

重组人肝再生增强因子基因转染肝细胞系的增殖活性研究

吴贻琛¹, 关崇丹¹, 刘鸿凌¹, 游绍莉¹, 刘晓燕¹, 苏海滨¹, 万志红¹, 胡瑾华¹, 貌盼勇², 辛绍杰¹ (1. 解放军第三〇二医院 肝衰竭诊疗与研究中心, 北京 100039; 2. 解放军第三〇二医院 实验技术研究保障中心, 北京 100039)

摘要: 目的 研究重组人肝再生增强因子(hALR)转染肝细胞系的生物学活性, 为生物人工肝细胞反应器提供合适的细胞材料。方法 本研究采用转染重组质粒pcDNA3.1(-)hALR的HepG2细胞, 经G418筛选, 在体外培养、传代后, 进行Western blot免疫印迹实验及免疫荧光实验, 检测细胞中hALR的表达, 并与未转染重组质粒的HepG2细胞进行比较; 采用ELISA方法, 检测两组细胞培养液中hALR的分泌情况; 使用流式细胞仪检测细胞中增殖细胞相关核抗原Ki-67, 了解重组质粒转染前后HepG2细胞的增殖状况。结果 转染重组质粒pcDNA3.1(-)hALR的HepG2细胞功能稳定, 形态良好, 细胞表达及分泌hALR较未转染重组质粒的HepG2细胞多, 且随着培养时间的延长, 细胞培养液中的hALR含量迅速升高, 优于未转染重组质粒的HepG2细胞; 转染重组质粒的HepG2细胞中Ki-67阳性细胞计数显著高于未转染重组质粒的HepG2细胞, 说明转染重组质粒使肝细胞增殖活跃。结论 本研究结果表明, 前期研究构建的转染了hALR基因的肝细胞系能较高表达hALR, 且细胞增殖活跃。

关键词: 肝再生增强因子; HepG2细胞; 生物活性

Bioactivity of the liver cell line transferred by recombinant human augments of liver regeneration gene

WU Yi-chen¹, GUAN Chong-dan¹, LIU Hong-ling¹, YOU Shao-li¹, LIU Xiao-yan¹, SU Hai-bin¹, WAN Zhi-hong¹, HU Jin-hua¹, MAO Pan-yong², XIN Shao-jie¹ (1. Liver Failure Treatment and Research Center, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 2. Research and Technology Service Center, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of augments of liver regeneration on the proliferation of HepG2 cells, and its mechanism of action; to provide a suitable liver cell line for the bio-reactor of bio-artificial liver support system. **Methods** HepG2 cells transferred with expression vector pcDNA3.1(-)hALR were screened by G418. After *in vitro* culture and subculture, the expression of hALR were detected by Western blot and immunofluorescence assay in two HepG2 cell lines transferred with or without expression vector. The secretion of hALR in the culture fluid of the two HepG2 cell lines were detected by ELISA. Ki-67 in two HepG2 cell lines were detected by flow cytometry to understand the proliferation of HepG2 cells transferred with or without expression vector. **Results** The function of HepG2 cell line transferred with expression vector pcDNA3.1(-)hALR was stable. HepG2 cells transferred with expression vector pcDNA3.1(-)hALR expressed and secreted more hALR than HepG2 cells, and with the extension of culture time, the content of hALR in the culture fluid of HepG2 cells transferred with expression vector pcDNA3.1(-)hALR increased more rapidly than those of HepG2 cells. The Ki-67 positive cells in HepG2 cells transferred with expression vector pcDNA3.1(-)hALR were significantly more than those of HepG2 cells, which indicated that the proliferation of HepG2 cells became more active by transfection of expression vector pcDNA3.1(-)hALR. **Conclusion** This study indicated that the HepG2 cells transferred with expression vector pcDNA3.1(-)

hALR can express more hALR, and the proliferation of the cells was very active.

Key words: Human augmenter of liver regeneration; HepG2 cell; Bioactivity

肝功能衰竭^[1]因肝细胞发生大面积变性、坏死,一般对症支持疗法难以逆转病情,人工肝支持系统(artificial liver support system, ALSS)是目前治疗肝功能衰竭的重要方法之一,但其作用单一,疗效有限。生物型人工肝支持系统(bioartificial liver support system, BALSS)^[2-6]在此基础上引入肝细胞,替代肝脏的解毒与合成功能,补充生物活性因子,成为未来的发展方向。HepG2细胞具有良好的肝细胞功能,临床研究显示其对肝功能衰竭患者有一定疗效,是BALSS理想的肝细胞材料^[7,8]。肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)^[9-12]可以促进肝细胞DNA合成。人肝再生增强因子(hALR)是目前唯一可以特异性刺激肝源性细胞增殖的因子,对于保护损伤后肝细胞,预防肝纤维化、肝硬化,治疗肝功能衰竭,提高肝移植的成功率,具有潜在的药用价值。

根据以上研究结果,本研究拟对转染重组质粒pcDNA3.1(-)hALR的HepG2细胞(前期研究构建)进行传代、培养,使其稳定表达、合成hALR蛋白,并进一步观察其生物学活性及功能,对其应用于生物型人工肝生物反应器的可行性进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 HepG2细胞系购自武汉中国病毒资源保藏中心,pcDNA3.1(-)hALR重组质粒为本中心前期构建,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、MEM培养基、G418购自美国Gibco公司,Vigo Fector转染试剂盒购自北京威格拉斯生物制品公司,胰蛋白酶、谷氨酰胺、青霉素、链霉素购自德国Merck公司,蛋白质低分子量Marker、蛋白质次高分子量Marker购自大连宝生物TaKaRa公司,兔抗人ALR抗体、异硫氰酸荧光素标记兔抗人ALR抗体、兔抗人β-肌动蛋白抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG、WIP组织裂解液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司,PE标记的鼠抗人Ki-67抗体、破膜剂均购自美国BD Pharmingen公司,BCA Protein Assay Kit试剂盒购自美国PIERCE公司,ECL超敏发光液购自普利莱基因技术有限公司,hALR ELISA试剂盒购自加拿大GBD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 hALR肝细胞系的建立 本研究中心前期构建pcDNA3.1(-)hALR重组质粒,转染HepG2细胞,

并用G418对转染后细胞进行筛选。具体步骤如下:转染前24小时将HepG2细胞按 1×10^5 个/孔浓度接种于3 ml培养瓶中,加入含10%FBS的MEM培养液,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,次日更换新鲜的MEM培养液,按Vigo Fect转染试剂盒操作说明进行转染,16~24小时后用新鲜的MEM培养液给细胞进行换液,继续培养,观察细胞形态。用含不同浓度G418(100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L)的MEM培养液,对上述转染后的细胞进行逐步筛选,获得能较强表达hALR的肝细胞系。

1.2.2 Western blot 免疫印迹试验检测 ALR 在 hALR 肝细胞系、HepG2 细胞系中的表达 重组质粒pcDNA3.1(-)hALR转染组及空白对照组肝细胞经培养72小时,超声破碎仪对样品进行冰浴匀浆破碎,提取蛋白,进行BCA蛋白定量。在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,加热3~5分钟,以充分变性蛋白。冷却至室温后,将蛋白样品、重组质粒pcDNA3.1(-)hALR转染组及空白对照组肝细胞的提取样品各20 ml,直接上样到SDS-PAGE凝胶加样孔内进行电泳。电泳后转移至PVDF膜,4℃封闭过夜。加入稀释过的一抗(兔抗人肝再生增强因子抗体1:200稀释、内参抗体β-肌动蛋白抗体1:500稀释),4℃孵育过夜。然后加入稀释的二抗[1:2000稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG],4℃孵育1小时。使用DAB显色试剂显色蛋白,将Western Blot膜完全浸入发光工作液中,室温孵育3分钟。暗房内X光片曝光和显影。

1.2.3 流式细胞仪检测转染 hALR 重组质粒前后肝细胞系的增殖情况 收集单层培养的hALR肝细胞、HepG2细胞,用细胞计数板计数(台盼蓝染色细胞存活率>90%)。细胞洗涤后离心,细胞沉淀加入破膜剂破膜30分钟,加入PE标记的鼠抗人Ki-67抗体,4℃避光孵育20分钟,1%多聚甲醛固定后上流式细胞仪检测,并进行分析。

1.2.4 ELISA 检测细胞系分泌 ALR 的情况 重组质粒pcDNA3.1(-)hALR组及空白对照组肝细胞分别培养24小时、48小时、72小时、96小时,收集培养液;按照hALR ELISA试剂盒操作说明进行实验,在波长450 nm的酶标仪上读取各孔的A值。以A值为纵坐标(Y轴),以标准品的浓度为横坐标(X轴),

绘制标准曲线图；根据各样品的 A 值查找对应的浓度范围。

1.2.5 数据分析 使用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。连续性变量资料以平均值 \pm 标准差表示，计量资料的比较采用 t 检验。统计学显著性检验均采用双侧检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 hALR 重组质粒后肝细胞的形态 在倒置显微镜下观察，经过筛选的转染重组质粒 pcDNA3.1(-) hALR 的 HepG2 细胞，呈菱形、三角形、多边形等，细胞形态舒展，细胞核完整，核仁清晰，细胞生长旺盛，见图 1。

2.2 Western blot 检测转染 hALR 重组质粒前后肝细胞系中 ALR 的表达 Western blot 检测转染 hALR 重组质粒肝细胞与 HepG2 细胞中 ALR 的表达情况见图 2，其中 1、2 泳道为转染 hALR 肝细胞，3、4

泳道为 HepG2 细胞。1、2 泳道的 hALR 条带较 3、4 泳道更为明显。蛋白含量采用 BioRad 公司凝胶自动成像系统 Quantity One 4.0 图像分析软件进行成像分析，结果采用累积光密度与 β -actin 累积光密度值之比作为蛋白相对表达量，hALR 肝细胞内 ALR 蛋白表达量较 HepG2 细胞内 ALR 蛋白表达量高，见图 3。

2.3 流式细胞仪检测 hALR 重组质粒转染前后肝细胞系的增殖状况 选择的检测指标为 Ki-67。Ki-67 是一种增殖细胞相关的核抗原，其功能与有丝分裂密切相关。Ki-67 在静息细胞缺乏而在增殖组织中广泛表达，其水平在 G_1 和 S 期早期表达较低，之后逐渐增加，并在分裂期到达顶峰。目前 Ki-67 常作为细胞增殖的标记抗原。经流式细胞仪检测发现，hALR 肝细胞中 Ki-67 阳性细胞百分率显著高于未转染质粒的 HepG2 细胞，两组比较 hALR 肝细胞

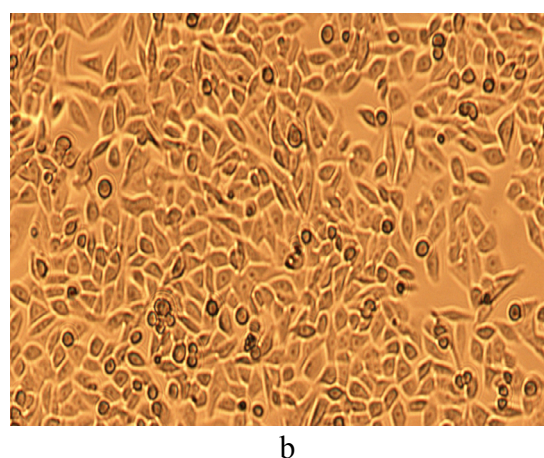
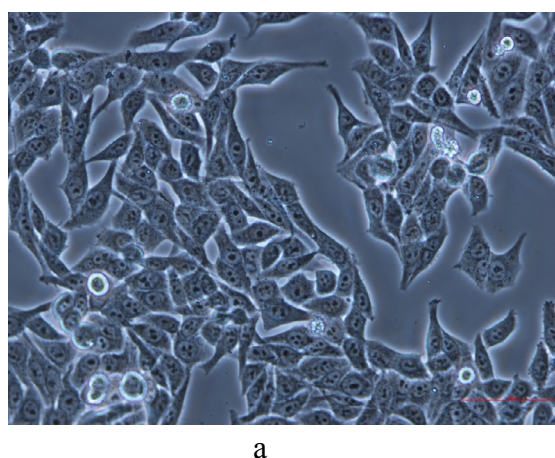


图 1 转染 hALR 重组质粒后肝细胞的形态

注：a：转染重组质粒 pcDNA3.1(-) hALR 的 HepG2 细胞形态舒展，细胞核完整，核仁清晰 ($\times 400$)；b：转染重组质粒 pcDNA3.1(-) hALR 的 HepG2 细胞生长旺盛，呈菱形、三角形、多边形等 ($\times 100$)

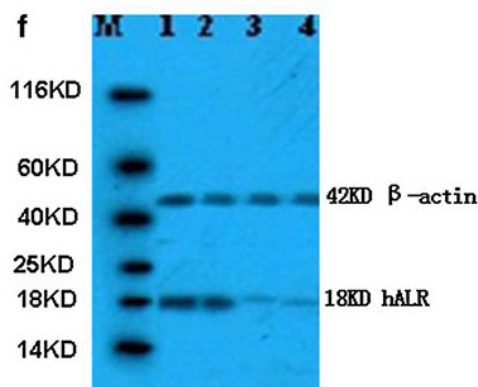


图 2 Western blot 检测转染质粒前后肝细胞系中 ALR 的表达

注：M：Marker；1、2 泳道为 hALR 肝细胞，3、4 泳道为 HepG2 细胞；1、2 泳道的 hALR 条带较 3、4 泳道更为明显

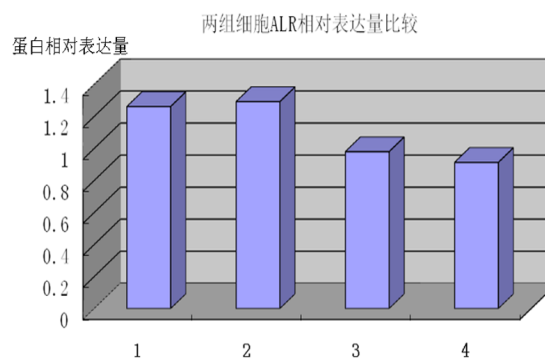


图 3 转染 hALR 重组质粒前后肝细胞系中 ALR 的相对表达量比较

注：1、2 为 hALR 肝细胞，3、4 为 HepG2 细胞；hALR 肝细胞内 ALR 蛋白表达量 (1、2) 较 HepG2 细胞内 ALR 蛋白表达量 (3、4) 高

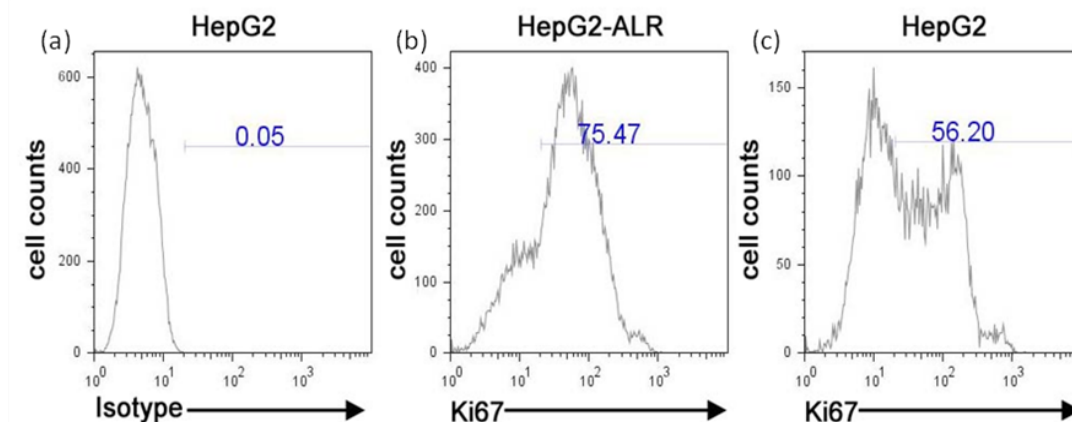


图4 流式细胞仪检测转染 hALR 重组质粒前后肝细胞系的增殖情况

注: a 图为 HepG2 细胞同型对照; b 图为 hALR 肝细胞中 Ki-67 阳性细胞的百分率; c 图为 HepG2 细胞中 Ki-67 阳性细胞的百分率。hALR 肝细胞中 Ki-67 阳性细胞百分率明显高于 HepG2 细胞, 提示 hALR 肝细胞的增殖更为活跃

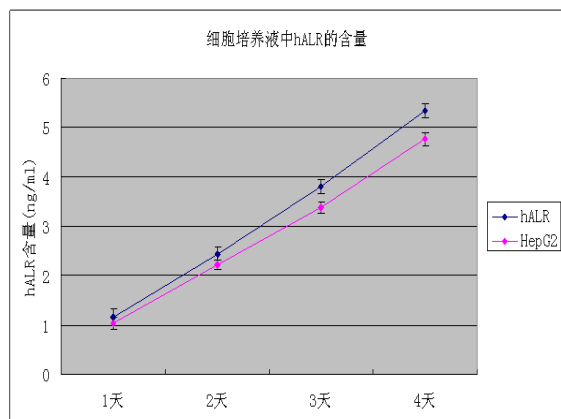


图5 Elisa 检测两组肝细胞培养液中 ALR 的含量及变化情况

注: hALR 肝细胞培养液中的 ALR 含量与 HepG2 细胞中的 ALR 含量相比, 2 天: $t = 3.224$, $P = 0.02$; 3 天: $t = 4.588$, $P = 0.01$; 4 天: $t = 5.622$, $P = 0.008$

的增殖更为活跃, 见图4。

2.4 ELISA检测转染hALR重组质粒前后肝细胞分泌ALR的情况 分别收集培养1天、连续培养2天、3天、4天的细胞培养液进行ELISA检测, 随着培养时间的延长, hALR肝细胞培养液中的ALR含量迅速升高[1天: (1.18 ± 0.16) ng/ml; 2天: (2.45 ± 0.14) ng/ml; 3天: (3.82 ± 0.16) ng/ml; 4天: (5.31 ± 0.15) ng/ml], 且显著高于未转染重组质粒的HepG2细胞[1天: (1.05 ± 0.11) ng/ml; 2天: (2.21 ± 0.09) ng/ml; 3天: (3.37 ± 0.15) ng/ml; 4天: (4.74 ± 0.17) ng/ml]。两组比较差异有统计学意义(2天: $t = 3.224$, $P = 0.02$; 3天: $t = 4.588$, $P = 0.01$; 4天: $t = 5.622$, $P = 0.008$), 见图5。

3 讨论

肝再生增强因子(ALR)是一种具有热稳定性、可促进肝细胞再生的细胞因子。ALR属于ALR基因家族, 该基因家族具有高度保守的C-末端序列, 含有氧化还原活性中心和FAD结合域, 可以出现在从酵母细胞到人的各种真核细胞内, 甚至有一些双链DNA病毒中也存在其同源序列, 该基因家族对细胞周期的调节、线粒体的生物合成以及高等真核生物肝脏和睾丸的发育起重要作用, 在不同的生物种属中表现出多样的生物学活性。研究显示, ALR以同源二聚体的形式存在, 具有巯基氧化酶的活性, 能催化二硫化物的形成。hALR的主要生物活性是参与肝细胞的再生, 预防和缓解肝细胞损伤, 并具有抗肝纤维化的活性, 但在体外ALR生化制剂易失活, 很难满足临床治疗及功能研究的需求^[9-16]。

肝肿瘤细胞系HepG2细胞具有合成、解毒功能, 本研究对转染pcDNA3.1(-)hALR重组质粒的HepG2细胞进行筛选、克隆, 建立了能较强表达hALR的肝细胞系, 并经长时间体外传代、培养, 肝细胞形态良好, 功能稳定, 肝细胞中hALR的表达量较转染前增加, 随着培养时间的延长, 细胞培养液中的hALR含量迅速升高, 细胞生长速度、细胞增殖状况均较转染前的HepG2细胞有所增强。真核载体表达目的hALR蛋白更符合其生理情况下的空间结构和构型。

肝功能衰竭是多种因素综合作用的结果, 其发病机制包括免疫病理反应、细胞因子网络激活及细胞代谢网络紊乱。细胞因子的改变在肝功能衰竭的发生、发展和预后中起重要作用。肝功能衰竭的预后与肝细胞坏死的程度及肝细胞再生的能力有密

切关系。影响肝细胞再生的因素很多,其中肝源性的细胞生长因子作用直接,作用较强,其种类繁多、功能复杂,通过多种途径促进或抑制肝细胞再生^[1,17-19]。目前,生物人工肝支持系统被公认为是治疗各种原因所致肝功能衰竭最有前途的方法之一。肝细胞是生物人工肝支持系统的核心原材料,生物人工肝对肝功能衰竭患者的肝支持作用完全依赖于所用肝细胞的生物学活性及功能^[2-4]。本研究中心采用转染人肝再生增强因子(hALR)的HepG2细胞为材料构建混合生物人工肝支持系统^[20,21],治疗慢加急性肝功能衰竭患者,利用生物反应器中hALR肝细胞的合成、代谢和解毒功能的同时,还可补充hALR促进肝细胞生长,已证实具有一定的安全性和有效性,有望成为肝功能衰竭治疗的重要手段。

参考文献

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊治指南[J].中华临床感染病杂志,2012,5:321-327.
- [2] O'Grady J. Personal view: current role of artificial liver support devices[J]. Aliment Pharmacol Ther,2006,23:1549-1557.
- [3] Santoro A, Mancini E, Ferramosca E, et al. Liver support systems[J]. Contrib Nephrol,2007,156:396-404.
- [4] Van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, et al. Clinical application of bioartificial liver support systems[J]. Ann Surg,2004,240:216-230.
- [5] Zhao LF, Pan XP, Li LJ. Key challenges to the development of extracorporeal bioartificial liver support systems[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2012,11:243-249.
- [6] Pless G. Bioartificial liver support systems[J]. Methods Mol Biol,2010,640:511-523.
- [7] Nibourg GA, Huisman MT, van der Hoeven TV, et al. Stable overexpression of pregnane X receptor in HepG2 cells increases its potential for bioartificial liver application[J]. Liver Transpl,2010,16:1075-1085.
- [8] Tang N, Wang Y, Wang X, et al. Stable overexpression of arginase I and ornithine transcarbamylase in HepG2 cells improves its ammonia detoxification[J]. J Cell Biochem,2012,113:518-527.
- [9] Hayiya M, Francavilla A, Plimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombination alr and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:8142-8146.
- [10] Gandhi CR. Augmenter of liver regeneration[J]. Fibrogenesis Tissue Repair,2012,5:10.
- [11] 常菁,崔春萍,吴祖泽.肝特异性生物活性肽研究进展[J].军事医学科学院院刊,2009,33:577-579.
- [12] Thirunavukkarasu C, Wang L F, Harvey SA K, et al. Augmenter of liver regeneration: An important intracellular survival factor for hepatocytes[J]. J Hepatology,2008,48:578-558.
- [13] 吴贻琛,辛绍杰.肝再生增强因子研究进展[J].传染病信息,2012,25:61-64.
- [14] Farrell SR, Thorpe C. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome C reductase activity[J]. Biochemistry,2005,44:1532-1541.
- [15] Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase[J]. FEBS Lett,2000,477:62-66.
- [16] Wu CK, Dailey TA, Dailey HA, et al. The crystal structure of augmenter of liver regeneration: a mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase[J]. Protein Sci,2003,12:1109-1118.
- [17] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure[J]. Lancet,2010,376:190-201.
- [18] Ohnishi A, Miyake Y, Matsushita H, et al. Serum levels of soluble adhesion molecules as prognostic factors for acute liver failure[J]. Digestion,2012,86:122-128.
- [19] Bernal W, Jalan R, Quaglia A, et al. Acute-on-chronic liver failure[J]. Lancet,2015,386:1576-1587.
- [20] 游绍莉,刘鸿凌,荣义辉,等.人细胞系生物人工肝支持系统治疗慢加急性肝衰竭患者的初步研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2011,25:387-389.
- [21] 游绍莉,刘鸿凌,荣义辉,等.混合型生物人工肝治疗HBV相关慢加急性肝衰竭患者的初步探讨[J].临床肝胆病杂志,2013,29:685-688.

收稿日期:2015-08-01