维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0239-04

重组蛋白 F3T7 的亚克隆、表达、纯化及生物学活性的初步鉴定

刘 洋,何爱彬,李甲初,蒋 雪,曾昭淳

(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆编码 F3T7 的 DNA 序列,获得融合蛋白 F3T7,研究其 F3T7 的功能。方法:采用亚克隆技术获得原核表达载体 PET32a(+)-F3TwM 法测定 F3T7 的抗血管活性。结果:F3T7 具有特异结合血管内皮细胞能力,并抑制其增殖和新血管生成。结论:初步表明 F3T7 仍具特异结合血管内皮细胞,抑制新血管生长的能力。

【关键词】亚克隆;融合表达;抗血管生成

【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-14

Subcloning, expressing, purifying and primary studing the biological activity of F3T7

LIU Yang, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medicine College, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the DNA sequence coding the F3T7, generate the fused protein F3T7, and investigate its function. *Methods*: We constructed prokaryotic expression vector pET32a (+)-F3T7 by subcloning technique, then fusion protein F3T7 was expressed and purified by affinity chromatography.and its activity of inhibiting the perliferation of HUVEC was assayed by MTT, then FITC was adopted to mark F3T7 to test its affinity with HUVEC, and its anti-angiogenses was detected by CAM. Results: We primarily certified that the fusion protein F3T7 selectively bound to HUVEC, inhibited its proliferation, and showed anti-angiogenic activity. *Conclusion*: F3T7 could have the abilities of binding to HUVEC and anti-angiogenesis

【Key words】Subclone; Fusion expression; Anti-angiogenesis

肿瘤生长、浸润及转移扩散依赖血管生成,新生血管为肿瘤细胞提供充足的氧气和营养,通过血管内皮细胞表达的生长因子,刺激肿瘤细胞增殖。因此,抑制新血管的生成是抑制肿瘤生长的有效途径。利用高选择性抑制肿瘤血管增生的药物,对于提高抗肿瘤药物和生物制剂的治疗效果,降低药物和生物制剂的用量,尤其显著降低这些抗肿瘤药物和生物制剂的毒性和副作用具有重要意义。

F3 肽是人类高迁移蛋白 2(Human high mobility group protein-2, HMGN-2)N- 末端的 31 个氨基酸的片段[1]。动物实验表明,兔子静脉注射 HMGN-2 后,在体内能定向分布到 HL-60 和 MDA-MB-435 的肿瘤生长部位[1]。F3 肽段几乎能与所有被测试的肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞高选择性地结合。可以将噬菌体和荧光染料带到肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞[1]。因此,F3 是针对肿瘤组织靶向给药的优良载体,能够携带抗肿瘤血管的肽类、药物实现靶向给药。Tumstatin(IV 型胶原 α3 链非胶原区片段)是一种血管生成抑制肽,通过抑制新血管的生成,阻断肿瘤细胞的营养供应,抑制肿瘤细胞的生长[2]。Tumstatin 抑制血管生成的活性位点位于它的 54~124 氨基酸残基中,我们克隆的 Tum-7 的 25 个氨基酸即为 Tumstatin 的 74~98 氨基酸活性残基[3]。F3 与 T7 是由一段可以翻译为 Ala-Ala-Ala linker 的碱基序列连接。

本实验采用亚克隆技术从重组克隆载体 pEKH-F3T7 获得 F3T7 基因,构建融合表达载体 PET32a(+)-F3T7,原核表达、纯化并初步鉴定其生物学活性,为进一步研究 F3T7 的功能及机理奠定基础[1]。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞株

作者介绍:刘 洋(1979-)男,硕士生,
主要研究方向:血管生成抑制剂对肿瘤的抑制。

基金项目:重庆市教委资助项目 2004 年,No.1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

PET32a (+) 载体购自 Merck 公司，大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)由本实验室保存，人脐静脉内皮细胞 HUEVC 由重庆医科大学组胚教研室提供，人正常肝细胞 L02 由重庆医科大学肝炎所提供。

1.2 引物及主要试剂

根据模版 PEKH-F3T7 设计引物。P1:5'-CAGGATC-CAAAGATGAACCGCAACGTCGTAG-3'，P2:5'CGAAGCTTT CAGCTGTAGTCGTTTCTGCTAGCGAAGT-3'，分别加有*BamH* Ⅰ与*Hind*Ⅲ酶切位点，由北京赛百盛生物公司合成。*Taq*DNA 聚合酶、内切酶 *BamH* Ⅰ与 *Hind*Ⅲ购自 Takara 公司；T4DNA 连接酶购自 NEB 公司；DNA 片段回收采用上海华舜公司胶回收 kit；His-Tag 融合蛋白纯化试剂盒购自 Merck 公司。其他主要试剂为 Sigma 公司产品。

1.3 F3T7 片段的扩增、克隆及测序

以 pEKH-F3T7 质粒为模板，PCR 扩增 F3T8 片段，PCR 扩增条件为 94℃预变性 4min 后，94℃变性 30s，63℃退火 30s，72℃延伸 30s，30 次循环，最后 72℃保温 10min 胶回收目的片段，*BamH* Ⅰ/*Hind*Ⅲ分别双酶切 F3T7 片段及 pET32a (+)，胶回收，用 T4 连接酶 4℃连接过夜，构建载体 pET32a (+)-F3T7，转化大肠杆菌 DH5α，LA 平板过夜培养，挑取单克隆，双酶切鉴定后，测序确认(上海生工)。

1.4 F3T7 表达产物的分析

将 pET32a(+)-F3T7 转化大肠杆菌 BL21(DE3)，挑取阳性克隆于 LA 培养基中，当 OD_{590}=0.7~0.9 时，加入 IPTG 至 1.0mmol/L，于 20℃继续培养 12h 后收集菌体。菌体经冰浴超声破菌后离心，分别取上清和沉渣，12%的 SDS-PAGE 分析表达产物，用薄层扫描仪计算 F3T7 在菌体总蛋白中的含量。

1.5 F3T7 表达产物的纯化

菌体超声破菌后，取上清，用 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖树脂进行纯化。参照 Novagen 公司的 His.Bind Kits 说明进行纯化，12%的 SDS-PAGE 分析纯化效果及酶切产物，透析去盐，Western blotting 鉴定，Bradford 法对纯化的蛋白定量。

1.6 MTT 比色实验

取对数生长期的单层脐静脉内皮细胞，胰酶消化后，以 2×10^4/孔接种至 96 孔板，每孔体积 200μl，于 37℃，5% CO_2 条件下培养 24h 后，加入不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6μg/ml)的纯化后的 F3T7，0.4μg/ml 设 18 复孔，余每一浓度设 3 复孔，同时加设 PBS 的空白对照孔。0.4μg/ml 组每天取出 3 孔，余继续培养至第 5 天，均进行下列实验：每孔吸去 20μl 培养液，加入 MTT(5μg/ml)20μl，4h 后终止培养，小心吸去上清，加入 DMSO 150μl/孔，室温震荡 10min，使紫蓝色结晶完全溶解。在酶标仪测 OD_{570}，以 4μg/ml 组的 OD_{570} 为纵坐标，天数为横坐标，绘制生长曲线；以 OD_{570} 为纵坐标、不同浓度的 F3T7 为横坐标，绘制量效曲线。

1.7 异硫氰酸荧光素(FITC)标记蛋白及与血管内皮细胞亲和活性的测定

将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人正常肝细胞(L02)分别接种于放有放有薄的盖玻片的 24 孔板中，24h 贴壁后换液，加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的纯化后的 F3T7，24h 后取出盖玻片，用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次，于荧光共聚焦显微镜下观察 FITC 标记的蛋白在细胞的分布，照相。

1.8 F3T7 抗血管活性的检测

采用鸡胚绒毛膜尿囊膜试验(CAM)。取 9 天龄的受精鸡胚，蛋壳上开口，分别以浸有 5μg F3T7 和 5μl PBS 的 1cm² 无菌滤纸小块贴于鸡胚绒毛膜尿囊膜上，37℃，培养 48h 后，剥开蛋壳，去除滤纸，光学显微镜下观察 6 组鸡胚绒毛膜尿囊膜上血管生成情况。*t* 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 目的基因的扩增、亚克隆及序列鉴定

以 pEKH-F3T7 为模板 PCR 扩增获得 200bp 的 F3T7 片段(图 1)，亚克隆进 pET32a(+)，构建 pET32a(+)-F3T7，经 PCR 鉴定及酶切片段大小确认(图 2)，测序表明读码框正确，表达质粒构建成

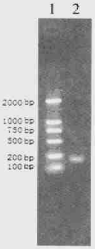


图 1 F3T7 PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳结果
1.DNA 分子量标准
2.PCR 产物

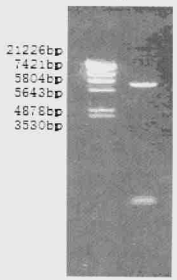


图 2 重组质粒酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析
1.DNA 分子标准(EcoRI 分解的 λ DNA)
2.*BamH* Ⅰ与 *Hind*Ⅲ酶切的重组质粒 pET32a(+)-F3T7

维普资讯 http://www.cqvip.com

功。

2.2 重组质粒原核表达、纯化及鉴定

用 1.0mmol/L 的 IPTG 分别于 37℃、4h 和 20℃、12h 诱导细菌表达，与未诱导的比较，在 12%的 SDS-PAGE 上 30KU 处均有一明显的表达条带，Quantity One 软件分析，表达量占菌体总蛋白含量的 30%(图 3)。菌体裂解后的 SDS-PAGE 分析表明，表达产物绝大部分以可溶性的存在，且在 20℃、12h 的条件下最优(图 4)。经 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖树脂亲和层析纯化、透析去盐，得到分子量为 30KU 的高纯度的蛋白(图 5)，并通过 Western blot 鉴定(图 5)。

2.3 抑制 HUVEC 细胞增殖活性检测

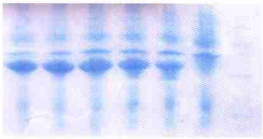


图 3 F3T7 在大肠杆菌中的诱导表达(37℃)

1.IPTG 诱导；2h；2. IPTG 诱导 3h；3. IPTG 诱导；4h；4. IPTG 诱导 5h；5. IPTG 诱导 6h；6. 未加 IPTG 诱导。7.蛋白质分子量标准

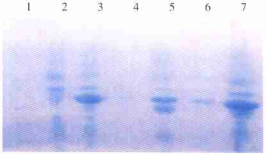


图 4 不同诱导条件下菌体裂解后的 SDS-PAGE 分析结果

1. 蛋白质分子量标准(14.4，20.0，28.5，35.0，45.0，66.2，94.0 KU)；2.未加 IPTG 诱导；3.37℃，IPTG 诱导 4h；4.沉淀(37℃，4h)5.上清(37℃，12h)6.沉淀(20℃，12h)；7.上清(20℃，12h)

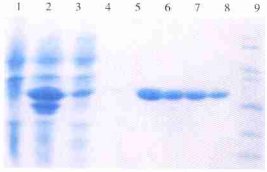


图 5 F3T7 经 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖树脂纯化结果(20℃、12h)

1.未加 IPTG 诱导；2.上清；3.沉淀 5-8，镍柱纯化不同时间洗脱物；9. 蛋白质分子量标准(14.4，20.0，28.5，35.0，45.0，66.2，94.0 KU)



图 6 Western blotting 鉴定 F3T7

1.蛋白质分子量标准(14.4，29.0，44.3，66.2，94.0 KU)

2.纯化的 F3T7

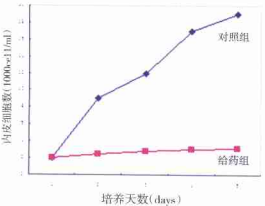


图 7 F3T7 抑制 HUVEC 的生长曲线

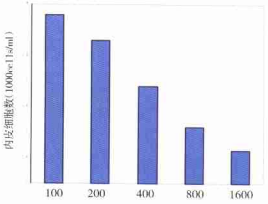


图 8 不同浓度的 F3T7 对 HUVEC 生长的抑制作用

维普资讯 http://www.cqvip.com

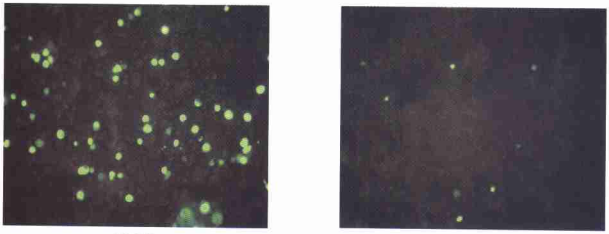
F3T7(0.4 μg/ml)显著抑制了体外内皮细胞的增殖(图 7),抑制率为 67.5%($P \leq 0.05$)。不同浓度的 F3T7 对内皮细胞增殖的抑制作用存在量效关系(图 8),且当 F3T7 浓度大于 0.4 μg/ml 时,内皮细胞出现增生缓慢,细胞逐渐出现变圆、离壁、浮起,活细胞数量减少。

2.4 与 HUVEC 细胞亲和活性检测

FITC 标记的蛋白与 HUVEC、L02 细胞共培养后,于荧光显微镜下检测显示,重组蛋白 F3T7 仍高选择性的靶向 HUVEC 细胞,而对照组几乎检测不到荧光(图 9)。

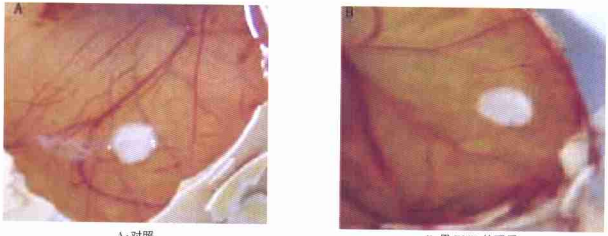
2.5 抗血管活性检测

鸡胚绒毛膜尿囊膜(CAM)试验结果显示:对照组血管呈叶状生长,加 PBS 后,血管密度无降低;而 F3T7 蛋白实验组加样后能明显抑制鸡胚绒毛膜尿囊膜血管生成(图 10)。



HUVEC L02

图 9 F3T7 与 HUVEC 亲和性检测结果



A:对照 B:用 F3T7 处理后

图 10 F3T7 对鸡胚绒毛膜尿囊膜(CAM)血管生成的影响

3 讨 论

目前已经报道的血管生成抑制肽有很多,包括血管抑素 angiostatin[4],内皮抑素 endostatin[5],Tumstatin(IV 型胶原 α3 链非胶原区片段)[3],Canstatin(IV 型胶原 α2 链片段)[6],Restin(胶原 XV 片段)[7]和 Arrestin(IV 型胶原 α1 链片段)[8]等,如何让这些药物准确的、选择性的作用于肿瘤新生血管,减少药物的用量,降低药物的毒副作用,提高药物的治疗效果是目前开发抗肿瘤药物的难题。基于此,我们采用 F3 与 tum-7 连接构建了新的克隆载体 pEKH-F3T7,拟研究出新的具有导向肿瘤新生血管及抗癌活性的融合蛋白。

本文采用亚克隆的方法,构建了新的表达载体 pET32a(+)-F3T7,并用 LA 培养基于 20℃、12h,

(下转第 327 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

高于股动脉组。一般给予停止用药后，局部暴露疗法，保持皮肤干燥，防止腋窝皮肤受损处潮湿，并保护水泡不穿破，2 周后水泡自行吸收，皮肤颜色逐渐恢复正常。有文献报道[6,8]：尺动脉插管灌注区域出现色素沉着等皮肤反应发生率分别为 21%和 33%，股动脉途径发生率为 14%[2]。

本文尺动脉组发生上肢肌肉萎缩 1 例，该病例在一次推药时未扎血压计袖带阻断动脉血流，推药后即出现患侧手指和手掌疼痛，后来逐渐出现上肢皮肤色素沉着，大、小鱼际肌及手掌骨间肌萎缩，肌张力降低，上肢功能障碍。经使用保护血管、神经药物及理疗，半年后症状有所好转。此并发症主要与违背操作规程有关。陈夏等曾报道 1 例尺动脉插管因管子部分滑脱未及时发现，致化疗后出现前臂肿胀、肌肉挛缩[9]。上述病例均应引以为训。此外，为减少化疗药物对患肢远端的影响，血压计袖带气囊应在化疗药物推注完毕 5min 后开始松解并缓慢减压[10]。

两组各有 1 例出现穿刺处少量出血，通过压迫后出血停止。股动脉组 1 例在推药 2min 后出现心慌、表情淡漠、意识模糊、神志不清，0.5h 后好转，可能与推注药物（紫杉醇）速度过快部分药物逸入颅内有关。徐万里曾报道经股动脉途径插管 1 例有一过性眩晕，1 例出现脑梗死[2]。化疗药物引起的副反应两组无显著性差异。

乳腺癌患者经股动脉介入化疗引起的并发症比经尺动脉少，故股动脉介入化疗途径应优于尺动脉途径；而长时间留置导管反复灌注化疗药物有可能增加病人的并发症，因此在选择介入化疗途径和化疗方案时应充分考虑上述因素，以保证介入化疗的安全性。

参 考 文 献

[1] 邹利光，戚跃勇，陈 垦.中晚期乳腺癌不同方法介入治疗的疗效分析[J].重庆医学，2004；33(7)：1023-1025.

[2] 徐万里.Ⅲ期乳腺癌术前超选择性动脉灌注化疗的临床应用[J].中国基层医药，2004；11(7)：801-802.

[3] 张婧娴，孟祥文.介入放射学治疗乳腺癌的临床应用与展望[J].实用医学影像杂志，2005；6(1)：55-57.

[4] 甘长清，吴凯南.乳腺癌介入治疗进展[J].世界今日医学杂志，2004；5(3)：213-214.

[5] 张婧娴，刘玉娥，赵宏光，等.中晚期乳腺癌术前介入治疗的临床应用[J].实用医学影像杂志，2004；5(1)：49-51.

[6] 吴心愿，张祥福，殷凤峙，等.Ⅲ期晚乳腺癌术前动脉内灌注化疗的临床研究[J].中华普通外科杂志，2001；16(3)：187-188.

[7] 罗 凤.晚期乳腺癌尺动脉插管介入化疗的护理[J].重庆医学，2003；32(11)：1590-1951.

[8] 黄昌明，张祥福，卢辉山，等.Ⅲ期乳腺癌术前尺动脉插管灌注化疗的远期疗效[J].中华外科杂志，2000；38(6)：412-414.

[9] 陈 夏，应敏刚，曾 毅.局部晚期乳腺癌术前尺动脉插管化疗观察[J].浙江肿瘤，1998；4(4)：237-238.

[10] 甘长清，苏新良，杨光伦，等.84 例乳腺癌介入化疗途径的探讨[J].重庆医学，2005；34(12)：1781、1784.

（上接第 242 页）

以 1.0mmol/L 的 IPTG 可诱导出可溶性的蛋白产物，纯化出具有抗血管活性的蛋白，解决了原核系统表达真核基因常常为不溶性包涵体的难题。另外，以异硫氰酸荧光素（FITC）标记蛋白与血管内皮细胞亲和活性的测定和 CAM 法，初步表明 F3T7 仍具导向肿瘤新生血管和抗血管生长的活性，为进一步研究此种新型融合肽的功能和作用机理及寻找对肿瘤组织高选择性的靶向给药载体系统奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Porkka K,Laakkonen P,Hoffman JA.,et al.A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo[J].PNAS,2002;99(11):7444-7449.

[2] Maeshima Y,Colorado PC,Torre A,et al.Distinct antitumor properties of a type Ⅳ collagen domain derived from basement membrane[J].J.Biol.Chem,2000;275:21340-21348.

[3] Maeshima Y,Sudhakar A,Lively JC,et al.Tumstatin,an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis [J].Science,2002;295(5552):140-143.

[4] O'Reilly MS,Holmtren L,Shing Y,et al.Angiostatin:A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma[J].Cell,1994;79:315-328.

[5] O'Reilly MS,Boehm T,Shing Y,et al.Endostatin:An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J].Cell,1997;88:277-285.

[6] 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.

[7] Bamchandran R,Dhanabal M,Volt R,et al.Antiangiogenic activity of restin,NC10 domain of human collagen Ⅹ Ⅴ:copparison to endostatin [J].Biochem Biophys Res Commun,1999;255 (3):735-739.

[8] Colorado PC,Torre A,Kamphaus G,et al.Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen[J].Cancer Res,2000;60(9):2520-2526.