

人小肠三叶因子在毕赤酵母中克隆表达及对肠粘膜修复作用的研究 Expression of Human Intestinal Trefoil Factor in *Pichia pastoris* and Its Biological Activity on Intestinal Epithelium *in vitro*

刘 伟¹, 郑华宝², 钟雪梅¹, 杨 晟², 许春娣^{1*}

LIU Wei¹, ZHENG Hua-Bao², ZHONG Xue-Mei¹, YANG Sheng² and XU Chun-Di^{1*}

1 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025

2 中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200023

1 Shanghai Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

2 Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200023, China

摘 要 为了研究人肠三叶因子(hITF)对肠粘膜的保护作用,利用 RT-PCR 从肠粘膜中扩增出 hITF 基因片段,与诱导分泌型毕赤酵母载体 pPIC9 连接构建了重组质粒 pPIC9hITF,重组质粒转化至宿主菌 GS115 经过 PCR 鉴定和转化子发酵筛选,得到一个重组毕赤酵母高产菌株 GS115/pPIC9hITF。在 5L 发酵罐中用基本盐培养基培养重组菌株,添加甲醇诱导表达 hITF,离心收集的上清液通过离心交换层析纯化得到 hITF。质谱鉴定结果表明纯化的 hITF 与天然提取产品在 N 端序列上完全相同。细胞实验和动物实验结果表明重组 hITF 能够促进细胞迁移,并可以保护肠粘膜免受有害因子的侵袭,保持了较好的生物学活性。

关键词 人肠三叶因子,毕赤酵母,表达,粘膜修复

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0824-07

Abstract In order to produce relatively large amounts of recombinant human intestinal trefoil factor and assess its biological activity. The expression plasmid pPIC9-hITF containing AOX1 promoter and the sequences of secreting signal peptides was transformed into the yeast cells. Then through selection, positive transformants were cultivated in fermentation basal salts medium in a 5L fermenter to obtain large amount product with low cost. The secreted peptides were then purified by a combination of ionic exchange chromatography and molecular sieve. To verify the product, electrospray mass spectrometry analyses was used to determine the structure of rhITF and Western Blotting was performed to test the immunological activity. Furthermore, the biological activity of the peptide was examined by experiments from cell to tissue. The nucleotide sequence of rhITF was the same as expected. With a 5-L fermenter, 253mg of hITF was isolated at the purity of 96% from 3.5L of yeast fermentation broth. The expression level for recombinant human ITF in this yeast system was 73.33mg/L. In our study, we provided a way to gain a production among milligram to gram of recombinant human ITF by the use of a yeast expression system. As human ITF are difficult to purify in any significant amount from tissue extraction, the way described may become a valuable tool in obtaining pure peptide for further studies of trefoil peptide function.

Key words human intestinal trefoil factor, *Pichia pastoris*, expression, cell migration

Received: January 4, 2007; Accepted: March 12, 2007.

This work was supported by the grant from the Key Project of Basic Science Researches by Science and Technology Commission of Shanghai Municipality in 2003 (No.03JC14041).

* Corresponding author. Tel: +86-21-64370045-600905; E-mail: chundixu@hotmail.com

上海市科委 2003 年基础项目重大课题资助 (No.03JC14041)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

人小肠三叶因子(human intestinal trefoil factor, hITF)属于三叶因子家族,是近年来发现的一种胃肠道粘膜修复因子^[1,2]。它由59个氨基酸组成,具有紧密的三叶结构域,能够抵抗多种蛋白酶的消化。在胃肠道粘膜受到损伤时,hITF能够早期、快速地表达,促进胃肠粘膜的修复。然而hITF在组织中含量极低,直接从组织中分离hITF十分困难。因此,我们利用基因工程技术,从人结肠粘膜中克隆hITF基因,构建hITF的毕赤酵母表达载体,应用基本盐培养基进行甲醇诱导表达,并对表达产物进行了纯化及生物学活性鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株、实验动物、仪器及试剂:毕赤酵母整合质粒pPIC9和宿主菌GS115(*Mut⁺ his4*)购于Invitrogen公司;大肠杆菌菌株TG1购于Sigma公司。限制性内切酶、T4 DNA连接酶和Taq酶购于TaKaRa公司;细胞总RNA抽提试剂盒Trizol、逆转录反应试剂和PCR试剂均购于GIBCO BRL公司;电转化仪器(Bio-Rad Gene Pulser)购于Bio-Rad公司;BioFlo III发酵罐为NBS公司产品;SP_{HP}、Sephadex G-25、MonoQ、Sephacryl S-100等填料和柱子均为Pharmacia公司产品。细胞迁移试剂盒购于CHEMICON公司。大鼠小肠上皮细胞株(IEC-6)购自北京协和医科大学细胞保藏中心。SD大鼠,雄性5~6周龄(体重180~220g),由西普尔BK实验动物有限公司提供,动物批号证书:沪动-合证字-号-152。TNBS购于Sigma公司,MPO检测试剂盒购于南京建成生物公司,其他试剂为国产试剂。

1.1.2 培养基 MD培养基:13.4g/L YNB,20g/L葡萄糖(4×10^{-4})g/L生物素,15g/L琼脂;YPD培养基:10g/L酵母膏,20g/L蛋白胨,10g/L葡萄糖;BMGY培养基:10g/L酵母膏,20g/L蛋白胨,13.4g/L YNB(4×10^{-4})g/L生物素,10g/L甘油,100mmol/L磷酸钾,pH6.0;BMMY培养基:10g/L酵母膏,20g/L蛋白胨,13.4g/L YNB(4×10^{-4})g/L生物素,5g/L甲醇,100mmol/L磷酸钾,pH6.0;基本盐培养基:磷酸26.7mL/L,硫酸钙0.93g/L,硫酸钾18.2g/L,硫酸镁14.9g/L,氢氧化钾4.13g/L,甘油40.0g/L。

1.2 方法

1.2.1 扩增目的基因:经结肠镜活检取肠粘膜,抽提总RNA,逆转录得到hITF的cDNA。设计引物如下,含有Xho I位点P1:5'-TGCAGTCTCGAGAAA

GAGAGGAGTACGTGGGCTGTC-3',含有Not I位点P2:5'-TTGCGGCCGCACTGCCTGGCAGCAATCACAG-3'。PCR反应条件为94℃预变性3min,然后94℃30s,57℃45s,72℃45s,共30个循环,最后72℃延伸5min。PCR扩增后,经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后,纯化回收PCR产物。

1.2.2 hITF重组质粒的构建、转化及转化子筛选和鉴定:质粒DNA抽提采用碱裂解法。载体构建参照文献^[3]进行。以质粒pPIC9为真核表达载体,将载体及目的基因片段均用Xho I和Not I进行双酶切,酶切产物分别经1%及2%琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒回收目的基因片段并用T4 DNA连接酶将两片段连接,连接产物转化大肠杆菌TG1,得到重组表达质粒pPIC9-hITF。重组质粒经上海基康生物技术有限公司测序确定为正确克隆。抽取约10μg的重组质粒pPIC9-hITF,用Sal I单酶切线性化,乙醇沉淀回收线性化质粒,采用电击法转化到GS115宿主菌中,电击产物涂布于MD平板上,放于30℃培养2~3d待长出转化子。据Invitrogen操作手册,以菌落PCR扩增目的片段筛选阳性转化子。从平板上挑取20个转化子用BMGY、BMMY培养基筛选,获得最优转化子。

1.2.3 高密度发酵分泌表达hITF:在5L发酵罐中分泌表达目的蛋白质。以BMGY、BMMY培养基培养种子液,按照5%接种量将种子液接种至含有2L基本盐培养基的发酵罐中,维持30%溶氧,温度设定为28℃,发酵过程中用氨水调节pH维持在6.0左右,当溶氧稳定在80%时,流加70%甘油,当溶氧回升至最高点并且稳定后开始加入甲醇诱导至发酵结束。发酵液在10000r/min 4℃离心30min,收集上清液在-20℃保存。

1.2.4 重组hITF的纯化及质谱鉴定:取1000mL发酵上清液,以柠檬酸调整样品pH至3.5,双蒸水调整样品电导为4ms/cm。利用SP_{HP}、Sephadex G-25、MonoQ、Sephacryl S-100纯化柱,以含有1mol/L NaCl的缓冲液进行梯度洗脱,NaCl梯度范围设定在0~100%,收集洗脱峰,并采用Lowry法^[4]进行蛋白质定量分析,SDS-PAGE薄层凝胶扫描分析蛋白质纯度。采用MALDI-TOF-MS分析鉴定重组蛋白质的性质,实验主要由上海第二医科大学病理生理教研室完成。

1.2.5 重组hITF生物学活性鉴定:

(1)重组hITF对大鼠肠上皮细胞迁移的影响:采用大鼠小肠上皮细胞株(IEC-6),参照Chemicon公

司细胞迁移试剂盒使用说明书进行。以无血清培养基培养细胞 24h 造成细胞饥饿后,以胰酶消化制备细胞悬液,细胞浓度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ /mL,24 孔板的每个内置孔板(底部为孔径 $0.8 \mu\text{m}$ 的膜,上皮细胞可从孔中穿过)中加入 $300 \mu\text{L}$ 细胞悬液,同时加入 PBS 或 10^{-5} mol/L 的重组 hITF,内置孔板外加入 $500 \mu\text{L}$ 含 5% 胎牛血清的培养基,培养 14h 后,吸出内置孔内的细胞悬液,将膜底部外侧的细胞洗脱下来,进行荧光染色后,采用荧光酶标仪,波长 480/520nm 检测。实验组加入 10^{-5} mol/L 的重组蛋白,对照组为 PBS。

(2)重组 hITF 对大鼠肠粘膜的保护作用 (i) 实验分组:SD 大鼠随机分为模型组和假模型组,模型组用 TNBS 和乙醇的混合液灌肠造模,假模型组用生理盐水替代灌肠。模型治疗组:用 rhITF 1mg/kg

治疗(给予蛋白量按 $1\text{mg}/\text{kg}$ 计算);模型对照组:用等量生理盐水治疗,每组 9 只实验大鼠。(ii) 肠炎模型制备方法:禁食不禁水 48h 后,灌胃给予浓度为 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的 rhITF 或生理盐水,30min 后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,经肛门插入硅胶管,约 8cm 深,模型组注入 TNBS 与乙醇的混合液,作用 30s 后,拔出硅胶管。24h 后处死动物留取直肠至阑尾的全部结肠组织,进行大体形态学观察并评分,损伤最明显处取约 $0.2\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 的全层肠粘膜组织,置 10% 福尔马林固定,制备石蜡切片,HE 染色后行病理组织学观察并评分,损伤明显剩余部分肠粘膜,生化法作髓过氧化物酶(MPO)活性测定。(iii) 肠粘膜损伤评分标准:大体评分标准参考 Butzner^[5] 等的评分标准,详见表 1;镜下评分标准:参考改进 Millar^[6] 等的评分标准,详见表 2。

表 1 大体形态学评分标准

Table 1 Macroscopic assessment of the colonic mucosa adapted from Butzner *et al.*

Ulcer	Adhesion	Diarrhea
Normal	0	0
Congestion with no ulcer	1	1
Ulcer without congestion and thickening	2	2
One ulcer with inflammation	3	3
≥ 2 ulcers or inflammations	4	4
Length of main lesion $> 1\text{cm}$	5	5
The length of lesion $> 2\text{cm}$, 1 point added at 1cm longer	6~10	6~10

表 2 病理组织学评分标准

Table 2 Histological assessment of full thickness biopsy specimens from TNBS colitis in rats, adapted from Millar *et al.*

	0	1	2
Acute inflammatory infiltration	zero	mild	serious
Mucosal congestion	zero	mild	serious
Submucous haemorrhage	zero	little	a lot
Submucous edema	zero	foliated	fusional
Necrosis of epithelium	zero	limited	extensive
Ulcer	zero	with	

1.2.6 统计学方法 细胞实验数据以均数 \pm 标准差表示,采用 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异,动物实验数据采用 WILCOXON 方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 PCR 扩增 hITF 基因和阳性重组子的鉴定

根据 hITF cDNA 序列,我们设计了一对 PCR 引物,前引物加了一个 *Xho* I 酶切位点及 α 分泌信号肽酶切基因序列,后引物中加了一个 *Not* I 酶切位

点,经 RT-PCR 扩增,预期反应产物应为 285bp。经琼脂糖凝胶电泳显示,在分子量约为 280bp 的位置可见与预期相符的特异性扩增条带(图 1)。重组质粒 pPIC9hITF 经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳检测可见 hITF 基因片段,表明重组入 pPIC9 中的片段为 hITF 基因片段(图 2)。目的基因的序列测序结果与文献报道完全一致。

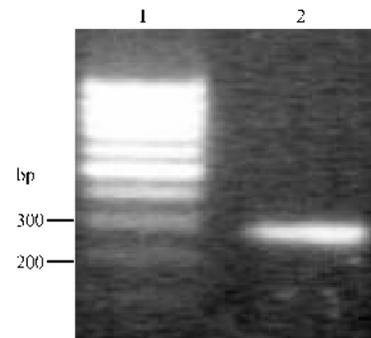


图 1 RT-PCR 扩增 hITF 结果

Fig.1 PCR production of rhITF

1: marker: 100bp DNA ladder; 2: hITF.

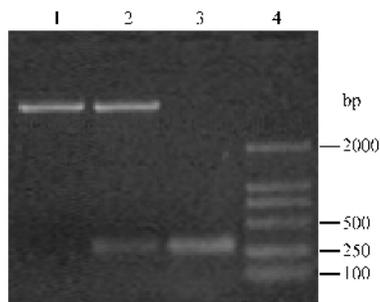


图2 重组质粒 pPIC9/hITF 酶切鉴定结果

Fig.2 Agarose electrophoresis of expression vector pPIC9/hITF with *Xho* I / *Not* I enzyme cleavage

1 :pPIC9(*Xho* I / *Not* I); 2 :recombinant expression plasmid pPIC9/hITF 3 :hITF 4 :DL2000 marker.

2.2 重组蛋白质的发酵表达和鉴定

随甲醇诱导时间增加,细胞湿重也不断增加,96h左右细胞湿重达到最高峰,之后增加不明显(图3)根据 Marker 指示,在 10~20kD 之间的条带是目的蛋白双体,位于 10kD 以下的条带是目的蛋白单体。

目的蛋白表达也随甲醇诱导时间增加而不断增加,72h 目的蛋白浓度最高,之后杂蛋白含量逐渐增多(图 4A 和图 4B)。根据蛋白电泳结果,初步推断表达的目的蛋白存在双体和单体两种形式,这一推断得到后续质谱分析试验结果的验证。共获得发酵液 3450mL,10000g × 30min,离心收集上清,获得草绿色上清液 2570mL,称细胞湿重约 1297.51g,平均细胞湿重为 376.0893g/L。

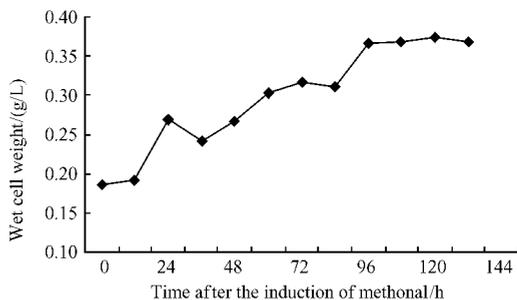


图3 不同甲醇诱导时间的细胞湿重

Fig.3 The bulk weight of yeast cells in different time after the induction of methanol

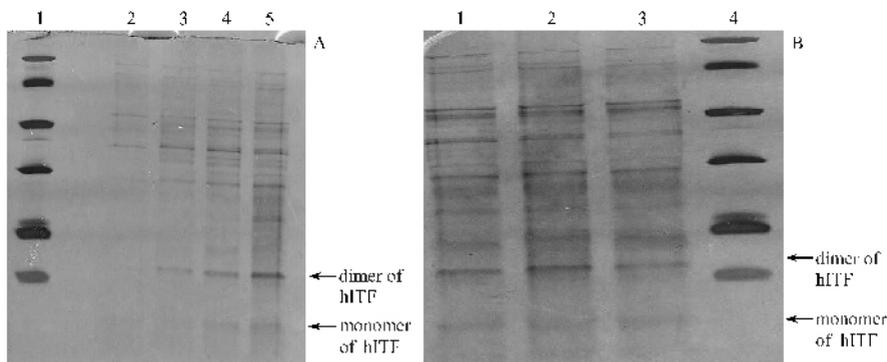


图4 不同甲醇诱导时间蛋白表达变化的 Tricine 电泳结果

Fig.4 Tricine electrophoresis showing the expression of hITF in different time after the induction of methanol

A. 1 marker 2~5 0h, 12h 24h 48h after the induction of methanol. B. 4 marker, 1~3 60h, 72h 84h, 103h after the induction of methanol.

2.3 重组蛋白的纯化

每一步纯化得率约为 70%~80%,总纯化得率为

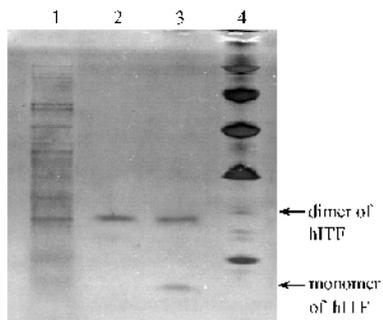


图5 纯化的 hITF Tricine 电泳银染结果

Fig.5 Tricine electrophoresis showing purified protein

1 :protein before purified 2 :protein after purified 3 :hITF standard ; 4 :marker.

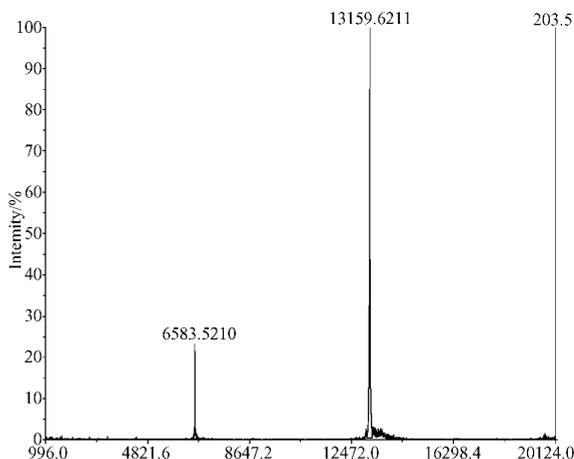


图6 应用质谱技术鉴定重组蛋白质分子量结果

Fig.6 The molecule weight of recombinant protein was determined by electrospray mass spectrometry analyses

35% ~ 45%。将纯化后所得蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 并进行银染(图 5)。电泳纯度分析显示蛋白纯度为 96%。Lowry 法测定蛋白浓度为 550 μ g/mL, 共获得纯化蛋白 253mg, 蛋白表达水平为 73.33mg/L。

2.4 重组蛋白的质谱鉴定

重组蛋白经过质谱分析, 结果如图 6、表 3 所示, 蛋白质双体分子量是 13159.6211D, 单体分子量

为 6583.5210D, 与理论计算的质量 13146.8 和 6574.4 基本一致, 而且双体含量是单体含量的 4 倍。质谱分析氨基酸序列的覆盖率为 69%, 结果表明重组蛋白与 solution structure of the disulphide-linked dimer of human intestinal trefoil factor(Tff3)相符合, 置信区间为 99.985%, NCBI 氨基酸序列登录号 gi147168540, 证实所得蛋白为人小肠三叶因子。

表 3 质谱鉴定重组蛋白质性质结果

Table 3 The result of recombinant protein was determined by electrospray mass spectrometry analyses

Rank	Protein name	Accession No.	Protein Score	Protein C.I. %
1	Chain 2, solution structure of the disulphide-linked dimer of human intestinal trefoil factor(Tff3)	gi147168540	89	99.985
2	Chain A, high resolution solution structure of human intestinal trefoil factor	gi112084578	51	16.131
3	Trefoil factor[human, intestine, peptide partial, 61 aa]	gi1385570	51	5.897
4	TFF3 protein[Homo sapiens]	gi117389674	44	0

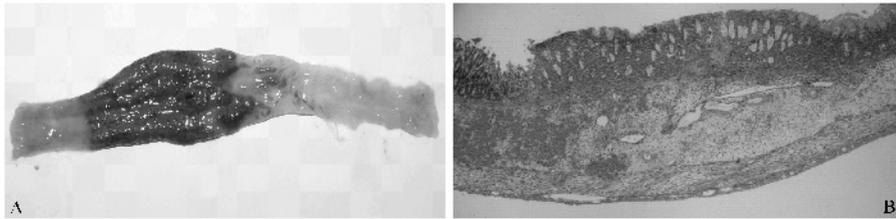


图 7 显示对照组大体标本形态学和病理组织学观察

Fig.7 The specimen(A) and microscopic pathology(B) of colon in rats treated with NS

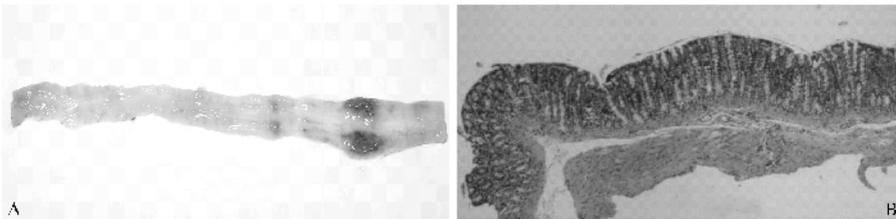


图 8 给予 1mg/kg rhITF 实验大鼠大体标本形态学和病理组织学观察

Fig.8 The specimen(A) and microscopic pathology(B) of colon in rats treated with 1mg/kg rhITF

2.5 重组 hITF 生物学活性鉴定

2.5.1 体外细胞迁移实验: 如表 4 所示, 蛋白干预组细胞迁移数量明显多于对照组, $P < 0.05$, 证实重组蛋白具有促进细胞迁移的活性。

表 4 rhITF 对细胞迁移功能的影响

Table 4 The role of rhITF in the migration of intestinal epithelial cell

	Control	ITF
Average \pm SD	41.08 \pm 15.14	58.98 \pm 23.94
P		0.0478

2.5.2 肠粘膜保护作用研究:

(1) 大体标本形态学观察(图 7、8): 造模后 24h, 假模型组肠粘膜无明显变化; 对照模型组出现大量粘液脓血便, 肠粘膜充血水肿, 大面积出血、溃疡, 且

大多数标本溃疡长度 > 2 cm, 肠壁增厚, 并与周围组织粘连, 不易分离; 预先灌服 rhITF 的实验组则仅少量粘液脓血便, 肠粘膜充血水肿, 有小溃疡, 无肠壁增厚, 与周围组织无粘连, 同对照组相比, 肠粘膜损伤程度明显较轻。预先给予 rhITF 的实验组大体评分结果同对照组相比均有显著统计学差异(表 5)。

表 5 rhITF 预防性保护肠粘膜的作用大体形态评分结果

Table 5 Effect of rhITF on macroscopic score in rats pretreated with rhITF at 30 minutes before administration of TNBS

Comparison between control group and 1mg/kg rhITF one	
U	98
P	4.33E-05

(2) 病理组织学观察(图 7、8): 对照组大多数标

本全层粘膜坏死,腺体完全破坏,大U+中性粒细胞和淋巴细胞浸润,粘膜下层出血,肌层组织发生蜂窝织炎和组织坏死,少数标本粘膜层充血水肿,出血,部分坏死,腺体结构部分破坏,粘膜下层出血,大量炎症细胞浸润;预先灌服 rhITF 的实验组标本仅浅层粘膜坏死,脱落,表浅糜烂形成,残留粘膜底层及腺管,腺体结构尚存,局部腺上皮增生,粘膜下层充血水肿,中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,粘膜组织损伤程度明显比对照组轻。而且预先给予 rhITF 的实验组病理评分结果同对照组相比均有显著统计学差异(表6)。

表6 rhITF 预防性保护肠粘膜的作用病理组织学评分结果
Table 6 Effect of various concentrations of rhITF on microscopic score in rats pretreated with rhITF at 30 minutes before administration of TNBS

Comparison between control group and 1mg/kg rhITF one	
U	98.5
P	2.17E-05

(3)MPO 活性:对照组的标本中组织 MPO 活性单位明显高于给予 rhITF 的实验组,而且两组比较有显著统计学差异(表7)。

表7 不同实验组的 MPO 活性(均数±标准差)
Table 7 MPO activity in different groups

	Control	1mg/kg ITF group
MPO content	5.22±3.40	2.32±1.39
P		0.030911

3 讨论

小肠三叶因子(intestinal trefoil factor,ITF)通过3对二硫键形成保守的二级结构,使整个分子结构紧密,能够抵抗胃酸和蛋白酶的破坏^[2]。研究发现 ITF 存在天然的双体形式,而且双体形式可能是其保持一定的生物学特性并发挥生物学作用的必要条件^[7]。

近年来研究表明,hITF 在胃炎、肠炎、消化性溃疡、炎症性肠病等病理情况下,ITF 的表达量显著升高^[8],提示其在肠道的自我保护机制中占据重要地位。hITF 的作用机理尚未完全阐明,其中一个重要原因是 hITF 在组织中含量极低,因而大大阻碍了对其性质和功能的研究。

毕赤酵母表达系统是近年来发展很快的一个真核表达系统,具有高表达、高稳定、高分泌的特点,已成功用于多种真核蛋白质的表达。为了实现 rhITF 的高效分泌表达,我们选用含有 α 分泌信号肽的载

体 pPIC9 进行 rhITF 的表达。

由于采用盐培养基发酵,发酵液上清中含有大量的盐,样品中的盐会影响样品的 PH 值以及等电点。因此我们采用 Pharmacia 公司生产的 Sephadex G-25 脱盐柱除去样品中的盐,更换蛋白缓冲液。理论上,毕赤酵母表达系统自身不分泌内源蛋白,发酵液上清中的杂蛋白含量很少,可以简化重组蛋白的纯化过程。但是在发酵过程中不可避免会出现菌体破裂现象,破裂的菌体释放出许多大分子胞内蛋白,增加了纯化的难度。但是同胞内表达相比,杂蛋白含量已明显减少了。我们采用 SPHP、MonoQ 以及分子筛 Sephacryl S-100 纯化柱,通过3步纯化过程,获得了高纯度的双体 hITF,纯化得率为 35%~45%,接近国外文献报道的纯化得率(25%~65%)。而且经过摸索,我们采用高载量低分辨率的 SPXL 柱进行初步纯化发酵液上清,收集样品过 Source30Q 柱,即可获得高纯度的目的蛋白,可以进一步简化纯化工序,提高纯化得率。

应用发酵罐发酵表达蛋白,有利于控制诱导表达时间、溶氧浓度以及培养基的 pH 值等发酵条件,大量获得目的蛋白。本实验采用国产 5L 发酵罐,每罐可收集发酵液 2.5L,经纯化后获得活性蛋白(hITF 双体形式)253mg,接近国外报道的 100mg/L^[9],高于国内大肠杆菌表达系统 3~4mg/L 的表达水平^[10]。为以后进行大量发酵生产打下了基础。同时采用基本盐培养基,同国内外其他学者采用的 YPD 和 BMMY/BMGY 培养基相比,价格低廉,在大规模生产时无疑可以降低生产成本,增加收益。

国内、外学者对应用 ITF 预防和保护胃粘膜的作用研究较多^[11-14],而对其在肠粘膜损伤时的作用报道较少,也没有学者直接给予实验动物外源性 hITF 后,观察 hITF 保护肠粘膜的作用。

因此,在基因重组获得 hITF 后,我们检测了重组 hITF 对大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)迁移的影响,并观察了预防性给予重组 hITF 对大鼠肠粘膜的保护作用。细胞迁移是正常上皮细胞的基本功能,在粘膜损伤后,细胞迁移至损伤区,可以维持粘膜上皮层的连续性,对维持肠粘膜的完整以及损伤的快速修复具有重要的意义。实验结果显示重组 hITF 能够促进肠上皮细胞的迁移。动物实验结果显示,同对照组相比,给予 rhITF 组动物的肠粘膜损伤明显减轻,大体标本和病理组织学评分以及髓过氧化物酶活性均明显低于对照组。髓过氧化物酶(MPO)是中性粒细胞嗜天青颗粒释放的过氧化物酶类,是

评价中性粒细胞在组织中浸润的可靠指标,可用于定量反应肠粘膜炎症反应的程度。结果提示 rhITF 具有保护大鼠肠粘膜免受化学物质侵袭的作用,对肠粘膜上皮细胞具有保护功能,而且在较低浓度(1mg/kg)时,即可发挥保护肠粘膜的作用。

本研究从人结肠粘膜 cDNA 中扩增并获得了 hITF 基因,构建了毕赤酵母表达载体 pPIC9/hITF,经测序鉴定并验证插入片段为目的基因片段。利用毕赤酵母外源蛋白表达系统,采用廉价的基本盐培养基实现了 hITF 的大量、高效表达,并研究了重组蛋白质促进肠上皮细胞迁移,保护肠粘膜免受损伤的生物学作用,为工业化、大规模生产 hITF 并进一步应用于临床实践打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Suemori S, Lynch-Devanty K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(24): 11017 - 11021.
- [2] Podolsky DK, Lynch-Denanty K, Stow JL, et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, 1993, **268**(9): 6694 - 6702.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Manatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 1 - 69.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 - 275.
- [5] Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, et al. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*, 1996, **38**(4): 568 - 573.
- [6] Millar AD, Rampton DS, Chander CL, et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut*, 1996, **39**: 407 - 415.
- [7] Chinery R, Bates PA, De A, et al. Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett*, 1995, **357**: 50 - 54.
- [8] Rio MC, Chenard MP, Wolf C, et al. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology*, 1991, **100**(2): 375 - 379.
- [9] Thim L, Woldike HF, Nielsen PF, et al. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry*, 1995, **34**: 4757 - 4764.
- [10] Wang W(王蔚), Kou RQ(口如琴), Li LY(李令媛), et al. Expression of human intestinal trefoil factor in *E. coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 1999, **15**(5): 724 - 728.
- [11] Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, et al. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*, 1995, **108**(2): 516 - 523.
- [12] Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, et al. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, 1996, **110**: 489 - 497.
- [13] Su YR(苏云鹏), Li LY(李令媛), Yu MM(俞梅敏), et al. The study of protection and cure by recombinant human trefoil factor (rhITF) against gastric injury in rat. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2000, **7**(3): 136 - 140. *ala alba medialis*.
- [14] Wang YR(王艳茹), Ren HW(任宏伟), An L(安琳), et al. Expression of human trefoil factor 3 in *Pichia pastoris* and its biological activity analysis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2001, **33**(6): 653 - 658.