中国肿瘤生物治疗杂志 Chin J Cancer Biother 2002 Sep; 9(3): 194~197

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0194-04

血管发生抑制因子 restin 的克隆表达及其抗血管活性的初步研究

张 革, 柯细松, 冯 涛, 周 兰, 曾昭淳(重庆医科大学生化教研室, 重庆 400016)

[摘 要] **目的:** 克隆人血管发生抑制因子 restin(hRS),在 *E. coli* 中融合表达,并测定其抗血管活性。**方法:** 用 RT-PCR 法从中国人胎盘组织中扩增 hRS 基因,重组入 pGEM-T 载体中并测序鉴定,构建原核表达载体 pGEX-hRS,表达融合蛋白 GST-hRS。融合蛋白经亲和纯化及凝血酶切后,采用鸡胚绒毛膜尿囊膜试验检测其抗血管生成活性。**结果:** RT-PCR 产物为 564 bp,测序结果与 Genbank 中胶原 XV(COL15A1)的 C 端序列一致,但在 21 位(TCT→TCG)引起丝氨酸的同义突变,82 位(ACA→TCA)引起丝氨酸突变为苏氨酸。诱导表达的人 GST-hRS 融合蛋白经凝血酶切后,分子量为 20 kD,具有抗血管生成活性。**结论:** hRS 的成功克隆、表达为抗血管生成治疗实体瘤的研究奠定了实验基础。

[关键词] restin; 克隆; 融合表达; 抗血管生成活性

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A

Cloning, Expression of Human Restin and It's Antiangiogensis Activity

ZHANG Ge, KE Xi-Song, FENG Tao, ZHOU Lan, ZENG Zhao-Chun (The Department of Biochemistry of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective:** To clone human angiogenesis inhibitor restin (hRS), express fusion protein in *E. Coli* and determine its biological activity. **Methods:** Restin gene was amplified by RT-PCR from Chinese human placenta tissue, then inserted into plasmid vector pGEM-T and sequenced. Prokaryotic expression vector pGEX-hRS was constructed and fusion protein GST-hRS was expressed. After the fusion protein purified by affinity chromatography and digested by thrombin, the anti-angiogenic activity of restin was tested by chicken chorio-allantoic assay. **Results:** RT-PCR product is 564 bp, the result of DNA sequencing identified the PCR product with the cDNA encoded human restin (Genbank COL15A1), but the synonymous mutation in bases encoding Ser^{21}(TCT→TCG) and mutation in Ser→Thr^{82}(ACA→TCA) were also discovered. The expressed protein size was 20 kD after isolated fusion protein digested by thrombin, it appeared the expressed restin had the power to inhibit angiogenesis. **Conclusion:** The successful cloning and expression of human restin lay the foundation for the therapy of solid tumors.

[**Key words**] restin; clone; fusion expression; antiangiogensis activity

* 实体瘤的生长及存活依赖血管形成,以肿瘤血管为靶标的抑瘤研究已成为当今癌症治疗研究的热点,目前已有多个实验室对此做了大量工作[1-2]。1999 年新发现的血管发生抑制因子 restin[3]为 XV 胶原的 C 末断片段,分子量为 20 kD,它可以抑制血管内皮细胞的迁移以及由 VEGF 刺激的血管内皮细胞的生长,并在动物肾癌模型中抑制肿瘤的形成。人体血液中有天然 restin 的存在[4],它与 XVⅢ胶原的 C 末断片段内皮抑素[5]氨基酸序列有 61% 的同源性,也具有抑制血管发生的功能。本实验从中国人胎盘组织中克隆了人 restin(hRS),初步测定其生物学活性,为进一步研究 restin 的功能及机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞、动物

E. coli DH5α, *E. coli* BL21, pGEX-2T 本室保存; pGEM-T 购自 Promega 公司;人胎盘组织取自临床标本。

* [基金项目] 本课题受重庆市科委基金资助

[作者简介] 张 革(1971-), 女, 西安人, 硕士, 助研, 主要从事抗血管生成的研究。现在中山大学中山医学院分子医学研究中心工作。

1.2 引物及主要试剂

根据文献[3]设计引物。P1: 5′-GGA TCC ATT TCA AGT GCC AAT CAT GAG AAG CCT-3′, P2: 5′-GAA TTC TTA CTT CCT AGC GTC TGT CAT GAA ACT-3′, 分别加有 BamH I 与 EcoR I 的酶切位点,由上海生工生物工程公司合成。AMV 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;DNA 片段的回收采用 Qiagen Gel Extraction Kit;GST 融合蛋白纯化试剂盒购自 Amersham Pharmacia 公司;其他主要化学试剂为 Sigma 公司产品。

1.3 RT-PCR 扩增 hRS cDNA

按 Trizol 试剂(Gibco BRL)的说明操作抽提总 RNA。用 PCR 下游引物,AMV 逆转录酶,于 42℃ 1 h 合成 cDNA 第一链。PCR 扩增的反应条件为 95℃变性 7 min 后,95℃变性 30 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,30 次循环,最后 72℃保温 10 min。

1.4 hRS 片段的克隆及测序

在长波紫外光下回收 DNA 片段,与 pGEM-T 载体 16℃过夜连接,连接产物转化 *E. coli* DH5α,挑取白色克隆,BamH Ⅰ,EcoR Ⅰ双酶切鉴定后,阳性克隆命名为 pGEM-hRS。ABI377 测序仪测序(上海博亚生物技术公司)。

1.5 GST- hRS 融合表达载体的构建

用 BamH Ⅰ, EcoR Ⅰ双酶切 pGEX-2T 载体与 pGEM-hRS 重组质粒,分别回收线状载体与目的片段,16℃过夜连接,转化 *E. coli* BL21。BamH Ⅰ,EcoR Ⅰ双酶切鉴定转化子,阳性克隆命名为 pGEX-hRS。

1.6 GST-hRS 融合表达产物的分析

接种阳性表达菌株于 2×YAT 培养基中,当 OD_{600} 值为 0.5~0.6 时,加入 IPTG 至 0.1 mmol/L,于 30℃继续培养 3 h 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,10% 的 SDS-PAGE 分析表达产物,用薄层扫描仪计算 GST-hRS 在菌体总蛋白质中的含量。

1.7 GST-hRS 融合表达产物的纯化

接种阳性表达菌株于 LB 培养基中,加入 IPTG 至 0.005 mmol/L,于 25℃培养 3 h 后收获菌体。置冰浴超声破菌后,取上清,用 Bulk GST Purification Modules 亲和纯化,凝血酶酶切,15% 的 SDS-PAGE 分析纯化效果及酶切产物,OD_{280} 测定蛋白含量。

1.8 hRS 抗血管活性的检测

采用鸡胚绒毛膜尿囊膜试验(CAM)。取 9 d 龄的受精鸡胚,蛋壳上开口,分别以浸有 0.2 μg VEGF(对照组)及 0.2 μg VEGF 和 3 μg hRS(给药组)的 1 cm^2 滤纸片贴于鸡胚绒毛膜尿囊膜上,37℃,培养 3 d 后,剥开蛋壳,去除滤纸,200× 光学显微镜下观察 6 组鸡胚绒毛膜尿囊膜上的平均新生血管一级数和二级数[6]。*t* 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增 hRS 基因片段

提取的人胎盘组织总 RNA, OD_{260}/OD_{280} = 1.95, 电泳可见清晰的 18S 及 28S rRNA 条带。RT-PCR 获得 564 bp 的 DNA 片段,与预期片段大小一致(图 1)。

图 1 PCR 产物及重组质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of PCR product and recombined plasmid pGEX-hRS

Lane 1: DNA marker(DL2,000); Lane 2: pGEX-hRS digested by Bam H I and EcoR I; Lane 3: PCR product

2.2 hRS 基因片段的克隆测序

hRS 基因片段的测序结果与 GeneBank 中胶原 XV(COL15A1)的 C 端序列一致,但在氨基酸序列的 21 位(TCT→TCG)有丝氨酸的同义突变,在 82 位(ACA→TCA)丝氨酸突变为苏氨酸。测序结果(见图 2)。

2.3 pGEX-hRS 表达载体的构建

随机挑选 5 个转化子,双酶切鉴定后,克隆阳性率为 100%。

2.4 GST-hRS 融合蛋白的表达及初步鉴定

用 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 30℃ 3 h 诱导细菌表达,与未诱导的比较,在 10% 的 SDS-PAGE 上 46 kD 处有一明显的表达条带,表达量占菌体总蛋白含量的 25%(图 3)。菌体裂解后的 SDS-PAGE 分析表明,表达产物以包含体形式存在,但通过改变培养基,降低诱导温度及 IPTG 的诱导浓度,则可表达出可溶性的目的蛋白,经亲和层析得到分子量为 46 kD 的高纯度的融合蛋白,凝血酶消化后,得到约 20 kD 的蛋白(图 4)。

ATT TCA AGT GCC AAT TAT GAG AAG CCT GCT CTG CAT TTG GCT GCT CTG AAC
ATG CCA TTT CGG GGG ACA TTC GAG CTG ATT TTC AGT GCT TCA AGC AGG CCA
GAG CTG CAG GAC TGT TGT CCA CCT ACC GAG CAT TCT TAT CTT CCC ATT TGC
AAG ATC TGT CCA CCA TTG TGA GGA AAG CAG AGA GAT ACA GCC TTC CCA TAG
TGA ACC TCA AGG GGC CAA GTA CTT TTT AAT AAT TGG GAC ACA ATT TTT TCT
GGC CAC GGA GGT CAG TTC AAT ATG CAT ATT CCA ATA TAC TCC TTT GAT GGT
CGA GAC ATA ATG ACA GAT CCT TCT TGG CCC CAG AAA GTC ATT TGG CAT GGC
TCC AGC CCC CAT GGC GTC CGC CTT GTG GAT AAC TAC TGT GAA GCA TGG CGA
ACC GCG GAC ACA GCG GTC ACG GGA CTT GCC TCC CCG CTG AGC ACG GGG AAG
ATT CTG GAC CAG AAA GCA TAC AGC TGT GCT AAT CGG CTA ATT GTC CTA TGT ATC
GAA AAC AGT TTC ATG ACA GAC GCT AGG AAG TAA

图 2　hRS 的 cDNA 序列

Fig. 2　The sequence of the cDNA of hRS

2.5　抗血管活性检测

200 × 光学显微镜下观察 4 个视野鸡胚绒毛膜尿囊膜上的平均新生血管一级数和二级数，给药组(9.7 ±3.1, 19.3 ±3.8)与对照组(17.5 ±1.9, 31.2 ±7.2)相比有显著减少($P<0.05$, $P<0.05$, 图 5)。

图 3　GST-hRS 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 3　Expression of GST- hRS fusion protein in *E. Coli*

Lane 1: pGEX-2T induced by IPTG; Lane 2: pGEX-hRS induced by IPTG; Lane 3: pGEX-hRS uninduced; Lane 4: Protein marker

图 4　GST-hRS 的纯化与酶切产物

Fig. 4　Purified and digested recombinant hRS

Lane 1: GST- hRS purified; Lane 2: GST- hRS digested by thrombin; Lane 3: hRS purified; Lane 4: GST purified; Lane 5: Protein marker

图 5　鸡胚绒毛膜尿囊膜试验(CAM)

Fig. 5　Chicken chorio-allantoic assay

A: The vessels of control groups(treated with VEGF)

B: The vessels of tested groups(treated with hRS and VEGF)

3　讨　论

血管发生在胚胎发育、组织生长、伤口愈合、肿瘤生长等许多生理病理过程中起重要作用。内皮抑素是目前最有效的血管发生抑制因子，与内皮抑素高度同源的 restin 也有类似的功能。但由于未知的原因，Restin 对血管发生的体外抑制效果不如内皮抑素，并且与内皮抑素相反，restin 仅抑制由 VEGF 诱导的血管生成而不能抑制由 FGF-2 刺激的血管生成[3]。同时，两者在组织定位以及在各组织中的表达丰度等方面也不尽相同[7-8]。另外，restin 从 XV 型胶原上的释放方式、抑制内皮细胞迁移的信号通路、抑制 VEGF 诱导的血管生成的机理等还未研究清楚。

本文克隆了 hRS 基因,序列分析表明在 21 位处有同义突变,在 82 位由丝氨酸改变为苏氨酸。丝氨酸与苏氨酸均为带有羟基的氨基酸,理化性质相似,在本实验中对生物学活性无影响,这些差异可能是由人种的差异引起的。本实验调整诱导条件,用 LB 培养基于 25℃,以 0.005 mmol/L 的 IPTG 可诱导出可溶性的蛋白产物,纯化出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含体的难题。本文认为相对低温、低浓度的 IPTG 及低营养的培养基有利于表达可溶性的蛋白。另外,CAM 法初步表明 hRS 的抗血管生长的活性,为进一步研究 restin 的功能与作用机理以及与内皮抑素联合的抗血管生成作用奠定基础。

致谢:感谢广东省农科院兽医所黄庚明博士帮助进行 CAM 实验。

[参考文献]

[1] 王若宁, 刘玲玲, 张一鸣, 等. 血管生成抑素的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 10-12.

[2] 刘都户, 张学庸, 黄裕新, 等. 血管内皮生长因子的表达和血管生成与人胃癌移植瘤生长的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 17-19.

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

[4] Harald J, Klaus T, Wolf G, *et al*. Novel glycosylated forms of human plasma endostain and circulating endostatin-related fragment of collagen XV[J]. Biochemistry, 1999, 38(32): 10217-10224.

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

[6] 付生法, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术[J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17(4): 294-296.

[7] Takako S, Helena L, Dominic T, *et al*. Endostatin derived from collagen ⅩⅤ and ⅩⅧ differ in structual and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity[J]. J Mol Biol, 2000, 301: 1179-1190.

[8] Li D, Charles CC, Myers JC, *et al*. Basement membrane zone type ⅩⅤ collagen is a disulfide-bonded chondroitin sulfate proteoglycan in human tissue and cultured cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 22339-22347.

[收稿日期] 2002-01-30 [修回日期] 2002-04-01

欢迎订阅《癌变·畸变·突变》杂志

《癌变·畸变·突变》是中国科学技术协会主管、中国环境诱变剂学会(国家一级学会)主办的唯一的学术期刊,也是我国向国内外公开发行的唯一一份专门报道环境因子致癌变、致畸变、致突变,以及抗癌变、抗畸变和抗突变科研成果的学术刊物,1989 年创刊。本刊为《中国学术期刊综合评价数据库》统计源期刊,《中国科技期刊引证报告》收录期刊,由《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录,并加入《万方数据—数字化期刊群》。根据 2001 年中国科学技术信息研究所分布的统计报告,本刊 1999 年的"影响因子"为 0.282,在全国 2 601 种学术期刊中排名第 582,在全国 21 种肿瘤类期刊中则排名第 8。"即年指标"(反映期刊当年发表的论文在当年被引用的情况)和"基金论文比"分别为 0.232 和 0.44,在全国 21 种肿瘤类期刊中均名列首位。本刊主要刊载医药品、化学物质、食品添加剂、化妆品、营养保健品、放射线,以及水体、空气、土壤等环境污染物与肿瘤发生、胎儿发育畸形和遗传基因突变的关系,以及癌变机制、抗癌物的开发利用、抗突变物的作用及其与抗癌物的关系、环境因子风险评价等方面的论著和检测研究。本刊读者对象为从事环境保护、卫生防疫、计划生育、药品及生物制品研制、肿瘤防治,以及从事遗传学、毒理学、药物学等工作的科技人员和大专院校的师生。

从 2003 年起,本刊在纸张、排版、印刷、装订等方面将有明显提高;封面改用 200 克进口铜版纸(单面覆膜),内页改用 105 克进口哑粉纸,增加彩色图版。虽然如此,订价仍维持不变;每期 6 元,全年 24 元。

本刊邮局发行代号:4-548。欢迎订阅,欢迎投稿。

kD