

• 医药生物技术 •

人丙氨酸氨基转移酶同工酶在人体组织中的分布

舒小琴, 胡小梅, 郑健, 李杰, 张娟

重庆市中医院, 重庆 400000

舒小琴, 胡小梅, 郑健, 等. 人丙氨酸氨基转移酶同工酶在人体组织中的分布. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2424-2434.

Shu XQ, Hu XM, Zheng J, et al. Study on the distribution of human alanine aminotransferase isoenzyme in human tissues. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2424-2434.

摘要: 文中拟通过采用基因重组技术获得 ALT1 和 ALT2 同工酶重组蛋白, 分别制备筛选出高特异性、高活性的 ALT1 和 ALT2 单克隆抗体 (ALT1 单克隆抗体已成功制备并发表), 初步探讨 ALT1 和 ALT2 同工酶在人体组织中的定位、分布及表达情况。采用 RT-PCR 方法从人肝癌细胞 (HepG2) 中扩增 ALT2 基因, 将成熟的 ALT2 基因亚克隆至 pET32a-ALT2 原核表达载体中, 并将其连接产物转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中经 IPTG 诱导表达 ALT2 蛋白, 镍柱 (Ni²⁺) 亲和层析法纯化 ALT2 重组蛋白。ALT2 重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 选取阳性血清小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合, 间接 ELISA 法挑选阳性细胞株, 有限稀释法进行亚克隆, 采用亲和层析柱法纯化 ALT2 抗体。通过 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 ALT1 和 ALT2 在人体正常组织中的表达和分布, 研究结果显示组织中的 ALT 同工酶基因在 mRNA 水平和蛋白水平上的表达几乎一致。ALT1 在肝脏、肾脏、骨骼肌高表达, 胃肠道平滑肌中等表达; ALT2 在脂肪、骨骼肌、心肌中高表达, 胃肠道平滑肌低表达。免疫组化研究表明, ALT1 在肝细胞、肾髓质小管和肌纤维中高表达, ALT2 在脂肪细胞、心肌细胞中高表达, 胃肠道组织 ALT1 和 ALT2 主要表达于肠壁上部区域黏膜, 上述结果显示同工酶 ALT1 和 ALT2 在组织中分布广泛, 为理解不同病理条件下 ALT 活性升高的变化机制提供理论依据。

关键词: 丙氨酸氨基转移酶同工酶, 丙氨酸氨基转移酶同工酶 1, 丙氨酸氨基转移酶同工酶 2, 蛋白表达, 单克隆抗体

Study on the distribution of human alanine aminotransferase isoenzyme in human tissues

Xiaoqin Shu, Xiaomei Hu, Jian Zheng, Jie Li, and Juan Zhang

Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400000, China

Abstract: This study intends to obtain recombinant proteins of ALT1 and ALT2 isozymes by using genetic recombination technology. Monoclonal antibodies ALT1 and ALT2 with high specificity and high activity were prepared and screened

Received: March 19, 2020; **Accepted:** June 18, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81101318).

Corresponding author: Juan Zhang. Tel: +86-23-67934618; E-mail: 6484605688@qq.com

国家自然科学基金 (No. 81101318) 资助。

网络出版时间: 2020-07-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200717.1359.001.html>

(ALT1 monoclonal antibody has been successfully prepared and published). The localization, distribution and expression of ALT1 and ALT2 isozymes in human tissues were discussed. The ALT2 genes were amplified from human liver cancer cell (HepG2) by RT-PCR method. The mature ALT2 gene was subcloned into the pET32a-ALT2 prokaryotic expression vector. Its ligation product was transformed into BL21(DE3) competent cells, and transformed into competent cells to express ALT2 proteins induced by IPTG. The recombinant proteins of ALT2 were purified by nickel column (Ni^{2+}) affinity chromatography. Balb/c mice were immunized with recombinant proteins of ALT2. Positive serum mouse spleen cells and myeloma cells SP2/0 were selected for cell fusion. The positive cell lines were selected by indirect ELISA and subcloned by limited dilution method. Affinity chromatography was used to purify ALT2 antibodies. The expression and distribution of ALT2 in human normal tissues were detected by RT-PCR and Western blotting. Results show that the expression of ALT isoenzyme in tissues was almost the same at gene mRNA level and protein level. ALT1 is highly expressed in liver, kidney and skeletal muscle, and moderately expressed in gastrointestinal smooth muscle. ALT2 is highly expressed in fat, skeletal muscle and myocardium, and is poorly expressed in gastrointestinal smooth muscle. Immunohistochemical studies show that ALT1 is highly expressed in hepatocytes, renal medullary tubules and muscle fibers, ALT2 is highly expressed in adipocytes and myocardial cells, and ALT1 and ALT2 in gastrointestinal tissues are mainly expressed in mucosa of upper intestinal wall region. The results showed that the isoenzymes ALT1 and ALT2 were mainly expressed in the mucosa of the upper part of the intestinal wall. It is widely distributed in the tissues, providing theoretical basis for understanding the mechanism of ALT activity increase under different pathological conditions.

Keywords: alanine aminotransferase isoenzyme, ALT1, ALT2, protein expression, monoclonal antibody

丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT, 也称谷丙转氨酶, Glutamic pyruvic transaminase, GPT) 是参与人体糖和蛋白代谢重要的酶, 在 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸之间催化可逆性的转氨反应形成丙氨酸和 L-谷氨酸。人 ALT 存在两种同工酶, 分别由不同的基因编码: ALT1 蛋白由 496 个氨基酸组成, 位于染色体 8q24.3^[1]; ALT2 蛋白由 523 个氨基酸组成, 位于染色体 16q12.1, ALT2 基因由于对前导序列的差别剪接, 从而产生了一种含 523 个氨基酸的蛋白产物及另一个含 423 个氨基酸的蛋白产物, 含 423 个氨基酸的剪接突变体命名为 ALT₂₋₂^[2]。近来研究表明 ALT1 和 ALT2 两种同工酶在组织上分布不同, mRNA 水平上人组织中 ALT1 在肾脏中高水平表达, 在肝脏、肌肉和心脏中度表达, 而 ALT2 在脂肪、肌肉、肾脏和脑组织中高水平表达, 在肝脏中度表达^[3-4]。Lindblom 等研究显示在蛋白水平人组织中的 ALT1 主要表达于肝脏、骨骼肌、肾脏, 心肌未检测出; ALT2 主要在心脏和骨骼肌细胞^[4-5], 虽然有一些相关的研究, 但还没有从基因、蛋白水平和组织定位等方面对 ALT 同工酶进行系

统全面的研究。

血清 ALT 的活性升高被认为是肝损伤的灵敏指标, 然而血清 ALT 活性升高也会在非肝损伤时出现, 例如多发性肌炎、肥胖、代谢性疾病以及健康受试者中^[4-8]。反之, 血清 ALT 在部分已确诊为肝损害的患者中并不升高, 如非酒精性脂肪型肝炎、C 型肝炎病毒^[9]。因此, 血清丙氨酸氨基转移酶数据的解释有时在临床诊断中具有挑战性, 并且血清中丙氨酸氨基转移酶活性变化的分子机制尚不明确。一项研究表明在小鼠小肠中 ALT1 表达的水平极高, 而无 ALT2 表达^[10]。类似的一项研究已经观察到, 临床上感染了轮状病毒 (首先侵害小肠) 而无肝损害的病人中血清 ALT 活性经常会升高^[11]。Jadaho 等在构建小鼠脂肪肝模型研究中发现, 小鼠血清 ALT1 表达维持不变, ALT2 基因表达却增加 2 倍, 且 ALT 总活性增加了 30%^[12]。剧烈运动过后检测受试者血清, ALT2 升高水平高于 ALT1^[13], 原因是骨骼肌损伤。一些研究显示 ALT2 是糖尿病的预测因子, 因为在肥胖和胰岛素抵抗者中 ALT2 大量来自脂肪组织^[13-14]。因此, 提示 ALT 同工酶在不同临床条件

下有不同的活性作用, 它们的表达水平可能与多种病理情况有关, 并且 ALT1 和 ALT2 共同影响着 ALT 总的活性。但目前临床上主要是检测血清总的 ALT 活性, 不能区分同工酶 ALT1 和 ALT2, 不能准确判定 ALT 活性升高的来源, 不能判断组织损伤的位置和程度。因此, 本研究拟利用基因重组技术表达 ALT1 和 ALT2 重组蛋白, 制备高特异性 ALT1 和 ALT2 同工酶单克隆抗体, 其中, ALT1 单克隆抗体已制备成功并已发表^[15], 从基因水平和蛋白水平上分析人体组织丙氨酸氨基转移酶的分布和表达, 为临床病理条件下血清丙氨酸氨基转移酶活性升高的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人体组织和动物

人体正常组织肝脏、肾脏、骨骼肌、心脏、胃、结肠、直肠、胰腺等来源于重庆医科大学附属第二院标本库。Balb/c 小鼠购于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 细胞和主要试剂

大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 和人类肝癌 G2 细胞 (HepG2) 由重庆医科大学生命科学院实验室保存。小鼠骨髓瘤细胞 (Sp2/0) 由重庆医科大学附属第一医院表观遗传学实验室提供。ALT1 抗体由本实验室制备, 限制性内切酶 *EcoR* I/*Hind* III、PCR 试剂盒、DNA 回收试剂盒、RNA 提取试剂盒购于 TaKaRa 公司, Ni-NTA 亲和层析凝胶 (Qiagen), 弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂和单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购于 Sigma 公司。

1.3 单克隆抗体制备及纯化

1.3.1 ALT2 cDNA 克隆和质粒构建

使用 TRIzol 试剂从肝癌细胞液中提取总 RNA, 用 RT-PCR 试剂盒将 ALT2 基因 (1 569 bp) 的完整编码序列进行扩增并逆转录为 cDNA, 引物基因序列如下 ALT2 forward 5'-CACCATGCAGCGGGCGGCGGCGCT-3', REVERSE 5'-TCACGC

GTACTTCTCCAGGAAGTTG-3', PCR 产物和 pET32a(+) 质粒分别经过双酶切, 酶切产物纯化后连接, 获得重组表达质粒 pET32a-ALT2。构建的质粒进行测序 (上海嘉根生物科技有限公司), 验证质粒构建是否正确。

1.3.2 ALT2 重组蛋白表达与纯化

将质粒 pET32a-ALT2 转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中, 将增菌培养后的液体培养基于 37 °C 振荡过夜, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 诱导蛋白表达。ALT2 重组蛋白经亲和层析柱进行纯化 (1.5 mL 填料, 载量 8 mg/mL 带 His-tag 蛋白), 目的蛋白上清于咪唑洗脱缓冲液中洗脱, SDS-PAGE 检测。

1.3.3 动物免疫

取 8 只 6-8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 随机分成 4 组, 将目的蛋白按照 25 μg、50 μg、75 μg 和 100 μg 的浓度梯度进行免疫。将目的蛋白与弗氏佐剂等比例乳化皮下多点注射, 共免疫 4 次, 末次免疫后 7 d 用间接 ELISA 法检测小鼠血清 ALT2 抗体效价, 选择效价最高的小鼠脾细胞进行细胞融合。

1.3.4 细胞融合与杂交瘤细胞筛选

将小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1^[16] 的比例充分混合, 在 0.8 mL PEG 作用下融合, 在含 1% HAT 培养基中进行选择性培养, 将阳性杂交瘤细胞株用有限稀释法进行克隆化培养, 稳定分泌 ALT2 抗体的细胞株进行扩大培养。

1.3.5 腹水制备与纯化

将 0.5 mL 杂交瘤细胞 (约 10⁶ 个) 接种于经降植烷 (Sigma) 预处理的 Balb/c 小鼠腹腔中, 7-10 d 后, 小鼠腹部明显膨隆, 采集腹水。用 Protein A 亲和层析法纯化单克隆抗体。用免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒鉴定 ALT2 单克隆抗体的类别及亚型并进行特异性鉴定。在以前的研究中已经报道了细胞融合和抗体制备的详细过程, 并且已经获得了抗 ALT1 的高质量单克隆抗体^[15]。

1.4 RT-PCR 检测

将所有组织分别取 100 mg, Trizol 三步法提取组织 RNA, 反转录试剂盒进行逆转录, 使用 Real-time 试剂盒, 以 cDNA 为模板进行实时荧光 PCR 反应, 检测各个组织中 ALT1 和 ALT2 基因的相对表达量。

1.5 Western blotting 检测

将提取的蛋白煮沸, 制备 10% 胶进行 SDS-PAGE, 转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭抗原 2 h, ALT1、ALT2 一抗 (1:400 稀释) 4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜 1 h, 每 10 min 换一次液, 羊抗鼠二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, PBST 再洗膜 1 h, 化学发光检测系统采集图像^[17]。观察 ALT1、ALT2 在不同组织中蛋白水平的表达。

1.6 免疫组织化学检测

石蜡切片经二甲苯脱蜡、酒精水化, 3% H₂O₂ 孵育 10 min, 抗原热修复 5 min, 滴加一抗 ALT1、ALT2 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min 后用 PBS 洗 3 次, 滴加辣根过氧化物酶孵育 15 min, DAB 显色, 蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片^[17]。镜下观察黄色或棕褐色为阳性表达, 判定组织中 ALT1、ALT2 抗体表达量及分布情况。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件对实验数据进行统计学分析, 两组间比较采用 *t* 检验和非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pET32a(+)-ALT2 重组质粒的构建

采用 RT-PCR 从肝癌细胞液中扩增出 ALT2 编码基因, 约含 1 569 个碱基对 (bp), 琼脂糖凝胶电泳鉴定显示在对应大小处有目的条带, 且无杂带, 结果如图 1 所示。将 *EcoR* I /*Hind* III 双酶切后的 ALT2 和质粒 PET32a(+) 相连接, PET32a(+)-ALT2 重组质粒构建成功。挑取单克隆

进行序列测定, 比对测序结果与理论相符。

2.2 ALT2 重组蛋白的表达与纯化

pET32a(+)-ALT2 重组质粒转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导表达, 超声破碎菌体上清液, 重组蛋白带有 His-tag 标签, 于大小 70 kDa 附近有明显的诱导条带, 结果如图 2 所示, 重组蛋白经镍柱 (Ni²⁺) 亲和纯化, 300 mmol/L 咪唑洗脱峰为目的蛋白峰, 经 SDS-PAGE 分析, 纯化后的蛋白纯度明显提高 (图 3)。

2.3 抗人 ALT2 单克隆抗体参数分析

杂交瘤细胞经过 3 次有限克隆化稀释后, 最终筛选出 5 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 AD7、BE5、BH4、DD2、HE2。用间

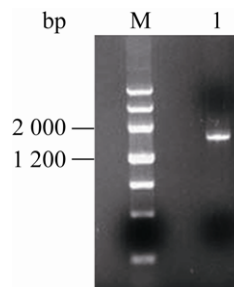


图 1 ALT2 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic map of PCR amplification products of ALT2 gene. M: DNA marker; 1: PCR products for ALT2 (1 569 bp).

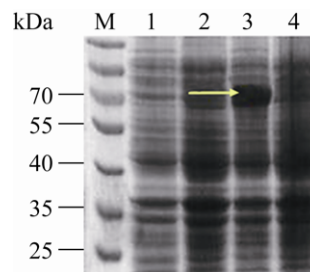


图 2 SDS-PAGE 检测 ALT2 重组蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the ALT2 recombinant protein. Lane M: protein marker; 1: pET32a(+) vector (IPTG induced); 2: pET32a(+) vector (non-induced); 3: pET32a(+)-ALT2(1 569 bp) vector (IPTG induced); 4: pET32a(+)-ALT2(1 569 bp) vector (non-induced).

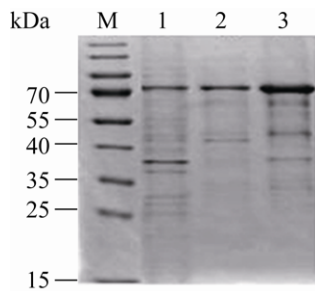


图3 SDS-PAGE 检测纯化后的 ALT2 重组蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified ALT2 recombinant protein. M: protein marker; 1: supernatant pET32a(+)-ALT2 (1 569 bp) (IPTG induced); 2-3: purified ALT2 (1 569 bp) recombinant protein.

接 ELISA 法分别测定杂交瘤细胞上清、腹水和纯化后 ALT2 单克隆抗体效价, 结果显示腹水和纯化后抗体效价为 10^6 , HE2 效价最高为 8.8×10^6 , 而上清液中仅为 10^3 。亚类鉴定均为 IgG1 类, 其中 BE5 为 λ 链, 其余均为 κ 链。Kaff 亲和常数均能达到 10^9 (表 1)。

2.4 抗人 ALT2 单克隆抗体特性鉴定

间接法 ELISA 测定显示 5 株杂交瘤细胞株分泌的 mAb 与商品化抗人 ALT2 单抗均能识别 ALT2 重组蛋白与血清中的 ALT2, 以 1% BSA、ALT1 重组蛋白 (本课题组表达)、质粒 pET32a(+) 作为对照组, 其结果显示为阴性 (表 2)。以人血清样本 (ALT 活性为 746 U/L) 作为抗原, Western blotting 检测显示 5 个抗体均能与血清中的 ALT2 发生免疫反应 (图 4)。以 ALT2 重组蛋白、ALT1 重组蛋白、1% BSA 作为抗原进行鉴定, 结果显

示 ALT2 抗体仅在 70 kDa 处特异性识别 ALT2 重组蛋白, 而不与 ALT1、BSA 发生交叉反应 (图 5)。结果表明, 纯化后的 5 个抗体均具有特异性。其中, BE5 抗体特异性、灵敏度最强, AD7 最弱。

2.5 正常组织中 ALT 同工酶基因与蛋白表达的定量分析

我们检测了人体正常组织中丙氨酸氨基转移酶同工酶 ALT1、ALT2 的基因和蛋白的表达量及分布情况。通过定量 PCR 分析显示, ALT1、ALT2 在人体正常组织中分布广泛, ALT1 在肝脏中表达量最高, 肾脏、骨骼肌表达量中等偏上, 心肌、胃、小肠、结肠、直肠和脂肪组织中等表达, 胰腺、肾上腺表达量低, 食管、肺、胆囊组织中表达量最低 (图 6)。相反的是, ALT2 主要表达在脂肪、肝脏中, 肾脏、骨骼肌、心肌表达量中等, 肾上腺、肺、胆囊表达量较高, 胃肠道平滑肌表达量最低。在蛋白水平上 ALT1 主要表达在肝脏、骨骼肌、肾脏中, 胃、结肠和直肠表达量中等, 心肌、脂肪、胰腺表达量低, 肾上腺、甲状腺、乳腺、肺和胆囊表达量极低。ALT1 集中分布在肝脏、肾脏、骨骼肌、胃肠道组织中, ALT2 集中分布在脂肪、肾脏、骨骼肌、心肌中 (图 7 和图 8)。而不同的是, 肝脏中 ALT1 表达量很高, 而 ALT2 表达量极低, 肾脏、骨骼肌中 ALT1 和 ALT2 的表达量相似, 脂肪组织中 ALT2 的表达量最高, 而 ALT1 的表达量很低, 胃肠道组织中的 ALT1 的表达量高于 ALT2。

表 1 ALT2 单克隆抗体效价及亚型

Table 1 Titer and subtype of ALT2 MAb

Clone cell	Antibody titer			Isotype	Kaff (L/mol)
	Supernatant	Ascites	Antibody		
AD7	7.81×10^3	2.11×10^6	3.19×10^6	IgG1 κ chain	6.11×10^9
BE5	5.65×10^3	1.57×10^6	2.28×10^6	IgG1 κ chain	4.37×10^9
BH4	3.89×10^3	1.24×10^6	2.04×10^6	IgG1 κ chain	3.11×10^9
DD2	4.11×10^3	1.27×10^6	2.07×10^6	IgG1 κ chain	3.36×10^9
HE2	2.48×10^3	1.08×10^6	1.56×10^6	IgG1 λ chain	2.01×10^9

表 2 ALT2 单克隆抗体的特异性鉴定

Table 2 Specific identification of ALT2 MAb

Sample	OD ₄₅₀				
	AD7	BE5	BH4	DD2	HE2
BL21(DE3) with pET32a (+)	0.145	0.121	0.157	0.161	0.172
Serum (ALT 746 U/L)	1.631	0.841	0.640	0.969	1.424
ALT1 protein	0.153	0.134	0.152	0.146	0.112
ALT2 protein	2.424	2.188	1.208	1.556	1.257

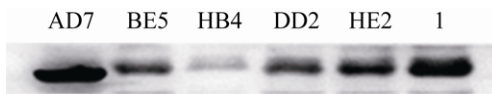


图 4 Western blotting 分析 ALT2 单克隆抗体的特异性
Fig. 4 Western blotting analysis of the specificity of ALT2 mAb. 1: commercialized ALT2 mAb.

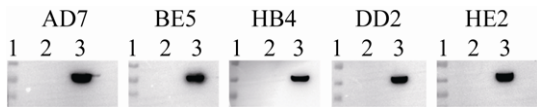


图 5 ALT2 单克隆抗体特异性分析

Fig. 5 Specificity analysis of ALT2 mAb. 1: crude lysate of BL21(DE3) cells with pET32a(+) vector (IPTG); 2: ALT1 recombinant protein; 3: ALT2 recombinant protein.

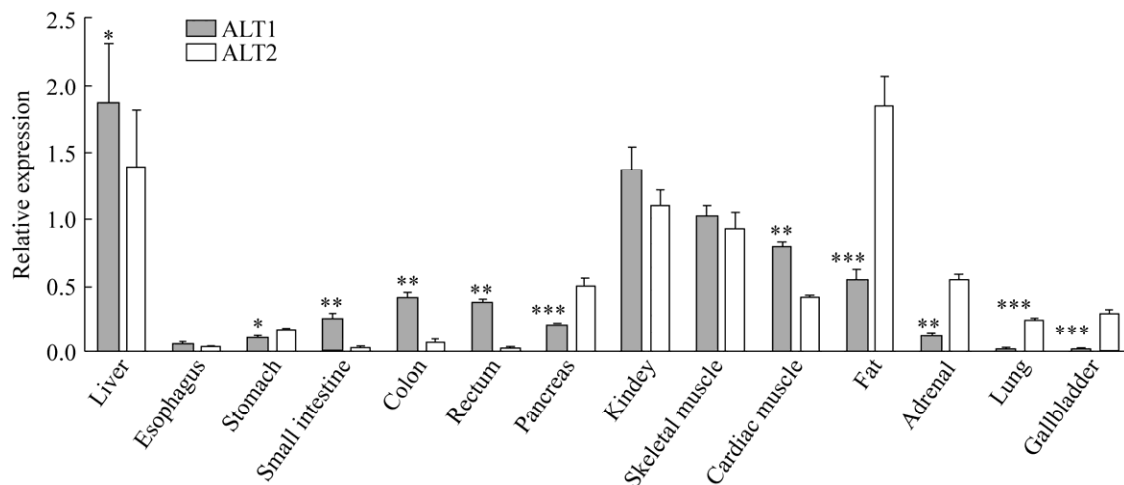


图 6 人体正常组织中 ALT1 和 ALT2 的 mRNA 相对表达量

Fig. 6 The mRNA relative expression of ALT1 and ALT2 in human normal tissues. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ compared with ALT2 in the same tissue.

2.6 免疫组化分析人体正常组织中 ALT1 和 ALT2 的蛋白表达

在肝脏组织中, ALT1 和 ALT2 主要集中表达于肝细胞, ALT1 表达强, ALT2 表达弱(图 9a、b)。食管中 ALT1 中等表达, 而 ALT2 低表达(图 9c、d)。胃中 ALT1 与 ALT2 分布类似, 信号主要定位于壁细胞, 在主细胞中仅观察到较弱的信号(图 9e、f)。空肠中 ALT1 和 ALT2 主要表达于肠壁上部区域黏膜, 而相邻的平滑肌细胞未检测出, 且 ALT1 和 ALT2 分布类似, 中等表达(图 9g、h)。结肠中 ALT1 和 ALT2 也主要分布于肠壁上部区域黏膜, ALT1 表达强, ALT2 表达中等(图 9i、j)。直肠中分布同结肠, ALT1 高表达, ALT2 低表达(图 9k、l)。

肾脏中 ALT1 和 ALT2 均检测出, 且表达相似, ALT1 主要表达在髓质中, ALT2 髓质和皮质均表达。放大倍数下, ALT1 主要表达在髓质小管中, ALT2 髓质和皮质小管中均有, 表达中等偏高(图 9m、n)。骨骼肌中 ALT1 和 ALT2 主要表达于肌肉纤维内, 分布相似, ALT1 和 ALT2 表达

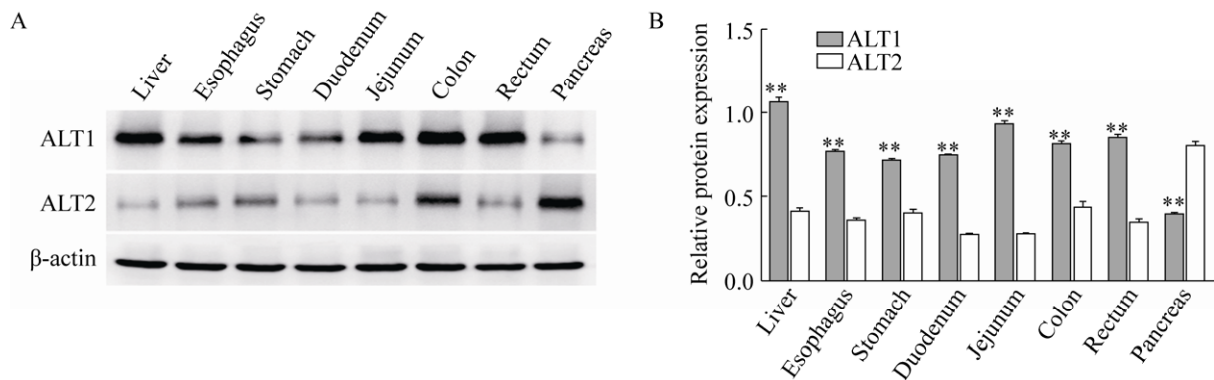


图7 ALT同工酶在人体正常组织中的蛋白相对表达量

Fig. 7 Quantitative analysis of human ALT isoenzyme tissue distribution. (A) Western blotting analysis of human ALT isoenzyme tissue distribution. (B) Protein expression of ALT isoenzyme in human tissues. Black column: ALT1; white column: ALT2. **: $P < 0.01$ versus ALT2 in the same tissue.

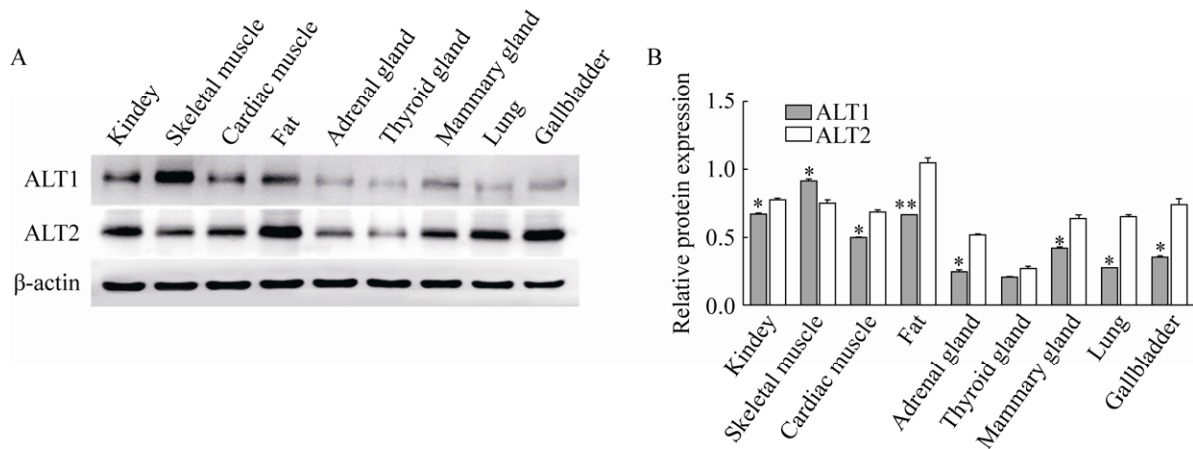


图8 ALT同工酶在人体正常组织中的蛋白相对表达量

Fig. 8 Quantitative analysis of human ALT isoenzyme tissue distribution. (A) Western blotting analysis of human ALT isoenzyme tissue distribution. (B) Protein expression of ALT isoenzyme in human tissues. Black column: ALT1; white column: ALT2. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ versus ALT2 in the same tissue.

中等 (图 9o、p)。心肌中 ALT1 和 ALT2 均检测出, 信号主要定位于心肌细胞中, ALT2 表达水平高于 ALT1 (图 9q、r)。脂肪中 ALT2 信号较强, 主要定位于脂肪细胞边缘的胞质中, 而 ALT1 信号极弱, 甚至未检测出 (图 9s、t)。肾上腺中 ALT1 和 ALT2 主要表达于皮质部分, 髓质中未检测出, ALT1 低表达至无表达, ALT2 中等表达 (图 9u、v)。

胰腺 ALT1 低表达于胰岛中, 腺泡无表达,

ALT2 于胰岛中强表达, 腺泡中低表达 (图 9w、x)。肺组织 ALT1 和 ALT2 主要表达在肺泡上, ALT1 表达极低, 而 ALT2 强表达 (图 9y、z)。胆囊 ALT1 和 ALT2 信号主要定位于肌层, 胆囊壁和外膜无信号, ALT1 表达极低甚至无表达, ALT2 中等偏低表达 (图 9a1、b1)。甲状腺、乳腺、脾脏、前列腺和膀胱组织中未检测出 ALT1 和 ALT2, 或者是表达极低。

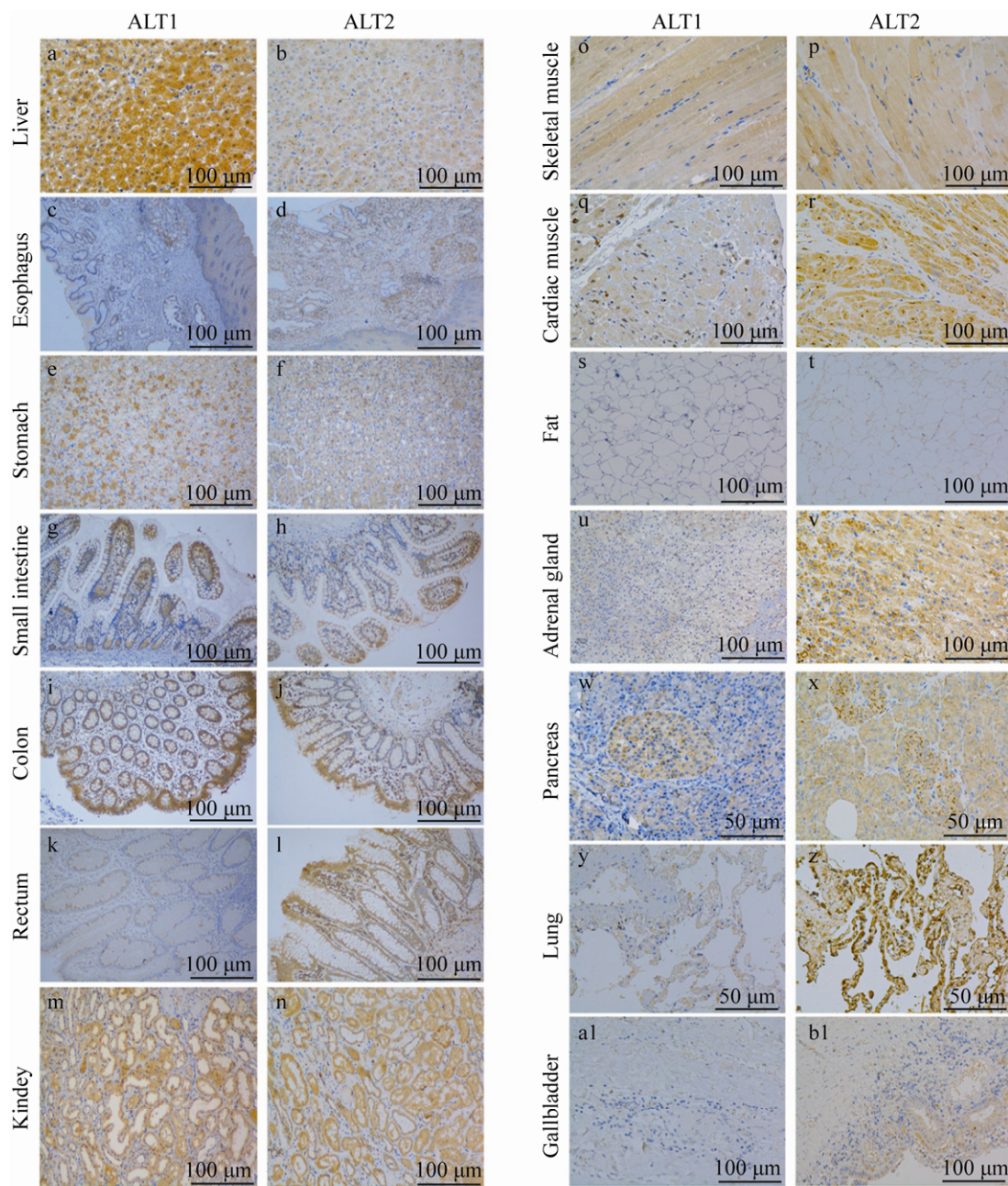


图9 人体正常组织 ALT1 和 ALT2 免疫组化定位分布

Fig. 9 Immunohistochemical localization of ALT1 and ALT2 in human tissues.

3 讨论

血清丙氨酸氨基转移酶 ALT 活性的升高在临床被作为诊断肝损伤的一种灵敏指标,其机制可能是肝脏中富含 ALT,肝损伤后肝细胞膜通透性增加,肝细胞中的 ALT 释放入血,导致血清

ALT 活性增高^[18]。因此,在早期的研究中,ALT 活性主要在肝脏组织中发现。然而,其他组织和器官也具有 ALT 活性,包括肾、骨骼肌、心肌、脂肪、心肌、胃、结肠、直肠等。因此,这些部位的任何器官损伤,如肾脏疾病、骨骼肌损伤、心肌梗塞、肥胖症和肠道疾病,都有可能

清丙氨酸氨基转移酶活性增加^[19-21]。例如,临床上感染了轮状病毒(首先侵害小肠)而无肝损害的病人中血清 ALT1 活性经常会升高^[11],肥胖和糖尿病患者中 ALT2 升高^[22-23],极端的体力活动可以引起血清 ALT 短期地、可逆地增高,且 ALT2 升高幅度大于 ALT1 变化趋势^[24-25],可能是骨骼肌损伤引起的。多项研究表明 ALT 同工酶在组织和器官中的分布是不同的^[5,10,26]。肝脏和肾脏中 ALT1 的表达尤其丰富,几乎没有检测到 ALT2,而心脏和骨骼肌同时表达 ALT1 和 ALT2。因此,我们推测血清中丙氨酸氨基转移酶的亚型特异性测定可能提供肝外器官损伤方面的额外信息,而不仅仅是丙氨酸氨基转移酶的总活性^[5,26],区分两种酶在亚细胞中的定位和在病理条件下的表达水平有助于评估不同组织损伤的程度,血清丙氨酸氨基转移酶同工酶的测定可为肝损伤和肝外损伤提供更有用的临床诊断信息。

1975 年分子生物学家 Kohler 和 Milstein 创建了杂交瘤技术,近几十年来,单克隆抗体技术快速发展,普遍应用于临床医学疾病诊断及治疗、生物医学学科的基础研究等多个领域。单克隆抗体具有高度特异性和均一性,仅针对某一特定的抗原决定簇发生免疫反应,本研究采用基因重组技术成功制备了 ALT 同工酶重组蛋白,我们选用具有高纯度高活性的 ALT 重组蛋白免疫雌性 Balb/c 小鼠,选取小鼠血清 ALT 抗体效价最高的脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞在聚乙二醇(PEG)的作用下进行细胞融合,建立杂交瘤细胞株,采用有限稀释法和间接 ELISA 法进行亚克隆和筛选,选择能够稳定分泌 ALT 单克隆抗体的细胞株进行腹水制备,亲和层析柱法纯化单克隆抗体,并鉴定单克隆抗体的效价、亚型及其特异性^[27-28]。为 Western blotting 和免疫组化分析 ALT 同工酶在人体组织中的定位分布和表达提供了必要条件。

本研究从基因、蛋白质和组织定位 3 个方面

评价了人类正常组织中的 ALT 同工酶。根据不同正常组织的基因分析结果,我们发现 ALT1 基因在人类正常组织中的分布比 ALT2 基因更广泛。ALT1 基因主要在肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、脂肪、结肠、直肠、小肠、胰腺和肾上腺中表达,从高到低依次为脂肪、肝脏、肾脏、骨骼肌、心肌、肾上腺、胰腺、肺和胆囊。Yang 等的研究表明,ALT1 在肾脏中高表达,在肝脏、肌肉和心脏中中等表达,而 ALT2 在脂肪、肌肉、肾脏和大脑中高表达,在肝脏中中等表达^[3-4],这与我们的研究大体一致。在组织裂解物的蛋白质印迹获得的蛋白质水平上发现了类似的结果,两种同工酶在人类正常组织中表达也存在差异^[10]。这两种同工酶在蛋白水平上的表达也是不同的,本研究显示 ALT1 在肝脏、骨骼肌、肾脏、胃肠道组织表达高,心肌、脂肪和胰腺中等表达,肾上腺、甲状腺、肺和胆囊表达较低,而 ALT2 主要表达于脂肪、肾脏、骨骼肌、心肌和胰腺组织中,肝脏、胃肠道组织表达较低,Lindblom 等研究显示在蛋白水平人组织中的 ALT1 主要表达于肝脏、骨骼肌、肾脏,心肌未检测出;ALT2 主要在心脏和骨骼肌细胞^[4],与本研究较为一致。有趣的是,肺和胆囊中 ALT2 也呈中等表达,临床上某些肺部疾病和胆道系统疾病的 ALT 活性升高,很有可能是 ALT2 释放入血,从而导致总 ALT 活性升高。ALT1 和 ALT2 主要表达部位受限,很有可能成为更具有特异性的血清标志物,Glinghammar 等研究首次揭示,在 3 种不同的肝损伤情况下(非酒精性脂肪肝、丙型肝炎和肝手术期间),血浆中 ALT1 活性的渗漏量大大超过 ALT2,肝损伤时 ALT1 的测定值与总 ALT 活性的测定值相等。相反,在运动性骨骼肌损伤过程中,ALT2 的渗漏量超过 ALT1,循环中 ALT1/ALT2 的比例也存在相应改变^[24]。血浆中 ALT 亚型的变化反映了肝脏和骨骼肌中 ALT1 和 ALT2 活性的相对含量。这些数据表明,用相同的标准分析平台评估 ALT1 和

ALT2 活性对血浆中 ALT 总活性的贡献率, 可以区分肝损伤和肝外损伤, 比如肝脏疾病、消化系统疾病可能主要引起 ALT1 升高, 而肥胖、骨骼肌损伤、心肌梗死、胰腺炎等可能会引起 ALT2 升高。

综上所述, 我们从 mRNA、蛋白和细胞水平检测了 ALT 同工酶在人体组织的定位分布和表达情况, 为区别肝和非肝损伤引起的 ALT 活性变化提供了必要的理论依据。本实验室准备进一步深入研究不同病理条件下如骨骼肌损伤、肾脏疾病、胰腺炎等疾病中 ALT 同工酶的变化情况。因此, 探讨人体组织中 ALT 同工酶的定位、分布及表达量, 为更好地研究不同病理条件下 ALT 同工酶的变化机制提供可靠依据。

REFERENCES

- [1] Díaz-Juárez J, Rivera-Valerdi L, Bernal-Cerrillo DE, et al. Predominance of released mitochondrial enzymes by partial hepatectomy-induced rat regenerating liver is controlled by hemodynamic changes and not related to mitochondrial damage. *Scand J Gastroenterol*, 2006, 41(2): 223–233.
- [2] Yagura M, Tanaka A, Kamitsukasa H, et al. Re-evaluation of the serum alanine aminotransferase upper normal limit in chronic hepatitis C patients. *Intern Med*, 2010, 49(6): 525–528.
- [3] Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, et al. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics*, 2002, 79(3): 445–450.
- [4] Liu L. The molecular mechanism of serum ALT elevation in mice treated with carbon tetrachloride and human ALT isoenzymes: molecular cloning, protein expression and purification and related study[D]. Shenyang: China Medical University, 2008 (in Chinese).
刘莉. 四氯化碳引起小鼠血清 ALT 升高的分子机制及人 ALT 同工酶分子克隆、蛋白表达、纯化及相关研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2008.
- [5] Lindblom P, Rafter I, Copley C, et al. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum-differential tissue expression using novel antibodies. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 466(1): 66–77.
- [6] Saxena S, Korula J, Shulman IA. A review of donor alanine aminotransferase testing. Implications for the blood donor and practitioner. *Arch Pathol Lab Med*, 1989, 113(7): 767–771.
- [7] Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician*, 2005, 71(6): 1105–1110.
- [8] Chen CH, Huang MH, Yang JC, et al. Prevalence and etiology of elevated serum alanine aminotransferase level in an adult population in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(9): 1482–1489.
- [9] Bhatti SA, Shaikh NA, Akhter SS. Liver histology in hepatitis C virus positive patients with normal and elevated alanine amino transferase levels. *J Pak Med Assoc*, 2009, 59(12): 832–834.
- [10] Yang RZ, Park S, Reagan WJ, et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: Molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 2009, 49(2): 598–607.
- [11] Teitelbaum, JE, Daghistani R. Rotavirus causes hepatic transaminase elevation. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(12): 3396–3398.
- [12] Jadaho SB, Yang RZ, Lin Q, et al. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1297–1302.
- [13] Thulin P, Rafter I, Stockling K, et al. PPAR α regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 231(1): 1–9.
- [14] Anemaet IG, Meton I, Salgado MC, et al. A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2833–2844.
- [15] Hu XM, Cheng SL, Liu XF, et al. Development of monoclonal antibodies and immunochromatographic lateral flow device for rapid test of alanine

- aminotransferase isoenzyme 1. *Protein Expr Purif*, 2016, 119: 94–101.
- [16] Chen J, Dai LN, Wang H, et al. Preparation and identification of a monoclonal antibody against human PD-L1. *J Sichuan Univ: Med Sci Ed*, 2011, 42(1): 5–9 (in Chinese).
陈娇, 戴丽娜, 王辉, 等. 鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体的制备及鉴定. *四川大学学报: 医学版*, 2011, 42(1): 5–9.
- [17] Li BW, Li X, Zhang ZC, et al. Study on the Notch-Hif-1 α signaling pathway in liver regeneration. *Prog Mod Biomed*, 2016, 16(15): 2806–2810 (in Chinese).
李博伟, 李霄, 张卓超, 等. Notch-Hif-1 α 信号通路参与调控大鼠肝再生过程的研究. *现代生物医学进展*, 2016, 16(15): 2806–2810.
- [18] Shi Q, Yang X, Mattes WB, et al. Circulating mitochondrial biomarkers for drug-induced liver injury. *Biomark Med*, 2015, 9(11): 1215–1223.
- [19] Giesen PL, Peltenburg HG, de Zwaan C, et al. Greater than expected alanine aminotransferase activities in plasma and in hearts of patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 1989, 35(2): 279–283.
- [20] Pettersson J, Hindorf U, Persson P, et al. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol*, 2008, 65(2): 253–259.
- [21] Hanley AJG, Karter AJ, Williams K, et al. Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Circulation*, 2005, 112(24): 3713–3721.
- [22] Qian K, Zhong S, Xie KM, et al. Hepatic ALT isoenzymes are elevated in gluconeogenic conditions including diabetes and suppressed by insulin at the protein level. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(6): 562–571.
- [23] Thulin P, Bamberg K, Buler M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, AZD4619, induces alanine aminotransferase-1 gene and protein expression in human, but not in rat hepatocytes: Correlation with serum ALT levels. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3): 961–968.
- [24] Rafter I, Gråberg T, Kotronen A, et al. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. *Int J Mol Med*, 2012, 30(5): 1241–1249.
- [25] Saengsirisuwan V, Phadungkij S, Pholpramool C. Renal and liver functions and muscle injuries during training and after competition in Thai boxers. *Br J Sports Med*, 1998, 32(4): 304–308.
- [26] Walle P, Takkunen M, Männistö V, et al. Fatty acid metabolism is altered in non-alcoholic steatohepatitis independent of obesity. *Metabolism*, 2016, 65(5): 655–666.
- [27] Ge C, Xian YL, Liao HM, et al. Expression of recombinant human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 2 and preparation of anti-ALT2 monoclonal antibody. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2010, 26(12): 1232–1234, 1237 (in Chinese).
葛翠, 鲜阳凌, 廖红梅, 等. 人丙氨酸氨基转移酶 (ALT2) 的表达、单克隆抗体制备及鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(12): 1232–1234, 1237.
- [28] Liu L, Zhong S, Yang RZ, et al. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in high-five insect cells. *Protein Expr Purif*, 2008, 60(2): 225–231.

(本文责编 陈宏宇)