

重组 GFP-VEGF6a 融合肽的构建表达及其抗肿瘤活性

孟雨菡¹, 刘素丽², 张会勇¹, 曹荣月¹, 范晓旭¹, 范豪^{2*}, 刘晶晶^{1**}(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ²上海一就生物医药有限公司, 上海 200030)

摘要 为了探讨血管内皮生长因子 6a (VEGF6a) 的抗肿瘤及其抑制外周血管生成活性, 采用两次加端 PCR 技术, 将 VEGF6a 片段的基因和绿色荧光蛋白 (GFP) 基因通过 GGGS 柔性片段融合, 连接至 pET28a 载体, 构建 GFP-VEGF6a (GFP6a) 融合肽 *E. coli* 表达菌。GFP6a 融合肽通过乳糖诱导表达和肝素亲和树脂精制得到。建立皮内和皮下移植型肝癌 ICR 小鼠模型, 验证了 VEGF6a 抑制肿瘤外周血管及抗肿瘤活性。结果表明, 与阴性对照 GFP 比较, GFP6a 200 mg/kg 组和 20 mg/kg 组均明显抑制肿瘤外周血管生成, 抑制 H22 肝癌细胞体内生长, 瘤重抑制率分别为 70.9% 和 56.1% ($P < 0.01$)。本研究显示, VEGF6a 具有潜在的抗肿瘤活性。

关键词 GFP-VEGF6a 融合肽; H22 细胞; 肝癌; 抑制血管生成

中图分类号 Q784; R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)01-0083-05

Construction, expression and activity studies of recombinant GFP-VEGF6a fusion polypeptide

MENG Yu-han¹, LIU Su-li², ZHANG Hui-yong¹, CAO Rong-yue¹, FAN Xiao-xu¹, FAN Hao^{2*}, LIU Jing-jing^{1**}

¹School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Shanghai Amtek Biomedical Co., Ltd., Shanghai 200030, China

Abstract To investigate the antitumor and anti-angiogenesis effects of vascular endothelial growth factor 6a (VEGF6a), VEGF6a and green fluorescent protein (GFP) gene were linked by GGGS segment and cloned into pET28a vector by PCR. GFP-VEGF6a (GFP6a) fusion polypeptides were expressed in *E. coli* and purified by heparin sepharose chromatograph. ICR mice bearing H22 hepatoma carcinoma cells was treated with subcutaneous injection of GFP6a and GFP. Compared with the negative control GFP, GFP6a (200mg/kg, 20 mg/kg) significantly inhibited the growth of the peripheral blood vessels and H22 cells *in vivo*, with the inhibition ratios of 70.9% and 56.1% ($P < 0.01$), respectively. VEGF6a has the potency in the application of anticancer clinical therapy.

Key words GFP-VEGF6a fusion polypeptide; H22 cell; hepatoma; angiogenesis inhibition

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772570, No. 30872393) and the National Fund for Fostering Talents of Basic Science (No. J0630858)

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是体内血管内皮细胞生长的特异性血管通透性因子和有丝分裂原, 它能促进肿瘤的新生血管形成, 为肿瘤细胞提供足够的营养进行生长、侵袭和转移^[1]。所以, VEGF 及其受体已成为近年抗肿瘤血管形成最具潜力的靶点之一^[2]。

其中 VEGF-A 的基因含 8 个外显子和 7 个内

含子, 其不同异构体是通过不同外显子 mRNA 剪接翻译而成。外显子 6a 编码的片段富含碱性氨基酸, 它与 VEGF 受体的亲和力最高, 理论上能阻碍 VEGF 结合到 VEGF 受体上^[3], 使 VEGF 受体无法酪氨酸化, 干扰内皮细胞功能和血管生成, 具有 VEGFR 拮抗剂的作用。James 等^[4]证明 VEGF 外显子 6a 编码的多肽片段能在肿瘤组织中积累, 有

* 收稿日期 2010-07-22 通讯作者 * Tel: 021-54489149 E-mail: fanhao@bioyiju.com

** Tel: 025-83271369 E-mail: minigene1@yahoo.com.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 30772570, No. 30872393); 国家基础科学人才培养基金资助项目 (No. J0630858)

抑制血管生成和抗肿瘤的潜力。Qin 等^[5]报道 VEGF189 外显子 6 编码的多肽能抑制体内卵巢癌细胞生长,转移。本文选择外显子 6a 编码的其中 18 肽作为研究对象,探索其抗肿瘤活性及机制。

本实验通过两次加端 PCR 法^[6]将 VEGF6a 中的 18 肽的基因串联至绿色荧光蛋白(GFP)基因 3' 端后,在 *E. coli* 中可溶性表达有荧光活性的 GFP-VEGF6a(GFP6a)融合蛋白。GFP6a 通过盐析、有机溶剂萃取、肝素琼脂糖树脂精制和冷冻干燥法纯化。建立皮内和皮下移植型肝癌 ICR 小鼠模型,初步验证 VEGF6a 抑制肿瘤外周血管和 H22 细胞生长的活性。

1 材料

1.1 试剂

分子克隆工具酶和试剂(大连宝生物公司);PCR 回收试剂盒和琼脂糖胶回收试剂盒(上海华舜生物工程公司);硫酸卡那霉素和质粒提取试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);引物合成与重组质粒测序(南京金思特生物科技有限公司);琼脂糖肝素树脂 CL-6B(诺蕾生物公司)。

1.2 质粒、菌株与动物

pET28a(+)-GFP 质粒, pET28a(+) 质粒, *E. coli* BL-21(DE3)均由本实验室保存。清洁级 6 周龄,雄性 ICR 小鼠购自扬州大学实验动物中心[合格证号 SCXK(苏)2007-0001]。

2 方法

2.1 GFP6a 基因的克隆

根据 GFP(GenBank 登录号:NC011521.1)与 VEGF189(GenBank 登录号:EU262734.1)序列,参考大肠杆菌的密码子偏爱性,由 Oligo 6 软件设计下列引物,上游引物 Up 添加 *Bsp*H I 酶切位点,与 GFP 的 5'端配对。下游引物 Down-1 添加 VEGF6a 部分序列,与 GFP 的 3'端配对,Down-2 添加 *Bam*H I 酶切位点和 VEGF6a 部分序列,其 5'端与 Down-1 的 3'端配对。

第一次 PCR 以 Up 与 Down-1 为引物,以 GFP-pET28a 质粒为模板,反应循环参数为:94 °C 5 min;94 °C 1 min,52 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。回收并纯化 PCR 产物 I;

第二次 PCR 以 Up 与 Down-2 为引物,以 PCR 产物 I 为模板,反应循环参数:94 °C 5 min,94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。回收并纯化 PCR 产物 II。

Table 1 DNA sequence of primers

| Name | Sequence of primers (from 5' to 3') |
|--------|--|
| Up | CGCTCATGA (<i>Bsp</i> H I) CTAGCAAAGGAGAAGAACTCT |
| Down-1 | GCCTTTACCCCTTACCACGAAACGGATTTAGAACC GCCACC GTTGTACAGTTTACCCATGC |
| Down-2 | GCGGGATCC (<i>Bam</i> H I) TTAACGGCTTTTCTTACGTTT GCGTTTCTGCGCTTTACCCTTACCACGAA |

2.2 GFP6a-pET28a 表达菌株的构建

PCR 产物 II 经 *Bsp*H I 和 *Bam*H I 37 °C 下双酶切 5 h,纯化回收酶切产物 I。采用碱抽提法小量提取 pET28a 质粒, pET28a 经 *Nco* I 和 *Bam*H I 37 °C 下酶切 5 h,纯化回收酶切产物 II;用 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接酶切产物 I 和酶切产物 II 过夜。连接产物转化至 *E. coli* BL21 感受态细菌,于含 50 mg/L 卡那霉素和 20% 乳糖的 LB 平板 37 °C 培养过夜;挑取绿色的阳性单克隆,扩大培养并作甘油管保存,并测序。

2.3 GFP 与 GFP6a 蛋白的表达

GFP 与 GFP6a 的重组菌经测序鉴定正确后,分别接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液 5 mL 中,培养过夜。培养液 5 mL 接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液 250 mL 中,加 20% 乳糖 5 mL 诱导,230 r/min 转速震荡培养 8 ~ 10 h,6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。

2.4 GFP 与 GFP6a 蛋白的纯化

纯化过程参见文献[7]。每克菌体溶解于 PBS 缓冲液 10 mL,反复冻融两次,加入溶菌酶至终浓度为 60 μg/mL, DNase I 至终浓度为 0.01%, 37 °C 搅拌 1 h。4 °C, 6 000 r/min 离心 20 min,收集上清。上清中边搅拌边缓慢加入三乙醇胺至终浓度为 100 mmol/L,并加入硫酸铵至终浓度为 1.6 mol/L(40% 饱和度),搅拌冰浴 1 h。4 °C, 6 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀。上清中边搅拌边缓慢加入硫酸铵至终浓度为 2.8 mol/L(70% 饱和度),使硫酸铵完全溶解。在此混悬液中加入 1/4 体积的乙醇,剧烈振摇,4 °C, 6 000 r/min 离心 5 min 收集上清。上清中加入 1/4 体积的正丁醇,剧烈振摇,4 °C, 6 000 r/min 离心 5 min 收集下层。

下层水相经 PBS 溶液透析过夜,恒流泵上样于 PBS 平衡后的琼脂糖肝素 CL-6B 柱。PBS 溶液冲洗肝素柱。用含 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 洗脱。洗脱蛋白进行透析脱盐。12% SDS-PAGE 鉴定纯化产物。冷冻干燥 GFP 和 GFP6a 蛋白, -20 °C 保存。

2.5 GFP6a 对肝癌组织周围新生血管的活性检测

选取 6 周龄 ICR 小鼠 12 只,随机分成 2 组(GFP6a 给药组和 GFP 对照组),每组 6 只,GFP6a 皮内接种 H22 细胞,接种量为每只 5×10^6 个细胞。GFP6a 组每天定时定点皮下注射 GFP6a 蛋白 PBS 溶液,给药剂量为 200 mg/kg。GFP 对照组每天定时定点皮下注射 GFP 蛋白 PBS 溶液,给药剂量为 200 mg/kg。连续给药 7 d 后处死小鼠,分离肿瘤周围腹部皮肤,观察肿瘤周围血管生长情况。

2.6 GFP6a 体内抗肿瘤活性实验

于小鼠腋下两侧皮下接种 H22 肝癌细胞悬液,接种量为每只每侧 5×10^6 个细胞。当肿瘤可见时,将荷瘤小鼠随机分为 4 组,每组 7 只,分别是 GFP6a 高、低剂量组(200, 20 mg/kg),PBS 空白组及 GFP 对照组(200 mg/kg)。于每只小鼠左侧肿瘤内部的皮下给药,右侧肿瘤附近(距瘤块 1 cm 左右范围内)皮下给药。连续给药 14 d 后处死小鼠,完整剥下肿瘤组织,测量肿瘤组织的重量拍照。瘤重抑制率(%) = $(1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100$ 。

2.7 结果统计

采用 SPSS 10.0 统计软件,瘤重抑制率的比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 pET28a-GFP6a 表达载体的构建

GFP6a 为包含有人内皮生长因子 VEGF189 (142 ~ 160) 的 261 个氨基酸的多肽,其具体序列为: GFP 多肽序列 3' 端连接 GGGSKS-VRGKKGQKRKRKKS。其中“GGGS”为柔性肽段,以保证 VEGF6a 片段能自由活动。“KS-VRGKKGQKRKRKKS”为 VEGF6a 片段,富含碱性氨基酸。

通过对该克隆进行测序,经序列分析 GFP6a 融合基因序列正确, GFP6a 片段成功插入到

pET28a *Nco* I 和 *Bam*HI 之间。DNASTAR 软件分析融合蛋白中“GGGS”连接多肽具有良好的柔韧性。

3.2 GFP6a 表达诱导

GFP6a 融合蛋白以可溶性形式表达,表达量约占总蛋白含量的 76% (图 1)。目的蛋白在诱导 8 h 表达量达到最大。

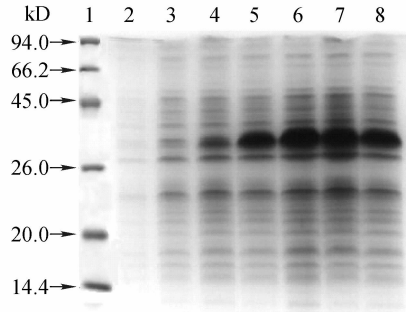


Figure 1 12% SDS-PAGE analysis of expression GFP6a induced by lactose for different time

Lane 1: protein molecular marker ; Lane 2-8: induced for 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 h, respectively

3.3 GFP6a 与肝素结合能力

通过 GFP6a 和 GFP 与肝素琼脂糖亲和柱的结合实验发现,绿色的 GFP6a 融合肽上样后聚集在肝素琼脂糖填料上层,能长时间停留在柱中,不能被平衡液洗脱出,可利用高盐溶液洗脱出 GFP6a。GFP 缺少 VEGF6a 片段,不能与填料结合,GFP 直接随上样液和洗脱液流出肝素柱。说明 GFP6a 利用了碱性的 VEGF6a 片段与肝素琼脂糖树脂 CL-6B 结合。

3.4 纯化后 GFP6a 和 GFP 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

12% SDS-PAGE 电泳图(图 2)显示,纯化后 GFP6a 和 GFP 的泳道均呈现单一条带,GFP6a 纯度约为 91%,GFP 纯度超过 95%。GFP6a 条带位置正确,符合其约 29.0 kD 的相对分子质量。未诱导的两种重组菌不能表达 GFP 和 GFP6a 蛋白。

3.5 GFP6a 的体内抗肿瘤周围血管生成结果

给药 14 d 后处死小鼠,分离腹部皮肤,比较 GFP6a 用药组和 GFP 阴性对照组肿瘤周围血管生长情况。发现 200 mg/kg GFP6a 表现出很强的抑制血管生成的活性(图 3),GFP6a 用药组的肿瘤周围的毛细血管明显减少。

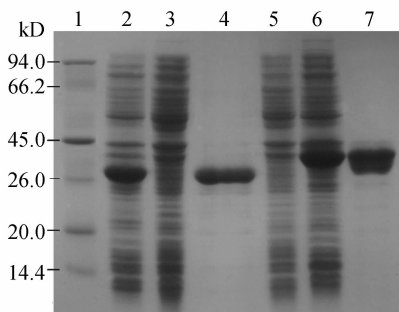


Figure 2 12% SDS-PAGE analysis of GFP6a and GFP

Lane 1: Molecular mass marker; Lane 2: Lactose-induced expression of GFP in pET-28a/BL21; Lane 3: Non-inducing expression of GFP in pET-28a/BL21; Lane 4: Purified GFP; Lane 5: Non-inducing expression of GFP6a in pET-28a/BL21; Lane 6: Lactose-induced expression of GFP6a in pET-28a/BL21; Lane 7: Purified GFP6a

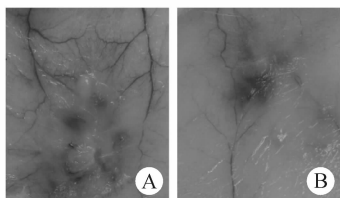


Figure 3 Blood vessels nearby tumor of GFP group (A) and GFP6a group (B)

3.6 GFP6a 体内抗 H22 细胞生长作用

瘤内皮下给药 GFP6a 200 mg/kg 组、GFP6a 20 mg/kg 组和 GFP 对照组平均瘤重分别为 0.155, 0.229, 0.531 g (肿瘤形态对比见图 4)。GFP6a 200 mg/kg 组和 GFP6a 20 mg/kg 组的瘤重抑瘤率分别达到 70.9% 和 56.1%, 均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

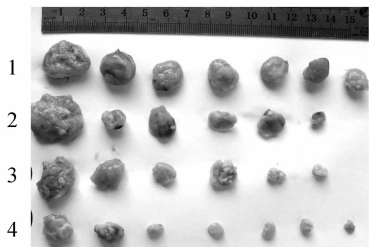


Figure 4 Tumor appearance by injecting drugs into tumor tissues
1: PBS; 2: GFP; 3: GFP6a (20 mg/kg); 4: GFP6a (200 mg/kg)

瘤外皮下给药 GFP6a 200 mg/kg 组、GFP6a 20 mg/kg 组和 GFP 对照组平均瘤重分别为 0.213, 0.466, 0.575 g (肿瘤形态对比见图 5)。GFP6a 200 mg/kg 组和 GFP6a 20 mg/kg 组的瘤重抑瘤率分别达到 63.0% ($P < 0.05$) 和 20.0%。

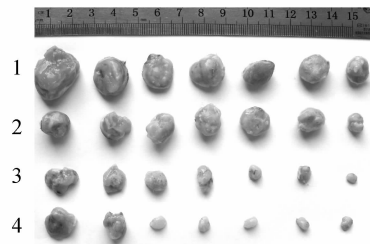


Figure 5 Tumor appearance by injecting drugs around tumor tissues
1: PBS; 2: GFP; 3: GFP6a (20 mg/kg); 4: GFP6a (200 mg/kg)

4 讨论

VEGF6a 为 VEGF 蛋白中富含碱性氨基酸的 18 肽,理论上应采用多肽逐步固相合成法制备,但考虑药理药效实验需要大量 VEGF6a,化学合成成本太高(每毫克 3 300 元),故设计采用基因工程法融合表达 VEGF6a 蛋白。

本研究利用原核表达系统成功地获得了 GFP6a 融合肽,并克服原核表达系统不能折叠成正确构象的困难。GFP6a 融合肽保留了 GFP 的荧光性质,可由 GFP 荧光性质观察融合肽的状态,发现该融合肽稳定性好,在纯化和保存过程中不易变性;设计以可溶性形式表达,表达效率较高,便于纯化操作。并且,该融合肽保留 VEGF6a 片段的碱性特征,能结合于酸性物质,为 VEGF6a 片段能结合于 VEGF 受体提供的实验依据。

肝癌临床上 5 年生存率低,VEGF6a 抑制肝癌细胞的生长实验尚未见文献报道。本研究在治疗小鼠移植性肝癌实验中,以 GFP 蛋白为阴性对照,证明了 VEGF6a (200, 20 mg/kg) 对肝癌有显著的抑制作用,瘤重抑制率能达到 70%。利用体内存在的 VEGF 片段治疗肝癌,与具有细胞毒性的外源抗癌药物相比,理论上 VEGF6a 的组织相容性较好,不良反应率较低,安全性较高。VEGF165b 缺少 VEGF6a 片段,虽然被证明能对抗 VEGF165 的促血管和 A375 黑色素瘤生成作用,但是单独使用对肿瘤抑制作用较小^[8]。本实验中 GFP6a 剂量较大,因为考虑到 VEGF6a 占 GFP6a 总分子量比例较小(仅为 6.8% 左右),并且多肽类皮下给药的生物利用度较低,后续实验的给药方式可改进为静脉给药,以降低给药剂量。

本研究初步判定 VEGF6a 能抑制肿瘤周围血管生长,故推测 VEGF6a 通过抑制血管生成,达到

破坏肿瘤营养来源的目的,从而抑制肿瘤生成。本课题组计划在后续的研究中利用 GFP 高灵敏度的荧光性质,直接活体观察 GFP6a 在组织中的确切位置,以表明 VEGF6a 的作用靶点和聚集特性。

参 考 文 献

- [1] Kiselyov A, Balakin KV, Tkachenko SE. VEGF/VEGFR signaling as a target for inhibiting angiogenesis[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, **16**(1): 83 - 107.
- [2] Gomika U, Caroline R, Rolf A, et al. A peptoid antagonist of VEGF receptor 2 recognizes a 'hotspot' in the extracellular domain distinct from the hormone-binding site [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **16**(12): 6 338 - 6 343.
- [3] Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review [J]. *Blood Cell Mol Dis*, 2007, **38**(3): 258 - 268.
- [4] James B, Jia HY, Azadeh BF, et al. A peptide encoded by exon 6 of VEGF(EG3306) inhibits VEGF induced angiogenesis *in vitro* and ischaemic retinal neovascularisation *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**(4): 793 - 799.
- [5] Qin ZX, Li QW, Liu GY, et al. Imaging targeted at tumor with 188re-labeled VEGF189 exon 6-encoded peptide and effects of the transfecting truncated KDR gene in tumor-bearing nude mice [J]. *Nucl Med Biol*, 2009, **36**(5): 535 - 543.
- [6] Tatiana L, Gordeeva LN, Sergei PS. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, **81**(2): 147 - 152.
- [7] Alexander VY, Leonid MV, Alexey KS, et al. Green fluorescent protein purification by organic extraction [J]. *Protein Expr Purif*, 1998, **14**(3): 382 - 386.
- [8] Emma SR, Maryam AH, Edward R, et al. Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice [J]. *Eur J Cancer*, 2008, **44**(13): 1 883 - 1 894.

· 本 刊 讯 ·

《中国药科大学学报》召开 2010 年度编委会

2010 年度《中国药科大学学报》编委会于 2011 年 1 月 12 日在南京凤凰台酒店召开,在宁近 40 位编委和编辑部全体工作人员参加了会议。

会议由《中国药科大学学报》副主编王明时教授主持并致欢迎辞。首先由《中国药科大学学报》编辑部主任邹栩编审作 2010 年《中国药科大学学报》工作汇报:《中国药科大学学报》在 2010 年取得了骄人成绩:复合影响因子为 1.171,位居全国药学期刊第 4 位;即年下载率由 2009 年的 42% 提高至 2010 年的 51%,学术影响力和传播力大幅攀升。《中国药科大学学报》在 2010 年度内获得集体、个人多项荣誉:《中国药科大学学报》2010 年第 3 次蝉联“中国高校精品科技期刊”称号。编辑部成员获得第六届中国科技期刊青年编辑骏马奖、首届华东地区优秀期刊工作者、江苏省新闻出版技能大赛铜奖等单项奖。在总结中,邹栩主任对一年来编委们的辛勤工作表示感谢,并呼吁编委们在 2011 年继续支持《中国药科大学学报》的发展,力争为本刊“组稿一篇、投稿一篇、审稿一篇”。

接着,中国药科大学期刊编辑部主任郑晓南编审回顾了《中国药科大学学报》发展,老一辈编委为学报成长所作出的贡献,并对期刊编辑部 2010 年总体发展情况进行了汇报。中国药科大学副校长、《中国药科大学学报》副主编王广基教授也在编委会致辞,在致辞中王广基校长充分肯定了《中国药科大学学报》编辑部在 2010 年的工作,感谢编委和编辑部成员为《中国药科大学学报》作出的无私奉献,希望今后继续加强组稿工作,保持本刊在中国药学期刊的领先地位。

最后,《中国药科大学学报》主编彭司勋院士作了总结,感谢各位编委对学报工作的支持以及编辑部成员的努力工作,希望今后编委们继续发挥作用,群策群力,把学报办得更好,最后向编委们表达了新年祝福。

(本刊编辑部)