

技术的尝试. 剥离减数分裂中期的染色体, 克隆于 pUC 质粒上, 用质粒已知序列作引物进行 PCR 扩增, 建立微克隆, 得到 23 000 个重组体, 其中 69% 经 DNA 印迹鉴定具有实用价值. 插入序列的平均长度为 150~ 160 bp.

Sandery 和 Jung 等将显微切割与微克隆技术应用到植物上, 也发现在植物上与在人类和哺乳动物上应用显微切割与微克隆技术有所不同. 首先, 植物与动物的细胞制片不一样, 植物细胞制片要复杂得多. 取材后, 首先要经过卡诺氏固定液的固定, 然后在醋酸的环境下压片, 获得良好的分裂相后用液氮或干冰揭片, 这样的载物片才能用来做染色体剥离或切割. 但植物制片取材的部位和时期较人和哺乳动物灵活得多, 可在根尖的染色体分裂中期^[8]花粉母细胞的减数分裂期进行.

近年来, 显微切割和微克隆在植物上的应用日渐活跃. Albani 等剥离 2~ 5 条染色体臂, 采用 Sau3A 连接-接合系统, 建立微克隆. 此方法不仅仅证明 Sandery 的方法在植物上的适用性, 而且对其进行了改进, 省去在油室操作过程, 使整个消化、连接、扩增过程在“single tube”中完成, 降低了操作的难度. Chen 等^[5]在燕麦上剥离一条染色体, 经单管中系列操作后, 用单个染色体少于 0.4 pg 的 DNA 量, 经两次 PCR 扩增, 得到 500 000 个重组克隆, 平均插入序列 650 bp, 其中 41% 高拷贝, 59% 低拷贝. 这不仅证明该方法的正确性, 而且只用一条染色体进行切割、扩增、

克隆, 得到染色体区带的 DNA 文库.

参 考 文 献

- 1 Bates G, Wainwright B J, Willianson N *et al.* Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2, *Mol Cell Biol*, 1986, **6** (11): 3826~ 3830
- 2 Ludecke H-J, Senger G, Claussen U, *et al.* Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 1989, **338** (23): 348~ 350
- 3 Robert D C, Saunders D, Glover M *et al.* PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (22): 9027~ 9037
- 4 邓汉湘, 夏家辉 (Deng H X, Xia J H). 人类染色体显微切割、微克隆与染色体区带特异性绘画技术. *自然科学进展 (Progress in Natural Science)*, 1992, **4**: 361~ 367
- 5 Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat chromosome. *Genome*, 1995, **38** (4): 706~ 714

Progress of Chromosome Microdissection and Microcloning Technology. TIAN Chai, LU Yifan¹⁾, DENG Jixian¹⁾, LIU Guangtian (*Department of Plant Science, Chinese Agriculture University, Beijing 100094, China;* ¹⁾*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China*).

Abstract Progress of chromosome microdissection and microcloning technology were reviewed. Some main technology problems such as chromosome identification, microdissection and microcloning were discussed. Some progress in plants was reviewed about chromosome microdissection and microcloning.

Key words chromosome, microdissection, microcloning

肿瘤坏死因子家族新成员——TRAIL

王梁华 焦炳华

(第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海 200433)

摘要 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 或称凋亡素 2 配体 (Apo2 ligand, Apo2L), 是 TNF 家族的新成员. 它是从表达序列标签库 (expressed sequenced tag, EST) 中寻找 TNF 的同源分子

时发现的. TRAIL 是一种分子质量为 32.5 ku 的 II 型跨膜糖蛋白, 活性形式呈同源三聚体. TRAIL 和可溶性的 TRAIL 强烈诱导肿瘤细胞株凋亡. 新近发现的 TRAIL 受体 DR4 和 DR5 及 TRID 说明了 TRAIL 与 TNF 和 Fas/ Apo-1 配体的作用途径是不同的. 随着对 TRAIL 的受体及作用机理研究的深入, TRAIL 很可能成为新一代抗肿瘤制剂.

关键词 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体, 凋亡, 抗肿瘤, 受体

学科分类号 Q73

根据 TNF 家族成员的来源及序列的不同^[1]: 将单核/巨噬细胞所产生的 TNF 称为 TNF- α ; 把 T 细胞产生的 TNF 称为 TNF- β , 或称为 LT, 把另一个有相似作用的蛋白质称为 Fas 配体, 而新近发现的与 TNF 序列同源性很高的蛋白质称为肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL). 这些分子在序列、分子结构和受体等方面都有很高的相似性: 其分子的活化形式均为三聚体. 受体激活时也呈三聚体. 由于其受体的特殊性, 因而 TRAIL 不易引起全身毒副反应, 而且其抗肿瘤谱较其他 TNF 家族成员更广.

1 TRAIL 是 TNF 超家族的新成员

TRAIL, 亦称 Apo-2L 是新近发现的一个与 TNF 家族成员序列有同源性的蛋白质分子^[2]. TRAIL 是在 EST 库中寻找 TNF 与 Fas 配体具有序列同源性的分子时发现的. 人 TRAIL 分子的细胞外区域与 Fas/ Apo-1/ CD95 配体、TNF- α 、LT- α 和 LT- β 的同源性分别为 28%、23%、23% 和 22%. 用特异核酸探针杂交 (Northern blot hybridization) 方法分析组织表达 TRAIL 的水平发现, 一个约 1.8~2 kb 长的 mRNA 广泛存在于许多组织中, 特别是成人的脾、前列腺和肺, 但脑、肝和睾丸

中不转录此因子. 在突变的细胞上, 如退行性淋巴细胞系 K299, 扁桃体 T 细胞中也特别丰富, Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞系中丰度较低. 另外, 在新鲜分离的外周血淋巴细胞中转录量也很低或不表达 TRAIL 的 mRNA.

对人 TRAIL 进行重组表达、理化性质分析和诱导多种细胞凋亡的研究, 结合氨基酸序列分析^[2]发现: 人 TRAIL 整个分子由 281 个氨基酸组成; 等电点为 7.63; 根据蛋白质化学理论推导的可溶性分子为第 114~281 位氨基酸, 但在体内还没有发现它被酶从膜上切割下来形成可溶性分子, 氨基酸序列中似乎也没有已知的金属蛋白酶的酶切位点, 非还原 SDS-PAGE 分析此可溶性分子, 分子质量为 24 ku 左右, 约在 48 ku 处形成二聚体, 三聚体大约为 66 ku; TRAIL 是典型的 II 型跨膜蛋白: 其 N 端 (细胞内区域) 没有信号肽, 第 15~40 位氨基酸为疏水区域, 可形成跨膜结构; C 端 (细胞外区域) 与 TNF 和 Fas 配体一样, 保守性较强, 能形成几个 β 折叠结构再形成典型的 β 链夹心, 即可形成同源三聚体的亚结构, 几个最保守的氨基酸可形成三聚体的中轴 D 链. 鼠的 TRAIL 由 291 个氨基酸组成^[2], 人与鼠的 TRAIL 有交叉活性. 根据 cDNA 推断人 TRAIL 的氨基酸序列见图 1.

MAMMEVQGGP SLGQ TCYLIV IFTVLLQSLC VAVTTVYPTN ELKQM QPKYS KSGIACFLKE
DDSTWDPNDE ESMNSPCWQV KWQLRQLGRK MILRTSEETI STVQEKQQNI SPL VRERGPQ
RVAAHITGTR GRSNTLSSPN SKNEKALHLR NGEL VIHEKT KNDKQM VQYI YK YTS YPDPI
LLMKSARNSC WSKDAETGLY SIYQGGIFEL KENDRIFVSV TNEHLIDMDH EASFFGAFLV G

图 1 cDNA 推断人 TRAIL 的氨基酸序列

划线者为跨膜区; 黑体为 109 位 Asn 糖基化位点; 斜体为可溶性 TRAIL.

但是, TRAIL 与 TNF 家族成员有所不同: TRAIL 的 N 端 (细胞内区域) 与其他成员无同源性, 它的 N 端极短, 只有几个氨基酸 (第 1~ 14 位); 另外, 它的广谱诱导细胞凋亡作用也只有 Fas 配体才能与之相媲美, 而其他的成员都有组织与细胞特异性; 还有, TRAIL 染色体定位在 3q26.1~ 26.2, 这与 TNF 家族其他成员定位于 6 号染色体或 19p13.3 不同, 到现在为止, 还没有发现 3 号染色体编码其他 TNF 家族成员.

2 TRAIL 诱导突变细胞的凋亡

纯化的人 TRAIL 能引起 9D 细胞和 EB 病毒转化的人 B 细胞数量的明显减少和典型的细胞凋亡的形态学特征, 而在用 Fas/ Apo-1 的抗体对这些细胞作用时引起与 Fas 配体相似的结果. TRAIL 在 2 h 内就能诱导 Jurkat 和 9D 细胞的核小体 DNA 片段化. 同样, TRAIL 对 Burkitt's 淋巴瘤 B 细胞系、急性人白血病 T 细胞系也有同样的诱导细胞凋亡的作用. TRAIL 对人肿瘤细胞如 HeLa、U937、A549 和 ME180 诱导凋亡的作用比对照均有非常显著的增强^[2]. 鼠的 TRAIL 也有类似的作用^[2]. 比较重组鼠 TRAIL 和 FasL 对靶细胞特异性和细胞外的激活途径发现: 鼠骨髓瘤细胞抗 FasL 诱导的凋亡, 而对 TRAIL 敏感; ICE 相关的蛋白酶抑制剂阻断 TRAIL 诱导的细胞凋亡作用. 表 1 列出了人 TRAIL 与 Fas 抗体对不同肿瘤细胞诱导凋亡的作用.

表 1 TNF 家族诱导的肿瘤细胞凋亡

肿瘤 细胞系	细胞凋亡百分率/ %		
	对照	TRAIL	抗 Fas/ Apo-1
9D	22. 5	92. 4	90. 8
Raji	35. 9	73. 4	80. 7
Jurkat	5. 9	77. 0	18. 1
HeLa	5. 3	18. 6	17. 9
U937	3. 6	62. 3	16. 6
A549	16. 5	74. 6	25. 1
ME180	8. 6	80. 7	9. 9
293	12. 3	12. 2	16. 7

在体内, TRAIL 能诱导突变的 T 淋巴细胞凋亡, 如恶变的 T 细胞, HIV 感染的 T 细胞等. 同时发现: a. TRAIL 的作用不同于 Fas, 可能与移植物抗肿瘤有关; b. TRAIL 的表达与 FasL 没有相关性, 也没有协同作用; c. TRAIL 的作用途径与已知的一些途径, 如多药抗性途径、Bcl-2 途径无关, 但受细胞因子的调控, 如 IL-2, IL-15, 抗 CD3 抗体等; d. TRAIL 的作用呈时间与剂量依赖性. 在体外, 不同突变的人淋巴细胞对 TRAIL 的敏感程度完全不同, 如 HIV 感染的 T 细胞对 TRAIL 非常敏感, 而有的细胞却呈抗性^[3].

3 TRAIL 受体及其作用机理

目前发现人 TRAIL 的细胞膜受体共有五种: 分别称为死亡受体 4 (DR4), 亦称作 TRAIL-R1; 死亡受体 5 (DR5), 亦称作 TRAIL-R2; 诱骗受体 (DcR1), 亦称无胞内区域受体 (TRID), 或称作 TRAIL-R3. 正常组织细胞可表达上述所有三种受体, 而肿瘤及转化细胞仅能表达 DR4 和 DR5. 最近又发现了 TRAIL 的另外两种受体, 分别称为 DcR2 和 TRAIL-R4, 亦称 TRUND. 这两种受体其实是同一个分子, 只是不同实验室的不同报道而已^[4,5].

DR4 的 108~ 206 位间含有两个富含 Cys 的重复序列, 227~ 245 为跨膜区域, 随后的 70 个氨基酸为与 TNFR1、DR3 及 Fas 等死亡区域 (death domain) 高度同源的片段. 细胞外区域与 DR4 一样有两个富含 Cys 的重复序列, 345~ 420 位为死亡区域. DcR1/TRID 前体为 259 个氨基酸, 与 DR4 一样有两个富含 Cys 的重复序列, 但紧接着的是 5 个以 15 个氨基酸为一组的 TAPE (富含 Thr、Ala、Pro、Glu 的序列) 重复单位. DcR1/TRID 没有细胞内区域, 以糖酯-磷脂酰肌醇 (GPI) 固定在细胞膜表面. DR4、DR5、DcR1/TRID 都是 I 型跨膜蛋白, 基因皆定位于染色体 8p22-21, 而现在还没有发现 8 号染色体编码其他的 TNF 受体超家族成员. 三种受体基因的紧密

相连, 表明它们可能有相同的复制前导序列; 同时, 染色体 8p 还编码一组肿瘤抑制基因, 这一点非常令人感兴趣.

DR4 介导的信号转导及细胞凋亡并不依赖于 FADD (Fas-associated protein with death domain), TRADD (TNFR1-associated death domain-containing protein), RIP (receptor interacting protein) 或 RIADD (RIP-associated ICH/CED-3 homologous protein with a death domain), 而这些分子是 TNFR1 和 Fas 信号转导途径中的关键环节^[1]; DR4 信号转导也不依赖于富含半胱氨酸的天门冬氨酸酶-8 (cysteine aspartase-8, caspase-8; 或称 FADD-like ICE-1, FLICE-1) 分子, 而 caspase 家族可能是 TNF 受体超家族成员信号转导的共同通路^[1]. DR4 不能介导 NF- κ B 的激活. 这些说明 DR4 的信号转导途径与 TNFR1 和 Fas 的途径完全不同, 并提示 DR4 可能由新的 caspase 分子介导其信号途径. DR5 介导的细胞凋亡可能与 FADD 有关, 并可能依赖于 caspase 家族. DR5 激活 NF- κ B 时呈组织特异性. 这些结果似乎与 TNF 存在两种受体并介导不同的功能相类似. 但关于 DR4、DR5 作用机理的结果, 几个研究小组的报道相互矛盾, 其原因可能是由于他们都是用某个抗体来阻断 DR4、DR5 的效应得出的初步结论. DR1/TRID 没有细胞内区域, 因而不含 DD, 故不能介导信号转导及细胞凋亡.

4 展 望

TRAIL 作为细胞因子 TNF 家族的一员, 随着重组 TRAIL 的出现对它的认识正在逐步深入, 如空间结构, 它的其他生物学功能; 对 TRAIL 作为细胞外信号诱导肿瘤细胞凋亡一定会更加深入.

虽然现在下结论可能太早, 但是 Genentech 和 Immunex 等公司已经开始用 TRAIL 对啮齿类动物的移植瘤进行实验. TRAIL 研究的几个主持人之一 Dixit 是这样评价 TRAIL 的: 这也许正是一直在寻找的工具——用一个

独立于 p53 作用的分子就能使细胞死亡, 而且这个分子并不象先前应用的 TNF 那样具有炎症反应等毒副作用.

参 考 文 献

- 1 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, **88** (2): 355~ 365
- 2 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3** (4): 673~ 682
- 3 Jeremias I, Herr I, Boehler T *et al.* TRAIL/Apo-2-ligand induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*, 1998, **28** (1): 143~ 152
- 4 Pan G H, Ni J, Wei Y F *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997, **277** (5327): 815~ 818
- 5 Pan G H, Ni J, Yu G L *et al.* TRUNDL, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett*, 1998, **424** (1): 41~ 45

TRAIL: A New Member of Tumor Necrosis Factor Superfamily. WANG Liang-hua, JIAO Bing-hua (*Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which called also Apo-2L, is a new member of the tumor necrosis factor superfamily. TRAIL cDNA was isolated via searching homology to Fas/Apo-1 ligand and TNF in an expressed sequenced tag (EST) data base. It consists of 281 amino acids with a calculated molecular mass of 32.5 ku. Transfected TRAIL is expressed at the cell surface with its C-terminus exposed, indicating a type II trans-membrane protein topology. Like Fas/Apo-1 ligand and TNF, its C-terminal exhibits a homotrimeric subunit structure. Soluble TRAIL induces extensive apoptosis in most tumor cell lines, but the effect of TRAIL is not inhibited by soluble Fas/Apo-1 and TNF receptors. So far, three receptors of TRAIL have been identified, i. e. DR4, DR5 and TRID. These discoveries suggest that the mechanism of TRAIL is different from TNF and FasL. TRAIL may likely be elaborated as a new anti-cancer drug.

Key words TNF-related apoptosis-inducing ligand, apoptosis, anticarcinogen, receptor