

# 日本血吸虫凋亡基因 *Sjcaspase3* 的克隆、真核表达及其功能分析

王涛, 洪炆, 韩宏晓, 吕超, 贾秉光, 曹晓丹, 韩倩, 陆珂, 李浩, 傅志强, 林矫矫

中国农业科学院 上海兽医研究所 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200241

王涛, 洪炆, 韩宏晓, 等. 日本血吸虫凋亡基因 *Sjcaspase3* 的克隆、真核表达及其功能分析. 生物工程学报, 2016, 32(7): 889–900.

Wang T, Hong Y, Han HX, et al. Cloning, eukaryotic expressing and function analysis of *Schistosoma japonicum* apoptosis gene *Sjcaspase3*. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 889–900.

**摘 要:** 为深入研究日本血吸虫细胞凋亡机制。利用 PCR 技术扩增得到 *Sjcaspase3* 的全长序列, 其 ORF 含 900 bp, 编码 299 个氨基酸, 理论分子量为 33 509.7 Da, 理论等电点为 6.39。Real-time PCR 分析表明该基因在日本血吸虫生长发育的各个时期均有表达, 其中 21 d 表达量最高, 42 d 雌虫表达量高于 42 d 雄虫。成功构建了 pXJ40-FLAG-*Sjcaspase3* 重组质粒并转染到 HeLa 细胞内, 荧光定量 PCR 和 Western blotting 分析表明 *Sjcaspase3* 成功在 HeLa 细胞中表达。酶活分析提示重组 *Sjcaspase3* 具有切割特异性底物天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸 (DEVD) 的活性。流式细胞术检测了 *Sjcaspase3* 可诱导 HeLa 细胞发生早期细胞凋亡。研究结果为深入探讨 *Sjcaspase3* 的生物学功能及日本血吸虫细胞凋亡机制奠定了基础。

**关键词:** 日本血吸虫, caspase3, 细胞凋亡, 酶活, 细胞流式

**Received:** November 13, 2015; **Accepted:** April 5, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81271871, 31172315).

**Corresponding author:** Jiaojiao Lin. Tel: +86-21-34293440; E-mail: jjlin@shvri.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81271871, 31172315) 资助。

网络出版时间: 2016-04-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160414.1437.002.html>

# Cloning, eukaryotic expressing and function analysis of *Schistosoma japonicum* apoptosis gene *Sjcaspase3*

Tao Wang, Yang Hong, Hongxiao Han, Chao Lv, Bingguang Jia, Xiaodan Cao, Qian Han, Ke Lu, Hao Li, Zhiqiang Fu, and Jiaojiao Lin

Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China

**Abstract:** For further research of the apoptosis mechanism of *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*). The cDNA encoding *Sjcaspase3* of *Schistosoma japonicum* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) technique, which contained 900 nucleotides and encoded 299 amino acids. The theory molecular weight and isoelectric point (PI) of the deduced protein is 33.5 kDa and 6.39, respectively. Real-time PCR was used to analyze the transcription profiles of *Sjcaspase3* at different development stages of *S. japonicum*. The results showed that this gene was expressed in all stages of *S. japonicum* with the highest expression in 21d worms, and the level of gene transcription in 42 d female worms was higher than that of male worms. The recombinant plasmid pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 was constructed and transfection into Hela cells successfully. Real-time PCR and Western blotting analysis showed *Sjcaspase3* was successfully expressed in Hela cells. Enzyme activity analysis revealed that recombinant Sjcaspase3 possessed the activity to cut substrate DEVD. Flow cytometry proved that *Sjcaspase3* could induce early apoptosis of Hela cells. The results provide the basis for proceeding further study on the biological function of *Sjcaspase3* and better understand the apoptosis mechanism of *S. japonicum*.

**Keywords:** *Schistosoma japonicum*, caspase3, apoptosis, enzyme activity, flow cytometry

细胞凋亡 (Apoptosis) 是细胞程序性死亡 (Programmed cell death) 的一种重要方式。它在多细胞生物去除不需要和异常细胞中起着重要作用, 对多细胞生物体生长发育具有重要的意义。目前, 研究比较透彻的凋亡调控通路主要有两条: 即外源性的死亡受体通路和内源性的线粒体通路。两种通路虽然起始的调控基因不同, 但终点都是半胱天冬酶家族 (Caspase family) 成员的激活并进行一系列切割, 最终导致细胞不可逆地发生细胞凋亡。可见 Caspase 家族在细胞凋亡中起着不可替代的作用。

本实验室前期对日本血吸虫的细胞凋亡现象和机制进行了初步探索。彭金彪等对不同适宜性宿主来源 10 d 日本血吸虫童虫的细胞凋亡

进行了观察和比较, 发现非适宜性宿主来源的日本血吸虫存在更明显的细胞凋亡现象<sup>[1]</sup>。韩宏晓等在 miRNA 水平上分析了不同适宜性宿主来源日本血吸虫差异表达的 miRNA, 发现一些与调控凋亡相关的 miRNA 在不同适宜性宿主来源虫体呈现差异表达<sup>[2]</sup>。郭小勇等观察并实验证明了大、小鼠来源不同时期的日本血吸虫存在细胞凋亡现象<sup>[3]</sup>。以上研究说明日本血吸虫和其他多细胞生物一样存在细胞凋亡现象, 并且细胞凋亡与日本血吸虫的生长发育具有重要关系。

2009 年日本血吸虫全基因组测序工作的完成对深入开展日本血吸虫凋亡机制的研究提供了重要基础<sup>[4]</sup>。人类等高等哺乳动物的 Caspase 家族目前已经发现有 11 个成员, 而日本血吸虫

仅仅在基因组水平上发现了 4 个成员<sup>[5]</sup>。本实验室前期已在转录及蛋白水平上证实日本血吸虫存在 Caspase9<sup>[6]</sup>, 但其他成员却未见相关报道。

很早以前人们就开始关注细胞凋亡在癌症治疗方面的应用<sup>[7-8]</sup>, 在细胞凋亡中 Caspase3 就是一个关键的分子<sup>[9]</sup>。近几年人们开始关注细胞凋亡在治疗血吸虫病方面的应用前景<sup>[10]</sup>。2013 年 Kumar 等利用生物信息学分析了血吸虫的 Caspase3/7 成员并对比了人类的 Caspase 成员<sup>[11]</sup>, 发现血吸虫的 Caspase3/7 蛋白在二级结构和三级结构上和它们的哺乳动物宿主具有一定的差异, 分析了血吸虫 Caspase3/7 作为药物靶点的可能性。因此对日本血吸虫 *Caspase3* 基因的研究具有重要意义, 不仅有助于对日本血吸虫细胞凋亡机制的理解, 也可能有助于日本血吸虫病新药物靶点的鉴定。

本研究对日本血吸虫 *Sjcaspace3* 进行了克隆、表达, 验证了其具有切割特异性底物的活性, 并可诱导 Hela 细胞发生细胞凋亡, 为深入研究日本血吸虫细胞凋亡机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和酶

Trizol、Superscript<sup>TM</sup>III 反转录酶购自 Invitrogen 公司; Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体、限制性内切酶、PrimeScript<sup>TM</sup> PT-PCR Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time)、EASY Dilution (For Real Time PCR) 均购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司; DNA 纯化回收试剂盒, 小型质粒回收试剂盒购自 Axygen 公司; 大型质粒纯化回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。Caspase3/7

活性检测试剂盒, FuGene HD 转染试剂购自 Progenia 公司; FLAG 单抗购自 CST 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自北京碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司; pXJ40-FLAG 质粒由中国农业科学院上海兽医研究所禽病实验室保存; DAPI 染料购自上海前生生物科技有限公司; Anti-Flag 亲和凝胶和 Poly Flag 多肽购自 Biotool 生物公司。

#### 1.1.2 生物材料

DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京金式金生物有限公司; Hela 细胞由中国农业科学院上海兽医研究所禽病实验室保存; 日本血吸虫虫体由中国农业科学院上海兽医研究所血吸虫实验室保存; 6 周龄雄性 BALB/c 购自上海斯莱克实验动物有限公司; 中国大陆株日本血吸虫阳性钉螺由中国农业科学院上海兽医研究所钉螺实验室提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 RNA 提取与反转录

取液氮保存的 42 d 日本血吸虫约 150 mg, 按照 Trizol 试剂盒说明书提取虫体总 RNA。利用 Superscript<sup>TM</sup> III 反转录酶将总 RNA 反转录成 cDNA。

### 1.2.2 *Sjcaspace3* 基因的克隆

根据日本血吸虫 *CASP3* 基因 (GenBank 登录号 FN315427.1) 序列设计特异引物 F1 (与 ORF 的 1-20 位核苷酸重叠) 和 R1 (与 ORF 的 878-900 位核苷酸反向互补), 引物序列见表 1, 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。PCR 反应体系参考 Ex Taq 酶说明书。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C

退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 继续延伸 5 min; 4 °C 终止反应并保存。

### 1.2.3 生物信息学分析

利用 ORF FINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线分析寻找开放阅读框; 将序列进行 BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对寻找同源基因; 利用 Primer Premier 5 软件进行酶切位点分析和理论编码蛋白质序列分析; 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线分析寻找结构域; 利用 MEGA 6 软件进行多序列比对并构建系统发育树; 利用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析氨基酸残基组成、数目, 蛋白质理论分子质量和理论等电点等基本理化性质。

### 1.2.4 荧光定量 PCR 分析 *Sjcaspace3* 在各期别虫体中的表达情况

分别提取日本血吸虫尾蚴、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d、42 d 雄虫、42 d 雌虫的总 RNA,

按照 TaKaRa PrimeScript™ PT-PCR Kit 试剂盒说明书反转录日本血吸虫各时期虫体的 cDNA。以日本血吸虫 *SjNADH* 基因为内参, 各时期日本血吸虫 cDNA 为模板, 并利用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 酶进行荧光定量 PCR 实验。实验进行 3 次独立重复。*Sjcaspace3* 荧光定量 PCR 引物 (F2 和 R2) 序列和日本血吸虫 *SjNADH* 内参引物 (F3 和 R3) 序列见表 1。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

### 1.2.5 pXJ40-FLAG-SjCaspase3 重组质粒的构建

根据 *Sjcaspace3* 自身酶切位点和 pXJ40-FLAG 多克隆位点设计携带有酶切位点的引物 F4 和 R4, 分别在上、下游引物的 5' 端引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性酶切位点。引物序列见表 1, 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, PCR 反应体系和反应条件同上。PCR 扩增产物经纯化回收后, 亚克隆到 pMD19-T 载体, 挑取单克隆测序验证后进一步克隆到 pXJ40-FLAG 载体上并再次进行测序验证。将构建成功的 pXJ40-FLAG-Sjcaspace3 单克隆菌液

表 1 PCR 和 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used for PCR and RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
F1	ATGGAAGAGAAAGTTGATGG	900
R1	TTATTTGATTCTTTTCGGTTGTC	
F2	ATCGCTGTCCTTCCCTGATTGGAA	114
R2	ATTACATCATCGCCTGCATCGGCA	
F3	TGTCAGCCTGGTGAAGGTATCGTT	104
R3	ACATTGTCAATAGTTTGTGCAGACC	
F4	CGCGGATCCATGGAAGAGAAAGTTGATGG	918
R4	GCGCTCGAGTTATTTGATTCTTTTCGGTTGTC	
F5	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	307
R5	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	

大量培养, 并利用 QIAGEN 质粒抽提试剂盒提取 pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 重组质粒, 保存备用。

### 1.2.6 转染 HeLa 细胞

将生长状况良好的 HeLa 细胞用完全培养基稀释成  $2 \times 10^5$  cells/mL 浓度, 按每孔 2 mL 的量铺到 35 mm 直径的细胞培养皿中。待细胞贴壁生长至 80%–90% 时可进行细胞转染。弃去培养基, 利用 37 °C 预热的 PBS 洗 3 遍后加入 1 mL 37 °C 预热的含 2% 胎牛血清的完全培养基。利用 FuGene HD 转染试剂, 按照质粒 ( $\mu\text{g}$ ) 与转染试剂 ( $\mu\text{L}$ ) 1 : 3 的比例配制进行转染。每个培养皿转染 2  $\mu\text{g}$  质粒。分别设置对照组、空质粒组和 Sjcaspase3 组。其中对照组只更换培养基, 不进行质粒转染; 空质粒组转染相应的 pXJ40-FLAG 质粒; Sjcaspase3 组转染 pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 重组质粒。

### 1.2.7 荧光定量 PCR 分析 *Sjcaspase3* 基因的表达

转染 HeLa 细胞后 6、9、12、15 h, 先弃去培养基, 利用 37 °C 预热的 PBS 洗 3 遍, 然后加入 Trizol 反复吹打细胞。按照上述方法提取 HeLa 细胞的总 RNA 并反转录成 cDNA。以 *Sjcaspase3* 的荧光定量 PCR 引物和人类的 *GAPDH* 基因为内参, 以各期别虫体 cDNA 为模板, 按照上述方法进行荧光定量 PCR 分析, 每个实验重复 3 次。*GAPDH* 内参基因的引物 (F5 和 R5) 见表 1。

### 1.2.8 Western blotting 分析 Sjcaspase3 蛋白表达

转染 HeLa 细胞后 6、9、12、15 h, 先弃去培养基, 利用 37 °C 预热的 PBS 洗 3 遍, 然后加入 200  $\mu\text{L}$  RIPA (含蛋白酶抑制剂) 细胞裂解液 4 °C 裂解 30 min。收集细胞裂解液, 4 °C、12 000 $\times g$  离心 10 min, 取上清进行 Western blotting 分析

Sjcaspase3 蛋白在 HeLa 细胞中的表达。

### 1.2.9 rSjcaspase3 重组蛋白的纯化

转染 HeLa 细胞后 15 h 后先弃去培养基, 利用 37 °C 预热的 PBS 清洗 3 遍, 然后加入 400  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液裂解 30 min。收集细胞裂解液, 4 °C、12 000 $\times g$  离心 10 min 取上清。按照 Anti-Flag 亲和凝胶纯化说明书进行操作, 取 300  $\mu\text{L}$  细胞裂解液并加入 100  $\mu\text{L}$  亲和凝胶 4 °C 振荡孵育 4 h。利用 TBS 缓冲液清洗 3 遍后加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Poly Flag 多肽 200  $\mu\text{L}$ 。4 °C 振荡孵育 4 h 后, 4 °C、10 000 $\times g$  离心 1 min 取上清即为纯化的目的蛋白。取 10  $\mu\text{L}$  目的蛋白上清并加入 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$  上样缓冲液煮沸后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳实验。

### 1.2.10 Caspase 酶活检测

转染 HeLa 细胞 15 h 后先弃去培养基, 利用 37 °C 预热的 PBS 清洗 3 遍, 然后加入 400  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液裂解 30 min。收集细胞裂解液, 4 °C、12 000 $\times g$  离心 10 min 取上清。按照 Promega Caspase3/7 酶活检测试剂盒说明书操作, 每组各取 200  $\mu\text{L}$  并加入 200  $\mu\text{L}$  含天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸 (DEVD) 序列的蛋白底物, 混匀后在室温下避光振荡。30 min 后利用 FB12 光度计读取荧光强度。取剩下的蛋白裂解液进行蛋白浓度测定。每个组别进行 3 次独立重复实验。

Sjcaspase3 体外酶活检测实验方法同上。取 100  $\mu\text{L}$  含 rSjcaspase3 重组蛋白上清并加入 100  $\mu\text{L}$  底物, 混匀后在室温下避光振荡。对照组为进行相同处理的阴性细胞裂解液。30 min 后利用 FB12 光度计读取荧光强度。每个组别进行 3 次独立重复实验。

### 1.2.11 流式细胞术检测细胞凋亡

转染 Hela 细胞 15 h 后利用流式细胞术分别检测对照组、空质粒组和 *Sjcaspase3* 重组质粒组细胞凋亡率, 对凋亡细胞进行统计学分析。转染 Hela 细胞 15 h 后收集各组细胞, 利用 PBS 洗 3 遍。按照 Invitrogen 凋亡检测试剂盒说明书利用 Binding buffer (试剂盒内提供) 稀释细胞浓度至  $1 \times 10^6$  cells/mL。避光下 100  $\mu$ L 细胞悬液中加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 1  $\mu$ L PI 染色 15 min 后利用流式细胞仪检测细胞凋亡。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Sjcaspase3* 基因克隆和生物信息学分析

利用日本血吸虫 42 d cDNA 为模板, 利用 *Sjcaspase3* 全长基因引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增。核酸凝胶电泳分析在 750 bp 和 1 000 bp 之间得到一条 DNA 片段 (图 1)。

生物信息学分析表明 *Sjcaspase3* 的 ORF 共有 900 bp, 编码 299 个氨基酸残基, 理论分子量为 33 509.7 Da, 理论等电点为 6.39。利用 NCBI 的 Blastx 在线工具分析, 发现该基因与曼氏血吸虫 SmCaspase3 基因的相似性为 77%, 故

将此基因命名为 *Sjcaspase3*。利用 NCBI 的 Conserved Domains Search Service 和 SMART 进行结构域搜索, 结果显示 *Sjcaspase3* 属于 CASc 超家族, 具有 CASc 结构域 (图 2)。选择曼氏血吸虫、埃及血吸虫、华支睾吸虫、细粒棘球绦虫和人类的 *Caspase3* 基因与日本血吸虫的 *Sjcaspase3* 基因进行多序列比较, 较高相似性依次为 77%、73%、53%、50% 和 43%。利用 MEGA 6 软件构建系统发育树, 结果显示曼氏血吸虫的 *Caspase3* 基因与日本血吸虫的 *Sjcaspase3* 亲缘性最近, 与人的 *Caspase3* 基因亲缘性较远 (图 3)。

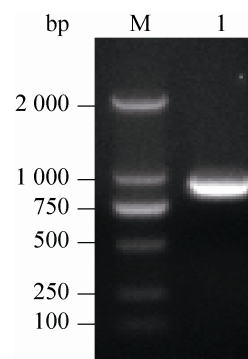


图 1 PCR 扩增 *Sjcaspase3* 基因

Fig. 1 PCR product of *Sjcaspase3* gene. M: DS2 000 DNA marker; 1: PCR product of *Sjcaspase3*.

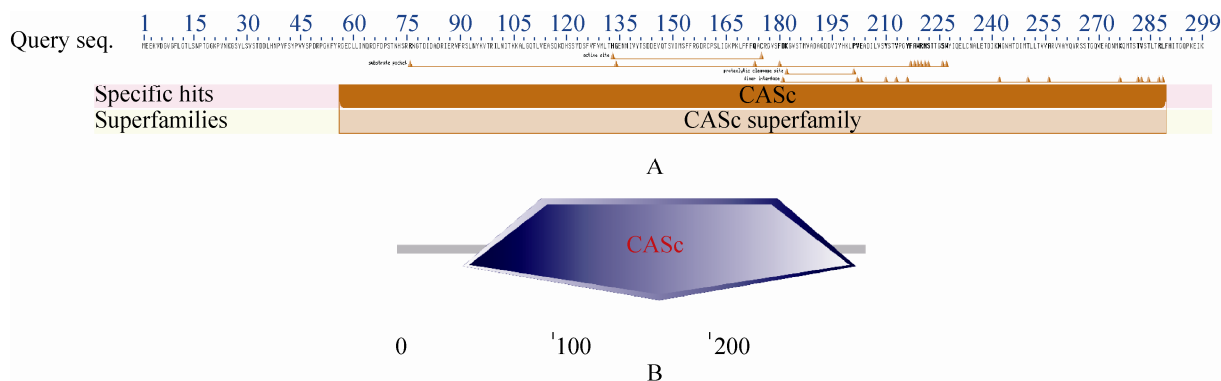


图 2 *Sjcaspase3* 功能域分析

Fig. 2 The function domain of *Sjcaspase3* gene. (A) The function domain of *Sjcaspase3* gene analysed by NCBI conserved domain search service. (B) The function domain of *Sjcaspase3* gene analysed by SMART service.

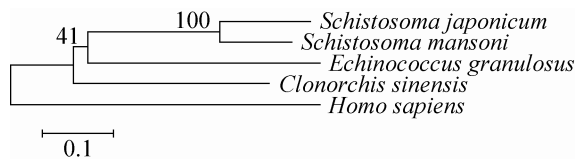


图 3 *Sjcaspase3* 系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic relationship of *caspase3* gene in *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *Clonorchis sinensis*, *Homo sapiens*. The phylogenetic tree was constructed by MEGA 6 using Neighbor-Joining algorithm.

2.2 *Sjcaspase3* 在各期别虫体中的表达情况分析

荧光定量 PCR 结果分析表明, *Sjcaspase3* 在日本血吸虫尾蚴、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d 虫体中均有表达 (图 4), 其中 21 d 虫体表达量最高。42 d 虫体雌雄虫转录水平相比, 雌虫表达量高于雄虫且具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

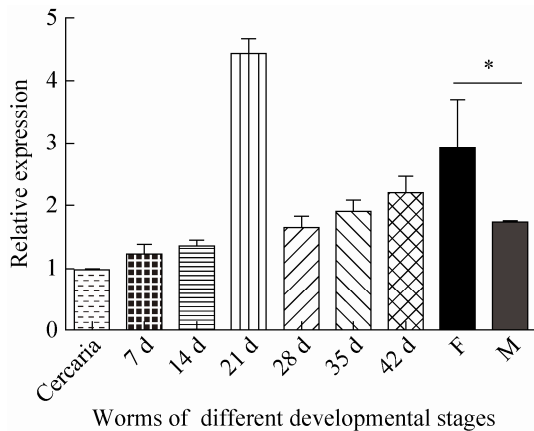


图 4 荧光定量 PCR 分析 *Sjcaspase3* 在日本血吸虫体内各期别的转录水平 ( $\bar{x} \pm s$ ) \*表示差异显著 ( $P<0.05$ )

Fig. 4 RT-PCR analysis of *Sjcaspase3* in *Schistosoma japonicum* at different stages. Expression throughout 7 stages of *S. japonicum* and expression in female and male adult worms were analyzed by real-time PCR. Housekeeping control gene *SjNADH* was used for normalizing. The experiments were repeated three independent times and data were showed by  $\bar{x} \pm s$ .

2.3 转染 Hela 细胞后 *Sjcaspase3* 基因转录水平

pXJ40-FLAG-*Sjcaspase3* 重组质粒转染 Hela 细胞后, 分别在 0、6、9、12、15 h 时经荧光定量 PCR 技术分析 *Sjcaspase3* 基因的表达量 (图 5)。结果显示在转染 pXJ40-FLAG-*Sjcaspase3* 质粒后 6 h 可检测到 *Sjcaspase3* 基因的转录, 在 15 h 之内随着时间的延长 *Sjcaspase3* 基因的表达量随着时间的延长逐步上升。

2.4 转染 Hela 细胞后 Western blotting 检测 *Sjcaspase3* 蛋白表达情况

如图 6 所示, 转染 Hela 细胞后分别在 6、9、12、15 h 时收样进行 Western blotting 检测, 12 h 时可见有微量 *Sjcaspase3* 蛋白表达, 15 h 后可见明显的 *Sjcaspase3* 蛋白表达。

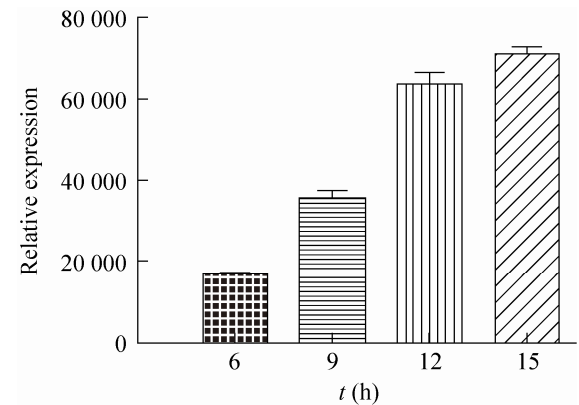


图 5 *Sjcaspase3* 在 Hela 细胞中不同时间的转录水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 5 Expression level of *Sjcaspase3* in Hela cells at different times. Real-time PCR analysis of *Sjcaspase3* in Hela cells after transfected with pXJ40-FLAG-*Sjcaspase3* plasmid. Human *GAPDH* gene was used as housekeeping control. The experiment was repeated three independent times and the data were showed by  $\bar{x} \pm s$ .

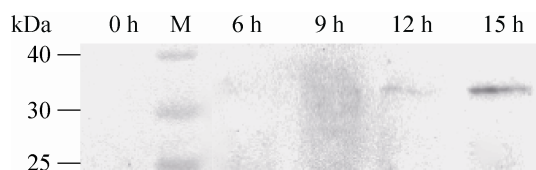


图6 Sjcaspase3 蛋白在 HeLa 细胞中表达检测

Fig. 6 Western blotting analysis of the expression of recombinant Sjcaspase3 protein in HeLa cells after transfection with pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 plasmid. 0 h was cells without transfection. 6 h, 9 h, 12 h and 15 h were cells collected after 6 hours, 9 hours, 12 hours and 15 hours post transfection with plasmid. Ab1 was anti-FLAG monoclonal antibody and Ab2 was HRP conjugated goat anti mouse antibody. M: protein marker.

## 2.5 rSjcaspase3 重组蛋白的纯化

利用 Anti-Flag 亲和凝胶对 HeLa 细胞表达的 rSjcaspase3 重组蛋白进行纯化并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 结果如图 7 所示。纯化结果为单一条带, 蛋白大小约 33 kDa, 符合预期。

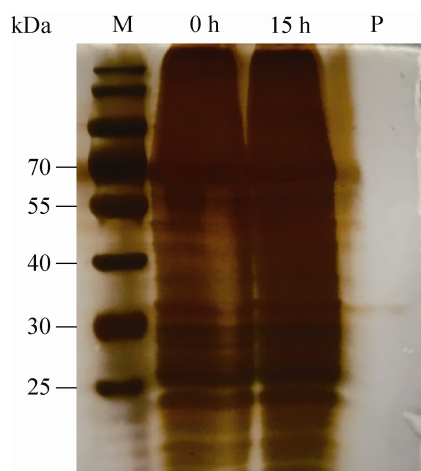


图7 rSjcaspase3 重组蛋白的纯化

Fig. 7 Purification of rSjcaspase3 recombination protein. SDS-PAGE analysis of purified rSjcaspase3 recombination protein in HeLa cells. M: protein marker. 0 h and 15 h means HeLa cell samples without and with transfection of pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 plasmid, respectively. P means final purified protein.

## 2.6 酶活检测

转染 HeLa 细胞 15 h 后分别提取细胞总蛋白并进行均一化处理。分别测定对照组、空质粒组和 Sjcaspase3 重组质粒组的 Caspase 酶活性结果 (图 8)。结果显示, 与对照组和空质粒组相比, Sjcaspase3 重组质粒组具有较高的荧光强度。体外 Caspase 酶活实验结果如图 9 所示, 结果与对照组相比, 纯化的 rSjcaspase3 重组蛋白组具有较强的荧光强度。

## 2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞流式结果如图 10 所示。对照组中有 99.1% 的细胞为正常细胞, 早期凋亡细胞占 0.5%, 晚期凋亡细胞占 0.4%; 空质粒组正常细胞占 91.7%, 早期凋亡细胞占 5.3%, 晚期凋亡细胞占 0.7%, 死亡细胞占 2.2%; Caspase3 组正常细胞占 79.8%, 早期凋亡细胞占 19.2%, 晚期凋亡细胞占 0.3%, 死亡细胞占 0.7%。

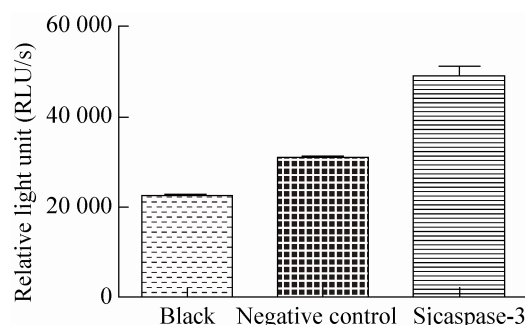


图8 转染 HeLa 细胞 15 h 后不同组别 Caspase 酶活检测

Fig. 8 Caspase3/7 activity of HeLa cell lysis after transfection 15 h of different group. Black control was black HeLa cells without treatment; Negative control group was transfected with pXJ40-FLAG plasmid; Sjcaspase3 group was transfected with pXJ40-FLAG-Sjcaspase3 recombinant plasmid. Cell lysis and substrate incubated at room temperature for 30 min and then measured with FB12 luminometer. The experiment was repeated three independent times and the data were showed by  $\bar{x} \pm s$ .



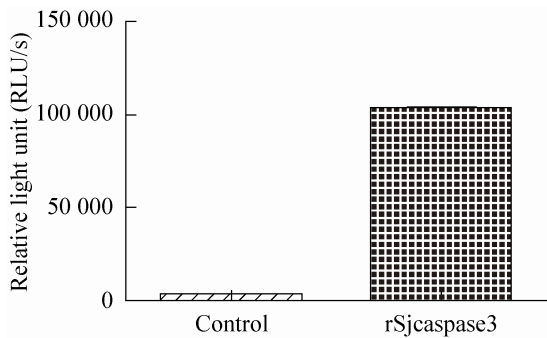


图 9 rSjcaspace3 重组蛋白体外 Caspase 酶活检测  
Fig. 9 Caspase3/7 activity of purified rSjcaspace3 recombination protein *in vitro*. Control group was purified normal cells without transfection; rSjcaspace3 group was purified rSjcaspace3 recombination protein. Samples and substrate incubated at room temperature for 30 min and then measured with FB12 luminometer. The experiment was repeated three independent times and the data were showed by  $\bar{x} \pm s$ .

3 讨论

日本血吸虫病是一种严重危害公共卫生安全的人畜共患寄生虫病，截至 2013 年底，全国推算有血吸虫病人 184 943 例<sup>[12]</sup>。血吸虫病的防治措

施是使用吡喹酮化疗为主，而长期大规模使用吡喹酮治疗引起了人们对耐药性的担心<sup>[13]</sup>。因此，迫切需要治疗血吸虫病新药物靶点的筛选，而血吸虫细胞凋亡分子就具有作为新药物靶点的潜力。本实验室前期在探讨东方田鼠对日本血吸虫感染的抗性机制时发现，细胞凋亡可能是东方田鼠清除日本血吸虫的机制之一<sup>[14]</sup>。Dubois 等利用凋亡诱导药物 Trichostatin A (TSA) 在体外对曼氏血吸虫进行处理，发现 TSA 可以提高曼氏血吸虫 Caspase3/7 的表达量，可见 Caspase3 在曼氏血吸虫细胞凋亡过程中发挥作用并具有作为药物靶标的潜力<sup>[15]</sup>。Hines-Kay 等研究表明 PZQ 对血吸虫的杀伤作用与细胞凋亡有关<sup>[16]</sup>，因此研究血吸虫细胞凋亡分子具有重要意义。

最早 H. Robert Horvitz 研究团队在 1993 年研究秀丽隐杆线虫时发现一个基因在凋亡细胞中表达特别丰富，命名为 CED3，Horvitz 发现此基因编码一种蛋白酶并与细胞凋亡有关<sup>[17]</sup>。随后，人们研究发现人类也存在与线虫 CED3 同源的

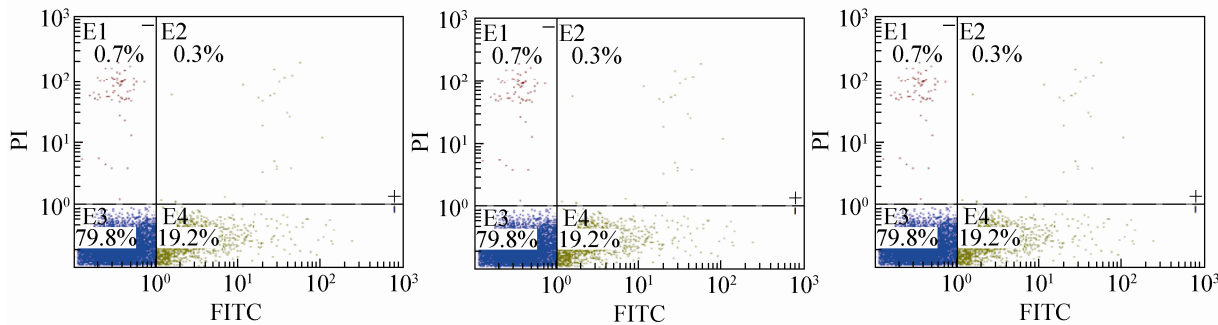


图 10 流式细胞术检测 Hela 细胞凋亡  
Fig. 10 Flow cytometry detection of apoptosis of Hela cells. Blank: normal cells without treatment; pXJ40-FLAG: cells transfected with pXJ40-FLAG plasmid; pXJ40-FLAG-Sjcaspace3: cells transfected with pXJ40-FLAG-Sjcaspace3 plasmid; E1: dead cells (FITC-PI+); E2: late apoptotic cells (FITC+PI+); E3: normal cells (FITC-PI-); E4: early apoptotic cells (FITC+PI-).

基因 CPP32<sup>[18]</sup>, 也证明此基因具有导致细胞凋亡的作用。后来人们陆续在人类基因中发现许多与线虫 CED3 同源的基因<sup>[19-21]</sup>。由于这些基因编码的蛋白质都具有半胱氨酸依赖性的天冬氨酸酶活性, 因此命名为半胱天冬酶 (Caspase)。Caspase 家族成员分为两类, 一类是起始者 (Initiators), 一类是执行者 (Executioners)。其中起始者负责凋亡信号的传递和放大, 主要成员有 Caspase8/9/10 等。而执行者的功能就像细胞的“刽子手”一样, 被激活后就会切割特异性底物, 导致细胞发生不可逆的凋亡, 主要成员有 Caspase3/6/7。本研究对日本血吸虫凋亡基因 *Sjcaspase3* 进行了克隆和真核表达, 并证明了其具有切割特异性底物 (DEVD) 和诱导 Hela 细胞发生细胞凋亡的作用。

荧光定量 PCR 结果表明 *Sjcaspase3* 在日本血吸虫生长发育的各个时期均有表达, 其中 21 d 虫体表达量最高。日本血吸虫雌雄虫一般在入侵后 14–16 d 开始合抱, 19–21 d 雌雄虫生殖器官及其相应的管道全部形成, 虫体处于配子发生期, 睾丸及卵巢开始有精子及卵子产生, 是虫体生长发育最快的阶段之一<sup>[22]</sup>。*Sjcaspase3* 在 21 d 呈现高表达可能与虫体的快速生长发育及性器官的发育成熟和产卵有关。42 d 雌虫比 42 d 雄虫表达量高且差异显著, 这可能与雌虫大量产卵相关。先前也有报道未成功合抱的曼氏血吸虫雌虫的卵巢会退化并发生细胞凋亡<sup>[23]</sup>, 这一结果提示 *Sjcaspase3* 基因可能对雌虫生殖器官发育和产卵具有重要作用。

pXJ40 是一种哺乳动物细胞表达载体, 经过多克隆位点前添加了一个 FLAG 标签 (DYKDDDDK) 的修饰后并不影响其连接和表达目的蛋白功能, 已有多位学者利用添加标签

修饰后的 pXJ40 载体表达出有功能的蛋白<sup>[24-26]</sup>。本实验构建了 pXJ40-FLAG-*Sjcaspase3* 重组质粒, 荧光定量 PCR 和 Western blotting 分析表明重组质粒成功转入 Hela 细胞, 并可在该细胞系中表达。

Caspase 家族蛋白具有切割特异性底物 (天冬氨酸残基后的肽键)。为了检测日本血吸虫的 *Sjcaspase3* 是否具有典型的 Caspase 家族特征。我们提取了含 *Sjcaspase3* 目的蛋白的细胞裂解液, 并加入了含天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸 (DEVD) 序列的蛋白底物和其他非底物酶。当特异性底物被切割后, 其他酶会继续发挥作用, 与切割后的底物发生作用并发出荧光, 并且荧光强度和 Caspase 酶活性成正比例相关。经检测, 与阴性对照组和空质粒对照组相比, *Sjcaspase3* 组 Caspase 酶活性明显增强。为进一步证明 *Sjcaspase3* 蛋白的 Caspase 酶活性, 我们对 Hela 细胞中的 r*Sjcaspase3* 重组蛋白进行了纯化, 并利用纯化后的 r*Sjcaspase3* 重组蛋白进行了体外 Caspase 酶活检测。结果表明 r*Sjcaspase3* 重组蛋白在体外也具有较高的 Caspase 酶活性。可见, 日本血吸虫的 *Sjcaspase3* 基因在 Hela 中成功表达且翻译出具有酶活的蛋白, 此蛋白具有 Caspase 家族其他蛋白切割特意底物的活性。

细胞凋亡具有一系列典型特征, 如细胞膜皱缩, 内陷、细胞核皱缩, 崩解、形成凋亡小体、保持膜完整性等, 通过检测这些特征性变化可以判断细胞是否发生了细胞凋亡。当细胞发生早期细胞凋亡时细胞膜上的磷脂酰丝氨酸会外翻, 它能与 Annexin V 特异性结合, 因此可以利用 FITC 标记的 Annexin V 检测到。当细胞处于细胞凋亡晚期时, 细胞膜依然保持完整但通透性会发生改变, 这时核染料 PI 就能进入细

胞核并与之结合。细胞坏死后细胞膜破裂,细胞可以被 PI 染色,但是却不能被 Annexin V-FITC 标记,以此判断细胞为坏死细胞。本研究通过细胞流式实验检测了 *Sjcaspase3* 诱导 Hela 细胞凋亡的作用。结果显示,对照组 99% 以上的细胞为正常细胞。空质粒组可能由于外源核酸的应激作用,诱导了 5.3% 和 0.7% 的细胞发生了早期凋亡与晚期凋亡,并且有 2.2% 的细胞发生坏死。但是空质粒组仍有 90% 以上的细胞为正常细胞。*Sjcaspase3* 组早期细胞凋亡率为 19.2%,明显高于对照组和空质粒组,但是晚期凋亡率却无明显差别。说明日本血吸虫的 *Sjcaspase3* 基因的表达可诱导 Hela 细胞发生早期细胞凋亡。

综上,本研究对日本血吸虫 *Sjcaspase3* 进行了初步的研究,为深入研究日本血吸虫细胞凋亡机制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Peng JB. Analysis of differentially expressed genes among the schistosomula of *Schistosoma japonicum* from different hosts [D]. Shanghai: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese).  
彭金彪. 不同宿主来源日本血吸虫童虫差异表达基因的研究 [D]. 上海: 中国农业科学院, 2010.
- [2] Han HX. Analysis on miRNA expression of host and schistosomulum among different suitable rodent animals under *Schistosoma japonicum* infection [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013 (in Chinese).  
韩宏晓. 日本血吸虫感染不同适宜性啮齿类动物后宿主及虫体 miRNA 表达分析 [D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [3] Guo XY. The preliminary observation of apoptosis in *Schistosoma japonicum* [D]. Shanghai: Chinese Academy of Agricultural Science, 2014 (in Chinese).  
郭小勇. 日本血吸虫细胞凋亡的初步观察 [D]. 上海: 中国农业科学院, 2014.
- [4] Zhou Y, Zheng HJ, Chen XY, et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*, 2009, 460(7253): 345–351.
- [5] Lee EF, Clarke OB, Evangelista M, et al. Discovery and molecular characterization of a Bcl-2-regulated cell death pathway in schistosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6999–7003.
- [6] Wang F. Cloning, expression and evaluation of *caspase9* of *Schistosoma japonicum* [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2011 (in Chinese).  
王飞. 日本血吸虫基因 *SjCaspase9* 的克隆、表达及免疫保护效果的初步评估 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [7] Dive C, Evans CA, Whetton AD. Induction of apoptosis-new targets for cancer chemotherapy. *Semin Cancer Biol*, 1992, 3(6): 417–427.
- [8] Ke W. Treatment of cancer using cell apoptosis theory. *Chin J Biotech*, 2004, 23(4): 589 (in Chinese).  
柯为. 利用细胞凋亡原理治疗癌症. *生物工程学报*, 2004, 23(4): 589.
- [9] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. *Oncogene*, 2012, 31(23): 2805–2808.
- [10] Lee EF, Young ND, Lim NTY, et al. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends Parasitol*, 2014, 30(2): 75–84.
- [11] Kumar S, Biswal DK, Tandon V. In-silico analysis of Caspase-3 and -7 proteases from blood-parasitic *Schistosoma* species (Trematoda) and their human host. *Bioinformation*, 2013, 9(9): 456–463.
- [12] Lei ZL, Zheng H, Zhang LJ, et al. Endemics status of schistosomiasis in People's Republic of China in 2013. *Chin J Schisto Control*, 2014, 26(6): 591–597 (in Chinese).  
雷正龙, 郑浩, 张利娟, 等. 2013 年全国血吸虫

- 病疫情通报. 中国血吸虫病防治杂志, 2014, 26(6): 591–597.
- [13] Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002, 96(5): 465–469.
- [14] Peng JB, Gobert GN, Hong Y, et al. Apoptosis governs the elimination of *Schistosoma japonicum* from the non-permissive host *Microtus fortis*. PLoS ONE, 2011, 6(6): e21109.
- [15] Dubois F, Caby S, Oger F, et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, 2009, 168(1): 7–15.
- [16] Hines-Kay J, Cupit PM, Sanchez MC, et al. Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel *in vitro*. Mol Biochem Parasitol, 2012, 186(2): 87–94.
- [17] Yuan JY, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. Cell, 1993, 75(4): 641–652.
- [18] Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. J Biol Chem, 1994, 269(49): 30761–30764.
- [19] Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Litwack G. Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 $\beta$  converting enzyme with different apoptotic activities. J Biol Chem, 1995, 270(9): 4312–4317.
- [20] Wang L, Miura M, Bergeron L, et al. Ich-1, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell, 1994, 78(5): 739–750.
- [21] Faucheu C, Diu A, Chan AW, et al. A novel human protease similar to the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. EMBO J, 1995, 14(9): 1914–1922.
- [22] Hu CR. Morphology, life history and biological characteristics of different stages of *Schistosoma japonicum*. Prac Rural Doctor, 1995, (1): 20–22(in Chinese).  
胡昌仁. 日本血吸虫的形态、生活史及各期生物学特性. 实用乡村医生杂志, 1995, (1): 20–22.
- [23] Galanti SE, Huang SC, Pearce EJ. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(2): e1509.
- [24] He HL. The regulation of *Stat3* on snail in *Esophageal Squamous* cell carcinoma and its role in EMT [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2011 (in Chinese).  
贺红柳. *Stat3* 对 Snail 的调控及在食管鳞癌上皮间质转化中的作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [25] Song JJ, Wang T, Xu XJ, et al. Construction and biological function of eukaryotic expression vector for myc-tagged HER2. Chin J Cell Mol Immunol, 2013, 29(6): 606–612 (in Chinese).  
宋金洁, 王涛, 徐小洁, 等. 带 myc 标签的人 HER2 基因真核表达载体的构建及其生物学功能. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(6): 606–612.
- [26] Zhang WS, Bian Q, Chi Y, et al. Construction and eukaryotic expression of NS1 protein of influenza A virus subtype H1N1. Mod Prev Med, 2011, 38(16): 3303–3308 (in Chinese).  
张文帅, 卞倩, 迟莹, 等. 甲型流感病毒 H1N1 亚型 NS1 蛋白真核表达载体的构建与表达. 现代预防医学, 2011, 38(16): 3303–3308.

(本文责编 郝丽芳)