

重组人 Endostatin/MBP 融合蛋白片段的构建 及体外抑制内皮细胞增殖活性

李 希 徐根兴* 王建军

(南京大学生物科学与技术系 南京 210093 *第二军医大学南京医学院 南京 210049)

自从70年代Folkman提出血管生成是实体瘤生长与转移的必要条件后,人们逐步发现肿瘤会产生vEGF和bFGF等许多促血管生长因子^[1],并可产生Angiostatin^[2]和Endostatin^[3]等血管生长抑制因子,这些因子构成一个动态的平衡体系,调节血管的生成。从而提示人们,可以通过抑制肿瘤血管生成来抑制肿瘤的生长和转移^[4,5]。1997年,O'Reilly和Folkman在培养鼠内皮细胞瘤(EOMA)细胞过程中,发现了一种分子量为20KD的新的蛋白,经序列分析证明为鼠胶原蛋白十八的C末端片段,并将其命名为Endostatin^[3]。我国徐根兴等也在研究内皮细胞的过程中发现了人Endostatin,并从人肝脏cDNA文库中筛选克隆得到人endostatin基因^[6],经大肠杆菌表达出的重组Endostatin蛋白,分子量为18KD,溶解度很低,研究中有一定困难,为此我们采用Endostatin/MBP(麦芽糖结合蛋白Maltose Binding Protein,MBP)融合蛋白使其可溶。利用限制性内切酶酶切构建了不同endostatin片段基因质粒,经大肠杆菌表达,亲和层析纯化得到rh Endostatin/MBP不同片段的融合蛋白,目的为研究其体外抑制内皮细胞增殖的活性,从而寻找Endostatin的活性作用片段。

材料与方 法

1. 材料

质粒载体pMAL-c2和工程菌*E. coli* DH₅ α 、bFGF以及牛肾上腺微血管内皮细胞株(Bovine Adrenal Capillary Endothelial Cell,BCE)由美国纽约大学医学院任敏东博士惠赠;限制性内切酶、TaqDNA聚合酶、T4DNA

连接酶等为Pharmacia Biotech产品;细胞培养基DMEM购自GIBCO/BRL公司;亲和层析柱MBP融合蛋白纯化柱Amylose Resin Beads(#800)购自New England Biolabs公司。

2. 方法

(1)DNA操作方法 质粒提取、酶切、连接、转化、鉴定等按参考文献6。

(2)片段的构建 根据人endostatin基因酶切图谱的酶切位点,用相应的内切酶(参见图1)对endostatin基因酶切,连接到pMAL-c2载体上形成含不同endostatin基因片段的基因重组质粒。

(3)大肠杆菌表达产物的鉴定 将含有人endostatin不同基因片段的pMAL-c2重组质粒转化到*E. coli* DH₅ α 中,接种于含有100 μ g/ml青霉素的LB培养液中,待其生长至OD₆₀₀为0.4-0.6时,用1mmol/L IPTG诱导4小时,离心收集菌体,进行SDS-PAGE实验观察表达情况。

(4)rh Endostatin/MBP纯化 菌体溶解于裂解缓冲液(0.1mol/L PBS,0.5mol/L NaCl,0.25% Tween20,10mmol/L 2-巯基乙醇,10mmol/L EDTA,10mmol/L EGTA),超声粉碎,15000g离心,按100:1(V/V)比例将上清与MBP亲和层析柱4 $^{\circ}$ C结合24小时,用裂解缓冲液和0.1mol/L PBS洗,再用10mmol/L麦芽糖洗脱下rh Endostatin/MBP。不同Endostatin基因片段的MBP融合蛋白表达纯化均按以上方法进行。

(5)rh Endostatin/MBP不同片段的融合蛋白体外抑制血管内皮细胞增殖实验 BCE细胞接种于铺有一层1.5% Gelatin(Hanks液配制)的灭菌培养瓶中37 $^{\circ}$ C培养,选取生长良好的细胞以12500个/孔的浓度接种于24孔培养板,培养液为DMEM+10% BCS+1% GPS,37 $^{\circ}$ C,10% CO₂温育24小时,然后换用0.25ml/孔含有9个不同浓度Endostatin/MBP的上述培

本文1999年9月13日收到,2000年1月12日接受。

养液,每种 rh Endostatin/MBP 片段均采用终浓度分别为 16 ng/ml, 32 ng/ml, 63 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000ng/ml, 2000ng/ml, 4000ng/ml, 培养 20 分钟后,每孔再加入 0.25ml 含 bFGF 的 DMEM 培养液, bFGF 的最终浓度为 1ng/ml, 37°C, 10% CO₂ 温育 72 小时, 吸去上清, 每孔用 0.5ml 0.05% Trypsin + 10mmol/L EDTA 消化细胞, 悬浮于 Hematall 器 (Fisher Scientific 产品) 中, 按产品说明方法, 用计数器计数。

结 果

1. rh Endostatin/MBP 不同片段的融合蛋白表达质粒的构建

利用 PCR 技术, 首先获得全长人 endostatin 基因, 在 PCR 引物中插入了酶切位点 EcoRI 和 BamHI。分别用不同的内切酶对 endostatin 基因酶切, 得到大小不同的 5 种基因片段 (如图 1), 分别编号为 A11 (全长 endostatin, 552bp, 184aa), ΔN_1 (486bp, 162aa), ΔN_2 (390bp, 130aa), ΔN_3 (264bp, 88aa), ΔC (288bp, 96aa), $\Delta N\Delta C$ (126bp, 42aa)。

然后将上述不同片段和 pMAL-c2 载体连接, 并转化到 *E. coli* DH_{5a} 中, 转化子经菌落筛选, DNA 酶切鉴定得到阳性重组子。

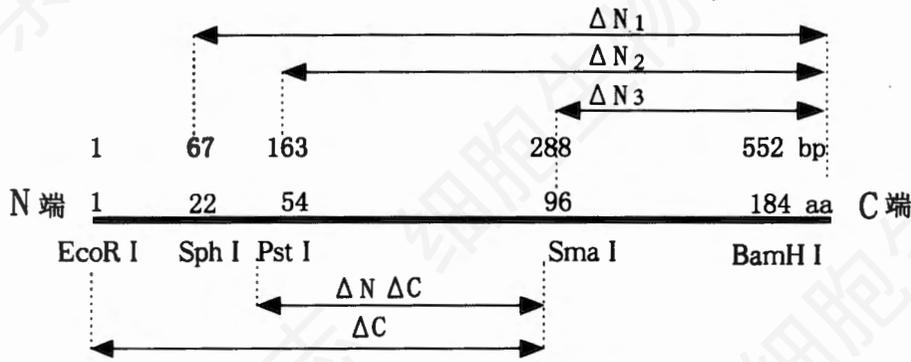


图 1 endostatin 基因酶切的五种不同基因片段及酶切情况

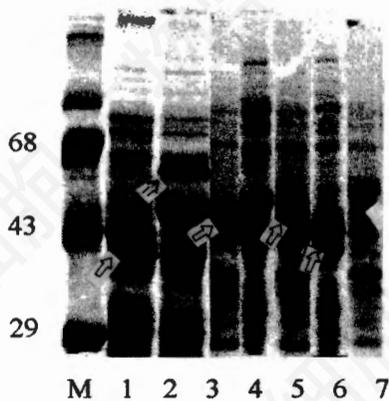


图 2 不同片段 rh Endostatin/MBP 融合蛋白表达图
1. MBP 2. A11 3. ΔN_2 4. ΔN_1 5. ΔN_3 6. $\Delta N\Delta C$ 7. ΔC

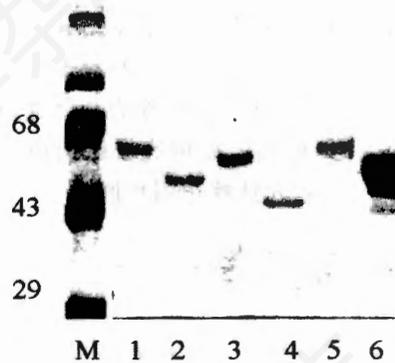


图 3 不同片段 rh Endostatin/MBP 融合蛋白 SDS-PAGE 分离图
1. A11 2. ΔN_2 3. ΔN_1 4. $\Delta N\Delta C$ 5. ΔC 6. ΔN_3

2. rh Endostatin/MBP 不同片段的融合蛋白在大肠杆菌中表达及纯化

将含重组质粒 pMAL-c2 的 *E. coli* DH₅ α 于 37℃ 培养,待其生长至 OD₆₀₀0.4-0.6 时用 1 mmol/L IPTG 诱导 4 小时,离心收集菌体,经 SDS-PAGE 电泳观察表达情况,空载体表达的 MBP 为 40KD,各片段融合蛋白的分子量在 40KD 到 68KD 之间(图 2)。再采用 MBP 亲和层析柱纯化得到 rh Endostatin/MBP 不同片段融合蛋白,其中 A11 分子量约为 58KD, ΔN_1 分子量约为 56KD, ΔN_2 分子量约为 53KD, ΔN_3 分子量约为 49KD, ΔC 分子量约为 50KD, $\Delta N\Delta C$ 分子量约为 45KD(图 3)。

3. rh Endostatin/MBP 融合蛋白体外抑制内皮细胞生长增殖与 bFGF 的影响

在培养的内皮细胞 BCE 中加入 bFGF 后细胞迅速增殖,加入 rh Endostatin/MBP 融合

蛋白能有效地抑制内皮细胞的增殖(图 4)。从图中可以看出,当 1000ng/ml rh Endostatin/MBP 融合蛋白就显示出较强的抑制由 bFGF 刺激引起的内皮细胞的增殖效应。

4. rh Endostatin/MBP 不同片段融合蛋白对内皮细胞增殖的影响

rh Endostatin/MBP 不同片段融合蛋白对由 bFGF 刺激引起的内皮细胞增殖的抑制效果不同(图 5-9),与全长 rh Endostatin/MBP 抑制内皮细胞增殖活性比较, ΔN_1 、 ΔN_2 、 ΔC 和 $\Delta N\Delta C$ 四种片段均显示出不同程度的抑制内皮细胞增殖活性,但均比全长的弱些, ΔN_3 则不显示抑制内皮细胞增殖活性。由此可推论 rh Endostatin/MBP 抑制内皮细胞增殖的活性部位位于 Endostatin 蛋白 N 端第 55-96 氨基酸内的位置。

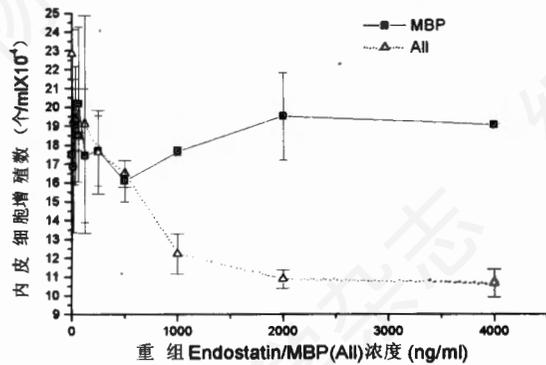


图 4 rh Endostatin/MBP 抑制内皮细胞增殖

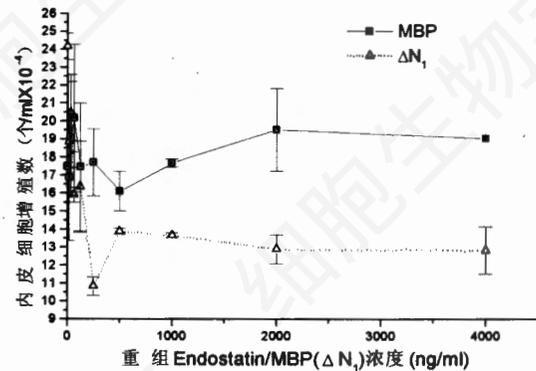


图 5 不同片段 rh Endostatin/MBP(ΔN_1)对内皮细胞增殖的影响

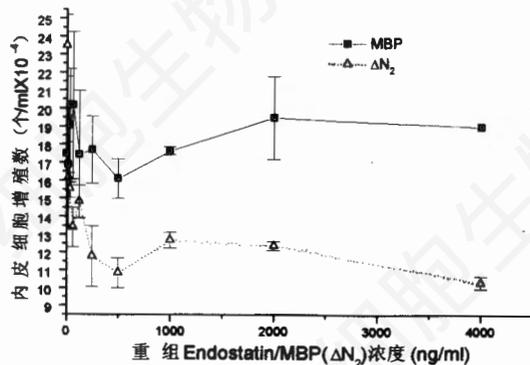


图 6 不同片段 rh Endostatin/MBP(ΔN_2)对内皮细胞增殖的影响

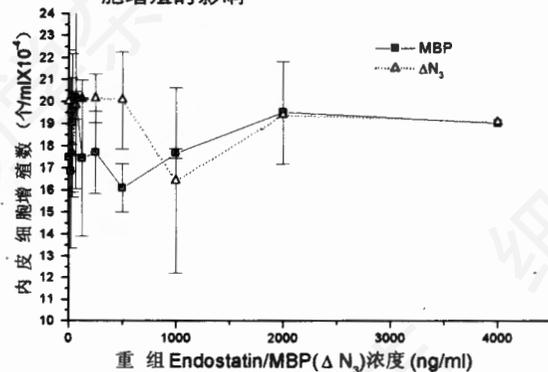


图 7 不同片段 rh Endostatin/MBP(ΔN_3)对内皮细胞增殖的影响

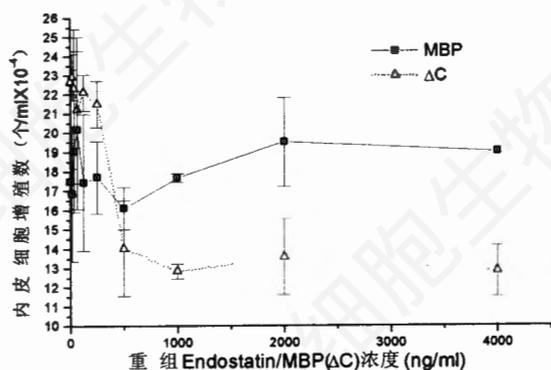


图 8 不同片段 rh Endostatin/MBP (ΔC)对内皮细胞增殖的影响

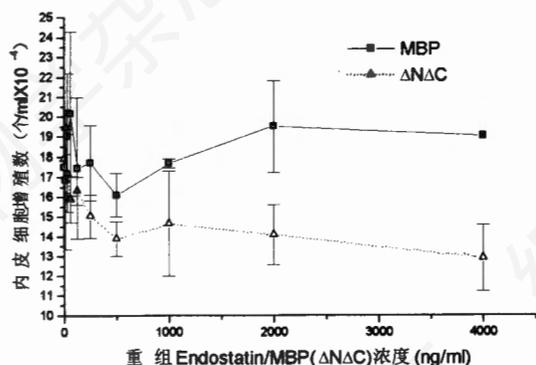


图 9 不同片段 rh Endostatin/MBP (ΔNΔC)对内皮细胞增殖的影响

讨 论

Endostatin 具有特异性抑制血管内皮细胞增殖活性,可应用于拮抗肿瘤细胞分泌 bFGF 等促血管生长因子的作用,作为一种抗血管生成疗法,为肿瘤治疗开辟了一种新的途径^[6]。

我们得到的重组人 Endostatin 蛋白,共 184 个氨基酸,如不经特殊处理,溶解度仅为 1% 左右^[6]。而 Ständker 等在人血中分离到的 Endostatin 在 N 端少了 12 个氨基酸,只有 172 个氨基酸,而且是可溶的,但它的体外实验表明它对内皮细胞的增殖没有抑制作用^[7]。我们得到的 rh Endostatin/MBP 也是可溶的,结合不同片段 rh Endostatin/MBP 对内皮细胞的抑制活性,推测 rh Endostatin/MBP 融合蛋白的

核心作用片段位于 ΔNΔC 片段内,即位于 N 端起第 55 到第 96 位氨基酸间。Endostatin 的主要功能域可能在 N 端,C 端(ΔN₃)起协同作用。当 Endostatin 是完整肽链时,1-54 位氨基酸可能形成一定的空间构型协同核心区域作用,也有可能 Endostatin 中二对二硫键配对情况不同而引起的不同空间构型影响它的活性。我们知道人 Endostatin 是人胶原蛋白十八 C 末端的一个片段,体内产生 Endostatin 可能是某种蛋白酶的作用。本研究中,当有 bFGF 存在情况下,BCE 细胞快速增殖,仅加入 MBP 并不抑制或促进 BCE 细胞增殖,只有加入 rh Endostatin/MBP 融合蛋白时才能明显抑制 BCE 细胞的增殖,当加入 rh Endostatin/MBP ΔN₁、ΔN₂、ΔC、ΔNΔC 等四个融合蛋白片段时也明显抑制 BCE 细胞的增殖,因此本研究表明,Endostatin 体外抑制内皮细胞增殖的活性部位在其 N 端第 55 到 96 位氨基酸范围内,但抑制作用不如全长的 Endostatin,说明 Endostatin N 端和 C 端均在结构功能上起协同作用。Hohenester^[8]认为 Endostatin 与肝素有高亲和力,而 bFGF 等生长因子也与肝素有亲和力,Endostatin 同 bFGF 竞争与硫酸乙酰肝素蛋白多糖的结合。只有当 bFGF 与硫酸乙酰肝素蛋白多糖结合才能完成其信号传导,故 Endostatin 可竞争抑制由 bFGF 刺激引起的内皮细胞增殖,而其具体的作用机理尚不清楚,有待于进一步研究。

摘 要

为了寻找人 endostatin 基因的核心作用片段,先用 PCR 方法从人的肝脏 cDNA 文库克隆出人 endostatin 基因。然后,利用限制性内切酶酶切得到 5 个不同的 endostatin 基因片段,并将它们构建到大肠杆菌表达载体 pMAL-c2 上。经转化并由大肠杆菌表达得到 rh Endostatin/MBP 6 个不同片段的融合蛋白,用亲和层析技术分离纯化,并分别作用于体外培养的牛肾上腺毛细血管内皮细胞(BCE),检测它们

对内皮细胞增殖的影响。rh Endostatin/MBP 不同片段的融合蛋白对经 bFGF 刺激引起的 BCE 细胞的快速增殖有不同程度的抑制作用。Endostatin 作用的活性片段位于 Endostatin 蛋白 N 端的第 55-96 氨基酸位置内。

关键词: Endostatin 血管生成 融合蛋白 内皮细胞 肿瘤

参 考 文 献

[1] Kandel J., Bossy-Wetzel E., Radvany F., et al., 1991, *Cell*, **66**, 1095-1104.

[2] O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., et al., 1994, *Cell*, **79**, 315-328.

[3] O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., et al., 1997, *Cell*, **88**, 277-285.

[4] O'Reilly M. S., Holmgren L., Chen C., et al., 1996, *Nature med*, **2**, 689-692.

[5] 汪振诚, 刘新卷, 徐江英, 1998, 国外医学肿瘤学分册, **25**, 271-273.

[6] 徐根兴, 任敏东, 许琳, 1998, 《发明专利公告》, **14** (12): 45, CN//77005A.

[7] Ständker L., Schrader M., Kanse S. M., et al., 1997, *FEB Letters*, **420**, 129-133.

[8] Hohenester E., Sasaki T., Olsen BR., et al., 1998, *EMBO Journal*, **17**(6), 1656-1664.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ENDOSTATIN/MBP FUSION PROTEIN AND ITS SEGMENTS AND THEIR INHIBITION ON ENDOTHELIA PROLIFERATION IN VITRO

LI Xi XU Gen Xing* WANG Jian Jun

(Department of Biology, Nanjing University, 210093, Nanjing, PRC; * Nanjing Military Medical College of the Second Military Medical University, 210049, Nanjing, PRC)

ABSTRACT

In order to find the active segments of human endostatin gene, human endostatin gene were obtained by PCR technology from human liver cDNA library. Using restriction enzymes, five segments of endostatin were obtained and cloned to *E. coli* expression vector pMAL-c2. Recombinant vectors were transformed to *E. coli* DH₅ α . Six kinds of Endostatin/MBP fusion protein were purified by Amylose Resin beads, and were applied in experiments of inhibition of bovine adrenal capillary endothelial cell (BCE) proliferation in vitro. Each segment of Endostatin/MBP fusion protein can inhibit proliferation of the endothelial cell stimulated by bFGF in different level. The active segment of endostatin is located in the N terminal No. 55 to 96 amino acid.

Key words: Endostatin Angiogenesis Fusion protein Endothelial cell Tumor

肌动蛋白存在于车蝗精母细胞核和染色体中*

赫 杰** 孙野青

张传善 邢 苗

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001) (东北师范大学遗传与细胞研究所 长春 130024)

肌动蛋白是一种重要的收缩蛋白。生化分析^[1-5](包括蛋白质电泳、亲和沉淀和免疫交叉反应等)和免疫细胞原位研究^[6-14](包括免疫荧光、免疫胶体金等)结果表明,肌动蛋白存在于真核生物有丝分裂细胞核和染色体中,并且有重要的功能。目前,关于减数分裂细胞核

和染色体中肌动蛋白的研究^[2,5,9,15-18]主要是以动物卵母细胞为材料进行的,这方面的研究

本文 1999 年 10 月 20 日收到,2000 年 1 月 20 日接受。

* 国家教委留学归国基金项目。

** 通讯联系人。