

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000662

人肝再生增强因子真核表达及其对顺铂
诱导肝癌细胞凋亡的影响

郑 钰, 李小芳, 孙 航, 刘 杞

(重庆医科大学附属第二医院感染科、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室, 重庆 400010)

【摘要】目的:构建人肝再生增强因子(human augmenter of liver regeneration, hALR)15kD 亚型的真核表达系统,并探索 ALR 对顺铂(Cisplatin, DDP)诱导的人肝癌细胞株 QGY 凋亡的影响。**方法:**用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法和基因重组技术,从重组质粒 pPIC9K-rhALR 中扩增出编码 rhALR 基因片段,将其克隆入 pPICZαA 质粒中构建重组质粒 pPICZαA-rhALR。重组质粒 Sac I 酶切线性化后电转入酵母 GS115 中,并在 1% 的甲醇诱导下表达。表达上清蛋白经 Western blot(ALR 多克隆抗体和 His-tag 标签抗体)鉴定和镍柱亲和层析纯化。MTS 试剂检测 rhALR 体外对人肝癌细胞(HepG2、QGY)的促增殖活性,及流式细胞仪检测 rhALR 在顺铂诱导 QGY 细胞凋亡中的抗凋亡作用。**结果:**PCR、双酶切、DNA 测序均鉴定重组质粒构建与预期一致。分泌表达的 rhALR 约占上清总蛋白的 70%,目的分子量约 17 kD,Western blot 均可见单一条带。纯化后的 rhALR 对 HepG2 和 QGY 的体外促增殖作用呈浓度依赖性增强(HepG2 组: $F=246.729, P=0.000$; QGY 组: $F=246.004, P=0.000$),且在 QGY 细胞顺铂诱导凋亡时也发挥着浓度梯度式抗凋亡作用($F=101.061, P=0.000$)。**结论:**成功构建高效分泌表达 rhALR 的 pPICZαA-rhALR GS115 真核表达系统;体外实验证实 rhALR 对顺铂诱导人肝癌细胞有呈浓度依赖性的抗凋亡作用。

【关键词】肝再生增强因子;酵母表达;生物学活性;镍柱亲和层析

【中图分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿时间】2014-12-18

Eukaryotic expression of human augmenter of liver regeneration and its
effects on the apoptosis of QGY cells induced by cisplatin

Zheng Yu, Li Xiaofang, Sun Hang, Liu Qi

(Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Institute of Viral Hepatitis)

【Abstract】Objective: To construct pichia pastoris GS115 expression system of 15 kD recombinant human augmenter of liver regeneration(rhALR), and to explore its effects on human hepatoma cell line QGY treated with cisplatin(DDP). **Methods:** With polymerase chain reaction(PCR), and gene recombination techniques, cDNA of rhALR was obtained from recombinant plasmid pPIC9K-rhALR and inserted into plasmid pPICZαA. The recombinant plasmid pPICZαA-rhALR demonstrated by sequencing was linearized by digestion with Sac I, and transformed into GS115 with electroporation. The rhALR expression was secreted by GS115 under the induction of 10 mL/L methanol, and purified through Nickel column affinity chromatography after it was analyzed by Western blot(ALR polyclonal antibody and His-tag mouse monoclonal antibody). The effects of rhALR on *in vitro* proliferation of QGY and HepG2 cells, as well as its effects on reducing cellular proliferation inhibition rate induced by DDP, were evaluated by MTS reagent. The anti-apoptosis effects of rhALR on QGY cells apoptosis induced by DDP were detected by flow cytometry. **Results:** The recombinant plasmid pPICZαA-rhALR was identified by PCR, restriction enzyme reaction methods and direct sequencing respectively. RhALR as a secretory protein was successfully expressed by GS115; with molecular weight about 17 kD, it accounts for 70% of the total protein in the supernatant from pPICZαA-rhALR GS115. The results of Western blot all showed the specific single band. The high qualitative rhALR purified through Nickel column affinity chromatography could stimulate *in vitro* proliferation of human hepatoma cell lines (HepG2 and QGY) in a dose-dependent manner($F=246.729, P=0.000$; $F=246.004, P=0.000$), reduce cellular proliferation inhibition rate and play anti-apoptosis effect also in a dose-dependent manner when QGY cells treated with DDP($F=101.061$,

作者介绍: 郑 钰, Email: zyhone1988@126.com,

研究方向: 传染病学。

通信作者: 刘 杞, Email: liuqi8148@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30971334)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150617.2231.002.html>

(2015-06-17)

$P=0.000$). **Conclusion:** The rhALR as a secretory protein is expressed in GS115 efficiently and purified through Nickel column affinity chromatography successfully. The rhALR exerts anti-apoptosis effects on QGY cells treated with DDP in a dose-dependent manner *in vitro*.

[Key words] human augments of liver regeneration; yeast expression system; bioactivity; Nickel column affinity chromatography

肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR) 是 Hagiya 等人于 1994 年对肝脏刺激物质进一步纯化时得到的一种热稳定性蛋白质^[1]。其在肝脏、睾丸及肾脏中均有表达^[1-2], 研究证明 ALR 存在 3 种亚型, 分别是 15、21 kD 和 23 kD。其中 15 kD ALR 亚型主要存在于核内及胞质内, 也可分泌至胞外发挥作用^[3-4], 目前已知它具有促进肝细胞 DNA 合成、抗肝纤维化、抑制 CYP450 酶活性改变细胞代谢以及免疫学功能等^[5-6]。

为了进一步研究 15 kD ALR 亚型体外生物学功能, 就需要大量有生物学活性的 ALR 蛋白制品。本实验选用带 His-tag 标签的表达载体 pPICZ α A, 及酵母真核表达系统可对外源蛋白进行正确折叠和糖基化等修饰, 且可分泌表达, 构建 pPICZ α A-rhALR GS115 表达系统。以期得到大量的、高纯度的、有活性的 rhALR, 为后续实验奠定基础。

目前肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 的治疗主要有手术切除、动脉栓塞和化疗等方法。因其病程进展迅速, 病发时多已错过了手术和动脉栓塞的时机。肿瘤细胞的丢失主要有 3 种方式: 缺血坏死、凋亡及免疫清除。诱导肿瘤细胞凋亡是癌症化疗的一个主要目标^[8-9]。已有文献报道 15 kD ALR 有抗凋亡作用^[10], 那是否 ALR 在肝癌细胞株 QGY 化疗治疗时也发挥着作用呢? 本实验即研究 ALR 对顺铂诱导肝癌细胞株 QGY 凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与细胞 DH5 α 、pPICZ α A DH5 α 、pPIC9K-rhALR DH5 α 、GS115 以及人肝癌细胞株 HepG2、QGY 均为本实验室所保存的。

1.1.2 主要试剂 普通 PCR Mix 试剂购自天根, 核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Ladder、限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 及 *Sac* I 和 DNA 连接酶购自 Takara 公司, 博来霉素(Zeocin)购自 invitrogen 公司, Ni 琼脂糖凝胶购自康为世纪公司, 截留分子量为 7 kD 的透析袋购自 Solarbio 公司, ALR 多克隆抗体购自 SANTA 公司, His-tag 标签抗体购自 SAB(SignalWay

Antibody)公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 及山羊抗小鼠 IgG 购自联科生物公司, MTS 试剂购自 Promega 公司, AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于凯基生物科技公司, BCA 蛋白浓度测定试剂购自碧云天生物技术研究, 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 hALR 目的基因扩增及重组质粒构建 设计引物如 P1: 5'-TTACTCGAGAAAAGAATGCGGACGCAGCAGAAG-3'; P2: 5'-TATCTAGACCGTCACAGGAGCCATCCTTC-3' 画线部分为 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点。以测序验证的 pPIC9K-rhALR 为模板进行 PCR。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad ChemiDoc 成像仪上切胶后核酸凝胶回收试剂盒回收。回收的 rhALR cDNA 和空质粒 pPICZ α A 均进行 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 琼脂糖凝胶回收后进行连接。连接产物转入 CaCl₂ 处理法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态, 在含 25 μ g/ml Zeocin 的 LB 低盐(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 0.5% NaCl, 1.5%琼脂粉)平板上进行筛选。挑取数个单克隆菌, 提取质粒进行 PCR 和双酶切初步鉴定后, 送公司测序进一步检测。

1.2.2 重组质粒电转入酵母菌及重组酵母菌基因组分析 重组质粒 pPICZ α A-rhALR *Sac* I 单酶切线性化, 无水乙醇-醋酸沉淀法纯化后, 取 10~20 μ g 经 BIO-RAD Gene Pulser Xcell 在 25 μ F、200 Ω 、2 000 V、4.9 ms、2 mm 条件下, 电转入 GS115 感受态。均匀地涂抹菌液于含 100 μ g/ml Zeocin 的 YPD 平板(2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 2%葡萄糖, 1.5%琼脂粉)上, 30 °C 孵箱培养 2~3 d 筛选阳性转化子。以分别含 500、1 000、2 000 μ g/ml Zeocin 的 YPD 平板, 进一步筛选高拷贝菌。合成通用引物 5' AOX1, 3' AOX1 如 P3: 5'-GACTGGTTCCAA-TTGACAAGC-3'; P4: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。以重组酵母菌基因组为模板进行菌落 PCR。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 3 min 30 s, 33 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳, 在 BIO-RAD Gel Doc100 型凝胶成像仪上曝光。

1.2.3 rhALR 蛋白表达及诱导条件优化 挑取单克隆菌于 YPD 液中活化, 29 °C 恒温摇床中以 280 r/min 震荡培养 16~18 h。再接种于 BMGY(2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0, 1.34% YNB, 4 $\times$ 10⁵ 生物素, 1%甘油)中, 同条件培养 20~24 h, 至 A_{600 nm}=2~6。3 000 g 室温离心 5 min, 弃上清。用 BMMY(2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 100 mmol/L

磷酸钾缓冲液 pH5.0, 1.34% YNB, 4×10⁵ 生物素, 0.5%~1.5% 甲醇)重悬稀释菌体沉淀使 $A_{600\text{ nm}}=1.5\sim2.0$ (比较 $A_{600\text{ nm}}$ 值为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 时表达量, 以 1.5 和 2.0 时表达量较高), 28 ℃ 250 r/min 诱导表达。每 24 h 补加 100% 的甲醇使终浓度为 0.5%~1.0% 保持诱导, 共诱导 96 h。5 000 g 4 ℃ 离心收集表达上清, 12% SDS-PAGE 电泳分析。设置 BMMY 培养基 pH 值分别为 4.5、5.0、5.4、5.8、6.4、6.8、7.2 及 7.6, 比较不同 pH 值条件下表达量, 以 pH 值 5.0 和 5.4 处最高。另比较诱导 (6、12、24、36、48、72、96、102) h 目的蛋白表达量, 以 96 h 较高。

1.2.4 Western blot 鉴定 Western blot 主要步骤: 诱导表达的上清蛋白经 12% SDS-PAGE 胶分离电泳并转印到 PVDF 膜上, 含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 1 h, ALR 多克隆抗体和 His-tag 标签抗体 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次每次 10 min, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 及山羊抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 在 Bio-Rad ChemiDoc 成像仪上 ECL 化学发光液显色 2~3 min。

1.2.5 分泌上清的纯化 表达上清液经 30 μm 的膜过滤后, 按 Ni 琼脂糖凝胶说明书对分泌上清进行纯化。用截留分子量为 7 kD 的透析袋对洗脱液进行透析, 以去除咪唑。选择 PBS 透析缓冲液, 在磁力搅拌器的作用下置于 4 ℃ 冰箱进行透析, 共透析 2~3 d。纯化蛋白经 12% SDS-PAGE 胶电泳分离, 考马斯亮蓝染色 30 min 后脱色。BCA 试剂测定蛋白浓度。

1.2.6 rhALR 促增殖活性检测 将对数生长期的肝细胞株 HepG2 和 QGY, 按 3×10³ 个/ml 浓度每孔 200 μl 细胞悬液, 分别种于 96 孔细胞培养板中, 37 ℃、5% CO₂ 孵箱培养过夜。待细胞长到 30% 左右, 分别加入终浓度为 0.01、0.1、1、10、100 μg/ml 的 rhALR, 每浓度组设 3 复孔, 以未加 rhALR 作为空白对照。继续培养约 24 h, 待细胞铺满培养孔 80%~90% 时, 以每 100 μl 培养基中加入 20 μl MTS 液的终浓度对细胞进行处理, 置于孵箱中孵育 1~4 h。每隔 30 min 在 Spectra Max M2 多功能酶标仪上 490 nm 波长处测吸光度。

1.2.7 rhALR 对顺铂(DDP)抑制 QGY 细胞增殖的影响 取对数生长期 QGY 细胞分组为 QGY(DDP-, ALR-), QGY+DDP (10 μg/ml)+ALR(0、5、10、20 μg/ml)。按 1.2.6 实验方法种 96 孔板, 待细胞贴壁融合至 80%~90% 时, 分别加入 DDP 和不同浓度的 rhALR, 孵育 24 h 后, MTS 液检测细胞的增殖。

1.2.8 流式细胞仪(FCM)检测 rhALR 对 QGY 和 DDP 诱导的 QGY 凋亡的影响 取对数生长期 QGY 细胞分组为 QGY+ALR(0、5、10、20 μg/ml), QGY+DDP(10 μg/ml)+ALR(0、5、10、20 μg/ml), 按细胞浓度为 3.0×10⁵ 个/ml, 每孔 2 ml 细胞悬液种 6 孔板, 待细胞贴壁融合至 80%~90% 时, 分别加入 DDP, 不同浓度的 rhALR, 孵育 24 h 后。按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测说明书对细胞进行处理, 在 FCM 上检测各组细胞凋亡率。

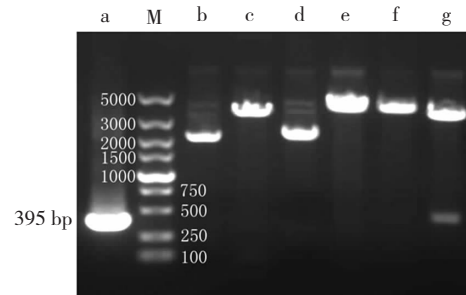
1.3 统计学处理

所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析, 其两两比较采用 LSD-*t* 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒 PCR 和酶切结果鉴定

重组质粒 pPICZαA-rhALR 引物 P1 和 P2 PCR 扩增出来的产物, 琼脂糖凝胶电泳分析, 见扩增的目的条带大小为 395 bp, 与预期大小一致; 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 分别单酶切及双酶切, 也得到与预期一致的条带。且送测序 100% 匹配, 无突变错配现象, 重组质粒构建成功。见图 1。



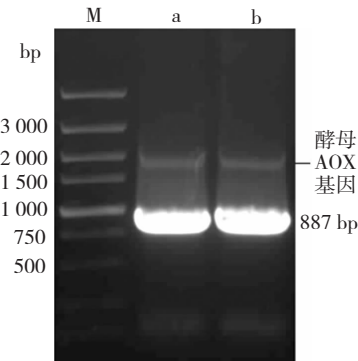
注: a. 重组质粒 pPICZαA-rhALR PCR 产物; M. DNA 标准(DL5000); b. 空质粒 pPICZαA; c. 空质粒 pPICZαA 双酶切产物; d. 重组质粒 pPICZαA-rhALR; e. 重组质粒 pPICZαA-rhALR *Xba* I 单酶切产物; f. 重组质粒 pPICZαA-rhALR *Xho* I 单酶切产物; g. 重组质粒 pPICZαA-rhALR 双酶切产物

图 1 重组质粒 pPICZαA-rhALR PCR 和酶切鉴定

Fig.1 Recombinant plasmid pPICZαA-rhALR identified by PCR and restriction enzyme digestion

2.2 PCR 鉴定阳性转化子及 Mut⁺型和 Mut⁻型

阳性转化子引物 P3 和 P4 PCR 扩增出来的产物, 琼脂糖凝胶电泳分析, 共扩增出 2 条带。一条为酵母 AOX1 基因组大约 2.2 kb 条带; 另一条带为目的基因的 887 bp (pPICZαA 质粒 AOX 588 bp+rhALR 基因片段 377 bp-两个酶切位点间重复序列 78 bp) 条带。确实目的基因已成功转入酵母菌, 且阳性菌为 Mut⁺型, 即甲醇利用正常型。见图 2。



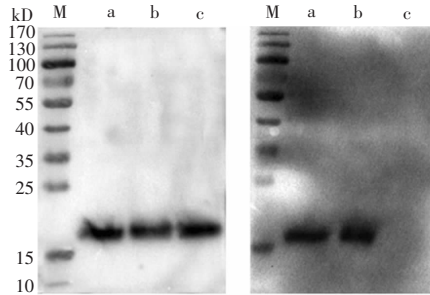
注: M. DNA 标准(DL5000); a、b. 阳性转化酵母菌菌落 PCR 产物

图 2 菌落 PCR 鉴定阳性转化子及 Mut⁺型和 Mut⁻型

Fig.2 Positive transformants and Mut⁺ and Mut⁻ phenotype of positive transformants identified by colony PCR

2.3 表达产物的鉴定

Western blot 结果显示,ALR 多克隆抗体和 His-tag 标签抗体孵育下,均可见分子量约 17 kD(His 标签分子量约 2.5 kD)单一条带。证实 rhALR 酵母菌中成功地分泌表达,且 His-tag 标签蛋白也被表达。见图 3。



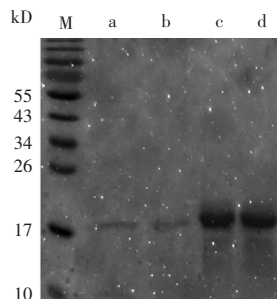
注:图 A,His-tag 标签抗体 WB 图:M. 蛋白 Marker;a、b、c. 重组目的质粒菌诱导表达的上清蛋白。图 B,ALR 多克隆抗体 WB 图:M. 蛋白 Marker;a、b. 重组目的质粒菌诱导表达的上清蛋白;c. 重组空质粒菌诱导表达上清蛋白

图 3 Western blot 检测目的蛋白的表达

Fig.3 hALR protein expression in pichia pastoris detected by Western blot

2.4 上清蛋白的表达及其纯化效果鉴定

PAGE 胶考马斯亮蓝脱色处理后,可见单一的、较未纯化上清蛋白浓缩的分子量约为 17 kD 的目的蛋白条带,纯度大于 95%,见图 4。此方法可有效地对目的蛋白进行纯化浓缩。BCA 试剂测纯化 rhALR 浓度约为(800~1 600) $\mu\text{g/ml}$ 。



注:M. 蛋白 Marker;a、b. 阳性菌诱导表达上清蛋白样品;c、d. 镍柱纯化后的蛋白样品

图 4 SDS-PAGE 电泳分析 rhALR 的表达与纯化

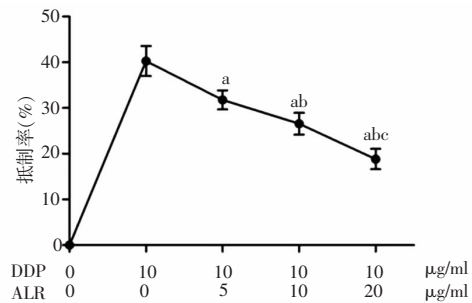
Fig.4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of rhALR

2.5 rhALR 蛋白活性鉴定

结果可见 rhALR 在 ng 水平已能明显刺激细胞增殖,在 μg 水平促增殖作用更强,存在剂量依从关系(HepG2: $F=246.729, P=0.000$; QGY: $F=246.004, P=0.000$),见表 1。

2.6 rhALR 对 DDP 抑制 QGY 细胞增殖的影响

加入 DDP 处理后,QGY 增殖活性明显低于正常组。根据公式:细胞抑制率(%)=(1-A_{实验组}/A_{正常组}) $\times 100\%$,吸光度(absorbance, A)值即 OD490,计算实验组细胞 DDP 的抑制率分别为(40.27 $\pm 3.30\%$)、(31.76 $\pm 2.08\%$)、(26.56 $\pm 2.36\%$)、(18.82 $\pm 2.23\%$)。加入 rhALR 后,DDP 的抑制率明显减弱,且其减弱同样呈剂量依赖性($F=37.841, P=0.000$; $P_{(10,0),(10,5)}=0.003, P_{(10,5),(10,10)}=0.036, P_{(10,10),(10,20)}=0.006$),见图 5。



注:a. 与 DDP ALR(10、0)组比较, $P=0.003$;b. 与 DDP ALR(10、5)组比较, $P=0.036$;c. 与 DDP ALR(10、10)组比较, $P=0.006$

图 5 rhALR 对 DDP 处理的 QGY 细胞增殖抑制的影响

Fig.5 The protective effect of rhALR on QGY cells proliferation inhibition induced by DDP

2.7 rhALR 对 QGY 细胞及 DDP 处理的 QGY 细胞凋亡作用

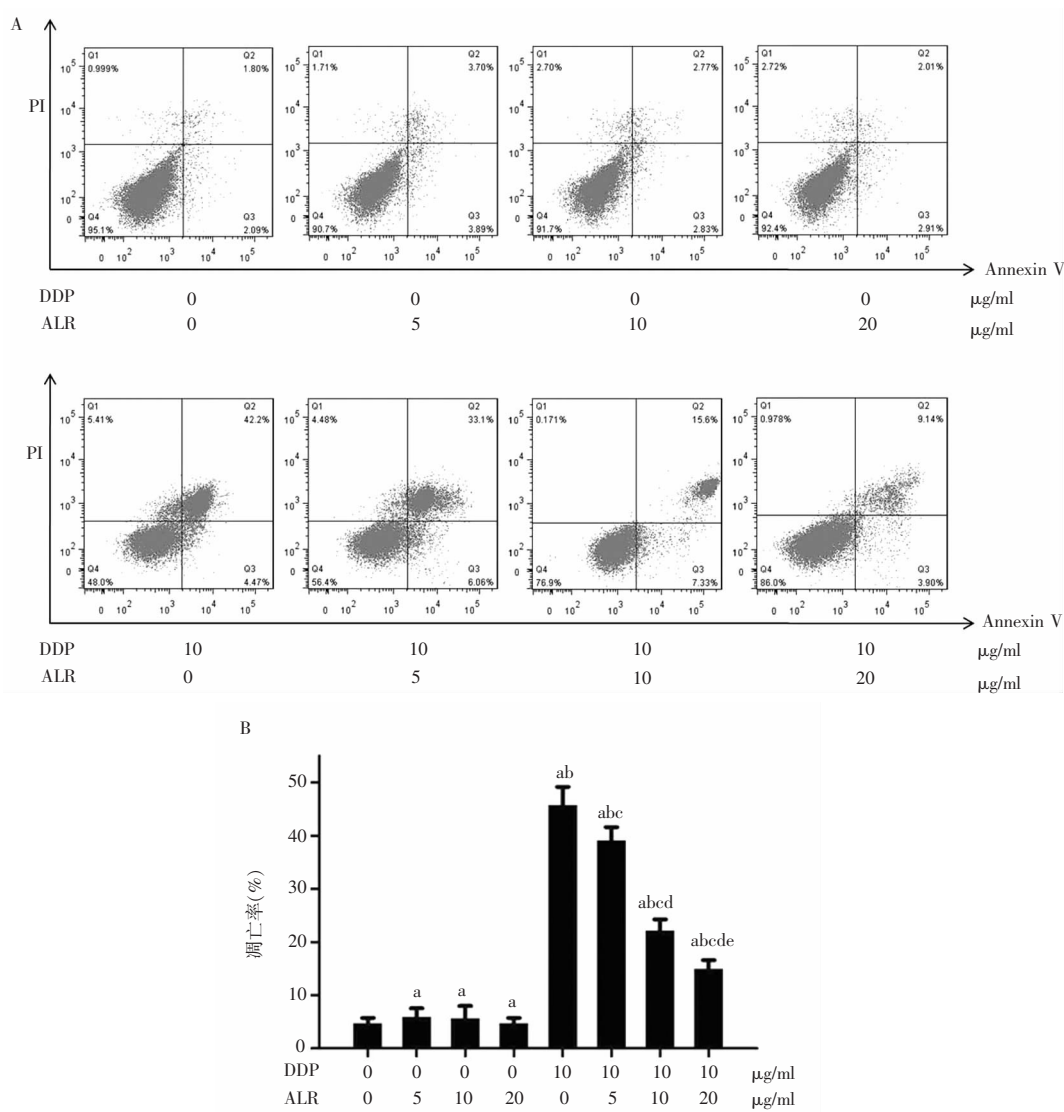
QGY 细胞单独 rhALR(0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理组凋亡率分别为(4.81 $\pm 0.94\%$)、(5.95 $\pm 1.57\%$)、(5.65 $\pm 2.33\%$)、(4.74 $\pm 0.99\%$),ALR 各浓度组间比较差异无统计学意义($F=0.452, P=0.723$),可见 ALR 对未受损肝癌细胞并无保护作用;而 DDP(10 $\mu\text{g/ml}$)+ALR(0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理组凋亡率分别为(45.81 $\pm 3.36\%$)、(39.15 $\pm 2.45\%$)、(22.18 $\pm 2.10\%$)、(14.95 $\pm 1.68\%$),DDP 处理时 ALR 各浓度组间差异有统计学意义($F=101.061, P=0.000$),且 ALR 抗凋亡作用也呈现浓度梯度式($P_{(10,0),(10,5)}=0.011, P_{(10,5),(10,10)}=0.000, P_{(10,10),(10,20)}=0.007, P_{(10,20),(0,0)}=0.002$),见图 6。

表 1 不同剂量的 rhALR 对 HepG2 和 QGY 细胞株体外增殖的影响($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

Tab.1 Effects of different dosages of rhALR on HepG2 and QGY proliferation *in vitro* ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

细胞株	0	0.01	0.1	1	10	100	F 值	P 值
HepG2	0.331 0 ± 0.032 8	0.418 0 ± 0.026 3 ^a	0.564 0 ± 0.013 9 ^c	0.660 0 ± 0.036 4 ^c	0.793 0 ± 0.015 0 ^c	0.918 0 ± 0.009 9 ^c	246.729	0.000
QGY	0.259 0 ± 0.017 7	0.326 0 ± 0.017 8 ^b	0.477 0 ± 0.024 0 ^c	0.575 0 ± 0.010 0 ^c	0.661 0 ± 0.038 4 ^c	0.786 0 ± 0.012 7 ^c	246.004	0.000

注:加入不同浓度 rhALR 各组与空白对照相比,a. $P=0.001$;b. $P=0.003$;c. $P=0.000$



注:图 A. 凋亡细胞散点图,图 B. 凋亡细胞柱状图;a.与空白组比较, $P>0.05$;b.与 DDP ALR(10,5)组比较, $P=0.011$;c.与 DDP ALR(10,10)组比较, $P=0.000$;d.与 DDP ALR(10,20)组比较, $P=0.007$;e.与空白组比较, $P=0.002$

图 6 rhALR 对 DDP 诱导 QGY 细胞凋亡的抑制作用

Fig.6 rhALR decreases apoptotic levels of QGY cells treated with DDP

3 讨论

毕赤酵母真核表达系统与其他表达系统相比,具有重组载体转化操作方便、遗传稳定、培养成本低、适合高密度发酵、蛋白表达量高及分泌表达和翻译后修饰的能力等优点^[7],因此在许多生物学研究中被广泛应用。本实验通过基因重组技术,不断地优化条件,如诱导表达 pH 值、时间和初始 OD 值等^[11-12],成功构建了高分泌 hALR 的 pPICZαA-rhALR

GS115 表达系统。然后因 pPICZαA 载体带 His-tag,而镍柱纯化系统对 6×His-tag 蛋白具有显著特异吸附能力,能够高效一步纯化带有 6 个组氨酸亲和标签的蛋白。本实验用镍柱亲和层析的方法对分泌上清进行纯化^[13],获得纯度达 95%以上的 rhALR。MTS 试剂测得 rhALR 体外对人肝癌细胞株 (HepG2、QGY) 有明显的促增殖活性^[14]。本实验成功地表达出大量高纯度的有生物学活性的 hALR,为进一步研究其功能奠定了基础。

HCC 是临床上高发恶性肿瘤之一,我国是乙肝

大国,乙肝相关性肝癌发病率相当的高。由于肝癌起病隐匿,发展迅速,侵袭性高,缺乏特异性症状和体征,所以就诊时,多已属于晚期,失去手术治疗最佳时机。再者患者即使接受了肿瘤根治术,术后 5 年的存活率为 70%^[15],复发率仍高达 (50~80)%^[16],故临床上常接合化疗治疗晚期病人及复发病。通过本实验我们发现,化疗药物顺铂可以显著抑制肝癌细胞株 QGY 的增殖,可外源性加入 rhALR 后,其抑制率明显减低^[14],并且呈剂量依赖性。而且流式细胞仪检测的凋亡率显示, rhALR 在正常的 QGY 细胞中未见保护作用,但在顺铂处理的 QGY 细胞中有显著的抗凋亡作用,也呈浓度梯度式。既然 ALR 对肝癌细胞有促增殖作用,在化疗药物 DDP 处理时有抗凋亡作用,那是否靶向作用于 ALR 的药物,使其表达下调或沉默,可以有效地辅助肝癌的治疗呢? 但 ALR 在正常肝细胞 DDP 处理时发挥着何种作用,另具体 ALR 参与抗凋亡作用的机制,及顺铂处理时细胞内 ALR 表达量是否有变化及其作用还有待进一步深入研究。希望 ALR 在肝癌的化疗中可能会提供新的治疗突破。

参 考 文 献

- [1] Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, et al. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors[J]. *Hepatology*, 1994, 20(3): 747-757.
- [2] Senkevich TG, White CL, Koonin EV, et al. A viral member of the ERV1/ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(22): 12068-12073.
- [3] Pawlowski R, Jura J. ALR and liver regeneration[J]. *Molecular Cellular Biochemistry*, 2006, 288(1-2): 159-169.
- [4] Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(31): 4951-4958.
- [5] Thasler WE, Dayoub R, Muhlbauer M, et al. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 822-829.
- [6] Daithankar VN, Farrell SR, Thorpe C. Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(22): 4828-4837.
- [7] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31-39.
- [8] Agostini M, Tucci P, Melino G. Cell death pathology: perspective for human diseases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(3): 451-455.
- [9] Zhou Z, Lu X, Zhu P, et al. VCC-1 over-expression inhibits cisplatin-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2): 336-342.
- [10] Shen Y, Liu Q, Sun H, et al. Protective effect of augmenter of liver regeneration on vincristine-induced cell death in Jurkat T leukemia cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2): 162-167.
- [11] Fang Z, Xu L, Pan D, et al. Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(10): 1541-1551.
- [12] Wang L, Bai J, Luo J, et al. Molecular cloning and expression of grass carp MyoD in yeast *Pichia pastoris*[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(1): 22-28.
- [13] Lee PY, Yong VC, Rosli R, et al. Cloning, expression and purification of squalene synthase from *Candida tropicalis* in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2014(94): 15-21.
- [14] Li J, Hou Y, Ding X, et al. Overexpression, purification, molecular characterization and the effect on tumor growth of ribosomal protein L22 from the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 3529-3539.
- [15] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [16] Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2002, 35(3): 519-524.

(责任编辑: 冉明会)