

· 基础论著 ·

FAM172A及其异构体重组蛋白对体外培养
肝细胞增殖的影响

张仁雯 康艳芳 乔雍 郝晓花 常路丝 李红敏 任慧 张晓静 孟雪 李兴旺 魏红山

【摘要】 目的 体外克隆人类基因FAM172A, 构建其原核表达载体并诱导其重组蛋白的表达, 制备兔抗FAM172A重组蛋白的多克隆抗体, 观察其在不同细胞系的表达情况。观察FAM172A-1和FAM172A-3蛋白对L02细胞增殖的影响。**方法** 利用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)及PCR技术, 构建原核表达质粒pET-32a(+)-FAM172A-1和pET-32a(+)-FAM172A-3。诱导该基因不同异构体重组蛋白的表达, 并通过蛋白质免疫印迹(Western blot)技术进行鉴定。纯化后的重组蛋白FAM172A-1和FAM172A-3与肝细胞L02细胞共孵育, 观察不同浓度的重组蛋白对细胞增殖的影响。利用纯化后的FAM172A(异构体3)重组蛋白免疫大耳白兔, 获得抗FAM172A-3蛋白的多克隆抗体, 利用酶联免疫吸附法(ELISA)以及Western blot技术对获得的多克隆抗体进行效价分析及特异性检测。**结果** 成功扩增获得FAM172A(异构体1、3)的基因片段, 测序结果与GenBank已公开的基因序列一致; 成功表达FAM172A(异构体1、3)的重组蛋白, 经过Western blot鉴定正确; 纯化后的重组蛋白FAM172A(异构体1、3)与L02细胞共孵育结果发现, 两者对L02细胞在一定浓度范围内均有促进细胞增殖的作用。所制备的兔抗人FAM172A-3重组蛋白的多克隆抗体, ELISA检测显示其效价可达1:1 280 000, Western blot检测证实该多克隆抗体的特异性良好; Western blot分析显示, 该蛋白在肝脏间质细胞和实质细胞均有一定程度的表达。**结论** FAM172A蛋白在肝实质细胞及肝间质细胞均表达, 且其重组蛋白可以促进L02细胞增殖, 推测该基因可能与肝细胞损伤、肝纤维化以及肝细胞再生等发生机制有关。

【关键词】 FAM172A基因; 多克隆抗体; 肝细胞; 细胞增殖

Effect of FAM172A and its isomer recombinant protein on proliferation of cultured L02 cells in vitro

ZHANG Ren-wen*, KANG Yan-fang[#], QIAO Yong, HAO Xiao-hua, CHANG Lu-si, LI Hong-min, REN Hui, ZHANG Xiao-jing, MENG Xue, LI Xing-wang, WEI Hong-shan. *Peking University Health Science Center, Beijing 100091; [#]Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: WEI Hong-shan, Email: drwei@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To clone human gene FAM172A in vitro and to establish prokaryotic expression vector of human gene FAM172A. To induce the expression of their recombinant proteins and rabbit anti-FAM172A-3 protein polyclonal antibody was prepared. To observe the expression of FAM172A (isomer 1, 3) in different cell lines and the effect of FAM172A protein on proliferation of cultured L02 cells. **Methods** With reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR), the gene fragments were cloned into prokaryotic expression vector pET-32a(+). The expression of gene recombinant proteins was induced and analyzed by Western blot. Purified recombinant protein and L02 cells were incubated, and the effect of proliferation of cultured L02 cells was analyzed. The FAM172A-3 purified recombinant protein was used to immunize the big ear rabbits to obtain polyclonal antibody. The potency and specificity of polyclonal

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.001

基金项目: 国家自然科学基金(No.81071411, No.81271901)

作者单位: 100191 北京, 北京大学教学医院地坛医院(张仁雯、魏红山); 首都医科大学附属北京佑安医院(康艳芳); 首都医科大学附属北京地坛医院(乔雍、郝晓花、常路丝、李红敏、任慧、张晓静、孟雪、李兴旺、魏红山); 新发突发传染病研究北京市重点实验室(郝晓花、魏红山)

通讯作者: 魏红山, Email: drwei@ccmu.edu.cn

第一作者: 张仁雯和康艳芳为共同第一作者

antibody were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. **Results** The recombinant protein of FAM172A were highly expressed. The recombinant FAM172A-1 and FAM172A-3 gene had the same DNA sequence with GenBank and the same molecular weight with prediction accessed by Western blot. ELISA analysis indicated that the titer of polyclonal antibody could achieve at 1 : 1 280 000. The high specificity of polyclonal antibody was confirmed by Western blot. Purified recombinant protein and L02 cells were incubated and the recombinant protein of FAM172A could promote L02 cells proliferation within a certain concentration range. **Conclusions** FAM172A (isomer 1, 3) expressed in hepatocytes and liver interstitial cells, which indicated it might be associated with hepatocellular injury and the mechanism of liver fibrosis. The recombinant protein of FAM172A could promote L02 cells proliferation within a certain concentration range, which might be associated with liver cell regeneration.

【Key words】 FAM172A gene; Polyclonal antibody; Hepatocyte; Cell proliferation

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是人类面临的主要健康问题之一, 在全球20亿慢性感染者中HBV感染者约占3.5亿^[1]。据统计, 每年约有60万人死于HBV感染所致的急性或慢性疾病^[2]。目前研究认为机体对HBV编码蛋白的免疫反应所导致的肝细胞损伤是HBV感染诱导肝细胞损伤的主要机制^[3]。但HBV诱导的免疫应答及其在乙型肝炎发病机制中某些环节的作用至今尚未完全阐明^[4]。

FAM172A基因是由李连喜等^[5]从人主动脉组织中首先克隆表达, 随后研究发现该基因的表达与糖尿病大血管病变有关。FAM172A表达上调可以促进细胞增殖并抑制凋亡。其研究结果提示, FAM172A基因表达与细胞生长调控有关^[6]。既往本课题组应用基因芯片以及差异蛋白质组技术等发现, FAM172A基因表达与病毒性肝炎慢性化及肝硬化的发生存在一定相关性^[7], 但该基因编码产物对体外肝细胞增殖的作用尚无相关报道。本研究通过体外克隆表达功能基因FAM172A, 纯化重组蛋白, 制备其多克隆抗体 (异构体3), 对该基因在不同肝细胞系的表达分布特征及其对肝细胞增殖的影响予以阐述, 为该基因在肝细胞损伤、肝纤维化及肝细胞再生的发生机制研究奠定一定理论基础。

材料与方法

一、实验材料与试剂

1. 实验所需细胞系: 人类肝癌细胞系 (HepG2细胞), 人类肝细胞系 (L02细胞), 人类肝星状细胞系 (LX2细胞) 均为本实验室保存; 大肠埃希菌DH5感受态细胞和大肠埃希菌BL21感受态细胞购自全式金生物技术有限公司。

2. 实验动物: 雄性大耳白兔, 体重2.3 kg, 购自北京大学医学部实验动物中心, 动物许可证号:

SCXK (京) 2011-0008。

3. 主要试剂: pET-32a (+) 载体为本室保存; Trizol购自Invitrogen公司; RT-PCR逆转录试剂盒购自上海Fermentas公司; Taq酶、dNTP、MgCl₂、pGEM-T-Vector等均购自美国Promega公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒、Western blot化学发光液购自美国Thermo公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、蛋白分析试剂盒以及二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 均购自美国Sigma公司; HisTrap-FF亲和层析柱购自美国GE公司; 蛋白A琼脂糖层析柱购自北京热景生物技术有限公司; HIS-标记的鼠单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 羊抗鼠-辣根过氧化物酶 (GAM-HRP) 购自美国BIO-RAD公司; MTT购自美国AMRESCO公司。

二、FAM172A (异构体1、3) 基因的扩增

根据FAM172A-1和FAM172A-3基因序列, FAM172A-1去除其N'-端18 aa的信号肽而设计扩增引物FAM172A-1 P1: 5' -GGTACCCAAATCCAGCAGGGAGGTC-3' 和P2: 5' -CTCGAGCAGCTCTTCGTGCTTGATG-3'; FAM172A-3 P1: 5' -GGTACCAAAAAGATGAA-CCGCCTC-3' 和P2: 5' -CTCGAGCAGCTCTTCGTGCTTGAT-3', 引物两端分别引入Kpn I/Xho I两个酶切位点。

利用Trizol法从HepG2细胞提取出总RNA, 然后通过反转录PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 获得cDNA并以此为模板获得目的基因序列。反应条件: ①94 °C, 5 min, ②94 °C, 40 s, ③61 °C退火40 s (FAM172A-1), 57 °C退火40 s (FAM172A-3), ④72 °C延伸1 min 30 s; ②~④重复29个循环, 72 °C, 10 min, 置于4 °C, 共进行30个循环。将扩增产物通过1%琼脂糖凝胶进行电

泳鉴定, 鉴定正确的目的片段予以纯化回收。

三、重组蛋白表达载体的构建

将连接酶、纯化回收的目的片段以及pGEM-T载体同时加入0.6 ml EP管中, 混匀后置于16 ℃水浴锅连接过夜; 次日将该连接体系转入大肠埃希菌DH5 α 感受态细胞中, 菌落扩增后, 将菌液平铺于含有氨苄青霉素的LB固体平板进行筛选(37 ℃、5% CO₂ 孵箱12~16 h); 从平板中挑取若干个单克隆菌落37 ℃进行菌落扩增, 质粒纯化后进行*Kpn* I/*Xho* I 酶切鉴定。酶切纯化后的目的片段, 与*Kpn* I/*Xho* I 双酶切的pET-32a(+) 表达质粒连接、转化, 再次酶切、测序鉴定。验证正确的pET-32a(+)-FAM172A-1和pET-32a(+)-FAM172A-3转化到大肠埃希菌BL21感受态细胞, 诱导表达备用。

四、重组蛋白的诱导表达

将转入表达菌株大肠埃希菌BL21感受态细胞中的表达质粒pET-32a(+)-FAM172A-1及pET-32a(+)-FAM172A-3经*Kpn* I/*Xho* I 双酶切鉴定, 将其菌液接种于含有氨苄青霉素(1:1000)的5 ml的LB培养基中, 37 ℃培养过夜, 次日将扩增后的菌液接种于含有氨苄青霉素(1:1000)的500 ml的LB培养基中, 37 ℃培养2~3 h使细菌密度值(*A*)达0.6~0.8即加入诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthi-B-dgalatoside, IPTG)至终浓度为1 mmol/L, 使细菌于37 ℃条件下继续扩增, 分别于2 h、4 h、6 h、8 h取样1 ml, 12 000 r/min、5 min离心收集细菌, 以100 μ l 的1.0 mol/L盐酸三(羟甲基)氨基甲烷(pH 6.8)将沉淀重悬, 加入5 \times 十二烷基硫酸钠凝胶上样缓冲液25 μ l, 99 ℃加热10 min, 离心后取上清20 μ l进行SDS-PAGE凝胶电泳分析, 并进行Western blot鉴定; 诱导蛋白采用镍柱纯化。-80 ℃保存备用。

五、兔重组蛋白FAM172A(异构体3)多克隆抗体的制备与鉴定

雄性大耳白兔1只, 体重2.3 kg, 免疫前3 d从兔耳缘静脉取血, 4 ℃静置过夜后分离血清作为阴性对照。第一次免疫, 于兔背部多点皮下注射1 mg纯化重组蛋白(蛋白与弗氏完全佐剂1:1乳化); 2周后先从耳缘静脉取血, 再采用上述方法多点皮下注射0.5 mg纯化重组蛋白(蛋白与弗氏不完全佐剂1:1乳化)进行第2次免疫; 间隔1周再重复免疫1次, 方法同第2次免疫。3次免疫后, 利用3次免疫前的耳缘静脉血进行多克隆抗体ELISA法效价分

析, 效价较高。因此, 定于第3次免疫后第3天用腹主动脉插管法取血, 离心收集血清, 采用蛋白A琼脂糖层析柱纯化抗体, 经SDS-PAGE分析后, 于-80 ℃保存备用。采用ELISA法测定纯化后多克隆抗体的效价; 采用Western blot鉴定制备的多克隆抗体的特异性。

六、FAM172A基因在不同细胞系中的表达

分别从HepG2细胞、L02细胞及LX2细胞中提取细胞总蛋白, 通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度, 以40 μ g/孔来决定各个细胞系的上样量, 进行Western blot鉴定。 β -actin一抗和二抗(GAM)的稀释比例均为1:4000; 以制备的多克隆抗体作为一抗的稀释比例为1:1000, 二抗(GAR)稀释比例为1:1000; 化学发光显影液、曝光。

七、细胞增殖实验(MTT)

用不同浓度的FAM172A异构体1、3的重组蛋白与血清饥饿12 h后的L02细胞共孵育24 h, 加入MTT(20 μ l), 37 ℃孵育4 h后终止, 吸弃上清, 每孔加入150 μ l DMSO溶解结晶物, 室温震荡10 min, 酶标仪于490 nm/570 nm(参照波长)读取4值。

八、统计学处理

采用GraphPad Prism 5.01软件进行统计学分析。多组之间的均数差异比较采用单因素方差分析; 两组数据之间比较采用*t*检验。*P* < 0.05为差异具有统计学意义。

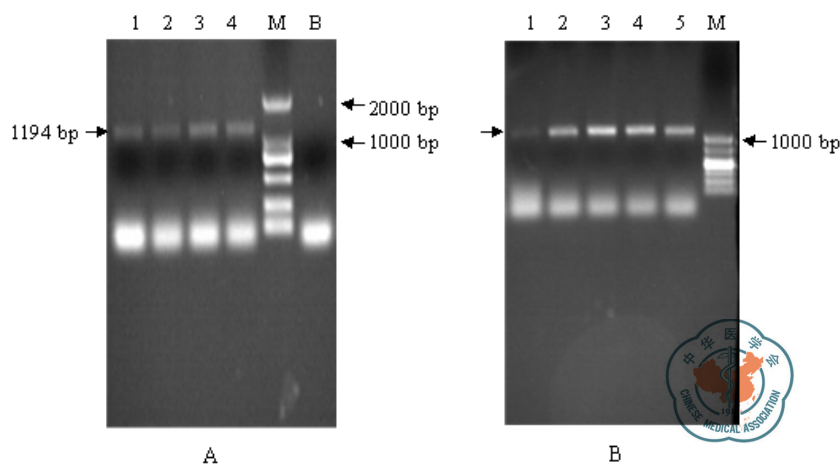
结 果

一、FAM172A重组蛋白的表达及其多克隆抗体的制备与鉴定

以HepG2细胞提取的RNA逆转录后产物为模板, PCR方法获得预期的FAM172A-1和FAM172A-3的基因片段(图1A, 1B)。*Kpn* I/*Xho* I 双酶切鉴定以及测序结果显示, FAM172A-1和FAM172A-3目的基因已经完全正确的插入原核表达载体pET-32a(+)中, 原核表达质粒构建成功(图2A, 2B)。

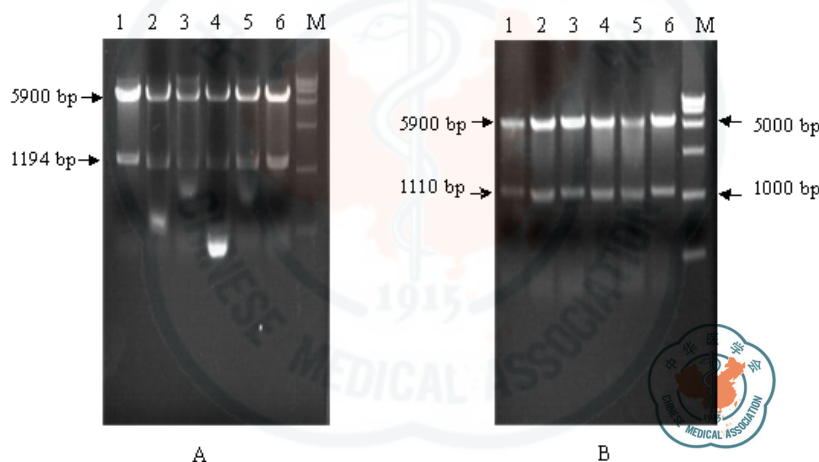
FAM172A(异构体1、3)重组蛋白的鉴定: SDS-PAGE分析结果显示, 未诱导组pET-32a(+)-FAM172A-1和pET-32a(+)-FAM172A-3均无明显目的蛋白表达, 而加入诱导剂组则有大量目的蛋白表达, 并且两者皆以细菌扩增2 h时蛋白表达量最高。FAM172A-1和FAM172A-3重组蛋白(均含His标签)大小分别为60 kDa和58 kDa。Western blot鉴定结果与SDS-PAGE结果一致(图3)。

大量诱导后的重组蛋白主要存在于包涵体中,



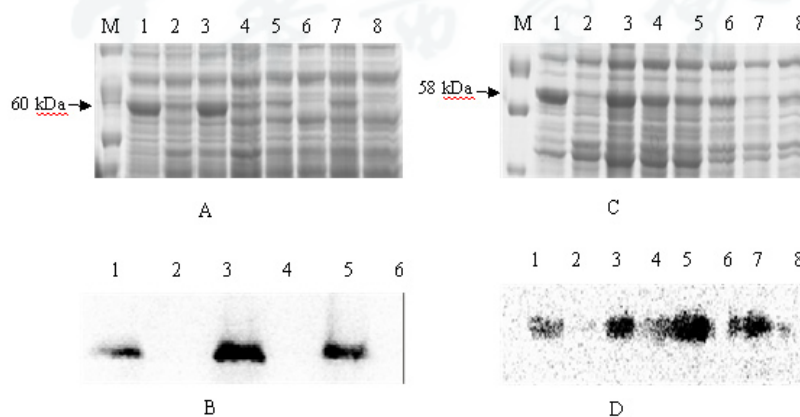
注: A: FAM172A-1基因的PCR扩增结果, 箭头所示即为目的片段(1: HepG2为模板; 2: 肝组织; 3: 淋巴组织; 4: PBMC; M为DL2000 marker; B为空白对照)。B: FAM172A-3基因的PCR扩增结果, 箭头所示即为目的片段, 约1110 bp(1: 胸腺组织; 2: HepG2; 3: 4淋巴组织; 5: PBMC; M为DL1000 marker)

图1 FAM172A的PCR产物图



注: A: pET-32a(+)-FAM172A-1原核表达质粒酶切电泳, 上箭头所示即为目的载体, 下箭头所示即为目的片段(1~6均为pET-32a(+)-FAM172A-1原核表达质粒酶切, M为DL15000 marker)。B: pET-32a(+)-FAM172A-3原核表达质粒酶切电泳, 上箭头所示即为目的载体, 下箭头所示即为目的片段(1~6均为pET-32a(+)-FAM172A-3原核表达质粒酶切, M为DL15000 marker)

图2 FAM172A-1及FAM172A-3重组蛋白原核表达质粒的构建



注: A: FAM172A-1 37℃重组蛋白诱导与非诱导的结果。箭头所示即为该基因的重组蛋白。(M为marker; 1、3、5、7分别为诱导组2 h、4 h、6 h、8 h的重组蛋白表达情况, 2、4、6、8分别为非诱导组2 h、4 h、6 h、8 h的重组蛋白表达)。B: FAM172A-1 37℃重组蛋白诱导与非诱导的Western blot鉴定图, 图示同A。C: FAM172A-3 37℃重组蛋白诱导与非诱导的结果。箭头所示即为该基因的重组蛋白, 图示同A。D: FAM172A-3 37℃重组蛋白诱导与非诱导的Western blot鉴定图, 图示同A

图3 FAM172A-1及FAM172A-3重组蛋白表达及鉴定

通过镍柱纯化后该蛋白主要用于相关的细胞实验(图4)。

ELISA分析结果显示,免疫后产生的抗体效价测量的均值(均设置测量复孔)与免疫前阴性对照相比均大于2.1倍,提示制备的该多克隆抗体具有较高的效价,约为1:1 280 000,见表1。收集FAM172A(异构体3)重组蛋白免疫后的兔血清,蛋白A柱纯化抗体结果见SDS-PAGE电泳图(图5A)。Western blot鉴定证实所制备的抗体特异性较好,按照1:160 000稀释后目的条带仍可见(图5B)。

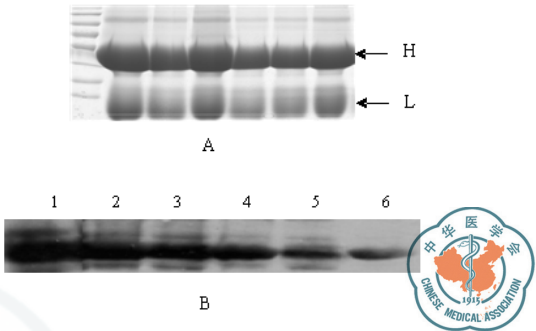
二、FAM172A在各细胞系中的分布特点

利用制备的FAM172A(异构体3)的多克隆抗体及本实验室保存的肝肿瘤细胞系(HepG2),肝细胞系(L02)及肝星状细胞系(LX2)进行了FAM172A在各细胞系分布情况的Western blot蛋白印迹分析(图6);Western blot结果显示,FAM172A(异构体1、3)蛋白在肝肿瘤细胞系、

正常肝细胞系及肝间质细胞系均有表达。

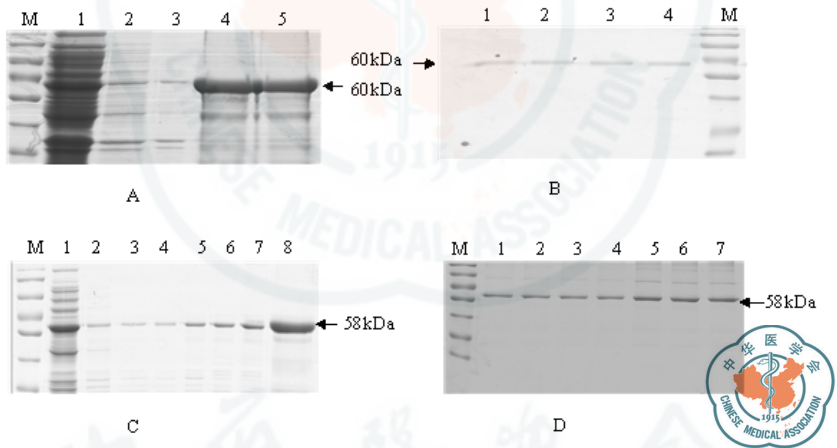
三、不同浓度的重组蛋白对体外培养肝细胞系增殖的作用

FAM172A通过生物信息学分析属于非糖基化



注: A: 蛋白A柱纯化后的SDS-PAGE电泳图, 图中上箭头所示为重链, 下箭头所示为抗体的轻链; B: 抗体的特异性的Western blot鉴定: 1: 一抗以1: 5000稀释获得的目的蛋白条带; 2: 一抗以1: 10000稀释获得的目的蛋白条带; 3: 一抗以1: 20000稀释获得的目的蛋白条带; 4: 一抗以1: 40000稀释获得的目的蛋白条带; 5: 一抗以1: 80000稀释获得的目的蛋白条带; 6: 一抗以1: 160000稀释获得的目的蛋白条带

图5 FAM172A-3多克隆抗体的纯化及特异性

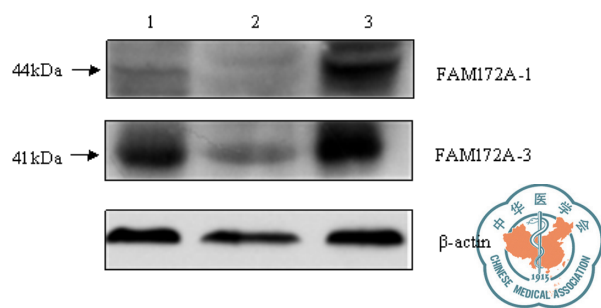


注: A: FAM172A-1 37℃ 2 h诱导的重组蛋白, 图中箭头所示为重组蛋白(M为marker, 1为A液, 2为B液, 3为C液, 4~5为D液)。B: FAM172A-1 37℃ 2 h诱导的重组蛋白的纯化图, 图中箭头所示为纯化后FAM172A-1的重组蛋白(M为marker, 1~4均为纯化后的重组蛋白)。C: FAM172A-3 37℃ 2 h诱导的重组蛋白表达, 图中箭头所示为FAM172A-3的重组蛋白(M为marker, 1为A液, 2~4为B液, 5~7为C液, 8为D液)。D: FAM172A-3 37℃ 2 h诱导的重组蛋白的纯化图, 图中箭头所示为纯化后的重组蛋白(M为marker, 1~7均为纯化后的重组蛋白)

图4 FAM172A-1及 FAM172A-3重组蛋白表达及纯化

表1 纯化后FAM172A-2多克隆抗体的效价表

组别	抗体滴度						
	1: 5000	1: 2 × 10 ⁴	1: 8 × 10 ⁴	1: 1.6 × 10 ⁵	1: 3.2 × 10 ⁵	1: 6.4 × 10 ⁵	1: 1.28 × 10 ⁶
阴性对照1	0.9334	0.4300	0.3257	0.2873	0.3526	0.2600	0.2628
阴性对照1	0.9727	0.3378	0.3660	0.3106	0.2769	0.2787	0.2511
第1次免疫1	4.2104	3.8467	2.2023	1.3010	0.7826	0.5736	0.4732
第1次免疫2	4.5150	3.8165	2.0840	1.1772	0.7393	0.5279	0.4818
第2次免疫1	5.1281	4.9092	4.1276	4.0203	4.0291	3.3702	2.4193
第2次免疫2	5.2628	4.8654	3.8235	4.0556	4.1201	3.3911	2.3360
第3次免疫1	5.5633	5.1070	3.7627	4.1549	4.3584	4.2437	3.6158
第3次免疫2	5.6183	4.8831	4.2619	4.0947	4.3821	4.3474	3.6711



注：图中的1、2、3泳道分别是肝癌细胞系（HepG2），肝细胞系（L02）及肝星状细胞系（LX2）

图6 FAM172A-1及FAM172A-3在各细胞系的分布特点

修饰的分泌蛋白，通过既往实验推断其重组蛋白可能会对肝细胞系有一定的增殖促进作用。FAM172A（异构体1、3）的重组蛋白由本实验诱导纯化所获得，用DMEM培养基将其稀释为不同浓度（分别为1、10、20、30、40、50、80和100 ng/ml），与肝细胞系L02细胞37℃共孵育24 h，加入MTT 20 μl，37℃孵育4 h后终止反应，酶标仪于490 nm/570 nm（参照波长）读取A值。实验共重复18次，FAM172A-1重组蛋白累计重复108个复孔，FAM172A-3重组蛋白共重复72个复孔。结果提示，FAM172A（异构体1）重组蛋白在10~100 ng/ml浓度范围内，FAM172A（异构体3）重组蛋白在80~100 ng/ml浓度范围内均能促进肝细胞系L02细胞的增殖（图7）。

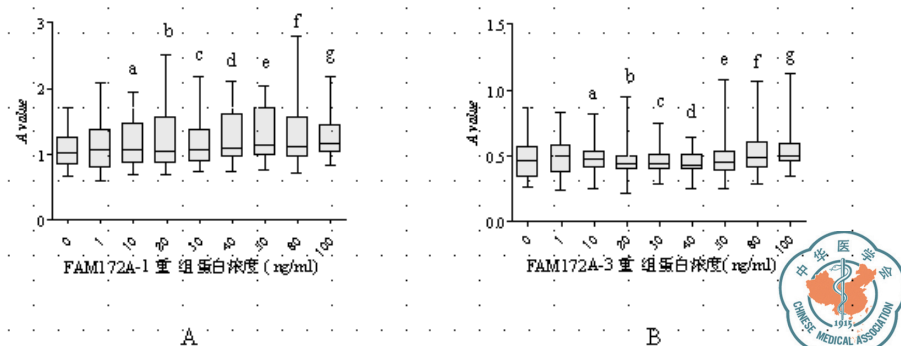
讨 论

本研究结果表明，FAM172A（异构体1）重组蛋白和FAM172A（异构体3）分别在10~100 ng/ml和80~100 ng/ml浓度范围内能够促进肝细胞系L02细胞的增殖。

李连喜等^[6]转染PDC315-FAM172A质粒至

HEK293细胞，HEK293细胞中FAM172A基因的过表达能够促进该细胞增殖、抑制其凋亡^[5]。尽管所用的细胞系与之前研究所采用的HEK293细胞（人胚胎肾细胞）有所不同，但本实验将纯化的重组蛋白（FAM172A异构体1、3）与肝细胞L02共孵育，结果显示该基因对L02细胞也有一定的促增殖作用，推测FAM172A基因对细胞具有一定的生长调控作用。为了获得FAM172A（异构体1、3）重组蛋白，本研究成功构建了FAM172A-1，FAM172A-3的原核表达质粒，诱导并纯化了FAM172A（异构体1、3）的重组蛋白，制备了抗FAM172A（异构体3）重组蛋白的兔抗多克隆抗体，并通过ELISA及Western blot分析进行了特异性和免疫活性检测，证实其存在良好的特异性和高效价（1:1 280 000）。利用所制备的抗体对体外培养的不同肝细胞系分析显示该基因除在肝实质细胞表达外，在肝间质细胞中亦有一定程度的表达。

生物信息学分析显示，FAM172A位于染色体5q15上，目前报道的FAM172A共有4个异构体。FAM172A-1（异构体1）全长416 aa，1~18 aa为信号肽，属于分泌蛋白；FAM172A-2（异构体2）全长292 aa；FAM172A-3（异构体3）全长370 aa；FAM172A-4（异构体4）全长306 aa。本研究发现，FAM172A（异构体1、3）重组蛋白在一定浓度范围对肝细胞系L02细胞具有促增殖作用。根据生物信息学分析结果，FAM172A-2（异构体2）和FAM172A-1（异构体1）的一级结构差异在于其缺少263~416 aa；FAM172A-3（异构体3）与FAM172A-1（异构体1）的结构差异是缺少N'-端的46 aa；FAM172A-4（异构体4）与前三者的结构差异除与异构体1和3的区别外，异构体4还缺少从129~189 aa。本研究观察了



注：A：FAM172A-1重组蛋白对L02细胞的影响。a、b、c、d、e、f、g分别与对照组进行t检验统计学分析，P值依次为0.034、0.0014、0.002、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ 和 $P < 0.0001$ ，提示FAM172A-1在10~100 ng/ml范围内能够促进L02细胞增殖；B：FAM172A-3重组蛋白对L02细胞的影响。f、g分别与对照组进行t检验，P值依次为0.0139和0.0056，提示FAM172A-3在80~100 ng/ml范围内能够促进L02细胞增殖

图7 FAM172A-1和FAM172A-3细胞增殖实验（MTT）

FAM172A (异构体1、3) 对于体外培养的肝细胞增殖的影响, 由此推测, FAM172A蛋白促进细胞增殖的功能结构域可能在其相对靠近C-末端的区域。另一方面, 基于异构体之间的共同保守序列, 本研究最终选择了以异构体3的重组蛋白来制备兔抗多克隆抗体, 以使该抗体可以发挥其最大效用。

肝功能衰竭发生、发展的机制十分复杂, 至今尚未明确, 出现大量肝细胞死亡是其最核心的事件^[8], 故促进肝细胞增殖是该类疾病药物研发的主要方向之一。但迄今为止, 临床上尚缺乏可以应用的、有效的促肝细胞生长因子^[9]。

目前, 肝脏干细胞 (liver stem cells, LSCs) 的研究已进入了一个新阶段, 微型胶囊型肝细胞的腹膜移植可能是最有前景的新选择, 这样可以保护细胞免受直接的免疫攻击, 从而避免免疫抑制的发生^[10]。但是目前细胞分化成熟后增殖能力下降, 因此如何获得大量细胞成为了研究的一个难题^[11]。间充质干细胞和骨髓干细胞的研究正在进行中, 间充质细胞可以分化为功能性的肝细胞, 其高度免疫调节能力可以作为急性肝功能衰竭治疗和相关应答的有效工具^[12]; 而骨髓干细胞是一类具有巨大增殖能力和定向分化潜能的细胞, 其定向分化为功能细胞^[13], 并且可以治疗器官损伤, 已成为整个生命科学的研究热点之一。骨髓干细胞是肝细胞的重要肝外来源, 自体骨髓干细胞移植后, 在体内环境其可以分化为肝细胞, 从而替代损伤肝细胞并促进受体内源性肝细胞增殖^[14-15], 达到肝功能修复和肝细胞再生的目的。该基因对体外培养肝细胞的促进增殖作用可能会为探讨临床治疗肝功能衰竭患者的全新方法提供一定的理论基础。

综合近期国内同行的报道, 该基因编码蛋白对其他细胞具有一定的增殖作用^[5]以及本研究结果均提示该基因编码的蛋白对细胞增殖的促进作用可能具有一定的普遍性, 但该基因调节细胞增殖的分子机制尚待进一步探讨, 诸如FAM172A编码蛋白在细胞表面的受体以及介导细胞增殖作用的信号转导通路等问题依然悬而未决, 相应的研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Alavian SM, Bagheri-Lankarani K, Mahdavi-Mazdeh M, et al. Hepatitis B and C in dialysis units in Iran: changing the epidemiology. *Hemodial Int*, 2008, 12(3):378-382.
- 2 Devi KhS, Brajachand N, Singh HL, et al. Coinfection by human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus in injecting drug users. *J Indian Med Assoc*, 2009, 107(3):144, 146-147.
- 3 Mohamed R, Desmond P, Suh DJ, et al. Practical difficulties in the management of hepatitis B in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(9):958-969.
- 4 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*, 1995, 17(2-3):261-281.
- 5 李连喜, 陶征, 董雪红, 等. C5orf21基因的分子克隆及在糖尿病大血管病变中的作用. *中华医学杂志*, 2009, 89(36):2574-2577.
- 6 李连喜, 周闻白, 陶征, 等. FAM172A蛋白对人胚胎肾细胞凋亡及增殖的影响. *中华医学杂志*, 2010, 90(34):2424-2427.
- 7 李国力, 魏红山, 宋淑静, 等. 血管紧张素 II 对肝星状细胞基因表达的影响. *中华肝脏病学杂志*, 2006, 14(12):914-919.
- 8 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(8):638-640.
- 9 李兰娟. 肝衰竭发病机制及治疗. *国际流行病学传染病学杂志*, 2008, 35(4):217-220.
- 10 Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(5):288-298.
- 11 Agarwal S, Holton KL, Lanza R. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(5):1117-1127.
- 12 Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, et al. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:860578.
- 13 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004, 364(9429):141-148.
- 14 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 等. 人自体骨髓干细胞移植治疗慢性肝功能衰竭的研究. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12):941-942.
- 15 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*, 2005, 33(1):108-119.

(收稿日期: 2012-12-04)

(本文编辑: 孙荣华)