

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0423-06

· 论 著 ·

血管基膜衍生多功能肽的表达及其生物活性的鉴定

戴文建¹, 张 曼¹, 彭淑平², 曹建国³(1. 湖南环境生物职业技术学院, 湖南 衡阳 421005; 2. 中南大学 肿瘤研究所, 长沙 410078; 3. 南华大学 肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

[摘 要] **目的:** 在毕赤酵母中表达血管基膜衍生多功能肽(vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, VBMDMP), 并鉴定其生物学活性。 **方法:** 利用 PCR 技术获得融合了谷胱甘肽转移酶(GST)的肿瘤抑素(tumstatin)活性成分的 GST-VBMDMP 基因, 克隆到 pPIC9K 载体; 然后原生质体转化法转化毕赤酵母细胞, 行多克隆筛选和表型鉴定。获得 His⁺ Muts 表型的转化子, 在 MGY 培养液中 30 °C 摇床培养, 每 24 h 从培养液中转移 1 ml 培养液上清于 -70 °C 保存, 并保持培养瓶中培养液的量和培养液中甲醇 0.5% 的浓度不变, 第 9 天行 SDS-PAGE 检测表达的蛋白并纯化, 然后进行细胞和动物生物活性检测。 **结果:** SDS-PAGE 发现阳性重组子在 MGY 培养液中表达的蛋白量在 1~7 d 逐渐增加, 到第 8 天后开始减少, 用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化获得 GST-VBMDMP 融合蛋白; GST-VBMDMP 能抑制 C57BL/6 鼠动脉内皮细胞管状结构的形成; 同时 GST-VBMDMP(2、6、10 mg/kg)对小鼠 Lewis 肺癌原发瘤(瘤重抑制率分别为 96.6%、82.1%、61.2%)和自发性肺转移瘤(瘤结节抑制率分别为 96.8%、87.9%、75.3%)均具有明显的抑制作用($P < 0.01$)。 **结论:** VBMDMP 能够抑制鼠动脉内皮细胞管状结构的形成, 并对小鼠 Lewis 肺癌原发瘤和肺转移具有明显的抑制作用。

[关键词] 血管基膜衍生多功能肽; 抗肿瘤; 血管形成抑制剂; 血管基底膜; 内皮细胞血管化

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A

Expression of vascular basement membrane-derived multifunctional peptide in *Pichia pastoris* and identification of its bioactivity

DAI Wen-jian¹, ZHANG Man¹, PENG Shu-ping², CAO Jian-guo³(1, Hunan Environment Biological College, Hunan Hengyang 421005, China; 2, Institute of Tumor Research, Central South University, Changsha 410006, China; 3, Institute of Tumor Research, Nanhua University, Hunan Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective:** To express vascular basement membrane-derived multiple peptide (VBMDMP) in *Pichia pastoris* and to identify its bioactivity. **Methods:** PCR technique was used to obtain the target fragment GST-VBMDMP, which was then cloned into pPIC9K vector. The resultant vector pPIC9K-GST-VBMDMP was transfected into *Pichia pastoris* cells with spheroplast and the positive recon was identified. The His⁺ Muts transformant was shake-cultured in MGY at 30 °C. The culture supernatant (1 ml) was collected for preservation at -70 °C every 24 hours while maintaining the concentration of methanol at 0.5% in the culture medium. SDS-PAGE analysis was used to detect the protein expression after 8 days and then animal and cell experiments were performed with GST-VBMDMP. **Results:** SDS-PAGE analysis found that protein express increased during 1-7 days and decreased after 8 days in MGY medium; GST-VBMDMP fused protein was obtained by Glutathione Sepharose 4B and it inhibited the artery endothelial cell tube structure formation in C57BL/6 mouse; GST-VBMDMP(2, 6, 10 mg/kg)also significantly inhibited the primary cancer Lewis mouse (tumor inhibitor rates being 96.6%, 82.1%, and 61.2%, respectively)and metastatic lung tumors(tumor inhibitor rates being 96.8%, 87.9%, and 75.3%, respectively)($P < 0.01$). **Conclusion:** VBMDMP can inhibit mouse artery endothelial cell tube structure formation and Lewis mouse primary, metastatic lung tumors.

[Key words] vascular basement membrane-derived multifunctional peptide; anti-tumor; angiogenesis inhibitor; vascular basement membrane; tube structure formation of endothelial cell

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 423-428]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30472040)

[作者简介] 戴文建(1968-), 男, 湖南湘阴人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

[通讯作者] 曹建国, E-mail: caojianguo48@ hotmail. com

血管形成抑制剂是近年抗肿瘤药的一个研究热点,人们已在血管基底膜上发现了数种具有抑制肿瘤血管形成的成分。来源于血管基底膜主要成分IV型胶原的 α_3 链非胶原区[$\alpha_3(\text{IV})\text{NC1}$]的新型血管形成抑制剂 Tumstatin 有抑制血管内皮和肿瘤细胞增殖作用两个功能区:Tumstatin N-端的 74~98 氨基酸功能肽(简称 T₇肽)能抑制肿瘤血管内皮增殖和诱导内皮细胞凋亡^[1], Tumstatin N-端的 197~215 氨基酸功能肽能够抑制肿瘤细胞增殖^[2]。有趣的是:当 Tumstatin 的 N-端 197~215 氨基酸功能肽作为 Tumstatin 整体的一部分时,没有抑制肿瘤细胞增殖的效应,只有切去该肽多余的片段时,该作用才能体现出来,Maeshima 等^[1]解释为空间结构影响所致。人的 IgG₃上游铰链区由 11 个氨基酸组成,柔性好,不但可以保证 P53 四价功能域与基因工程抗体的空间构象互不影响,还可以使基因工程的四聚体中的 4 个抗体同时与距离较远的抗原结合,进一步增加四聚体的功能性亲和力^[3]。本实验室曾应用人工合成基因技术构建了 T₇肽-人 IgG₃上游铰链区-Tumstatin N-端的 197~215 氨基酸功能肽核苷酸序列,测序并命名为血管基膜衍生多功能肽(vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, VBMDMP)DNA^[4]。本课题构建融合谷胱甘肽转移酶(GST)的血管基膜衍生多功能肽(GST-VBMDMP)的真核表达载体,并在巴斯德毕赤酵母大量表达并纯化,然后鉴定其生物学活性,为可能的基因工程药 VBMDMP 的临床应用作好前期准备工作。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株和试剂

p9PICK 表达载体、毕赤酵母菌株 GS115[his4]购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5 α [supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1],含 GST-VBMDMP 区 cDNA 片段的重组质粒 pGEX-4T-I-VBMDMP 为本实验室保存;所有毕赤酵母菌株均在 4℃ 下保藏于 YDP 平板上,每 2 周传代 1 次;PCR 引物由上海生工公司合成;T4 DNA 连接酶, dNTP, TaqDNA 聚合酶,内切酶 Bgl II、SnaB I、Not I 为 TakaRa 公司产品。

1.2 培养液

大肠杆菌完全培养液 LB 成分为:1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物,1% 氯化钠;YPD 培养液成分为:1% 酵母抽提物,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖,1.5% 琼脂;MD 培养液成分为:0.34% YNB,1% 硫酸铵,2% 葡萄糖,4 \times 10⁻⁷生物素,1.5% 琼脂;MM 培养液成分为:0.34% YNB,1% 硫酸铵,0.5% 甲醇,4 \times 10⁻⁷生物素,1.5% 琼

脂;MGY 培养液成分为:0.34% YNB,1% 硫酸铵,1% 甘油。SOS 培养液:91% 甘露醇,1.5% 酵母抽提物,3% 蛋白胨,3% 葡萄糖,1.75% 琼脂,0.39% 氯化钙。

1.3 动物和药品

环磷酰胺为上海华联制药有限公司产品,批号为 011216。Lewis 肺癌种鼠和 C57BL/6 试验用小鼠分别购自中国科学院药物研究所和上海生命科学院试验动物部。

1.4 目的基因的获取

根据 GST-VBMDMP 的碱基序列,pPIC9K 碱基序列、多克隆位点和 DNAClub 软件设计并合成引物:R₁:5'-CGG TAC GTA GTA TTC ATG TCC CCT ATA C-3'含 SnaB I 酶切位点;R₂:5'-ATA GCG GCC GCT CTT TCT GGG TTT AAT GAA GC-3'含 Not I 酶切位点;以 PGEX-4T-1-VBMDMP 为模板,R₁、R₂为引物进行延伸反应;将反应物加入 0.5 ml Eppendorf 管中;反应条件是:94℃ 变性 2 min 后,进行第一个循环:变性,退火,延伸分别是 94℃ 45 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min 30 个循环,最后一个循环后 72℃ 延伸 5 min。

1.5 重组表达质粒的构建和鉴定

参照 Sambrook 等^[5]的方法进行。PCR 产物和载体 pPIC9K 分别用 SnaB I 和 Not I 酶切,纯化,混合 37℃ 连接过夜;转化大肠杆菌,提取质粒,酶切和测序鉴定。将 10 μ l(约 16 μ g)线性化的质粒(pPIC9K-GST-VBMDMP 及 pPIC9K)分别加入 300 μ l 的原生质球细胞中室温下温育 10 min,管中加新鲜配制的 PEG/CaT 溶液 1.0 ml,轻轻混匀离心倒出上清,重悬细胞球于 150 μ l 的 SOS 培养液中,室温下温育 20 min;加入 850 μ l 1 mol/L 山梨醇,铺于 MD 平板上;翻转平板 28~30℃ 培养 2~5 d,得到 His⁺型转化子;然后将该转化子铺于含质量浓度 1.0 mg/ml G418 的 YPD-G418 平板上,30℃ 培养,每天检查,待 YPD-G418 平板上长出菌落后在 MM 和 MD 平板上划线,30℃ 培养划线的 MM 和 MD 平板,2~3 d 后,在 MD 平板上生长正常,MM 平板上没有生长的或生长缓慢的菌株为甲醇慢利用型(His⁺Mut^{*})。煮-冻-煮法裂解甲醇慢利用型毕赤酵母细胞,提取 DNA,鉴定目的基因是否已经融合入酵母细胞。

1.6 GST-VBMDMP 基因片段在毕赤酵母中的表达和纯化

挑取单一 His⁺Mut^{*}的克隆接种于装有 100 ml MGY 培养液的 500 ml 培养瓶中,在 28~-30℃ 摇床中培养(250~300 r/min)20 h。室温下 2 000 r/m 离心 5 min 收集细胞,细胞沉淀重悬于含 20 ml MM 液体培养液的 250 ml 的培养瓶中,用两层无菌纱布覆盖继续

培养。每隔 24 h 取样 1 ml 室温下 12 000 r/min 离心 3 min 收集上清 - 80 °C 冻存, 并补加 MGY 培养液至 20 ml, 然后添加 100% 甲醇至终体积分数为 0.5%。8 d 后, 取样进行 SDS-PAGE 分析。将样品上样到谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱上, PBS 溶胀, 充分洗涤, 再用含有 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱, 即可得到纯化的 GST-VBMDMP。

1.7 抑制大鼠动脉内皮细胞血管化活性的测定

用含 10% 小牛血清的 M199 培养液培养大鼠动脉内皮细胞 (MAE), 按每孔 25 000 个细胞加到 24 孔平板上, 然后将 matrigel 按每孔 280 μ l 均匀地加到 24 孔平板上并允许它聚合。分别用 VBMDMP 50 μ g 和等量灭菌的 PBS 处理, 细胞在 37 °C 温育 28 h, H-E 染色, 光镜下 ($\times 10$) 观察并照相。

1.8 对体内肿瘤细胞抑制的观察

Lewis 肺癌细胞悬液, 将细胞 1.5×10^6 个 (溶于消毒的 0.1 ml PBS 溶液中) 右后肢皮下接种于 8 周大小的 Lewis 小鼠, 第 2 天将动物随机分为 6 组 (每组 4 只): 模型对照组, GST 对照组, 环磷酰胺阳性对照组, GST-VBMDMP 3 个不同的剂量组。环磷酰胺阳性对照组以 100 mg/kg 体重隔天注射, 一共给药 6 次; GST 对照组 10 mg/kg, GST-VBMDMP 低剂量组 2 mg/kg, GST-VBMDMP 中剂量组 5 mg/kg, GST-VBMDMP 高剂量组 10 mg/kg, 模型对照组生理盐水 10 mg/kg, 连续腹腔注射 14 d, 每天 1 次。28 d 后处死小鼠, 比较瘤重、肺转移瘤结节数, 瘤组织病理切片观察病变情况。

1.9 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件包分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 目的基因的获取及序列鉴定

以 PGEX-4T-1-VBMDMP 为模板, R_1 、 R_2 为引物进行延伸反应, 反应完成后取反应产物 3 μ l 加 1/6 体积上样液后在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳鉴定, 结果显示获得大小 880 bp 左右条带, 与预期大小相符 (图 1) 测序显示与预期的序列结果完全一致 (图略)。

2.2 pPIC9K-GST-VBMDMP 表达载体的构建

*Sna*b I 和 *Not* I 双酶切目的片段和载体 pPIC9K, 用 T4 DNA 连接酶连接过夜后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌, 得到重组质粒 pPIC9K-GST-VBMDMP, 用 *Sna*b I 和 *Not* I 双酶切, 并用 *Not* I 酶切 pPIC9K, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 连接有 GST-VBMDMP 的载体可得到 880 bp 大小片段和载体片段, 而空质粒则未见 880 bp 大小片段 (图 2), 该小片段大小与目的基因片段大小

一致。为了进一步确证, 对该重组子进行序列分析, 测序显示与预期的序列结果完全一致 (图略)。

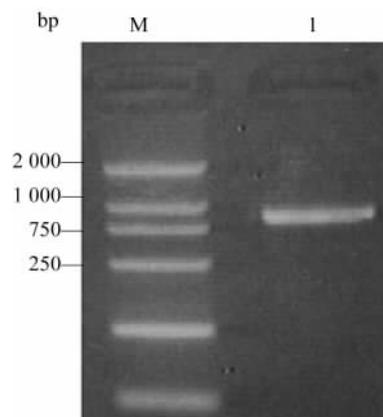


图 1 PGEX-4T-1-VBMDMP 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products from PGEX-4T-1-VBMDMP
M: DNA marker; 1: PCR product

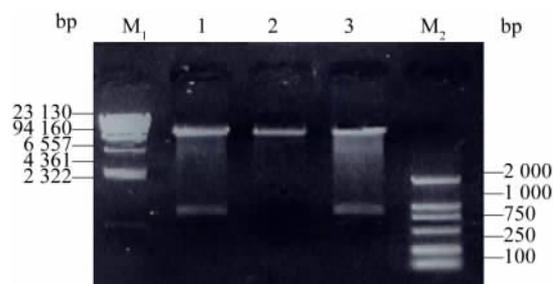


图 2 用 *Sna*b I 和 *Not* I 限制性内切酶消化 pPIC9K-GST-VBMDMP 和 pPIC9K

Fig. 2 Restriction map plasmid pPIC9K-GST-VBMDMP and pPIC9K digested with *Sna*b I and *Not* I
 M_1 、 M_2 : DNA marker; 1, 3: pPIC9K-GST-VBMDMP; 2: pPIC9K

2.3 pPIC9K-GST-VBMDMP 和 pPIC9K 转化酵母菌

将 *Bgl* II 线性化的 pPIC9K-GST-VBMDMP 和 pPIC9K 转化感受态的 GS115 酵母细胞, 抽提转化细胞的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物琼脂糖凝胶中电泳鉴定结果, 显示转化了 pPIC9K-GST-VBMDMP 的细胞能获得大小 880 bp 左右片段, 而转化了 pPIC9K 的细胞未见任何片段 (图 3)。

2.4 GST-VBMDMP 融合蛋白的表达

挑选 His⁺ Mut⁺ 菌株在 MGY 培养液中培养 8 d, 并用 0.5% 甲醇诱导, SDS-PAGE 发现 pPIC9K-GST-VBMDMP 工程菌表达产物在约相对分子质量为 41 000 处有一条新浓蛋白条带 (图 4)。该融合蛋白在第 8 天前, 表达的量持续上升, 至第 8 天开始下降。对图 5 的电泳结果进行薄层扫描显示, GST-VBMDMP 目的条带

可占总蛋白条带的 20% 左右。Bradford 试剂测定重组酵母培养上清的总蛋白量为 623.2 mg/L。由此可知, GST-VBMDMP 的表达量可达 125.3 mg/L。

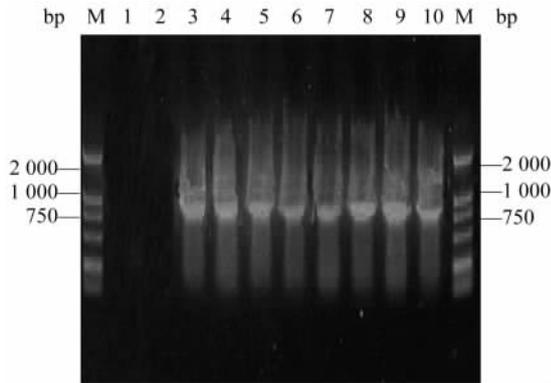


图 3 PCR 鉴定转化的 GS115 酵母细胞中抽提的 DNA

Fig. 3 PCR identification of DNA extracted from transformed GS115

M: Marker; 1,2: pPIC9K; 3~10: pPIC9K-GST-VBMDMP

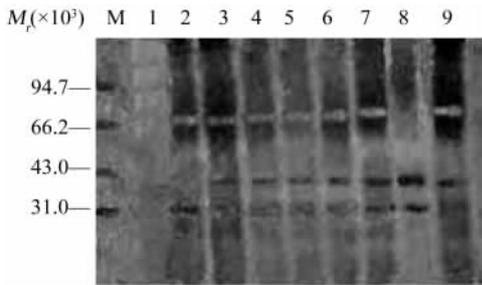


图 4 SDS-PAGE 分析表达产物 GST-VBMDMP

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression products

M:Protein mass marker; 1: pPIC9K 7 days after methanol culture; 2~9: pPIC9K-GST-VBMDMP 1 d,2 d,3 d,4 d, 5 d,6 d,7 d,8 d after induced by methanol, respectively

2.5 GST-VBMDMP 融合蛋白的纯化

GS115 对照组(转化有空质粒 pPIC9K)未见蛋白质表达,转化有重组质粒 pPIC9K-GST-VBMDMP 的 GS115 经甲醇诱导后,在 41 000 左右出现一条新的蛋白质条带,它比预期的 33 000 相对分子质量要大,这与以往文献的报道一致。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 层析柱纯化后,得到高纯度的 GST-VBMDMP 融合蛋白(图 5),而空质粒未见有蛋白质出现。

2.6 融合蛋白对鼠动脉内皮细胞血管化的抑制作用

在 MAE(鼠动脉内皮细胞)培养液中加 50 μg 转化酵母表达培养液总蛋白,MAE 细胞的血管化受到明显抑制(图 6A),而对照组则出现明显的内皮细胞血管化现象(图 6B)。

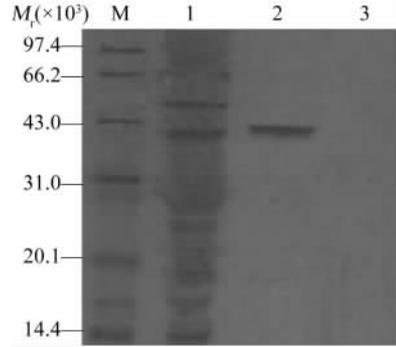


图 5 纯化融合蛋白 GST-VBMDMP 的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE of purified fusion protein GST-VBMDMP

M: Protein mass marker; 1: GST-VBMDMP before purification; 2: GST-VBMDMP after purification; 3: Blank plasmid

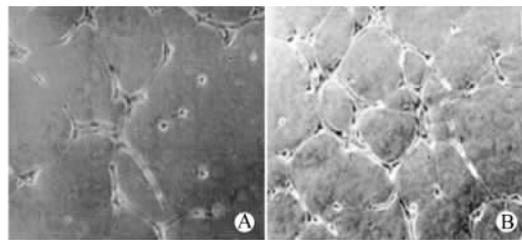


图 6 GST-VBMDMP 作用前后鼠动脉内皮细胞的血管化状态(×10)

Fig. 6 Tubulation of endothelial cells before and after treated with GST-VAMDMP (×10)

A: In the presence of 50 μg VBMDMP; B: Without VBMDMP

2.7 融合蛋白对体内肿瘤细胞生长的影响

2.7.1 GST-VBMDMP 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长的影响 模型鼠接种部位原发瘤重量平均(3.26 ± 0.23) g,说明病理模型成功建立,治疗前和后(GST-VBMDMP 10 mg/kg)的病理学组织检查见图 7,GST 对照组和模型对照组没有明显差异。经治疗后,GST-VBMDMP 对小鼠 Lewis 肺癌原发瘤具有显著抑制作用,且呈剂量依赖性。环磷酰胺的瘤重抑制率为 81.0%,中高剂量 GST-VBMDMP 的瘤重抑制率与环磷酰胺相当(表 1)。

2.7.2 GST-VBMDMP 对小鼠 Lewis 移植瘤自发性转移瘤结节数的影响 GST-VBMDMP 能显著的抑制小鼠 Lewis 移植瘤自发性肺转移,处死后发现肺部自发性转移瘤的结节数明显少于对照组,低剂量 VBMDMP (2 mg/kg)的自发性肺转移结节抑制率为 73.9%,接近环磷酰胺的治疗效果(表 2)。治疗前和后(10 mg/kg)的组织病理学改变见图 8。

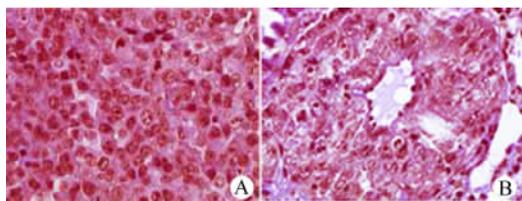


图7 GST-VBMDMP 治疗前后 C57 BL6 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的病理形态改变(H-E, $\times 400$)

Fig. 7 Pathological change of xenograft of lewis lung carcinoma in mice C57BL before and after treatment with GST-VBMDMP(H-E, $\times 400$)

A: Before treatment; B: After treatment

表1 GST-VBMDMP 对 C57BL/6 小鼠 Lewis 移植瘤生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Influence of GST-VBMDMP on growth of xenograft in C57BL /6 mice

Group	Dose ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Mass (m/g)	IR (%)
NS control	10 ml/kg	3.8 ± 0.4	
GST control	10	3.7 ± 0.5	0.5
GST-VBMDMP	2	$1.5 \pm 0.3^{**}$	61.2
GST-VBMDMP	5	$0.7 \pm 0.4^{**}$	82.1
GST-VBMDMP	10	$0.17 \pm 0.14^{**}$	96.7
CTX	100	$0.72 \pm 0.25^{**}$	81.0

** $P < 0.01$ vs NS control; IR: Inhibitory rate

表2 GST-VBMDMP 对 C57BL 6 小鼠 Lewis 移植瘤转移结节的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effects of GST-VBMDMP on metastasis nodes of Lewis xenograft in C57BL/6 mice

Group	Dose ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Metastasis nodes	IR (%)
NS control	0.1 ml/kg	9.6 ± 2.5	
GST control	10	9.6 ± 1.8	0.0
GST-VBMDMP	2	$2.5 \pm 1.6^{**}$	75.3
GST-VBMDMP	5	$1.3 \pm 1.0^{**}$	87.9
GST-VBMDMP	10	$0.5 \pm 0.7^{**}$	96.8
CTX	100	$2.4 \pm 1.3^{**}$	75.0

** $P < 0.01$ vs NS control; IR: Inhibitory rate

3 讨论

寻找和开发有良好治疗作用的抗肿瘤药物一直是

国内外医学界共同关注的热点。恶性肿瘤细胞生长迅速,并具有向周围正常组织浸润及转移到远处的特性。传统的治疗方法如化疗和放疗,主要是针对异常增殖的肿瘤细胞,抑制其生长、诱导其凋亡或使其坏死,但正常细胞不可避免地同时会受到损伤而死亡。血管生成抑制剂具有对肿瘤血管生成的抑制作用而不影响正常细胞的生长^[5],是近年来抗肿瘤药物研究的热点。而 tumstatin 在几种内源性血管生成抑制因子(angiostatin, endostatin, canstatin)中具有最强的血管生成抑制效应,在人前列腺癌裸鼠异种移植瘤模型和 C57BL/6 小鼠 786-0 肾癌移植瘤模型的治疗实验中, Tumstatin 的抗肿瘤效应较 Endostatin 强 10 倍^[6]。T7 肽(74-98aa)抑制血管生成效应与 tumstatin 相似, a₃(IV)NC1 185-203aa(即 tumstatin 的 N-端 197-215aa)获得性肽能抑制多种恶性肿瘤细胞增殖、迁移和黏附能力,如不同株系的黑色素瘤细胞、纤维肉瘤细胞、骨肉瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞等^[7]。本实验室开发了具有抑制肿瘤血管形成的专利药血管基膜衍生多功能肽(专利号:1594580A)。为了进一步获得该肽在人体中应用的依据,本研究在真核细胞中表达了该肽,并研究了它的生物学活性。

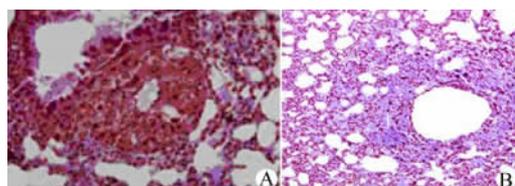


图8 GST-VBMDMP 治疗前后的 C57BL 6 鼠 Lewis 移植瘤转移灶的病理形态(H-E, $\times 400$)

Fig. 8 Pathologic morphologies of metastases of Lewis xenograft in C57BL/6 mice before and after treatment with GST-VBMDMP(H-E, $\times 400$)

A: Morphologies of metastases of Lewis xenograft in C57BL/6 mice; B: Morphologies of metastases of Lewis xenograft in C57BL/6 mice after treatment with GST-VBMDMP

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近年来兴起的一个真核高效表达系统,具备许多独特的优点,已迅速发展成为分子生物学领域中被广泛用于重组蛋白生产的主要系统之一^[8-9],有许多其他蛋白表达系统所不具备的优点^[10-11]:(1)具有强有力的乙醇氧化酶(AOX1)基因启动子,可严格调控外源蛋白的表达;(2)可对表达的蛋白进行加工折叠和翻译后修饰,从而使表达的蛋白具有生物活性;(3)营养要求低,生长快,培养液廉价;(4)表达量高;(5)外源基因通过质粒整合到巴斯德毕赤酵母基因组上,这样得到的基因工程菌株比

较稳定;(6)糖基化程度低,和酿酒酵母比,巴斯德毕赤酵母中加到翻译蛋白上的糖链长度平均每条侧链为 8~14 个甘露糖残基,较之酿酒酵母每条侧链短得多。此外酿酒酵母核心多糖末端存在 α -1,3 糖苷键,而毕赤酵母没有。一般认为酿酒酵母中糖蛋白的 α -1,3 糖苷键使得这些蛋白具有高度的抗原性,因而无治疗用途。

为避免 VBMDMP cDNA 分子量较小,造成表达后易被降解和表达后的纯化问题,本研究将 GST 融合到目的基因中,并根据载体本身的特点设计引物,将目的基因融合在载体的 α -factor 信号肽序列下端加上载体本身的多聚组氨酸标签,从而成功地实现了目的基因在毕赤酵母中的表达。其优点是:(1) GST-VBMDMP 以可溶形式表达并保持正确构象;(2)可减少 GST-VBMDMP 被胞内蛋白酶降解,同时有利该蛋白的纯化和检测。研究中发现,表达的蛋白与预期的蛋白分子量不同,经去糖基化反应证明,分子量多出部分为蛋白糖基化所致。

本研究成功地合成了 VBMDMP DNA 序列,构建了表达载体,并在毕赤酵母中获得稳定表达的 GST-VBMDMP 融合蛋白。该蛋白能被体内凝血酶切断,游离出 VBMDMP 和 GST。因此,GST-VBMDMP 融合蛋白可产生体内抗肿瘤活性。小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型治疗发现,重组表达的 GST-VBMDM 融合蛋白对小鼠 Lewis 肺癌皮下接种原发瘤和肺转移均有抑制作用,并呈剂量依赖性。同时发现,VBMDMP 能显著地抑制内皮细胞管道状结构的形成,表明 VBMDMP 具有抑制肿瘤血管生成和抑制肿瘤细胞增殖的双重功能,是一种极具潜力的新型抗肿瘤基因工程药。

血管基膜衍生多功能肽的作用机制可能与它的两个活性成分的机制相关,因为铰链区 IgG₃并不影响两个活性成分的空间构象,这两者连接之后,它既可抑制肿瘤血管的形成,也可抑制肿瘤细胞的增殖,是一个多作用靶点肽。Maeshima 等^[12]认为 T₇肽可作用于血管形成的不同阶段,并可以通过细胞表面的受体而特异性地抑制内皮细胞增殖,同时它还可能抑制表皮生长因子和纤维细胞生长因子;它诱导内皮细胞凋亡与其增加 caspase-3 活性有关^[12];另外,T₇肽还可能抑制与血管生成密切相关的基质金属蛋白酶^[13]。而 tumstatin 的 N-端 197-215 氨基酸功能肽的抗肿瘤作用是它作用于肿瘤细胞表面的 CD47/IAP(integrin associated protein)和 $\alpha\gamma\beta_3$ 蛋白而发挥作用^[2]。

[参 考 文 献]

- [1] Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, *et al.* Extracellular matrix-derived peptide binds to $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and inhibits angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(34): 31959-31968.
- [2] Floquet N, Pasco S, Ramont L, *et al.* The antitumor properties of the $\alpha(3)$ (IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 2091-2100.
- [3] Rheinacker M, Hardt C, Ilag LI, *et al.* Muhiwident antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen[J]. *J Immunol*, 1996, 157(7): 2989-2997.
- [4] 彭淑平,方唯意,戴文建,等. 血管基膜获得性功能肽克隆、表达和空间构象分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 185-189.
- [5] Sund M, Hamano Y, Sugimoto HF, *et al.* Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8): 2934-2939.
- [6] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, *et al.* Identification of anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 275(18): 15240-15248.
- [7] Han J, Ohno N, Pasco S, *et al.* A cell binding domain from the $\alpha(3)$ chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cell [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(33): 20395-20401.
- [8] Cregg JM, Cereghino J, Shi J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(1): 23-52.
- [9] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45-66.
- [10] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*[J]. *Biototechnology*, 1993, 11(8): 905-910.
- [11] Laroche Y, Strome V, Meutter JD, *et al.* High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide(TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Biototechnology*, 1994, 12(11): 1119-1124.
- [12] Pedchenko V, Zent R, Hudson BG. $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ integrins bind both the proximal RGD site and non-RGD motifs within noncollagenous (NC1) domain of the $\alpha(3)$ chain of type IV collagen: Implication for the mechanism of endothelial cell adhesion[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2772-2780.
- [13] 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(28): 21340-21348.

[收稿日期] 2006-07-23

[修回日期] 2006-09-20

[本文编辑] 王莹