

重组人 canstatin 表达产物的抗肿瘤活性鉴定

冬毕华,唐运莲,蒋日成

Identification of Recombinant Human Canstatin's Biological Activity

DONG Bi-hua, TANG Yun-lian, JIANG Ri-cheng

Cancer Research Institute of NanHua University, HengYang 421001, China

Abstract: Objective To construct human canstatin gene prokaryotic expression vector. To express recombinant human canstatin in *E. coli* M15 [pREP4] and investigate its biological activity. **Methods** The obtained canstatin cDNA fragment was subcloned into the BamH_I and Hind_{III} sites of pQE30 prokaryotic expression vector. The recombinant protein was expressed with induction of IPTG in *E. coli* M15 [pREP4]. After the purification and renaturation of the expression product, its anti-angiogenesis biological activity was detected by using geneic mice with Lewis lung carcinoma. **Results** Prokaryotic expression vector of recombinant human canstatin was successfully constructed and the recombinant protein was highly expressed after induction with IPTG. After the administration of the purified recombinant protein, subcutaneous inoculated tumor was smaller than those of controls, and looked pale with sparse capillaries, necrosis could be seen commonly. The percentage of the tumor weight inhibition was 60%. The percentage of the lung metastatic foci inhibition was 74.3%. **Conclusion**

(1) The human canstatin prokaryotic expression vector was constructed successfully. (2) Recombinant human canstatin protein was expressed in *E. coli* M15 [pREP4] in high level, and purified with affinity chromatography methods. (3) The purified recombinant protein showed the anti-angiogenesis activity. The expression and application of human canstatin gene lay the foundation of the anti-angiogenesis therapy of tumors.

Keywords: Recombinant human canstatin; Prokaryotic expression; Identification of biological activity

摘要:目的 正确构建人 canstatin 原核表达载体,诱导表达重组人 canstatin 融合蛋白,并对其活性鉴定。方法 将人 canstatin cDNA 亚克隆入 pQE30,构建重组质粒 pQE30-canstatin;转化 M15 [pREP4] 中, IPTG 诱导表达,纯化回收表达产物,复性后用 Lewis 肺癌移植瘤模型对其活性鉴定。结果 成功构建人 canstatin cDNA 表达载体,纯化回收,获得高纯度 canstatin 重组蛋白。纯化产物在体内能抑制 Lewis 肺癌移植瘤血管的生成,从而抑制肿瘤生长和转移,抑瘤率(%)为 60.0%,转移抑制率(%)为 74.3%。结论 (1)成功构建了原核表达载体 pQE30-canstatin。(2)重组人 canstatin 融合蛋白在原核表达系统中高水平表达,并获得高纯度 canstatin 重组蛋白。(3)重组 canstatin 融合蛋白可抑制 Lewis 肺癌移植瘤血管的生成,从而抑制肿瘤生长和转移活性。

关键词:重组人 canstatin; 原核表达; 活性鉴定

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)05-0273-03

0 引言

近年来对血管生成抑制素^[1](angiostatin)、内皮抑素^[2](endostatin)等血管生成抑制剂的研究已取得了丰硕的成果。

最新研究表明 canstatin 可剂量依赖性抑制内皮细胞管结构形成,有效抑制内皮细胞增殖和转移,且能诱导内皮细胞凋亡。其抑制肿瘤生长的效力可能超过内皮抑素^[3]。这预示 canstatin 将成为极有发展前景的血管生成和肿瘤生长抑制剂。

为了对 canstatin 的深入研究,我们克隆了 canstatin 基因,并按正确的阅读框架将其次级定向

克隆入 pQE30 表达载体中,与氨基末端的 6-组氨酸亲和标记物作为融合蛋白进行诱导表达,用 Ni-NTA 蛋白亲和层析进行纯化回收。回收的表达产物具有明显抑制新生血管生成,进而抑制肿瘤生长和转移的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

E. coli DH5 由阎宏伟惠赠, *E. coli* M15 [pREP4] 由王建博士惠赠,质粒 pQE30 表达载体购自 QIAGEN 公司(基因公司代理)。

1.1.2 试剂

低分子量标准蛋白质:购于 Promega 公司(华美公司代理);T₄ DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、限制

收稿日期:2003-05-12;修回日期:2003-09-22

作者单位:421001 湖南衡阳,南华大学肿瘤所

性内切酶 BamH 和 Hind 及 Xba、DNA 分子量标准:购于 MBI 公司(上海生工代理);Ni-NTA 蛋白亲和纯化试剂盒(Ni-NTAS pinKit):购自 QIAGEN 公司(基因公司代理)。

1.1.3 实验动物

Lewis 肺癌荷瘤小鼠购于中国医科院药物研究所。C₅₇BL/6N 小鼠购于北京维通利化公司,合格证号为 SCXK(京)2002-0003。6~7 周龄,体重(18+1.5)g,雌雄兼用。

1.2 方法

1.2.1 canstatin 原核表达载体的构建

经测序证实的重组质粒 DNA 以 BamH 和 Hind 双酶切纯化回收后,与同样处理的 pQE30 表达载体经 T₄ DNA 连接酶连接,构建 pQE30-Canstatin 载体,转化 DH5,挑选阳性克隆,裂解提取质粒以 PCR 及 BamH 和 Hind 双酶切鉴定。然后转化大肠杆菌 M15_[pREP4],少量培养,提取质粒双酶切鉴定。

1.2.2 canstatin 蛋白表达与纯化

挑取 pQE30-Canstatin 阳性 M15_[pREP4] 克隆入 5ml 含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中,37 振荡培养过夜,取菌液 3ml 接种到 60ml 含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中剧烈振荡培养至 OD₆₀₀为 0.6 左右,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,继续培养 6h,诱导表达前及其后每 2h 取菌液 1ml,12000 g 离心取菌,加入 1 × SDS 上样缓冲液,沸水浴 5min,离心取上清 20μl,用 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 12%)对表达产物进行鉴定。按 Ni-NTA 蛋白亲和纯化试剂盒(Ni-NTAS pinKit)说明纯化回收重组蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.2.3 重组蛋白复性透析

加 9 倍体积的复性缓冲液(0.1mol/L 磷酸二氢钠 NaH₂PO₄ pH 7.4;6mol/L 尿素 Urea;150mmol/L 氯化钠 NaCl;2mmol/L 还原型谷胱胱;1mmol/L 氧化型谷胱胱)4 放置 24h,透析。BCA 法测定蛋白浓度。用聚乙二醇(PEG)进行浓缩,调蛋白浓度为 2mg/ml。

1.2.4 融合蛋白生物学活性鉴定

(1) 颈椎脱臼法将荷瘤小鼠处死,剪切良好的肿瘤组织,称重,按照肿瘤(g):生理盐水(ml)为 1:3 的比例加入生理盐水在玻璃匀浆器中研磨,过 300 目滤网。用注射器吸取细胞悬液,消毒小鼠腹部外侧皮肤,按每只 0.3ml(约 2 × 10⁶ 个细胞)作皮下注射。10 只实验小鼠,随机分为两组,各 5 只,雌雄兼用。(2) 待肿瘤长至约 200mm³ 时(约为接种后第 5 天),腹腔注射 canstatin 重组蛋白 10mg/(kg·d),隔日给

药。对照组给予相同体积的灭菌 PBS。从给药日至第 16 天,颈椎脱臼处死小鼠,先称体重,后解剖小鼠,显露肿瘤,观察血管生长情况,肺转移情况。剥离肿瘤,称重后用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色。(3) 观察肿瘤生长、移植瘤血管生成抑制情况和肿瘤肺转移情况,同时注意 canstatin 重组蛋白的毒副作用。采用疗效指标抑瘤率(%)、肺表面转移抑制率(%) ,并作统计学处理。计算公式为:肿瘤抑制率=(1-T/C) × 100%,T 和 C 分别为给药组和对照组平均瘤重,肺表面转移抑制率=[1-(给药组转移数/对照组转移数)] × 100%; 统计学分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组表达载体 pQE30-Canstatin 的构建和鉴定

重组质粒 pQE30-Canstatin 经 PCR 及 BamH 和 Hind 双酶切鉴定,获得 483bp 条带。证实片段已经插入载体中,见图 1。

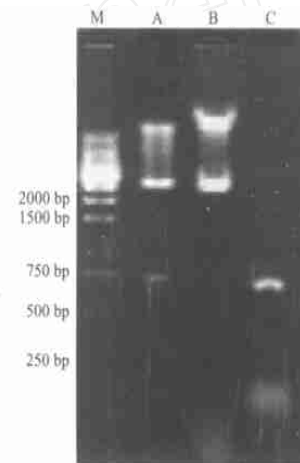


图 1 pQE30 Canstatin 质粒的 BamH and Hind 酶切片段和 PCR 扩增片段

M: 核酸标准分子量条带

A: pQE30-Canstatin 质粒用 BamH and Hind 双酶切消化的片段

B: 没有消化的 pQE30-Canstatin 质粒

C: pQE30-Canstatin 质粒的 PCR 扩增片段

2.2 重组质粒的表达与纯化

pQE30-Canstatin 重组质粒转化的阳性 M15_[pREP4] 大肠杆菌,在 1.0mmol/L IPTG 诱导下,表达于 4h 达高峰。表达蛋白分子量约为 24KD,与推测蛋白大小相仿,所表达的蛋白约占总菌体蛋白的 20%。亲和纯化后获得高纯度的重组蛋白,见图 2。

2.3 Canstatin 活性测定

与对照组相比,实验组小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤体积明显小,重量轻($P < 0.05$),坏死常见,抑

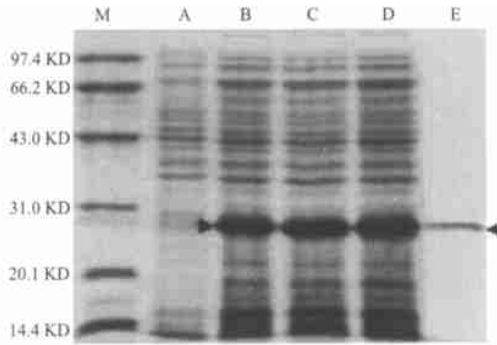


图 2 大肠杆菌 M15 中 Canstatin 的表达

M: 蛋白质标准分子量条带
 A: 诱导前的蛋白表达
 B: 诱导 2 小时后的蛋白表达
 C: 诱导 4 小时后的蛋白表达
 D: 诱导 6 小时后的蛋白表达
 E: 用 Ni-NTA 亲和纯化的重组蛋白

瘤率 (%) 为 60.0% , 对照组肿瘤颜色红润, 毛细血管丰富, 扩张迂曲, 易出血, 体积大。实验组肿瘤颜色苍白, 毛细血管稀少, 较少出血, 坏死多, 体积小。对照组肺转移结节大, 数目多; 实验组肺转移结节小, 数目少 ($P < 0.05$), 转移抑制率 (%) 为 74.3% , 见图 3a、3b。在整个治疗用药过程中两组小鼠活动良好, 未见脱毛、腹泻等副反应。

表 1 Canstatin 重组蛋白对 Lewis 肺癌皮下移植瘤抑制作用

组别	动物数 (只)	体重 ($\bar{x} \pm s$) (g)		瘤重 ($\bar{x} \pm s$) (g)	抑瘤率 (%)	P
		实验前	实验后			
PBS 组	5	20.00 ± 1.40	23.38 ± 1.29	5.08 ± 0.82		
用药组	5	19.58 ± 1.66	20.70 ± 1.71	2.05 ± 0.23	60.0	<0.01

表 2 Canstatin 重组蛋白对 Lewis 肺癌转移抑制作用

组别	动物数 (只)	肺表面转移结节数 ($\bar{x} \pm s$) (个)	转移抑 制率 (%)	P
PBS 组	5	7.00 ± 1.58		
用药组	5	1.80 ± 1.10	74.3	<0.05

3 讨论

我们成功克隆了 canstatin 基因, 并按正确的阅读框架将其次级定向克隆入 pQE30 表达载体中, 与氨基末端的 6-组氨酸亲和标记物作为融合蛋白进行诱导表达, 用 Ni-NTA 蛋白亲和层析进行纯化回收。获得高纯度 canstatin 重组蛋白, 该重组蛋白能在 M15 大肠杆菌中稳定表达, 产量较高。实验证明

canstatin 融合蛋白可以抑制 Lewis 肺癌皮下移植瘤生长和转移, 抑瘤率 (%) 为 60.0% , 转移抑制率 (%) 为 74.3% , 且在整个治疗用药过程中小鼠活动良好, 未见脱毛、腹泻等副反应。考虑到实验所给予的融合蛋白为原核表达载体表达产物, 并且隔日给药剂量不高, 可以肯定 canstatin 蛋白将成为极有开发应用前景的血管生成抑制剂。

Folkman 认为在肿瘤的发展及转移过程中, 肿瘤血管生成是最关键的, 因此抑制血管生成或许能作为治疗癌症的一种新方法。但他又认为: 这种治疗策略即使能成功, 也不是彻底治愈, 而是阻止肿瘤继续生长或者促使已生长的肿瘤消退到直径为 1 ~ 2mm 大小, 它不能根除所有肿瘤细胞, 此时, 肿瘤在没有血管供应下继续生存是可能的。这种治疗方法被认为是“诱导休眠”。一旦治疗停止, 肿瘤可能复发, 难以达到彻底治疗的目的。鉴于此, 为提高内源性血管生成抑制因子的治疗效果, 我们应考虑以下几个方向: (1) 联合治疗: 即抑制血管生成治疗与放疗、化疗、手术、免疫治疗等联合应用, 或者几种血管生成抑制因子合用, 相辅相成, 协同治疗。(2) 基因治疗: 即用携带血管生成抑制因子的载体进行治疗, 可以延长作用时间, 降低用药剂量。(3) 靶向治疗: 即利用肿瘤或血管内皮特异性受体, 将高浓度药物靶向于病灶而非全身治疗。(4) 延长药物半衰期: 即使血管生成抑制因子在体内缓慢释放, 保持稳定的血药浓度。

总之, canstatin 蛋白作为一种新型血管生成抑制剂, 具有明显抑制新生血管生成的活性。本实验的完成将为 canstatin 的真核表达、单克隆抗体的制备、基因治疗、联合应用等提供依据和奠定基础。

(本文图 3a、3b 见封 3)

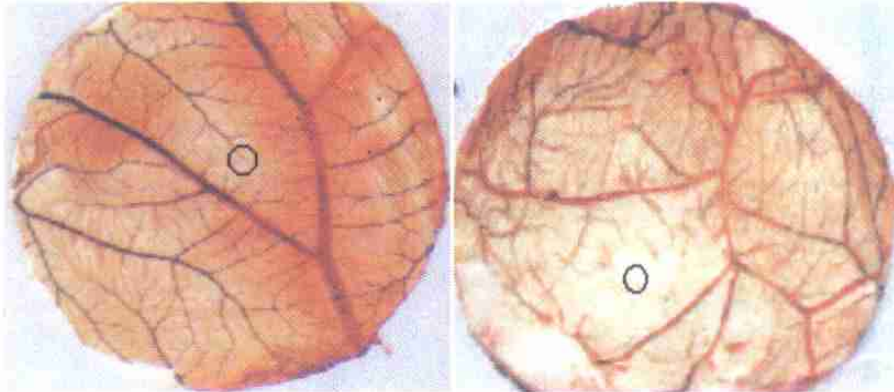
参考文献:

- [1] O'Reilly MS, Holmgren L, Shin g Y, et al. An angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma [J]. Cell, 1994, 79 (2): 315-328.
- [2] O'Reilly MS, Boehm T, Shin g Y, et al. Endostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of tumor growth [J]. Cell, 1997, 88 (2): 277-285.
- [3] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (2): 1209-1215.

[编辑: 刘红武; 校对: 贺文]

紫杉醇抗血管生成作用的实验研究

(正文见 282 页)



生理盐水组血管生长未受抑制

紫杉醇(7nmol/L组)血管生长明显受抑

图 3 鸡胚尿囊膜血管新生被抑制的阴性和阳性结果

重组人 canstatin 表达产物的抗肿瘤活性鉴定

(正文见 273 页)

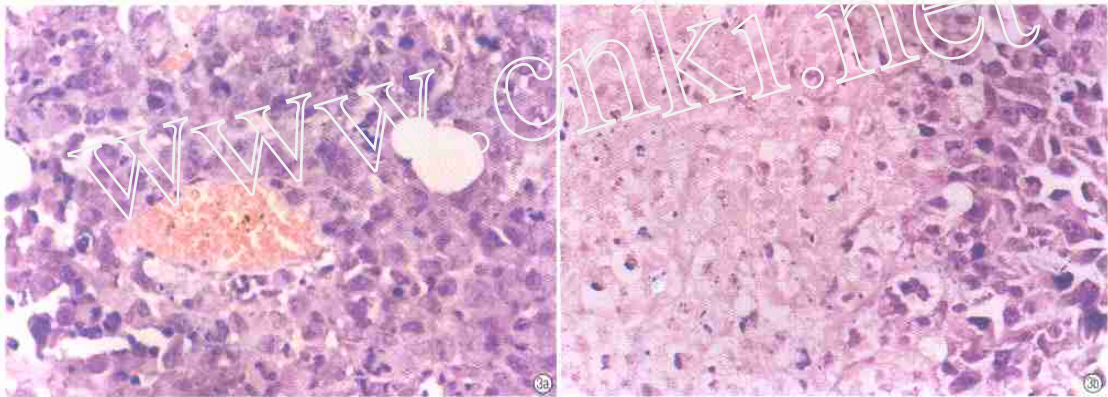


图 3a 对照组 Lewis 肺癌小鼠皮下移植肿瘤病理切片 (HE × 400)

图 3b 实验组 Lewis 肺癌小鼠皮下移植肿瘤病理切片 (HE × 400)

p16 蛋白和 VEGF 在乳腺癌组织中的表达及相关性研究

(正文见 257 页)

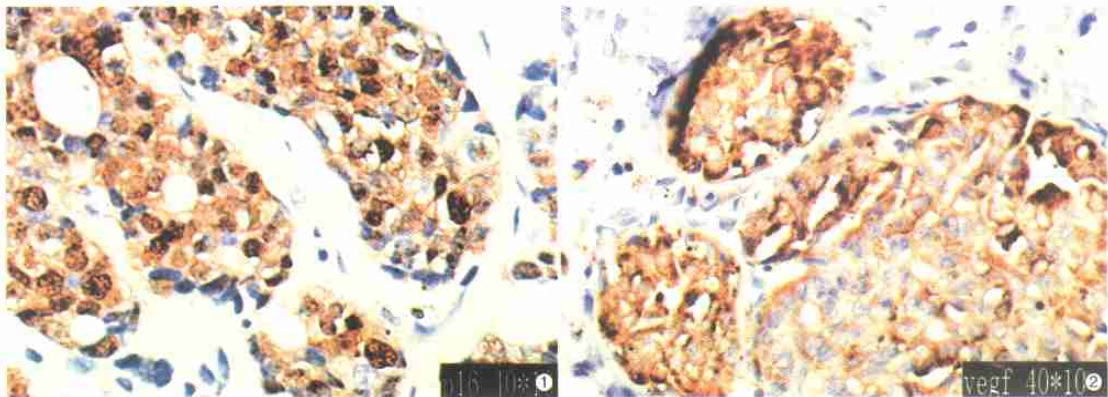


图 1 乳腺癌组织中 p16 蛋白阳性表达, 位于胞核内 (SABC × 400)

图 2 乳腺癌组织中 VEGF 阳性表达, 位于胞浆内 (SABC × 400)