

## R9-FOXM1(1-234aa)重组蛋白批量纯化 及其抑瘤效应研究\*

谭拥军<sup>†</sup>,余景卫,陈燕,向勤,谭桂湘  
(湖南大学 生物学院,湖南 长沙 410082)

**摘要:**通过基因工程构建重组表达质粒 pET15b-R9-FOXM1(1-234aa),转化大肠杆菌建立构建表达 R9-FOXM1(1-234aa)的菌株.采用原核表达系统和 His-tag 亲和纯化手段,规模化制备纯化穿膜肽 R9-FOXM1(1-234aa),获得的蛋白的纯度达到 90%以上.用 R9-FOXM1(1-234aa)穿膜肽处理不同的肿瘤细胞,通过 MTT 实验研究其细胞效应.结果显示:当 R9-FOXM1(1-234aa)穿膜肽的浓度达到 2 mM 时,肿瘤细胞的死亡率为 50%左右.实验表明穿膜肽 R9-FOXM1(1-234aa)抑制不同肿瘤细胞的生长,有可能成为治疗肿瘤的潜在蛋白类药物.

**关键词:**多聚精氨酸;细胞穿膜肽;FOXM1;肿瘤治疗

**中图分类号:**Q784

**文献标志码:**A

## Study of Scale Purification and Anti-tumor Efficacy of R9-FOXM1(1-234aa) Recombinant Protein

TAN Yongjun<sup>†</sup>, YU Jingwei, CHEN Yan, XIANG Qin, TAN Guixiang  
(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** A recombinant protein expression vector pET15b-R9-FOXM1(1-234aa) was constructed and transformed to *E. coli* in order to generate a strain expressing R9-FOXM1(1-234aa). The recombinant protein R9-FOXM1(1-234aa) (R9-FOXM1(1-234aa)) was isolated at a large scale through His-tag affinity chromatography. The purity of the purified protein reached 90%. Moreover, MTT assay was used to test the effect of R9-FOXM1(1-234aa) on cells, and the test results showed that R9-FOXM1(1-234aa) caused the cell death of different types of cancer cells with a half lethal dose around 2 mM. The results also demonstrated that R9-FOXM1(1-234aa) suppressed the proliferation of cancer cells and may be considered as a potential agent for anti-cancer in the future.

**Key words:** arginine-rich; cell-penetrating peptides; FOXM1; tumor therapy

Forkhead Box(Fox)基因广泛分布于从酵母到人的各种真核生物,构成一个庞大的转录因子家族<sup>[1]</sup>,在哺乳动物中已拥有超过 40 个以上的成员,分别参与调节细胞分化、增殖、代谢及细胞凋亡等

生理过程<sup>[2]</sup>.该家族的成员 FOXM1,首先被发现是一个调控细胞周期和细胞增殖的蛋白<sup>[3]</sup>.在细胞增殖过程中,FOXM1 表达水平增高,并参与调节细胞周期相关的多个基因转录,从而控制细胞的 DNA

\* 收稿日期:2017-02-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472718),National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介:谭拥军(1967—),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

<sup>†</sup> 通讯联系人,Email: yjtan@hnu.edu.cn

复制与有丝分裂过程<sup>[4-6]</sup>,还与 DNA 损伤修复有关<sup>[7-8]</sup>.通过小鼠肝脏再生模型的研究发现,当从肝细胞中特异性敲除 FOXM1 基因之后,肝脏再生过程中 DNA 的复制降低了 80%,而有丝分裂被完全抑制<sup>[5]</sup>.在 FOXM1 被敲除的肝细胞中,细胞核内累积了大量细胞周期蛋白激酶的抑制蛋白 p21Cip1 和 p27Kip1,从而大大降低了 DNA 的复制水平<sup>[5-6,9]</sup>.同时,FOXM1 还上调激活 DNA 复制所必须的 Cdc25A 磷酸酶的表达<sup>[5]</sup>.另一方面,FOXM1 的缺失抑制了有丝分裂过程:因为 FOXM1 控制着许多与有丝分裂相关的基因转录,其中包括 cyclin B1, Cdc25B, polo-like kinase 1 (PLK1), aurora B kinase, Survivin, 着丝粒蛋白 A (CENPA) 和 CENPB 基因<sup>[5-6,10-11]</sup>.此外,不同器官中有条件敲除 FOXM1 还抑制了致癌剂所诱导的肝癌、肺癌、结直肠癌等实体瘤的发生和发展<sup>[9,12-13]</sup>.

FOXM1 蛋白氮端能够通过和碳端结合,干扰 FOXM1 碳端的磷酸化,抑制 FOXM1 转录活性、竞争性阻碍 FOXM1 与其他肿瘤促进因子互作及促瘤信号通路对 FOXM1 的修饰活化作用等<sup>[14]</sup>.在细胞周期 G<sub>2</sub> 阶段,FOXM1 的激活依赖 cyclin A/cdk 的磷酸化,缺失 N 端的 FOXM1 不再依赖 cyclin A,细胞周期被激活<sup>[15]</sup>.

细胞穿膜肽 (cell-penetrating peptides, CPPs) 是由氨基酸组成具有穿透细胞膜能力的多肽,最早从 HIV-1 的 TAT 蛋白中发现:该蛋白中包含具有穿膜能力的特殊肽段区域<sup>[16]</sup>;多聚精氨酸作为目前已知最为简单有效的细胞穿膜肽,其中以九聚精氨酸 (R9) 效率最高 (大约为 TAT 的 20 倍),具有极大的研究及应用价值<sup>[17]</sup>.本实验通过构建携带 R9 的 FOXM1-N(1-234aa) 原核诱导表达体系,采用 His-tag 亲和纯化手段进行批量纯化,选用不同肿瘤细胞株,研究重组蛋白对肿瘤细胞的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乳腺癌细胞 MCF-7、肝癌细胞 HepG2、肺癌细胞 A549 来源于 (American Type Culture Collection, ATCC),二苯基溴化四氮唑蓝 (MTT) 由上海生工提供,DMEM 培养基和 1640 培养基均为 GIBCO 公司产品,HisTrap<sup>TM</sup> FF. crude, AKTA 均由 GE 公司提供.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pHis-FOXM1(1-234aa)-R9 的构建

设计 NcoI, BamHI 限制性内切酶上下游引物,引物序列如下:

引物 1(上游引物):GCG CCC ATG GTG CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG AAA ACT AGC CCC CGT CG.

引物 2(下游引物):GCG GAT CCC TAC CTT CTC CTT CTC CTT CTC CTT CTC CTA GAC ACA GAG TTC TGC CAG G.

以 pcDNA3.1-FOXM1 为模板,在引物 1 和引物 2 的引导下 PCR 扩增反应体系为:克隆质粒 pcDNA3.1-FOXM1 (80 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10X PCR Buffer for KOD-Plus-Neo5  $\mu$ L, dNTPs (2 mM each) 5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 溶液 (25 mM) 4  $\mu$ L, KOD-Plus-Neo (1.0 U/mL) 1  $\mu$ L, 引物 1 (100 nM) 1  $\mu$ L, 引物 2 (100 nM) 1  $\mu$ L, DMSO 2  $\mu$ L, 加去离子水补充至反应体系 50  $\mu$ L. PCR 反应条件:先 94  $^{\circ}$ C 5 min;再 95  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环;然后 68  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 5 min. 反应结束后,对 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,回收并纯化扩增的目的片段,纯化产物溶于 40  $\mu$ L TE 缓冲液中, -20  $^{\circ}$ C 冻存备用.

利用 NcoI, BamHI 限制性内切酶切出克隆片段的粘性末端.酶切体系:目的片段 (150 ng/mL) 或 pET-15b 质粒 (150 ng/mL) 6.7  $\mu$ L, NcoI 限制性内切酶 0.5  $\mu$ L, BamHI 限制性内切酶 0.5  $\mu$ L, 10X FastDigest Buffer 1  $\mu$ L, 加去离子水至总体积 10  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min.

将 NcoI, BamHI 限制性内切酶处理的目的片段和载体进行连接,连接体系及反应条件为:酶切载体 5.63  $\mu$ L, 酶切目的片段 2.36  $\mu$ L, T4 DNA Ligase (5 U/mL) 1  $\mu$ L, 10X T4 DNA Ligase buffer 1  $\mu$ L, 加去离子水至反应体系 10  $\mu$ L. 22  $^{\circ}$ C 反应 20 min, -20  $^{\circ}$ C 冻存备用.

取一管 DH5 $\alpha$  感受态细胞置于冰上溶解,待感受态完全溶解后,加入 1  $\mu$ L 的连接片段,用拇指轻弹混匀,冰上放置 30 min. 热激过程:42  $^{\circ}$ C 热激 90 s, 冰上放置 2 min;加入 1 mL 的 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 放置 45 min;取 200  $\mu$ L 涂布 LB 平板 (氨苄青霉素浓度为 25  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C 培养过夜 (12~16 h);挑取单克隆,接种到 5 mL 的 LB 培养液 (含 25  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素) 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜 (12~16 h). 提取质粒,用限制性内切酶 NcoI, BamHI 进行酶切鉴

定,保种并分装测序,pHis-FOXM1(1-234aa)-R9 原核表达质粒结构示意图(图 1(a)).

### 1.2.2 重组蛋白的规模化制备及检测

将表达载体 pHis-FOXM1(1-234aa)-R9 转化大肠杆菌 Rostta DE3 感受态细胞,37 °C 培养过夜(12~16 h),随机挑选一个单克隆,接种到 5 mL 的 LB 培养基(含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素),37 °C 振荡培养 4~6 h.将菌液加到 100 mL 的 LB 培养液(含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素)37 °C 振荡培养过夜(12~16 h),取菌液检测  $\text{OD}_{600}$  值,调整  $\text{OD}_{600}$  值至 0.8~1,加入 IPTG 诱导剂(终浓度 0.8 mM),30 °C 诱导振荡培养 6 h.4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,用 15 mL Binding Buffer(20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)重悬菌体,超声 40 min(超 3 s,停 2 s)破碎菌体.细菌裂解液采用原核表达系统和 His-tag 亲和纯化手段,纯化后蛋白利用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法检测蛋白.

根据上述确认的菌液进行扩大培养,在 8 瓶 500 mL 的摇瓶进行培养,37 °C 振荡培养过夜,取菌液检测  $\text{OD}_{600}$  值,调整  $\text{OD}_{600}$  值至 0.8~1,加入 IPTG 诱导剂,30 °C 诱导振荡培养 6 h.4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,用 15 mL Binding Buffer 重悬菌体,超声 40 min 破碎菌体.裂解液用 HisTrap<sup>TM</sup> FF crude 亲和层析方法,通过 GE AKTA 蛋白纯化系统,用不同强度的离子浓度洗脱,收集吸收峰出现的样品,然后利用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法检测蛋白.

### 1.2.3 MTT 法检测细胞活性

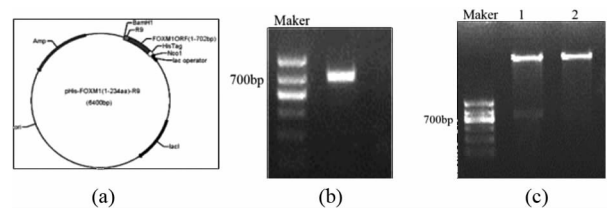
取对数期细胞,以每孔 20 000 个细胞接种到 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$  培养基,置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h.吸出培养基,加入纯化的蛋白,蛋白按照 5 个浓度梯度,5 个平行样处理细胞,置于培养箱中培养 24 h.每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 培养 4 h,小心吸出上清,每孔加 100  $\mu\text{L}$  DMSO,用酶标仪测定 492 nm 的吸光度 OD 值.利用 Origin 9.0 软件系统绘制曲线.

## 2 实验结果

### 2.1 pHis-FOXM1(1-234aa)-R9 的构建

PCR 扩增 R9-FOXM1(1-234aa) 目的基因,1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,条带位于 700bp 位置,如图 1(b)所示.构建的重组表达质粒 pHis-FOXM1

(1-234aa)-R9 经 NcoI, BamHI 限制性内切酶处理,结果如图 1(c)所示,1 号样品符合结果,测序结果比对,与理论序列一致.



(a) 重组表达载体质粒图 pHis-FOXM1(1-234aa)-R9

(b) 目的基因 FOXM1(1-234aa) 的扩增结果

(c) 重组质粒 pET15b-R9-FOXM1(1-234aa) 双酶切鉴定结果

图 1 重组表达载体的构建

Fig.1 The construction of recombinant expression plasmid

### 2.2 重组蛋白 R9-FOXM1(1-234aa) 的批量纯化及鉴定

裂解液采用原核表达系统和 His-tag 亲和纯化手段,采用不同洗脱强度收集纯化蛋白,实现规模化制备纯化穿膜肽融合人 FOXM1 蛋白氮端(1-234aa)的重组蛋白,并获得纯化过程的 HPLC 分析谱图图 2(a),横坐标表示洗脱体积,纵坐标表示吸收峰 UV280.吸收峰曲线代表整个过程中 UV280 检测结果,阶梯状曲线代表洗脱液的离子强度(实验过程中采用梯度洗脱),箭头为重组蛋白吸收峰. SDS-PAGE 凝胶电泳方法检测蛋白制备不同阶段的蛋白样品,上样量均为 10  $\mu\text{g}$ (图 2(b), AKTApurifier 蛋白纯化仪纯化过程中不同时间段纯化蛋白的纯度,100%洗脱时目的蛋白的纯度高,箭头为目的蛋白的位置. Lane1: Marker Lane2: sample Lane3: filtered sample Lane4: No binding sample Lane5: 0% elutionB Lane6: 30% elutionB Lane7: 100% elutionB).

### 2.3 重组蛋白 R9-FOXM1(1-234aa) 对肿瘤细胞的抑制效应

MTT 实验验证重组蛋白对肿瘤细胞增殖表型的影响:选择乳腺癌 MDA-MB-231、肺癌 A549、肝癌 HepG2 细胞,用不同浓度的重组蛋白(1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 7  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 9  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )进行处理,24 h 时后检测细胞的活性,R9-GFP 处理作为对照,获得剂量依赖曲线,如图 3(a)不同浓度重组蛋白处理 231 细胞,24h 后细胞的影响,图 3(c)不同浓度重组蛋白处理 A549 细胞,24h 后细胞的影响,图 3(e)不同浓度重组蛋白处理 HepG2 细胞,24h 后细胞的影响.针对所选细胞,固定重组蛋白处理浓度

(1  $\mu\text{mol/L}$ ), 在处理不同时间点(1 d, 2 d, 3 d)检测细胞活性, 获得相关细胞的生长曲线, 图 3(b) 1  $\mu\text{mol/L}$  重组蛋白处理 231 细胞, 3d 内细胞活性变化, 图 3(d) 1  $\mu\text{mol/L}$  重组蛋白处理 A549 细胞, 3d

内细胞活性变化, 图 3(f) 1  $\mu\text{mol/L}$  重组蛋白处理 HepG2 细胞, 3d 内细胞活性变化. 实验结果表明, R9-FOXM1(1-234aa) 对不同的肿瘤细胞都具有一定的抑制作用.

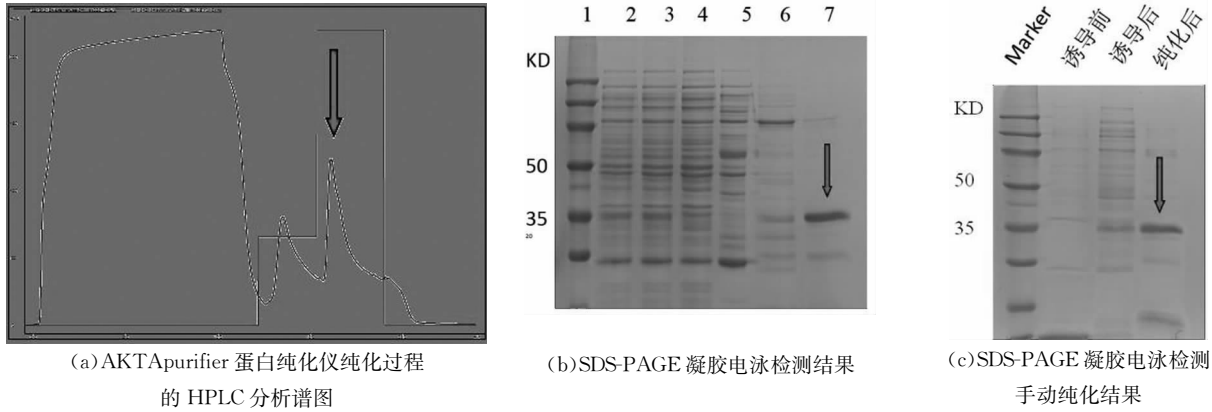


图 2 重组蛋白 R9-FOXM1(1-234aa) 的批量纯化及检测  
Fig.2 Large-scale preparation and identification of R9-FOXM1(1-234aa) protein

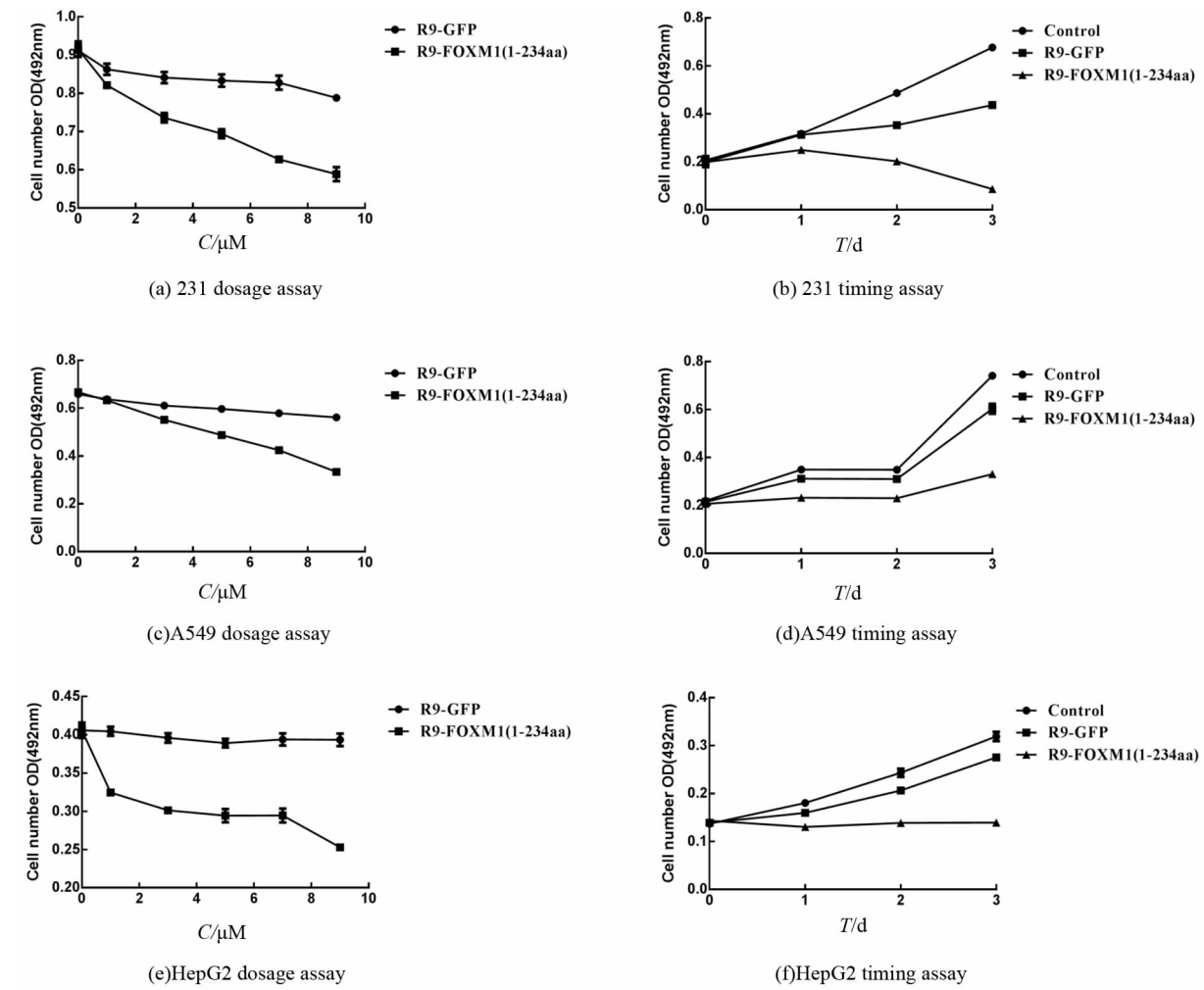


图 3 显示了 R9-FOXM1(1-234aa) 重组蛋白对不同类型肿瘤细胞增殖的抑制作用  
Fig.3 R9-FOXM1(1-234aa) suppressed the proliferation of different types of cancer cells

### 3 结 论

转录因子 FOXM1 能刺激细胞增殖、增强 DNA 损伤修复能力、维持细胞干性、促进细胞迁移,并被作为肿瘤治疗的分子靶标,抑制 FOXM1 有效抑制肿瘤的发生和发展.FOXM1 蛋白氮端抑制 FOXM1 转录活性、竞争性阻碍 FOXM1 与其他肿瘤促进因子互作及促瘤信号通路对 FOXM1 的修饰活化作用等.本实验研究结合多聚精氨酸 R9 穿膜肽,构建了穿膜肽融合人 FOXM1 蛋白氮端(1-234aa)的原核表达质粒;采用原核表达系统和 His-tag 亲和纯化手段,规模化制备穿膜肽 R9-FOXM1(1-234aa).相对手动纯化,实验纯化手段具有蛋白纯度高,产量高,时间短等明显优势.为进一步的活体实验提供充足的材料.细胞水平上选择了不同类型的肿瘤细胞(乳腺癌 MDA-MB-231、肺癌 A549、肝癌 HepG2)开展实验,证实了 R9-FOXM1(1-234aa)对肿瘤细胞的抑制作用,R9-FOXM1(1-234aa)具体的作用机制还需要进一步的研究.本研究为 R9-FOXM1(1-234aa)成为新型抗肿瘤蛋白类药物提供了初步理论基础.

### 参考文献

- [1] KAESTNER K H, KNOCHEL W, MARTINEZ D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors [J]. *Genes Development*, 2000, 14(2): 142-146.
- [2] HANNENHALLI S, KAESTNER K H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease [J]. *Nature Review Genetics*, 2009, 10(4): 233-240.
- [3] YE H, KELLY T F, SAMADANI U, *et al.* Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues [J]. *Molecular Cell Biology*, 1997, 17(3): 1626-1641.
- [4] YE H, HOLTERMAN A X, YOO K W, *et al.* Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase [J]. *Molecular Cell Biology*, 1999, 19(12): 8570-8580.
- [5] WANG X, KIYOKAWA H, DENNEWITZ M B, *et al.* The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration [J]. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 2002, 99(26): 16881-16886.
- [6] WANG I C, CHEN Y J, HUGHES T, *et al.* Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase [J]. *Molecular Cell Biology*, 2005, 25(24): 10875-10894.
- [7] TAN Y, RAYCHAUDHURI P, COSTA R H. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes [J]. *Molecular Cell Biology*, 2007, 27(3): 1007-1016.
- [8] TAN Y, CHEN Y, YU L, *et al.* Two-fold elevation of expression of FoxM1 transcription factor in mouse embryonic fibroblasts enhances cell cycle checkpoint activity by stimulating p21 and Chk1 transcription [J]. *Cell Proliferation*, 2010, 43(5): 494-504.
- [9] KALINICHENKO V V, MAJOR M L, WANG X M B, *et al.* Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor [J]. *Genes Development*, 2004, 18(7): 830-850.
- [10] KRUPCZAK-HOLLIS K, WANG X, KALINICHENKO V V, *et al.* The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2004, 276(1): 74-88.
- [11] WANG X, QUAIL E, HUNG N J, *et al.* Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver [J]. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 2001, 98(20): 11468-11473.
- [12] KIM I M, ACKERSON T, RAMAKRISHNA S, *et al.* The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(4): 2153-2161.
- [13] YOSHIDA Y, WANG I C, YODER H M, *et al.* The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1420-1431.
- [14] PARK H J, WANG Z, COSTA R H, *et al.* An N-terminal inhibitory domain modulates activity of FoxM1 during cell cycle [J]. *Oncogene*, 2008, 27(12): 1696-1704.
- [15] LAOUKILI J, ALVAREZ M, MEIJER L A, *et al.* Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(9): 3076-3087.
- [16] REGBERG J, SRIMANEE A, LANGEL U, *et al.* Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 5(9): 991-1007.
- [17] SCHMIDT N, MISHRA A, LAI G H, *et al.* Arginine-rich cell-penetrating peptides [J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(9): 1806-1813.