

·基础研究·

人工合成二聚体运动相关肌因子 Irisin-Irisin 的表达与功能

刘凤英¹, 黄义德², 林佳³, 陈学群⁴, 王清水⁴, 林尧^{4*}

1 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122;

2 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108;

3 福建中医药大学康复产业研究院, 福建 福州 350122;

4 福建中医药大学科技创新与转化中心, 福建 福州 350122

* 通信作者: 林尧, E-mail: yaolin@fjtem.edu.cn

收稿日期: 2022-08-19; 接受日期: 2022-11-06

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82003095); 福建省自然科学基金项目(2020J06041);

福建中医药大学校管课题(X2021011)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.01005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:**运动相关肌因子 Irisin 是以二聚体的形式来发挥功能,故设计串联的 Irisin-Irisin 模拟二聚体,探讨大肠杆菌表达的重组 Irisin-Irisin 在活性、对肿瘤细胞功能方面与商品化单体 Irisin 的异同。**方法:**选择 BL21(DE3)大肠杆菌表达菌株、pET-30a 表达载体,通过异丙基-β-D 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导,获得大肠杆菌重组蛋白 Irisin-Irisin。用镍柱亲和纯化获取高纯度的重组 Irisin-Irisin,将重组 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 分别处理 C2C12 骨骼肌细胞,观察线粒体相关基因 UCP-1 的表达来验证活性,并在胃癌、结直肠癌等消化道肿瘤中验证其功能,对比重组 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 在活性及对肿瘤细胞功能方面的差异。**结果:**① 重组 Irisin-Irisin 表达、纯化结果:与未诱导的样品比较,IPTG 诱导后重组 Irisin-Irisin 显著表达;通过镍柱亲和纯化法得到大小约 27 kDa 高纯度的重组 Irisin-Irisin。② 重组 Irisin-Irisin 活性检测结果:与空白对照组比较,重组 Irisin-Irisin 组和 Irisin 组处理 C2C12 细胞均能上调 UCP-1 的表达($P < 0.05$);相较于 Irisin 组,重组 Irisin-Irisin 组诱导 UCP-1 效果更显著($P < 0.05$),活性更强。③ 重组 Irisin-Irisin 抗肿瘤功能检测结果:与空白对照组比较,100 ng/mL Irisin-Irisin 组和 200 ng/mL Irisin-Irisin 组均能抑制胃癌细胞和结直肠癌细胞的迁移能力($P < 0.05$),但对其增殖、克隆形成能力无影响;相较于 Irisin 组,重组 Irisin-Irisin 组抑制细胞迁移的效果更显著($P < 0.05$)。**结论:**大肠杆菌原核系统表达的重组 Irisin-Irisin 有活性,且活性优于单体 Irisin;重组 Irisin-Irisin 对胃癌细胞、结直肠癌细胞迁移有影响,且效果优于单体 Irisin。

关键词 重组 Irisin-Irisin; 运动相关肌因子; 原核表达; 生物学功能

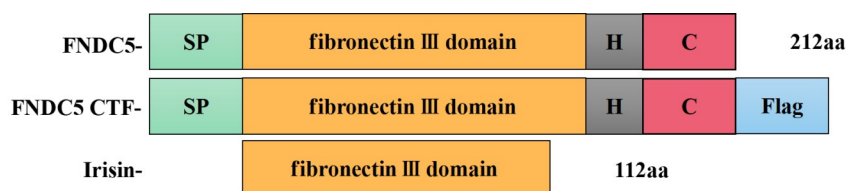
Irisin 是 Spiegelman 实验室于 2012 年发现的一种运动诱导的肌因子^[1],由含 III 型纤连蛋白域蛋白 5 (fibronectin type III domain-containing protein 5, FNDC5)在过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1-α (peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 alpha, PGC-1α)作用下被蛋白酶水解产生^[2],其前体 FNDC5 由 209 个氨基酸组成,从 N 端

到 C 端分别是信号肽、含 III 型纤连蛋白结构域、疏水结构域和 C 末端结构域^[3](蛋白结构见图 1)。Irisin 是含 112 个氨基酸、相对分子质量为 2.2×10^4 的糖基化蛋白,有 2 个糖基化位点,脱糖后相对分子质量约 1.5×10^4 ^[4]。Irisin 在人体中广泛分布,真核生物中几乎所有器官和组织都有表达^[5]。

引用格式:刘凤英,黄义德,林佳,等.人工合成二聚体运动相关肌因子 Irisin-Irisin 的表达与功能[J].康复学报,2023,33(1):32-41.

LIU F Y, HUANG Y D, LIN J, et al. Expression and function of synthetic dimeric exercise-induced cytokine Irisin-Irisin [J]. Rehabil Med, 2023, 33(1): 32-41.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.01005



注:C为结构域;H为疏水结构域;SP为信号肽。

Note: C is C-terminal domain; H is hydrophobic domain; SP is signal peptide.

图1 Irisin 蛋白结构示意图

Figure 1 Protein structure diagram of Irisin

Irisin 在调节能量代谢、改善认知功能和胰岛素抵抗、调节骨代谢以及抗癌方面发挥功能^[6]。Irisin 能将白色脂肪转变为棕色脂肪,促进机体能量代谢^[7-8],也能通过改善老年痴呆模型大鼠的突触可塑性和记忆障碍来提高认知功能^[9-12],还能改善2型糖尿病的胰岛素抵抗水平促进糖尿病患者的恢复^[13-15]。此外,有报道发现 Irisin 能通过 αV 类整合素受体促进骨骼重塑以调节骨代谢^[16]。除了上述功能,Irisin 在肿瘤中的作用也常被报道。NOWINSKA 等^[17]用不同浓度 Irisin 处理人肺癌细胞,发现 Irisin 对肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭均有明显的抑制作用,且呈时间相关性。SHAO 等^[18]推测 Irisin 水平与乳腺癌的发生密切相关,是乳腺癌的独立预测因子。SHI 等^[19]探讨 Irisin 通过 PI3K-AKT 途径抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖迁移能力。也有1项研究通过病例对照研究发现,胃癌患者血清中 Irisin 水平低于健康人群,推测 Irisin 可以作为胃癌早期诊断的血清标志物^[20]。LIU 等^[21]在胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 中发现 Irisin 可以抑制该细胞的增殖迁移等功能,但具体机制不清。虽然研究 Irisin 对肿瘤功能影响的工作越来越多,但 Irisin 干预肿瘤的机制尚无定论,腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Mammalian target of rapamycin, mTOR) 被报道是介导 Irisin 干预肿瘤功能的下游信号通路之一^[22]。

虽然已知 Irisin 是通过二聚体的形式发挥作用,但目前研究都集中在纯化单体 Irisin 的功能,一个稳定的二聚体 Irisin-Irisin 是否比单体 Irisin 的活性更高,未见相关研究。因此,本研究设计2个串联的重组 Irisin-Irisin 以模拟二聚体的形式,探究重组 Irisin-Irisin 融合蛋白的活性及其在消化道肿瘤中的生物学功能是否优于单体 Irisin。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 本实验室涉及的 AGS 胃癌细胞 (ATCC, CRL-1739)、DLD-1 结直肠癌细胞 (ATCC, CCL-221) 及 C2C12 骨骼肌细胞 (ATCC, CRL-1772) 均购自 ATCC, 细胞接种至 T₂₅ 培养瓶中培养,肿瘤细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,C2C12 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。

1.1.2 主要实验试剂 DMEM 高糖培养基、RPMI-1640 培养基 (BI, XP2069); 胰蛋白酶 (Sigma, T4049); RIPA 蛋白裂解液 (Boster, AR0102-100); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (雅酶, PG213); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo, 23227); 胎牛血清 (Sigma, F8318); CCK-8 试剂盒 (Sangon, E606335); 结晶紫染色液 (Beyotime, C0121); Anti-His antibody (Proteintech, 66005-1-Ig); Anti-UCP-1 antibody (Sigma, U6382); GAPDH 蛋白抗体 (Proteintech, 60004-1-Ig); Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (ImmunoResearch, 115-001-003); Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (ImmunoResearch, 111-001-003); 超敏 ECL 化学发光即用型底物 (Boster, AR1172); 无血清细胞冻存液 (新赛美, C40100); Irisin (Enzo, ADI-908-307-0010)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养 表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3)、表达载体 pET-30a 为本实验室保存。将 BL21 (DE3) 接种至 LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 摇床培养过夜。

1.2.2 重组表达载体及菌株构建 Irisin [Genbank: NM_153756.3 (260~595 bp)] 通过密码子分析软件 EMBOSS 优化后,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将目的基因 Irisin-Irisin 构建至 pET-30a 质粒中(具体质粒图谱如图2),并转化至 BL21 (DE3) 大肠杆菌表达菌株,测序验证序列正确后,命名为 BL21 (DE3)-Irisin-Irisin,于-80 °C 保存。

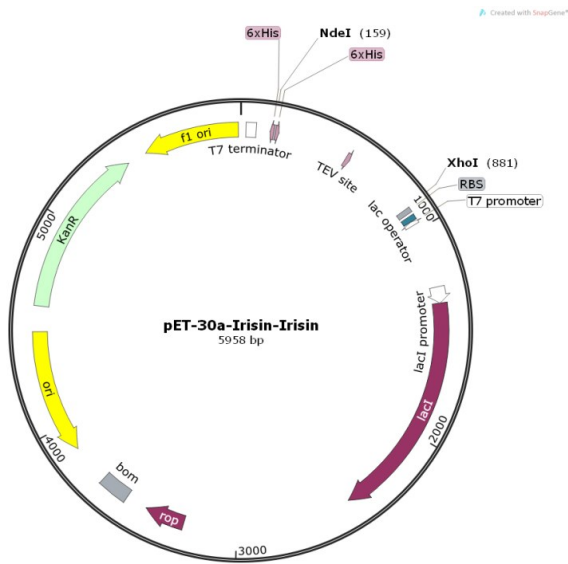


图2 pET-30a-Irisin-Irisin质粒图谱

Figure 2 Plasmid profile of pET-30a-Irisin-Irisin

1.2.3 重组 Irisin-Irisin 的表达和纯化

1.2.3.1 大肠杆菌中表达重组 Irisin-Irisin 挑取 BL21(DE3)-Irisin-Irisin 单克隆于 10 mL 含卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床过夜。按照 1% 的接种量, 将过夜培养的菌液接种到 1 L 含卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB 液体培养基中, 220 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇至菌液 $\text{OD}_{600} = 0.6$ 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D 硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导 4 h, 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 收集菌体。

1.2.3.2 包涵体溶解 菌体加入 Lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% (V/V) TritonX-100) 重悬, 超声波细胞破碎仪 (JY92-IIN, Scientz) 裂菌, 工作 5 s, 休息 5 s, 55 W 功率破碎 30 min, 菌液于 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 后弃上清, 沉淀加入包涵体洗涤液 [50 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、0.5 (V/V) TritonX-100、8 mol/L Urea、5 mmol/L DTT] 重悬, 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 收集上清。

1.2.3.3 镍柱亲和纯化 AKTA 蛋白纯化仪 (AKTA prime plus, GE) 纯化重组 Irisin-Irisin。Binding Buffer (50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、8 mmol/L Urea) 平衡镍柱后将蛋白挂柱, 收集柱后上清液。分别用含 8、6、4、2、0 mol/L Urea 平衡液在镍柱上梯度复性, 每个梯度结束后暂停 1 h, 用洗脱液 (50 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L 咪唑、500 mmol/L

NaCl) 洗脱蛋白, 收集洗脱峰。将纯化所得的溶液过 Sepharose G 50 分子筛以去除其中的咪唑并将 Tris-HCl 缓冲液更换为 PBS 缓冲液。

1.2.4 重组 Irisin-Irisin 的鉴定与浓度检测 样品经 10% SDS-PAGE 电泳, 电泳后将胶转至 NC 膜, 置于冰上 300 mA 转膜 1 h。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, Anti-His-antibody 一抗室温孵育 2.5 h, 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 室温孵育 1 h 后用 1 \times TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 ECL 化学发光底物在 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。

蛋白样品用 BCA 法检测浓度, 具体方法参考 BCA 试剂盒说明书。经纯化和分子筛的重组 Irisin-Irisin 的蛋白浓度为 0.214 mg/mL。

1.2.5 重组 Irisin-Irisin 活性检测 C2C12 骨骼肌细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基贴壁培养, 按 3×10^5 个/mL 密度接种至 6 孔板, 待细胞长至 70% 左右, 重组 Irisin-Irisin 组用重组 Irisin-Irisin 处理 2 d, Irisin 组用单体 Irisin 处理 2 d, 另设 1 个空白对照组, Western blot 法检测 UCP-1 蛋白表达量来验证重组 Irisin-Irisin 的生物活性。

1.2.6 重组 Irisin-Irisin 肿瘤功能检测 用重组 Irisin-Irisin 处理 AGS 胃癌细胞、DLD-1 结直肠癌细胞, 检测重组 Irisin-Irisin 在不同肿瘤细胞的功能。

1.2.6.1 细胞增殖实验 待细胞长满后按照 4×10^3 个/mL 密度接种至 96 孔板做 CCK8 细胞增殖实验, 设置空白对照组、100 ng/mL Irisin-Irisin 组和 200 ng/mL Irisin-Irisin 组, 每组设置 6 个复孔, 另外, 设置 0、24、48、72 h 4 块板, 检测不同时间段细胞增殖能力。

1.2.6.2 细胞迁移划痕实验 细胞长满时, 按照 1×10^6 个/mL 接种至 6 孔板做划痕实验检测细胞迁移能力, 组别设置与增殖实验一致, 每组 3 个复孔, 在细胞长至 80% 密度时用 10 μL 的枪头划痕, 空白对照组换成无血清培养基继续培养 48 h, 其余 2 组分别换成含有 100、200 ng/mL 重组 Irisin-Irisin 的无血清培养基继续培养, 按时拍摄细胞迁移图片, 采用 Image J 计算迁移面积。

1.2.6.3 克隆形成实验 细胞长至 80% 密度时按 10^3 个/mL 接种至 6 孔板, 组别设置如前所述, 每组设置 3 个复孔, 在观察到明显集落形成时, 吸弃旧液, PBS 清洗 2 遍, 70% 甲醇固定 20 min, PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 200 μL 结晶紫染液室温染色 30 min, 纯水清洗 3 遍, 自然晾干后拍摄图像。

1.3 统计学方法

本研究中涉及图片分析均采用 Image J 软件,数据分析采用 GraphPad Prism 7;实验过程重复至少 3 次,并采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,结果均服从正态分布,数据用($\bar{x} \pm s$)来表示。多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,则采用 LSD-*t* 方法两两比较,若方差不齐,采用 Games-Howell 法两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 Irisin-Irisin 表达、纯化与鉴定

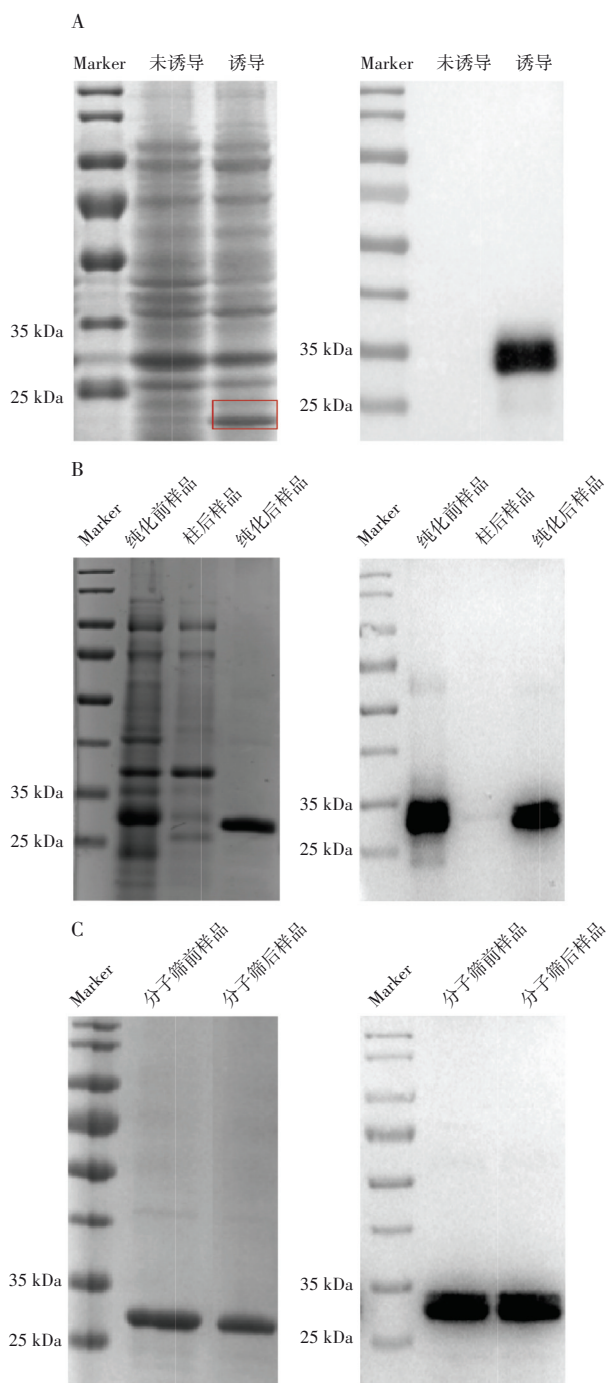
通过构建最终获得 pET-30a-Irisin-Irisin, 质粒图谱如图 2 所示。对重组 Irisin-Irisin 表达和纯化情况进行鉴定,如图 3 所示,与未诱导的样品比较, IPTG 诱导后在 27 kDa 处显现出单一条带,与预期的重组 Irisin-Irisin 大小一致(图 3A)。为进一步验证条带是否正确,采用 Western blot 法进行鉴定。镍柱亲和纯化法纯化重组 Irisin-Irisin, 见图 3B。将所得蛋白过 Sepharose G 50 分子筛脱盐纯化,见图 3C。

2.2 重组 Irisin-Irisin 活性鉴定

采用 Western blot 法鉴定 UCP-1 蛋白表达量,见图 4。与空白对照组比较, Irisin 组和重组 Irisin-Irisin 组均上调 UCP-1 的相对表达量($P < 0.05$),证明大肠杆菌表达的重组 Irisin-Irisin 有活性且活性优于单体 Irisin($P < 0.05$)。

2.3 重组 Irisin-Irisin 抗肿瘤功能检测

用不同浓度的重组 Irisin-Irisin 处理 AGS 胃癌细胞以及 DLD-1 结直肠癌细胞,检测细胞增殖、迁移能力,见图 5。如图 5D、图 5E 所示,重组 Irisin-Irisin 能抑制 DLD-1 结直肠癌细胞的迁移能力($P < 0.05$),但对细胞的增殖(图 5C)和克隆形成(图 5A、图 5B)无影响($P > 0.05$)。如图 6D、图 6E 所示,重组 Irisin-Irisin 可以抑制 AGS 胃癌细胞迁移($P < 0.05$),但对细胞增殖(图 6C)和克隆形成(图 6A、图 6B)无明显影响($P > 0.05$)。为探讨二聚体 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 的区别,用相同浓度的重组 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 处理 AGS 胃癌细胞及 DLD-1 结直肠癌细胞,如图 7 所示,重组 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 均能抑制 AGS 胃癌细胞(图 7A)、DLD-1 结直肠癌细胞(图 7B)细胞迁移能力。



注:A为重组 Irisin-Irisin 表达鉴定;B为重组 Irisin-Irisin 镍柱纯化;C为分子筛脱盐纯化。

Note: A is expression of recombinant Irisin-Irisin; B is purification of recombinant Irisin-Irisin; C is recombinant Irisin-Irisin acrossing the molecular sieve.

图3 重组 Irisin-Irisin 表达与纯化

Future 3 Expression and purification of recombinant Irisin-Irisin

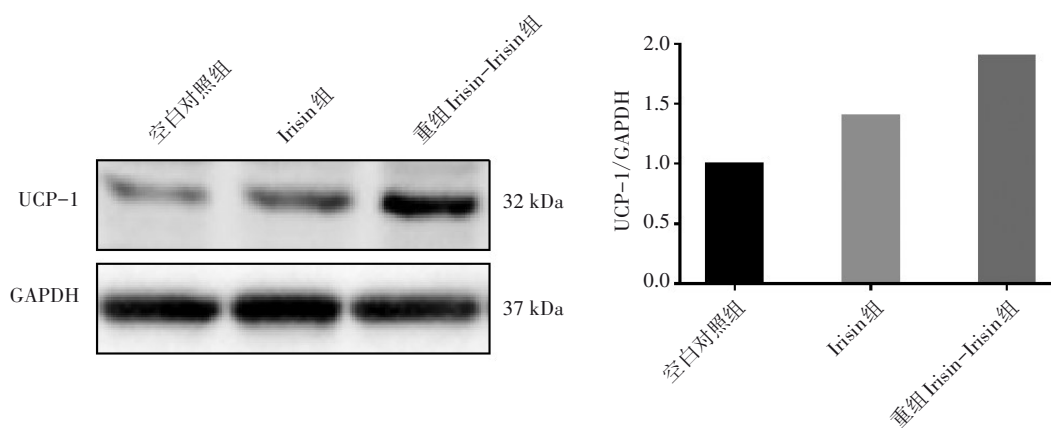


图4 C2C12骨骼肌细胞中UCP-1蛋白表达

Figure 4 Relative expression level of UCP-1 in C2C12 skeletal muscle cells

3 讨论

随着饮食习惯的改变,肥胖及代谢性疾病的发生越来越普遍^[23]。虽然运动被认为是改善肥胖及其并发症的有效方法,但是仍然有些人身体条件不允许或不愿意通过运动改善肥胖。运动模拟是近年来新兴的治疗方式,专注于增强运动本身或模仿体育锻炼的效果。在很大程度上,运动模拟物能预防或者治疗相关疾病^[24]。前期的探索研究发现,Irisin作为一种运动释放的肌肉因子,其在痴呆模型、癌症、心血管疾病等领域都展现出有益作用^[25]。因此,研究重组Irisin的表达及其生物学功能具有重要意义。

3.1 重组Irisin的表达和纯化

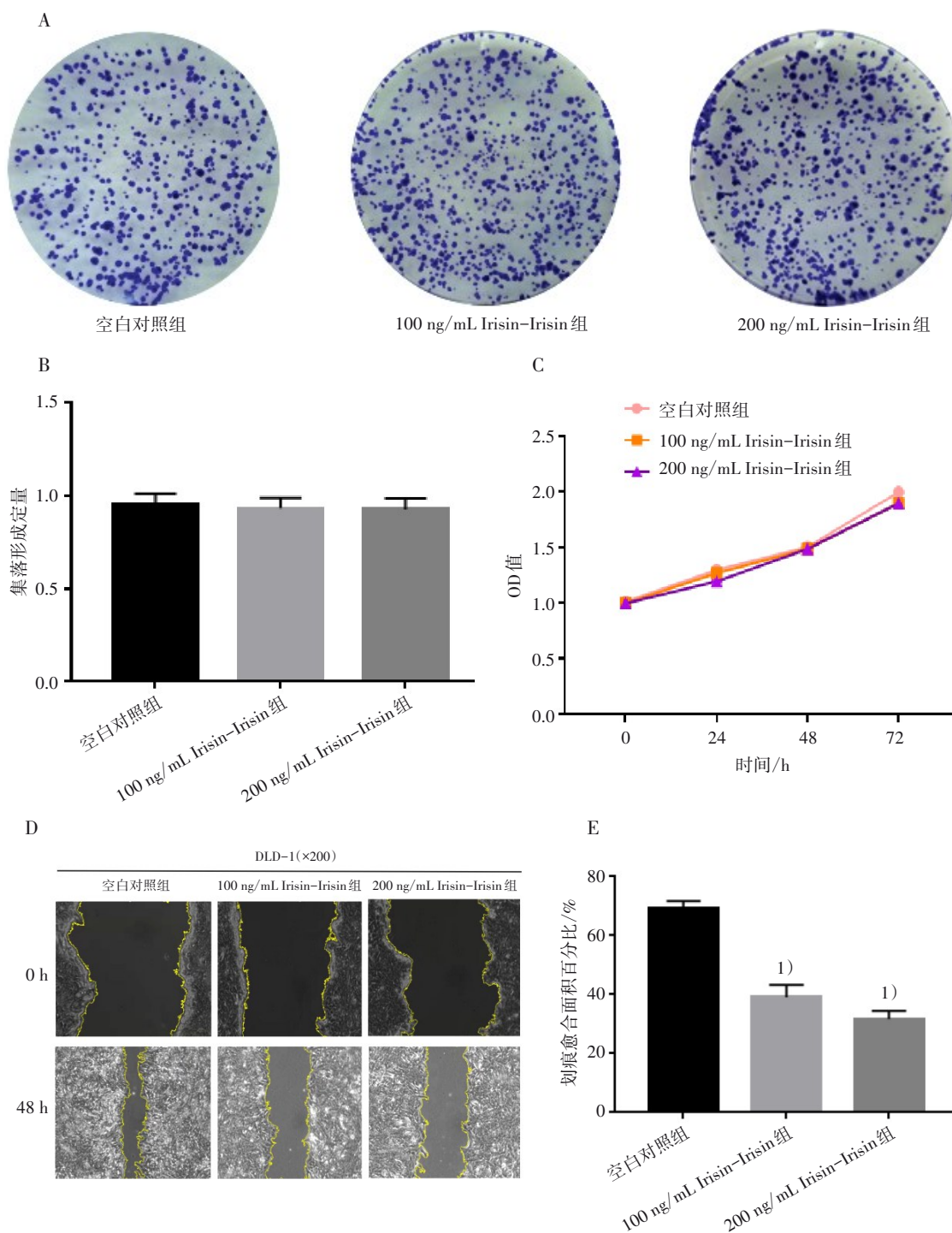
目前国内外研究中,对重组Irisin的表达研究相对较少,有学者在大肠杆菌中表达了重组Irisin,利用镍柱亲和纯化的方法得到了12.5 kDa的Irisin^[26]。刘佳玉^[27]在毕赤酵母和大肠杆菌中表达重组Irisin,讨论不同表达系统表达的Irisin对胰腺癌的功能差异。何赛等^[28]在大肠杆菌中表达重组Irisin,纯化后得到大小为14 kDa的蛋白。以上研究着重关注了单体Irisin的表达与生物学功能,而二聚体Irisin-Irisin的重组表达及功能鉴定尚未研究。因此,本研究想探讨二聚体Irisin-Irisin的表达及比较其与单体Irisin的功能差异。考虑到大肠杆菌遗传背景较为清楚,基因工程操作手段完善,代谢途径和基因表达调控机制比较清楚,外源基因产物表达量高等,故本研究采用大肠杆菌原核表达系统,表达可溶性蛋白

重组Irisin-Irisin,获取了高纯度重组Irisin-Irisin^[29]。

3.2 重组Irisin-Irisin的活性检测

在重组Irisin蛋白活性检测上,目前应用最多的方法是Irisin能够诱导白色脂肪转为棕色脂肪,检测与棕色脂肪产热相关的基因如UCP-1、PGC-1 α 的蛋白表达量。最初有学者用大肠杆菌自表达Irisin处理3T3-L1前脂肪细胞,3T3-L1前脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞,油红O染色检测脂滴的数量验证诱导效果,采用Western blot法验证重组Irisin上调UCP-1、PGC-1 α 的表达水平^[26]。刘佳玉^[27]用大肠杆菌和毕赤酵母表达的2种Irisin处理胰腺癌细胞,检测Irisin对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭、集落形成能力的影响,验证重组Irisin抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移能力来验证重组蛋白的活性和生物学功能。何赛等^[28]将自表达的Irisin处理C2C12骨骼肌细胞,从mRNA水平上检测UCP-1基因表达水平。

Irisin最初是在骨骼肌中发现的,是参与能量稳态和代谢调节的多肽激素^[30]。研究表明,Irisin水平升高和胰岛素抵抗风险降低相关,Irisin可通过增强PGC-1 α 的表达,进而加速骨骼肌的能量消耗和氧化代谢水平;线粒体功能障碍可能会导致骨骼肌胰岛素抵抗,从而引起代谢紊乱^[31]。以往的研究显示Irisin能改善线粒体功能,而本研究用重组Irisin-Irisin及商品化单体Irisin处理C2C12骨骼肌细胞,发现这2种Irisin均能诱导UCP-1的相对表达量,且重组Irisin-Irisin诱导效果优于单体Irisin,这也证实了Irisin是以二聚体的形式来发挥功能的特点。

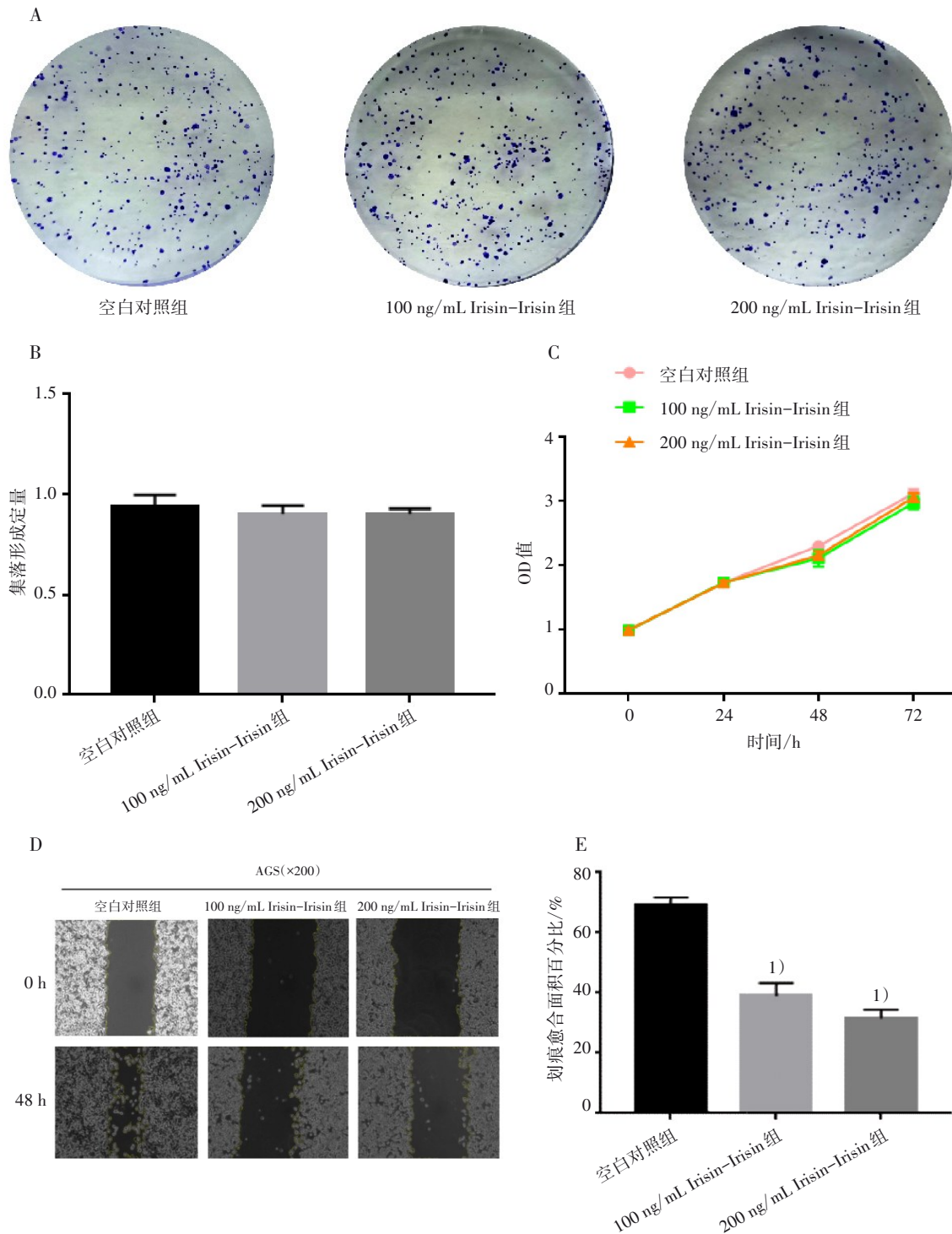


注:A为集落形成实验;B为集落形成定量;C为CCK-8增殖实验;D为划痕实验;E为划痕实验定量。

Note: A is colony formation assay; B is quantification of colony formation efficiency; C is CCK-8 proliferation experiment; D is wound healing assay; E is quantification of wound healing assay.

图5 重组 Irisin-Irisin 对 DLD-1 结直肠癌细胞功能的影响(×200)

Figure 5 Effect of recombinant Irisin-Irisin on function of DLD-1 colorectal cancer cells (×200)

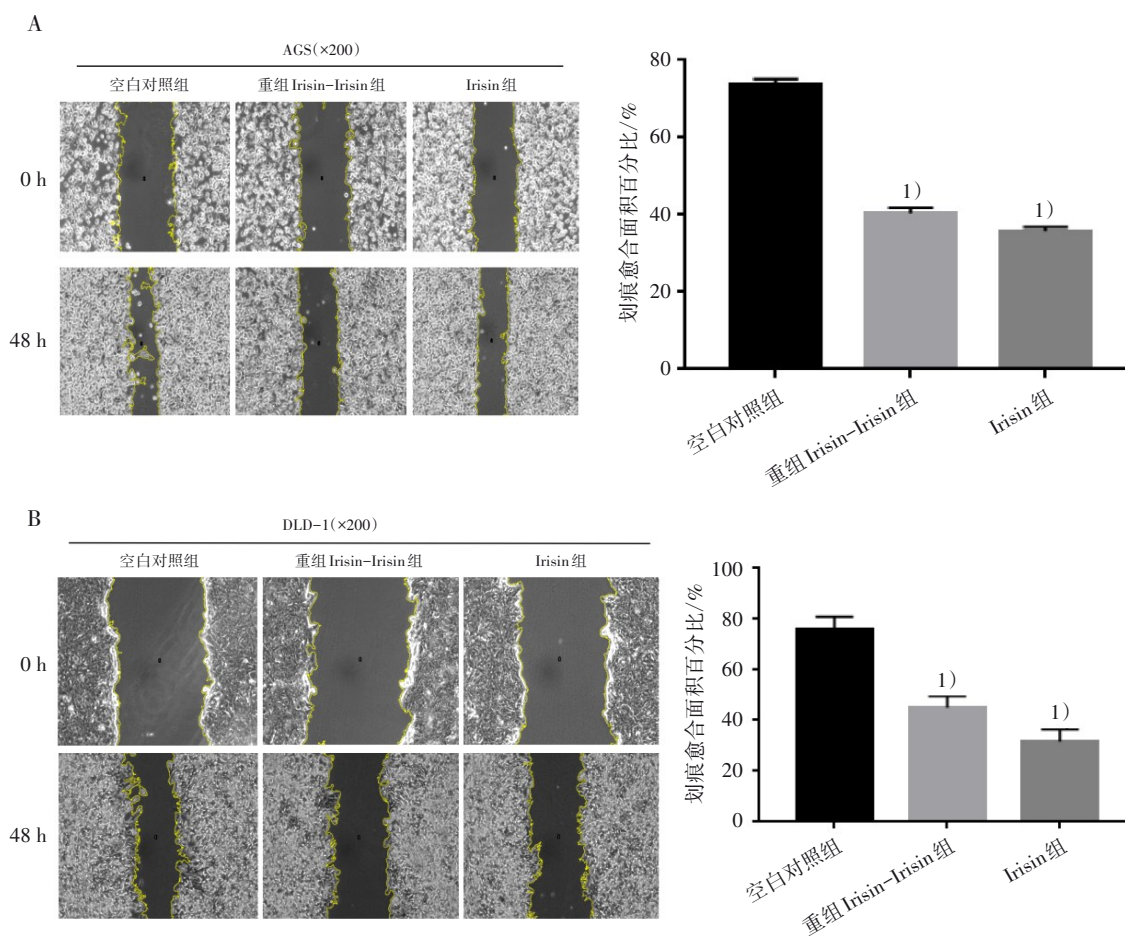


注:A为集落形成实验;B为集落形成定量;C为CCK-8增殖实验;D为划痕实验;E为划痕实验定量。

Note: A is colony formation assay; B is quantification of colony formation efficiency; C is CCK-8 proliferation experiment; D is wound healing assay; E is quantification of wound healing assay.

图6 重组 Irisin-Irisin 对 AGS 胃癌细胞功能的影响($\times 200$)

Figure 6 Effect of recombinant Irisin-Irisin on function of AGS gastric cancer cells ($\times 200$)



注:A为AGS胃癌细胞划痕实验;B为DLD-1结直肠癌细胞划痕实验。

Note: A is wound healing assay in AGS cells; B is wound healing assay in DLD-1 cells.

图7 不同Irisin对AGS胃癌细胞和DLD-1结直肠癌细胞迁移能力的影响(×200)

Figure 7 Effects of different Irisin on migration ability of AGS gastric cancer cells and DLD-1 colorectal cancer cells (×200)

3.3 重组 Irisin-Irisin 在肿瘤细胞中的功能

自 Irisin 报道以来,研究者对其功能的探索逐渐展开。研究发现 Irisin 在不同的肿瘤细胞中发挥不同的功能。SHAO 等^[18]发现低剂量的 Irisin (20 nmol/L)能抑制 NCI-H446 及 A549 肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭及克隆形成的能力。20 nmol/L 的 Irisin 处理 MDA-MB-231 乳腺癌细胞能有效抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移能力^[21]。刘佳玉^[27]用不同浓度 Irisin 处理 MIA PaCa-2 及 Panc03.27 胰腺癌细胞,发现 Irisin 通过 PI3R/AKT 信号通路抑制胰腺癌细胞的增殖侵袭能力。本研究将重组 Irisin-Irisin 和商品化单体 Irisin 处理 DLD-1 结直肠癌细胞及 AGS 胃癌细胞,探讨重组 Irisin-Irisin 对这 2 种细胞的增殖、迁移、集落形成等功能的影响及比较重组 Irisin-Irisin 和单体 Irisin 在细胞功能上的区别。本研究不足之处在于没有探讨重组 Irisin-Irisin 及

单体 Irisin 在其他肿瘤细胞的功能以及缺乏对机制的研究。

4 结论

本研究在大肠杆菌原核表达系统里面表达了可溶性重组 Irisin-Irisin 蛋白,通过镍柱纯化及分子筛脱盐处理,得到了分子量 27 kDa 的目的蛋白,重组 Irisin-Irisin 处理 C2C12 骨骼肌细胞 2 d 后能上调 UCP-1 蛋白表达,证明了重组 Irisin-Irisin 有活性,且重组 Irisin-Irisin 活性高于 Irisin。重组 Irisin-Irisin 处理 AGS 胃癌细胞以及 DLD-1 结直肠癌细胞,发现其能抑制 AGS 胃癌细胞、DLD-1 结直肠癌细胞的迁移能力,但对细胞的增殖无影响。此外,相较于 Irisin,重组 Irisin-Irisin 抑制细胞迁移的效果更好,但重组 Irisin-Irisin/单体 Irisin 促进结直肠癌、胃癌康复的机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] BOSTRÖM P, WU J, JEDRYCHOWSKI M P, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.
- [2] MAAK S, NORHEIM F, DREVONC A, et al. Progress and challenges in the biology of FNDC5 and Irisin [J]. *Endocr Rev*, 2021, 42(4): 436-456.
- [3] PERAKAKIS N, TRIANTAFYLLOUG A, FERNÁNDEZ-REAL J M, et al. Physiology and role of Irisin in glucose homeostasis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(6): 324-337.
- [4] ZHANG D G, TAN X Y, TANG N, et al. Review of research on the role of Irisin in tumors [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4423-4430.
- [5] PEDERSEN K, FEBBRAIO A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(8): 457-465.
- [6] KORNEIL A, DEN HARTOGHD J, KLENTROU P, et al. Role of the myokine Irisin on bone homeostasis: review of the current evidence [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9136.
- [7] CHEN Y, DING J, ZHAO Y F, et al. Irisin induces white adipose tissue browning in mice as assessed by magnetic resonance imaging [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(14): 1597-1606.
- [8] COLAIANNI G, CINTI S, COLUCCI S, et al. Irisin and musculo-skeletal health [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1402(1): 5-9.
- [9] ISLAM R, VALARIS S, YOUNG M F, et al. Exercise hormone Irisin is a critical regulator of cognitive function [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(8): 1058-1070.
- [10] LOURENCO V, FROZZAR L, DE FREITAS B, et al. Exercise-linked FNDC5/Irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models [J]. *Nat Med*, 2019, 25(1): 165-175.
- [11] PIGNATARO P, DICARLO M, ZERLOTIN R, et al. FNDC5/Irisin system in neuroinflammation and neurodegenerative diseases: update and novel perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1605.
- [12] YOUNG M F, VALARIS S, WRANN C D. A role for FNDC5/Irisin in the beneficial effects of exercise on the brain and in neurodegenerative diseases [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2019, 62(2): 172-178.
- [13] LIN C, GUO Y Z, XIA Y L, et al. FNDC5/Irisin attenuates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes mouse model by activation of integrin $\alpha V/\beta 5$ -AKT signaling and reduction of oxidative/nitrosative stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 160: 27-41.
- [14] OGURI Y, SHINODA K, KIM H, et al. CD81 controls beige fat progenitor cell growth and energy balance via FAK signaling [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 563-577. e20.
- [15] ZHANG Y, LI R, MENG Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling [J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 514-525.
- [16] KIM H, WRANN C D, JEDRYCHOWSKI M, et al. Irisin mediates effects on bone and fat via αV integrin receptors [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1756-1768. e17.
- [17] NOWINSKA K, JABLONSKA K, PAWELCZYK K, et al. Expression of Irisin/FNDC5 in cancer cells and stromal fibroblasts of non-small cell lung cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1538.
- [18] SHAO L, LI H J, CHEN J, et al. Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(3): 598-605.
- [19] SHI G J, TANG N, QIU J T, et al. Irisin stimulates cell proliferation and invasion by targeting the PI3K/AKT pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 585-591.
- [20] AYDIN S, KULOGLU T, OZERCANM R, et al. Irisin immunohistochemistry in gastrointestinal system cancers [J]. *Biotech Histochem*, 2016, 91(4): 242-250.
- [21] LIU J Y, SONG N N, HUANG Y B, et al. Irisin inhibits pancreatic cancer cell growth via the AMPK-mTOR pathway [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15247.
- [22] LI R L, WU S S, WU Y, et al. Irisin alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inducing protective autophagy via mTOR-independent activation of the AMPK-ULK1 pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 242-255.
- [23] ZECHNER R, ZIMMERMANN R, EICHMANNT O, et al. FAT SIGNALS: lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(3): 279-291.
- [24] GUBERT C, HANNANAJ. Exercise mimetics: harnessing the therapeutic effects of physical activity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11): 862-879.
- [25] CHEN K, XU Z C, LIU Y K, et al. Irisin protects mitochondria function during pulmonary ischemia/reperfusion injury [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(418): eaa06298.
- [26] PANATI K, NARALAV R, NARASIMHAV R, et al. Expression, purification and biological characterisation of recombinant human Irisin (12.5 kDa) [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2018, 16(2): 459-466.
- [27] 刘佳玉. 重组Irisin在毕赤酵母中的表达及其对人胰腺导管癌抗癌活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019: 13-25.
- [28] LIU J Y. Expression of recombinant Irisin in *Pichia pastoris* and its anticancer activity against human pancreatic ductal carcinoma [D]. Changchun: Jilin University, 2019: 13-25.
- [29] 何赛, 李洁, 郁建锋, 等. 人Irisin基因的克隆、原核表达及重组蛋白的纯化[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10): 1522-1528.
- [30] HE S, LI J, YU J F, et al. Cloning, prokaryotic expression of human (*Homo sapiens*) Irisin gene and purification of recombinant-protein [J]. *J Agric Biotechnol*, 2016, 24(10): 1522-1528.
- [31] 刘丽琴, 陈婷婷, 李少伟, 等. 大肠杆菌表达系统在基因工程疫苗研发中的应用与策略优化[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(21): 2434-2442.
- [32] LIU L Q, CHEN T T, LI S W, et al. *Escherichia coli* expression system applied in the development of recombinant human vaccines and its potential improvement [J]. *Chin J New Drugs*, 2020, 29(21): 2434-2442.
- [33] ESTELLE G, LEP T, VEGTING Y, et al. Irisin directly stimulates osteoclastogenesis and bone resorption *in vitro* and *in vivo* [J]. *eLife*, 2020, 9: e58172.
- [34] PARKS E, PARKC Y, SWEENEY G. Biomarkers of insulin sensitivity and Insulin resistance: past, present and future [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(4): 180-190.

Expression and Function of Synthetic Dimeric Exercise-Induced Cytokine Irisin-Irisin

LIU Fengying¹, HUANG Yide², LIN Jia³, CHEN Xuequn⁴, WANG Qingshui⁴, LIN Yao^{4*}

¹ College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China;

³ Rehabilitation Industry Research Institute, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

⁴ Science and Technology Innovation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: LIN Yao, E-mail: yaolin@fjtc.edu.cn

ABSTRACT Objective: Studies have shown that the exercise-induced cytokine Irisin functions were as a dimer, so tandem Irisin-Irisin mock dimers were designed to explore the similarities and differences between recombinant Irisin-Irisin expressed by *Escherichia coli* and commercial Irisin in activity and function on tumor cells. **Methods:** *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and pET-30a expression vectors were selected to obtain recombinant Irisin-Irisin by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. High purity recombinant Irisin-Irisin was obtained by Ni Sepharose excel. C2C12 skeletal muscle cells were treated with recombinant Irisin-Irisin and monomeric Irisin respectively, and the expressions of mitochondrial related gene UCP-1 were observed to test the activity. The functions were verified in gastric cancer, colorectal cancer and other gastrointestinal tumors, and the activity and function of recombinant Irisin-Irisin and monomeric Irisin on tumor cells were compared. **Results:** (1) Expression and purification of recombinant Irisin-Irisin: compared with the non-induced samples, the recombinant Irisin-Irisin was significantly expressed after IPTG induction; high purity recombinant Irisin-Irisin with a molecular weight of about 27 kDa was obtained by Ni Sepharose excel. (2) Detection of recombinant Irisin-Irisin activity: compared with the blank control group, both the recombinant Irisin-Irisin group and the Irisin group could up-regulate the expression of UCP-1 in C2C12 cells ($P<0.05$); compared with the Irisin group, the recombinant Irisin-Irisin group had a more significant effect and stronger activity in inducing UCP-1 ($P<0.05$). (3) Recombinant Irisin-Irisin on tumor function: compared with the blank control group, both the 100 ng/mL and 200 ng/mL Irisin-Irisin groups could inhibit the migration of gastric cancer cells and colorectal cancer cells ($P<0.05$), but had no effect on their proliferation and clone formation; compared with the Irisin group, the recombinant Irisin-Irisin group had a more significant effect on cell migration inhibition ($P<0.05$). **Conclusion:** The recombinant Irisin-Irisin expressed by *Escherichia coli* has activity, and the activity is higher than that of the monomeric Irisin; recombinant Irisin-Irisin has an effect on the migration of gastric cancer cells and colorectal cancer cells, and the effect was better than that of the monomeric Irisin.

KEY WORDS recombinant Irisin-Irisin; exercise-induced cytokine; prokaryotic expression; biological function

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.01005

(上接第 31 页)

Study of Brain Default Network Changes in Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment Based on rs-fMRI

HU Saiqin¹, ZHAO Xu², LI Yaxue², JI Yahong², CAO Danna², LI Sha¹, LU Jing¹, ZHANG Yi¹, WANG Feng^{2*}

¹ Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China;

² The First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China

*Correspondence: WANG Feng, E-mail: wfmzy123@163.com

ABSTRACT Objective: To explore the altered functional connectivity (FC) within default mode network (DMN) in patients with amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and its relationship with cognitive function. **Methods:** According to the inclusion criteria and the exclusion criteria, resting-state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) was performed on 40 untreated aMCI patients (aMCI group) and 40 volunteers (control group) with normal cognitive function. Factors including gender, age, and education level were matched between the control group and the aMCI group. The DMN of both groups of subjects was extracted by independent component analysis (ICA). The FC differences within DMN between two groups were compared with SPM 12 software. Pearson correlation or Spearman correlation analyses were used to test the zFC values of differential brain regions and neuropsychological scores in the aMCI group. **Results:** Compared with the control group, the FC enhanced brain regions in the aMCI group were located in the right parahippocampal gyrus, left insula, left posterior cingulate gyrus, left cuneus, right opercular part of inferior frontal gyrus, left superior margin gyrus, left precuneus and right precentral gyrus; the FC reduced brain regions were located in the left middle frontal gyrus, right superior margin gyrus, right anterior cingulate gyrus, right angular gyrus and right middle temporal gyrus. The correlation analysis showed that the zFC values in left middle frontal gyrus ($r=0.439$, $P=0.005$), right middle temporal gyrus ($r=0.422$, $P=0.007$), right parahippocampal gyrus ($r=0.468$, $P=0.002$) and left precuneus ($r=0.482$, $P=0.002$) were positively correlated with MMSE score, and the zFC value in right anterior cingulate gyrus was positively correlated with AVLT-delayed recall score ($r=0.362$, $P=0.022$) and DST-forward score ($r=0.503$, $P=0.001$), while the zFC value in right precentral gyrus was negatively correlated with TMT-B score ($r=-0.450$, $P=0.004$). **Conclusion:** The abnormal FC within DMN in patients with aMCI are associated with cognitive defects in memory, attention, executive function and audio-visual function. It is speculated that FC changes within DMN may be an imaging biomarker for early recognition and diagnosis of AD.

KEY WORDS amnesic mild cognitive impairment; resting state functional magnetic resonance imaging; default mode network; functional connectivity; independent component analysis

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.01004