

# 人肝再生增强因子基因序列的优化、重组表达及功能研究

黄应峰<sup>1,2</sup>, 周飞国<sup>3</sup>, 高春芳<sup>1\*</sup>, 王皓<sup>4</sup>, 高致远<sup>1</sup>, 王坤<sup>1</sup>, 陈捷<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438; 2. 上海友恒生物科技有限公司, 上海 201413; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外一科, 上海 200438; 4. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**体外重组表达人肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)并进行功能研究。**方法:**全基因合成 ALR 序列并插入原核表达载体 pET28a+, 转化入 BL21 菌内进行诱导表达, 表达产物经过纯化后利用 MTT 法观察表达产物对人肝细胞的刺激增殖活性; 利用小鼠急性四氯化碳损伤模型观察表达产物的肝功能保护作用。**结果:**酶切鉴定及测序结果提示表达产物正确; 纯化后表达产物具有明确的促进肝细胞增殖作用, 并在中、低剂量具有降低小鼠急性化学性损伤后转氨酶水平的作用。**结论:**重组表达的 ALR 结构正确, 具有促进肝细胞再生的作用。

**[关键词]** 肝再生增强因子; DNA, 重组; 肝细胞; 细胞增殖; 转氨酶类

**[中图分类号]** R 333.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1284-04

## Genetic optimization, recombinant expression and functional study of human augmenter of liver regeneration

HUANG Ying-feng<sup>1,2</sup>, ZHOU Fei-guo<sup>3</sup>, GAO Chun-fang<sup>1\*</sup>, WANG Hao<sup>4</sup>, GAO Zhi-yuan<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup> (1. Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Shanghai You-Heng Biotech Inc., Shanghai 201413; 3. Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438; 4. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct recombinant expression vector of human augmenter of liver regeneration (ALR) and study its protective effect on liver function. **Methods:** ALR cDNA was synthesized and inserted into expression vector pET28a+. The recombinant plasmid was transformed into BL21 and the expression of ALR was induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG). MTT method was used for cell proliferation assay; the protective effect of recombinant product on liver function was observed in CCl<sub>4</sub>-induced acute toxic mouse model. **Results:** Recombinant expression plasmid of ALR was confirmed correct by restriction enzyme digestion and sequencing. The purified expression product had strong stimulatory effect on hepatocyte proliferation. Low and medium dosages of expression product decreased aminotransferase level in acute chemical injury mouse model. **Conclusion:** The recombinant expression vector of ALR has been correctly constructed and the expressed rALR can simulate hepatocyte regeneration.

**[KEY WORDS]** augmenter of liver regeneration; DNA, recombinant; hepatocytes; cell proliferation; transaminases

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1284-1287]

与其他器官相比, 肝脏具有较强的再生能力, 但对于肝脏再生的机制研究还处于初级阶段。近年来, 越来越多参与肝脏再生过程的分子被发现和表达, 其中肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)由于在肝脏再生和病变过程中的潜在作用而备受关注。Giorda 等<sup>[1]</sup>首先克隆出人 ALR 基因序列, 它由 1 813 个核苷酸组成, 定位于染色体的 16p13.3 位点上, 包括 3 个外显子和 2 个内含子。进一步的研究表明, 人 ALR 在肝脏细胞中存在 125 aa(Mr=15 000)和 205 aa(Mr=23 000)两种形式, 前者与后者相比 N 末端缺少 80 个氨基酸, 并且 ALR (15 000)主要存在于细胞核中; ALR (23 000)主要存在于细胞质中, 定位于细胞线粒体内外膜间腔。Hagiya 等<sup>[2]</sup>在成功克隆出大鼠 ALR 后, 运用 North-

ern 杂交技术获得的结果显示 ALR 分布于多种组织器官, 无组织特异性, 但与正常肝脏相比, 部分肝切除及损伤期肝组织 ALR mRNA 的表达显著增强, 间接说明了 ALR 在肝脏再生的过程中发挥了重要的作用。国内谢玲等<sup>[3]</sup>在大鼠动物模型中发现, ALR (23 000)可以治疗四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的急性肝功能衰竭, 重组 ALR 能够显著提高中毒大鼠的存活率。提示重组 ALR 可能应用于临床治疗严重肝病。

为了进一步研究人 ALR(15 000)的生物学活性

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30571774). Supported by National Natural Science Foundation of China (30571774).

**[作者简介]** 黄应峰, 硕士.

\* Corresponding author. E-mail: gaocf1115@yahoo.com

并使 ALR 在大肠杆菌中得到高效表达, 在本研究中, 我们根据大肠杆菌的最适密码子, 合成适合大肠杆菌表达的 ALR(15 000) 基因序列, 并尝试对重组 ALR 体外和体内的生物学活性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 质粒和菌株: pET28a+ 质粒和 BL21 表达菌株购自 Novagen 公司; *EcoR* I、*Xho* I 内切酶、 $T_4$  DNA 连接酶、*Taq* 酶、dNTPs 和 RT-PCR 反应试剂盒等均为 Promega 公司产品; DNA 标记物、DNA 回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、IPTG 等为 TaKaRa 公司产品。

1.2 ALR 序列设计 为了利于 ALR 在大肠杆菌中的表达, 根据大肠杆菌的最适密码子(<http://molbio.info.nih.gov/molbio/>), 合成适合大肠杆菌表达的 ALR 基因序列(上海生工生物工程技术有限公司), 具体序列已经申请专利(200710107839)。

1.3 ALR 表达载体的构建及鉴定 (1) ALR 基因扩增用上、下游引物分别加入 *EcoR*I 和 *Xho*I 切点, 同时上游引物还引入肠激酶(EK)作用切点。引物序列如下: 上游引物, TTG GAA TTC GAC GAC GAC GAC AAG ATG CGT ACC CAG CAG AAA; 下游引物, TTG CTC GAG TTA GTC GCA AGA ACC GTC。(2) PCR 反应体系(50  $\mu$ l): 34  $\mu$ l 无菌  $H_2O$ , 10 $\times$  缓冲液 5  $\mu$ l, 25 mmol/L  $Mg_2SO_4$  2  $\mu$ l, 2 mmol/L dNTP 5  $\mu$ l, 50  $\mu$ mol/L 上游引物 1  $\mu$ l, 50  $\mu$ mol/L 下游引物 1  $\mu$ l, 10 ng 模板 DNA 1  $\mu$ l, Extaq 1  $\mu$ l。(3) PCR 条件: 94 $^\circ$ C 5 min $\rightarrow$ 94 $^\circ$ C 30 s $\rightarrow$ 50 $^\circ$ C 30 s $\rightarrow$ 68 $^\circ$ C 30 s $\rightarrow$ 68 $^\circ$ C 2 min, 共 25 个循环。(4) 重组体构建及鉴定: *EcoR*I 和 *Xho*I 双切 PCR 产物和 pET28a 载体, DNA 片段用  $T_4$  连接酶链接后转化 DH5 $\alpha$  细胞, 挑取单克隆抽提质粒, 酶切鉴定得到的阳性克隆测序验证, 克隆有 ALR 正确序列的质粒转化到表达菌株 BL21(DE3) 中, 得到 ALR 的表达菌株。

1.4 ALR 蛋白表达 挑取 ALR 表达菌株接种到 LB 培养基, 37 $^\circ$ C 振荡培养 6 h 后, 用 1 mmol/L IPTG 诱导, 37 $^\circ$ C 继续培养 4 h, 诱导前后各取菌液 50  $\mu$ l 行 12% SDS-PAGE。

1.5 ALR 蛋白纯化 (1) 用 Tris-HCl 裂解液重悬菌体, 冰上超声破碎。低温下高速离心 20 min, 收集上清与沉淀。(2) 沉淀用含 2 mol/L 尿素的裂解液彻底洗涤, 低温下高速离心 10 min, 弃上清, 用含有 8 mol/L 尿素的裂解液彻底溶解, 低温高速离心弃去沉淀。(3) 包涵体裂解液用 Ni-Sepharose FF 柱

纯化, 同时采用尿素浓度梯度复性缓冲液缓慢过柱洗涤, 用含咪唑的洗脱液洗脱。(4) 用 Sephadex G-25 柱脱去洗脱液中咪唑及盐离子并用重组肠激酶(rEK) 消化。(5) 用 Ni-Sepharose FF 柱将切下的含 His 融合蛋白的片段分离。(6) 将流出液中样品过 1 ml Q Sepharose FF 柱纯化, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡, NaCl 梯度洗脱, 收集不同的洗脱管。

1.6 ALR 蛋白体外活性鉴定 取生长状态良好的人肝细胞株 L-02 (购自中国科学院细胞库), 按  $1 \times 10^5$ /ml、100  $\mu$ l/孔的量接种于细胞培养板, 在 37 $^\circ$ C、5%  $CO_2$  的条件下培养 24 h, 然后换含 0.2% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 12 h。吸弃培养液, 分别加入以上表达纯化后的 ALR(用 RPMI 1640 培养液稀释成 0.16、0.31、0.625、1.25、2.5、5、10、20  $\mu$ g/ml), 加入量为 100  $\mu$ l/孔, 同时设置空白对照孔。每个药物浓度及对照孔设置四复孔, 培养 24 h 后加入 10  $\mu$ l/孔的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 吸弃培养上清液, 加入 100  $\mu$ l/孔的 DMSO, 培养板振荡 15 min 后, 在 550 nm 波长下测定各孔的光密度值(D)。

1.7 ALR 对肝损伤保护作用的动物实验 取体质量、年龄相仿的昆明种小鼠(购自第二军医大学实验动物中心) 24 只, 随机分为 6 组, 每组 4 只, 分别为: (1) 生理盐水组, 应用  $CCl_4$  造成小鼠的急性肝损伤, 在治疗时给予生理盐水; (2) 促肝细胞生长素组,  $CCl_4$  造模后, 在治疗时给予促肝素(商品名威佳, 威海赛洛金药业有限公司产品), 剂量为 20  $\mu$ g/kg, 作为阳性治疗组; (3)~(5) ALR 高剂量、中剂量、低剂量组,  $CCl_4$  造模后, 给予 ALR 的量分别为 2 mg/kg、200  $\mu$ g/kg 和 40  $\mu$ g/kg; (6) ALR 正常对照组: 不造模, 但选用最高治疗剂量的 ALR(2 mg/kg)。具体实验过程如下: 除 NC 组外, 其他各组小鼠经腹腔注射含体积分数为 10%  $CCl_4$  的橄榄油, 给药剂量为 10 ml/kg(NC 组注射等体积生理盐水)。4 h 后, 对以上 6 组小鼠进行相应治疗, 经腹腔注射, 共给药 4 次, 每次给药体积均为 200  $\mu$ l, 每 12 h 给药 1 次。最后 1 次给药 8 h 后, 经小鼠眶静脉取血, 分离血清后使用全自动生化仪检测丙氨酸转氨酶(ALT) 和天冬氨酸转氨酶(AST) 水平。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件对研究数据进行统计分析。各指标用  $\bar{x} \pm s$  表示。两样本均数作 *t* 检验。  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 ALR 表达载体目的片段的鉴定 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约 400 bp 片段, 符合

ALR 目的基因的大小(图 1)。重组体构建完成后酶切鉴定提示插入片段正确(图略)。

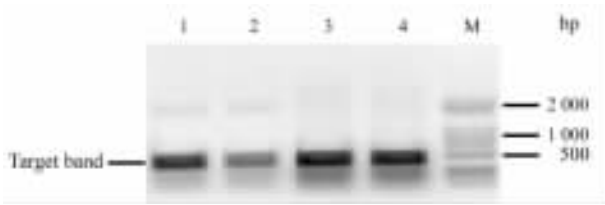


图 1 ALR 基因扩增产物

Fig 1 PCR product of ALR gene

1-4: PCR products; M: Marker

2.2 ALR 蛋白的表达和纯化 挑取 ALR 表达菌株经 IPTG 诱导后,37℃继续培养 4 h,诱导前后各取菌液 50 μl 行 12% SDS-PAGE,结果见图 2。ALR 蛋白经过柱原位复性,流经镍柱富集纯化后,得到的蛋白用 rEK 消化过夜后,再次用镍柱去除 ALR 蛋白融合序列,单独的 ALR 存在于流出液中。经过以上步骤的纯化,得到的纯化蛋白电泳结果见图 3。

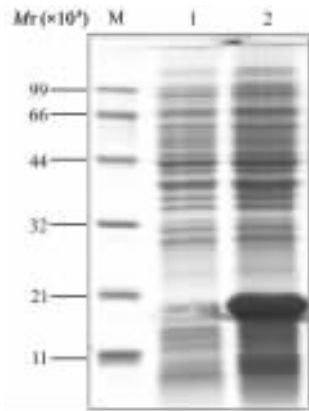


图 2 ALR 蛋白的表达结果

Fig 2 Expression of ALR protein

M: Marker; 1: Before induction; 2: After induction

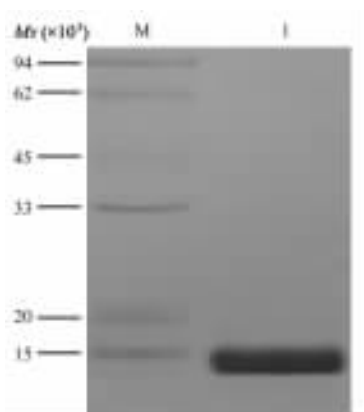


图 3 ALR 蛋白的纯化结果

Fig 3 Purification of ALR protein

M: Marker; 1: Purified ALR protein

2.3 ALR 蛋白体外活性鉴定 不同浓度的 ALR 刺激细胞后,用 MTT 法测定 L-02 细胞的增殖,测定结果参见图 4。与空白对照相比,我们得到的 ALR 在体外具有显著的刺激肝细胞增殖的作用,并且其体外刺激效应在一定范围内与剂量呈正相关关系。

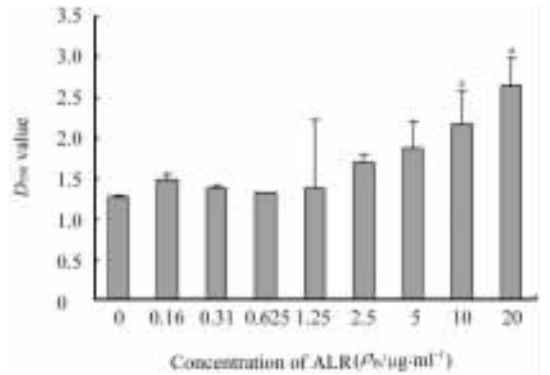


图 4 不同 ALR 浓度刺激下的 L-02 肝细胞增殖实验

Fig 4 Proliferation of L-02 cells induced by ALR of different concentrations

\*  $P < 0.05$  vs control (0 μg/ml ALR) group;  $\bar{x} \pm s, n = 4$

2.4 ALR 对肝损伤保护作用的动物实验 用不同剂量的 ALR 对急性肝损伤的小鼠进行治疗后,各组 ALT 和 AST 水平如表 2 所示。与阴性治疗组相比,ALR 在中或低剂量(200、40 μg/kg)时可显著降低两种转氨酶 ALT、AST 在血清中的含量,而且观察到的肝组织损伤程度较轻(病理图片未列出),提示 ALR 对小鼠化学性肝细胞损伤具有保护作用。表 1 中结果还提示 ALR 的效果优于促肝素。

表 1 各组小鼠急性肝损伤经治疗后转氨酶的水平

Tab 1 Aminotransferase levels in mice with acute liver injury after treatment in each group

( $\bar{x} \pm s, z_B / U \cdot L^{-1}$ )

Group	n	ALT	AST
Normal saline	4	442 ± 108	824 ± 91
2 mg/kg ALR	3	845 ± 740 **	1 360 ± 277
200 μg/kg ALR	4	285 ± 39 *	719 ± 258
40 μg/kg ALR	4	215 ± 62 **	478 ± 246 *
PHGF	4	408 ± 116	761 ± 229
Normal control	4	19 ± 6	31 ± 40

PHGF: Prohepatocyte growth factor. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal saline group

### 3 讨论

本实验利用优化的人 ALR 基因序列,成功实现

了 ALR 的高表达, 重组人 ALR 蛋白占大肠杆菌菌体蛋白的 20% 左右。经过复性、纯化、消化后的 ALR 不带有任何标签, 去除了冗余蛋白潜在的影响。

纯化的 ALR 蛋白在体外具有显著的刺激肝脏来源的细胞增殖的作用, 并且在体外刺激效应在一定范围内与剂量呈正相关关系。ALR 在中、低剂量 (200、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 使用时可显著抑制由  $\text{CCl}_4$  造成的小鼠急性肝损伤, 对小鼠化学性肝细胞损伤具有保护作用, 显著降低两种转氨酶 ALT、AST 在血清中的含量。动物实验表明, 尽管高剂量的 ALR 对正常肝组织没有损伤作用, 但是对损伤的肝细胞, 高剂量的 ALR (2 mg/kg) 不仅没有保护作用, 相反具有一定的协同损伤作用 (有病理组织学支持, 文中未列出)。造模 + ALR 高剂量组与阴性治疗组相比甚至可以升高 AST 水平, 且升高幅度在统计学上有差异 ( $P < 0.05$ ), 说明高剂量的 ALR 对于受损伤的肝细胞有一定的破坏作用, 这提示使用剂量应控制在中、低剂量范围内。

ALR 对于肝脏再生过程中作用机制的研究还处于起步阶段, Thasler 等<sup>[4-5]</sup> 用免疫组化和定量 PCR 的方法比较了胆管细胞性肝癌 (cholangiocellular carcinoma, CCC)、肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 和正常肝细胞中 ALR 的表达差别, 发现 CCC 和 HCC 细胞中的 ALR 含量显著升高; 研究<sup>[6-8]</sup> 发现大鼠 ALR 在体外抑制 NK 细胞活性; ALR 在体外可以刺激表皮生长因子 mRNA 的表达, 同时还可以活化 MAPK (mitogen activated protein kinase) 信号通路<sup>[9-10]</sup>。

本实验证明 ALR 对于人肝细胞株 L-02 增殖具有显著的刺激作用, 以后的研究过程中还需要更多的数据, 研究 ALR 对更多细胞株如正常原代肝细胞增殖的影响; 同时 ALR 对于肝细胞特别是肝癌细胞的刺激增生作用也使人们对于 ALR 应用时存在的

潜在致癌活性需要进一步评价。

## [参考文献]

- [1] Giorda R, Hagiya M, Seki T, et al. Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene[J]. Mol Med, 1996, 2: 97-108.
  - [2] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene; expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 8142-8146.
  - [3] 谢玲, 杨晓明, 贺福初, 等. 重组大鼠再生增强因子救治急性肝衰竭的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 1996, 12: 324-326.
  - [4] Thasler W E, Schlott T, Thelen P, et al. Expression of augments of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma[J]. Histopathology, 2005, 47: 57-66.
  - [5] Dayoub R, Thasler W E, Bosserhoff A K, et al. Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augments of liver regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345: 181-187.
  - [6] Vujanovic N L, Polimeno L, Azzarone A, et al. Changes of liver-resident NK cells during liver regeneration in rats[J]. J Immunol, 1995, 154: 6324-6338.
  - [7] Francavilla A, Vujanovic N L, Polimeno L, et al. The *in vivo* effect of hepatotrophic factors augments of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions[J]. Hepatology, 1997, 25: 411-415.
  - [8] Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, et al. Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation[J]. Hepatology, 2000, 31: 907-915.
  - [9] An W, Liu X J, Lei T G, et al. Growth induction of hepatic stimulator substance in hepatocytes through its regulation on EGF receptors[J]. Cell Res, 1999, 9: 37-49.
  - [10] Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, et al. Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes[J]. Growth Factors, 2002, 20: 61-69.
- [收稿日期] 2007-09-17 [修回日期] 2007-11-12  
[本文编辑] 邓晓群