

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0179-04

人血管抑制因子 Vasostatin 短片段(120-180 aa)的克隆、表达及功能研究

李光宇¹, 范斌¹, 吴雅臻¹, 吴家祥²(1. 吉林大学第二医院, 长春 130041; 2. 吉林大学基础医学院, 长春 130021)

[摘要] **目的:** 利用基因工程技术, 克隆并表达人血管抑制因子 Vasostatin_{120-180 aa} 功能区片段, 探讨其对鸡胚绒毛尿囊膜新生血管抑制的作用。**方法:** 采用 PCR 技术扩增人血管抑制因子 Vasostatin_{120-180 aa} 功能区基因, 并利用 pQE30 原核表达系统诱导表达 Vasostatin_{120-180 aa}, 经镍金属螯合层析法纯化, 通过鸡胚绒毛尿囊膜实验验证其抑制新生血管生成的作用。**结果:** PCR 扩增出了长度为 180 bp 的 Vasostatin_{120-180 aa} 功能区基因, 后经 pQE30 原核表达系统表达并纯化出 Vasostatin_{120-180 aa}, SDS-PAGE 显现一条约 8 kD 的阳性条带, Vasostatin_{120-180 aa} 可显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜新生血管的生成。**结论:** 原核表达的 Vasostatin_{120-180 aa} 功能区片段具有生物学活性, 可明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜新生血管的生成, 在一定范围内呈量效依赖性。

[关键词] 血管抑制因子; 基因表达; 血管新生

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A

Cloning and Expression of Recombinant Human Vasostatin's Domain and Its Ability to Inhibit Angiogenesis in CAM

LI Guang-yu¹, FAN Bin¹, WU Ya-zhen¹, WU Jia-xiang²(1. Jilin University, The Second Hospital, Changchun 130041, China; 2. Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To clone and express the recombinant human Vasostatin_{120-180 aa} domain and to investigate its activity of inhibiting angiogenesis in CAM. **Methods:** After amplifying gene of human Vasostatin_{120-180 aa} domain, we subcloned it into pQE30 vector and expressed Vasostatin_{120-180 aa} domain by *E. coli*. We also tested its ability of inhibiting angiogenesis in CAM. **Results:** The total gene length of human Vasostatin_{120-180 aa} domain is 180 bp. Expressed by pQE30 system in *E. coli* and purified by IMAC, Vasostatin_{120-180 aa} was detected by SDS-PAGE, in which there is a positive band and molecular weight is about 8 kD. **Conclusions:** Recombinant human Vasostatin_{120-180 aa} could play effective role in anti-angiogenesis in CAM and it showed a dose dependent effect in some degree.

[Key words] vasostatin; gene expression; angiogenesis;

* 新生血管的生成与众多疾病相关, 如肿瘤、糖尿病视网膜病变、风湿性关节炎等。抗新生血管作用的研究也一直是热点问题之一。血管抑制因子 Vasostatin 是美国学者 Pike 等^[1]于 1998 年首次发现并命名, 它是钙网素 (calreticulin) N' 端的水解片段, 全长 180 个氨基酸, 具有抑制血管生成的作用。但其主要功能区位于 120-180 aa, 为进一步探讨并验证 Vasostatin 功能区片段的抗新生血管作用, 我们重组了人 Vasostatin 短片段 (120-180 aa), 将其在大肠杆菌中进行表达, 并通过鸡胚绒毛尿囊膜实验, 来验证其抑制新生血管生成的作用。

1 材料与方法

1.1 酶、质粒、菌株、细胞株及主要试剂

Kpn I 及 BamH I 限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶购于宝泰克生物公司; 携带人 Vasostatin 全长基因的 pUC-T-VASO 质粒由吉林大学第二医院范斌博士惠赠; 大肠杆菌 JM109, M15 由吉林大学第一医院中心实验室惠赠; 质粒 pQE30 表达系统购自 QIAGEN 公司。质粒提取试剂盒、DNA 清洁回收试剂盒购自鼎国公司。NALON 凝胶购自 CLONTECH 公

[基金项目] 本课题由吉林大学第二医院创新基金资助, 2003 年编号 041

[作者简介] 李光宇 (1973-), 男, 长春人, 主治医师, 病理学博士, 主要研究病理性血管新生机制

司。鸡胚购自长春北方鸡场。

1.2 Vasostatin(120-180 aa)引物的设计

遵循 PCR 引物设计的原则,根据发表的人 Vasostatin 编码区 cDNA 序列及所需短片段位置、长度(120-180 aa),设计 PCR 引物。引物 1: 5' GAG-GATCCGGCCCTGGCACCAAGAAGTTC3' 引物 2: 5' CAGGTACCTTCCAAGGAGCCGGACTCCACCT3'。并委托大连宝生物工程公司合成。

1.3 PCR

以携带人 Vasostatin 全长基因的 pUC-T-VASO 质粒为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增。反应条件为: 95℃ 变性 5 min 后,进入 30 个循环: 95℃ 变性 35 s, 66℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 35 s; 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经含溴化乙锭的 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定(见图 2),DNA 清洁回收试剂盒回收。

1.4 pUC-T-VASO₁₂₀₋₁₈₀ 测序载体的构建及序列测定

将回收的 PCR 产物 15 μl, 加入 2 μl 10 × buffer、1 μl T₄ DNA 连接酶、1 μl PUC-T 载体和 1 μl ddH₂O, 16℃, 过夜, 次日转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞。经蓝白筛选, 挑取菌落, 提取质粒, PCR 及酶切鉴定重组阳性菌落。将阳性重组质粒命名为 pUC-T-VASO₁₂₀₋₁₈₀, 委托大连宝生物工程公司测序。

1.5 pQE30-VASO₁₂₀₋₁₈₀ 表达载体的构建

将 pUC-T-VASO₁₂₀₋₁₈₀ 质粒用 BamH I 和 Kpn I 两种限制性内切酶切割, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 VA-SO₁₂₀₋₁₈₀ 基因片段。pQE30 载体用同样双酶切割, 回收。T₄ DNA 连接酶连接目的基因和表达载体, 4℃, 过夜。转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞。挑取菌落, 提取质粒, PCR 及酶切鉴定重组阳性载体。

1.6 目的蛋白的诱导表达

将 pQE30-VASO₁₂₀₋₁₈₀ 重组阳性载体转化至 M15 大肠杆菌感受态细胞。从 37℃ 过夜培养的平板上随机挑选生长良好的单菌落, 接种于 1ml LB 液体培养基(卡那霉素 50 μg/ml, 氨苄青霉素 200 μg/ml), 37℃, 125 r/min 振摇过夜。次日取过夜菌 1: 100 倍稀释, 230 r/min 振摇至 OD₆₀₀ 大约为 0.5 ~ 0.6 之间时加入 IPTG, 37℃, 230 r/min 继续振摇。

1.7 目的蛋白的纯化

取 100 ml 菌液, 离心后沉淀加入 4 ml 的超声裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris · Cl, 250 mmol/L NaCl, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml Aprotinin, pH8.0), -70℃ 反复 3 次冻融、超声破碎后, 离心收集沉淀包涵体。加入 3 ml 2% 去氧胆酸(250 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, 20 mmol/L Tris · Cl, pH8.0), 充分悬浮, 50℃, 水浴 10 min。利用固定镍凝

胶柱复性法(一步纯化/复性法)^[2]使重组的蛋白结合于镍凝胶柱上, 用梯度发生器产生尿素浓度逐渐降低的梯度进行复性。流速 15 ml/h, 复性 4 h。上述带有已复性的重组蛋白的镍凝胶微型柱, 用梯度发生器产生咪唑浓度逐渐升高的梯度进行洗脱。分别收集流出液, 各留出 40 μl 行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶扫描测定蛋白纯度。将有目的蛋白条带的各管收集液合并, 装入透析管中, 4℃ 下用 1 × PBS 缓冲液(含 10% 甘油, pH8.0)透析 24 h。4℃ 下聚乙二醇 20000 浓缩至所需体积。

1.8 鸡胚绒毛尿囊膜实验(chicken embryo chorioallantoic membrane, CAM assay)

取鸡受精卵, 用干布拭净, 置于卵架上, 放入 38℃ 恒温箱中孵育, 孵箱内置水盘使相对湿度为 45% ~ 60%。每天翻动 1 ~ 2 次, 孵育至第 4 天, 用检卵灯观察鸡胚是否发育。发育的鸡胚可在壳壁上看到清晰的血管影和鸡胚暗影, 以后胚影逐渐增大, 渐有胚动, 血管也增多、变粗、明显。将已死的鸡胚或胎动消失、血管昏暗模糊处于濒死状态者淘汰。

取 6 日龄发育情况好的鸡胚 40 只, 分为 4 组: 空白对照组, A 组, 10 只, 给予 1 × PBS 透析缓冲液各 200 μl; 实验组, B 组, C 组, D 组, 各 10 只, 给予浓度为 6.25、50、100 μg/ml 的 Vasostatin_{120-180aa} 各 200 μl, 每个浓度 10 只, 每日给药 1 次。

1.9 给药方法

检卵灯下划定气室的边界, 75% 乙醇消毒该部位, 用无菌粗针头将蛋壳钻一个直径约 1 mm 的圆洞, 1 ml 注射器穿透壳膜进入尿囊腔注射蛋白溶液, 无菌封口膜封口。38℃ 继续孵育 48 h, 除去鸡胚外壳, 观察血管生长情况并拍照。

1.10 统计学分析

分级: 各级分支血管无明显抑制(-), 三级以上分支血管抑制明显(+), 二级分支血管抑制明显(++), 一级分支血管抑制明显(+++)

应用非参数统计方法(Kruskal-Wallis 法), 对 3 组不同浓度 Vasostatin_{120-180aa} 抑制新生血管生成的效果观察后进行统计分析。

2 结果

2.1 VASO₁₂₀₋₁₈₀ PCR 产物

根据已设计的引物进行 PCR, 得到 180 bp 大小的片段, 同预期大小一致, 如图 1 所示。测序分析后与发表的 Vasostatin(120-180 aa) 基因序列完全一致。

2.2 目的蛋白的诱导表达、纯化与鉴定

Vasostatin_{120-180aa} 在 M15 大肠杆菌中的表达主要以

包涵体形式存在,不同时相表达结果显示如图 2,蛋白在 IPTG 诱导表达后的 4 ~ 5 h 表达量较大,且杂蛋白较少;若再延长时相,杂蛋白增多。包涵体经镍金属螯合层析方法纯化后,SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色显示 8 kD 左右单一条带,与计算值相符(见图 2),凝胶扫描显示蛋白纯度达 88.46%。

消退。

2.4 统计学分析

不同浓度 Vasostatin_{120-180aa} 对鸡胚新生血管的抑制情况如下:A 组为对照组;B 组(6.25 μg/ml),(-)为 1 例,(+)为 8 例,(++)为 1 例;C 组(50 μg/ml),(+)为 4 例,(++)为 5 例,(+++)为 1 例;D 组(100 μg/ml), (++)为 3 例,(+++)为 7 例。应用非参数统计方法(Kruskal-Wallis 法)统计分析后,3 组不同浓度的 Vasostatin_{120-180 aa} 对新生血管抑制效果明显不同($P < 0.05$),且具有量效依赖性。

图 1 Vasostatin_{120-180 aa} PCR 产物的琼脂糖胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of vasostatin_{120-180 aa} PCR products
1: Marker; 2: Vasostatin_{120-180 aa}

2.3 鸡胚绒毛尿囊膜实验(chicken embryo chorioallantoic membrane, CAM assay)

如(图 3),A 组对照组,B,C,D 组分别加入蛋白 6.25 μg/ml 只、50 μg/ml 只、100 μg/ml 只。B 显示鸡胚绒毛尿囊膜各级血管生长仍比较旺盛;C 显示大血管末端变细,小血管消退明显;D 显示大、小血管均有

图 2 不同诱导时相 Vasostatin_{120-180aa} 纯化后 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE of purified Vasostatin_{120-180aa} on different induced time point

图 3 不同浓度 Vasostatin_{120-180aa} 对鸡胚绒毛尿囊膜新生血管的抑制作用

Fig.3 The effect of Vasostatin_{120-180aa} with different concentration to inhibit angiogenesis of chicken embryo chorioallantoic membrane

A: Control group; B: Vasostatin_{120-180aa} 6.25 μg/ml; C: Vasostatin_{120-180aa} 50 μg/ml; D: Vasostatin_{120-180aa} 100 μg/ml

3 讨论

Vasostatin 的 120-180 aa 片段区是其主要功能区,我们通过基因工程技术,克隆并表达了 Vasostatin_{120-180aa}

短片段,经镍金属螯合层析的方法纯化出了活性蛋白,纯度达 88.46%。在利用 IPTG 诱导蛋白表达时,我们发现诱导时间为 5~6 h 最佳,既能表达大量目的蛋白,又可防止过多杂蛋白生成。鸡胚绒毛膜尿囊膜实验显示,Vasostatin_{120-180aa}具有良好的抑制新生血管生成的作用,小剂量时即可显示出对末梢小血管及毛细血管抑制作用,在 50 μg/ml 时抑制作用明显,可以对小血管以及粗大血管产生显著抑制作用。我们经过对新生血管抑制情况分级后,采用非参数检验法(Kruskal-Wallis 法)对不同浓度的 Vasostatin_{120-180aa}组进行统计学分析,结果显示 Vasostatin_{120-180aa}抑制新生血管生成的作用在一定范围内具有量效依赖性,随着剂量增加后,抑制作用逐渐增强。目前抗新生血管生成的机制很多,如直接抑制血管内皮细胞增殖的抑制性因子 Endostatin, Angiostatin 等;拮抗刺激性因子的 VEGF-trap, sFlt 等^[3]。但 Vasostatin_{120-180aa}短片段抑制血管生成的作用机理还不是十分清楚,我们克隆出了 Vasostatin_{120-180aa}短片段可以为以后更好地探讨并研究其作用机制奠定基础

础,同时 Vasostatin_{120-180aa}短片段增加了蛋白作用专一性,提高了生物学效能,缩短肽链长度后,更易于表达,减少蛋白的降解率,使其更具有基因工程药物的特征,Vasostatin_{120-180aa}短片段是一种极具开发潜力的抗新生血管生成的基因工程药物。

[参 考 文 献]

[1] Pike SE, Yao L, Jones KD, *et al.* Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(12): 2349.
 [2] Holzinger A, Phillips KS, Waver TE. Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: Application to surfactant protein B[J]. *Bio Techniques*, 1996, 20: 804.
 [3] Brian P. Eliceiri, David A. Cheresh. The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(9): 1227.

[收稿日期] 2003 - 12 - 23

[修回日期] 2004 - 03 - 20

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0182-01

IFN-α 对 CML 树突状细胞表型及功能的影响

翟欣辉, 邢佩霓, 赵文理, 魏绪仓 (陕西省人民医院血液科, 西安 710068)

临床观察表明 IFN-α 治疗早期慢性期 CML 患者有效,并且 IFN-α 治疗 CML 达到部分细胞遗传学缓解以上的患者较之 IFN-α 治疗无效者其生存期明显延长。IFN-α 治疗 CML 有效的机制尚不清楚,可能与其增强 DC 的表型及功能有关。DC 是体内唯一能激活初始型 T 细胞的抗原递呈细胞,在机体免疫系统中处于中心地位。我们采用 CML 患者骨髓单个核细胞,体外有血清培养体系中观察 IFN-α 对 CML-DCs 的分化及其功能的影响。

CML 骨髓单个核细胞(1×10^6 /ml)悬浮于含体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,接种于 35 mm 平底培养皿(总体积 1 ml)。加入 rhGM-CSF 900 U/10 μl, rhTNF-α 50 U/ml, 于培养的第 1~5 天加入 rhSCF 200 U/ml 和 rhFlt-3L 5 ng/ml。第 5~12 天以 rhIL-4 500 U/10 μl 替换 rhSCF、rhFlt-3L, 其余细胞因子不变。IFN-α 分 A 组(0 U/ml)和 B 组(300 U/ml), 于培养的第 1, 第 4, 第 7, 第 10 天加入上述体系中培养 2 周,每隔 2 天更换 1/3 量含细胞因子的培养基。流式细胞仪检测培养细胞的免疫表型;G 显带法显示 Ph¹ 染色体;MTT 法检测 CML-DCs 刺激健康人外周血 T 淋巴细胞的增殖情况。

结果显示,A 组和 B 组培养 2 周后的细胞在细胞形态上无明显差异;在培养细胞的数量及 DC 比例上两组间明显不同,B 组总的细胞数减少,但 DC 比例增加($P < 0.01$);流式细胞仪进一步分析 DC 免疫表型发现 A 组和 B 组间 HLA-DR 的表达无差异,但 B 组 DC CD86, CD83, CD40, MHC- I 类分子的表达水平明显升高($P < 0.01$);Ph¹ 染色体阳性比例分析发现,B 组培养后与培养前比较 Ph 染色体阳性比例下降,而 A 组无变化;同种混合淋巴细胞反应中,B 组较 A 组 OD 值亦明显升高,表现出明显增强的刺激能力($P < 0.01$)。

本研究表明,IFN-α 通过上调 CML-DCs 共刺激分子及 MHC- I 类分子而加速 DCs 的成熟,增强 DCs 的功能,部分解释了 IFN-α 治疗 CML 有效的机制。

[关键词] α-干扰素;慢性粒细胞性白血病;树突状细胞

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] D

[收稿日期] 2003 - 10 - 17

[修回日期] 2004 - 03 - 01

[基金项目] 陕西省卫生厅科研基金资助课题(NO.99034)资助