基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0257-05

肝再生增强因子,细胞色素 P450 与人肝癌细胞在体外耐药的关系

徐永红,孙 航,郭 晖,钱克莉,张臣丽,刘 杞
(重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究肝癌顺铂耐药细胞 HepG2/cDDP 中人肝再生增强因子(Human augmenter of liver regeneration,hALR)对细胞色素 P450(Cytochrome P450,CYP450)表达的影响,观察 ALR 是否通过作用 CYP450 与肝癌细胞耐药的形成有关。方法:建立体外肝癌顺铂耐药细胞系、MTT 检测耐药指数;将构建好的人肝再生增强因子 siRNA 表达质粒 psiALR-A 及其阴性对照质粒 psiALR-B 采用脂质体转染的方法分别转染至 HepG2/cDDP 细胞,荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,计算转染效率。根据转染不同的质粒,将 HepG2/cDDP 细胞分为 3 组:转染组(转染 psiALR-A),对照组(转染 psiALR-B),空白组(未转染重组质粒)。免疫细胞化学法、免疫印迹法、实时荧光定量 PCR 法检测转染细胞中 hALR 和 CYP450 的表达,化学发光法检测各组细胞中 CYP3A4 的活性,MTT 比色法检测各组细胞对顺铂敏感性的变化。结果:耐药模型成功建立,耐药指数为 6.26;成功转染质粒 psiALR-A 和 psiALR-B;转染组细胞中 hALR 表达明显减少,CYP450 的表达明显增加,活性升高,而对照组和空白组细胞中 hALR 和 CYP450 表达没有明显的变化。MTT 结果显示转染组细胞对顺铂的敏感性降低,对照组和空白组细胞对顺铂的敏感性没有明显变化。结论:阻断人肝再生增强因子的表达后,HepG2/cDDP 细胞 CYP450 表达明显增加,活性增强,对顺铂的敏感性下降,ALR 可能通过作用 CYP450 在肝癌细胞耐药的发生发展中起着重要作用。

【关键词】肝再生增强因子;CYP450;肝癌;顺铂;药物耐受性;RNA 干扰
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-15

The relationship between augmenter of liver regeneration, cytochrome P450 and the drug resistance of induced human hepatocellular carcinoma drug-resistant cells in vitro

XU Yong-hong, et al
(*Institute for Viral Hepatitis, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of augmenter of liver regeneration (hALR) in cisplatin (cDDP) induced human hepatocellular carcinoma drug-resistant cells (HepG2/cDDP) on the expression of cytochrome P450, and detect whether ALR has relationship with the drug resistance of human hepatocellular carcinoma cells by affecting CYP540. *Methods*: A drug resistant human hepatoma cell line (HepG2/cDDP) induced by cisplatin was established in vitro, and its resistance index was evaluated by MTT assay. The expressing siRNA plasmid psiALR-A targeting hALR and the unrelated control plasmid psiALR-B were constructed successfully and transfected into HepG2/cDDP cells with lipofectamine 2000 methods, respectively; the expression of green fluorescent protein was observed under a fluorescence microscope to calculate transfection efficiency. According to different plasmid transfection, HepG2/cDDP cells were divided into three groups: transfection group (transfected psiALR-A), control group (transfected psiALR-B), and blank control group (non-transfected with the recombinant plasmid). The protein and mRNA level of hALR and CYP450 in each group of cells were measured by immunocytochemistry, Western Blot and Real-time FQ-PCR. The activities of CYP450 in each group of cells were detected by chemiluminescence; drug sensitivity to cDDP in each group cells was detected by MTT assay. *Results*: HepG2/cDDP cell line was established successfully with stable resistance to cDDP, and the resistance index (RI) was 6.26. Plasmid psiALR-A targeting hALR and the unrelated control plasmid psiALR-B were transfected successfully. In transfection group, the level of hALR protein and mRNA expression decreased significantly, but the level of CYP450 protein and mRNA expression increased significantly. In the control group and blank control group, there was no obvious change. The activities of CYP450 were increased significantly and the sensitivity to cDDP was decreased in transfection group; however, there was no obvious change in the control group and blank control group. *Conclusion*: The level of CYP450 expression and the activities of CYP450 are increased significantly, but the sensitivity to cDDP is decreased in transfection group. ALR may play an important role in the occurrence and development of the drug resistance of hepatocellular carcinoma cells.

【Key words】 augmenter of liver regeneration; cytochrome P450; hepatocellular carcinoma; cisplatin; drug resistance; RNA interference

作者介绍:徐永红(1984-),女,硕士,
研究方向:肝再生增强因子与肝癌。
通信作者:刘 杞,男,教授,Email:liuqiz@hotmail.com。
资金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30570826)。

人肝再生增强因子(Human augmenter of liver regeneration, hALR)是一种具有热稳定性、非特异促进肝细胞再生的细胞因子[1],在肝癌发生、发展过程中发挥重要的作用[2-8]。细胞色素 P450(Cytochrome P450,CYP450)酶系是药物代谢中最重要的一个系统,CYP3A4 是其中最重要的一种同工酶[9],CYP3A4 在人类肝脏和小肠中表达最丰富,与大量药物的代谢和药物之间的不良反应用有关[10]。CYP3A4 参与 50%以上目前常用药物在体内的代谢转化过程[11],因此 CYP450 与化疗药物耐药之间关系愈发受到人们的关注。研究表明 ALR 可以抑制原代培养的肝细胞中 CYP540 在蛋白和 mRNA 水平的表达,降低其活性[12]。但 ALR 是否通过影响 CYP450 表达,进而影响肝癌细胞耐药的发生,目前还不清楚。为阐明 ALR 是否与肝癌耐药细胞中 CYP3A4 的表达相关, 可以通过 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术干扰 ALR 的表达后,观察 CYP3A4 表达的变化。因此,将已构建好的 ALR 小干扰 RNA 阳性质粒 psiALR-A 和其阴性对照质粒 psiALR-B 转染肝癌耐药细胞(HepG2/cDDP),观察 hALR 及 CYP450 的表达变化,为观察 ALR 是否通过抑制 CYP450 的表达水平间接参与肝癌细胞耐药的发生、发展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞

质粒 psiALR-A[13](人肝再生增强因子的 siRNA)、psiALR-B[13](阴性对照质粒)、人肝癌细胞株 HepG2 由重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所提供。

1.2 主要试剂

DNA marker 购于宝生物(大连)有限公司;脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购于美国 Invitrogen 公司;免疫细胞化学试剂盒及 DAB 显色试剂盒购于康为世纪生物科技有限公司;大量质粒提取试剂盒购于美国 OMEGA 公司;总 RNA 提取试剂盒及总蛋白提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司;胎牛血清购于美国 HyClone 公司。CYP3A4 化学发光试剂盒购于美国 Promega 公司。CYP3A4 抗体购于上海艾碧康生物制品有限公司;抗 hALR 单克隆抗体由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。其余试剂由重庆医科大学病毒性肝炎研究所供应室提供。

1.3 细胞培养

将 HepG2 细胞自液氮中复苏,用含 10%胎牛血清的RPMI1640 培养液作为培养基,细胞进行常规培养和传代。

1.4 耐药细胞株 HepG2/cDDP 的诱导

采用逐步递增 cDDP 浓度,持续作用的方法诱导。取对数生长期 HepG2 细胞接种至含 cDDP 的 RPMI1640 培养液中,从低浓度(0.1 μg/ml)开始,48 h 换液 1 次,当变圆或脱落的 HepG2 细胞与贴壁生长的 HepG2 比例小于 20%时,增加调整 cDDP 量。如此反复换液、传代,逐步提高 cDDP(0.1 μg/ml-0.2 μg/ml-0.4 μg/ml-0.8 μg/ml- 1.0 μg/ml)持续诱导,最终获得 1 株能耐受 1.0 μg/m 1cDDP 的细胞系,命名为 HepG2/cDDP。

1.4 MTT 法检测顺铂的细胞毒作用[14]

96 孔培养板内加入 5×10^4 个/ml 单细胞悬液,每孔 200 μl,并加入倍比稀释成 5 种浓度的顺铂 20 μl,每一浓度重复 6 孔,设空白对照及细胞对照,置于 37℃,5% CO_2 孵箱内培养 48 h,加 5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸去上清液,再加入 DMSO 200 μl,振荡 5 min,用自动酶标读数仪(Spectra-Max M2 酶标仪,USA)测定 490 nm 波长的光密度值(D)值,按下面公式计算药物对细胞的抑制率:抑制率(%)=(1-$D_{实验组}$/$D_{对照组}$)×100,用 SPSS13.0 软件计算出顺铂的半数抑制浓度(IC_{50}),并计算耐药指数(Resistance index,RI),RI= IC_{50} 耐药细胞 /IC_{50} 亲代细胞。

1.5 重组质粒抽提

将冻存的质粒 psiALR-A[含绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)表达基因]、psiALR-B[含绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)表达基因],分别进行转化、卡那霉素抗性筛选。根据 OMEGA 大量抽提质粒试剂盒说明书抽提质粒,供转染细胞用。

1.6 重组质粒转染

重组质粒的转染及转染后 GFP 的表达:以合适的密度(3~4)×10^5 个/ml 将 HepG2/cDDP 细胞接种于 6 孔板,在无抗生素、含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养待细胞达到 80%~90%的融合度时进行转染。Lipofectamine 2000 说明书分别进行 psiALR-A、psiALR-B 转染,并于转染后 4~6 h 更换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养[15]。细胞转染 24 ~ 48 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,以判断转染是否成功,并照相。随机选择 5 个高倍视野(20×10 倍),计数绿色荧光细胞数及总细胞数,绿色荧光细胞发生率 =(绿色荧光细胞数/总细胞数)×100%,以确定转染成功率。

1.7 蛋白质印迹法检测 hALR 和 CYP3A4 在蛋白水平的表达变化

各处理组细胞经裂解液提取蛋白后,常用 BCA 法定量蛋白浓度。蛋白变性后在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,完毕后将蛋白电转移到 PVDF 膜上,用含 5% BSA 的 TBST 缓冲液封闭 1 h。加入特异性一抗和相对应的二抗。最后 DAB 显色检测目的条带,拍照后采用 BandScan5.0 图像分析软件进行扫描分析。采用特异性基因光密度/管家基因光密度(β-actin)相对定量。

1.8 免疫细胞化学法检测 hALR 和 CYP3A4 在蛋白水平的表达变化

按照 1.2.5 所示方法转染重组质粒,转染 24 h 后 PBS 洗 3 次,4%多聚甲醛固定,PBS 洗 3 次,0.5%Txiton-X100 处理(室温)60 min,PBS 洗 3 次。按照康为世纪免疫组化二步法试剂盒说明书进行染色, DAB 显色,图像采集。

1.9 RNA 抽提及荧光定量 PCR 分析

使用 RNA 抽提试剂盒提取 RNA,测量其浓度及 OD 值。按照 TAKARA RNA PCR KIT(AMV)VER,3.0 DRR019A 说明书将 RNA 逆转录合成 cDNA.使用 SYBR Premix Ex TaqTM II

(Perfect Real Time) DRR081S 试剂盒进行定量 PCR 反应。引物序列见表 1。以 Sybr Green 作为荧光标记物,在 ABIPRISM 7300 荧光实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。使用两部法 PCR 扩增标准程序,反应条件如下:预变性 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。使用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法来计算相对 mRNA 的含量,△CT=CT(目的基因)-CT(参照基因 GADPH),△△CT=△CT(转染组)-△CT (对照组或者空白组),$2^{-\triangle\triangle CT}$ 表示转染组 RNA 的含量较对照组或空白组的倍数。

表 1 荧光定量 PCR 中的引物序列

基因	引物(5'-3')
hALR(F)	GCAAGACATGGCCCAGTTCATACA
hALR(R)	GTTCACTTCATTGTGCAGGTGGCA
CYP3A4(F)	TGCTCTTCACCGTGACCCAAAGTA
CYP3A4(R)	GAGCAAACCTCATGCCAATGCAG
GADPH(F)	TGATTCTACCCACGGCAAGTT
GADPH(R)	TGATGGGTTTCCCATTGATGA

1.10 化学发光法检测 CYP3A4 的活性

将 HepG2/cDDP 单细胞悬液接种于 96 孔板,每组设 6个复孔,接种密度为 1 万/孔,同时做空白对照。待细胞贴壁后,转染 psiALR-A, psiALR-B, 转染 24 h 后,按照 1:40 的比例,每孔加入 Luciferin-PFBE 1.5 μl,培养液 58.5 μl。在 37℃孵箱作用 3~4 h 后,按照 1:1 的比例,取上述反应液 50 μl,新鲜培养液 50 μl,室温下作用 15~20 min,多功能酶标仪检测各孔细胞光密度值。各处理组细胞光密度值减去空白对照组光密度值,即所需结果 A 值,实验重复 3 次。

1.11 MTT 比色法检测转染后各组细胞对顺铂的药物敏感性

将 HepG2/cDDP 单细胞悬液接种于 96 孔板,每组设 6个复孔,接种密度为 1 万/孔,待细胞贴壁后,转染 psiALR-A, psiALR-B,转染 24 h 后,选取 10 μg/ml 浓度的顺铂加入 6 个复孔中培养 48 h,结束前 4 h 每孔加入新鲜配制的 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,结束时弃去培养液和 MTT,每孔加入 DMSO 150 μl 溶解,震荡 10 min 后,待完全溶解,酶标仪测定 490 nm 处的光密度值(D 值),实验重复 3 次。

1.12 统计学处理

数据采用 SAS9.1 统计软件进行数据分析,实验数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 个处理组的计量指标的比较采用成组设计的方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验,检验水准,$\alpha = 0.05$,若 $P<0.05$,就表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HepG2 细胞体外诱导筛选成功

采用逐步递增 cDDP 浓度持续作用的方法对 HepG2 细胞进行体外诱导筛选,历时 3 个月获得了在 1.0 mg/ml cDDP作用下生长良好的耐药细胞系 HepG2/cDDP; MTT 法检测结果表明 HepG2 野生株的 IC_{50} 是 1.69 μg/ml,HepG2/cDDP 的 IC_{50} 是 10.58 μg/ml,HepG2/cDDP 对 cDDP 的耐药指数为 6.26,属于中度耐药。

2.2 GFP 在转染细胞中的表达

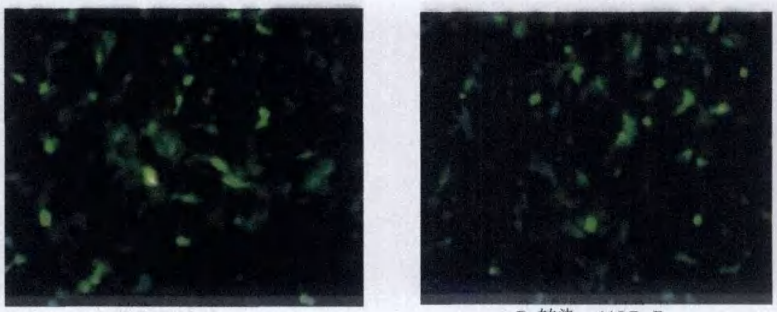
转染 24 h 后 HepG2/cDDP 细胞内有大量明亮的 GFP 表达(图 1)。经 2 种质粒转染的细胞均有 60%以上的细胞有绿色荧光的表达(转染效率),没有明显差异,说明转染是成功的。

2.3 免疫印迹法检测 HepG2/cDDP 中 hALR 和 CYP3A4 的表达

Western blot 检测结果,图像采集,BandScan5.0 图像分析软件进行扫描分析,以各组 hALR 和 CYP3A4 与自身内参 β-actin 灰度值的比作为各组细胞中 hALR 和 CYP3A4 的相对含量。实验结果(表 2、图 2,)发现转染组与空白组及对照组比较,hALR 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),CYP3A4 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),对照组与空白组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

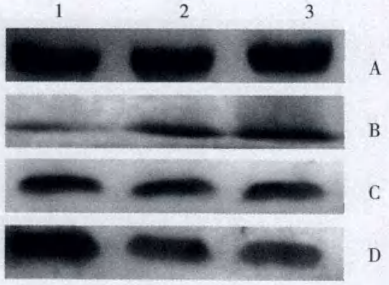
2.4 免疫细胞化学法在蛋白质水平检测各处理组 HepG2/cDDP 细胞中 hALR 以及 CYP3A4 表达水平的变化

免疫细胞化学方法证实转染组细胞染色呈极浅的棕黄色说明 hALR 表达明显减少(见图 3 B),而对照组和空白组细胞仍然呈深棕黄色,说明仍然有 ALR 表达(图 3 A 和 C)。在蛋白质水平证实 hALR 的 siRNA 表达质粒对 HepG2/cDDP 细胞表达 hALR 有抑制作用;转染组细胞染色呈极深的棕黄色说明 CYP3A4 表达明显增多(图 3 F),而对照组和空白组细胞染色没有明显变化,说明 CYP3A4 的表达没有明显变化(图 3 D 和 E)。在蛋白质水平证实 HepG2/cDDP 细胞表达 hALR 被抑制后,CYP3A4 的表达明显增加。



A. 转染 psiALR-A　　B. 转染 psiALR-B

图 1 质粒转染 HepG2/cDDP 细胞后绿色荧光蛋白的表达(×200)



A. β-actin(42 kD); B. hALR(15 kD);
C. β-actin(42 kD); D. CYP3A4(57 kD)
1. 转染组;2. 对照组;3. 空白组

图 2 人肝再生增强因子的 siRNA 对 HepG2/cDDP 细胞耐药株中 hALR 和 CYP3A4 的影响

2.5 实时定量 PCR 法检测转染后 ALR 和 CYP3A4 在 mRNA 水平变化

使用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法来计算相对 mRNA 的含量，△CT=CT(目的基因)-CT(参照基因 GADPH)，△△CT=△CT(转染组)-△CT(对照组或者空白组)，$2^{-\triangle\triangle CT}$ 表示转染组 mRNA 的含量较对照组或空白组的倍数。PCR 结果显示转染组与对照组相比，ALR 的表达减少了 58.0%；转染组与空白组比较，ALR 的表达减少了 54.0%，而对照组与空白组比较，ALR 的表达没有明显差异；转染组 CYP3A4 的表达是对照组的 3.68 倍，是空白组的 3.50 倍，而对照组和空白组相比，CYP3A4 的表达没有明显变化。

2.6 化学发光法检测 CYP3A4 的活性

严格按照 Promega CYP3A4 活性检测试剂盒说明书处理各组细胞，用化学发光法检测 CYP3A4 活性。

2.7 MTT 比色法检测转然后各组细胞对顺铂的药物敏感性

转染后检测各组细胞光密度值(D 值)的变化，结果显示

表 2 各组肝癌耐药细胞中 hALR 和 CYP3A4 蛋白检测结果($\bar{x} \pm s$)

指标	转染组	对照组	空白组
hALR	4.46 ± 0.06*#	8.47 ± 0.09	8.53 ± 0.12
CYP3A4	3.81 ± 0.04*#	1.46 ± 0.02	1.41 ± 0.02

表 3 各组肝癌耐药细胞 hALR 和 CYP3A4 蛋白检测结果($\bar{x} \pm s$)

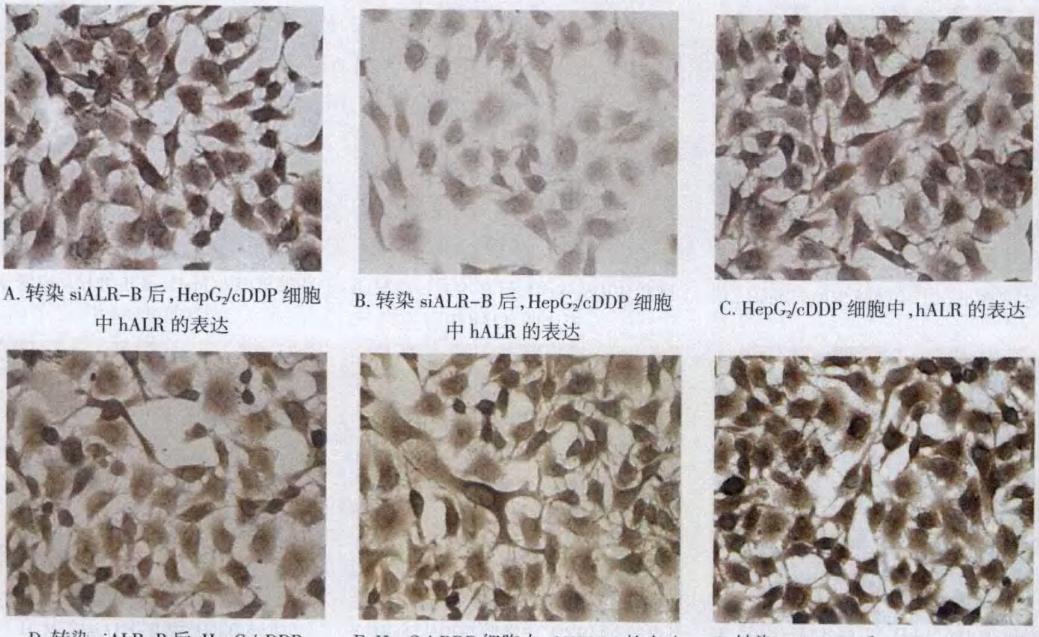
指标	转染组	对照组	空白组
hALR	0.81 ± 0.03*#	2.10 ± 0.03	2.11 ± 0.04
CYP3A4	3.16 ± 0.03*#	2.05 ± 0.03	2.07 ± 0.04

注：与对照组比较 *$P<0.05$；与空白组比较 #$P<0.05$，空白组与对照组比较，$P>0.05$

转染组光密度值明显升高，而对照组和空白组的光密度值没有明显变化，可能是 ALR 被干扰后，CYP3A4 的活性升高，顺铂灭活增加，降低了细胞对其敏感性所致。

3 讨 论

CYP450，也称肝微粒体混合功能氧化酶，主要存在于肝细胞平滑肌内质网内，由血红素蛋白(P450)、黄素蛋白(NADPH、细胞色素 c 还原酶)及磷脂 3 部分组成[16]，肝脏 CYP450 酶系统对外源性药物和毒物的代谢有非常重要的意义。最新研究表明，CYP450 酶亚型对于环磷酰胺、紫杉萜、紫杉醇、衣立替康、长春新碱等抗癌药物的使用具有极其重要的影响。CYP3A 的表达与人群对抗肿瘤药物的耐药有关，这可能是通过它对抗肿瘤药物的灭活作用而产生的。CYP3A4 可以灭活紫杉萜、长春花碱等抗肿瘤药物。在对乳腺癌的化疗过程中，CYP3A4 阴性的肿瘤对紫杉萜的敏感性(67%)高于 CYP3A4 阳性的肿瘤组织(19%)。根据 CYP3A4 的表达，可以预计患者对紫杉萜的敏感性，从而实现个体化用药。Yao[17]等的研究发现经



A. 转染 siALR-B 后，$HepG_2$/cDDP 细胞中 hALR 的表达
B. 转染 siALR-B 后，$HepG_2$/cDDP 细胞中 hALR 的表达
C. $HepG_2$/cDDP 细胞中，hALR 的表达
D. 转染 siALR-B 后，$HepG_2$/cDDP 细胞中 CYP3A4 的表达
E. $HepG_2$/cDDP 细胞中，CYP3A4 的表达
F. 转染 siALR-A 后，$HepG_2$/cDDP 细胞中 CYP3A4 的表达

图 3 人肝再生增强因子的 siRNA 对 HepG2/cDDP 细胞耐药株中 hALR 和 CYP3A4 的影响

表 4 ALR mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

分组	△CT	△△CT	$2^{-\triangle\triangle CT}$	下调倍数
A	3.40 ± 0.28	1.24 ± 0.25	0.42 ± 0.34	0.58 ± 0.50*
B	2.20 ± 0.20	1.10 ± 0.23	0.46 ± 0.28	0.54 ± 0.37#
C	2.15 ± 0.35	0.15 ± 0.32	0.99 ± 0.31	1.00 ± 0.25△

注：转染组和对照组比较 *P<0.001；转染组和空白组比较 #P<0.001；对照组和空白组比较，△P>0.05

表 5 CYP3A4 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

	△CT	△△CT	$2^{-\triangle\triangle CT}$	上调倍数
A	8.22 ± 0.39	−1.88 ± 0.35	3.68 ± 0.57	2.68 ± 0.45*
B	10.03 ± 0.33	−1.81 ± 0.37	3.50 ± 0.49	2.50 ± 0.38#
C	10.10 ± 0.25	0.07 ± 0.30	1.05 ± 0.46	0.05 ± 0.42△

注：转染组和对照组比较 *P<0.001；转染组和空白组比较 #P<0.001；对照组和空白组比较，△P>0.05

表 6 各组肝癌耐药细胞中 CYP3A4 的活性($\bar{x} \pm s$)

处理组	复孔数	A 值
转染组	6	0.83 ± 0.03*#
对照组	6	0.34 ± 0.04
空白组	6	0.36 ± 0.03

注：* 与对照组比较，P<0.01；# 与空白组比较，P<0.01；对照组和空白组比较，P>0.05

表 7 顺铂对各组肝癌耐药细胞增值的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

处理组	复孔数	D 值
转染组	6	1.06 ± 0.07*#
对照组	6	0.81 ± 0.03
空白组	6	0.76 ± 0.03

注：* 与对照组比较，P<0.001；# 与空白组比较，P<0.001；对照组和空白组比较，P>0.05

长春花碱选择的结肠腺癌细胞耐药株高表达 CYP3A4，首次证实了肿瘤细胞株 CYPs 表达有可能参与化疗过程中耐药的形成。目前，CYP3A 的表达与抗肿瘤药物耐药性的关系还有待进一步研究。

ALR 是近年发现的一种新型的促肝再生的生长因子，其参与肝脏再生、在肝脏损伤及疾病中保护肝脏、参与组织器官的形成与发育，在免疫调控调节方面起到重要的作用[18,19]。在肝脏疾病及肝脏再生中，肝脏药物的生物转化和解毒作用主要由 P450 介导的，国外文献报道，ALR 可以降低原代培养的肝细胞内基础和诱导的 CYP450 的表达使其活性降低，由于在各种急性肝脏疾病、肝硬化，肝细胞肝癌及和胆管细胞癌中 ALR 的表达水平上升[20,21]，因此可能导致 CYP450 表达降低，从而使肝脏的药物代谢和解毒作用受到损伤。

本研究结果显示，在人耐药肝癌细胞模型中，转染组 CYP3A4 在蛋白质和 mRNA 水平的表达明显增加，活性升高，空白组和对照组 CY3A4 表达水平及活性没有明显变化，这提示在肝癌细胞中人肝再生增强因子可能抑制 CYP3A4 的表达，ALR 被干扰后，对 CYP3A4 的抑制作用降低，致使CYP3A4 的表达增加，活性增高。国外文献报道顺铂可以被 CYP3A4 和 CYP2E1 2 种酶所代谢[22]，各组细胞转染后 MTT 结果显示，转染组细胞的光密度值明显高于对照组及空白组，说明其对顺铂的敏感性明显降低，而对照组和空白组则无明显变化，其原因可能是 ALR 被干扰后，CYP3A4 的活性升高，导致顺铂代谢灭活增加，降低了细胞对它的敏感性。药物被 P450 代谢后可表现为灭活反应，即促进底物羟化，脱烃基等在分子内形成极性基团，利于通过生物转化反应；但有些药物因CYP450 的作用而活化，如环磷酰胺、甲苄肼、氮烯咪胺、氯胍等，另外有些药物因 CYP450 的作用而活性增强，如噻替派、阿霉素和依托泊苷等；ALR 在肝癌细胞中的表达水平明显增加，使 CYP450 的表达减少，活性降低，经 CYP450 代谢活化或者活性增强的化疗药物，其活性可能会明显下降，因此引起肝癌细胞对化疗药物的耐受，导致耐药的发生。综上所述，ALR 对 CYP450 的抑制作用，间接参与了肝癌细胞耐药的形成，是肝癌细胞耐药形成的机制之一。

参 考 文 献

[1] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(17): 8142-8146.

[2] 杨晓明，胡志远，谢 玲，等. 重组人肝再生增强因子在体外能刺激 HTC 肝癌细胞 DNA 合成[J]. 生理学报，1997，45(5)：557-561.

[3] 余慧锋，刘 杞. hALR 在毕赤酵母菌 GS1 15 中表达和体外活性检测[J]. 中华肝脏病杂志，2003，11(7)：421-423.

[4] Liu Q, Yu H F, Sun H, et al. Expression of human augmenter of liver regeneration in pichia pastoris yeast and its bioactivity in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(21): 3188-3190.

[5] 陈 莉，孙红柳，安 威. 重组人肝刺激因子的促增殖和抗损伤作用[J]. 解剖学报，2003，34(2)：155-158.

[6] 王 阁，房殿春，刘为纹，等. 人肝细胞生成素受体的确定及特性[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1051-1054.

[7] 唐 琳，孙 航，张 林，等. 阻断肝再生增强因子的表达对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的抑制作用[J]. 癌症，2006，25(6)：671-676.

[8] Tang L, Sun H, Liu Q, et al. Effects of the augmenter of liver regeneration on the biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. Saudi Med J, 2009, 30(8): 1001-1009.

[9] Lynch T, Price A M Y. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on drug response, interactions, and adverse effects[J]. American Family Phy

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0262-04

丙型肝炎病毒 P7 蛋白体外原核表达状况的研究

陈 可,胡接力,胡 源,张文露,王增产,汤 华,黄爱龙,蔡雪飞
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:扩增丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)P7 蛋白基因,克隆到多个原核表达系统,观察 P7 蛋白在体外表达的情况,获取具有生物学活性的 HCV P7 重组蛋白。方法:设计扩增全长 HCV P7 基因片段的特异引物,以 H/FL 质粒 DNA(含 HCV 1a cDNA 全长序列)为模板,通过 PCR 扩增全长 HCV P7 基因,定向克隆到 pQE30、pGEX 4T-2、pET32a(+)3 种不同类型的原核表达载体中。将重组后包含 HCV P7 基因的原核表达载体转化表达型大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 或 SG13009(PREP4),并做异丙基硫化-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactoside,IPTG)诱导表达,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 HCV P7 蛋白原核表达的情况。结论:获得可溶性的重组蛋白 GST-HCV P7 和 Trx-HCV P7,为进一步研究 P7 蛋白的生物学功能奠定基础。

【关键词】丙型肝炎病毒;P7 蛋白;原核表达
【中国图书分类法分类号】Q571.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-17

Study on prokaryotic expression of hepatitis C virus P7 protein

CHEN Ke, et al
(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To amplify HCV P7 gene and clone it into several prokaryotic expression systems, then investigate the effects of these working systems and harvest HCV P7 protein with biologic activity. *Methods*: Design Special primers were designed for the amplification of HCV P7 complete DNA sequence and amplify P7 DNA fragments were amplified with H/FL plasmid as template by PCR. The obtained P7 DNA fragments were directly cloned into

作者介绍:陈 可(1968-),男,实验师,
研究方向:病毒分子生物学。
通信作者:蔡雪飞,男,助理研究员,Email:xfcaiii@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81000732,30600405),
重庆市教委科学技术资助项目(编号:KJ100309)。

sician,2007,76(3):391-396.
[10] Venkatakrishnan K,von Moltke L L,Greenblatt D J.Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance[J].Clin Pharmacokinet,2000,38(2):111-180.
[11] Zhou S F.Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring[J].Ther Drug Monit,2007,29(6):687-710.
[12] Wolfgang E,Thasler W E,Rania D,et al. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration[J].The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics,2006,316(2):822-829.
[13] 唐 琳,孙 航,郭 晖,等.人肝再生增强因子小干扰 RNA 表达质粒的构建和鉴定[J].中华肝脏病杂志,2004,12(9):534-537.
[14] Masters J R,Osbome E J,Walker M C,et al. Hypersensitivity of human tumor cell lines to chemotherapeutic drugs[J].Int J Canter,1993,53(2):340-346.
[15] Evarts R P,Nakatsuksa I I,Marsden E R,et al.Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation[J].Mol Carcingen,1992,5(1):25-31.
[16] 李晓宇,刘皋林.CYP450 酶特性及其应用研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):942-946.
[17] Miyoshi Y,Taguchi T,Kim S J,et al. Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers[J]. Breast Cancer,2005,12(1):11-15.
[18] 唐谢华,孙 航,刘 杞,等.肝再生增强因子对大鼠脾单个核细胞增殖及 IL-2 产生的影响[J].中国免疫学杂志,2007,23(5):467-470.
[19] 王新国,刘 杞,孙 航,等.ERK 在 ALR 抑制免疫过程中的变化及意义[J].免疫学杂志,2010,26(2):128-131.
[20] Tanigawa K,Sakaida I,Masuhara M, et al.Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J].J Gastroenterol,2000,35(2):112-119.
[21] Thasler W E,Schlott T,Thelen P,et al. Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma [J]. Histopathology,2005,47(1):57-66.
[22] Scripture C D,Sparreboom A,Figg W N.Modulation of cytochrome P450 activity:implications for cancer therapy[J].Lancet Oncol,2005,6(10):780-789.

(责任编辑:冉明会)