

两种重组蛋氨酸酶表达条件优化及其对人肺腺癌细胞 GLC 的抑制作用研究^Δ

罗沈强^{1*}, 田长富^{2#}[1. 重庆医科大学附属第三医院(捷尔医院)药剂科, 重庆 401120; 2. 昆明医科大学科研实验中心, 昆明 650500]

中图分类号 R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1634-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.10

摘要 目的: 优化两种重组蛋氨酸酶表达的诱导条件, 并探讨其对宣威人肺腺癌细胞 GLC 的抑制作用。方法: 将重组蛋氨酸酶表达质粒 PGEX-4T1-4A1-MGL 和 PGEX-4T1-3B8-MGL 转染至感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达。以目标蛋白表达量为指标, 采用单因素试验对诱导前菌液起始光密度(OD_{600 nm})值、培养温度、诱导时间等诱导条件进行优化。采用亲和层析法对所得重组蛋氨酸酶 4A1-MGL、3B8-MGL 进行纯化; 采用考马斯蓝法检测其质量浓度, 十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测其纯度, 分光光度法检测其活性。采用 MTT 法检测经低、中、高剂量重组蛋氨酸酶(4A1-MGL 和 3B8-MGL 分别均为 0.1、0.2、0.4 U/mL)作用 24、48、72 h 后的细胞增殖情况, 并计算细胞抑制率。结果: 两种重组蛋氨酸酶表达的最优诱导条件为菌液起始 OD_{600 nm} 值 0.9、培养温度 37 $^{\circ}$ C、诱导时间 5 h。验证试验结果显示, 4A1-MGL、3B8-MGL 的蛋白表达量分别为 1.52 ± 0.04 、 1.28 ± 0.03 (RSD < 3%, $n=3$)。经纯化后, 4A1-MGL 的质量浓度为 (0.70 ± 0.02) mg/mL, 纯度为 (96.42 ± 3.15) %, 活性为 (0.45 ± 0.02) U/mg; 3B8-MGL 的质量浓度为 (0.56 ± 0.02) mg/mL, 纯度为 (97.43 ± 2.96) %, 活性为 (0.91 ± 0.03) U/mg。经低、中剂量 4A1-MGL 和 3B8-MGL 作用 48、72 h, 高剂量 4A1-MGL 和 3B8-MGL 作用 24、48、72 h 后, GLC 细胞的抑制率均显著升高, 且高剂量组作用 72 h 时显著高于同时间点低、中剂量组 ($P < 0.05$)。结论: 本研究成功优化了重组蛋氨酸酶表达的诱导条件, 所得 4A1-MGL 和 3B8-MGL 可剂量依赖性地抑制 GLC 细胞增殖。

关键词 重组蛋氨酸酶; 诱导条件; 单因素试验; GLC 细胞; 抑制作用

Study on Expression Condition Optimization of Two Recombinant Methioninases and Their Inhibitory Effects on Human Lung Adenocarcinoma Cells GLC

LUO Shenqiang¹, TIAN Changfu²[1. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (Gener Hospital), Chongqing 401120, China; 2. Scientific Research and Experiment Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the expression induction condition of two recombinant methioninases, and to investigate their inhibitory effects on the proliferation of human lung adenocarcinoma cells GLC. METHODS: Recombinant methioninases expression plasmid PGEX-4T1-4A1-MGL and PGEX-4T1-3B8-MGL were transfected into competent *Escherichia coli* Dh5 α , and induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside. Using the expression level of target protein as index, the initial OD_{600 nm} value before induction, culture temperature and induction time were optimized by single factor test. The recombinant methioninase 4A1-MGL

- 酶的双重作用[J]. 药理学学报, 2010, 45(9): 1194-1198.
- [21] 吴笑春, 辛华雯, 李馨, 等. 五酯胶囊对健康受试者他克莫司药动学的影响[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(8): 647-650.
- [22] 黄琪, 裴奇, 周于禄, 等. 五酯胶囊对拉米夫定人体内药动力学的影晌[J]. 中南药学, 2007, 5(5): 461-463.
- [23] 石庆玲. 五酯胶囊对阿托伐他汀药动学的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2014.

^Δ 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金资助项目[No.2018FE001(-194)]

* 药师, 硕士。研究方向: 肿瘤基因治疗。电话: 023-60353253。E-mail: 650807@hospital.cqmu.edu.cn

通信作者: 研究员, 硕士生导师。研究方向: 肿瘤基因治疗。电话: 0871-65922555。E-mail: tiancf@21cn.com

- [24] XUE XP, QIN XL, XU C, et al. Effect of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) on the pharmacokinetics of cyclosporin A in rats[J]. *Phytother Res*, 2013, 27(8): 1255-1259.

(收稿日期: 2018-10-10 修回日期: 2019-03-18)

(编辑: 张元媛)

and 3B8-MGL were purified by affinity chromatography. The concentration of recombinant methioninase was detected by Coomassie blue method. The purity of the product was detected by sodium lauryl benzene sulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis; its activity was detected by spectrophotometry. The proliferation of cells was detected by MTT assay after treated with low-dose, medium-dose and high-dose of recombinant methioninases (4A1-MGL or 3B8-MGL was 0.1, 0.2, 0.4 U/mL) for 24, 48, 74 h. Inhibitory rate of cells were calculated. RESULTS: The optimal induction condition of two recombinant methioninases included that initial OD_{600 nm} of 0.9, culture temperature of 37 °C, induction time of 5 h. The results of validation test showed that protein expression level of 4A1-MGL was 1.52 ± 0.04, that of 3B8-MGL was 1.28 ± 0.03 (RSD < 3%, n = 3). After purification, the concentration, purity and activity of 4A1-MGL were (0.70 ± 0.02) mg/mL, (96.42 ± 3.15)% and (0.45 ± 0.02) U/mg; and those of 3B8-MGL were (0.56 ± 0.02) mg/mL, (97.43 ± 2.96)% and (0.91 ± 0.03) U/mg. After treated with low-dose and medium-dose of 4A1-MGL and 3B8-MGL for 48 and 72 h, treated with high-dose of 4A1-MGL and 3B8-MGL for 24, 48 and 72 h, inhibitory rate of GLC cell was increased significantly, and high-dose group for 72 h was significantly higher than low-dose and medium-dose groups at same time point (P < 0.05). CONCLUSIONS: The induction conditions of recombinant methioninase expression are successfully optimized in this study. The obtained 4A1-MGL and 3B8-MGL could inhibit the proliferation of GLC cells in a dose-dependent manner.

KEYWORDS Recombinant methioninase; Induction condition; Single factor test; GLC cells; Inhibitory effect

蛋氨酸(Methionine)是哺乳类动物正常发育和成长所必需的氨基酸,且不能自身合成,必须从食物中摄取;同时,蛋氨酸也是大多数肿瘤细胞生长所必需的氨基酸^[1]。绝大部分肿瘤细胞(包括乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、胶质瘤、肾癌、黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌等)的一个共同特点是对蛋氨酸的绝对需求,这种现象被称为“蛋氨酸依赖”^[2]。蛋氨酸的代谢受蛋氨酸酶(Methionase)的调控,后者可消除机体内的蛋氨酸;当该酶活性受到抑制时,正常细胞还能通过高半胱氨酸甲基化途径获取蛋氨酸,而肿瘤细胞则不能,可见蛋氨酸酶的抑制不会影响正常细胞,但可影响肿瘤细胞的增殖,故有望成为新一代的抗肿瘤药物^[3]。

蛋氨酸酶具有旋光性,在动物体内L型易被肠壁吸收,而D型需转化为L型才能参与蛋白质的合成^[4]。其中,L-蛋氨酸酶γ-裂解酶(L-methionine-γ-lyase, MGL)包括真核和原核两种类型,具有抑制肿瘤细胞生长的作用^[5]。本课题组前期通过分子克隆技术,将阴道毛滴虫中两种真核类型的蛋氨酸酶基因片段(4A1和3B8)分别连接至以谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标记的原核表达载体PGEX-4T1中,成功构建了两种真核类型的重组蛋氨酸酶表达质粒PGEX-4T1-4A1-MGL和PGEX-4T1-3B8-MGL^[6]。本研究在此基础上,拟将这两种重组表达质粒转染至感受态大肠杆菌Dh5α中,以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白表达,并对诱导条件进行优化;表达产物经亲和层析法纯化,得到两种重组蛋氨酸酶4A1-MGL和3B8-MGL;通过检测上述两种重组蛋氨酸酶的浓度、纯度、活性以及其对宣威人肺腺癌细胞GLC的抑制率,初步探讨其对肺腺癌细胞增殖的抑制作用,以期后续细胞试验和动物实验的深入开展奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

ND-1000型微量核酸蛋白定量仪(美国NanoDrop公司);PectraMax190型酶标仪(美国Molecular Devices公司);VCX130型超声波组织粉碎仪(美国Sonic公司);Universal Hood II型凝胶成像系统(美国Bio Rad公司);U3010型紫外分光光度计(日本Hitachi公司);5702型高速离心机(德国Eppendorf公司);HZQ-X100型振荡培养箱(哈尔滨市东明医疗仪器厂);DYY-8C型电泳仪、DY-CP-31D型垂直电泳槽(北京市六一仪器厂);TS-8型摇床(江苏海门其林医用仪器厂);PH100-2A41L-A型显微镜(美国Pherix公司);DM2500型荧光显微镜(德国Leica公司);TP-2101型精密天平(美国Denver Instrument公司)。

1.2 药品与试剂

蛋氨酸酶对照品(批号:M2570-1VL,纯度:>99.9%)、Maker(批号:D531A D)、L-蛋氨酸均购自日本Takara公司;标准牛血清白蛋白(BSA,北京华美生科生物技术有限公司,批号:CSB-E08633h);10%胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:130412-140);RPMI 1640培养基(美国Gibco公司,批号:C11875500B);注射用氨苄西林钠(哈尔滨制药总厂,批号:16030902-1,规格:按C₁₆H₁₉N₃O₄S计算1.0g);IPTG(批号:927C054)、考马斯亮蓝R250染色液(批号:201205412)、考马斯亮蓝脱色液(批号:201203785)均购自上海索莱宝生物科技有限公司;还原型谷胱甘肽(批号:EC05BA0037)、LB培养基(批号:EB13KA0181)、苯甲基磺酰氟裂解保护液(批号:D120BA0007)、MTT检测试剂盒(批号:D410FA0001)、GST Resin型凝胶纯化柱(1 cm×0.6 cm, 50 μm)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;十二

烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液、3-甲基-2-苯并噻唑酮(MBTH)、磷酸吡哆醛均购自美国Sigma公司;pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS,福晨(天津)化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 原核表达载体、菌株与细胞

原核表达载体 PGEX-4T1 由香港中文大学孔祥俊教授惠赠;感受态大肠杆菌 Dh5 α (编号: D9017A) 购自宝生物工程科技有限公司;宣威人肺腺癌 GLC 细胞株由昆明医科大学郝萍教授惠赠。

2 方法与结果

2.1 重组蛋氨酸酶的转染、诱导表达及条件优化

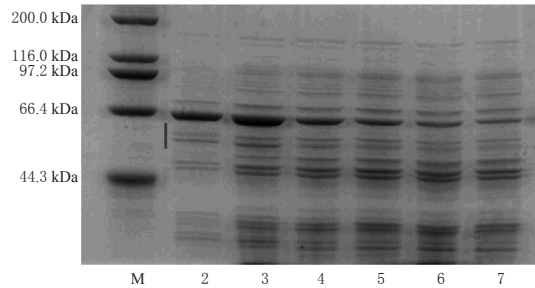
2.1.1 重组蛋氨酸酶的转染及诱导表达 参考本课题组前期研究,将阴道毛滴虫中两种真核类型的蛋氨酸酶基因片段(4A1和3B8)分别连接至 GST 标记的 PGEX-4T1 中,构建重组蛋氨酸酶表达质粒 PGEX-4T1-4A1-MGL 和 PGEX-4T1-3B8-MGL。分别将上述两种表达质粒转染至大肠杆菌 DH5 α 中,挑取单个菌落置于含氨苄西林钠的 LB 培养基 7 mL 中,置于摇床中,于适宜温度下以 180 r/min 培养过夜;随后将菌落转移至 LB 培养基 100 mL 中,使用紫外分光光度计于 600 nm 波长处检测其光密度(OD)值(即菌液起始 OD_{600 nm} 值),然后加入 IPTG 适量(终浓度为 0.6 mmol/L),诱导适宜时间,直至菌液 OD_{600 nm} 值约等于 2,收集菌液,于 4 °C 保存。将上述菌液以 3 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 PBS 重悬(每 0.1 克沉淀使用 PBS 6 mL)于试管中,并加入 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氨裂解保护液适量,在冰浴中超声(功率:200 W,频率:25 kHz)裂解,每超声 3 s 停止 4 s,共循环 30 次。使用显微镜观察直至无杆状菌体出现(即破碎率达 90% 以上)。将菌液于 4 °C 下以 10 000 r/min 离心 20 min,直至上清液清亮且无黑色碳化物出现时,收集上清液,备用。

2.1.2 重组蛋氨酸酶表达量的检测 参考文献[7]方法检测重组蛋氨酸酶的表达式,试验重复 3 次。取待测蛋白上清液、Marker(1.0 mg/mL)各 10 μ L,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(浓缩胶电压:80 V,分离胶电压:100 V),以考马斯亮蓝 R250 染色 60 min 后,以考马斯亮蓝脱色液脱色 90 min,置于凝胶成像系统上成像。使用 Image Lab 3.0 软件对蛋白条带进行分析,以目标蛋白与 Marker 条带的灰度值比值来表示目标蛋白的表达式。

2.1.3 诱导条件优化 参考文献[8],以目标蛋白(重组蛋氨酸酶 4A1-MGL)表达式为指标,采用单因素试验对诱导前菌液起始 OD_{600 nm} 值、培养温度、诱导时间等条件进行优化(该优化条件也适用于 3B8-MGL^[9])。

①菌液起始 OD_{600 nm} 值:将诱导时间设为 5 h,培养温度设为 37 °C,其余操作同“2.1.1”项,考察不同起始 OD_{600 nm} 值(0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6)对 4A1-MGL 蛋白表

达量的影响。结果显示,当起始 OD_{600 nm} 值为 0.9 时,4A1-MGL 蛋白的表达式最高;而当起始 OD_{600 nm} 值 \geq 1.0 时,4A1-MGL 蛋白的表达式呈下降趋势,详见图 1、表 1。故最终选择菌液起始 OD_{600 nm} 值为 0.9。



注: M. Marker; 2. 起始 OD_{600 nm} 值为 0.8; 3. 起始 OD_{600 nm} 值为 0.9; 4. 起始 OD_{600 nm} 值为 1.0; 5. 起始 OD_{600 nm} 值为 1.2; 6. 起始 OD_{600 nm} 值为 1.4; 7. 起始 OD_{600 nm} 值为 1.6

Note: M. Marker; 2. initial OD_{600 nm} value was 0.8; 3. initial OD_{600 nm} value was 0.9; 4. initial OD_{600 nm} value was 1.0; 5. initial OD_{600 nm} value was 1.2; 6. initial OD_{600 nm} value was 1.4; 7. initial OD_{600 nm} value was 1.6

图 1 菌液起始 OD_{600 nm} 值对 4A1-MGL 蛋白表达式影响的电泳图

Fig 1 Electrophoresis of the effect of different initial OD_{600 nm} on protein expression of 4A1-MGL

表 1 菌液起始 OD_{600 nm} 值、提取温度、诱导时间对 4A1-MGL 表达式的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

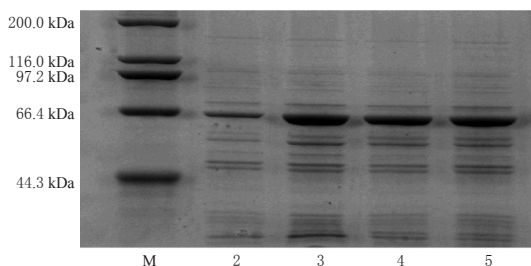
Tab 1 Effects of initial OD_{600 nm} value, extraction temperature and induction time on the expression of 4A1-MGL ($\bar{x} \pm s, n=3$)

菌液起始 OD _{600 nm} 值	表达式	培养温度, °C	表达式	诱导时间, h	表达式
0.8	0.98 \pm 0.11	35	0.26 \pm 0.03	2	0.09 \pm 0.02
0.9	1.44 \pm 0.04	37	1.32 \pm 0.02	3	0.93 \pm 0.04
1.0	0.69 \pm 0.03	39	1.14 \pm 0.02	4	1.21 \pm 0.03
1.2	0.51 \pm 0.07	41	1.15 \pm 0.04	5	1.55 \pm 0.03
1.4	0.36 \pm 0.01			6	1.42 \pm 0.02
1.6	0.24 \pm 0.02				

②培养温度:将菌液起始 OD_{600 nm} 值设为 0.9,诱导时间设为 5 h,其余操作同“2.1.1”项,考察不同培养温度(35、37、39、41 °C)对 4A1-MGL 蛋白表达式的影响。结果显示,当培养温度为 37 °C 时,4A1-MGL 蛋白的表达式最高;而当温度 $>$ 37 °C 时,4A1-MGL 蛋白的表达式有所减少,详见图 2、表 1。故最终选择培养温度为 37 °C。

③诱导时间:将菌液起始 OD_{600 nm} 值设为 0.9,培养温度设为 37 °C,其余操作同“2.1.1”项,考察不同诱导时间(2、3、4、5、6 h)对 4A1-MGL 蛋白表达式的影响。结果显示,当诱导时间为 2 h 时,4A1-MGL 蛋白的表达式最低;而当诱导时间为 5 h 时,4A1-MGL 蛋白的表达式最高,详见图 3、表 1。故最终选择诱导时间为 5 h。

2.1.4 验证试验 按上述最优条件(即起始 OD_{600 nm} 值为 0.9、培养温度为 37 °C、诱导时间为 5 h)平行操作 3 次,按“2.1.2”项下方法检测目标蛋白的表达式。结果,4A1-MGL 蛋白的表达式为 1.52 \pm 0.04 (RSD = 2.63%, n = 3),

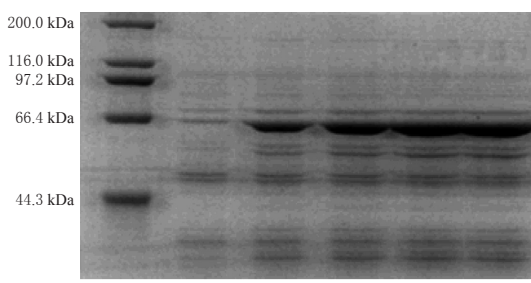


注: M. Maker; 2. 培养温度为 35 ℃; 3. 培养温度为 37 ℃; 4. 培养温度为 39 ℃; 5. 培养温度为 41 ℃

Note: M. Maker; 2. culture temperature was 35 ℃; 3. culture temperature was 37 ℃; 4. culture temperature was 39 ℃; 5. culture temperature was 41 ℃

图2 培养温度对4A1-MGL蛋白表达量影响的电泳图

Fig 2 Electrophoregram of the effects of culture temperature on protein expression of 4A1-MGL



注: M. Maker; 2. 诱导时间为 2 h; 3. 诱导时间为 3 h; 4. 诱导时间为 4 h; 5. 诱导时间为 5 h; 6. 诱导时间为 6 h

Note: M. Maker; 2. induction time was 2 h; 3. induction time was 3 h; 4. induction time was 4 h; 5. induction time was 5 h; 6. induction time was 6 h

图3 诱导时间对4A1-MGL蛋白表达量影响的电泳图

Fig 3 Electrophoregram of the effects of induction time on protein expression of 4A1-MGL

3B8-MGL蛋白的表达量为 1.28 ± 0.03 (RSD=2.34%, $n=3$)。

2.2 重组蛋氨酸酶的纯化

按“2.1”项下最优条件诱导表达重组蛋氨酸酶4A1-MGL和3B8-MGL后,取上清液各适量,以0.45 μm微孔滤膜滤过后,采用亲和层析法以凝胶纯化柱纯化,加入洗脱缓冲液(pH 8.0;含20 mmol/L还原型谷胱甘肽、50 mmol/L Tris-盐酸溶液,用水定容至50 mL)2 mL,以500 r/min离心1 min,即得纯化后的重组蛋氨酸酶4A1-MGL和3B8-MGL溶液。上述产物均于4 ℃保存,待用。

2.3 重组蛋氨酸酶的浓度和纯度测定

采用考马斯亮蓝法检测重组蛋氨酸酶的质量浓度^[10],试验重复3次。取标准BSA适量,用水配制成质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1 mg/mL的标准溶液。以PBS为对照,取上述不同质量浓度的BSA标准溶液各10 μL至96孔板中,依次加入PBS 5 μL和待测蛋氨酸酶溶液10 μL,随后加入考马斯亮蓝R250染色液285 μL,显色5 min后,以酶标仪于595 nm

波长处检测其OD_{595 nm}值。以标准BSA的质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、其OD_{595 nm}值(y)为纵坐标进行线性回归;精密度、准确度、重复性试验等方法学考察内容见本课题组前期研究^[11]。结果,回归方程为 $y=0.350 0x+1.484 0$ ($R^2=0.951 6$),表明标准BSA检测质量浓度的线性范围为0.1~1 mg/mL。根据回归方程计算得4A1-MGL蛋白的质量浓度为 (0.70 ± 0.02) mg/mL (RSD=2.86%, $n=3$),3B8-MGL蛋白的质量浓度为 (0.56 ± 0.02) mg/mL (RSD=3.57%, $n=3$)。

重组蛋氨酸酶按“2.1.2”项下方法进行SDS-PAGE电泳后,采用Image Lab 3.0软件分析目标蛋白的纯度[目标蛋白纯度=(目标蛋白条带的平均灰度值/目标蛋白所在泳道各条带的平均灰度值之和)×100%],试验重复3次。结果,测得4A1-MGL蛋白的纯度为 $(96.42 \pm 3.15)\%$;3B8-MGL蛋白纯度为 $(97.43 \pm 2.96)\%$ 。

2.4 重组蛋氨酸酶的活性测定

采用分光光度法检测重组蛋氨酸酶的活性^[12],试验重复3次。取蛋氨酸酶对照品适量,以水为溶剂配制活性分别为1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 U/mg的标准溶液。取待测蛋氨酸酶溶液50 μL,加至酶底液[每200 mL含100 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH 8.0)、25 mmol/L L-蛋氨酸、10 μmol/L磷酸吡哆醛]500 μL中,于37 ℃水浴中反应10 min,后以4.5%三氯乙酸溶液终止反应,于4 ℃下以10 000 r/min离心5 min;取上清液400 μL,加入1 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 5.2)0.8 mL和0.05% MBTH溶液0.3 mL,混匀,于50 ℃水浴中反应40 min,冷却至室温后,以紫外分光光度计于315 nm波长处检测其OD_{315 nm}值。空白对照组把加入酶底液和三氯乙酸溶液的顺序调换,其余操作同上。以蛋氨酸酶对照品的活性值(x , U/mg)为横坐标、其OD_{315 nm}值(y)为纵坐标进行线性回归;精密度、准确度、重复性试验等方法学考察内容见本课题组前期研究^[13]。结果,回归方程为 $y=5.744 3x-0.005 3$ ($R^2=0.993 0$),表明蛋氨酸酶检测活性的线性范围为0.062 5~1.0 U/mg。取两种待测蛋白溶液各50 μL,同法测定OD_{315 nm}值,并根据上述回归方程计算,测得4A1-MGL蛋白的活性为 (0.45 ± 0.02) U/mg (RSD=4.44%, $n=3$),3B8-MGL蛋白的活性为 (0.91 ± 0.03) U/mg (RSD=3.30%, $n=3$)。

2.5 重组蛋氨酸酶对GLC细胞抑制率的检测

采用MTT法检测两种重组蛋氨酸酶对GLC细胞的抑制作用,并计算细胞抑制率^[14],试验重复3次。将GLC细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(以下简称“完全培养基”)中,置37 ℃、5% CO₂的培养箱中培养(下同)。取对数生长期的GLC细胞适量,以完全培养基重悬后,按 5×10^3 个/mL接种于96孔培养板(每孔100 μL)中,培养过夜。将细胞随机分为空白组(无细胞、无药物)、对照组(有细胞、无药物)和4A1-MGL、3B8-

MGL不同剂量组(均设置低、中、高剂量,分别为0.1、0.2、0.4 U/mL,以完全培养基为溶剂;剂量设置参考文献[15]),每组设置5个复孔。空白组、对照组分别加入完全培养基100 μ L,各给药组加入含相应药物的完全培养基100 μ L,分别于培养24、48、72 h时,弃去培养基,每孔加入5 mg/mL MTT溶液10 μ L,继续培养4 h后,吸弃上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,振荡10 min。以酶标仪于490 nm处测定各孔OD_{490 nm}值,以空白组OD_{490 nm}值调零后,计算细胞的增殖抑制率[抑制率=(1-试验组平均OD_{490 nm}值/对照组平均OD_{490 nm}值)×100%]。采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果显示,与对照组比较,经低、中剂量4A1-MGL和3B8-MGL作用48、72 h,高剂量4A1-MGL和3B8-MGL作用24、48、72 h后,GLC细胞的抑制率均显著升高,且高剂量组作用72 h时显著高于同时间点低、中剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见表2。

表2 各组细胞抑制率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of cell proliferation inhibition rate in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
4A1-MGL低剂量组	3.68±1.14	5.57±1.35*	7.58±1.56**
4A1-MGL中剂量组	7.34±1.45	18.54±1.42*	33.32±8.01**
4A1-MGL高剂量组	11.34±1.98*	21.53±3.37*	60.28±3.98*
3B8-MGL低剂量组	2.95±1.01	4.24±1.12*	5.66±1.80 [△]
3B8-MGL中剂量组	5.95±1.23	11.02±1.03*	16.30±2.22 [△]
3B8-MGL高剂量组	10.78±1.57*	22.06±2.14*	56.94±8.60*

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与4A1高剂量组比较,* $P<0.05$;与3B8高剂量组比较,[△] $P<0.05$

Note: vs. control group, * $P<0.05$; vs. 4A1 high concentration group, * $P<0.05$; vs. 3B8 high concentration group, [△] $P<0.05$

3 讨论

蛋氨酸依赖是大多数肿瘤细胞的显著特征,这种依赖是一种代谢缺陷,也是肿瘤选择性治疗的靶点之一,因此利用重组蛋氨酸酶去减少体内蛋氨酸的生产已成为抗肿瘤基因治疗药物研发的热点之一^[16]。蛋氨酸酶是调控蛋氨酸表达的关键酶,本研究在重组蛋氨酸酶的基础上,对其表达的诱导条件进行优化;同时以肿瘤细胞蛋氨酸依赖为原理,初步探讨了重组蛋氨酸酶对GLC细胞的体外抑制作用。

有研究表明,不同的菌液起始OD_{600 nm}值、诱导时间、培养温度等条件对目的蛋白表达量的影响较大^[7,17]:(1)诱导前的菌液浓度是影响蛋白表达量的主要因素之一,而起始OD_{600 nm}值是反映其浓度的有效指标;而且,当细胞处于对数生长期也有利于蛋白的表达。(2)适宜的培

养温度可有利于蛋白产率的提高。(3)诱导时间是影响蛋白表达的关键因素之一,其过短或过长均可导致蛋白产率偏低。鉴于此,本结果对上述3项因素进行了单因素试验。结果显示,当菌液起始OD_{600 nm}值为0.9、培养温度为37 $^{\circ}$ C、诱导时间为5 h时,重组蛋氨酸酶的表达量最多,为最优诱导条件;验证试验所得4A1-MGL和3B8-MGL的蛋白表达量分别为 1.52 ± 0.04 、 1.28 ± 0.03 (RSD<3%)。

有研究指出,经破碎离心后,重组蛋氨酸酶同时存在于包涵体沉淀和上清液中,若从沉淀中获取所需蛋白,则存在包涵体沉淀不易复溶、复性效率不高、目标蛋白得率偏低等问题^[18]。本课题组在研究过程中发现,重组质粒PGEX-4T1-4A1-MGL和PGEX-4T1-3B8-MGL表达的蛋氨酸酶主要以游离形式存在,故本研究选用了上清液进行后续试验。随后,本研究采用亲和层析法以凝胶纯化柱对重组蛋氨酸酶进行了纯化。其原理为:含目标蛋白的上清液从凝胶纯化柱中经过,标记的GST会被吸附在纯化柱表面,从而实现了目标蛋白与标记蛋白的分离,减少了后者对目标蛋白纯度的影响^[19]。经纯化后,本研究采用考马斯亮蓝法和SDS-PAGE电泳法分别检测了重组蛋氨酸酶的浓度和活性。其中,考马斯亮蓝法的原理为:在酸性条件下,染料与待测蛋白结合,最大吸收波长将由465 nm变为595 nm;且在检测的质量浓度范围内,待测蛋白和染料复合物的OD_{595 nm}值与待测蛋白质量浓度呈正比^[10]。结果,所得4A1-MGL蛋白的质量浓度为 (0.70 ± 0.02) mg/mL、纯度为 (96.42 ± 3.15) %,3B8-MGL蛋白的质量浓度为 (0.56 ± 0.02) mg/mL、纯度为 (97.43 ± 2.96) %。本研究采用分光光度法检测了所得重组蛋氨酸酶的活性。其原理为:蛋氨酸、蛋氨酸酶和磷酸吡哆醛反应后可生成巯基甲烷、 α -酮丁酸和氨,后两者均可用以评价蛋氨酸酶的活性;同时考虑到 α -酮丁酸在315 nm波长处有强烈的吸收峰,故本研究通过定量检测 α -酮丁酸的生成量来计算蛋氨酸酶的活性^[20]。结果,所得4A1-MGL蛋白的活性为 (0.45 ± 0.02) U/mg,3B8-MGL蛋白活性为 (0.91 ± 0.03) U/mg。

本研究采用MTT法初步考察了两种重组蛋氨酸酶对GLC细胞增殖的影响。结果显示,与对照组比较,经低、中剂量4A1-MGL和3B8-MGL作用48、72 h,高剂量4A1-MGL和3B8-MGL作用24、48、72 h后,GLC细胞的抑制率均显著升高,且高剂量组作用72 h时显著高于同时间点低、中剂量组。这提示经不同剂量的3B8-MGL和4A1-MGL作用后,GLC细胞的增殖受到了不同程度的抑制,且这种作用具有一定的剂量依赖性。

综上所述,本研究成功优化了重组蛋氨酸酶表达的诱导条件,并纯化得到4A1-MGL和3B8-MGL蛋白;两种重组蛋氨酸酶对GLC细胞具有一定的抑制作用,且呈剂量依赖性。本研究可为后续蛋氨酸酶的抗肿瘤作用

及机制分析奠定基础。但本研究通过上清液途径获取的目标蛋白表达总量较少,后续需解决包涵体沉淀不易溶解、复性效率不高等问题,从包涵体沉淀途径获取更多的所需蛋白;此外,蛋氨酸酶对肿瘤细胞生长的抑制作用还与其本身的活性、纯度直接相关^[21],故后续研究仍需进一步提高重组蛋氨酸酶的活性及纯度。

参考文献

[1] HOFFMAN RM. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(1):21-31.

[2] KAWAGUCHI K, HIGUCHI T, LI S, et al. Combination therapy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4):3086-3092.

[3] BENAVIDES MA, BOSLAND MC, DA SILVA CP, et al. L-methionine inhibits growth of human pancreatic cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(2):200-203.

[4] CHATURVEDI S, HOFFMAN RM, BERTINO JR. Exploiting methionine restriction for cancer treatment[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.05.003.

[5] SUGANYA K, GOVINDAN K, PRABHA P, et al. An extensive review on L-methioninase and its potential applications[J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2017. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.09.009.

[6] 林琳, 赵瑜, 付崴, 等. 两种真核蛋氨酸裂解酶基因克隆、鉴定及分析比较[J]. *中国民族民间医药*, 2009, 18(7): 1-3, 6.

[7] MUHARRAM MM. Recombinant engineering of L-methioninase using two different promoter and expression systems and in vitro analysis of its anticancer efficacy on different human cancer cell lines[J]. *Pak J Biol Sci*, 2016, 19(3):106-114.

[8] MURAKAMI T, LI S, HAN Q, et al. Recombinant methioninase effectively targets a Ewing's sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22):35630-35638.

[9] 田腊梅, 任小丽, 胡振良, 等. 2种重组真核蛋氨酸酶原核体系表达及活性比较[J]. *昆明医科大学学报*, 2012, 33(5):11-14.

[10] KAWAGUCHI K, IGARASHI K, LI S, et al. Recombinant methioninase (rMETase) is an effective therapeutic for BRAF-V600E-negative as well as -positive melanoma

in patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1):915-923.

[11] 张芳, 任晓丽, 罗得华, 等. 切除 GST 标签的重组蛋氨酸酶及多抗制备[J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(3): 8-11.

[12] TOMOAKI T, MITSUSHIMA K, YAGI S, et al. Assay method for antitumor L-methionine gamma-lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine[J]. *Anal Biochem*, 2004, 327(2):233-240.

[13] 胡月新, 徐天勇, 张钰雯, 等. 蛋氨酸酶联合顺铂协同抑制人肺腺癌细胞 GLC 生长作用[J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 35(1):5-7, 20.

[14] SAKAI W, SWISHER EM, KARLAN BY, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1116-1120.

[15] IGARASHI K, LI S, HAN Q, et al. Growth of doxorubicin-resistant undifferentiated spindle-cell sarcoma PDOX is arrested by metabolic targeting with recombinant methioninase[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4):3537-3544.

[16] 龚娇, 田长富. 蛋氨酸依赖性对肿瘤生长抑制的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(3):499-501.

[17] 余婷玉, 方志远, 黄卫, 等. 穿膜肽标记的荧光素酶蛋白在大肠杆菌中表达条件的优化及其活性研究[J]. *实验技术与管理*, 2018, 35(2):62-66.

[18] 孔晨虹, 夏立亮, 于源华, 等. 重组蛋氨酸裂解酶的表达、复性及活性研究[J]. *生物技术通报*, 2010(4):190-193.

[19] IGARASHI K, KAWAGUCHI K, KIYUNA T, et al. Metabolic targeting with recombinant methioninase combined with palbociclib regresses a doxorubicin-resistant dedifferentiated liposarcoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4):912-917.

[20] YAO G, QIN X, CHU J, et al. Expression, purification and characterization of a recombinant methionine adenosyltransferase pDS16 in *Pichia pastoris*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(3):1241-1253.

[21] YANO S, TAKEHARA K, ZHAO M, et al. Tumor-specific cell-cycle decoy by Salmonella typhimurium A1-R combined with tumor-selective cell-cycle trap by methioninase overcome tumor intrinsic chemoresistance as visualized by FUCCI imaging[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13): 1715-1723.

(收稿日期:2018-11-25 修回日期:2019-04-18)

(编辑:张元媛)