DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.010
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1723-03

论著

Canstatin基因表达载体的构建及其生物学效应研究

李玉英,钱桂生,黄桂君,王兴友,余时沧,李淑平,陈维中,戢福云 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 构建可表达人血管生成抑制素(canstatin)蛋白的真核表达载体,探索canstatin对人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)和人肺腺癌A549细胞株的生物学效应。方法 RT-PCR法从胎儿肝组织中获取canstatin cDNA全长,并将其克隆到真核蛋白表达载体pCMV-Script上。阳离子脂质体介导该重组载体转染HUVE细胞系、A549细胞株。RT-PCR法检测其对canstatin mRNA的表达。台盼蓝拒染法活细胞记数,^{3}H-TdR掺入法检测细胞增殖,TUNEL法检测细胞凋亡,流式细胞术检测细胞周期。结果 成功构建pCMV-Script-Cans真核表达重组载体,并在转染该表达载体的A549及HUV-EC-C细胞株中均检测到canstatin mRNA的表达。HUV-EC-C细胞株pCMV-Script-Cans载体转染组比空载体组^{3}H-TdR掺入量明显减低($P<0.01$),细胞凋亡率明显增加($P<0.01$),A549细胞株转染组与空载体组^{3}H-TdR掺入量无显著差异($P>0.05$),细胞凋亡率无显著差别($P>0.05$)。结论 pCMV-Script-Cans重组载体能在转染的哺乳动物细胞中表达canstatin,并抑制内皮细胞增殖,诱导内皮细胞凋亡,但对肿瘤细胞没有直接抑制作用。

关键词:人血管能抑制素;血管生成;肿瘤治疗
中图法分类号:Q782;R394-33;R979.1 文献标识码:A

Construction of canstatin vector and research on its biological effects

LI Yu-ying, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, WANG Xing-you, YU Shi-cang, LI Shu-ping, CHEN Wei-zhong, JI Fu-yun (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To construct an expression vector (pCMV-cans) containing canstatin cDNA and to study the biological effects of canstatin on human endothelial cells and tumor cells. **Methods** Canstatin full-length cDNA, acquired from adult hepatocytes by RT-PCR method, was cloned into eukaryotic expression vector pCMV-Script. The recombinant vector pCMC-cans was transfected into human umbilical vein cells (HUVECs) and human lung adenocarcinoma cells A549 by cationic liposome. Canstatin mRNA expression in the transfected cells was detected by RT-PCR method. The proliferation, apoptosis, and cell cycle of the two kinds of cells were measured by ^{3}H-thymidine incorporation method, TUNEL method, and flow cytometry, respectively. **Results** The pCMV-cans vector was successfully constructed and transfected into HUVECs and A549 cells. The canstatin mRNA was detected in both of the transfected cells. The ^{3}H-TdR incorporation in pCMV-cans transfected HUVECs was significantly lower than that in the pCMV-Script transfected cells ($P<0.01$), while the apoptosis rate was significantly higher than that of the control cells ($P<0.01$). No significant difference in ^{3}H-TdR incorporation and apoptosis rate was found between pCMV-cans and pCMV-Script transfected A549 cells ($P>0.05$). **Conclusion** Expression of canstatin mRNA is found in both A549 and HUVECs, but pCMV-cans transfection can only inhibit cell proliferation and induce apotosis in endothelial cells.

Key words: canstatin; angiogenesis; tumor therapy

通过阻止肿瘤血管生成来抑制肿瘤生长的疗法被称之为休眠疗法(dormancy therapy)。目前,已有多种血管生成抑制剂被用于这一领域的研究。Canstatin是又一新近发现的内源性血管生成抑制剂,具有很强的抑制血管生成的作用[1]。构建canstatin的真核表达载体,研究其对肿瘤细胞和内皮细胞的生物学效应并阐明其作用机制,将对该蛋白抑制血管生成的特性及抗肿瘤治疗研究提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 人胎肝组织、细胞株、载体及宿主菌 人胎肝组织来自第三军医大学新桥医院妇产科引产胎儿。肺腺癌A549细胞

作者简介:李玉英(1972-),女,甘肃省兰州市人,博士,主治医师,主要从事肺癌的分子生物学治疗方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755320, E-mail:Lzhlyyhy@163.com
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2003-08-19;修回日期:2004-06-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

株为本所保存，人脐静脉内皮细胞系 HUV-EC-C 细胞(human umbilical vein cells, HUVECs)购自美国 ATCC。pCMV-Script 载体及 X-Blue MRF' 宿主菌均购自美国 Stratagene 公司。

1.1.2 其他相关试剂 内切酶、T4DNA 连接酶为华美公司提供，*Tag* 酶为鼎国公司产品，RT-PCR 试剂盒，G418 为 Promaga 产品，脂质体为美国 Roche 公司产品。Tripure、RNA 酶抑制剂为 Gibico 产品。^{3}H-TdR 购自中国科学院上海原子能研究所。dNTP 为上海 Sangon 产品，DNA Marker 为鼎国公司产品，其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 引物设计与合成 因为 canstatin 为Ⅳ胶原 α_2 链上的一个结构域(NC1)，所以根据 GenBank 中公布的Ⅳ胶原 α_2 链基因 cDNA 全序列，利用本研究所保存的软件 Primer5.0 设计如下引物并送上海 Sangon 合成。预计扩增产物长度 703 bp。

P1: TCGAATTCATGGTCAGCATCGGCTACCTCCT

P2: GCAAGCTTTCACAGGTTCTTCATGCACAC

下划线部分为内切酶识别序列。

1.2 方法

1.2.1 胎肝组织总 RNA 的提取、cDNA 的第一链的合成、扩增，及 pCMV-Script-Cans 重组载体的构建，参照参考文献[2]进行。

1.2.2 pCMV-Script-Cans 转染 A549 及 HUVECs 及筛选 A549 细胞培养在含10%小牛血清的 1640 培养基中，HUVEC 培养在含 10%小牛血清的 Hams F12K 培养基中，含 30 μg/ml 内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)。将纯化的重组质粒 pCMV-Cans 取 5 μg 加入 HBS 缓冲液中，使终体积至 50 μl。取 30 μl DOTAP 脂质体加入 HBS 70 μl，室温放置 15 min。将质粒 HBS 混合液加入 100 μl 脂质体 HBS 混合液中混匀，加入 2 ml 无血清的 1640 培养基中，并加入细胞生长 70% 融合的 25 ml 培养瓶中，37 ℃ 5%CO_2 培养 8 h，更换有含 10%小牛血清的继续培养 48 h 后换用含 400 μg/ml 的 G418(A549 为 500 μg/ml)的选择性培养基，约 7 d 后筛选出抗性克隆后扩大培养，并用 200 μg/ml G418 维持抗性。同时用空载体 pCMV-Script 转染上述两种细胞为对照(转染方法同上)，并设未转染细胞对照。

1.2.3 转染细胞 canstatin mRNA 的表达检测 将上述筛选出来的第 1 代阳性细胞分别扩大培养，常规消化收集细胞悬液于离心管中，800× *g* 离心 10 min，弃上清。加入 1 ml/管 Tripure 试剂，分离细胞总 RNA(具体操作步骤参照 Gibico 公司 Tripure 说明书进行)，将各组细胞 RNA 分别逆转录为 cDNA(具体步骤参照 Promaga 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行)，用各组细胞 cDNA 为模板，P1、P2 为引物常规 PCR 法检测重组载体转染细胞空载体转染细胞及未转染细胞(A549, HUVECs) canstatin mRNA 的表达(方法和扩增条件同 1.2.1)，并以 β-actin 为内对照(扩增条件：95 ℃ 2 min，94 ℃ 45 s，55 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s，72 ℃ 2 min，32 cycle)。

1.2.4 台盼蓝拒染法细胞记数[3] 上述细胞经 0.25%的胰酶消化，以 1× 10^4 接种 24 孔板，台盼蓝拒染法每天记数 3 孔细胞，共 8 d。观测转染后细胞生长状况和细胞活力。

1.2.5 细胞周期、细胞增殖检测 细胞消化传代后培养 48 h 再经常规胰酶消化，800× *g* 离心 10 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次，75%乙醇固定后行流式细胞术(美国 Bio-Rad 公司流式细胞仪)检测。以 1× 10^4 接种 96 孔板培养 48 h 后更换培养基并加入 3.7× 10^4 Bq ^{3}H-TdR 继续培养 6 h，收集细胞做液体闪烁计数(Backman Modle Ls8100 闪烁计数仪)。

1.2.6 原位凋亡检测(TUNEL 法) 将上述细胞以 1× 10^5 接种放有无菌小盖玻片的 24 孔板中培养 48 h 后 PBS 漂洗 4%多聚甲醛固定 30 min，其余步骤按华美公司原位凋亡试剂盒说明书进行，照相并记数凋亡率。

1.3 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件包行方差分析。

2 结果

2.1 pCMV-Script-Cans 重组载体的鉴定及 canstatin 序列分析[2]

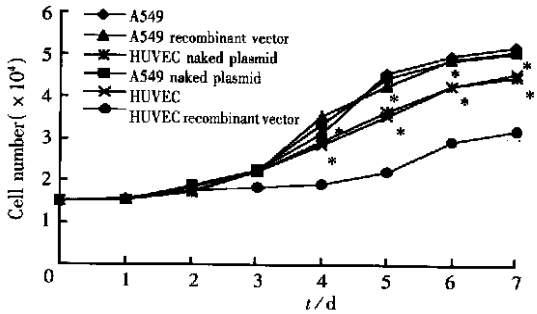
人肝组织中克隆到的 canstatin PCR 产物琼脂糖凝胶电泳，约 700 bp 与预期一致。该序列经测序验证后提交 GenBank，收录号为 AY450357。重组质粒经双酶切得到约 700 bp 片段，与预期一致。测序结果显示连接方向正确，证实重组载体构建成功。

2.2 A549、HUVEC 细胞 canstatin mRNA 表达

转染 pCMV-Script-Cans 及 pCMV-Script 的两种细胞基因组 DNA 中均扩增到 Neo 基因(492 bp)亲代细胞未扩增到 Neo 基因，证明转染成功。pCMV-Script-Cans 转染的 A549、HUVE 细胞均有 canstatin 表达(资料未显示)。

2.3 台盼蓝细胞生长曲线

转染 pCMV-Script-Cans 的 HUVE 细胞生长缓慢，而 A549 细胞与空载体对照组无差别。细胞生长曲线显示 A549 细胞亲代组、空载体组、重组载体组在细胞倍增时间为饱和密度、最大增殖倍数上比较均无显著差异($P>0.05$)，而 HUVEC 重组载体组细胞生长缓慢，与空载体组及 HUVE 细胞未干预组相比倍增时间明显延长、最大增殖倍数、饱和密度显著降低($P<0.01$)表明重组载体转染后内皮细胞 HUVEC 的生长受到明显抑制，而 A549 细胞生长不受影响(图 1)。



*: $P<0.05$, *vs* HUVEC recombinant vector

图 1 A549 细胞及 HUVE 细胞生长曲线

Fig 1 Growth curve of A549 cells and HUVECs

2.4 细胞增殖和细胞周期检测结果

2.4.1 细胞增殖 A549 细胞亲代组、空载体转染组、重组载体转染组的 ^{3}H-TdR 掺入量依次为(23 074.05±3 224.36)、(23 370.08±3 320.56)和(21 034.61±1 455.93)，3 组相比无显著差异($P>0.05$)；HUVE 细胞亲代组、空载体转染组、重组载体转染组的 ^{3}H-TdR 掺入量依次为(5 810.50±30.41)、(5 478.00±71.16)、(2 786.50±28.43)。重组载体转染组显著低于空载体转染组及亲代 HUVE 细胞组($P<0.01$)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4.2　细胞周期　　A549 细胞基因转染后 $G_0 \sim G_1$ 期、$G_2 \sim M$ 期、S 期均无明显变化, 各组均有少量细胞凋亡, 但凋亡率小于 0.3%, 在正常培养细胞凋亡率正常范围内。HUVEC 细胞重组载体转染后细胞生长周期受到阻滞, $G_0 \sim G_1$ 期细胞增多, $G_2 \sim M$ 期及 S 期细胞明显减少, 在 G_0/G_1 期前有一群 DNA 含量低的细胞形成的峰(凋亡峰), 凋亡率为 14.85%。

2.5　原位凋亡检测结果

光镜下观察到的 HUVE 细胞重组载体转染组如图 2 所示。重组载体转染的 HUVE 细胞凋亡率为(7.56±0.52)%, 显著高于空载体组(1.98±0.32)% 及亲代细胞组(1.32±0.35)% ($P<0.01$)。而 A549 亲代细胞组、空载体组、重组载体组的凋亡率分别为:(0.70±0.28)%、(0.50±0.25)%、(0.44±0.31)%, 无显著差异($P>0.05$)。说明 canstatin 基因转染可诱导内皮细胞凋亡而对肿瘤细胞无诱导凋亡的作用。

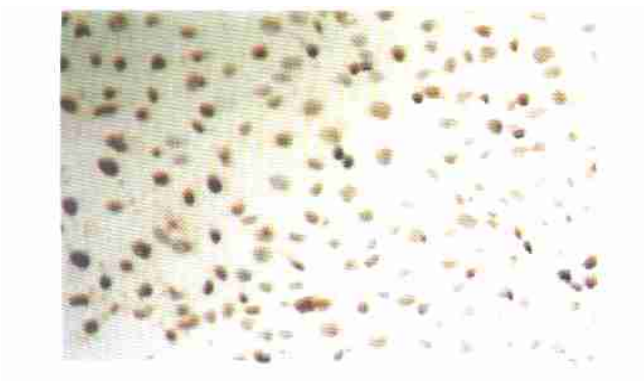


图 2　pCMV-Script-Cans 载体转染 HUVEC 原位凋亡

Fig 2　***In situ*** **apoptosis of HUVEC-pCMV-canstatin transfected cells**

3　讨论

自 Folkman 的"肿瘤饥饿疗法"提出以来陆续发现了大量的血管生成抑制剂。Canstatin 是又一新发现的内源性血管生成抑制剂, 具有更高活性且具有内皮生长抑制特异性[1]。虽然其抑制血管生成的机制还不十分清楚, 但其强大的抑制血管生成的作用却吸引了学术界的普遍关注。基因疗法可持续稳定的表达基因产物, 并使局部保持高浓度, 因此利用 canstatin 哺乳动物表达载体研究其对内皮细胞的生长抑制作用, 将对其生物活性的进一步认识和加速其临床应用的发展有很重要的意义。

Canstatin 是胶原 Ⅳ C 端的一个片段, 长 228 aa。胶原Ⅳ在肝脏中高表达, 所以从人肝组织中很容易克隆到 canstatin cDNA, 并成功地构建了含有 canstatin cDNA 的真核表达载体 pCMV-Script-Cans, 经测序证实阅读框架正确。细胞生长曲线是反映细胞生长状况的简单有效指标。实验结果显示转染了 pCMV-Script-Cans 重组载体的人脐静脉内皮 HUVE 细胞生长显著抑制, 其倍增时间显著延长, 最大密度时间、饱和密度、最大增殖倍数均显著低于空载体转染组和 HUVEC 亲代细胞组。但转染重组载体的 A549 细胞却生长良好, 上述生长状况指标与两个对照组相比无差别。说明 canstatin 基因可抑制内皮细胞生长, 但对肿瘤细胞没有直接的抑制作用。^{3}H-TdR 掺入法是检测细胞增殖极为灵敏的方法, 其原理是利用细胞增殖时细胞核可大量摄入胸腺嘧啶, 其摄入量与细胞增殖程度成正比。实验中重组载体组 HUVE 细胞 ^{3}H-TdR 掺入量明显低于空载体组和亲代细胞组, A549 细胞则与两对照组无差别。此实验进一步表明 canstatin 基因可抑制内皮细胞增殖。流式细胞术能很好地检测细胞周期, 如果有凋亡发生也会在图中得到体现。实验中重组载体组 HUVE 细胞 $G_0 \sim G_1$ 期增加、$G_2 \sim M$ 期减少、呈现 $G_0 \sim G_1$ 期阻滞, 细胞凋亡率显著增高, 而 A549 细胞各组细胞周期变化不明显。说明 canstatin 基因可使内皮细胞停滞于 $G_0 \sim G_1$ 期, 并诱导内皮细胞凋亡的发生, 说明 canstatin 对肿瘤生长的抑制作用是内皮细胞特异性的, 这一点在原位凋亡检测中也得到了进一步证实。以上结果可得出结论:转染 pCMV-Script-Cans 载体的肿瘤细胞和内皮细胞均有 canstatin mRNA 表达, 但仅内皮细胞增殖、生长明显受抑制, 凋亡率显著增高, 而肿瘤细胞生长、增殖均未受到影响, 亦无凋亡发生, 说明 canstatin 对肿瘤生长的抑制作用是内皮细胞特异性的。有研究表明 canstatin[1,4] 与生长因子竞争细胞表面受体, 抑制细胞因子对内皮的刺激增生作用。体外实验中缺乏内皮生长因子时, canstatin 对抗凋亡蛋白 FLIP 水平无影响。而当 canstatin 缺失时, 不论刺激因素存在与否, FLIP 水平上升, 因而认为 canstatin 抑制血管生成是通过降低 FLIP 水平致使内皮细胞对凋亡信号敏感性增高所致。这也许是 canstatin 诱导细胞凋亡只对内皮细胞有效的一种解释。通过构建 pCMV-Script-Cans 真核表达载体使 canstatin 在肿瘤细胞和内皮细胞的有效表达将为进一步研究该基因抑制内皮生长的机制及肿瘤的生物治疗研究提供实验基础和理论依据。

参考文献:

[1] Kamphaus G D, Colorado P C, Panka D J, *et al*. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2002, 275(2): 1209-1215.

[2] 李玉英, 黄桂君, 钱桂生, 等. 中国人 Canstatin 基因的克隆[J]. 重庆医学, 2004, 33(5): 714-715.

[3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 2001. 136-137.

[4] Panka D J, Mier J W. Canstatin Inhibits akt activation and induces fas-dependent apoptosis in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37632-37636.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net