孵育 30 min, 750 W 40% 功率, 5 s 超声, 9 s 间隔, 冰上超声处理 100 min。裂解产物 10 000 g, 4 ℃ 离心 30 min, 弃沉淀上清液加入 1.0 mL Ni-NTA 琼脂糖, 200 r/min, 4 ℃ 震荡混匀 1.5 h 后, 装入纯化柱。后用 4.0 mL 冲洗液冲洗 2 次并收集。然后利用洗脱液分 8 次, 每次 0.5 mL 洗脱目的蛋白, SDS-PAGE 电泳进行分离检测。

将洗脱液全部混合后转载进带有 3.5 ku 分子量截留的透析盒中, 并加入 1 L 的 PBS 缓冲液。4 ℃, 透析 18 h, 直至样品透析完全, 并将样品移入微量离心管中。后进行了浓度测定及 Western blot 分析, 置于 -20 ℃ 保存。

1.2.5 兔抗 T β 10 血清的制备及效价测定

将透析复性的蛋白与等体积的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混合乳化后皮下多点注射, 分 4 次进行免疫^[17]。首次按 0.6 mg/只剂量免疫, 第 21、35 天分别按 0.4 mg/只剂量免疫, 第 49 天按 0.2 mg/只剂量免疫, 第 60 天时采全血分离血清。将纯化的 5 μ g/mL 的 T β 10 蛋白 4 ℃ 过夜包被于酶标板中, PBST 洗涤后, 添加 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1.0 h, 洗涤后不同稀释度的待检免疫血清, 并以免疫前正常兔血清为阴性对照。37 ℃ 孵育 1.5 h, 同上洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000), 37 ℃ 孵育 1.5 h, 同上洗涤后加入 100 μ L 四甲基联苯胺显色液, 37 ℃ 显色 20 min, 加入 20 μ L 2 mmol/L H₂SO₄ 终止反应, 通过酶标仪检测 OD 540 值。

1.2.6 MTT 法检测 T β 10 重组蛋白对 HUVEC 及鹿茸细胞增殖的影响

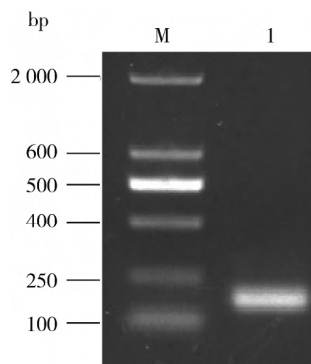
利用 MTT 法检测 T β 10 重组蛋白对 HUVEC

细胞及来源于鹿茸尖部不同分层的鹿茸细胞: 间充质层、前成软骨层、过渡区及软骨层细胞增殖的影响。上述细胞胰酶消化后, 按照 5 000 个/孔的细胞数接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后(约 6 h), 更换含有 60、80、100 和 120 ng/mL 的 T β 10 融合蛋白的 DMEM 培养基(含 10% FBS, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL), 并设立阴性对照(正常 DMEM 培养基含 FBS 5%)和阳性对照(HUVEC 细胞: bFGF, 100 ng/mL; 鹿茸细胞: 10% FBS), 每个梯度设立 6 个复孔, 于添加蛋白后 36 h 进行 MTT 测定, 测定前 2 h, 添加 MTT 试剂 20 μ L (5 mg/mL), 将 MTT 试剂以及培养基小心移除, 同时添加 150 μ L DMSO, 室温避光震荡摇匀 10 min 后, 于 570 nm 处测定其吸光度, 利用 IBM SPSS 20.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 T β 10 基因片段

PCR 扩增梅花鹿 T β 10 基因的 ORF, 获得约 200 bp 的特异性条带(图 1)。所得条带单一, 说明产物特异性好, 与试验预期的 190 bp 相符(T β 10 基因 ORF 加引物接头)。因此, 将该条带回收后进行后续克隆试验。



M, DNA 分子量标准; 1, PCR 扩增产物。

M, DNA marker; 1, Product of the PCR product of T β 10.

图 1 T β 10 基因 PCR 产物凝胶电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of T β 10

2.2 T β 10 基因原核表达载体的构建

将 PCR 特异扩增片段与穿梭载体 pDONR201 重组后(由于该载体含有自杀基因), 获得重组质粒 pDONR-T β 10。随后, 利用 LR 克隆反应将 pDONR-T β 10 与 pDEST17 质粒重组, 获得

pDEST17-T β 10 重组质粒,将该质粒测序序列采用 DNASTar 等进行分析表明,T β 10 基因序列无缺失

和突变,且在重组位点 attB1 和 attB2 之间插入了 T β 10 基因 ORF(图 2)。

```

GAAGGAGATATACATATGTCGTACTAC[CATCACCATCACCATCAC]CTCGA
ATCA[ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT]CTATGGCAGACAAGCCCGA
TGGGGGAAATCAACAGCTTCGATAAGGCCAAGCTGAAGAAGACTG
GCAGGAGAAGAACACCCTGCCGACCAAAAGAGACCATTGAGCAG
CAAGCAAAGTGAA[ACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGG]TTGATTGAGCCTG
CTAACAAAGCCCGAAAGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCACCGCTGACCAATAA
CTAGCATAACCCCTTGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTCTTGCT

```

阴影部分为 T β 10 开放阅读框。

Shadow represents ORF of T β 10.

图 2 重组质粒 pDONR-T β 10 插入 T β 10 基因结果

Fig. 2 Inserted sequence of T β 10 in the plasmid pDONR-T β 10

将该序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析,发现梅花鹿 T β 10 基因与绵羊的同源性最高,为 100%,与牛的同源性达到 99%,与野猪的同源性达到 96%,此外,与人以及马的同源性达到 95%,表明 T β 10 蛋白在不同物种间是比较保守的。

该核酸序列利用 SwissProt 工具翻译成多肽序列(阴影部分为 T β 10 蛋白氨基酸序列):

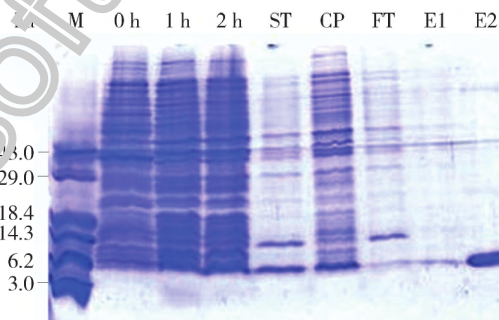
MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSMADKPDNCEI
NSFDKAKLKKKTETQEKNLPTKETIEQETQAK

2.3 T β 10 融合蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 分析结果显示,重组质粒 pDEST17-T β 10 诱导表达后(1 h 和 2 h)约在 6.2 kD 处有一条特异性条带(图 3),而未诱导时未出现此带(图 3, 0 h)。诱导表达的 T β 10 融合蛋白大小与理论值接近,说明在大肠杆菌 BL21-DE3 成功诱导了 T β 10 蛋白的表达。

取上清及沉淀分别进行 SDS-PAGE,结果显示在上清和沉淀中 T β 10 蛋白均有表达(图 3, ST, CP),但上清中该蛋白含量较高,说明重组蛋白主要以可溶性蛋白的形式表达。

采用 Ni-NTA 亲和层析纯化上清中的 T β 10 重组蛋白,经测定洗脱纯化后蛋白浓度为 0.5 mg/mL。SDS-PAGE 结果显示,分次洗脱均能够获得一条约 6.2 kD 的特异性蛋白条带且蛋白纯度及浓度递增(图 3)。



M 为蛋白分子量标准;0 h 为诱导 0 小时总蛋白;1 h 为诱导 1 小时总蛋白;2 h 为诱导 2 小时总蛋白;ST 为上清;CP 为细菌沉淀;FT 为洗脱液;E1、E2 为纯化后蛋白。

M, standard protein maker; 0, 1 and 2 h are respectively total protein produced from BL21-DE3 cells in 0, 1 and 2 h after induction; ST, supernatant; CP, cell pellet; FT, flow through; E1 and E2, purified fusion T β 10 proteins.

图 3 纯化 T β 10 蛋白 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of purified fusion protein T β 10

2.4 T β 10 蛋白多克隆抗体效价测定

取 4 次免疫后全兔血清进行抗体效价检测,以未免疫兔血清为阴性对照。稀释倍比为(1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:50 000 及 1:100 000)。测定结果如图所示,每一点的标准差用垂直短线表示。以相同稀释度下试验组与对照组比值大于 2.1 为标准,制备的 T β 10 兔抗血清效价在 10⁵ 之上,可用于鹿 T β 10 蛋白的定性及定量研究。

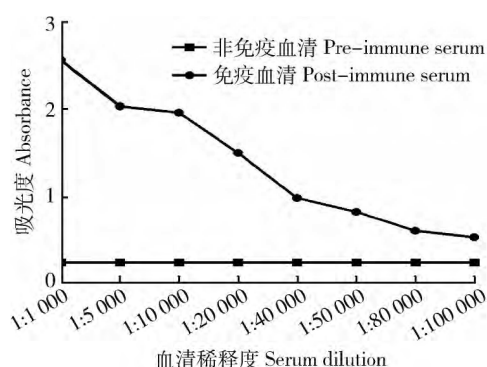


图4 Elisa测定Tβ10多克隆抗体效价结果

Fig. 4 Titer of polyclonal antibody Tβ10 by Elisa assay

2.5 Tβ10多克隆抗体特异性检测

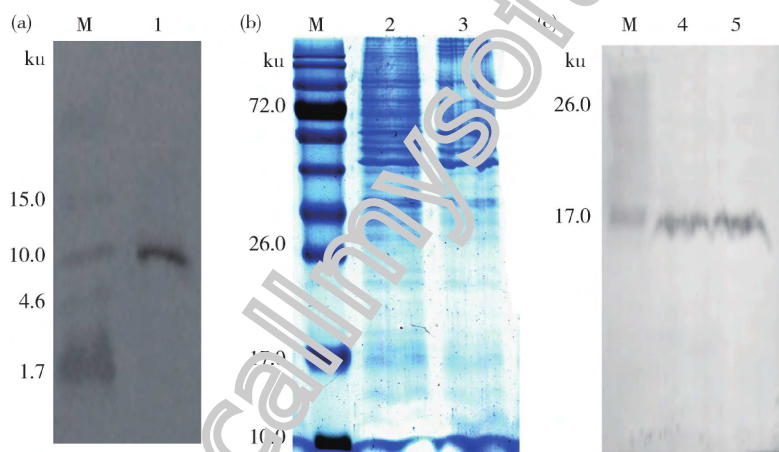
WB检测发现,阳性对照(Tβ10融合蛋白组)在10 ku左右检测到1条特异性条带,条带大小与纯化蛋白大小较为一致(图5(a)),说明Tβ10抗体可以很好地识别融合Tβ10蛋白。用Tβ10多克隆抗体

对不同品种的鹿(梅花鹿和马鹿)总蛋白进行WB分析,总蛋白中检测到约17 ku的特异性条带(图5(b)和(c)),表明制备的Tβ10多克隆抗体可以特异性识别不同品种鹿体内天然的Tβ10蛋白。

2.6 Tβ10融合蛋白的活性检测

2.6.1 Tβ10蛋白促HUVEC细胞增殖

MTT检测结果表明,在添加Tβ10融合蛋白对HUVEC细胞的具有促增殖作用。添加融合蛋白24 h后,60 ng/mL、80 ng/mL、100 ng/mL和120 ng/mL组的细胞增殖均高于阴性对照组(NC)和阳性对照组(PC),其中80 ng/mL和100 ng/mL组别与阴性对照组相比差异极显著($P < 0.01$),80 ng/mL组别极显著高于阳性对照(bFGF, 100 ng/mL)组($P < 0.01$),100 ng/mL组别显著高于阳性对照组($P < 0.05$),综合以上结果,本试验纯化的Tβ10融合蛋白具有生物活性,并且能够促进HUVEC细胞增殖,且促增殖效果较bFGF显著。



(a) 纯化蛋白的Western blot分析结果(泳道1);(b) 鹿茸总蛋白SDS-PAGE考染结果(泳道2为梅花鹿蛋白,泳道3为马鹿蛋白);(c) 鹿茸总蛋白的Western blot分析结果(泳道4为梅花鹿茸蛋白,泳道5为马鹿茸蛋白)。M, 蛋白分子量标准。

2.6.2 重组及天然Tβ10蛋白Western blot分析结果

Fig. 5 Western blot assay of recombinant and natural Tβ10 proteins

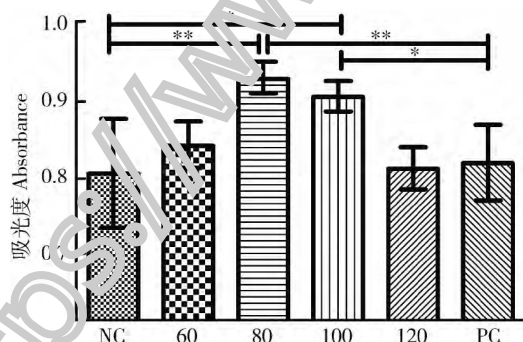


图6 HUVEC细胞添加Tβ10融合蛋白细胞增殖测定结果

Fig. 6 MTT assay of HUVECs after Tβ10 protein added

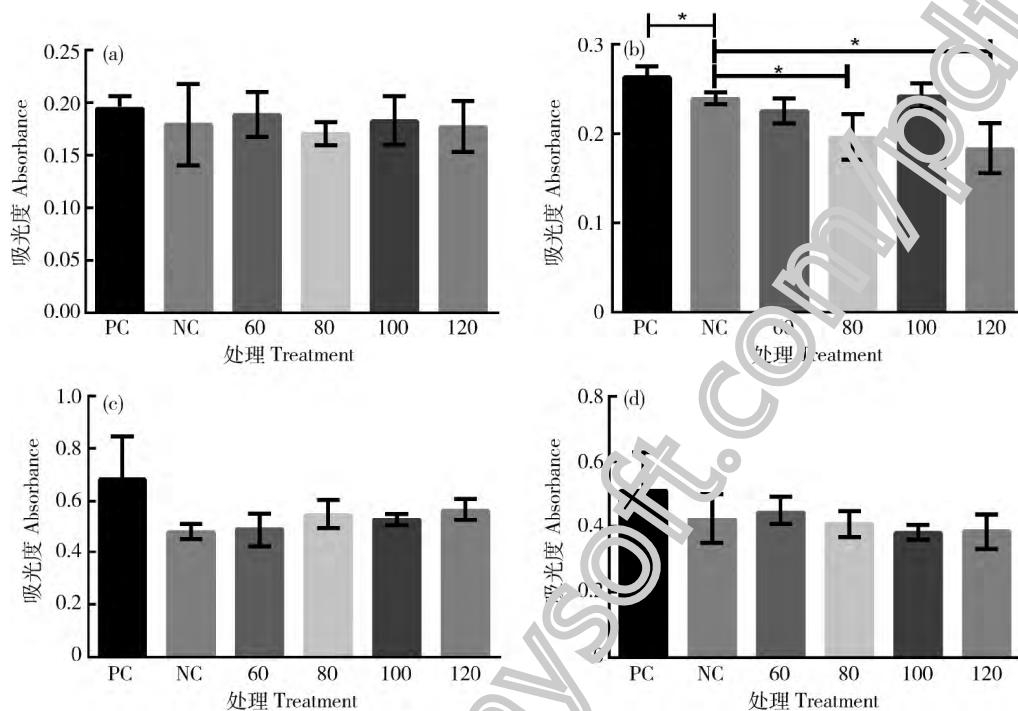
**表示差异极显著($P < 0.01$); *表示差异显著($P < 0.05$)。NC 阴性对照, PC阳性对照。60、80、100和120分别代表添加Tβ10的浓度, ng/mL。下同。

** means the difference is extremely significant ($P < 0.01$); * means the difference is significant ($P < 0.05$). NC, negative control; PC, positive control; 60, 80, 100 and 120 respectively represent the concentrations of Tβ10 added, ng/mL. The same below.

2.6.2 T β 10 对不同鹿茸层细胞增殖的影响

MTT 试验表明, T β 10 融合蛋白对鹿茸尖部细胞前成软骨细胞表现为抑制作用, 而对其他细胞无显著影响。添加融合蛋白培养 24 h 后, 鹿茸间充质层、过渡区及软骨层细胞与阴性对照相比无显著的

促进或抑制作用($P>0.05$) (图 7 (a)、(c) 和 (d)), 对于前成软骨层细胞, 主要表现为抑制作用, 其中 80 ng/mL 和 120 ng/mL 组与阴性对照组差异显著($P<0.05$) (图 7(b))。综合以上结果, 本研究所得 T β 10 融合蛋白可抑制鹿茸前成软骨细胞增殖。



(a) 间充质层细胞融合蛋白细胞增殖测定结果; (b) 前成软骨细胞融合蛋白细胞增殖测定结果; (c) 过渡层细胞融合蛋白细胞增殖测定结果; (d) 软骨层细胞融合蛋白细胞增殖测定结果。

(a) MTT assay of mesenchymal cells of an antler tip; (b) MTT assay of precartilaginous cells of an antler tip; (c) MTT assay of transitional zone cells of an antler tip; (d) MTT assay of cartilage cells of an antler tip.

图 7 鹿茸分层细胞添加 T β 10 融合蛋白细胞增殖测定结果

Fig. 7 MTT assay of different layer cells of an antler tip after T β 10 protein added

3 讨论

鹿茸是可以周期性快速生长的哺乳动物器官, 富含血管, 与肿瘤存在众多相似点^[14]。T β 10 基因在上述 2 种不同性质的组织中均高表达, 而鹿茸是结构有序的哺乳动物器官, 肿瘤则是异常增生的癌变组织^[7,18]。因此, 揭示 T β 10 基因调控鹿茸生长中心内细胞的快速增殖而不癌变机制, 有可能为癌症的诊断及治疗提供借鉴。

本研究构建了 T β 10 基因的原核表达载体, 在 30 °C 0.2 mol/L NaCl 诱导表达 2 h, 融合蛋白的表达量达到最大, 可溶性分析表明该融合蛋白主要存在于上清液中, 采用 Ni-NTA 纯化方式纯化得到融合蛋白浓度为 0.5 mg/mL。高质量的外源蛋白对

于抗体的制备至关重要, 本试验利用纯化得到的目的蛋白免疫新西兰大白兔, 得到多克隆抗血清, Western blot 试验表明抗血清能结合天然及融合 T β 10 蛋白且没有杂带, 说明该抗体具有良好的特异性。但是, 在鹿茸全蛋白中, T β 10 的条带出现在了 17 ku 左右, 与理论上的 5 ku 相差较大; 一种可能的解释是该蛋白在水溶液中没有常规的结构, 而是和其他蛋白一起形成复合物^[18]; 另外一种可能的解释是可能检测到了 T β 10 前体蛋白 (如人 T β 10 前体蛋白, Genbank 登录号 EAW99547), 人的 T β 10 前体蛋白包含 169 个氨基酸残基并且预测分子量为 17.98 ku, 并且其最后的 44 个氨基酸与 T β 10 蛋白一样。

T β 10 基因参与众多的细胞生物学过程且与细胞增殖高度相关, T β 10 mRNA 表达上调能够促进

小鼠甲状腺腺泡细胞增殖^[15]。此外, $T\beta 10$ 还与肿瘤的恶化、转移高度相关, 是肿瘤发生及恶化分级的预判指标之一^[17]。肿瘤富含血管且内部细胞快速分裂增殖, 有研究表明 $T\beta 10$ 蛋白可以通过调节肌动蛋白的装配来影响细胞的增殖^[16]。因此, $T\beta 10$ 在肿瘤细胞的快速增殖中发挥着重要作用。鹿茸同样拥有令人惊异的生长速度但却同时拥有正常的组织结构而不发生癌变, 沿纵轴至上而下鹿茸可以划分为间充质层, 前成软骨层, 过渡区及软骨层^[19]。其中, 前成软骨层是鹿茸中血管的生长中心, 前软骨层中血管及附近的细胞可以被 Ki67 所标记, 同时该区域还可见大量 BrdU 阳性细胞^[20]。本研究发现, $T\beta 10$ 蛋白对鹿茸尖部 4 种分层细胞的分裂繁殖具有不同的作用, 表现为抑制前成软骨区细胞增殖, 而对其他 3 个分层包括间充质层、过渡区及软骨层细胞增殖无显著促进或抑制作用。添加 $T\beta 10$ 融合蛋白于 HUVEC 细胞中, $T\beta 10$ 表现出促增殖作用。上述结果表明: $T\beta 10$ 一方面通过促进血管生成保证了鹿茸快速生长所需的营养供给; 另一方面通过抑制前成软骨区细胞的快速增殖保证了鹿茸组织结构合理有序。可部分解释鹿茸快速生长而不发生癌变的原因。

4 结 论

综上所述, 本研究获得了梅花鹿 $T\beta 10$ 融合蛋白, 并制备了效价较高的多克隆抗体。Western blot 检测表明, 该抗体可以特异性检测内源性和外源表达的 $T\beta 10$ 蛋白。获得的 $T\beta 10$ 具备生物学活性, 可以促进 HUVEC 并抑制鹿茸前成软骨区细胞增殖, 预示着其在鹿茸快速生长中发挥着重要功能。

参考文献 References

- [1] Fehr L Z, Pocsay G, Krein L, Zvara A, Bagdi E, Pocsay R, Lukes G, Gyry F, Gabor A, TarkE, and Pusks L G. Amplification of *Thymosin beta 10* and *AKAP13* genes in metastatic and aggressive papillary thyroid carcinomas[J]. *Pathology & Oncology Research*, 2012, 18(2): 449-458
- [2] Gerosa C, Fanni A, Nemolato S, Locci A, Marinelli V, Cabras T, Masana I, Castagnola M, Monga G, Fanos V, Faa G. Thymosin beta-10 expression in developing human kidney[J]. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2010, 23(S3): 125-128
- [3] Gu Z, Wang C S, Wang Y, Qiu X S, Wang E H. Expression of thymosin beta10 and its role in non-small cell lung cancer [J]. *Human Pathology*, 2009, 40(1): 117-124
- [4] Kim Y C, Kim B G, Lee J H. Thymosin beta 10 expression driven by the human TERT promoter induces ovarian cancer specific apoptosis through ROS production[J]. *PLOS One*, 2012, 7(5): e35399
- [5] Lee S H, Son M J, Oh S H, Rho S B, Park C, Kim Y J, Park M S, Lee J H. Thymosin beta (10) inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with Rho function[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(1): 137-148
- [6] Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, Asai M, Fukuda S, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T. Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis[J]. *Kidney International*, 2006, 69(6): 996-1004
- [7] Li C Y, Zhao H P, Liu Z, Chu W H. Deer antler—a novel model for studying organ regeneration in mammals [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 56: 111-22
- [8] Clark D E, Lord E A, Suttie J M. Expression of VEGF and ephrin A2 in deer antler[J]. *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 2005, 288(12): 1281-1293
- [9] Park J, Jeon B, Kang S, Oh M, Kim M, Jang S, Park P, Kim S, Moon S. Study on the changes in enzyme and insulin-like growth factor-1 concentrations in blood serum and growth characteristics of velvet antler during the antler growth period in Sika deer (*Cervus nippon*)[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(9): 1303-1308
- [10] Lord E A, Clark D E, Martin S K, Pedersen G W, Gray J, Li C Y, Suttie J M. Profiling genes expressed in the regenerating tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler[C]. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on Antler Science and Product Technology*. Queenstown: Deer Industry New Zealand, 2005, 129-134
- [11] Krauss S, Wagermaier W, Estevez J A, Currey J D, Fratzl P. Tubular frameworks guiding orderly bone formation in the antler of the red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 175(3): 457-64
- [12] 徐秋芳, 陈晴晴, 倪海平, 李 硕, 张金凤, 周益军. 灰飞鼠原肌球蛋白的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(19): 3791-3798
- [13] Xu Q F, Chen Q Q, Ni H P, Li S, Zhang J F, Zhou Y J. Cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of tropomyosin gene in *Laodelphax striatellus* fallen[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(19): 3791-3798 (in Chinese)
- [14] Santanu D C, W W Y, Stefan C, Chris M M, Jolon M D, Li C Y. Direct localization of molecules in tissue sections of growing antler tips using MALDI imaging[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 409: 225-241
- [15] Li C Y. Deer antler regeneration: A stem cell-based

- epimorphic process[J]. *Birth Defects Resear:Part C*, 2012, 96(1): 51-62
- [15] Viglietto G, Califano D, Bruni P, Baldassarre G, Vento M T, Belletti B, Fedele M, Santelli G, Boccia A, Manzo G, Santoro M, and Fusco A. Regulation of thymosin $\beta 10$ expression by TSH and other mitogenic signals in the thyroid gland and in cultured thyrocytes[J]. *European Journal of Endocrinology*, 1999, 140(6): 597-607
- [16] 和金周, 周长林, 方宏清. 胸腺素 $\beta 10$ 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 613-616
- He J Z, Zhou C L, Fang H Q. Advances in thymosin $\beta 10$ [J]. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(4): 613-616 (in Chinese)
- [17] Mohamad S, Pascal P, Christine P, Catherine G J, Joelle D, Pascal M S. Thymosins $\beta 4$ and $\beta 10$ are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22, 1206-1221
- [18] 杨继岚, 蒋永新. 胸腺素 $\beta 10$ 与恶性肿瘤相关性的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (1): 257-259
- Yang J L, Jiang Y X. Advances in thymosin $\beta 10$ and malignancy tumor research [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2015, 35(1): 257-259 (in Chinese)
- [19] Li C Y, Clark D E, Lord E A, Santoro A, Suttie J M. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery [J]. *Anatomical Record Part A-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 2011, 268(2): 125-130
- [20] Clark D E, Li C Y, Wang Y Y, Martin S K, Suttie J M. Vascular localization and proliferation in the growing tip of the deer antler [J]. *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 2006, 288 (9): 973-981

责任编辑: 杨爱东