

鲨肝刺激物质类似物基因在大肠杆菌中的表达与产物活性分析

王颖边 杉,张婷婷,赵艳景,吴梧桐,叶波平,王 昊

(中国药科大学生命科学与技术学院,江苏南京,210009)

摘要:构建了鲨肝刺激物质类似物基因片段的原核表达载体质粒(pET-sHSS),转化大肠杆菌后通过IPTG诱导获得原核表达产物,并利用凝胶层析方法对表达产物进行了分离纯化;进一步利用MTT比色法研究了该重组产物对肝癌细胞株SMMC-7721的增殖影响。结果表明,在1 mmol/L的IPTG的诱导下,鲨肝刺激物质类似物基因片段在大肠杆菌BL21菌株中获得表达,表达产物的相对分子质量大小约为17 500 u,占菌体可溶性蛋白总量的38%左右,纯化后的产物在低浓度下(< 50 ng/L)具有明显刺激SMMC7721细胞株增殖的活性,高浓度下(> 100 ng/L)则明显抑制该肿瘤细胞株的生长,与天然鲨肝刺激物质的生物活性类似。

关键词: 鲨肝刺激物质类似物,原核表达,cDNA克隆,生物活性

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2004)06-0037-05

1975年,美国学者Lebracque等报道从初断乳大鼠肝脏中提取到一种能促进肝细胞增殖的活性蛋白质,称为肝刺激物(Hepatic Stimulator Substance, HSS)^[1]。研究表明,HSS为一种相对分子质量为10~20 ku的蛋白质,广泛存在于哺乳动物幼仔肝、胚胎肝及再生肝组织中,具有阻断肝损伤、促进肝再生、恢复肝功能的作用^[2]。作者通过对鲨鱼(Cihiroscyllium plagiosum)肝脏中活性多肽的研究,从中分离纯化到一种具有类似HSS活性的活性蛋白,命名为鲨肝刺激物质(sHSS)^[3],现已基本完成了将sHSS开发成抗肝炎新药的临床前研究工作。然而,从鲨鱼肝脏中分离纯化sHSS的得率很低(< 40 μg/g),这影响到后续对sHSS的进一步开发工作,利用基因工程手段获得重组产物是目前解决药源问题的一个良好途径,为此,作者根据对sHSS的N-端氨基酸序列的分析结果,设计简并引物,利用RT-PCR方法获得一段cDNA序列,并对该序列的结构和功能进行了初步分析^[3],通过Protean软件对推导出的蛋白质序列的等电点分析结果表明该片段表达产物的等电点(pI 5.0)和相对分子质量与已测定的天然产物的等电点(pI 5.2)和相对分子质量(17 000 u)相近,但是,该序列与已报道其它来源的肝刺激物质氨基酸序列差异较大,而与一种未知功能的蛋白质序列具有较高的同源性^[3]。由于目前作者尚未解析天然sHSS的一级结构,无法确定该

序列与天然产物氨基酸序列间的关系,因此,暂时将之命名为鲨肝刺激物质类似物基因。通过基因重组的方法获得该cDNA序列的重组产物,比较其与天然产物生物活性间的差异,有望确定两者间的关系,并为最终将HSS开发成抗肝炎新药打好基础。

本研究利用pET-28a构建了鲨肝刺激物质类似物cDNA片段的原核表达载体,转化大肠杆菌后获得表达该cDNA片段的基因工程菌株,并通过IPTG诱导获得重组表达产物,进一步通过已建立的活性研究方法比较其与天然sHSS活性的异同,以初步确定两者的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞株

大肠杆菌BL21菌株和肝癌细胞株SMMC-

收稿日期:2003-12-23,修回日期:2004-04-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171103);江苏省自然科学基金资助项目(BK2002418)

作者简介:王颖(1979-),女,江西九江人,微生物与生化药理学专业硕士研究生;叶波平,王,通讯作者,电话:025-3271016/3271395, E-mail: yebp2001@yahoo.com.cn

7721 由本实验室保存, 含 sHSS cDNA 序列的质粒 (pGEM-sHSS) 以及表达载体 pET-28a 由本实验室提供。

1.2 主要试剂

IPTG、X-gal 为 BBI 公司产品, Sephadex G75 购自 Pharmacia 公司, 限制性内切酶 (NdeI、XhoI) 及 DNA 分子量标准 (λ DNA/EcoRI + Hind III、PBR322/Alu) 购自 MBI 公司, T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, 蛋白质分子量标准为中国科学院上海生物化学研究所的产品, Taq-plus DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术发展中心, 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Vitagene 公司, His bind kits 和凝血酶为 Novagen 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 重组表达载体的构建与鉴定

1.3.1 引物的设计

上游引物: 5' AGCCATATGAGGACCGCAAG3' (含有 NdeI 酶切位点)。

下游引物: 5' ACTCGAGTCATTAACACTGCCAC3' (含有 XhoI 酶切位点)。

上述引物由上海申友生物技术有限责任公司合成。

1.3.2 PCR 扩增 sHSS 基因及扩增产物的回收

100 μ l PCR 扩增体系为: 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 内含 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 上下游引物各 50.0 pmol, 3U Taq DNA 聚合酶和 0.05 μ g pGEM-sHSS 模板; PCR 扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 热变性 3 min 后进入 35 个 PCR 循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;

扩增产物经 1.5% Agarose 琼脂糖凝胶电泳检测后, 按凝胶回收试剂盒说明书回收扩增产物。

1.3.3 重组表达载体的构建与鉴定^[4]

将回收的 PCR 产物 20 μ L 体系中经过 NdeI 和 XhoI 双酶切, 并以 NdeI 和 XhoI 对纯化后的 pET-28a 质粒进行双酶切, 分别回收酶切产物后, 经 T₄DNA 连接酶连接, 转化 *Escherichia coli* JM109 菌株。从转化平板上挑取克隆, 培养后提取质粒进行双酶切鉴定, 并对双酶切检测的阳性克隆进行测序, 该工作由上海 Sangon 公司协助完成。

1.4 重组 sHSS 的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳分析^[4]

鉴定阳性的克隆提取质粒后, 转化 *E. coli* BL21 菌株并鉴定, 挑取一个阳性克隆接种于含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 振荡培养过夜后, 按 1:

100 接种至新鲜培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 振荡至对数生长期, 加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 分别于诱导后的 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 收集菌体并沉淀, 以适量的 1 \times 蛋白上样缓冲液重悬菌体, 并于沸水浴中加热 3~5 min, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 10 μ L 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳以比较不同发酵时间重组产物的表达量, PAGE 胶浓度为: 12% 分离胶、4.5% 浓缩胶, 电压 100 V, 电泳 2.5 h^[5]。

1.5 重组蛋白的收集、分离纯化

工程菌经 IPTG 诱导表达 3 h, 离心收集菌体, 经 PBS 洗涤后, 用 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0) 重悬, 在 0 $^{\circ}$ C 以超声波破碎菌体, 加入适量 DNase 于 4 $^{\circ}$ C 处理过夜, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。将上述蛋白样品按 His bind kits 操作手册进行纯化, 向纯化后的样品中加入凝血酶, 23 $^{\circ}$ C 下酶切 20 h 后上样于经 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0) 平衡的 Sephadex G75 柱, 用 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0) 洗脱, 按 3 mL/管收集洗脱峰, 通过 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白。以 Folin-酚法计算蛋白含量。

1.6 重组产物的活性研究

根据张丽君等^[6]1999 的方法对纯化后的重组产物进行活性测定, 对测定的数据进行 t 检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物的鉴定

PCR 扩增产物经琼脂糖电泳显示, 在 500bp 附近

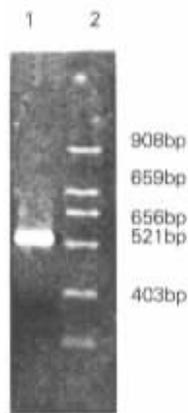


图 1 鲨肝刺激物质类似物 cDNA 片段的扩增

Fig. 1 Amplification of shark hepatic stimulate substance analogue's cDNA with the template of pGEM-sHSS
1. sHSS 扩增片段 2. 核酸分子量标准
1. Amplification product of sHSS; 2. DNA Marker

出现一条与预期产物大小相符的 DNA 片段(图 1)。

2.2 pET - sHSS 表达载体的构建

将经过 XbaI/XhoI 双酶切的 PCR 片段与经同样酶切的 pET - 28a 质粒连接后,通过限制性内切酶酶切鉴定(图 2),并对鉴定阳性的质粒进行序列分析

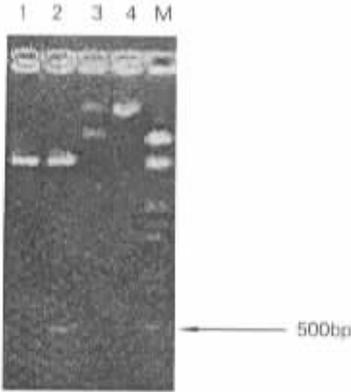


图 2 重组质粒的限制性酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET - sHSS with endonucleases analysis

1. XbaI 和 XhoI 双酶切质粒 pET - 28a ;2. XbaI 和 XhoI 双酶切质粒 pET - sHSS ;3. 质粒 pET - sHSS ;4. M 为质粒 pET - 28a (+) ;λDNA EcoR I 和 Hind III 双酶切核酸分子量标准

1. pET - 28a digested with XbaI and XhoI; 2. pET - sHSS digested with XbaI and XhoI; 3. plasmid pET - sHSS; 4. plasmid pET - 28a (+); M: λDNA /EcoR I + Hind III Marker

(结果略)表明插入序列正确。

2.3 重组 sHSS 的诱导表达和产物的分离纯化

利用 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,对不同诱导时间的菌体可溶性蛋白进行 SDS - PAGE 电泳分析,目的蛋白在 IPTG 的诱导下获得表达,不同时间的表达量有差异,其中以诱导后第 3 小时的表达量最高,占菌体可溶性蛋白总量的 38% 左右(图 3)。SDS - PAGE 电泳结果表明表达蛋白的相对分子质量约为 17 500 u 与预期的蛋白相对分子质量一致。由于表达的重组蛋白在 N 端融合 6 个 His 残基,利用 His bind kits 对重组产物进行了分离,并利用凝血酶对纯化后的重组产物进行酶切降解以除去 N 端的氨基酸残基,利用 Sephadex G75 对蛋白降解产物进行了纯化,电泳分析表明纯化后的蛋白纯度为 90% 以上(图 4)。

2.5 重组蛋白对 SMMC - 7721 细胞株增殖活性的影响

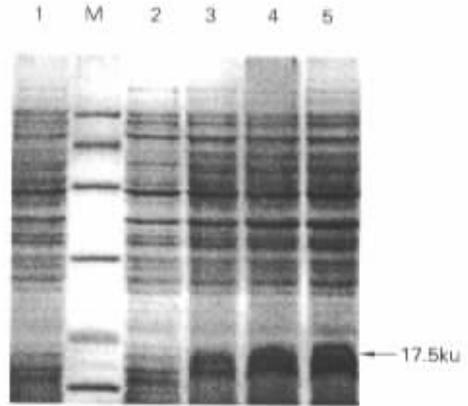


图 3 不同诱导时期菌体可溶性蛋白的电泳分析

Fig.3 SDS - PAGE analysis of total soluble proteins induced for different times

1. 诱导 3 h 的转 pET - 28a 菌株 ;2. 2 ~ 5 分别为诱导 0, 1, 2, 3 h 的转 pET - sHSS 菌株 ;M 为蛋白质分子量标准

1. pET - 28a (+) induced for 3 hours (3 h); 2. pET - sHSS induced for 0 hour; 3. pET - sHSS induced for 1 hour; 4. pET - sHSS induced for 2 hours; 5. pET - sHSS induced for 3 hours; M: Protein molecular weight markers (from up to down: 97.4, 66.2, 42.7, 31.0, 20.1, 14.4ku)

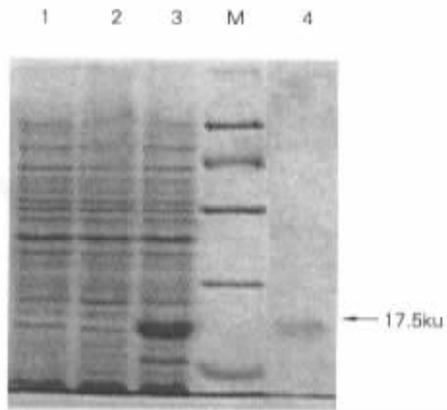


图 4 重组蛋白的纯化分析

Fig.4 Purification of recombinant proteins compared with total soluble proteins

1. 诱导 3 h 的转 pET - 28a 菌株 TSP ;2~3. 诱导 0, 3 h 的转 pET - sHSS 菌株 TSP ;4. 纯化后的重组蛋白 ;M 为蛋白质分子量标准

1. pET - 28a (+) induced for 3 hours; 2. pET - sHSS before induction; 3. pET - sHSS induced for 3 hours; 4. purified target proteins hydrolyzed with thrombin; M. Protein molecular weight marker

表 1 重组产物对 SMMC-7721 细胞株增殖的影响

Tab. 1 Effect of expressed products on proliferation of

SMMC-7721		
样品	剂量(mg/L)	A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm S$)
重组产物	5	0.51 ± 0.04 *
	10	0.56 ± 0.06 *
	50	0.53 ± 0.02 *
	100	0.41 ± 0.01
	200	0.37 ± 0.03
天然 sHSS	100	0.53 ± 0.09 *
	50	0.37 ± 0.02
阴性对照		0.42 ± 0.03

* < 0.01 与阴性对照产生显著差异。

对初步纯化的表达产物的生物活性进行了分析(表 1)。从表 1 中可以明显看到,表达产物在浓度高于 10 mg/L 时,随浓度升高,其促进增殖活性逐渐降低,当浓度大于 100 mg/L 时,则明显抑制 SMMC7721 细胞的生长。结果同时显示,该表达产物在浓度为 5~50 mg/L 时对 SMMC7721 细胞的增殖活性与 100 mg/L 的天然产物相似。

3 讨论

肝刺激物质(HSS)^[7]、肝再生增强因子(ALR)^[8]以及肝细胞生长因子(HGF)^[9]等是一类与肝细胞再生调控相关的细胞因子,它们在肝损伤过程中均有代偿性地增强表达,有望开发成抗肝病的新药。从 1975 年发现 HSS 以来,各国研究人员开展了大量的有关 HSS 的分离纯化、理化性质以及作用机理的研究工作,为将 HSS 开展成为抗肝病新药奠定了一个良好的基础。然而,不可否认的是,从各研究小组报道的情况来看,从动物肝脏中分离纯化 HSS 的得率很低,严重影响了将其开发成抗肝炎新药的研究工作。解决上述“药源”困难的途径之一是设法获得与这些细胞因子类物质相关的基因,进而利用基因工程手段大量富集目的产物以供后续的研究工作。

在前期研究过程中,作者已根据来自鲨鱼的 HSS 的 N-端氨基酸残基序列设计简并引物,并利用 RT-PCR 的方法获得了一个 cDNA 片段,通过 Protean 软件对推导出的蛋白质序列的等电点分析结果表明该片段表达产物的等电点为 5.0 左右,与天然产物等电点(pI 5.2)相近,但是,该序列与已报道其它来源的

肝刺激物质氨基酸序列差异较大,而与一种未知功能的蛋白质序列具有较高的同源性^[3]。由于目前作者尚未解析天然 sHSS 的一级结构,无法确定该序列与天然产物的氨基酸序列间的关系。通过基因重组的方法获得该 cDNA 序列的重组产物,比较其与天然产物生物活性间的差异,有望最终确定两者间的关系,并最终将 HSS 开发成抗肝炎新药打好基础。

在本研究中,作者以 pET-28a 为表达载体,构建了该 cDNA 序列的基因工程菌株,在 1 mmol/L IPTG 的诱导下,该菌株中重组产物的表达量可高达菌体可溶性蛋白总量的 38% 左右,表达蛋白的分子量接近于天然 sHSS 的分子量(17 000 u);在构建的重组表达载体中,在目的基因的上游融合了一段核苷酸序列,该序列包括 6 个 His 残基和一段可被凝血酶识别的短肽编码序列,利用 His 与 Ni²⁺亲和的特点,很容易就获得重组表达产物,这为后期的纯化中试工艺提供了方便;利用凝血酶将这段融合表达的短肽序列去除后,rHSS 的 N 段多出 3 个氨基酸残基,即:Gly、Ser 和 His,但是,从活性分析结果来看:这 3 个氨基酸残基的存在并没有严重影响到 rHSS 的结构与功能。

从纯化后的表达产物对 SMMC-7721 细胞的增殖活性研究结果来看,重组产物与天然产物均有明显刺激该细胞株增殖的生物活性,虽然目前我们还不能明确重组产物与天然产物间的关系,但是,上述研究结果表明,该重组产物与天然产物应该同为一类具有刺激细胞增殖活性的细胞因子类物质。

由于目前对天然产物一级结构全序列分析较为困难,进一步利用 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠模型研究重组产物对血清 ALT 和 AST 活性的影响,并通过比较重组产物与天然产物对肝再生过程相关的细胞因子,如:IL-6、TGF-1 以及 HGF 等^[9]表达的调节作用,有望为最终确定重组产物与天然产物间的关系奠定一个良好的基础。目前,我们已完成重组产物对 CCl₄ 致急性肝损伤模型小鼠血清 ALT 和 AST 活性以及对肝细胞膜保护作用的研究工作,正在比较其与天然产物对环磷酰胺致免疫性肝损伤小鼠的保护作用,并进行了重组产物对细胞因子类物质表达调控的影响研究,上述研究大大促进了将 sHSS 开发成抗肝炎新药的研究进程。

参考文献:

[1] LaBrecque D R, Peshch L A. Preparation and partial

- characterization of hepatic regenerative stimulator substance from rat liver[J]. *J Physiol*, 1975, 248:273-284.
- [2] LaBrecque D R. Hepatic stimulator substance——discovery, characteristics and mechanism of action[J]. *Dig Dis Sc*, 1991, 36:669-673.
- [3] 叶波平 奚涛 吕正兵 等. 鲨肝刺激物质类似物 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. *中国天然药物*, 2003, (2) 5-9.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Hames BD, Rickwood D. *蛋白质的凝胶电泳——实践方法*[M]. 北京 科学出版社, 1994. 18.
- [6] 张丽君, 吴文俊, 王友同, 等. 应用 MTT 比色法测定 HSS 体外生物学活性[J]. *药物生物技术*, 1999, 6(1): 49-52.
- [7] Francavilla A, Ove P, Polimeno L, *et al.* Extraction and purification of a hepatic stimulator substance in rats, mice and dog[J]. *Cancer Res*, 1987, 47:5 600-5 605.
- [8] 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*, 1994, 91:8 142-8 151.
- [9] Michalopoulos G K, DeFrances M C. Liver regeneration [J]. *Science*, 1997, 276:60-66.

Expressing and bioactivity analysis of shark hepatic stimulate substance analogue in *Escherichia coli*

WANG Ying, BIAN Shan, ZHANG Ting - ting, ZHAO Yan - jing, WU Wu - tong, YE Bo - ping, WANG Min

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Received: Dec., 23, 2003

Key words: shark hepatic stimulate substance analogue; prokaryotic expression; cDNA clone; bioactivities

Abstract: After being induced with 1 mmol/ IPTG, the recombinational protein was purified by Gel chromatography and the activity analyzed with MTT, the prokaryotic expression plasmid of sharks hepatic stimulant analogues gene was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 line.

The results show that the quantities of recombinant protein to the about 38% of the total soluble proteins of BL21 under the induction of IPTG, its molecular weight is about 17 500 u analyzed by SDS - PAGE electrophoresis. The purified products can improve the proliferation of SMMC7721 cell under the concentration of 50 ng/L, but will inhibit the cell's proliferation up to 100 ng/L. Therefore, the recombinant product of shark hepatic stimulant substance analogue gene has the similar activities as the natural form purified from shark livers before.

(本文编辑: 谭雪静)