

人血管生成抑制素基因的克隆、序列分析 及其在大肠杆菌中的表达*

罗进贤 卢文菊 李文清 张添元 罗学斌

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 血管生成抑制素是新发现的一种血管生成抑制因子,能抑制肿瘤的生长和转移,有临床应用前景. 根据血管生成抑制素是纤溶酶原的一个内片段的特点,以人纤溶酶原 cDNA 为模板,用 PCR 扩增出人血管生成抑制素基因,经序列分析后克隆至质粒 pBV220 转化大肠杆菌 DH5 α ,在温度诱导下获得高效表达. SDS-PAGE 及 Western 印迹分析显示:表达产物占菌体总蛋白的 38%,相当于 212 mg/L,并具有免疫活性. 生物活性分析结果表明,重组人血管生成抑制素能抑制 bFGF 诱导的 CAM 血管生成、抑制 C57BL/6 小鼠皮下原位 B16 黑色素瘤生长.

关键词 人血管生成抑制素 基因克隆和表达 序列分析 大肠杆菌

血管生成是实体肿瘤得以迅速生长和转移的基础,利用高效的血管生成抑制因子,抑制血管生成,切断肿瘤的营养供给,达到治疗肿瘤的目的,是目前肿瘤研究的热点之一. 血管生成抑制素(Angiostatin)是 1994 年发现的血管生成抑制因子,是纤溶酶原(Plasminogen)的一个内片段,相当于其 1~4 Kringle 区,它通过抑制血管内皮细胞的增殖及新血管的形成从而抑制肿瘤的转移和继发瘤的生长^[1]. 最近发现,人血管生成抑制素尚能抑制实验性小鼠原发瘤的生长,包括小鼠 Lewis 肺癌、纤维肉瘤和网状细胞瘤以及人乳腺癌、结肠癌和前列腺癌^[2]. 以上发现表明,血管生成抑制素对肿瘤的治疗和转移机理的研究都有重要意义^[3]. 本文首次报道人血管生成抑制素基因的克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达.

1 材料和方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 C600 及 DH5 α 为本室保存. 含人纤溶酶原 cDNA 的质粒 pPLGKG 由瑞典 Lund 大学 Héden 博士惠赠. 质粒 pBV220 由中国预防医学科学院病毒研究所构建,中山大学害虫生物防治国家重点实验室转赠. 质粒 pCRTMII 购自 Invitrogen 公司.

1.2 酶和主要试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs 及 DNA 序列分析试剂盒购自 Bohringer Mannheim 公司,人

1998-06-29 收稿,1998-10-14 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号:39670013)和广东省科学基金(批准号:960052)资助项目

纤溶酶原抗血清为 Sigma 公司产品, bFGF 为 GIBCO-BRL 公司产品, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, 余为国产分析纯试剂.

1.3 鸡胚、细胞株和实验动物

6 天龄来杭鸡胚购自广州畜牧科学研究所, B16 黑色素瘤细胞株由中山医科大学实验动物研究室提供, 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体重(20±2) g, 购自中山医科大学实验动物中心.

1.4 质粒的纯化、酶解、DNA 连接及大肠杆菌转化

按文献[4]的方法进行.

1.5 PCR 扩增

以人纤溶酶原 cDNA 为模板, 扩增条件为第一循环 94℃ 4 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min. 以后每个循环 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 25 个循环.

1.6 PCR 产物的克隆和序列分析

PCR 产物先克隆至 pCRTMII, 然后按 GIBCO-BRL 公司提供的方法进行 DNA 序列分析.

1.7 人血管生成抑制素的诱导表达

接种重组转化菌于 LB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中振荡培养过夜, 次日以 10% 接种量接种于新鲜 LB 中, 30℃ 培养至 $O.D_{600\text{ nm}} = 0.4$ 时, 转移至 45℃ 水浴缓摇 2 min, 再转至 42℃ 水浴继续振荡 4 h, 离心收集菌体.

1.8 SDS-PAGE

浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%. 取 1 mL 培养物离心, 菌体悬浮于 40 μL TE 缓冲液中, 加等体积的 2 \times 上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min, 取 10 μL 进行 34 mA 恒流电泳 45 min.

1.9 表达产物的免疫印迹分析

按 Sambrook 等^[4]的方法, 以羊抗人纤溶酶原抗血清为第一抗体, 辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A (HRP-Protein A) 为第二抗体.

1.10 包涵体的纯化、溶解与重组蛋白的复性

将菌体悬浮于 STE 溶液中超声破碎, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀即为粗制包涵体. 用添加有 0.05% Triton X-100, 2 mol/L 尿素, 1 mol/L NaCl 的 STE 缓冲液反复洗涤除去细胞碎片、核酸等杂质, 纯净的包涵体溶解于缓冲液 a (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L β -巯基乙醇) 中, 调节蛋白终浓度为 1 mg/mL, 缓慢滴加 10 倍体积的缓冲液 b (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mol/L 氧化型和还原型谷胱甘肽), 4℃ 磁力搅拌 24 h, 透析、冻干后, 溶于 0.01 mmol/L PBS, pH = 7.2 溶液中.

1.11 鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 血管生成抑制活性分析

参照文献[5]的方法进行, 实验选用 6 天龄鸡胚, 以灭菌滤纸片 (0.5 mm \times 0.8 mm) 作为样品载体, 对照组 ($n = 5$) 加 30 ng bFGF (10 μL) 和 10 μL PBS 溶液, 实验组 ($n = 5$) 加 30 ng bFGF (10 μL) 和 200 μg (10 μL) 重组人血管生成抑制素样品, 作用时间 48 h.

1.12 抑瘤实验

将 B16 黑色素瘤细胞悬浮于无血清 RPMI 1640 培养液中, 细胞浓度为 5×10^6 个/mL; 在 C57B16/J 小鼠背部近中线皮下接种瘤细胞悬液 0.2 mL. 瘤体长出后, 以游标卡尺测量肿瘤的长径 (L) 和短径 (W), 按公式 $V = 1/2LW^2$ 计算肿瘤体积, 单位 mm^3 . 待肿瘤长至 100~200 mm^3 时, 将小鼠随机分组: 实验组 ($n = 4$) 在远离肿瘤部位皮下按 200 mg/kg 体重注射血管生成抑制

素样品,用药体积 0.3 mL;对照组($n=4$)皮下注射 0.3 mL PBS. 每 24 h 重复注射一次,持续两周.

2 结果与讨论

2.1 PCR 引物的设计和合成

根据已发表的资料^[6],血管生成抑制素同源子纤溶酶原的前 4 个 Kringle 区,即相当于其 98 至 440 位氨基酸的片段,设计合成一对引物,如下:

5'端引物: CCGTCGAC GAATTC AATGATCTCTCAGAGTGCAAC

Sal I *Eco*R I

3'端引物: GACCACAAAATGGTGTCTGATCCTAGG TTCGAACCC

*Hind*III *Bam*H I

5'端引物除与目的基因 5'端配对的序列外,另加上起始密码及 *Sal* I 和 *Eco*R I 两个酶切位点;3'端引物除与目的基因 3'端配对的序列外,另加上终止密码 TAG 的互补序列 ATC 及 *Hind*III 及 *Bam*H I 位点.

2.2 PCR 扩增人血管生成抑制素基因

以人纤溶酶原 cDNA 为模板,合成的两段序列作引物,按材料和方法中介绍的条件,用 PCR 方法扩增人血管生成抑制素基因. 反应产物直接克隆至质粒 pCRTMII,获得 pCRTMII-A,经酶切电泳分析后,进行 DNA 序列分析,结果如图 1. 酶切电泳分析如图 2.

```

      SalI      EcoRI
1      CCGTCGAC  GAATTC  ATG TAT CTC TCA GAG TGC AAG ACT GGG AAT GGA AAG AAC TAC AGA GGG ACC ATG TCC AAA ACA AAA
      M Y L S E C K T G N G K N Y R G T M S K T K
82     AAT GGC ATC ACC TGT CAA AAA TGG AGT TCC ACT TCT OCC CAC AGA CCT AGA TTC TCA OCT GCT ACA CAC CCC TCA GAG GGA CTG
      N G I T C Q K W S S T S P H R P R F S P A T H P S E G L
166    GAG GAG AAC TAC TGC AGG AAT CCA GAC AAC GAT CCG CAG GGG CCC TGG TGC TAT ACT ACT GAT CCA GAA AAG AGA TAT GAC TAC
      E E N Y C R N P D N D P Q G P W C Y T T D P E K R Y D Y
250    TGC GAC ATT CTT GAG TGT GAA GAG GAA TGT ATG CAT TGC AGT GGA GAA AAC TAT GAC GGC AAA ATT TCC AAG ACC ATG TCT GGA
      C D N L E C E E E C M H C S G E N Y D G K I S K T M S G
334    CTG GAA TGC CAG GGC TGG GAC TCT CAG AGC CCA CAC GCT CAT GGA TAC ATT OCT TCC AAA TTT CCA AAC AAG AAC CTG AAG AAG
      L E C Q A W D S Q S P H A H G Y I P S K F P N K N L K K
418    AAT TAC TGT GAT AAC CCC GAT AGG GAG CTG GGG CCT TGG TGT TTC ACC ACC GAC CCC AAC AAG GGC TGG GAA CTT TGC GAC ATC
      N Y C R N P D R E L R P W C F T T D P N K R W E L C D I
502    CCC GGC TGC ACA ACA CCT CCA CCA TCT TCT GGT CCC ACC TAC CAG TGT CTG AAG GGA ACA GGT GAA AAC TAT CCC GGG AAT GTG
      P R C T T P P P S S G P T Y Q C L K G T G E N Y R G N V
586    GCT GTT ACC GTT TCC GGG CAC ACC TGT CAG CAC TGG AGT GCA CAG ACC OCT CAC ACA CAT AAC AGG ACA CCA GAA AAC TTC CCC
      A V T V S G H T C Q H W S A Q T P H T H N R T P E N F P
670    TGC AAA AAT TTG GAT GAA AAC TAC TGC GGC AAT OCT GAC GGA AAA AGG GGC CCA TGG TGC CAT ACA ACC AAC AGC CAA GTG CCG
      C K N L D E N Y C R N P D G K R A P W C H T T N S Q V R
754    TGG GAG TAC TGT AAG ATA CCG TCC TCC CCA GTA TCC ACG GAA CAA TTG GCT CCC ACA GCA CCA OCT GAG CTA ACC
      W E Y C K I P S C D S S P V S T E Q L A P T A P P E L T
838    OCT GTG GTC CAG GAC TGC TAC CAT GGT GAT GGA CAG AGC TAC CGA GGC ACA TCC TCC ACC ACC ACC ACA GGA AAG AAG TGT CAG
      P V V Q D C Y H G D G Q S Y R G T S S T T T T G K K C Q
922    TCT TGG TCA TCT ATG ACA CCA CAC CCG CAC CAG AAG ACC CCA GAA AAC TAC CCA AAT GCT GGC CTG ACA ATG AAC TAC TGC AGG
      S W S S M T P H R H Q K T P E N T P N A G L T M N Y C R
1064  AAT CCA GAT GCC GAT AAA GGC CCC TGG TGT TTT ACC ACA GAC TAG GATCC AAGCTTGGG 1064
      N P D A D K G P W C F T T D BamHI HindIII

```

图 1 PCR 合成的人血管生成抑制素基因的 DNA 序列及其编码的氨基酸顺序

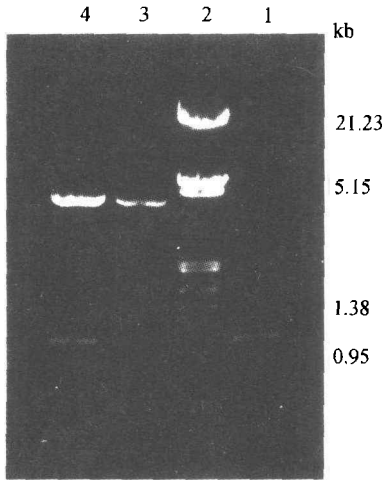


图 2 PCR 产物的电泳分析

1. PCR 产物, 2. λ cl857DNA/*Hind*III + *Eco*R I, 3. pCR™II/*Eco*R I, 4. pCR™II-A/*Eco*R I + *Bam*H I

2.4 人血管生成抑制素基因在大肠杆菌中的诱导表达

按 1.8 的方法进行 SDS-PAGE 分析, 如图 5 所示, 经温度诱导后, 含重组质粒 pBVA2 的 DH5 α 在 43 kd 附近的位置上出现一条新的蛋白带, 而未经诱导的含重组质粒的 DH5 α 及不含重组质粒 pBVA2 但含 pBV220 的 DH5 α 不出现这一蛋白带。

目前, 人血管生成抑制素只能从人纤溶酶原经弹性蛋白酶消化制得, 来源困难, 尚无商品出售, 难于制备抗血清。由于血管生成抑制素由纤溶酶原 1~4 Kringle 区构成, 本研究以 Sigma 公司的人纤溶酶原抗血清作为第一抗体, 进行 Western blot 分析, 结果显示, 经诱导的工程菌蛋白样品能与入纤溶酶原抗血清特异结合(图略)。

为估计基因的表达水平, 用薄层激光扫描仪进行扫描分析, 测算出表达的人血管生成抑制素占菌体总蛋白的 38%, 人血管生成抑制素的表达量为 212 mg/L。

2.5 重组人血管生成抑制素对血管生成的抑制作用

按文献[5]的方法进行血管生成抑制活性分析, 从图版 I-A 可见, 同时加有血管生成刺激

从图 1 可知, PCR 合成了共 1 064 bp 的产物, 其中 1 035 bp 的 DNA 序列(从 16 bp ~ 1 050 bp)与人纤溶酶原 98 至 441 位氨基酸的编码区相同, 另加起始密码和终止密码。

2.3 含表达人血管生成抑制素基因的质粒 pBVA2 的构建

为了构建表达载体的方便, 用 *Sal*I 与 *Hind*III 将人血管生成抑制素基因从 pCR™II-A 上切下重新克隆至 pM1, 生成质粒 pMA1(图略)。如图 3 所示, 用 *Eco*R I 及 *Bam*H I 酶解质粒 pMA1, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收约 1.0 kb 的人血管生成抑制素基因的编码区, 与经 *Eco*R I, *Bam*H I 双酶切的质粒 pBV220 以适当比例混合、连接。连接产物转化 *E. coli* C600, 筛选 *Amp*^r 转化子, 经质粒检测和酶切分析获得含人血管生成抑制素基因的重组表达质粒 pBVA2。从图 4 可见, pBVA2 经 *Eco*R I, *Bam*H I 双酶切后产生 3.6 及 1.0 kb 两个片段, 3.6 kb 片段是载体 pBV220, 1.0 kb 片段为人血管生成抑制素基因。

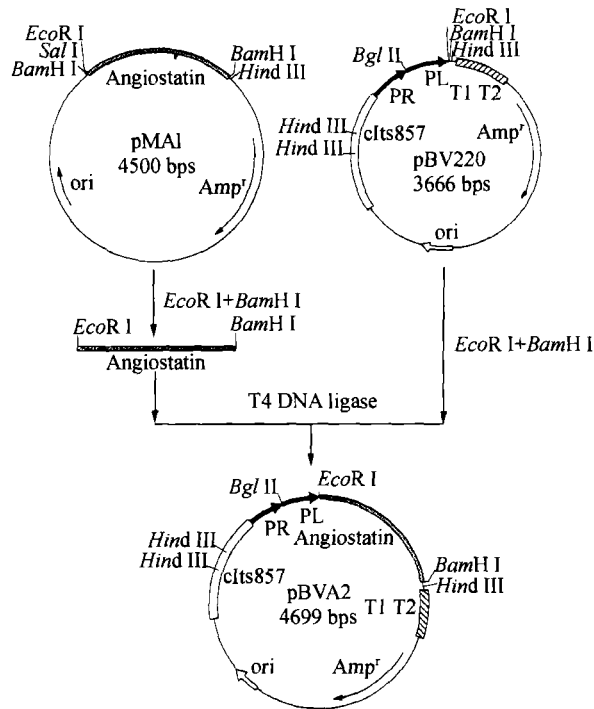


图 3 重组质粒 pBVA2 的构建

因子 bFGF 和重组人血管生成抑制素的实验组鸡胚在载样滤纸片下形成无血管区,而仅加 bFGF 未加重重组人血管生成抑制素的对照组鸡胚,载样滤纸片下形成放射状毛细血管丛。

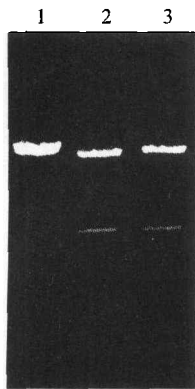


图4 重组质粒 pBVA2 的电泳分析

1. pBV220/*EcoR* I,
2. pMA1/*EcoR* I + *Bam*H I,
3. pBVA2/*EcoR* I + *Bam*H I

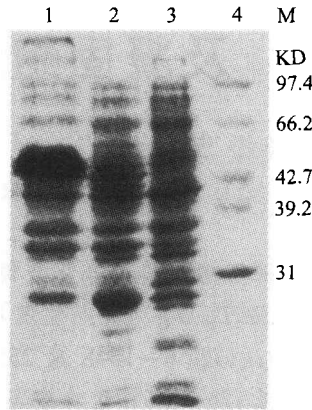


图5 人血管生成抑制素基因在 *E. coli* 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

1. DH5 α (pBVA2) 诱导,
2. DH5 α (pBV220) 诱导,
3. DH5 α (pBVA2) 未诱导,
4. 蛋白质分子量标准

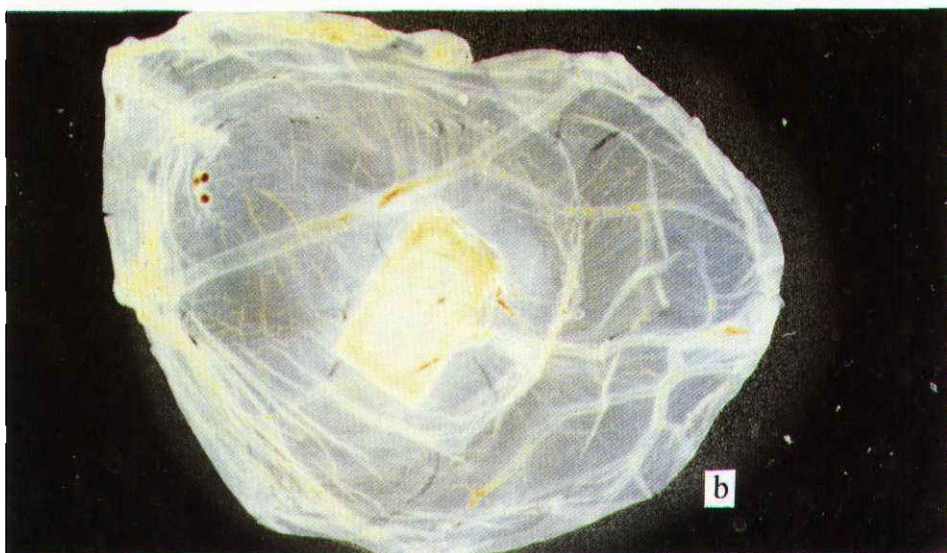
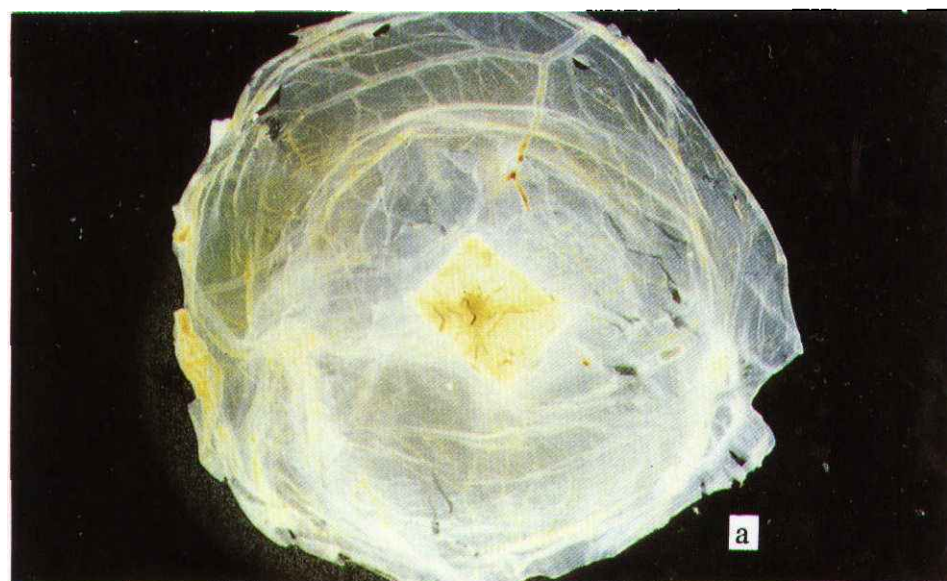
2.6 重组人血管生成抑制素的抑瘤活性

按 1.12 的方法进行抑瘤活性分析,结果见图版 I-B,注射 PBS 的对照组小鼠背部皮下肿瘤生长迅速,实验期(2周)结束时,瘤体积达(3 955 \pm 334) mm³;注射重组人血管生成抑制素的实验组小鼠,肿瘤体积为(158 \pm 16) mm³,与对照组相比,差异显著($p < 0.01$)。

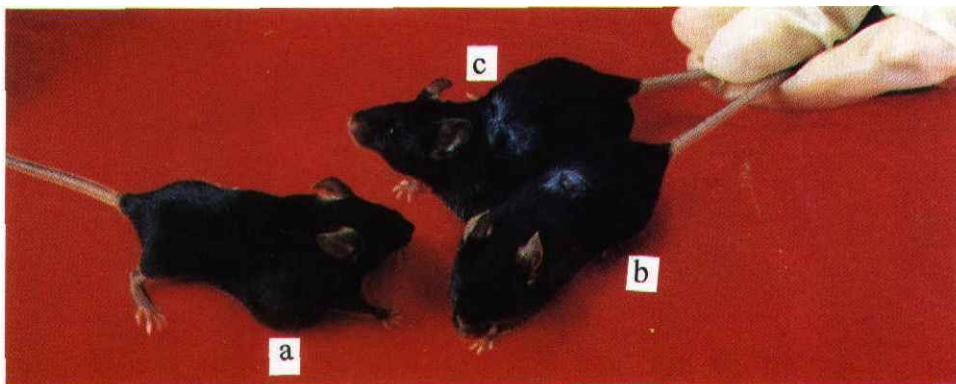
以上结果表明:人血管生成抑制素已在大肠杆菌中获得高效表达,表达产物具有免疫活性,并具有抑制血管生成和肿瘤生长的活性,有希望发展成为一种新的抗癌药物。

参 考 文 献

- 1 O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79: 315
- 2 O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine*, 1996, 2: 689
- 3 Vile R. Less blood means more sanguinity. *Current Biology*, 1995, 5: 10
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1994
- 5 付生法,陆应麟,张朝山,等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术. *军事医学科学院院刊*, 1993, 17: 294
- 6 Forsgren M, Raden B, Israelsson M, et al. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS LETTERS*, 1987, 213: 254



A



B

A. 重组人血管生成抑制素的血管生成抑制活性分析. a—对照组, b—实验组; B. 重组人血管生成抑制素的抑瘤活性分析. a—对照组(瘤体积 = $3\ 955 \pm 334\ \text{mm}^3$), b、c—实验组(瘤体积 = $158 \pm 16\ \text{mm}^3$)