

MMP-9-PEX 原核表达、纯化及其对结肠癌细胞侵袭能力的影响

严春霞 何俊琳 刘学庆 丁裕斌 陈雪梅 王应雄*

(重庆医科大学公共卫生学院遗传优生教研室, 重庆 400016)

摘要 用 RT-PCR 法扩增出基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) C 末端血红素结合蛋白样结构域 (PEX), 克隆至表达载体 pET32a 中并转化至 *E.coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后在约为 42 kDa 处发现有外源基因的表达, 密度扫描显示表达蛋白含量占菌体总蛋白的 50% 左右。重组蛋白质 pET32a/PEX 主要以包涵体形式表达, 其在上清液中的含量极微。含 8 mol/L 尿素和 10 mmol/L DTT 的裂解缓冲液溶解的包涵体采用金属整合层析有效分离出目标蛋白, 纯化后 pET32a/PEX 蛋白质的纯度大于 90%。在 Transwell 实验中发现复性纯化后的重组蛋白质 pET32a/PEX 能抑制结肠癌细胞的侵袭, 且呈剂量依赖性。

关键词 基质金属蛋白酶-9; 血红素结合蛋白样结构域; 基因表达; 细胞侵袭

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类依赖 Zn^{2+} 的蛋白酶家族, 能够水解各种类型胶原、糖蛋白以及蛋白多糖等多种细胞外基质, 参与细胞黏附、迁移、增殖和分化等过程^[1]。血红素结合蛋白样结构域(hemopexin domain, PEX)是除了 MMP-7、MMP-23 和 MMP-26 以外所有 MMPs 在羧基末端都含有的一个血红素结合蛋白样结构域^[2], 由体内提取的 PEX 是 MMPs 的内源性抑制剂。Roeb 等^[3]证明重组子 MMP-9-PEX 可以抑制 MMP-9 的活性和阻止黑色素瘤细胞的侵袭, 并证明了 MMP-9-PEX 结构域与凝胶有高度的结合率。

目前对 PEX 的研究主要集中在肿瘤方面, 它主要通过抑制 MMPs 的活性来抑制血管发生、细胞增殖和侵袭等。但在胚胎着床和胚胎发育中的作用未见报道。而在胚胎着床过程中 MMPs 同样起着非常重要的作用。着床启动后, 滋养层细胞通过一些蛋白水解酶的作用, 穿过子宫基底膜, 进入基质组织, 完成着床过程。MMPs 及其基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)在着床过程的组织重建中发挥关键作用^[4,5]。其中 MMP-2 和 MMP-9 被认为是滋养层细胞侵入的分子标志, 这与肿瘤侵袭有着惊人的相似机制, 使我们有理由相信 PEX 在胚胎着床过程中很可能扮演着重要的角色。因此, 我们利用基因工程技术构建了携带 MMP-9-PEX 基因的原核质粒(pET32a/

PEX), 并成功表达出目的蛋白和得到高纯度的 pET32a/PEX 融合蛋白, 同时, 我们还对 pET32a/PEX 的功能作了初步研究, 证实其能有效抑制结肠癌细胞的侵袭。这为进一步探索 PEX 在胚胎着床中的功能特性打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pET32a 质粒、*E.coli* DH5a 和 *E.coli* BL21(DE3) 由重庆医科大学肝炎研究所惠赠。结肠癌 Iovo 细胞株来源于重庆医科大学医学检验系, Transwell 购自 Costar 公司, Matrigel 购自 BD 公司。引物合成、Trizol 试剂盒、琼脂糖购自上海生物工程公司, 逆转录酶购自 Promega, PCR 试剂盒和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa。限制性内切酶 *Hind*III 购自 NEB 公司、*Eco*RI 购自 Fermentas 公司。质粒纯化抽提、凝胶回收、PCR 产物纯化试剂盒为上海华瞬生物公司产品。金属螯合层析试剂盒购自 Novagen 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因扩增 根据 MMP-9 C 末端的编码序列设计带有酶切位点的引物。P1: 5'-GAC GAA

收稿日期: 2005-11-24 接受日期: 2006-06-06

重庆市科委攻关项目资助(No.7668)

* 通讯作者。Tel: 023-68485926, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn

TTC ATG AAT CCT TGC AAT GTG G-3'为上游引物(斜体部分为 *EcoRI* 内切酶位点); P2: 5'-TGC AAG CTT TGA GCA CTG CAG GAG GTC G-3'为下游引物(斜体部分为 *HindIII* 内切酶位点)。引物由上海生工合成。

取孕 D7.5 天的 小鼠 子宫 内膜 组织(发现 阴 栓 记 为 D1 天, 此时 MMP-9 表 达 量 最 高), 用 RT-PCR 扩 增 目 的 片 段 PEX, 该 片 段 长 度 为 594 bp。PCR 循 环 条 件: 94 °C 5 min, 一 个 循 环; 94 °C 35 s, 63 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个 循 环; 72 °C 10 min, 一 个 循 环。反 应 产 物 经 1% 琼 脂 糖 凝 胶 电 泳 鉴 定 后 用 PCR 纯 化 试 剂 盒 纯 化。

1.2.2 重组质粒 pET32a/PEX 的构建和鉴定 用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切 PCR 扩 增 出 的 片 段, 回 收 后 的 酶 切 产 物 与 同 样 用 量 的 *EcoRI* 和 *HindIII* 双 酶 切 的 表 达 载 体(pET32a)在 T4 DNA 连 接 酶 作 用 下 16 °C 连 接 过 夜 后, 转 化 到 *E.coli* BL21 (DE3) 的 感 受 态 细 胞 中, 挑 选 重 组 子, 经 酚 / 氯 仿 初 筛 选 后, 抽 提 质 粒 作 酶 切 鉴 定, 获 得 阳 性 克 隆, 命 名 pET32a/PEX, 然 后 进 行 序 列 测 定 与 分 析。

1.2.3 含 PEX 的表达载体在 *E.coil* 中表达 将 表 达 质 粒 pET32a/PEX 转 化 *E.coli* BL21 (DE3)。挑 单 菌 落 接 种 于 2 ml LA (LB+100 μg/ml 氨 苄 青 霉 素) 培 养 液 中, 37 °C 振 摇 过 夜。次 日, 按 1:100 转 种 至 100 ml 新 鲜 的 LA 培 养 液 中, 37 °C 振 摇 培 养 3~4 h 至 $A_{600}=0.6$ 左 右, 加 IPTG 终 浓 度 至 1 mmol/L, 诱 导 表 达 4 h。以 5 000 r/min 离 心 菌 液, 沉 淀 菌 体 用 适 量 缓 冲 液 彻 底 悬 浮, 进 行 SDS-PAGE, 考 马 斯 亮 蓝 染 色, 脱 色 后 观 察 结 果。SDS-PAGE 凝 胶 进 行 扫 描 检 测 蛋 白 质 表 达 含 量。

1.2.4 固定化金属螯合层析(IMAC)与纯化蛋白质的复性 将 制 备 好 的 包 涵 体 悬 浮 于 变 性 裂 解 缓 冲 液 中, 12 000 r/min 离 心, 取 上 清 液 加 到 用 10 倍 体 积 变 性 裂 解 缓 冲 液 平 衡 过 的 Ni-NTA 琼 脂 糖 柱 上, 然 后 用 5 倍 柱 体 积 的 变 性 裂 解 缓 冲 液 洗 涤, 最 后 用 不 同 浓 度 咪 唑 的 变 性 裂 解 缓 冲 液 对 目 标 蛋 白 进 行 特 异 性 梯 度 洗 脱, 收 集 洗 脱 液。取 各 管 收 集 液 进 行 SDS-PAGE, 以 此 结 果 分 析 蛋 白 质 分 布。

采 用 分 步 透 析 的 方 法, 用 含 尿 素 的 复 性 缓 冲 液 (100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 还 原 型 谷 胱 甘 肽 和 0.2 mmol/L 氧 化 型 谷 胱 甘 肽) 进 行 透 析, 将 尿 素 浓 度 从 8 mol/L 依 次 降 低 为 0 mol/L, 透 析 结 束 后, 分 别 取 适 量 样 品, 离 心 后 通 过 SDS-PAGE 观 察 复 性 结 果。

1.2.5 Matrigel 细胞侵袭实验 用 Transwell 作 为 侵 袭 小 室, 在 8 μm 的 聚 碳 酸 酯 膜 上 涂 上 50 μl 1 mg/ml Matrigel, 下 室 加 600 μl 含 10% 小 牛 胎 儿 血 清 的 DMEM 培 养 基 作 为 趋 化 剂。将 lovo 结 肠 癌 细 胞 用 无 血 清 的 DMEM 稀 释 成 4×10^4 个 /ml。分 成 6 组, 每 组 细 胞 设 3 个 平 行 孔, 分 别 加 PBS 和 不 同 浓 度 的 重 组 PEX 蛋 白(1 μg, 10 μg, 20 μg, 100 μg 和 500 μg)于 稀 释 好 的 细 胞 悬 液 中。充 分 混 匀 后, 以 每 孔 250 μl 加 入 上 室。37 °C、5% CO_2 培 养 箱 内 温 育 10 h。取 出 上 室, 滤 膜 用 90% 酒 精 常 温 固 定 30 min, 0.1% 结 晶 紫 染 色 10 min, 轻 水 漂 净, 用 棉 签 轻 轻 擦 掉 上 层 未 迁 移 细 胞, 于 400 倍 显 微 镜 下 计 数 10 个 视 野 侵 袭 细 胞 数, 求 平 均 值。

2 结果

2.1 重组质粒 pET32a/PEX 的构建与鉴定

表 达 质 粒 pET32a/PEX 的 构 建 如 图 1 所 示。经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双 酶 切 得 到 约 5 780 bp 和 594 bp 的 两 条 片 断, 双 向 测 序 的 结 果 表 明 编 码 的 核 苷 酸 序 列 与 基 因 库 所 公 布 的 MMP-9 C 末 端 编 码 序 列(即 PEX)一 致, 没 有 发 生 碱 基 突 变, 表 明 已 成 功 的 构 建 了 重 组 质 粒 pET32a/PEX。

2.2 含 PEX 基因的表达及纯化

pET32a/PEX 重 组 质 粒 以 *E.coli* BL21 (DE3) 为 宿 主 菌, 经 IPTG 诱 导 后, 由 SDS-PAGE 检 测 发 现 重 组 外 源 基 因 的 表 达 载 体 诱 导 后 比 不 诱 导 的 在 42 kDa 处 可 见 蛋 白 质 明 显 增 多, 而 且 宿 主 菌 和 空 载 体 菌 株

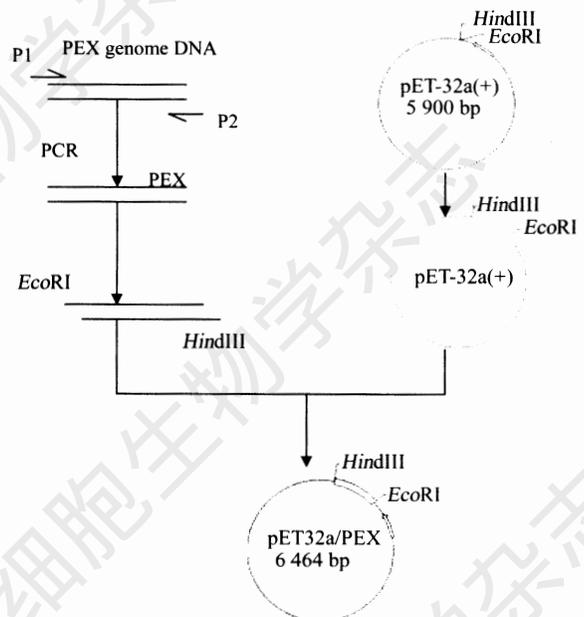


图1 重组质粒 pET32a/PEX 的构建

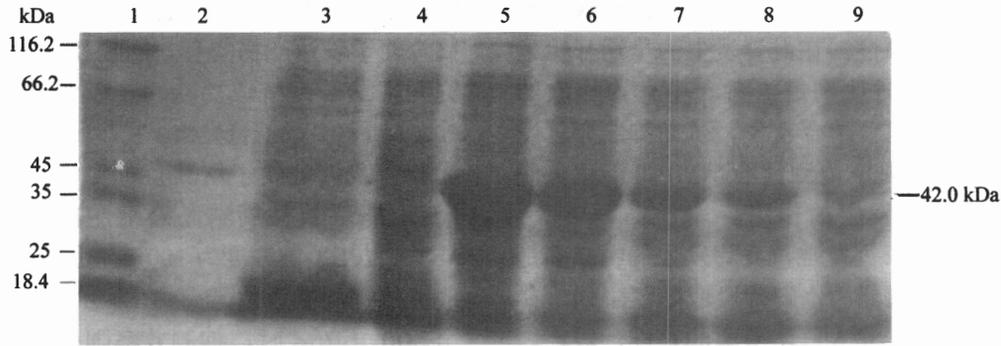


图2 不同诱导时间的全菌电泳图

1: 蛋白质分子量标准; 2: 上清液中纯化后的 pET32a/PEX 蛋白; 3: IPTG 诱导后的空质粒; 4: 未诱导空质粒; 5~8: 不同诱导时间(4~1 h)表达的 pET32a/PEX 质粒; 9: 未诱导 pET32a/PEX 质粒。

诱导后与不诱导在 SDS-PAGE 上无区别, 表明重组的外源基因经 IPTG 诱导后有表达(图 2), 其分子量大小与预期理论值相符。通过蛋白质溶解性的分析表明目的蛋白大都以包涵体形式存在, 其在上清液中的含量极微, 密度扫描检测出目标蛋白质的表达量约为 50%。然后分别对包涵体和上清液进行纯化, 通过 Ni-NTA 琼脂糖柱中镍离子与 His-Tag 的整合使目标蛋白被特异性吸附, 而后在咪唑的特异性洗脱下, 在 SDS-PAGE 上显示出分子量大小相符的单一一条带(图 3)

2.3 目的蛋白复性

纯化后的包涵体经含尿素的复性液分步透析复性后, 重组蛋白质 PET/PEX 的纯度大于 90%, 接近电泳纯, 复性效果较好, 可以直接用于后续实验。

2.4 重组 PET32a/PEX 蛋白对结肠癌细胞侵袭的影响

Matrigel 能够模拟细胞外基质, 是肿瘤细胞体外侵袭的三维蛋白富集屏障。Tanswell 实验结果表明重组蛋白质 pET32a/PEX 能有效地抑制结肠癌细胞的侵袭且呈剂量依赖性。重组蛋白质的浓度在 0~100 $\mu\text{g/ml}$ 之间时, 随着所加入重组蛋白质浓度的增高, 对细胞侵袭的抑制能力也增加。重组质浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 达到最高峰, 约 93% 的细胞侵袭受到抑制, 而当浓度升高到 500 $\mu\text{g/ml}$ 时抑制率有所下降, 为 76%(图 4)。横坐标为所加入重组蛋白质 pET32a/PEX 的浓度, 纵坐标代表高倍镜下($\times 400$)每个视野所通过侵袭小室的细胞数。

3 讨论

PEX 是除了 MMP-7、MMP-23 和 MMP-26 以外所有 MMPs 在羧基末端都含有的一个血红素结合

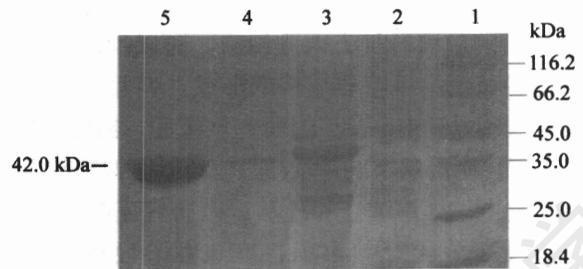


图3 纯化后重组蛋白质的 SDS-PAGE 鉴定

1: 蛋白质分子量标准; 2: 未诱导; 3: IPTG 的诱导表达; 4: 纯化后的上清液; 5: 纯化后的包涵体。

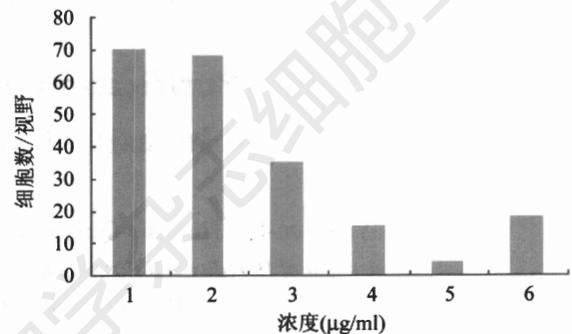


图4 重组蛋白质 pET32a/PEX 对 lovo 细胞体外侵袭能力的影响
1: 500 $\mu\text{g/ml}$ PBS; 2: 1 $\mu\text{g/ml}$ pET32a/PEX; 3: 10 $\mu\text{g/ml}$ pET32a/PEX; 4: 20 $\mu\text{g/ml}$ pET32a/PEX; 5: 100 $\mu\text{g/ml}$ pET32a/PEX; 6: 500 $\mu\text{g/ml}$ pET32a/PEX。

蛋白样结构域。研究人员^[6,7]描绘了猪的 MMP-1-PEX, 其 PEX 结构域是由 4 个 β 折叠片组成的矮蹲状圆柱体的空间结构。每个折叠片代表一个血红素结合蛋白样模块, 是 4 片 β 螺旋桨结构中的一片, 由四股反平行的 β 折叠形成。

Brooks 等^[8]发现 MMP-2 可通过 C 端与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合而激活自身催化活性, 产生一分子质量为 29~32 kDa 的 PEX, 该片段可阻断 MMP-2 与 $\alpha_v\beta_3$ 结合而抑制 MMP-2 对细胞外基质(extracellular matrix,

ECM)的降解和血管形成。PEX 在体内的形成具有血管发生的阶段依赖性,在血管发生的早期开始累积,血管生成完成时达到最大量。由体内提取的 PEX 可与 MMP-2 竞争结合 $\alpha_v\beta_3$,从而抑制血管发生,因而认为 PEX 是一内源性的 MMP-2 活化抑制剂,具有抑制血管发生的作用。

近年来,许多研究发现抗血管发生的物质多是体内一些蛋白质或酶原的水解片段或隐藏序列,如血管抑素(angiostatin)是人纤溶酶原的 C 端片段,内皮抑素(endostatin)是胶原蛋白 XVIII 的 C 端片段,使得 PEX 的抗血管发生作用也越来越受到人们的关注。Peifer 等^[9]用慢病毒作为 PEX 的载体,研究它在不同血管发生模型中的作用,发现在体外用带有 PEX 片段的病毒转导人内皮细胞,可以抑制内皮细胞的侵袭和毛细血管样结构的形成,并且不影响它的趋化作用。Bello 等^[10]的研究也证明, MMP-2 通过自身催化所降解下的片段(即 PEX)能够抑制胶质瘤的血管发生、细胞增殖和迁移。有研究证明 PEX 在血管的侵袭阶段开始累积,在成熟阶段达到最大值,并在血管的侵袭阶段起到了负调节子的作用^[8]。

pET 系统是目前最理想的利用大肠杆菌表达外源基因的原核载体之一^[11]。这种带有 His-Tag 的新型融合表达系统,具有表达量高、可增加表达产物

的稳定性和免疫原性,通过 Histidine 与金属离子的螯合便于表达产物的有效回收和纯化等特点。本研究利用这一系统成功获得了重组蛋白质 pET32a/PEX,并对其功能特性作了初步研究,通过 Transwell 实验,我们证实了所获得的重组蛋白质 pET32a/PEX 能有效抑制结肠癌细胞的侵袭,并发现当 pET32a/PEX 的浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时,对结肠癌细胞侵袭的抑制能力达最高峰(约 93%),而当浓度升高至 500 $\mu\text{g/ml}$ 时,抑制效率则有所下降(约 76%)。鉴于胚胎着床与肿瘤细胞侵袭有着十分相似的机制,因此,本研究所获得的重组蛋白质 pET32a/PEX 为我们进一步研究 PEX 在胚胎着床中的作用打下了重要的实验基础,也为不孕症和习惯性流产的病因诊断及治疗提供一个全新的思路。

参考文献 (References)

- [1] Huppertz B *et al.* *Cell Tissue Res*, 1998, **291**: 133
- [2] Itoh Y *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 4782
- [3] Roeb E *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 50326
- [4] Das SK *et al.* *Dev Genet*, 1997, **21**: 44
- [5] Alexander CM *et al.* *Development*, 1996, **122**: 1723
- [6] Allan JA *et al.* *Biochem J*, 1995, **309**: 299
- [7] Overall CM *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 4421
- [8] Brooks PC *et al.* *Cell*, 1998, **92**: 391
- [9] Pfeifer A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 12227
- [10] Bello L *et al.* *Cancer Res*, 2001, **61**: 8730
- [11] Fischer B *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1993, **306**: 183

Expression, Purification of the MMP-9-PEX in *E.coli* and Its Effect on Invasive Capacity of Colonic Cancer Cells

Chun-Xia Yan, Jun-Lin He, Xue-Qing Liu, Yu-Bing Ding, Xue-Mei Chen, Ying-Xiong Wang*

(Department of Heredity and Birth Health, The School of Public Health, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing, 400016, China)

Abstract Matrix metalloproteinase 9 hemopexin domain (PEX), which locates the C-terminal, was amplified by RT-PCR and was inserted into expression vector pET32a. The recombinant plasmid was induced by IPTG for 4 h and a 42 kDa recombinant protein was produced. Amount of the fusion protein pET32a/PEX expression was 50% of total bacterial protein, mostly in form of inclusion, few in form of supernatant. Inclusion was dissolved in 8 mol/L urea and 10 mmol/L DTT, carried out affinity purification under denaturing condition. The expressed 42 kDa fusion protein is confirmed by SDS-PAGE. The pET32a/PEX expression vector was successfully constructed and highly expressed in *E.coli*. The purified pET32a/PEX protein can inhibitor the invasion of the colonic cancer cell in Transwell experiments and show a dose-dependent manner.

Key words matrix metalloproteinase-9; hemopexin domain; gene expression; cell invasion

Received: November 24, 2005 Accepted: June 6, 2006

This work was supported by the Science and Technology Commission Foundation of Chongqing (No.7668)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn