

重组人 Hespintor 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用

孙杰¹, 赵梓晗², 潘志鹏², 潘凌鸿¹, 伦永志^{1,2,Δ}

(1. 莆田学院药学与医学技术学院医学检验系, 福建莆田 351100; 2. 大连大学医学院医学检验系, 辽宁大连 116622)

[摘要] **目的** 完善重组 Hespintor 蛋白(rHespintor)的纯化方法,提高蛋白提取效率,并探讨其对肝母细胞瘤 HepG2 细胞增殖及侵袭作用的影响。**方法** 在重组蛋白提取中增加包涵体洗涤过程,更改蛋白纯化缓冲体系,并利用 Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(BAPNA)为作用底物,测定纯化的 rHespintor 对胰蛋白酶水解抑制活性。以空白组为对照组,通过 MTT 实验、细胞划痕愈合实验、肿瘤细胞侵袭实验分别检测 rHespintor 对肝母细胞瘤 HepG2 细胞生长的影响及作用效果。**结果** 对包涵体蛋白进行尿素梯度洗涤后可有效去除目的蛋白中绝大多数杂蛋白,一步纯化后,目的蛋白 rHespintor 具有较高胰蛋白酶水解抑制活性,且抑制效果呈剂量依赖关系。rHespintor 作用于肝母细胞瘤 HepG2 细胞后,细胞增殖受到抑制,迁移能力减弱,侵袭的细胞数量显著减少。**结论** rHespintor 在体外可明显抑制肝母细胞瘤 HepG2 细胞的增殖及侵袭作用。

[关键词] 重组蛋白质类;丝氨酸蛋白酶抑制因子;细胞增殖;细胞运动;细胞侵袭**[中图分类号]** R730.54**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1182-04

Inhibitory effects of recombinant human Hespintor on proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells

Sun Jie¹, Zhao Zihan², Pan Zhipeng², Pan Linghong¹, Lun Yongzhi^{1,2,Δ}

(1. Faculty of Laboratory Medical Science, School of Pharmacy and Medical Technology, Putian University, Putian, Fujian 351100, China; 2. Faculty of Laboratory Medical Science, College of Medicine, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

[Abstract] **Objective** To perfect the purification method of recombinant fusion protein of Hespintor (rHespintor) for increasing the protein extraction efficiency, and to investigate its effects on the proliferation, migration and invasion of hepatoblastoma cell line HepG2. **Methods** In the recombinant protein extraction, the inclusion body washing process was added and the protein purification buffer system was changed. BAPNA was used as the substrate. The inhibitory effect of purified rHespintor on trypsin hydrolysis was detected. The blank group served as the control group. The MTT test, cell scratch wound healing test and tumor cell invasion test were performed to detect the effect of rHespintor on growth of hepatoblastoma HepG2 cells and its effect. **Results** The urea gradient washing on the inclusion body protein could effectively remove the vast majority of impure proteins from the targeted protein. After one-step purification, the target protein rHespintor exhibited a high inhibition effect of trypsin hydrolysis, and the inhibitory effect was exhibited a dose-dependent manner. After acting on hepatoblastoma HepG2 cells with rHespintor, the cell proliferation ability was inhibited, the migration ability was reduced and the number of invaded cells were significantly decreased. **Conclusion** rHespintor can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of hepatoblastoma cell line HepG2 cells in vitro.

[Key words] recombinant protein; serine proteinase inhibitor; cell proliferation; cell movement; cell invasion

在肿瘤的生长、血管生成及浸润和转移过程中,除了生长因子与抑癌基因突变、细胞周期改变等上游机制的参与外,蛋白酶也扮演着最终共同途径的角色,并且在功能性或病理性组织重建过程中起到重要作用^[1]。大量实验证明,肿瘤细胞侵袭、转移能力的强弱与其诱导产生的蛋白酶降解细胞外基质(ECM)及基底膜的能力密切相关,抑制此类蛋白酶活性,就可能影响肿瘤的进程,成为治疗肿瘤的一种有效方法。蛋白酶的活性可由多个层次进行调控,但最直接的方法还是阻断蛋白酶活性。高表达的蛋白酶抑制剂或者人工合成的蛋白酶抑制剂都能有效地阻断蛋白酶的激活,阻止 ECM 的降解^[1-3]。现有研究证明, Kazal 家族成员大多具有蛋白酶抑制活性,如胰腺分泌的胰蛋白酶抑制因子、顶体蛋白酶抑制因子、弹性蛋白酶抑制因子等^[4-5]。越来越多的研究显示这一家族的某些成员参与调节肿瘤细胞的侵袭和转移。

Hespintor 作为一个新的 Kazal 家族成员,其开放阅读框

架(ORF)长度为 285 bp,编码产物是由 94 个氨基酸残基组成的丝氨酸蛋白酶抑制因子。分析表明 Hespintor 分为 3 部分: N 端 1~23 个氨基酸残基为信号肽;第 35~94 个氨基酸含一个典型的 Kazal 结构域;N 端信号肽与 Kazal 结构域间的 24~34 位氨基酸残基构成了连接区。同源分析表明, Hespintor 与 Kazal 家族其他成员在结构上既有相似又有独特的特点。因此,开展 Hespintor 抗肿瘤活性研究将有助于进一步了解其在肿瘤的侵袭和转移过程中的作用,为以后研制开发基于丝氨酸蛋白酶抑制因子 Hespintor 的肿瘤治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)质粒及菌株:重组大肠埃希菌 Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/Hespintor 为本实验室保存。肝母细胞瘤 HepG2 细胞引自北京市理化分析测试中心。(2)主要试剂: PigeRuler Proteinase Ladder 购自美国 Thermo 公司;鼠抗人 His⁶-Fag 单克隆抗体(一抗)购自科百奥公司;羊抗鼠

HRP-IgG(二抗)购自中杉金桥公司;牛血清清蛋白(BSA)、胰蛋白酶(活性大于或等于 250 NF U/mg)购自美国 Amresco 公司;Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(Nα-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide Hydrochloride, BAPNA)购自美国 Sigma 公司;Ni²⁺柱(Ni²⁺-Histrap FF crude 5 mL)购自美国 GE Healthcare 公司;BCA 蛋白水平测定试剂盒购自北京赛默生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组 Hespintor 蛋白(rHespintor)包涵体的提取 挑取阳性克隆的 Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/Hespintor 单菌落接种于加有卡那霉素、氯霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 摇菌 8 h;按比例扩大培养,待 OD600 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.25 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖(IPTG)于 30 °C,180 r/min 诱导 5 h。收集诱导后 Rosetta (DE3)菌液,收集菌体,经破碎,洗涤,最后以 8 mol/L 尿素溶解缓冲液(Binding Buffer)重悬 rHespintor 包涵体沉淀,将所得上清液抽滤通过 0.45 μm 膜,备用。

1.2.2 rHespintor 包涵体的纯化和复性 按 GE 公司 6×His 组氨酸标签蛋白亲和层析纯化操作对包涵体溶液进行纯化。用 Binding Buffer 平衡 Ni²⁺柱,平衡后低速上样 10 mL 稀释后柱前蛋白液,整个过程 4 °C 操作。上样后继续用 Binding Buffer 洗平基线,随后用 Refolding Buffer 20 倍柱体积对柱上蛋白进行复性,最后用 Elution Buffer 洗脱,收集 280 nm 吸收峰处的目的蛋白。将收集的目的蛋白进行 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析后加入透析袋中,以 PBS 为缓冲液,透析完成后重新收集,并测定蛋白水平,于-20 °C 保存备用。

1.2.3 rHespintor 的活性鉴定 所得纯化后 rHespintor 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。按参考文献并优化 rHespintor 的酶活性测定方法^[6-7]。用含 0.4%CaCl₂ 的 0.1 mol/L Tris 缓冲液(pH8.0)调节 rHespintor 浓度至 0.2 mg/mL,取一定量与 0.1 mg/mL 的 100 μL 胰蛋白酶(Trypsin, Sigma)反应,调节反应体系中 rHespintor 质量与胰蛋白酶质量比依次为 1:4,1:2,1:1,2:1,3:1,4:1,5:1,37 °C 水浴 10 min。随后加入反应底物 Na 苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(BAPNA) 300 μL(1 mg/mL)于 37 °C 作用 10 min,最后加入 30%冰醋酸充分混匀,终止反应。检测前室温 8 000 g 离心 3 min,去除未溶解的 BAPNA 对检测的影响。以分光光度计检测 A_{410nm} 数值。以不加入 rHespintor 为阴性对照组。按该方法,分析 rHespintor 对胰蛋白酶水解作用抑制效果的剂量效应。根据下列公式计算 rHespintor 的抑制率,绘制抑制曲线。

$$\text{抑制率} = \frac{(\Delta A_{410nm} \text{未抑制} - \Delta A_{410nm} \text{抑制})}{(\Delta A_{410nm} \text{未抑制} - \Delta A_{410nm} \text{空白})} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 细胞增殖抑制实验 取对数生长期 HepG2 细胞,每孔 200 μL 接种至 96 孔板中,于 37 °C,5%CO₂ 培养过夜。次日分别给予不同浓度的 rHespintor 处理,使其终浓度分别为 1、2、4、8、12、16 μg/mL。另设无药物阴性对照组,空白组及顺铂(DDP)阳性对照组。每组设 5 个复孔,分别培养 48、72 h 后加入 20 μL 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO,轻柔震荡 10 min,于酶标仪检测 A_{570nm},根据以下公式计算肿瘤细胞存活率:

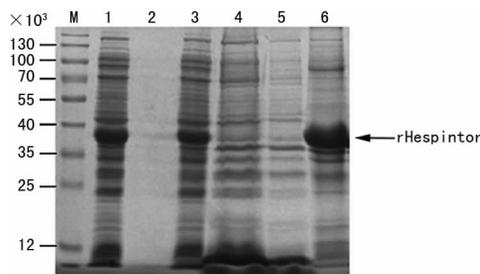
$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 } A_{570nm} - \text{空白组 } A_{570nm}}{\text{对照组 } A_{570nm} - \text{空白组 } A_{570nm}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 细胞划痕愈合实验 当 HepG2 细胞于 6 孔板内培养至 90%融合状态时,用 10 μL 移液枪头沿底部划线,PBS 清洗 3 次,加入 DMEM(10% FBS),rHespintor 终浓度分别为 0、5、10 μg/mL(对照组、低浓度组、高浓度组)。37 °C,5%CO₂ 培养 0、12、24 h 分别拍照记录。

1.2.6 肿瘤细胞侵袭实验 将基底膜基质胶 matrigel 用预冷无血清 DMEM 稀释,Transwell 24 孔板(8.0 μm,美国 Corning 公司)上室铺基质胶,37 °C 过夜成胶。终浓度分别为 0、5、10 μg/mL(对照组、低浓度组、高浓度组)的 rHespintor 作用 HepG2 细胞 4 d 后^[8-9],弃培养液,无血清饥饿培养 12 h 后经 0.25%胰酶消化调整细胞密度至 4×10⁵/mL。上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 500 μL 含重组肝细胞生长因子(rHGF)作为趋化因子的 DMEM(含 0.1%FBS,40 ng/mL rHGF)^[10]。37 °C,5%CO₂ 孵育 24 h。取出小室,预冷甲醛固定 20 min,PBS 洗涤 2 次;结晶紫避光染色 30 min,PBS 洗涤两次;用棉签轻轻擦拭聚碳酸酯膜上室面的细胞。小心切下膜片,置载玻片上滴加中性速干胶后以盖玻片封片。显微镜下观察,每张膜取 5 个视野计数,实验重复 3 次。

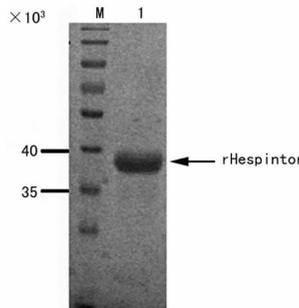
2 结果

2.1 rHespintor 的诱导表达及包涵体的提取 诱导后的 Rosetta (DE3)菌液离心后,菌体经溶菌酶裂解后离心得菌体沉淀,将菌体沉淀重悬后进行 SDS-PAGE 分析,可见 rHespintor 以包涵体的形式存在于沉淀当中。先后经过 2 mol/L 尿素和 4 mol/L 尿素洗涤包涵体沉淀去除杂蛋白,最后以 8 mol/L 尿素(Binding Buffer)溶解沉淀,得到包涵体溶解液。诱导后将全菌沉淀和上清液分别作 SDS-PAGE 分析,重组蛋白以包涵体形式全部集中在沉淀中;经先后 2 次洗涤液能有效去除杂蛋白,提高粗提蛋白纯度,见图 1。



M: 预染蛋白质相对分子质量标准;1:诱导后全菌沉淀;2:诱导后全菌上清液;3:裂解后全菌沉淀;4:一次洗涤后上清液;5:二次洗涤后上清液;6:rHespintor 包涵体溶液。

图 1 诱导后表达菌株粗提蛋白 SDS-PAGE 分析

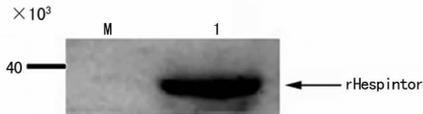


M: 预染蛋白质相对分子质量标准;1:纯化 rHespintor。

图 2 纯化后 rHespintor 的 SDS-PAGE 分析

2.2 rHespintor 的纯化 将包涵体溶解液经 Ni²⁺亲和层析柱纯化,同时在操作台上完成对 rHespintor 的复性过程,洗脱后

所得蛋白经半透膜脱盐后作 SDS-PAGE 分析,得到单一条带(图 2)。经 Western blot 鉴定, rHespintor 成功表达 His-Tag, 见图 3。



M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: 纯化 rHespintor。

图 3 重组蛋白表达产物的 Western blot 分析

2.3 纯化 rHespintor 的活性检测 胰蛋白酶可水解低分子底物 BAPNA,使之释放出黄色的对硝基苯胺,该物质在 405 nm 处有最大吸收值。若在此反应体系中加入胰蛋白酶抑制剂,抑制胰蛋白酶的水解活性,可使 A_{405 nm} 吸收值下降。结果显示:10 μg rHespintor 与 10 μg 胰蛋白酶作用,rHespintor 可抑制 30.99% 的胰蛋白酶活性。当 rHespintor 与胰蛋白酶的质量比为 1:4、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 时,胰蛋白酶活性抑制率分别为 2.28%、12.37%、30.99%、45.72%、52.29%、59.18%、70.32%。

2.4 rHespintor 对 HepG2 细胞生物学行为的影响 rHespintor 对肝母细胞瘤 HepG2 细胞有显著的生长抑制作用。当 rHespintor 作用 HepG2 细胞时间相同时,随着蛋白浓度的增

大,抑制作用逐渐增强;当 rHespintor 作用 HepG2 细胞浓度相同时,随着作用时间的延长,抑制作用同样逐渐增强,见图 4。

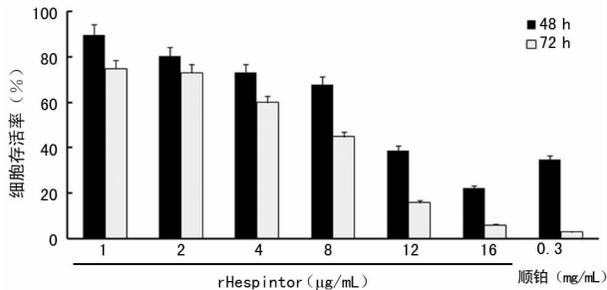


图 4 rHespintor 对 HepG2 细胞增殖活性的抑制作用

2.5 rHespintor 对 HepG2 细胞划痕愈合及侵袭的影响 实验组 HepG2 细胞与对照组相比,细胞迁移能力差异有统计学意义(P<0.05)。当 rHespintor 作用 HepG2 细胞时间相同时,随着蛋白浓度的增大,细胞迁移能力抑制愈加明显。以 rHGF 为趋化因子,rHespintor 作用后的 HepG2 细胞侵袭能力明显减弱,组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。当不同浓度的 rHespintor 同时作用于 HepG2 细胞时,随着蛋白浓度的增大,细胞侵袭能力下降愈加明显,见图 5、6。

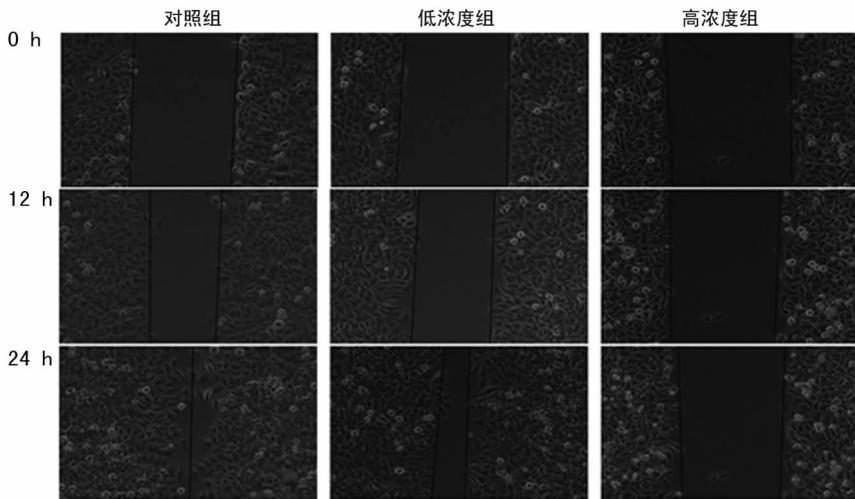
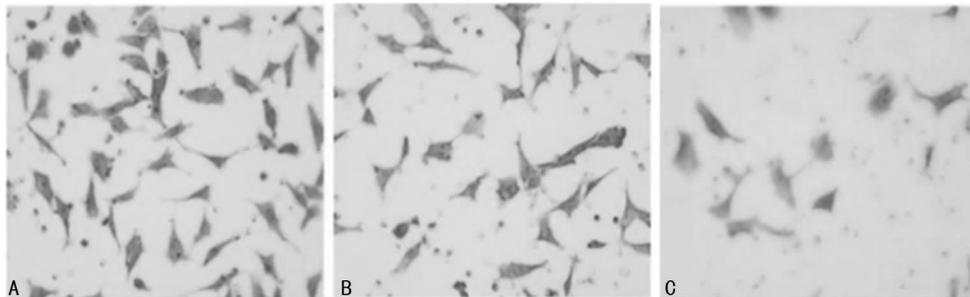
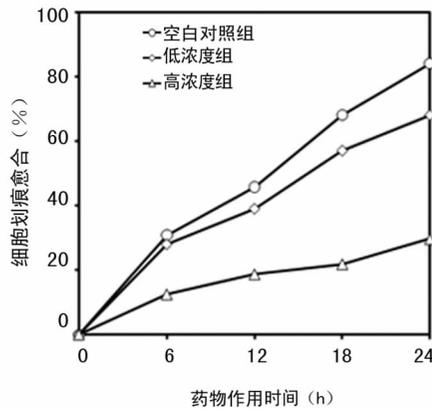


图 5 rHespintor 对 HepG2 细胞划痕愈合能力的抑制作用



A: 对照组; B: 低浓度组; C: 高浓度组; ^a: P<0.05, 与对照组比较; ^b: P<0.05, 与低浓度组比较。

图 6 rHespintor 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响

3 讨论

恶性肿瘤的侵袭和转移是造成肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程,包括肿瘤细胞的黏附和脱黏附作用,ECM 的降解和重建作用等过程,其中肿瘤

细胞水解 ECM 是肿瘤侵袭和转移的首要步骤和分子基础。尿激酶型纤溶酶原激活系统可以促进人类肿瘤细胞的生长,在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中起重要作用。当尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)与其受体(uPAR)结合后,活化生成纤溶酶,

纤溶酶即可直接降解 ECM, 又可通过基质金属蛋白酶 (MMPs) 通路参与降解 ECM^[11-15]。诸多实验结果表明, 抑制尿激酶型纤溶酶原激活系统中 uPA/uPAR 活性可组织肿瘤细胞的侵袭和(或)迁移运动^[16-17]。恶性肿瘤的侵袭和转移是造成肿瘤患者死亡的主要原因。寻找安全有效、不良反应小的抗肿瘤药物一直是各国学者孜孜以求的目标。多种丝氨酸蛋白酶抑制因子已被证实具有抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭, 引起肿瘤细胞凋亡等作用, 因此相关研究也吸引了更多关注。

本研究通过前期研究构建的 Hespintor-Kazal 原核表达体系^[18], 采用 IPTG 诱导获得了 Hespintor-Kazal 融合标签蛋白的大量表达。大肠埃希菌表达系统具有遗传背景清楚、流程简单快速、成本低、产量高的特点, 多种真核基因已成功在 E. coli 中获得了高效表达。但是大肠埃希菌表达系统无法对真核基因翻译后蛋白进行加工, 难以形成正确的二硫键配对及空间构象, 从而所得重组蛋白往往缺乏良好的生物学活性。而当外源基因在 E. coli 高效表达式, 容易以包涵体(inclusion body)形式聚集在细胞内。要获得具有与天然蛋白相同活性的重组蛋白, 必须首先分离获得包涵体, 并进行洗涤, 然后用高浓度的变性剂(如 6~8 mol/L 盐酸胍, 8~10 mol/L 尿素)溶解包涵体, 再将所溶解的无活性包涵体蛋白进行复性, 使其正确折叠, 恢复天然的蛋白分子构象。在实验过程中, 变性后的包涵体蛋白进行再折叠和复性, 占据了重组蛋白质整个工艺的关键步骤, 是生物工程技术中的一个难点问题。过程的每一步都会造成目的蛋白的丢失, 而且步骤越多, 目的蛋白丢失越多, 产率越低。本研究在蛋白纯化步骤中, 增加梯度洗涤过程, 尽量去除杂质蛋白对纯化过程的影响; 提高缓冲液中咪唑的基础浓度, 降低宿主细胞蛋白质与亲和层析柱的结合, 增强组氨酸标签蛋白的结合; 用 Tris 缓冲液替代磷酸缓冲液, 减低非组氨酸标签蛋白的结合力。

本研究中, rHespintor 可在体外显著抑制 HepG2 细胞的增殖作用, 抑制其对基底膜基质胶 matrigel 的黏附和侵袭作用。因此, rHespintor 可通过抑制肝母细胞瘤 HepG2 细胞水解 ECM 及细胞基底膜的能力, 从而达到抑制其侵袭浸润的作用。这一过程可通过其在细胞外抑制 MMPs 的激活, 从而导致了 ECM 降解能力的下降。

综上所述, 本研究为 rHespintor 发展成新型抗肿瘤药物提供了体外研究依据, 后期将更深层次探讨 rHespintor 的抗肿瘤分子机制, 并进一步完善其在动物体内的抗肿瘤研究。

参考文献

- [1] Aureli L, Gioia M, Cerbara I, et al. Structural bases for substrate and inhibitor recognition by matrix metalloproteinases[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(22): 2192-2222.
- [2] Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 622(622): 471-487.
- [3] Goerge T, Barg A, Schnaeker EM, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7766-7774.
- [4] Empie MW, Laskowski M. Thermodynamics and kinetics of single residue replacements in avian ovomucoid third domains: effect on inhibitor interactions with serine proteinases[J]. *Biochemistry*, 1982, 21(10): 2274-2284.
- [5] Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, et al. Epigenetic silenc-

ing of maspin gene expression in human breast cancers[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(6): 805-810.

- [6] Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1961, 95(2): 271-278.
- [7] Barkia A, Bougatef A, Nasri R, et al. Trypsin from the viscera of Bogue (Boops boops): isolation and characterisation[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2010, 36(4): 893-902.
- [8] Yang C, Zeisberg M, Lively JC, et al. Integrin alpha1beta1 and alpha2beta1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8312-8317.
- [9] Wu XZ, Chen D, Han XQ. Anti-migration effects of Gekko sulfated glycopeptide on human hepatoma SMMC-7721 cells[J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4958-4970.
- [10] Lee WJ, Wu LF, Chen WK, et al. Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 160(2): 123-133.
- [11] Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, et al. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(1): 32-71.
- [12] Gramling MW, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment[J]. *Thromb Res*, 2010, 125(5): 377-381.
- [13] Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, et al. Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(8): 1051-1067.
- [14] Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(5): 785-801.
- [15] Hildenbrand R, Allgayer H, Marx A, et al. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(5): 641-652.
- [16] Festuccia C, Dolo V, Guerra F, et al. Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(6): 513-528.
- [17] Durko M, Brodt P. Suppression of type I collagenase expression by antisense RNA in melanoma cells results in reduced synthesis of the urokinase-type plasminogen activator receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(2): 342-348.
- [18] Lun YZ, Wang XL, Feng J. Purification and identification of the Kazal domain of a novel serine protease inhibitor, Hespintor, through a bacterial (Escherichia coli) expression system[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1): 321-326.