论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1454-06

核糖核酸酶抑制因子与血管生成素的相互作用

李 林,舒 静,刘玉林,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 探讨核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor, RI)与血管生成素(angiogenin, ANG)的相互作用。**方法** 利用免疫荧光标记结合共聚焦显微镜技术来确立RI与ANG蛋白在细胞内的共定位。利用激光共聚焦显微镜的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)技术验证RI和ANG蛋白的相互作用。构建原核表达质粒pGEX-4T-RI,转化*E. coli* BL21大肠杆菌(DE3)表达,并经谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B(glutathione sepharose 4B)纯化GST-RI蛋白,考马斯亮蓝染色和免疫印迹鉴定表达情况,利用GST蛋白沉降技术检测RI与ANG蛋白在体外的结合作用。应用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验检测两蛋白在真核细胞内的结合作用。**结果** 细胞内免疫荧光标记的RI和ANG蛋白在激光共聚焦显微镜观察下存在共定位现象。FRET结果显示RI与ANG在细胞内存在相互作用。另外酶切和测序结果证明原核表达质粒pGEX-4T-RI构建成功,GST-RI蛋白诱导表达正确,GST蛋白沉降结果显示RI和ANG蛋白在原核细胞反应体系中存在相互作用。**结论** RI和ANG蛋白在原核细胞反应体系和真核细胞中均存在相互结合作用。

[关键词] 核糖核酸酶抑制因子;血管生成素;相互作用
[中图法分类号] R341;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Protein-protein interaction between ribonuclease inhibitor and angiogenin in mammalian cells

Li Lin, Shu Jing, Liu Yulin, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Diseases, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protein-protein interaction between ribonuclease inhibitor (RI) and angiogenin (ANG). **Methods** Immunofluorescence assay and laser scanning confocal microscopy were used to observe the co-location between RI and ANG in human bladder cancer T24 cells. The molecular interaction between RI and ANG was detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET). The prokaryotic expressing plasmid pGEX-4T-RI was constructed and then transferred into *E. coli* BL21 (DE3) to express glutathione-S-transferase-ribonuclease inhibitor (GST-RI) fusion protein. The fusion protein GST-RI was purified using glutathione Sepharose 4B. The interaction between RI and ANG in 293 cells was identified by GST pull down assay and co-immunoprecipitation. **Results** We found that RI was co-localized with ANG in the T24 cells. FRET study showed that RI interacted with ANG in the 293 cells. The prokaryotic expressing plasmid pGEX-4T-RI was verified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Prokaryotically expressed products were purified and their sequences were confirmed. GST pull down and co-immunoprecipitation results showed that the interaction between RI and ANG occurred in both prokaryotic cells and mammalian cells. **Conclusion** The interaction between RI and ANG occurs in prokaryotic cells and eukaryotic cells.

[**Key words**] ribonuclease inhibitor; angiogenin; interaction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81372203,81172424). Corresponding author: Chen Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor, RI)是一个含有大量的半胱氨酸残基和由15个富含亮氨酸重复序列(LRRs)组成的一种酸性糖蛋白。LRRs已经在超过100个蛋白质中显示出了广泛的功能,包括

[基金项目] 国家自然科学基金(81372203,81172424)
[通信作者] 陈俊霞,E-mail: chjunxia@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140513.0854.006.html(2014-05-13)

细胞周期调控,DNA 修复,细胞外基质的相互作用,并抑制酶的活性[1]。这些 LRRs 存在于一个广大的蛋白质家族,又由于 RI 独特的结构和功能,使其成为研究 LRRs 的一个关键蛋白质[2-3]。我们以前的研究结果显示,下调 RI 能显著促进非侵入性的 BIU-87 细胞在体外和体内的生长和转移潜能[4];上调 RI 可以抑制 B16 细胞的侵袭、转移[5]和抑制膀胱癌 T24 细胞的侵袭、转移及 EMT 发生[6]。另有研究表明[7]: RI 可以抑制血管的生成以及小鼠体内实体的长大。血管生成素(angiogenin, ANG)是一种重要的血管生成因子,在体内和体外均具有很强的诱发血管生成的活性,能有效促进血管的生成,同时参与调控其他血管生成因子[8]。ANG 本身还具有弱 RNase 活性,对血管内皮细胞的增殖、迁移以及血管形成有很大的影响。但是 RI 与 ANG 原核细胞或者真核细胞内直接结合或者相互作用的实验证据少有报道,本课题组在前期的实验中曾利用 Co-IP 方法检测过 RI 与 ANG 在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein cells, HUVECs)内的结合能力[9-11],本研究在此基础上进一步研究 293 细胞中 RI 与 ANG 的相互作用,以证实 RI 与 ANG 之间的关系,为后续 GST pulldown、FRET 等实验奠定基础。因此为进一步探讨其关系,本实验利用荧光共定位分析、荧光共振能量转移和免疫共沉淀的方法来研究 RI 与 ANG 在真核细胞内的相互作用,同时利用 GST 蛋白沉降实验在原核体系中研究 RI 与 ANG 蛋白的相互结合作用。为进一步研究肿瘤血管的抑制靶基因与肿瘤药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株、大肠杆菌 DH5α、T24 膀胱癌细胞以及 HEK 293 细胞,质粒 pcDNA3.1-myc-RI、pCMV-3 × flag -ANG 为本实验室构建并保存。质粒 pGEX-4T-1 购自 GE 公司,质粒 pECFP-N1、pEYFP-N1 购自 BD Clontech 公司, 高保真 *Taq* DNA 聚合酶、T_4连接酶、*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ、*Hind*Ⅲ等工具酶购自大连 TaKaRa 公司,谷胱甘肽购自 Promega(北京) 生物技术有限公司, 质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒均购自 OMEGA 公司,脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司,RIPA 裂解液购自重庆波尔生物技术公司,Sepharose 4B gel 购自 GE healthcare 公司, 蛋白酶抑制剂购自武汉博士德生物公司, 兔抗人 RI 抗体为本实验室制备保存, 鼠抗人 ANG 抗体购自美国 Abcam 公司, 鼠抗人 GST 抗体、FLAG 抗体以及 Protein G + A agarose 购自碧云天生物技术公司,羊抗鼠、羊抗兔二抗,Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥公司。彩色预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司 及 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T24 膀胱癌细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,293 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO_2、饱和湿度,常规培养细胞。

1.2.2 免疫荧光标记结合激光共聚焦显微镜观察 将 T24 细胞接种于含有盖玻片的 6 孔板中,待贴壁后,PBS 洗细胞 3 遍,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 洗 3 遍。加适量 0.1% Triton X-100 通透,冰上静置 10 min 后,PBS 洗 3 遍,用 3% BSA 封闭 1 h,吸掉液体。分别加配制好的兔抗人 RI 抗体和鼠抗人 ANG 抗体,4 ℃静置孵育过夜,用 PBS 缓冲液洗细胞 3 次,每次 5 min,用配制好的 Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG 与 Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠 IgG 滴加在细胞面,避光 37 ℃静置孵育 1 h 左右,PBS 缓冲液洗细胞 3 次。加适量的 DAPI 液避光静置孵育 10 min,PBS 缓冲液洗细胞 3 次后封片。用共聚焦显微镜观察结果,分析 2 种蛋白在细胞内的定位关系。

1.2.3 pGEX-4T-RI、pECFP-RI 和 pEYFP-ANG 的构建 以 pcDNA3.1-myc-RI、pCMV-3 × flag-ANG 为模板设计引物。pGEX-4T-RI 引物序列:上游引物 5′-CGGGATCCATGAGCCTGGACATCCAGAG-3′(下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点);下游引物 5′-CCGCTCGAGTCAGGAGATGACCCTCAGG-3′(下划线为 *Xho*Ⅰ酶切位点)。pECFP-RI 引物序列:上游引物 5′-CCCAAGCTTATGAGCCTGGACATCCAG-3′(下划线为 *Hind*Ⅲ酶切位点);下游引物 5′-CGGGATCCATGGAGATGACCCTCAGGGA-3′(下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点)。pEYFP-ANG 的引物序列:上游引物 5′-CCCAAGCTTATGGTGATGGGCCTGGGCGT-3′(下划线为*Hind*Ⅲ酶切位点);下游引物 5′-CGGGATCCATCGGACGACGGAAAATTGAC-3′(下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点)。PCR 引物由上海生工生物公司合成,PCR 产物在 1% 琼脂糖进行凝胶电泳检测,并对正确 PCR 产物胶回收纯化,双酶切纯化后的 PCR 产物与表达载体 pGEX-4T-1、pECFP-N1、pEYFP-N1,1% 琼脂糖凝胶电泳回收,利用 T_4 DNA 连接酶分别连接胶回收产物,16 ℃连接过夜。将连接产物转化至 DH5α 感受态细菌中,分别涂布于 LB(含 Amp 抗生素)、LB(含 Kana 抗生素)平板,37 ℃孵箱过夜,次日随机挑选单菌落扩增并提取重组质粒,双酶切鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切结果,并将酶切正确的克隆送 Invitrogen 基因公司测序。

1.2.4 GST-RI 融合蛋白的诱导表达 将测序正确的 pGEX-4T-RI 或 pGEX-4T-1 质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单菌落接种于 3 mL LB(100 mg/mL Amp)培养基中,150 r/min 37 ℃摇床培养过夜,次日以 1∶100 比例转接于 2 × YTA(100 mg/mL Amp)培养基中,37 ℃摇床培养 3 h(光密度值为 0.6 ~ 0.8),分别加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 1、3、5、8 h。分别离心收集菌体,并用 1 mL 预冷 PBS,按 100 mg 菌体加入1 mL 非变性裂解液的比例重悬菌体,经冰浴超声破碎后,离心分离上清,样品进行 10% SDS-PAGE 分离后用考马斯亮蓝(coomassieblue,CBB)染色鉴定融合蛋白表达。

1.2.5 融合蛋白 GST-RI 的纯化与检测 证实融合蛋白有正确表达后,pGEX-4T-RI 或 pGEX-4T-1 转化 BL21(DE3)后,大量摇菌诱导融合蛋白表达,冰浴超声破碎菌体离心收集上清,按 1 mL 上清加入 10 μL 的 sepharose 4B gel 的比例,于 4 ℃孵育 1 ~ 2 h 后,将混合液 500 × *g* 离心 5 min,预冷 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,离心收集珠子,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0)的

还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱珠子,500 × *g* 离心 5 min,收集上清,将纯化后的样品进行 SDS-PAGE 分析,利用考马斯亮蓝染色法和蛋白印迹法检测纯化效果。

1.2.6 pCMV-3 × flag-ANG 转染细胞 取对数生长期的 293 细胞接种于 10 cm 的培养皿中,待长至 90% 时开始转染实验,按照脂质体 Lipofectamine 2000 说明书进行操作,分别将 pCMV-3 × flag -ANG 或 pCMV-3 × flag 转染 293 细胞。48 h 后收集细胞,并用 RIPA 裂解液裂解细胞,4 ℃离心获得细胞裂解液。

1.2.7 GST pull down 实验 向转染有 pCMV-3 × flag-ANG 或 pCMV-3 × flag 的细胞裂解液中加入干净的 sepharose 4B gel,离心收集上清。将上清加入结合有 GST-RI 或 GST 蛋白的 sepharose 4B gel 中,4 ℃摇床孵育 2 h,低速离心,预冷 PBS 洗涤 3 次,每次 1 min,小心吸弃上清,加入 loading buffer,进行 SDS-PAGE 并用 Western blot 检测。

1.2.8 免疫共沉淀实验 将 293 细胞接种于 10 cm 的培养皿,将 pcDNA3.1-myc-RI 或 pcDNA3.1-myc 和 pCMV-3 × flag 或 pCMV-3 × flag-ANG 两质粒共转染进 293 细胞,转染后 48 h 分别收获细胞,提取蛋白,加入 2 μg 的 Myc 抗体,4 ℃缓慢摇动过夜,再加入 40 μL 充分重悬的 protein G + A agarose,4 ℃缓慢摇动 3 h 10 000 × *g* 离心 5 min,小心吸除上清,用 PBS 洗涤沉淀 5 次,完成最后一次洗涤后,去除上清,加入 20 ~ 40 μL 的 1 × SDS-PAGE 电泳上样缓冲液,重悬,离心,沸水浴 3 ~ 5 min,样品稍离心后取样立即用于 SDS-PAGE 电泳并进行 Western blot 检测。

1.2.9 FRET 将 293 细胞接种于共聚焦专用培养皿中,待长至 80% 时,共转染 pECFP-RI 和 pEYFP-ANG,24 h 后,PBS 洗涤,换液,激光共聚焦显微镜观察,分别以 488 nm 和 558 nm 作为激发波长,检测供体 CFP-RI 融合蛋白与受体 YFP-ANG 融合蛋白发出的绿色荧光和红色荧光,再用 514 nm 的激发波长对受体荧光进行淬灭漂白。根据 FRET 检测原理,如果供体和受体的两个荧光蛋白之间存在相互作用,其距离在 10 nm 以内的时候,将受体蛋白的荧光进行淬灭漂白后,供体蛋白的荧光强度(intensity)会增加。

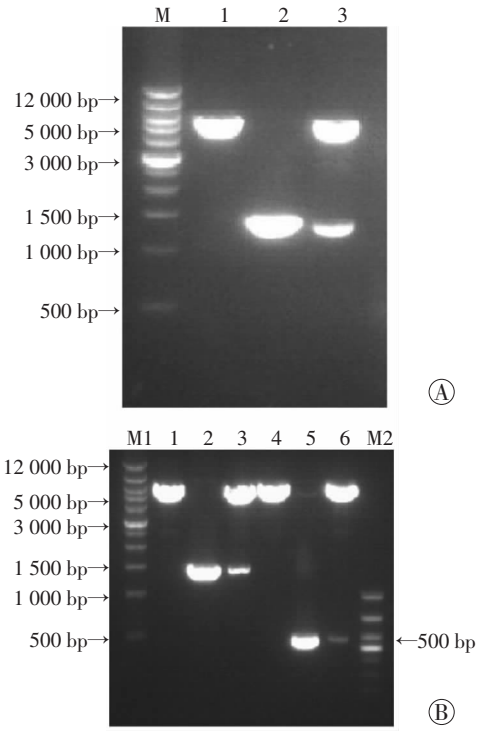
2 结果

2.1 RI 和 ANG 蛋白在 T24 细胞中的共定位

封片后,于共聚焦显微镜下观察结果显示 ANG 蛋白在细胞质和细胞核均有表达,RI 蛋白的表达也位于细胞质和细胞核,二者融合之后可以观察到有黄色的区域出现,再通过 DAPI 标记细胞核,可以发现 RI 和 ANG 蛋白在 T24 膀胱癌细胞核和细胞质都有明显的颜色融合(图 1)。实验说明 RI 与 ANG 蛋白在细胞内存在共定位的现象。

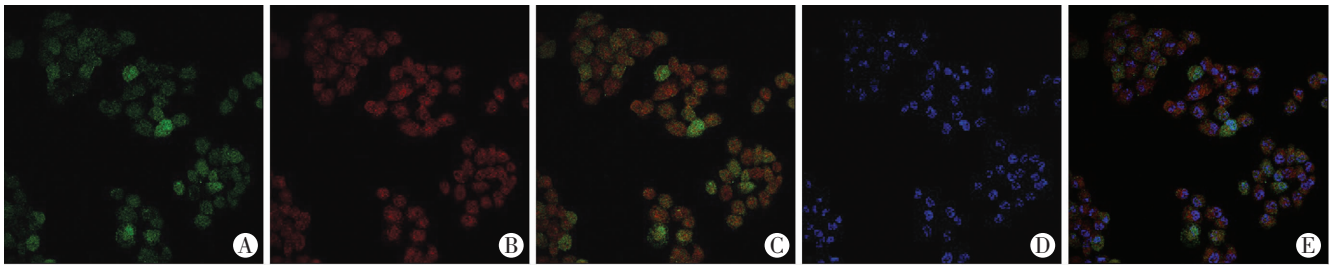
2.2 pGEX-4T-RI、pECFP-RI 和 pEYFP-ANG 重组载体的鉴定

双酶切、电泳后结果显示,在近 1 400 bp 处的条带为酶切后的目的基因 RI 与 PCR 条带吻合,在近 500 bp 处为酶切后的目的片段 ANG 的编码基因,也与 PCR 结果吻合(图 2)。测序结果分析也表明重组载体构建成功。



A:pGEX-4T-RI 重组载体的酶切鉴定 M:12 000 bp 标准;1:pGEX-4T-1 双酶切(*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ)产物;2:RI PCR 产物;3:pGEX-4T-RI 双酶切(*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ)产物;B:pECFP-RI 和 pEYFP-ANG 重组载体的酶切鉴定 M1:12 000 bp 标准;1:pECFP-N1 双酶切(*Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ)产物;2:RI PCR 产物;3:pECFP-RI 双酶切(*Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ)产物;4:pEYFP-N1 双酶切(*Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ)产物;5:ANG PCR 产物;6:pEYFP-ANG 双酶切(*Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ)产物;M2:1 000 bp 标准

图 2 pGEX-4T-RI、pECFP-RI 和 pEYFP-ANG 重组载体的酶切鉴定

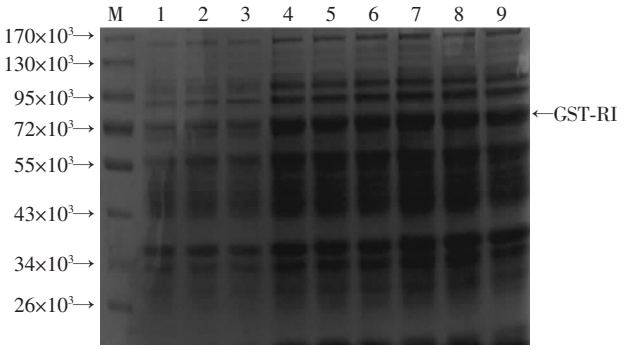


A:ANG 蛋白(绿色)在 T24 细胞中的定位情况;B:RI 蛋白(红色)在 T24 细胞中的定位情况;C:RI 蛋白和 ANG 蛋白重叠共定位情况;D:T24 细胞的细胞核的位置和形态(DAPI 核染,蓝色);E:RI 蛋白、ANG 蛋白和细胞核在 T24 细胞中的重叠共定位情况

图 1 激光共聚焦显微镜观察荧光标记的 RI 与 ANG 蛋白在 T24 细胞中的共定位 (×200)

2.3 GST-RI 融合蛋白的表达及优化

经诱导后,0.1 mmol/L 的 IPTG 在不同的诱导时间下细菌超声破碎产物进行 10% SDS-PAGE 鉴定,考马斯亮蓝染色可见在 76×10^3 的位置有目的蛋白条带出现,当 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 3 h 和 5 h 时融合蛋白表达较高(图 3)。



M:蛋白标准;1~3:IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 pGEX-4T-RI 1 h 破菌后上清;4、5:IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 pGEX-4T-RI 3 h 破菌后上清;6、7:IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 pGEX-4T-RI 5 h 破菌后上清;8、9:IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 pGEX-4T-RI 8 h 破菌后上清

图 3 GST-RI 融合蛋白在 BL21 中的表达和优化情况

2.4 GST-RI 融合蛋白纯化的鉴定

考马斯亮蓝染色结果显示,经 sepharose 4B gel 纯化后的 GST、GST-RI 融合蛋白分别在 26×10^3、76×10^3 处有特异性条带(图 4A),蛋白免疫印迹结果显示,经 RI 抗体孵育的纯化 GST-RI 融合蛋白在 76×10^3 处出现有特异性反应条带(图 4B),经 GST 抗体孵育的纯化 GST、GST-RI 融合蛋白在 26×10^3、76×10^3 处出现特异性反应条带(图 4C),与预期是相符合的。

2.5 GST pull down 结果

Western blot 显示转染 pCMV-3 × flag - ANG 的细胞裂解液即 ANG 蛋白能结合 GST-RI 并被沉降下来,说明 GST-RI 融合蛋白能与 ANG 蛋白发生相互结合作用(图 5)。

2.6 免疫共沉淀实验确认 RI 与 ANG 在 293 细胞内的相互作用

为了更进一步研究 RI 与 ANG 在细胞内的相互作用,将 pcDNA3.1-myc-RI 和 pCMV-3 × flag-ANG 共转染 293 细胞,破碎细胞抽提裂解物与抗-Myc 抗体进行免疫沉淀试验,随后用抗-RI 及抗-ANG 抗体实施 Western blot 测定,结果显示:只有当 pcDNA3.1-myc-RI 和 pCMV-3 × flag-ANG 共转染后,在经抗-Myc 抗体沉淀的 Myc-RI 相互作用蛋白复合物中,才可以检测到 Flag-ANG 的表达(图 6),表明 RI 与 ANG 存在相互作用。

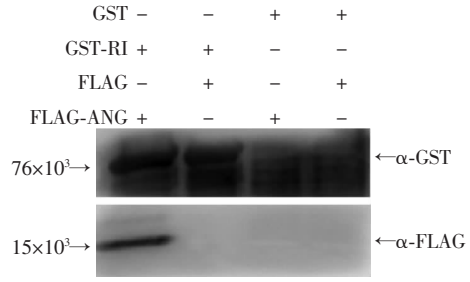


图 5 RI 与 ANG 蛋白的 GST pull down 检测结果

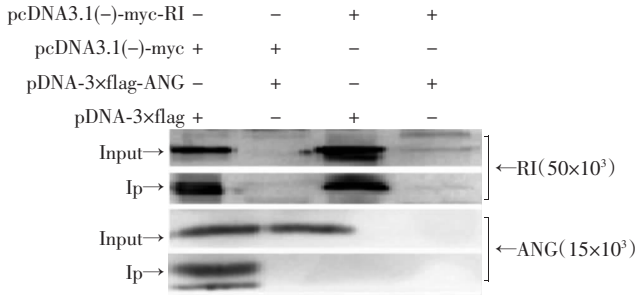
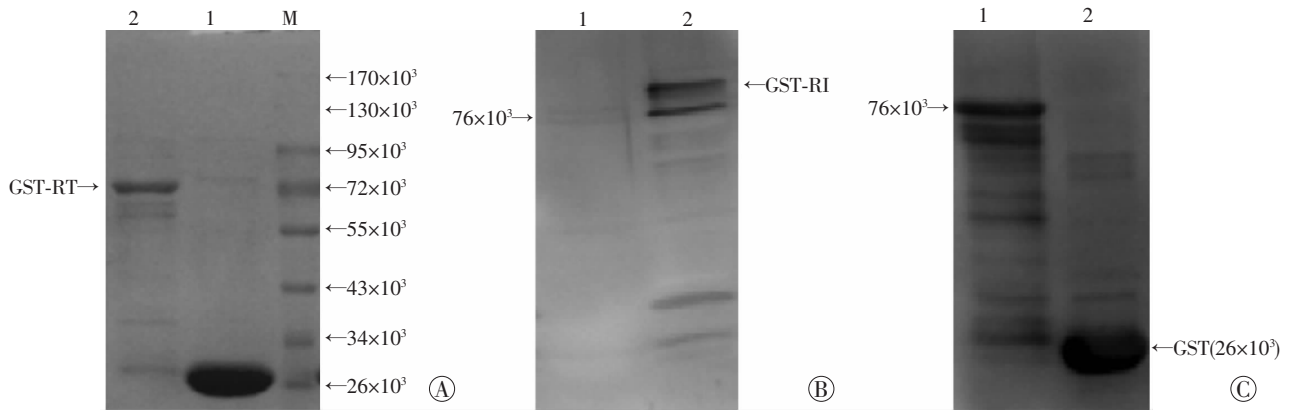


图 6 免疫共沉淀实验鉴定 RI 与 ANG 间的相互作用

2.7 FRET 检测二者在 293 细胞中的相互作用

为了确认 FRET 现象,pECFP-RI 和 pEYFP-ANG 共转染 293 细胞 24 h 后,以 488 nm 和 558 nm 为激发波长,激光共聚焦下观察检测 CFP-RI 和 YFP-ANG 发出的绿色荧光和红色荧光,再利用强 514 nm 的激发波长对 YFP 进行淬灭漂白,以阻断 CFP 到 YFP 的能量转移,通过观察漂白前后 CFP 荧光强度的变化。结果表明淬灭漂白受体 YFP 后,供体 CFP-RI 的 CFP 荧光强度显著升高(图 7),结果表明 CFP-RI 和 YFP-ANG 二者之间发生了能量转移,存在 FRET 现象,说明 RI 与 ANG 在细胞内存在相互作用。



A:考马斯亮蓝染色检测融合蛋白 GST-RI;B:RI 抗体检测融合蛋白 GST-RI 的表达;C:GST 抗体检测融合蛋白 GST-RI 的表达 M:蛋白标准;1:GST融合蛋白;2:GST-RI 融合蛋白

图 4 检测纯化的 GST 和 GST-RI 融合蛋白的表达

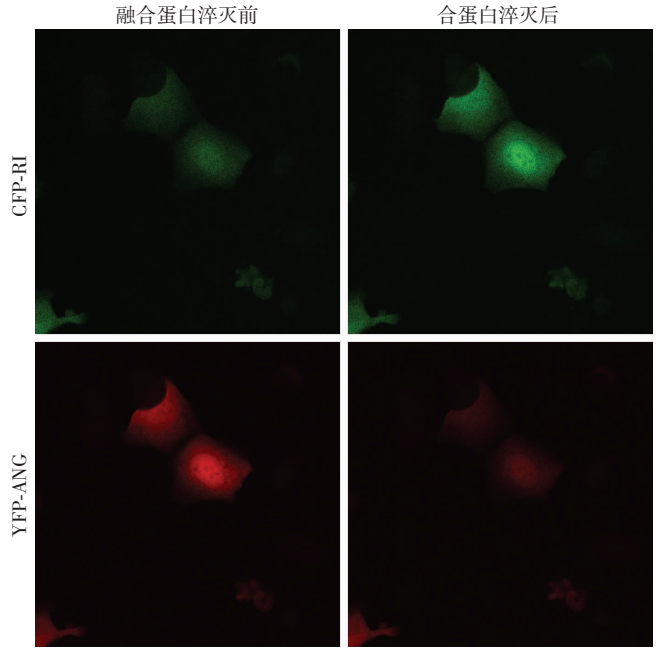


图7 FRET实验鉴定RI与ANG间的相互作用 （激光共聚焦显微镜 ×800）

3 讨论

RI的相对分子质量为50×10^3，它由461个氨基酸组成的胞质酸性蛋白，包含32个半胱氨酸残基和LRRS。ANG是核糖核酸酶超家族中唯一能诱导血管生成的一员，同时在血管生成因子家族中又是一个拥有低核糖核酸酶活性的蛋白。

前期的实验研究中发现在膀胱癌细胞中RI的表达呈现上调，并且会影响动物新生血管的形成[9-10]，另外通过RI基因的过表达，ANG在mRNA转录水平和蛋白翻译水平上都存在表达的下降，并在一定程度上抑制了血管内皮细胞的增殖及迁移，并且RI与ANG在HUVECs内存在结合[11]。本研究通过293细胞完成免疫共沉淀的实验来研究RI与ANG在细胞内的相互作用，结合本研究的其他实验以全面和系统地阐明RI与ANG的相互作用。另一方面，在膀胱癌细胞中过表达RI之后，也会显著抑制新生血管的生成[12]。ANG被认为在癌症进展的血管生成和癌细胞增殖中发挥双重作用[13]。其他实验也表明，RI可有效地抑制肿瘤诱导的血管生成[14-15]。因此我们推测RI与ANG之间可能存在某种形式的结合和相互作用来影响血管生成。本实验通过免疫细胞化学的方法，共聚焦显微镜观察到RI与ANG在293细胞内存在共定位现象，带有绿色荧光标记的ANG蛋白与带有红色荧光标记的RI蛋白在细胞质和细胞核均有一定程度的重叠，研究表明共定位现象的存在在一定程度上说明蛋白间会存在相互作用[16-17]，为了进一步验证RI与ANG之间的关系，我们又构建了pECFP-RI和pEYFP-ANG重组载体进行了FRET实验，同时利用已有的载体进行了免疫共沉淀实验，结果同样表明RI与ANG蛋白在哺乳动物细胞内存在相互结合作用，除此之外，为了进一步研究RI与ANG在体外的反应体系中是否也存在蛋白间的相互作用，我们构建了原核表达的pGEX-4T-RI质粒，并表达纯化出GST和GST-RI融合蛋白，与内源性的ANG蛋白进行GST pull down实验，结果表明，ANG蛋白能够被外源性的GST-RI沉淀下来。GST pull down方法特异性比较强，对于蛋白质相互作用的研究应用非常广泛[18]。

针对本实验中细胞选择的情况，我们选择293细胞来进行免疫共沉淀实验、GST pull down实验和FRET实验是因为它自身蛋白质表达系统很稳定，且转染效率高，蛋白表达水平高；之所以另外选择T24细胞来做共定位实验是因为本课题组后续将进行一些T24膀胱癌细胞体内实验和动物实验，故选择了T24细胞来进行共定位实验。T24细胞是膀胱癌细胞株，RI在本课题组在前期的实验中证明RI为抑癌基因，在T24中有表达，过表达RI可以有效地抑制人膀胱癌T24细胞的侵袭，转移及EMT发生，众所周知，肿瘤的侵袭和转移很大程度上依赖于肿瘤新生血管的生成为其提供基础，而肿瘤新生血管的生成与ANG之间存在很大的关系，RI抑制人膀胱癌T24细胞侵袭，转移及EMT的发生的机制还未进一步阐明，故通过RI与ANG相互作用研究，可以进一步揭示膀胱癌在其发生发展中的一些生物学上的机制和关系。我们后续的工作将围绕RI与ANG的相互作用在膀胱癌的发生发展中的生物学影响来开展。因此，本研究表明在真核细胞和原核细胞中RI与ANG蛋白都存在相互作用，也为下一步继续探讨二者的相互作用分子机制和作用奠定了很好的基础。

另一方面，ANG可以通过激活PI3K/AKT/mTOR通路和ANG的核转位来刺激肿瘤的生长和发展[13]，RI通过与ANG的相互作用可能会在一定程度上通过这两个方式的抑制来实现，因此，我们接下来将对其生物学方面进行研究，以进一步揭示RI与ANG相互作用的意义，为寻找新的肿瘤药物提供科学线索。

参考文献：

[1] Shapiro R. Cytoplasmic ribonuclease inhibitor[J]. Methods Enzymol, 2001, 341: 611-628.

[2] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(6): 725-732.

[3] Nekrasov A N, Zinchenko A A. Structural features of the interfaces in enzyme-inhibitor complexes [J]. J Biomol Struct Dyn, 2010, 28(1): 85-96.

[4] Chen J, Ou-Yang X, Gao J, *et al*. Knockdown of ribonuclease inhibitor expression with siRNA in non-invasive bladder cancer cell line BIU-

87 promotes growth and metastasis potentials[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 349(1/2): 83-95.
[5] 潘湘阳, 李红彦, 姚雪, 等. 核糖核酸酶抑制因子过表达抑制B16细胞的侵袭和转移[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 284-289.
[6] 姚雪, 熊冬梅, 舒静, 等. 过表达人RI抑制人膀胱癌T24细胞的侵袭, 转移及EMT发生[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(23): 2378-2383.
[7] Chen J X, Gao Y, Liu J W, *et al*. Antitumor effects of human ribonuclease inhibitor gene transfected on B16 melanoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(6): 1219-1231.
[8] Fang S, Repo H, Joensuu H, *et al*. High serum angiogenin at diagnosis predicts for failure on long-term treatment response and for poor overall survival in non-Hodgkin lymphoma [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(11): 1708-1716.
[9] Gao J, Zhu J, Li H Y, *et al*. Small interfering RNA targeting integrin-linked kinase inhibited the growth and induced apoptosis in human bladder cancer cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(9): 1294-1304.
[10] Zhu J, Pan X, Zhang Z, *et al*. Downregulation of integrin-linked kinase inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in bladder cancer cells[J]. Cell Signal, 2012, 24(6): 1323-1332.
[11] 李红彦, 潘湘阳, 姚雪, 等. RI基因真核表达载体的构建及其对人脐静脉内皮细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(16): 1591-1595.
[12] Yao X, Li D, Xiong D M, *et al*. A novel role of ribonuclease inhibitor in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and ILK signaling pathway in bladder cancer cells [J]. Cell Tissue Res, 2013, 353(3): 409-423.
[13] Li S, Hu G F. Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2010, 1(1): 26-35.
[14] Botella-Estrada R, Malet G, Revert F, *et al*. Antitumor effect of B16 melanoma cells genetically modified with the angiogenesis inhibitor rnasin [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(4): 278-284.
[15] Fu P, Chen J, Tian Y, *et al*. Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 12(3): 268-275.
[16] 马洪峰, 郭星, 李晓瑜. 喉鳞状细胞癌中STK15蛋白和BUBR1蛋白的表达及相互作用[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(7): 631-634.
[17] 金芳敏, 钱冠华, 杨艳, 等. 人NIRF蛋白与HBV核心蛋白相互作用的初步研究[J]. 生命科学研究, 2011, 15(1): 1-5.
[18] 涂占晗, 林旭. 蛋白质相互作用研究的常用方法进展及比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19(14): 18-20.

(**收稿**:2013-11-25;**修回**:2014-02-05)
(编辑 郭建秀)

文章编号:1000-5404(2014)14-1459-01

经验交流

肾炎康复片联合依那普利治疗慢性肾炎疗效观察

周长岳 (401320 重庆,重庆市巴南区人民医院肾内科)

[**关键词**] 慢性肾炎;肾炎康复片;依那普利;临床疗效
[**中图法分类号**] R692.305 [**文献标志码**] B

慢性肾炎是临床中常见疾病,在临床中具有较高的发病率,患者常常表现为不同程度的肾衰竭并发症,严重地影响患者的生活质量。临床中常常给予免疫抑制剂和激素进行治疗,但是其治疗效果并不理想[1]。我科结合多年的临床工作经验,对慢性肾炎患者给予肾炎康复片与依那普利联合治疗,取得了较好的疗效。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院2012年收治的256例慢性肾炎患者临床资料,按随机数字法分为研究组和对照组,各128例。研究组中男性70例,女性58例,年龄22~60(43.1±3.4)岁,病程2~9(4.2±1.2)年。其中增生硬化性肾小球肾炎35例,膜性肾病30例,局灶节段硬化31例,IgA肾病32例。对照组中男性66例,女性62例,年龄24~60(44.7±3.2)岁,病程2~10(4.7±1.1)年。其中增生硬化性肾小球肾炎34例,膜性肾病30例,局灶节段硬化32例,IgA肾病32例。研究组和对照组性别比、病程时间和疾病类型等资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入患者均签署知情同意书。

1.2 纳入标准与排除标准

纳入标准:①符合慢性肾炎的临床诊断标准;②病程1年以上;③持续蛋白尿,且24 h尿蛋白定量不足3.0 g;④伴有水肿和高血压等症状;⑤18岁以上。排除标准:①继发性肾脏病;②入组前使用过其他药物,如激素、免疫抑制剂等。

1.3 治疗方法

两组患者均给予预防感染和利尿等常规的治疗,对照组给予口服10.0 mg依那普利(国药准字:H32026568,江苏制药股份有限公司生产),2次/d[2];研究组在对照组治疗基础上口服1.5 g肾炎康复片(国药准字Z10940034,天津同仁堂集团股份有限公司生产),3次/d。两组患者均连续治疗3个月进行效果评估[3]。观察患者临床疗效、血肌酐(SCr)、尿素(BUN)、24 h尿蛋白定量、尿微量蛋白排泄率、不良反应。

1.4 疗效评估

患者的临床治疗效果主要依据《中药新药治疗慢性肾炎临床研究指导原则》中的疗效标准[4]进行评估。

1.5 统计学处理

采取SPSS 14.0统计软件,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,独立样本资料进行t检验,组间计数资料采取χ^2检验。

[**通信作者**] 周长岳,E-mail:28013594@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140710.0859.005.html(2014-07-10)

(下转1471页)