文章编号:1000-5404(2010)19-2049-04

论著

重组BC047440蛋白的表达及其对人肝癌细胞系HepG2增殖的影响

郑 璐,梁 平,李 靖,黄小兵,杨彤翰,左国华,王 梁 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肝胆外科)

【摘要】 目的 构建原核表达载体,制备重组BC047440蛋白并观察不同浓度的重组蛋白对HepG2细胞增殖的影响。方法 提取肝癌组织总RNA,经逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增BC047440 cDNA,克隆入质粒pMD19-T,转化*E. coli* DH5α,酶切目的基因片段,插入质粒pET-28a(+),转化*E. coli* BL21,IPTG诱导蛋白表达,SDS-PAGE电泳鉴定表达产物,提取重组BC047440蛋白,MTT法和流式细胞术检测不同浓度重组蛋白对HepG2细胞增殖的影响,Western blot检测重组蛋白作用后HepG2细胞表达Ki67蛋白的变化。结果 克隆、鉴定BC047440基因,构建其原核表达载体,成功制备并纯化BC047440重组蛋白。1.0、10.0、20.0 μg/ml浓度重组BC047440蛋白分别作用HepG2细胞48 h后,细胞增殖率分别为124.0%、136.1%、126.6%,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞术结果提示,对照组的细胞增殖常数(PI)为26.1,重组蛋白处理组PI为48.6,二者差异具有统计学意义($P<0.05$)。重组BC047440蛋白作用HepG2细胞后,Ki67蛋白的相对表达量为(0.317±0.062),对照组的相对表达量为(0.177±0.037),二者差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 制备的重组BC047440蛋白具有直接促进HepG2细胞增殖和促进其表达Ki67蛋白的作用,可能是一种新的促进肝癌增殖蛋白。

【关键词】 BC047440;肝癌;增殖;Ki67
【中图法分类号】 R394.3;R730.23;R735.7 【文献标志码】 A

Expression of recombinant BC047440 protein and its effects on proliferation of HepG2 cells *in vitro*

Zheng Lu, Liang Ping, Li Jing, Huang Xiaobing, Yang Tonghan, Zuo Guohua, Wang Liang (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 **Objective** To construct the prokaryotic expression vector of BC047440 gene and to observe the effect of different concentrations of this recombinant protein on proliferation of human HepG2 cells. **Methods** Total RNA was extracted from HepG2 cells. BC047440 gene fragments were amplified from the total RNA by RT-PCR. The PCR product was cloned into pMD19-T vector and sequenced. The confirmed BC047440 cDNA was cloned into plasmid pET-28a (+) and transformed into *E. coli* BL21 where expression of BC047440 proteins was induced by IPTG. The expression product of BC047440 protein was identified by SDS-PAGE. Recombinant BC047440 protein was extracted and its effect on proliferation of HepG2 cells was detected by MTT assay and cytometry, respectively. Effect of recombinant BC047440 protein on expression of Ki67 protein in HepG2 cells was detected by Western blotting. **Results** The prokaryotic expression vector was constructed. The BC047440 gene was cloned, identified, and purified. The proliferation rate of HepG2 cells was 124.0%, 136.1%, and 126.6% respectively 48 h after BC047440 protein was transformed into HepG2 cells at the concentration of 1.0, 10.0, and 20.0 μg/ml respectively ($P<0.05$). Cytometry showed that the proliferation constant of HepG2 cells was 26.1 in control group and 48.6 in experimental group ($P<0.05$). The relative expression of Ki67 protein was 0.317±0.062 in experimental group and 0.177±0.037 in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Recombinant BC047440 protein can directly promote the proliferation and expression of Ki67 protein and may be a new protein that can stimulate the proliferation of HCC cells.

【Key words】 BC047440; liver cancer; proliferation; Ki67

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570843). Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68774606, E-mail: xqyylijing@tom.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30570843)
【通信作者】 李 靖,电话:(023)68774606,E-mail:xqyylijing@tom.com

原发性肝癌是一种常见的恶性肿瘤，发病率有逐年上升的趋势。我们在前期的研究中已发现了1条在肝癌中高表达但其功能未知的基因（登录号BC047440），并在基因转录水平研究了BC047440的表达情况，发现其mRNA在肝癌组织中的表达高于癌旁组织，且该基因的功能与肝癌生长增殖有关[1-4]。本研究在制备重组BC047440蛋白的基础上，观察其对肝癌细胞系HepG2增殖的影响及对肿瘤增殖相关蛋白Ki67表达的影响，进一步探讨BC047440在肝癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

肝癌组织取自我科手术切除标本，*E. coli* DH5α、*E. coli* BL21、HepG2细胞由我院中心实验室保存，表达质粒pET-28a(+)、T载体(pMD19-T)购自武汉晶赛生物公司，限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ、T_4 DNA连接酶及DNA标准购于NEB公司，低分子量标准蛋白质购于上海生工生物工程公司，Trizol购自晶美公司，RT-PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司，IPTG、X-gal、质粒回收试剂盒、胶回收试剂盒、Pierce蛋白提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。引物根据GenBank中报告的BC047440编码区序列设计而成，上下游引物5′端分别携带*Bam*HI和*Eco*RI酶切位点，目的片段为BC047440基因182～778碱基，长597 bp。由上海生工生物工程公司合成。上游引物：5′-CGGGATCCGGCCGCCTGCACTGC-3′，下游引物：5′-CGGAATTCTTAGCAGAAACACTCCATGCTGG-3′。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的克隆和鉴定 以肝癌组织为模板，Trizol一步法提取总RNA。逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增目的片段[5]，按胶回收试剂盒提供方法，回收目的基因片段。

1.2.2 原核表达载体的构建及重组蛋白的表达 参照文献[5]进行TA克隆并构建原核表达载体，鉴定阳性克隆，Sanger双脱氧链终止法对目的基因进行序列分析。诱导蛋白表达后于1、2、3、4 h各取菌液1 ml，12 000×*g*离心取菌，行SDS-PAGE电泳鉴定表达产物。

1.2.3 重组蛋白的纯化 菌体重悬于20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中，在冰浴条件下超声破碎。沉淀用含2 mol/L尿素和1% Triton×100的20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.5)4 ℃洗涤。洗涤后的包涵体溶解于含8 mol/L尿素的20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中，经SP-Sepharose离子交换层析和Superdex-75分子排阻层析进一步纯化和柱上部分复性，然后经透析最终复性获得目的蛋白。

1.2.4 MTT检测重组BC047440蛋白对HepG2细胞的增殖的影响 人肝癌HepG2细胞用含10%小牛血清的RPMI1640培养基，置37 ℃、5% CO_2孵箱培养，培养液加1%双抗(青霉素、链霉素)，48～72 h传代，传代前用0.25%胰蛋白酶消化。取对数生长期的细胞，经胰酶消化后吹打成单细胞悬液，接种于96孔培养板中，每孔5×10^3个细胞，含10%小牛血清的RPMI1640培养基200 μl，置37 ℃、5% CO_2培养24 h后证实细胞贴壁并且生长良好，改换无血清RPMI1640培养基，每孔180 μl。加入重组BC047440蛋白后使其终浓度分别为0.1、1.0、10.0、20.0 μg/ml，每孔20 μl，每组浓度设5个复孔，以相同缓冲液作为对照，继续孵育48 h后各孔加入MTT(5 mg/ml)，继续培养4 h，去上清液，然后加入DMSO，振荡10 min，用酶标仪检测吸光度值(波长570 nm)。计算各浓度重组蛋白对HepG2细胞增殖的影响。

增殖率=重组蛋白组D(570)值/对照组D(570)值×100%

1.2.5 流式细胞术检测 细胞分组及培养方法同前，细胞在培养瓶内生长至70%～80%融合时，加入BC047440重组蛋白并调整浓度为10 μg/ml；37 ℃ 5% CO_2培养箱培养48 h，用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化，1500 r/min离心5 min，弃上清，0.01 mol/L PBS洗涤3次；缓慢加入预冷的70%乙醇1 ml进行固定；离心弃乙醇，用0.01 mol/L PBS洗涤2次，去除固定液；加入200 μl RNA酶(1 g/L)，37 ℃孵育(30 min)，然后用溴化乙锭(EB)作细胞DNA染色，4 ℃避光作用30 min。应用流式细胞仪测定各细胞周期所占百分比。

1.2.6 Western blot分析HepG2细胞表达Ki67蛋白水平的变化 细胞分组及培养方法同前，10 μg/ml重组蛋白作用HepG2蛋白48 h后，按Pierce蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白，采用Bradford法测定总蛋白浓度。灌注10%分离胶和5%积层胶，各取总蛋白40 μg行SDS-PAGE，电泳结束后电转印2 h到PVDF膜。PVDF膜4 ℃封闭过夜(0.5% BSA，0.01 mol/L PBS)，分别加入山羊抗人Ki67多克隆抗体(1∶500)，小鼠抗人β-actin抗体(1∶500)，37 ℃孵育2 h，PBST(0.01 mol/L PBS，0.02% Tween)洗膜10 min×3，分别加入辣根酶标记兔抗羊IgG(1∶6000)，辣根酶标记兔抗小鼠IgG(1∶6000)，37 ℃孵育1 h，PBST洗膜15 min×4，最后ECL显色。显色结果通过凝胶成像分析系统进行扫描，并分析各条带吸光度值×面积(Int×mm^2)。

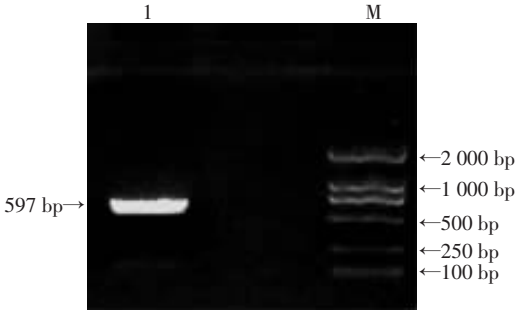
1.3 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件，数据以$\bar{x}\pm s$表示，重组蛋白对肝癌细胞的促增殖作用采用单因素方差分析，组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 RT-PCR扩增BC047440基因

总RNA抽提产物经1%琼脂糖凝胶电泳，紫外透射仪下见3条清晰条带，分别为28S、18S和5S。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，在DL2000标准的500 bp和750 bp位置之间可见清晰条带，和目的片段(大小597 bp)一致(图1)。

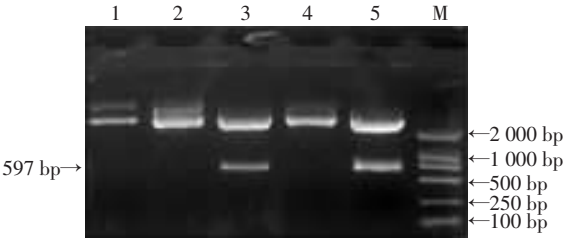


1 :BC047440 基因编码区目的条带 ;M :标准(DL 2000)

图 1　RT-PCR 扩增 BC047440 基因电泳分析

2.2　产物的克隆及鉴定

纯化的 PCR 产物在连接酶的作用下克隆至 pMD19-T 载体中,篮白斑筛选后,5 个白色克隆中有 2 个克隆经 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切后,出现 2 条特异性条带,其中 1 条与酶切前质粒位置相近,另 1 条与目的基因大小基本一致(图 2)。阳性克隆经碱裂解法抽提重组质粒 pMD19-T/BC047440。测序结果显示,插入片段长度为 597 bp,与 GenBank 中公布的 BC047440 基因 182 ~ 778 碱基序列匹配,两者同源性为 100%。



1 ~ 5 :pMD19-T/BC047440 质粒 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切后 ;1,2,4 :阴性克隆 ;3,5 :阳性克隆 ;M :标准(DL 2000)

图 2　pMD19-T/BC047440 质粒酶切鉴定

2.3　表达质粒 pET-28a(+)/BC047440 鉴定

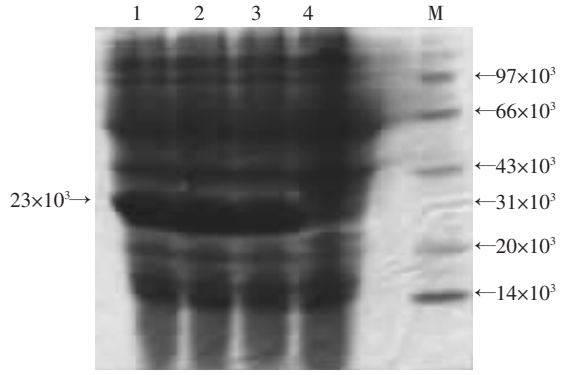
连接产物 pET-28a(+)/BC047440 转化 *E. coli* BL21 后,过夜培养至生长出许多白色菌落。挑取 7 个白色克隆,小量提取质粒,*Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切后,电泳结果显示 7 个菌落均出现 2 条特异性条带,位置分别对应原质粒和目的基因。

2.4　重组蛋白表达鉴定

SDS-PAGE 分析结果显示,经 IPTG 诱导的含重组质粒的 *E. coli* BL21 在相对分子质量 23×10^3 左右位置上出现 1 条新条带,与预期蛋白大小一致(图 3)。

2.5　重组蛋白对 HepG2 细胞增殖的影响

不同浓度重组 BC047440 蛋白作用 HepG2 细胞 48 h 后 *D*(570) 值均升高,其中 1.0、10.0、20.0 μg/ml 组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。0.1、1.0、10.0、20.0 μg/ml 组细胞增殖率分别为 107.8%、124.0%、136.1%、126.6%。提示重组 BC047440 蛋白对 HepG2 细胞的促增殖作用具有浓度依赖性(表 1)。流式细胞仪分析结果提示 :对照组的细胞增殖常数(PI)为 26.1, 处理组 PI 为 48.6,二者比较具有显著差异($P<0.05$),说明 BC047440 重组蛋白显著促进 HepG2 细胞的增殖(表 2)。



1 ~ 3 :pET-28a(+)/BC047440 诱导后 2、3、4 h ;4 :pET-28a(+)诱导后 4 h ;M :低分子量标准蛋白质

图 3　SDS-PAGE 分析重组 BC047440 蛋白的表达

表 1　不同浓度重组 BC047440 蛋白作用 48 h 对 HepG2 细胞增殖的影响

组别	重组蛋白组	对照组	增殖率	*P* 值
0.1 μg/ml	0.562 ± 0.050	0.521 ± 0.036	107.8%	>0.05
1.0 μg/ml	0.636 ± 0.046	0.513 ± 0.045	124.0%	<0.05
10.0 μg/ml	0.718 ± 0.087	0.508 ± 0.027	136.1%	<0.05
20.0 μg/ml	0.671 ± 0.019	0.530 ± 0.049	126.6%	<0.05

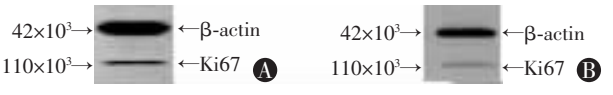
表 2　BC047440 重组蛋白对 HepG2 细胞增殖的影响

细胞株	对照组			BC047440 组		
	G_2	S	PI(%)	G_2	S	PI(%)
HepG2	6.4	19.7	26.1	32.9	15.7	48.6[a]

a :$P<0.05$,与对照组比较

2.6　重组 BC047440 蛋白诱导 HepG2 细胞表达 Ki67 蛋白水平的变化

与对照组比较,重组 BC047440 蛋白作用后,HepG2 细胞中 Ki67 蛋白的表达水平明显升高,其相对表达量为(0.317 ± 0.062),对照组的 Ki67 蛋白相对表达量为(0.177 ± 0.037)(图 4)($P<0.05$)。



A :BC047440 蛋白作用组 ;B :对照组

图 4　Western blot 检测 BC047440 重组蛋白作用 HepG2 细胞后 Ki67 蛋白的表达

3　讨论

肝癌是发病率最高的恶性肿瘤之一,肝癌的发生、发展是不同基因在各阶段相互作用的复杂过程,并受到多种因素的调节影响。许多癌基因、抑癌基因以及相关基因的激活或异常失活是肝癌发生的分子基础[6-9]。肝癌发生的分子调控机制至今仍未完全阐

明,寻找新的肝癌发生相关基因,并阐明基因的功能及其与其他基因间的相互关系,对揭示肝癌发生、发展的分子机制及其治疗具有重要意义[10]。

BC047440基因系已经注册但功能未知的基因。Prosite分析显示该基因可能存在3个蛋白激酶C磷酸化位点、2个酪蛋白激酶2磷酸化位点、2个肉豆蔻基位点(MYRISTYL)、1个天冬酰胺酶糖基化位点。蛋白质的亚细胞定位预测结果表明其可能属于一种胞浆蛋白。BC047440基因定位于20号染色体20q11.22。BC047440编码的蛋白质可能是一种由200个氨基酸组成,等电点6.32,分子量为22.6×10^3的胞浆蛋白[2]。RT-PCR证实该基因在人肝癌组织中的mRNA表达明显高于其对应的癌旁肝组织。从人肝癌组织中克隆出BC047440基因的全长cDNA序列,构建其反义RNA真核表达载体并导入HepG2肝癌细胞,封闭HepG2细胞中内源性BC047440基因表达后,发现该细胞生长速度减慢且大部分细胞滞留于G_1期。我们之前的研究提示BC047440可能是一个新的肝癌相关基因,该基因可能参与了肝癌的发生过程。

BC047440在转录水平对肝癌增殖的影响目前已有较多研究,但其蛋白表达产物对肝癌增殖是否有类似的影响?因此,利用基因工程技术构建其表达载体,表达重组蛋白并进一步研究其功能很有必要。本研究利用RT-PCR技术克隆出BC047440的编码区cDNA片段,连接至载体pMD19-T,克隆出pMD19-T/BC047440质粒,酶切鉴定证实了扩增片段成功插入该克隆菌落载体中。测序分析进一步证实克隆完全正确。pET载体系统是目前在*E. coli*中克隆表达重组蛋白功能最强大的系统,BC047440基因编码区片段被克隆至pET-28a(+)上,受T_7 RNA聚合酶充分诱导后可选择性表达目的蛋白。经双酶切后,2个条带分别与质粒及目的片段的位置一致,进一步测序实验证实了表达载体构建正确。

为了在蛋白水平研究BC047440的功能,本实验表达了重组BC047440蛋白,并应用MTT法初步观察了经不同浓度重组BC047440蛋白直接作用后,人肝癌细胞系HepG2增殖的变化。结果发现重组BC047440蛋白的介入促进了HepG2的增殖,其中10.0 μg/ml组作用48 h后增殖率可达到136.1%。进一步应用流式细胞仪研究其对HepG2细胞系增殖的影响,结果发现BC047440重组蛋白对HepG2细胞增殖活性(S期百分比或增殖指数PI)及其DNA合成具有促进作用。在基因水平我们已经发现HepG2肝癌细胞中过表达BC047440,此实验则提示BC047440对HepG2细胞增殖的影响具有浓度依赖性。Ki67是一种在增殖细胞中表达的核抗原,与肿瘤的发生、浸润、转移密切相关,是目前已知的增殖抗原中最具增殖能力代表性,也是比较可靠的肿瘤细胞增殖指标。本实验发现,重组BC047440蛋白可以显著上调HepG2细胞中Ki67蛋白的表达,提示制备的重组BC047440蛋白促进肝癌增殖可能与上调Ki67蛋白表达有关。本实验不仅证实了BC047440在基因水平的研究结果[2-4],也进一步提示BC047440蛋白可能是一种新的调节肝癌增殖蛋白,将有可能为肝癌的分子治疗提供新的手段和实验数据。

参考文献:

[1] 李靖,韩本立,黄桂君,等. 肝癌组织差异表达基因cDNA序列的筛选与鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志,2003,20(1):49-52.

[2] 刘世呈,李靖,黄小兵,等. BC047440-siRNA对肝癌HepG2细胞增殖抑制及其分子机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报,2007,29(23):2207-2211.

[3] 钟扬,李靖,黄小兵,等. 慢病毒载体介导的人肝癌HepG2细胞BC047440基因沉默[J]. 第三军医大学学报,2010,32(8):744-748.

[4] 黄小兵,梁平,李靖,等. BC047440基因通过NF-κB调节HepG2细胞增殖的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(22):2090-2092.

[5] 何小平,李兆申,屠振兴,等. 人canstatin基因原核载体构建及其重组蛋白的表达纯化[J]. 医学研究生学报,2005,18(11):981-985.

[6] Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J. Gene therapy of liver cancer[J]. Ann Hepatol, 2007, 6(1):5-14.

[7] Osada S, Naganawa A, Misonou M, *et al*. Altered gene expression of transcriptional regulatory factors in tumor marker-positive cells during chemically induced hepatocarcinogenesis[J]. Toxicol Lett, 2006, 167(2):106-113.

[8] Yeh S H, Chiu C M, Chen C L, *et al*. Somatic mutations at the trinucleotide repeats of androgen receptor gene in male hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2007, 120(8):1610-1617.

[9] Ohta K, Ohigashi M, Naganawa A, *et al*. Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis[J]. Biochem J, 2007, 402(3):559-566.

[10] Imamura Y, Sano H. International comparisons of cumulative risk of liver cancer, from Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII[J]. Jpn J Clin Oncol, 2006, 36(4):259-260.

(收稿:2010-05-07 修回:2010-06-17)

(编辑 王 红)