维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0113-03

人肝再生增强因子DNA免疫的实验研究

石小枫，刘 杞，马华锋，罗 娅
（重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：构建人肝再生增强因子（hALR）真核表达质粒，免疫家兔，获得抗hALR多抗血清。方法：将已构建的人肝再生增强因子（hALR）重组质粒 PET11-hALR，经PCR扩增，亚克隆入真核表达质粒 pcDNA3.1，构建 pcDNA3.1-hALR重组质粒。中量制备pcDNA3.1-hALR重组质粒及 pcDNA3.1对照质粒，以1.08mg/只免疫家兔，取血并分离血清，进行蛋白质 Western blot印迹分析。结果：构建了pcDNA3.1-hALR真核表达质粒，此重组质粒诱发了家兔抗hALR抗体的产生。结论：说明构建的重组质粒在体内有表达能力，为进一步研究 hALR的生物学活性及某些疾病的治疗奠定了基础。

【关键词】人肝再生增强因子；DNA免疫；Western blot
【中国图书分类法分类号】R.392.0 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-27

Experimental study on nucleic acid immunity of human augmenter of liver regeneration

SHI Xiaofeng, et al
(Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To immunize rabbit with the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-hALR and obtain antiserum against hALR. *Methods*: The hALR gene was obtained from recombinant vector PET11a-hALR by PCR technique with the primers designed. The hALR gene was subcloned into the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1. The recombinant plasmid pcDNA3.1-hALR was obtained and transformed to E.Coli DH5 α. The resistant clone was selected by ampicillin. The integrity of reading frame of hALR gene in pcDNA3.1-hALR was confirmed through the restriction endonuclease digestion and DNA sequence analysis.Recombinant plasmid pcDNA3.1-hALR and control plasmid pcDNA3.1 were prepared with Midi QIAGEN-Tip-100. DNA contents were measured by ultraviolet quantity at 260nm, respectively. After the injection of these expression plasmids into tibialis anterior of rabbit(per 1.08mg), the antiserum was obtained. The antiserum was assayed by Western blot. *Results*: It was constructed successfully for the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-hALR.After the recombinant plasmid pcDNA3.1-hALR and control plasmid pcDNA3.1 were injected into rabbits respectively, it was confirmed by Western blot that the expression of plasmid pcDNA3.1-hALR induced the production of antibody against hALR. *Conclusion*: These results suggested that recombinant vector pcDNA3.1-hALR can express the hALR in vivo and stimulate the anti-hALR antibody production. This provides a means for us to study further its biological activity and action mechanism.

【Key words】Human augmenter of liver regeneration; DNA immunity; Western blot

人肝再生增强因子（human Augmenter of liver regeneration，hALR）是新近发现并已从胎肝克隆的一种与肝再生有关的因子。国内外已先后克隆了鼠及人的ALR[1,2]，它和许多肝再生有关的因子一样，可能也参与了肝脏的生长发育调控。国内外先后用ALR作为抗原免疫动物制备了抗ALR的单克隆抗体及多克隆抗体[3,4]。在体外刺激肝癌细胞株增殖，国内外报道差异较大[1,5]，因此，我们拟构建pcDNA3.1-hALR真核表达质粒，通过免疫家兔和小鼠诱生抗hALR抗体的产生，为进一步探讨hALR的生物学活性奠定基础。

作者简介：石小枫（1964- ）男，副教授，硕士。
主要研究方向：病毒性肝炎的免疫发病机理及治疗。
基金项目：本课题受国家自然科学基金（39570651）。
国家教委骨干教师基金资助。

1 材料和方法

1.1 动物

日本大耳白雄性家兔两只，体重2.3－2.4kg，购自重庆医科大学实验动物中心，在本实验室喂养1周后进行实验。

1.2 质粒

PET11a-hALR和 PET32a(+)-hALR：由本所构建。

维普资讯 http://www.cqvip.com

PET32a(+)-hALR为融合表达重组质粒、其表达产物hALR为含109个氨基酸的硫氧还蛋白和带6个his · Tag融合蛋白。真核表达载体：pcDNA3.1（+）：5400bp、氨苄抗性，购于Invitrogen公司。

1.3 菌株

大肠杆菌DH-5α由本实验室保存；表达菌BL21由军事医学科学院赠送。

1.4 硝酸纤维素膜

由Gelman公司出品。

1.5 引物

5'端：5'-TCGGATCCATGCGGACCCAGCAGAAGCGGGAC-3'

3'端：5'-GCCTCGAGTTAGTCACAGGAGCCGTCCTTCCAG-3'

由上海生工生物工程公司合成，2 OD值、PAGE纯化。

1.6 羊抗兔IgG-HRP，工作浓度1:1000；羊抗鼠IgG-HRP，工作浓度1:1000；DAB显色Kit;dNTP等购自于北京经科生化试剂公司。

1.7 pcDNA3.1-hALR真核表达质粒的构建

用DNA质粒提取Kit抽提重组质粒PET11a-hALR、作PCR扩增。回收400bp的目的基因片段。将PCR扩增产物与pCDNA3.1质粒作XhoI&BamHI双酶切，将经酶消化的PCR扩增产物与pcDNA3.1按1:1（v/v）进行连接反应、T4DNA连接酶2μl，15℃连接过夜。转化$CaCl_2$法制备的感受态大肠杆菌DH5α。次日挑单菌落抽提质粒、酶切及测序鉴定。

1.8 pcDNA3.1-hALR重组质粒的中量提取及含量测定

参照QIAGENE质粒中量提取Kit说明进行，紫外分光光度计于波长260nm处测定吸光度A值，按DNA含量计算公式计算DNA含量（μg/μl=吸光度A值 × 50 × 稀释倍数/1000），于-20℃保存。

1.9 对动物的DNA免疫

雄性家兔2只、体重2.3～2.4kg，分为pcDNA3.1-hALR免疫组及pcDNA3.1免疫对照组。先于右后肢胫前肌肉处分三点注射内含0.25%Bupivacaine和0.1%Methy-hydroxybenzoate的生理盐水2.5ml/只，3天后在同一部位分别注射600 μl（1.08mg）的pcDNA3.1-hALR和630 μl（1.08mg）的pCDNA3.1、4周后加强1次，加强后2周通过心脏穿刺取血，分离血清、-20℃保存。

1.10 hALR的诱导表达及纯化

采用IPTG诱导表达及Ni-NTA Resin亲和层析纯化由PET32a(+)-hALR表达的hALR融合蛋白、由本实验室制备。

1.11 抗hALR固相化蛋白质的免疫学测定（Western blot）

参见《分子克隆》[9]进行。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1-ALR真核表达质粒的构建及鉴定

提取PET11a-hALR质粒，进行PCR扩增，1%琼脂糖电泳，胶回收400bp的目的基因片段（图1）、同时与pcDNA3.1分别用XhoI&BamHI双酶切，进行连接反应、转化大肠杆菌DH-5α、挑菌落提质粒，XhoI&BamHI双酶切能切出400bp的片段（图2）。我们对所构建的pcDNA3.1-hALR真核表达质粒进行了序列测定，证实其基因序列完整，阅读框正确，无碱基的缺失及突变。

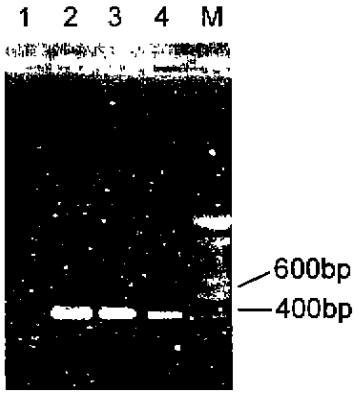


图1 ALR的PCR扩增

lane 1:PET11a PCR; lane 2,3: PET11a-ALR PCR

lane 4: PET11a-ALR PCR extraction

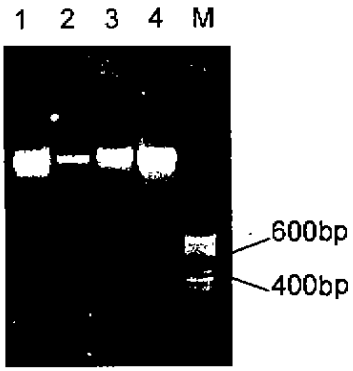


图2 pcDNA3.1-ALR的构建及酶切鉴定

lane 1 :pcNDA3.1-ALR:

lane 2: pcDNA3.1 digested by XhoI&BamHI

lane 3: pcDNA3.1-ALR digested by XhoI;

lane 4: pcDNA3.1-ALR digested by XhoI&BamHI

2.2 pcDNA3.1-ALR及pcDNA3.1质粒的中量提取和含量测定

中量提取pCDNA3.1-ALR及pCDNA3.1质粒，紫外分光光度计测定吸光度A值，分别为0.36和0.342，根据公式计算出DNA含量分别为1800 μg/ml、1710 μg/ml。

2.3 重组质粒的DNA免疫及Western blot

分别分离经pcDNA3.1-hALR及pCDNA3.1免疫的家兔血清、进行Western blot检测。图3是纯化的诱导表达产物hALR的Western blot结果。PAGE电泳：5道和7道是上样buffer；6道和8道是纯化的hALR融合蛋白。抗原抗体反应：5和6道的一抗是

维普资讯 http://www.cqvip.com

pcDNA3.1-hALR免疫家兔的抗血清；7和8道的一抗是pCDNA3.1免疫家兔抗血清。结果表明：pcDNA3.1-hALR免疫组有单一的染色条带，和蛋白分子标准比较、条带大小约30Kda,与hALR融合蛋白大小一致；pCDNA3.1免疫组无任何条带出现。由此认为pcDNA3.1-hALR诱导了家兔抗hALR的产生。

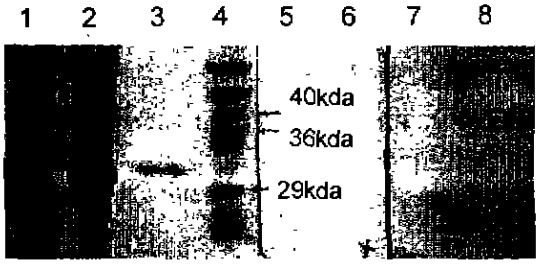


图3 纯化的诱导表达产物ALR对家兔的Western blot

lane 1:PET32a; lane 2:PET32a-ALR;

lane 3:purified ALR fusion protein; lane 4:Marker;

lane 5:buffer; lane 6:purified ALR fusion protein;

lane 7:buffer; lane 8:purified ALR fusion protein

3 讨 论

ALR主要是在肝细胞内合成和储存、体内实验表明、hALR与rALR均可促进1/3肝叶切除大鼠的肝细胞DNA合成，防止肝细胞的萎缩，提高CCl_4致毒性肝细胞功能衰竭大鼠的存活率、降低血清ALT、AST、LDH水平及抗肝纤维化作用[5]。体外实验中，rALR对原代培养肝细胞及人肝癌SMMC-7721细胞无刺激增殖作用，而hALR都具有明显促进原代培养大鼠肝细胞和HTC肝癌细胞的增殖[1]。

鉴于rALR在体外无肝细胞增殖活性，有人推测其在体内强大的促肝细胞生长活性可能是通过非实质细胞的调控实现的，其依据为：体内实验发现hALR对肝内NK细胞的细胞毒功能有显著抑制作用、对肝外的单核细胞的细胞毒功能无抑制作用，而且hALR在体外对来自肝内单核细胞也无作用[7]。研究还发现肝内NK细胞对新生肝细胞有杀伤作用，成熟肝细胞能抵抗肝内NK细胞的杀伤作用[8]。由此认为在肝再生时，ALR通过抑制NK细胞的功能，使新生肝细胞能顺利成长为成熟肝细胞而达到促肝再生作用。

由于对ALR的体外生物学活性报道的差异，因此我们构建了pcDNA3.1-hALR的真核表达载体，DNA序列分析其阅读框完整，无缺失、突变等。通过免疫家兔，Western blot实验表明诱发了抗hALR抗体的产生。此多抗血清可作为检测hALR生物学活性的手段，探讨hALR转化哺乳动物细胞后是否有hALR的表达及作用机制等。我们的实验也说明、此真核表达质粒在体内是有表达能力的、因此，可设想将此重组质粒直接注射到人体内或者某一组织器官，使hALR在体内持续表达，刺激组织的再生、这对某些疾病的治疗无疑具有重要的意义。

另外，我们也将此真核表达质粒免疫了BALB/C小鼠、但未检测出抗hALR抗体的产生，其原因可能与我们免疫的剂量较小或者在小鼠体内的表达量不高有关。本实验所获得的兔抗hALR多抗血清为进一步研究hALR的生物学功能及作用机理提供了基础。

参 考 文 献

[1] Hagiya M D, 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;91:8142-8146.

[2] 刘 杞，王志毅，罗 娅，等. 人肝再生增强因子阅读框架的cDNA克隆和序列分析[J]. 中华肝脏病杂志，1999;7(3):156-158.

[3] Antonio F, Michio H, Kendrick AP, et al. Augmenter of liver regeneration:Its place in the universe of hepatic growth factors[J]. Hepatology, 1994;20(3):747-756.

[4] Chanorasheker RG, Ruhul K, Vladimir MS, et al. Afresh look at augmenter of liver regeneration in rats[J].1999;29(5):1435-1445.

[5] 杨晓明，胡志远，谢 玲，等. 人肝再生增强因子在体外能直接刺激HTC肝癌细胞增殖[J]. 生理学报，1997;49(5):557-559.

[6] J萨姆布鲁克，EF弗里奇、T罗尼阿帝斯. 分子克隆实验指南[M]. 第2版，北京:科学出版社，1993;880-886.

[7] Francavilla A,Vujanovic NL,Polimeno L. The in v ivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions[J]. Hepatology, 1997;25(2):411-415.

[8] Nikola L.Vujanovic, Lorenzo polimeno, Alessandro Azzarone, et al. Changes of liver-resident Nkcells during liver regeneration in rats[J]. J.Immunology, 1995;154:6324-6338.