

人源性 RPL22 基因的原核表达与纯化及功能分析

田甜,张星娟,杨明夏

[南京医科大学第三附属医院(常州市第二人民医院)呼吸科,常州 213003]

摘要 目的 了解人类核糖体蛋白 L22(RPL22)基因的生物信息学,原核表达与纯化人类 RPL22 重组蛋白,在体外合成人类 RPL22(标记为试剂 M),研究试剂 M 对 NSCLC A549 细胞增殖、周期、凋亡的影响,分析试剂 M 和顺铂(DDP)联合进行化疗的效果。方法 分析 RPL22 生物信息学。PCR 克隆 RPL22 基因,进行单链寡核苷酸的设计及合成,获得目的基因后连接 pET-28 α 载体,构建 pET-28 α -RPL22 重组质粒,转化大肠埃希菌感受态细胞 DH $_{5\alpha}$,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western blot 分析重组蛋白 RPL22 的表达情况。CCK-8 检测试剂 M 和 DDP 在 A549 细胞中的半抑制率(IC $_{50}$)以及试剂 M 对 A549 细胞增殖的影响;流式细胞术检测试剂 M 对 A549 细胞凋亡、周期的影响;qPCR、Western blot 检测试剂 M 和 DDP 分别对磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)、腺苷 5'-单磷酸激活蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)信号通路的影响。结果 RPL22 蛋白为不稳定亲水性蛋白质。诱导表达的重组蛋白经溶解纯化后获得了高浓度重组蛋白。在 A549 细胞中,试剂 M 的 IC $_{50}$ 为 400 μ g/L,DDP 的 IC $_{50}$ 为 10 μ mol/L,试剂 M 抑制细胞增殖,其浓度与细胞活性成反比;试剂 M(200 μ g/L)与 DDP(2.5 μ mol/L)联合运用时,效果与单独使用 10 μ mol/L DDP 抑制增殖比相似;试剂 M 能诱导 G $_2$ 细胞周期停止、促进细胞凋亡,且可能参与 PI3K/AKT、AMPK/mTOR 通路的调节。结论 本研究首次克隆得到人类 RPL22 重组蛋白,使其成功纯化表达。

关键词 核糖体蛋白 L22;非小细胞肺癌;生物信息学分析;原核表达与纯化;功能分析

中图分类号 R 56

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1785-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.013

非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)是肺癌亚型之一,占肺癌病例的 80%~85%^[1]。铂基抗癌药物^[2]在各种实体肿瘤的化疗中发挥着至关重要的作用。然而,铂基类药物特异性差有严重副作用,临床应用受到限制,基于驱动基因突变和免疫相关治疗的靶向治疗不一定具有持续的治疗效果^[3]。核糖体蛋白^[4](ribosomal protein, RP)在调节某些信号通路方面发挥关键作用,一些 RP 具有核糖体外功能,如调节肿瘤抑制剂 p53 表达^[5]。核糖体蛋白 L22(ribosomal protein L22, RPL22)的功能基因研究是哺乳动物研究的热点所在。有证据^[6]表明,RPL22L1 在前列腺癌中高表达,其低表达抑制癌细胞的生长和侵袭。然而,RPL22 在肺癌中的临床意义研究较少,近些年有分析表示抑制 RPL22 对 NSCLC 患者的生存有着不利影响^[7]。该课题组先前的研究^[8]表明,RPL22 在非

小细胞肺癌肿瘤组织中表达量较正常组织低。研究^[9]表明 RPL22 可以通过抑制酪蛋白激酶 2 α (casein kinase2 α ,CK2 α)介导的体外磷酸化调控磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B,PI3K/AKT)通路来促进肺癌细胞凋亡,这表明 RPL22 在一定程度上具有抗肿瘤活性,对肺癌进行了负调节。

为了进一步探索 RPL22 对 NSCLC 的影响,该课题组在体外合成人类 RPL22(标记为试剂 M),探究其对 A549 细胞增殖、凋亡、细胞周期的影响,同时对比研究试剂 M 和顺铂(cis-diamminodichloroplatinum II dichloridide,DDP)在 A549 细胞中的半抑制率(50% inhibitory concentration,IC $_{50}$),以及试剂 M 和 DDP 联合运用时的影响,进一步探索 RPL22 调控 PI3K/AKT、腺苷 5'-单磷酸激活蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(serine/threonine kinase AMP-activated protein kinase-mammalian/mechanistic targets of rapamycin,AMPK/mTOR)通路的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 pET-28 α 、大肠埃希菌感受态细胞

2024-07-11 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81472199)

作者简介:田甜,女,硕士研究生;

杨明夏,男,副教授,主任医师,硕士生导师,通信作者,E-

mail:cougermx@126.com

DH_{5α} 购自北京华普奥科生物科技有限公司; A549 细胞购自上海中乔新舟有限公司; PageRuler Marker 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上样缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒、细胞凋亡试剂盒、聚偏氟乙烯膜、快速封闭液购自上海碧云天生物技术有限公司; SDS-PAGE 凝胶配置溶液购自上海雅酶生物医药科技有限公司; CCK-8 试剂购自合肥兰杰柯科

技有限公司; 细胞周期试剂盒购自江苏凯基生物有限公司; 高信号 ECL 化学发光底物试剂盒购自上海天能科技有限公司。

1.2 RPL22 蛋白的生物信息学分析 在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中查询到 RPL22 基因的序列号 (Gene ID: 6146), 以 RPL22 基因 CDS 区编码产物所对应的蛋白质为研究对象, 对其进行生物信息学预测以及分析, 所采用的软件及网址见表 1。

表 1 生物信息学软件相关信息

Tab. 1 Bioinformatics software related information

Software brand	Uniform resource locator	Application
ExPASy-ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	The physicochemical properties of proteins were analyzed
ExPASy-ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/	Protein hydrophilicity/hydrophobicity was analyzed
PSorT II	https://psort.hgc.jp/form2.html	Protein subcellular localization
TMHMM Serverv 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	Protein transmembrane structure analysis
SignalP-5.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/	Protein signaling peptide prediction
NetnGlyc 1.0 Server	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/	Prediction of N-terminal glycosylation site of protein
NetPhos 3.1 Server	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	Protein phosphorylation site prediction
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.html	Secondary protein structure
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/	Protein tertiary structure

1.3 RPL22 基因的提取与目的基因的扩增 通过 NCBI 数据库, 获得以 RPL22 基因 mRNA 的 CDS 序列为模板, 设计基因的上下游特异性引物 (表 2), 构建 RPL22 基因反应体系后进行 PCR 扩增。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 在紫外照仪上切下目的基因条带, 之后使用 DNA 琼脂糖回收试剂盒进行目的基因的回收纯化。

表 2 引物序列信息

Tab. 2 Primer sequence information

Primer name	Primer sequence(5'-3')
Human-RPL22	F: ACTCTTGATTGACCCACCC
	R: AAGGTCCAGCTTTCCGT
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	R: GAAGATGCTGATGGGATTTC

1.4 人 RPL22 的载体构建和鉴定 将纯化后的基因片段合成 puC57-RPL22 质粒, 经限制性内切酶 BamH I、Sal I 连接到载体 pET-28α 原核表达载体上, 命名为 pET-28α-RPL22。最后挑取阳性菌落, 小提质粒后酶切、测序。

1.5 包涵体蛋白溶解与纯化 ① 将菌液沉淀经过高压细胞破碎后, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min, 弃去上清液, 用玻璃棒刮去沉淀表面上的淡黄色菌体碎片及灰黑色杂质, 并检查是否密度均匀; ②

加入 6 ml 预冷的裂解缓冲液重悬包涵体蛋白, 并用玻璃棒捣碎、搅拌包涵体, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液; 重复步骤②1 次; ③ 加入 6 ml 预冷的 PBS 缓冲液重悬包涵体, 并再次用玻璃棒捣碎、搅拌包涵体, 吸取 20 μl 样品准备进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。剩余包涵体再次 4 °C 条件下 13 500 r/min 离心 10 min 并弃掉上清液; ④ 对包涵体进行称重; ⑤ 加入 6 mol/L 盐酸胍溶液, 至包涵体浓度 30 mg/ml。⑥ 取溶解后的包涵体进行 BCA 蛋白浓度测定, 以及 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。

1.6 RPL22 在非小细胞肺癌细胞 A549 细胞中的生物学功能及分析

1.6.1 试剂 M 和 DDP 在 A549 细胞中 IC₅₀ 的测定

A549 细胞系在 F-12k 基础培养基中常规生长, 补充 10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素, 置于 5% CO₂、37 °C 的湿润细胞培养箱培养。细胞按 1 × 10⁵ 个密度播种在 96 孔板中, 培养 24 h 待细胞贴壁且密度达 60% ~ 70% 汇合度时, 试剂 M 按照浓度梯度 0、20、50、80、100、200、400、800 μg/L, 分别加样, 每个浓度梯度设置 3 个复孔, DDP 按照浓度梯度 0、0.1、2.0、10.0、100.0 μmol/L, 分别加样, 每个浓度梯度设置 3 个复孔, 根据 CCK-8 试剂盒的说明, 培养 24 h 后使用分光测量仪进行检测。

1.6.2 RPL22 与 DDP 结合使用对 A549 细胞生长的影响 A549 细胞按 1×10^8 个密度播种在 10 cm 细胞培养皿中,无血清培养基培养 24 h 后用 DDP 和试剂 M + DDP 处理。根据本研究,A549 中 DDP 的 IC_{50} 约为 $10 \mu\text{mol/L}$,试剂 M 的 IC_{50} 为 $400 \mu\text{g/L}$ 。细胞在平行培养中暴露于 DDP 条件 ($10 \mu\text{mol/L}$)、M ($200 \mu\text{g/L}$)、M ($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($1.25 \mu\text{mol/L}$)、M ($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($2.5 \mu\text{mol/L}$)、M ($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($5 \mu\text{mol/L}$)。用一个实验中处理过的培养物中的细胞同时进行 qPCR 和 Western blot 分析,以尽量减少样品之间的变异性。

1.6.3 CCK-8 检测各组细胞增殖抑制率情况

A549 细胞在 96 孔板中播种,每孔密度为 1×10^3 个。当达到 50% 的汇合度时,分别用 0、200、800 $\mu\text{g/L}$ 的试剂 M 对细胞进行治疗。根据 CCK-8 试剂盒的说明,使用分光测量仪进行检测。

1.6.4 细胞凋亡和细胞周期的流式细胞仪分析

A549 细胞在 6 孔板中播种,每孔密度为 2×10^5 个。当达到 50% 的汇合度时,分别用 0 $\mu\text{g/L}$ 和 400 $\mu\text{g/L}$ 的试剂 M 对细胞进行治疗。根据细胞凋亡试剂盒和细胞周期分析的说明,使用流式细胞仪进行处理。使用 Flowjo 处理和分析数据。

1.6.5 RPL22 蛋白的 Western blot 检测 将纯化的蛋白作为抗原加上 5 × 蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min,在 15% 的 SDS 凝胶中通过 SDS-PAGE 分离,然后电转移到聚偏氟乙烯膜上,在 4 °C 下,用快速封闭液封闭 15 ~ 30 min 后,用按 1 : 1 000 稀释的 [KO Validated] RPL22 兔抗作为一抗,4 °C 孵育过夜,将 HRP Goat IgG 兔抗以 1 : 5 000 稀释作为二抗,室温孵育 2 h,利用 TBST 洗涤 3 次后,使用 ECL 化学发光底物进行显影。

1.7 统计学处理 使用 ANOVA 双尾方差分析多样本之间的比较,确定了各组之间的差异。所有实验均至少重复了 3 次。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RPL22 蛋白质的生物学分析 RPL22 蛋白中有 15.6% 的氨基酸(天冬氨酸 + 谷氨酸)带负电荷,有 19.5% 的氨基酸(精氨酸 + 赖氨酸)带正电荷,氨基酸数量为 128,分子量达到 14.787 ku,理论等电点为 9.21,RPL 蛋白的分子式为 $C_{660}H_{1066}N_{180}O_{198}S_3$ 。该基因的不稳定性指数 49.52%,表明 RPL22 蛋白

为不稳定蛋白质。

2.1.1 亲水性疏水性分析 维持蛋白质的三级结构最重要的作用力就是疏水基的相互作用力。利用 ExPASy-ProtScale 软件对 RPL22 蛋白的氨基酸序列进行疏水性/亲水性进行分析,如图所示(图 1A),该蛋白疏水性最强的氨基酸位于第 59 位,疏水值为 1.256,亲水性最强的氨基酸是缬氨酸,位于第 122 位,亲水值为 -3.5。阳性评分为疏水性,阴性评分为亲水性,绝对值越大,疏水性/亲水性程度越高。由亲水性/疏水性分布图可知,大部分氨基酸为亲水性氨基酸,因此可以认为 RPL22 是一种亲水性蛋白。

2.1.2 RPL22 蛋白质的跨膜区、信号肽预测分析

亚细胞定位的预测结果表明,RPL22 在细胞质、细胞核、线粒体的占比依次为 56.5%、30.4%、8.7%,细胞骨架中含量最低,为 4.3%。RPL22 蛋白无跨膜结构,显示 RPL22 蛋白所有的氨基酸均位于细胞内(图 1B),这与亚细胞定位预测结果一致。RPL22 不具有信号肽(图 1C)。

2.1.3 RPL22 蛋白质的糖基化和磷酸化分析

RPL22 蛋白的翻译后修饰如糖基化和磷酸化是实现蛋白质生理功能所必须的。糖基化在蛋白质和其他大分子之间的相互作用起着非常重要的作用。在 RPL22 蛋白的糖基化位点预测(图 1D)中,共含有 0 个 N 糖基化位点,与 RPL22 不具有信号肽结果一致。

磷酸化修饰时生物体内重要的共价修饰方式之一,与信号传导、细胞周期、生长发育以及癌症机制等诸多生物学问题密切相关,也会使蛋白结构发生改变,进一步改变蛋白质的生物学活性。预测结果显示 6 个丝氨酸磷酸化位点,分别位于第 66、68、74、79、106、109 位氨基酸,6 个苏氨酸磷酸化位点分别位于第 22、26、62、71、73、87 位氨基酸,5 个酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点分别位于第 82、85、90、110、114 位氨基酸(图 1E)。

2.1.4 RPL22 蛋白质的结构分析

蛋白质的二级结构是指沿着一个方向排列的周期性结构,是蛋白质多肽链中有规则的重复构象。软件预测结果表明,该蛋白的二级结构由 31.25% 的 α -螺旋,9.38% 的 β -转角,29.69% 的无规卷曲构成,蛋白质其余结构被预测为延伸连(图 1F)。

利用 SWISS MODEL 软件预测了 RPL22 蛋白质的三级结构,最优建模进行展示,其中建模评价指标

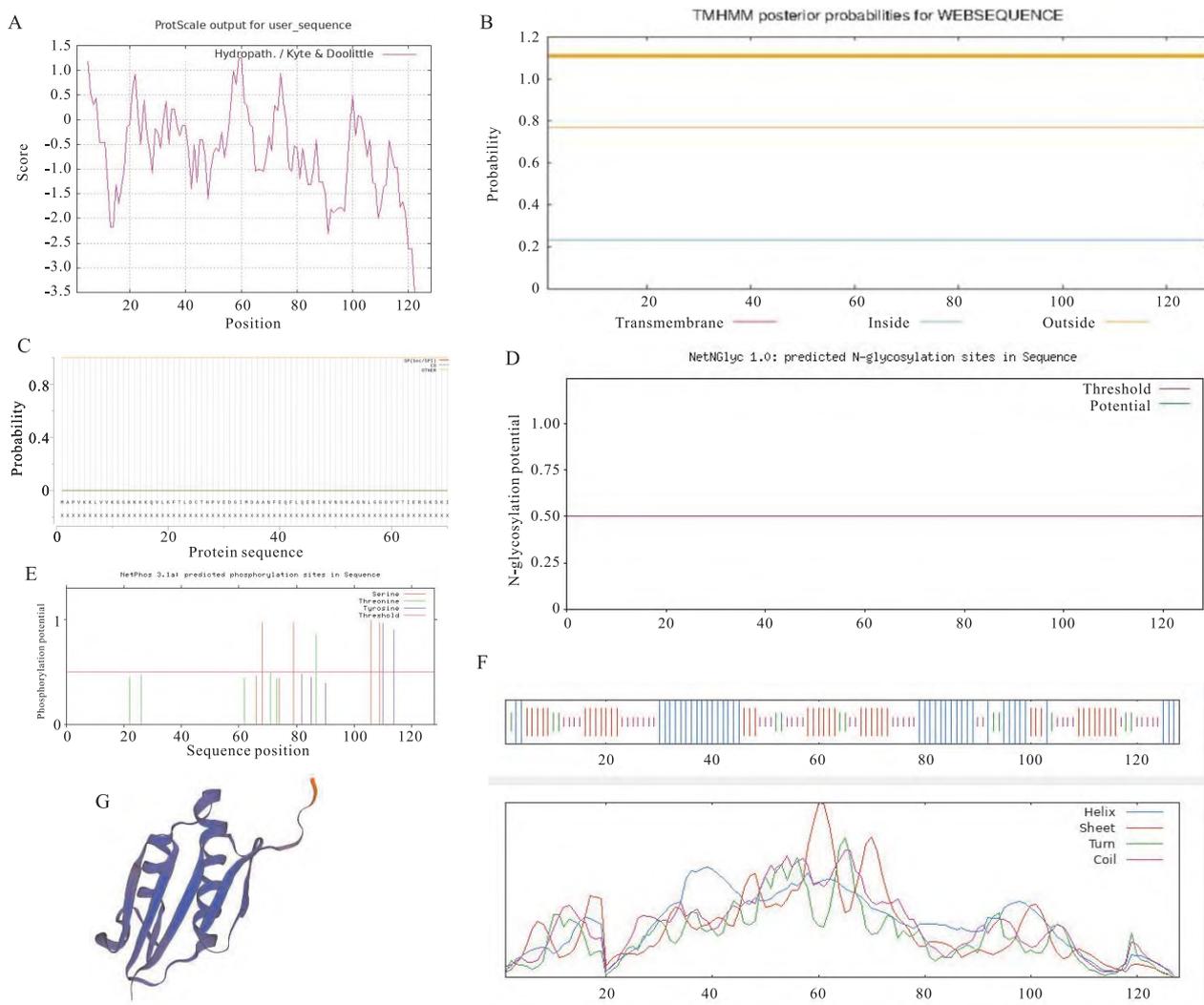


图1 RPL22 蛋白质的生物学分析

Fig.1 Biological analysis of RPL22 protein

A:Hydrophilic/Hydrophobic prediction of RPL22 ;B:Transmembrane structure prediction of RPL22 protein;C:Signal peptide prediction of RPL22 protein;D:N-terminal glycosylation site in RPL22 protein;E:Phosphorylation site in RPL22 protein;F:Secondary structure prediction of RPL22 protein; G:Tertiary structure prediction of RPL22 protein.

包括 Qmean 和 GMQE(全球性模型质量评估), 评价值分别为 0.83 和 0.76, 所得模型质量良好, 三级结构预测结果显示该蛋白是单体形式(图 1G)。

2.2 RPL22 蛋白原核表达、鉴定和纯化 电泳结果如图 2A 所示, 重组蛋白在表达菌株裂解液上清液中有明显的条带; 且洗脱液中可以看到目的蛋白被有效地洗出, 除了第 1 和第 2 次洗脱时有少量杂带外, 后续洗脱纯度较高。结果显示 RPL22 重组蛋白完成了纯化。如图 2B 所示, 重组蛋白在 18 ku 大小处有明显的条带, 符合预期蛋白大小, 结果表明重组质粒在大肠埃希菌中成功诱导表达了 RPL22 蛋白。

2.3 CCK-8 检测 A549 细胞系中试剂 M 和 DDP 的 IC₅₀ 为了分别检测试剂 M 和 DDP 在 A549 细胞中的 IC₅₀, 分别设置不同浓度梯度, 细胞抑制率由 CCK-8 方法计算。试剂 M 浓度梯度设置为 0、20、50、80、100、200、400、800 μg/L, 结果显示, 在浓度级联中, 400 μg/L 试剂 M 最接近 IC₅₀ (P < 0.001) (图 3A)。DDP 浓度梯度设置为 0 (control)、0.1、2.0、10.0、100.0 μmol/L, 结果提示, 当浓度达到 10 μmol/L 时 DDP 最接近 IC₅₀ (P < 0.001) (图 3B)。

2.4 CCK-8 检测 A549 细胞增殖抑制率情况 为了确定试剂 M 对 A549 细胞增殖的影响, 用各种浓度(0、200、800 μg/L)的试剂 M 处理, 进行了 CCK-8

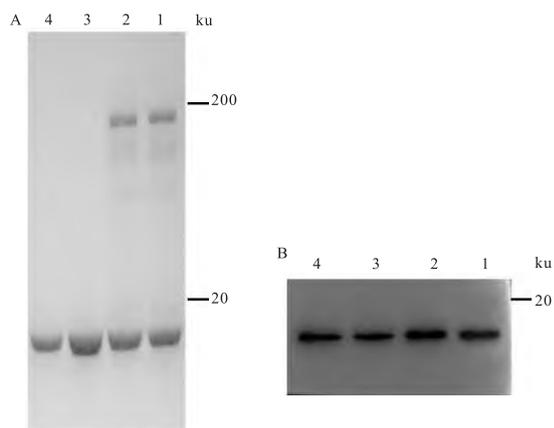


图2 RPL22蛋白原核表达和纯化

Fig. 2 Expression and purification of RPL22 protein in prokaryotic cell

A: Purification result of RPL22 protein; B: Western blot results of purified recombinant protein RPL22; Lanes 1-4: Elution wash once, elution second, elution third and elution fourth respectively.

检测,以检测细胞活力。结果显示,与对照组(试剂浓度为 $0 \mu\text{g/L}$)相比,试剂M以浓度依赖性的方式抑制了A549细胞增殖($P < 0.001$)(图3C)。

2.5 流式细胞术检测试剂M对A549细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测探究试剂M对A549细胞系

细胞凋亡的影响。如图4所示,与对照组(试剂M浓度为 $0 \mu\text{g/L}$)相比,用试剂M($400 \mu\text{g/L}$)治疗A549细胞的凋亡率分别从 8.02% ($8.02 \pm 0.76\%$)显著增加到 18.7% ($18.7 \pm 1.33\%$) ($P < 0.05$)。

2.6 流式细胞术检测试剂M对A549细胞周期的影响 为了进一步研究A549细胞中试剂M诱导凋亡的潜在机制,通过流式细胞仪检测来测量细胞周期分布。与对照组($M = 0 \mu\text{g/L}$)(图5A)相比,试剂M($400 \mu\text{g/L}$)处理的A549细胞 [$27.91 \pm 2.43\%$ vs ($18.91 \pm 1.46\%$), $P < 0.05$]表现出 G_2 细胞周期相积累(图5B)。结果显示(图5C),试剂M可能具有诱导 G_2 细胞周期停止的能力($P < 0.05$)。

2.7 试剂M和DDP的联合运用对A549细胞增殖的影响 上述实验结果表明,DDP($10 \mu\text{mol/L}$)的细胞增殖抑制比约为 50% ,因此,将DDP $10 \mu\text{mol/L}$ 作为对照组;A549细胞活力随着试剂M浓度增加而减少,试剂M的 IC_{50} 为 $400 \mu\text{g/L}$,为避免抑制率过高导致细胞死亡率大幅度增加,选择试剂M浓度为 $200 \mu\text{g/L}$ 为基础浓度组。设置浓度组合为DDP ($10 \mu\text{mol/L}$)、M($200 \mu\text{g/L}$)、M($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($1.25 \mu\text{mol/L}$)、M($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($2.5 \mu\text{mol/L}$)和M($200 \mu\text{g/L}$) + DDP ($5 \mu\text{mol/L}$)。细胞抑制比

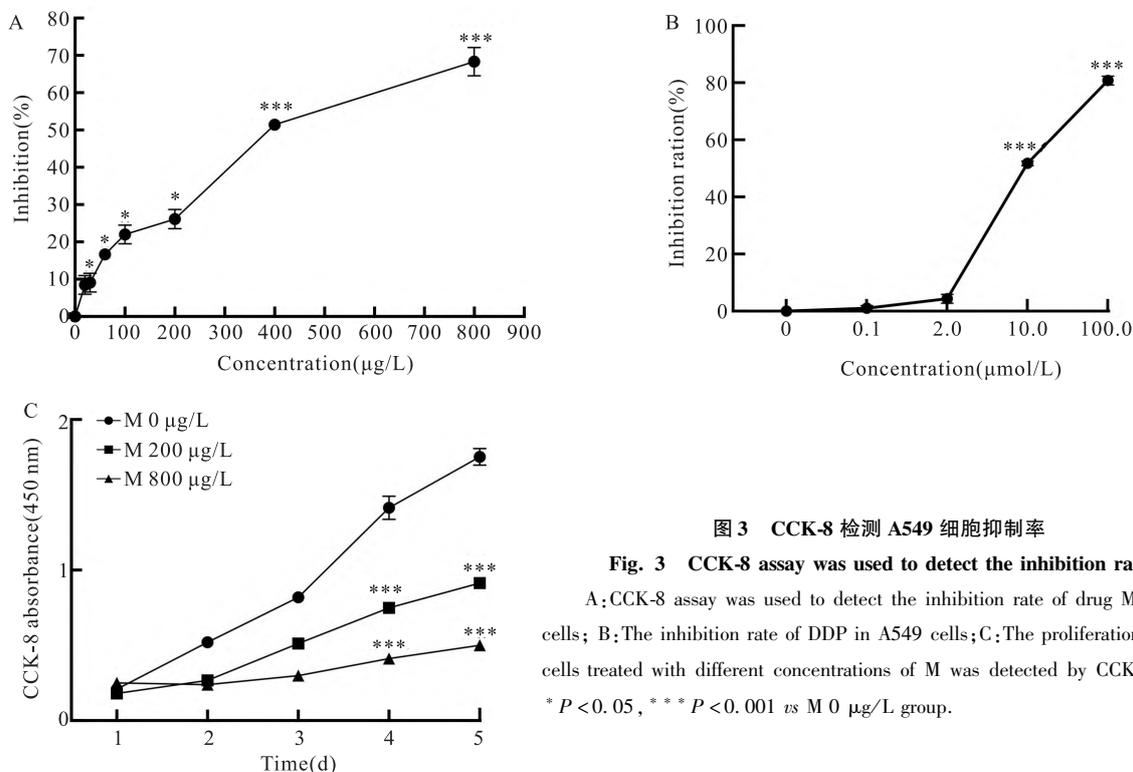


图3 CCK-8检测A549细胞抑制率

Fig. 3 CCK-8 assay was used to detect the inhibition rate

A: CCK-8 assay was used to detect the inhibition rate of drug M in A549 cells; B: The inhibition rate of DDP in A549 cells; C: The proliferation of A549 cells treated with different concentrations of M was detected by CCK-8 assay; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs M $0 \mu\text{g/L}$ group.

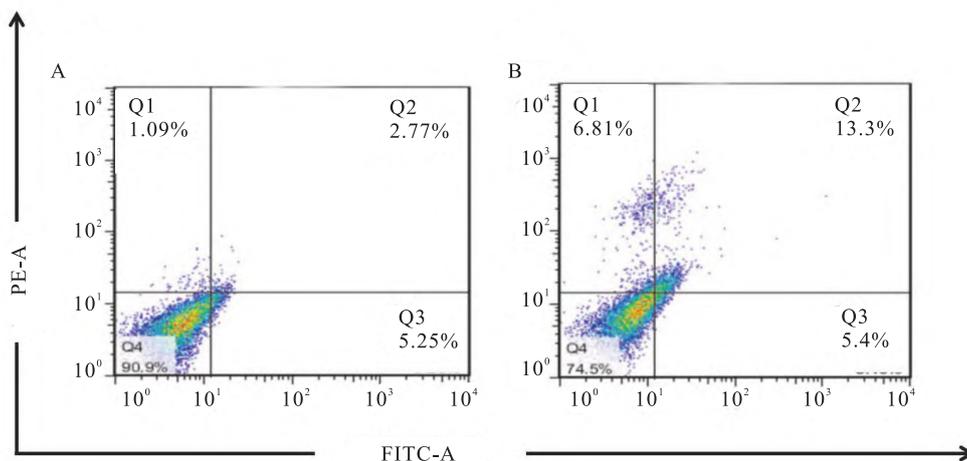


图4 流式细胞仪检测肺癌细胞凋亡数

Fig. 4 Flow cytometry was performed to detect apoptosis of lung cancer cells *in vitro*

A: The distribution of apoptotic cells of A549 when reagent M was 0 μg/L; B: The distribution of apoptotic cells of A549 when reagent M was 400 μg/L.

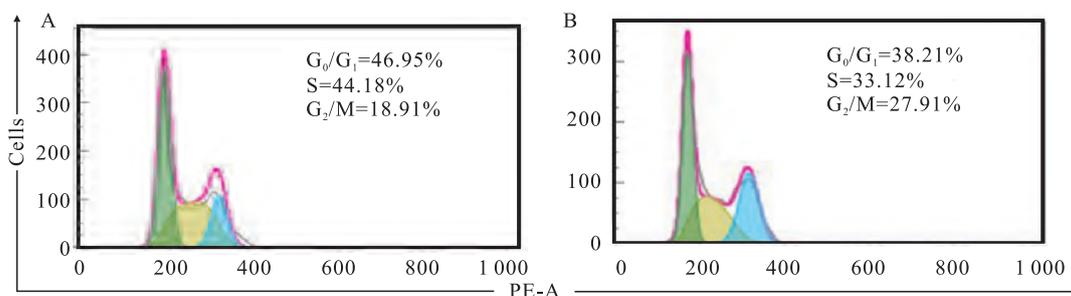
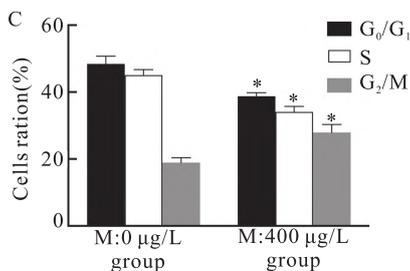


图5 通过流式细胞仪测定细胞周期分布

Fig. 5 Cell cycle distribution was measured by flow cytometry

A: The cell cycle distribution of A549 cells treated with drug M(0 μg/L); B: The cell cycle distribution of A549 cells treated with drug M(400 μg/L); C: The analysis of cell number proportion in each cell cycle in repeated experiments; * P < 0.05 vs M; 0 μg/L group.



由 CCK-8 方法计算。如图 6 所示,DDP 和试剂 M 都表现出抑制细胞增殖的能力,低剂量的 DDP 在与试剂 M 合作时显著抑制细胞增殖 (P < 0.05)。此外,暴露于 M(200 μg/L)与 DDP(2.5 μmol/L)联合运用的 A549 细胞增殖抑制比与单独使用 DDP(10 μmol/L)治疗的细胞增殖抑制比相似。也就是说 DDP 与试剂 M 的联合使用降低了 DDP 的治疗剂量,并增加了 A549 细胞的抗肿瘤活性。

2.8 试剂 M 在 A549 细胞系中影响信号通路基因 mRNA 的表达 之前的研究^[9]表明,RPL22 通过 CK2α 调控 PI3K/AKT 信号通路。经 qPCR 检测相

关调节剂的表达水平,提示参与 PI3K/AKT 和 AMPK/mTOR 通路的某些基因的 mRNA 表达水平出现变化,即试剂 M(400 μg/L)处理的 A549 细胞中,CK2α、PTEN、PI3K、AKT、mTOR 和 NF-κB 的 mRNA 表达显著下降 (P < 0.05) (图 7A)。这些结果表明,试剂 M 参与对 PI3K/AKT 通路的调节。

2.9 试剂 M 在 A549 细胞中影响信号通路基因蛋白的表达 为了确定蛋白质水平表达的差异是否符合 qPCR 结果,进行了 Western blot 分析,提示 CK2α、PTEN、PI3K、AKT、mTOR 基因的蛋白质表达水平下降 (P < 0.05) (图 7D、7E),这与 mRNA 表

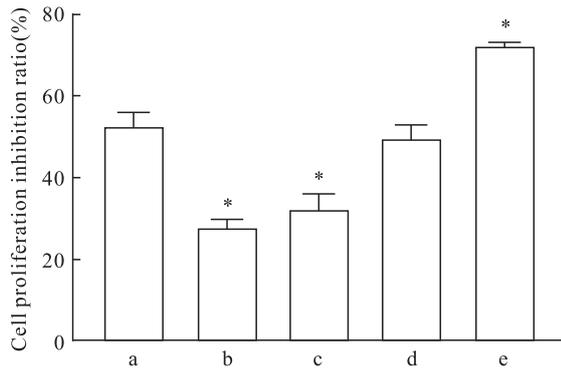


图6 DDP 以及 M + DDP 的组合中的细胞增殖抑制比
Fig. 6 Cell proliferation inhibition ratio in DDP and M + DDP combinations

a: DDP (10 μmol/L) group; b: M (200 μg/L) group; c: M (200 μg/L) + DDP (1.25 μmol/L) group; d: M (200 μg/L) + DDP (2.5 μmol/L) group; e: M (200 μg/L) + DDP (5 μmol/L) group; * $P < 0.05$ vs a group.

达水平一致。因此,这项研究表明,试剂 M 对 NSCLC 细胞增殖的负面功能是通过调控 PI3K/AKT

途径诱导的。

2.10 试剂 M 和 DDP 分别对信号通路基因 mRNA 表达的影响 为了对比研究试剂 M 和 DDP 对信号通路的影响,控制 DDP 浓度 10 μmol/L,试剂 M 浓度 400 μg/L,测定 A549 细胞信号通路各基因 mRNA 的表达量,显示 DDP 对 PI3K、PTEN 的抑制效率优于试剂 M ($P < 0.05$) (图 7B),试剂 M 抑制 AKT (图 7B)、促进 AMPK、TSC1 (图 7C) 表达的效率的显著优于 DDP 组 ($P < 0.05$),还可促进 LKB1、AMPK、TSC1、TSC2 的表达 ($P < 0.05$) (图 7C)。提示试剂 M 参与调控 PI3K/AKT 途径、AMPK/mTOR 途径且部分效率优于 DDP。

3 讨论

NSCLC 威胁着人类的健康和生命。核糖体蛋白质是真核生物核糖体的组成部分,具有调节细胞周期、凋亡等功能。近年来很少有研究显示 RPL22 对 NSCLC 的负面影响。该课题首先分析 RPL22 生物信息学,显示 RPL22 蛋白为不稳定亲水性蛋白

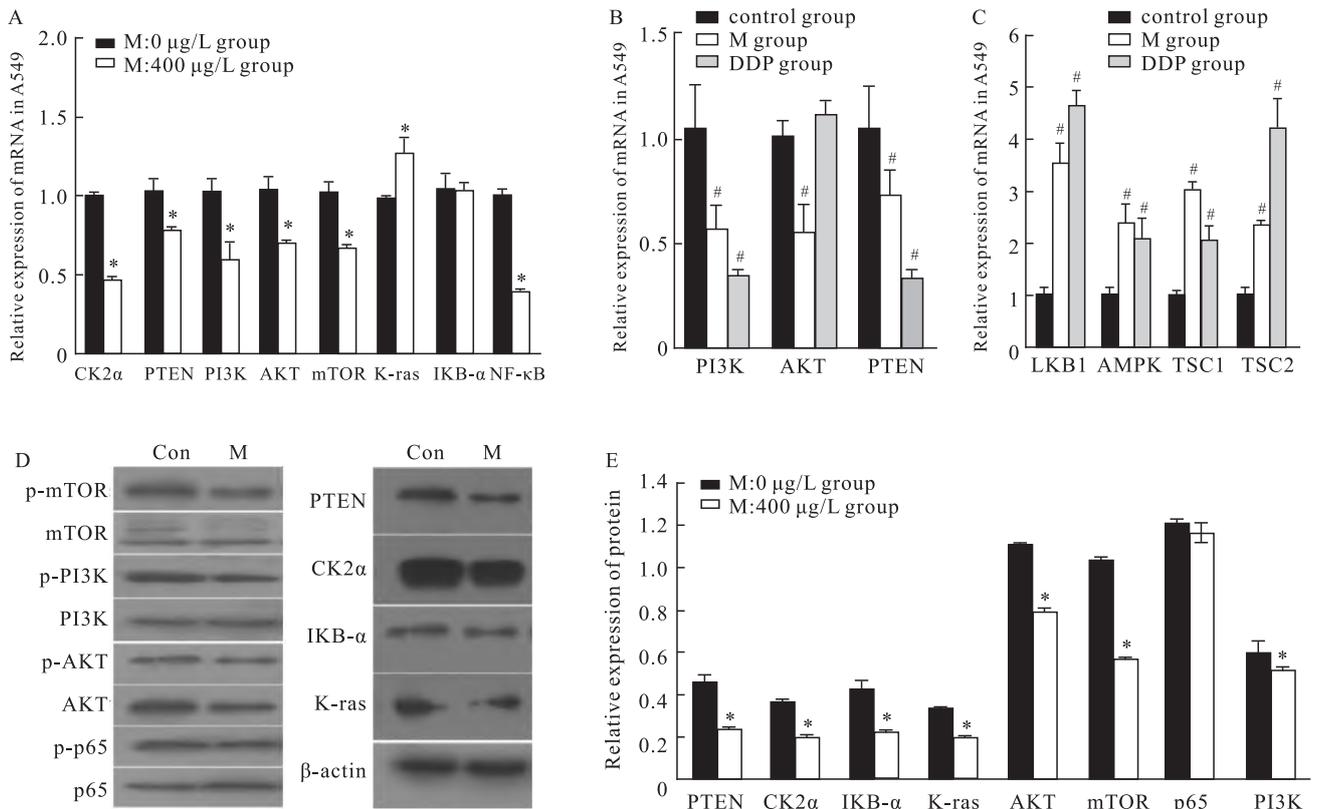


图7 信号通路基因 mRNA 及蛋白在试剂 M 和/或 DDP 作用下表达

Fig. 7 mRNA and protein of signaling pathway genes were expressed under the action of reagents M and/or DDP

A: qPCR; B: Effect of drug M on PI3K/AKT signaling pathway; C: Effect of drug M on AMPK/mTOR signaling pathway; D: Western blot results of protein expression levels of genes involved in PI3K/AKT and AMPK/mTOR pathways; E: Visual analysis of A and B; * $P < 0.05$ vs M 0 μg/L group; # $P < 0.05$ vs control group.

质,主要分布于细胞质中,不具有信号肽、磷酸化和糖基化位点。而后构建 RPL22 原核表达载体并成功获得了高浓度纯化 RPL22 重组蛋白。

该课题检测出在 A549 细胞中,试剂 M 的 IC_{50} 为 $400 \mu\text{g/L}$, DDP 的 IC_{50} 为 $10 \mu\text{mol/L}$,以此为基础,发现试剂 M 显著抑制细胞增殖,并且细胞活性会随着试剂 M 治疗浓度的升高而减弱。流式细胞仪术显示试剂 M 诱导 A549 细胞在 G2 期停滞,且能促进凋亡。之前的研究^[9]表明,RPL22 可以通过与 CK2 α 相互作用来抑制 CK2 α 活性下游目标——PI3K/AKT 途径。PI3K/AKT 通路^[10]的失调会影响一些信号,显著阻碍蛋白质合成,最终导致细胞周期停滞和凋亡。PI3K/AKT 信号转导通路还可以控制 mTOR 活动^[11]。为了深入挖掘试剂 M 对参与 PI3K/AKT 通路的影响,进行了 qPCR 和 Western blot 实验,结果显示,与对照组相比,PI3K、AKT 和 mTOR 基因的表达明显下调。然而作为重要负调节剂的 PTEN 的表达没有像预期的那样增加。可能因为试剂 M 抑制了核 PTEN 转录。已有研究^[12]表明,RPL22 蛋白通过与某些基因或组蛋白 H1 直接相互作用来抑制大多数核基因转录过程。因此,该课题组提出假设,试剂 M 使细胞内 RPL22 过量抑制了核 PTEN 转录进而减少其表达,为了验证这一假设,该课题组将继续进行相关实验加以验证。

顺铂^[13]是铂基类药物其中一种。该研究表明在 A549 细胞中,当试剂 M ($200 \mu\text{g/L}$)与 DDP ($2.5 \mu\text{mol/L}$)联合运用时,抑制率几乎与 DDP ($10 \mu\text{mol/L}$)一致,这表明试剂 M 协同 DDP 在一定程度上增强细胞对铂类药物的敏感性,并减少 DDP 的治疗剂量。对参与 PI3K/AKT 和 AMPK/mTOR 信号通路相关基因进行 qPCR 检测,结果表明,试剂 M 抑制 AKT、促进 AMPK、TSC1 明显优于 DDP,即试剂 M 相较于 DDP 能更好地调节 PI3K/AKT、AMPK/mTOR 通路,从而达到抗肿瘤的效果。但试剂 M 具体是通过哪些关键节点来调控 PI3K/AKT、AMPK/mTOR 通路尚未可知,该课题组将继续进行体内试验进一步探索其中的机制。

综上所述,试剂 M 能够抑制 A549 细胞的增殖并促进其凋亡,提高 A549 细胞对铂基化疗药物的敏感性。重要的是,该研究表明试剂 M 可以通过调节 PI3K/AKT 和 AMPK/mTOR 通路来抑制肺癌细胞生长。尽管这项研究付出了很多努力,但仍需要进一步进行体内动物实验探索试剂 M 对 PI3K/AKT 和 AMPK/mTOR 通路影响的确切机制。

参考文献

- [1] 臧超,戈巧,李超,等.沉默MPZL1调控 β -catenin对A549/Tax细胞干性及耐药性的影响[J].安徽医科大学学报,2024,59(1):99-105. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.016.
- [1] Zang C, Ge Q, Li C, et al. Effect of silencing MPZL1 on tumor cell stemness and drug resistance of A549/Tax cells via β -catenin signaling[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(1): 99-105. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.016.
- [2] Zhang C, Xu C, Gao X, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies[J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2115-32. doi:10.7150/thno.69424.
- [3] Lahiri A, Maji A, Potdar P D, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 40. doi:10.1186/s12943-023-01740-y.
- [4] Petibon C, Malik Ghulam M, Catala M, et al. Regulation of ribosomal protein genes: an ordered anarchy[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, 12(3): e1632. doi:10.1002/wrna.1632.
- [5] Kang J, Brajanovski N, Chan K T, et al. Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 323. doi:10.1038/s41392-021-00728-8.
- [6] Minervini C F, Berloco M F, Marsano R M, et al. The ribosomal protein Rpl22 interacts *in vitro* with 5'-UTR sequences found in some *Drosophila melanogaster* transposons[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(2): 305. doi:10.3390/genes13020305.
- [7] Yi X, Zhang C, Liu B, et al. Ribosomal protein L22-like1 promotes prostate cancer progression by activating PI3K/Akt/mTOR signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(3): 403-11. doi:10.1111/jcmm.17663.
- [8] Yang M, Sun H, Wang H, et al. Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(3): 646. doi:10.1007/s12032-013-0646-0.
- [9] Yang M, Sun H, He J, et al. Interaction of ribosomal protein L22 with casein kinase 2 α : a novel mechanism for understanding the biology of non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 139-44. doi:10.3892/or.2014.3187.
- [10] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-8. doi:10.1016/j.gene.2019.02.076.
- [11] Luo Q, Song Y, Kang J, et al. mtROS-mediated Akt/AMPK/mTOR pathway was involved in Copper-induced autophagy and it attenuates Copper-induced apoptosis in RAW264.7 mouse monocytes[J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101912. doi:10.1016/j.redox.2021.101912.
- [12] Xie P, Peng Z, Chen Y, et al. Neddylation of PTEN regulates its nuclear import and promotes tumor development[J]. *Cell Res*, 2021, 31(3): 291-311. doi:10.1038/s41422-020-00443-z.
- [13] 王晓丹,宋国庆,姜丹. MiR-28-5p通过抑制FSP1介导的铁死亡逆转肺癌细胞顺铂耐药的机制[J].安徽医科大学

学报, 2023, 58(4): 630-6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.018.

[13] Wang X D, Song G Q, Jiang D. MiR-28-5p reverses cisplatin re-

sistance in lung adenocarcinoma cells by inhibiting FSP1-mediated ferroptosis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(4): 630-6. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.018.

Prokaryotic expression, purification and functional analysis of human RPL22 gene

Tian Tian, Zhang Xingjuan, Yang Mingxia

[*Dept of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Third Affiliated Hospital of Nanjing Medical University (Changzhou Second People's Hospital), Changzhou 213003*]

Abstract Objective To understand the bioinformatics of human ribosomal protein L22 (RPL22) gene, prokaryotic expression and purification of human RPL22 recombinant protein, synthesis of human RPL22 (labeled as agent M) *in vitro*, study the effects of agent M on proliferation, cycle and apoptosis of NSCLC A549 cells, and to analyze the effect of combination chemotherapy with M and cisplatin (DDP). **Methods** RPL22 bioinformatics was analyzed. RPL22 gene was cloned by PCR, the single chain oligonucleotide was designed and synthesized to obtain the target gene, and connect the pET-28 α vector. The pET-28 α -RPL22 recombinant plasmid was constructed, and the receptive cell DH_{5 α} of *Escherichia coli* was transformed. The expression of recombinant protein RPL22 was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The semi-inhibitory rate (IC₅₀) of M and DDP in A549 cells and the effect of M on the proliferation of A549 cells were detected by CCK-8. The effect of agent M on apoptosis and cycle of A549 cells was detected by flow cytometry. qPCR and Western blot assays were used to detect M and DDP on phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and adenosine 5'-monophosphate activation of protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) signaling pathway, respectively. **Results** RPL22 protein was an unstable and hydrophilic protein. The recombinant protein was dissolved and purified to obtain high concentration of recombinant protein. In A549 cells, the IC₅₀ of reagent M was 400 μ g/L, and the IC₅₀ of DDP was 10 μ mol/L, and the concentration of reagent M was inversely proportional to the cell activity. The inhibitory effect of reagent M (200 μ g/L) combined with DDP (2.5 μ mol/L) was similar to that of DDP (10 μ mol/L) alone. Reagent M could induce G₂ cell cycle arrest and promote apoptosis, and might be involved in the regulation of PI3K/AKT and AMPK/mTOR pathways. **Conclusion** The recombinant RPL22 protein is cloned and expressed successfully.

Key words ribosomal protein L22; non-small cell lung cancer; bioinformatic analysis; prokaryotic expression and purification; functional analysis

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81472199)

Corresponding author Yang Mingxia, E-mail: cougermx@126.com