

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0110-03

重组人内皮细胞生成抑制因子-Endostatin 的表达和纯化

李忠义¹, 汪军远², 刘江秋¹, 陈林生², 李 宁²(1. 沈阳军区军事医学研究所, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁肿瘤生物基因治疗中心)

[摘 要] 目的: 利用 *Pichia pastoris* 菌株高效表达重组人内皮细胞生长抑制因子(rh-Endostatin), 并将其纯化至均质。方法: 将构建的菌种 *Pichia pastoris* X33/pLW202 扩增后接种至发酵培养基中, 诱导表达后收获上清, 将上清浓缩后经亲和层析、凝胶层析后得到高纯度 rh-Endostatin。结果: 从发酵上清中可得到 60 mg/L 高纯度的 rh-Endostatin, 经 HPLC 检测纯度达 98% 以上。结论: 在 *Pichia pastoris* 表达系统中, 实现了 rh-Endostatin 的高效分泌性表达。

[关键词] 重组人内皮细胞生成抑制因子; 基因表达; 分离; 纯化

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Expression and Purification of Recombinant Human Endostatin

LI Zhong-yi¹, WANG Jun-yuan², LIU Jiang-qiu¹, CHEN Lin-sheng², LI Ning²(1. Military Medical Institute of Shenyang Military Region, Shenyang 110034, China; 2. Liaoning Tumor Biological Gene-Therapy Center)

[Abstract] **Objective:** To highly express rh-Endostatin from *Pichia pastoris* and purify it to homogeneity. **Methods:** Constructed *Pichia pastoris* X33/pLW202 was amplified and inoculated to ferment media. The supernatant of the strain was collected after induction. Through ultrafiltration, affinity and gel chromatography, rh-Endostatin with high purification was obtained. **Results:** 60mg/L rh-Endostatin was obtained from supernatant. HPLC showed its purity was above 98%. **Conclusion:** High level expression of secreted rh-Endostatin has been successfully achieved in *Pichia pastoris* expression system.

[Key words] rh-Endostatin; gene expression; isolation; purification

* 肿瘤是严重危害人类健康, 且死亡率很高的疾病。人体细胞分裂中都有细胞恶化的可能, 但是发展成肿瘤的可能性很小, 因为与其他迅速分化的组织一样, 肿瘤生存也需要氧气和营养, 没有血液供应, 潜在的肿瘤细胞呈死亡或呈休眠状态。肿瘤细胞迅速生长成肿瘤的关键是少数细胞的血管化^[1], 这就为人们提供了一种治疗肿瘤的新途径, 即抑制肿瘤的血管生成。目前为止, 已发现了多种血管生成抑制因子, 其中 Endostatin^[2]的作用最好, 能有效抑制 Lewis 肺癌、黑色素瘤、纤维肉瘤等多种肿瘤的生长, 且不产生抗药性^[3]。

我们在 *Pichia pastoris* 系统中构建表达了 rh-Endostatin, 其与其他表达系统表达的 rh-Endostatin 相比溶解度好, 表达量高, 可达到 60 mg/L, 而且由于蛋白分泌到细胞外易于纯化, 内毒素低, 和大肠杆菌表达物相比活性高出许多^[4]。

1 材料与方法

1.1 菌种及试剂

Pichia pastoris X33/pLW202 为本所构建。Heparin-Sepharose CL-6B 和 Sephacryl S-200 为 Pharmacia 公司产品。YPD, YNB, BMGY 培养基为 Invitrogen 公司产品。试剂均为进口分析纯。

1.2 rh-Endostatin 的表达

将菌种 *Pichia pastoris* X33/pLW202 接种至 YPD 种子培养液中, 于 180 r/min, 30℃ 培养 24 h, 再以 2.5% 的比例接种至 YNB 中进行菌种扩增, 于 180 r/min, 30℃ 培养 18 h。扩增的种子液的 1% 的比例接入

* [基金项目] 辽宁省科学技术厅(2001226001)基金资助
[作者简介] 李忠义(1946-), 男, 河北抚宁人, 研究员, 博士生导师, 主要从事抗肿瘤基因药物及病毒疫苗的研究。

发酵培养基 BMGY 中,于 30℃ 培养的 19 h,开始补 50% 甘油,在 DO >30% 的情况下补料 24 h。停止补料 0.5 h 后,开始进行甲醇诱导,控制 DO >30% 情况下补料 48 h 后离心收集上清。

1.2.1 rh-Endostatin 的纯化

1.2.1.1 浓缩粗提

取离心后上清液用 Millipore 超滤器(截留分子量为 10 000 kD)浓缩为原体积的 1/10,再加入同体积的缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl pH7.4)继续超滤浓缩 1 倍,重复操作 3 次,使表达液 pH 为 7.4。

1.2.1.2 纯化

Heparin-Sepharose CL-6B 柱用 50 mmol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl pH7.4 的缓冲液平衡后对浓缩粗提液进行特异性吸附,然后用平衡液洗掉非特异性吸附蛋白,再依次用 0.3 mol/L NaCl,0.6 mol/L NaCl,1 mol/L NaCl(3 种洗脱液 pH 均为 7.4 含 50 mmol/L Tris-HCl)洗脱。将 0.6 mol/L NaCl 洗脱峰浓缩至蛋白浓度约 25 mg/ml 进行 SephacryLS-200 凝胶过滤,洗脱液为 20 mmol/L PB,pH7.0。

2 结 果

2.1 经过对发酵表达上清取样作电泳,可以发现 Pichia pastoris 的最佳表达时间为 48 h,且随菌体量的增加,表达量增加,SDS-PAGE 分析见图 1。文献报道 Pichia pastoris 系统^[5]的表达量已达到 1 g/L 蛋白,今后有希望进行高密度发酵,提高蛋白表达量。

脱峰为杂蛋白,0.6 mol/L NaCl 洗脱峰为样品峰,1 mmol/L NaCl 无明显洗脱峰(图 2)。SephacryLS-200 柱洗脱峰(图 3)的 SDS-PAGE 分析为单一条带。各峰纯度的分析见图 1。

图 2 rh-Endostatin 亲和层析纯化图谱
Fig.2 rh-Endostatin elution pattern by affinity chromatography
1: Peak eluted with 0.3 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris pH7.4;
2: Peak eluted with 0.6 mol/L NaCl, 50 mmol/LTris pH7.4

图 1 各组化阶段的 rh-Endostatin 蛋白
(非变形样品)的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of protein form various
purification stages of rh-Endostatin (nonreduced samples)
Lane 1: Makrer; Lane 2: S-200 chromatography pooled fractions;
Lane 3: Heparin-sepharose pooled fractions; Lane 4: Organic
extract; Lane 5: Supernatant of cultured media

图 3 rh-Endostatin 凝胶层析纯化图谱
Fig.3 rh-Endostatin elution pattern by gel chromatography
eluted with 20 mmol/L PBS, pH7.0

2.2 Heparin-Sepharose CL-6B 柱的 0.3 mol/L NaCl 洗 Waters 510; 色谱柱: TSK SW3000 7.5 × 300 mm;

2.3 HPLC 仪器

流动相:20 mmol/L PBS pH7.0;流速:1.0 ml/min;进样量:30 μ l (见图4)。

启动诱导。在诱导表达期甲醇过多对细胞有毒害作用,也需要限制甲醇加入速度,以平衡细胞密度和从 AOXI 启动子开始的最佳表达。另外,发酵过程中的控制参数对菌体生长影响很大,在发酵培养中转速加快,通气量和罐压板大都可使溶氧值增加,溶氧值低时,菌体生长周期延长,溶氧增加,必须增加转速或通气量。因为通气量和罐压的改变对设备的要求较高,我们设定通气量为 5 L/min,罐压为 0.05 MPa,将转速和溶氧控制级联。在补料和诱导过程中,保持溶氧 >30% 的条件下尽可能多补。

我们表达的 rh-Endostatin 由 184 个氨基酸组成,N-端和 C-端的氨基酸序列分析与理论推测相符,用等电聚焦测定等电点,其主区带在 7.9~8.9。为确定表达的 rh-Endostatin 的抗血管生成活性我们采用鸡胚 CAM 定性和用牛毛血管内皮细胞(BCE)和人脐静脉内皮细胞(ECU304)定量测定其活性^[6],均有显著的抑制血管生成作用。用黑色素瘤细胞进行的小鼠动物实验的结果显示治疗组的肿瘤明显小于对照组病理切片显示有肿瘤的大面积坏死及瘤周毛细血管的消失^[7]。体内体外的抗血管生成结果表明我们制备的 rh-Endostatin 与国外文献报导的一致,而且生产工艺简单适于进行扩大生产。

[参考文献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 258: 1182-1186.
[2] O'Reilly MS, Boehm T, Shing, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88: 277-285.
[3] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. Nature, 1997, 390: 404-407.
[4] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: Yeast production, mutants and antitumor effect in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1999, 59: 189-197.
[5] Sudbery PE. The expression of recombinant proteins in yeasts[J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7: 517-524.
[6] 刘江秋, 李忠义, 孙亦红, 等. 重组人血管内皮抑素体外活性检测方法的研究[J]. 沈阳部队医药, 2002, 15: 4-6.
[7] 刘江秋, 李忠义, 陈林生, 等. 重组人血管内皮抑素抗肿瘤效应的应用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17: 63-64.

[收稿日期] 2002-03-05 [修回日期] 2002-04-10

图4 rh-Endostatin HPLC 纯化图谱
Fig. 4 HPLC profile of expressed rh-Endostatin

3 讨论

自 Folkman 从 Lewis 原发肺肿瘤中分离出 Endostatin 后,已采用基因工程技术用大肠杆菌,杆病毒和 Pichia pastoris 等成功地进行了表达。Pichia 表达系统是近年来发展起来的一种高效表达系统,我们构建的 Pichia pastoris X33/pLW202 以 pPICZ α A 质粒为载体,以醇氧化酶 AOXI 为启动子,有蛋白质修饰功能。它是一株甲醇利用型,能以甲醇为唯一可利用的碳源和能源生长。实验证明 Pichia pastoris 表达系统表达的蛋白不仅具有高表达、高稳定和高分泌的特点,而且分泌的蛋白不会过度糖基化,Endostatin 蛋白表达水平与大肠杆菌相比要高出 5 倍以上,另外,大肠杆菌表达的 Endostatin 不溶,临床使用不方便,也容易有内毒素,我们构建的 Pichia pastoris 表达的蛋白可溶,且由于蛋白的胞外分泌,缩短和简化了纯化过程,解决了内毒素易超标的问题。经过初步实验, rh-Endostatin 的表达量为 60 mg/L,高于同样表达系统的有关报道。发酵中我们发现补料时的甘油会抑制 AOXI 启动子的表达,因此需要限制补料速度,并要求培养基中的甘油消耗完再