

钙网蛋白 122 ~ 180 片段基因 克隆、表达和活性分析*

陈 宏 张添元 罗进贤** 胡志上

(中山大学生物化学系, 基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

摘要 钙网蛋白是高等动物细胞中普遍存在的一种钙结合蛋白, 近年发现它及其 N 端 1 ~ 180 位氨基酸能抑制内皮细胞生长和血管生成. 为了寻找高效和小分子质量的血管生成抑制因子, 用 PCR 技术扩增出钙网蛋白 N 端 122 ~ 180 位氨基酸的 DNA 序列, 克隆进原核表达载体 pET-3c, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后, 该片段以包涵体形式表达, 表达量约占菌体总蛋白的 35.4%. 包涵体经变性溶解、复性和初步纯化后, 纯化产物可以抑制人脐静脉内皮细胞的生长, 鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成和小鼠原位黑色素瘤的生长.

关键词 122 ~ 180 片段, 钙网蛋白, 基因表达, 内皮细胞, 血管生成, 肿瘤生长

学科分类号 Q78

肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的生成以提供充足的血液, 使癌组织获得生长所需的营养和氧气^[1]. 寻找高效低毒的血管生成抑制因子抑制肿瘤的血管生成, 达到抑制和治疗肿瘤的目的, 是当前肿瘤研究领域的热点之一. 20 世纪末已先后发现了多个内源性的血管生成抑制因子, 如 Angiostatin^[2]、Endostatin^[3]、Restin^[4,5]、Canstatin^[6]、Tumstatin^[7]等, 它们都能专一地抑制血管生成和实验肿瘤的生长. 与传统的抗癌药物不同, 这一类抑制因子不会产生抗药性且毒性极低. 但这些蛋白质因子的分子质量都较大, 不利于重组蛋白的生产和药物的传输. 钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 是高等动物细胞中普遍存在的一种钙结合蛋白, 由 3 个功能区组成, 包括 N 端 (180 位氨基酸) 的保守区、C 端 (137 位氨基酸) 的钙结合区及中间的富含脯氨酸并有两段重复序列的 P 区. CRT 具有分子伴侣、结合钙、细胞吸附和基因表达调控等功能^[8]. 最近发现 CRT 及其 N 区 (1 ~ 180 位氨基酸), 能专一地抑制内皮细胞的生长和血管的生成, 其 N 区与白介素 12 共同使用还能抑制 Burkitt 淋巴瘤细胞瘤、直肠癌的生长^[9,10]. 为了探索是否存在更小分子质量的具有抗血管生成的功能片段, 本研究用蛋白质分析软件对 CRT N 端 (1 ~ 180 位氨基酸) 片段可能的活性功能区进行了分析后, 应用 PCR 技术扩增了 CRT N 区编码 122 ~ 180 位氨基酸的 DNA 片段 (N58), 克隆至大肠杆菌表达载体, 并对其在大肠杆菌表达的产物进行了抗血管生成和抑癌活性分析, 为寻找新的高效和小分子质量的血管生成抑制因子和抗癌蛋白打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 为本室保存, 质粒 pET-3c 由暨南大学生物工程中心转赠.

1.1.2 细胞株、鸡胚和实验动物: 海兰种蛋由佛山畜牧有限公司供给; 黑色素瘤细胞株 (B16)、人脐静脉内皮细胞株 (ECV304)、人胚肺成纤维细胞株 (HLF)、人乳腺癌细胞株 (MCF-7); C57/BL 小鼠, 雄性, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g 购于中山大学医学院动物实验中心.

1.1.3 酶和主要试剂: 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶及其他限制性修饰酶购自 GIBCO - BRL 公司, dNTP、PCR 试剂盒及 DNA 回收试剂盒为 Roche 公司产品. Tricine, MTT 及 IPTG 购自 Sigma 公司, PCR 引物由上海博亚公司合成, 胎儿组织总 cDNA 购自 Clontech 公司.

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取、酶切、DNA 的连接及大肠杆菌的转化: 按文献 [11] 方法进行.

1.2.2 PCR 扩增及 PCR 产物的 DNA 序列分析: 先从人胎肝总 cDNA 中用 PCR 扩增人钙网蛋白 cDNA, 然后以 CRT cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增

* 广东省自然科学基金资助 (011207).

** 通讯联系人.

Tel: 020-84112397, E-mail: lsbro02@zsu.edu.cn

收稿日期: 2003-08-05, 接受日期: 2003-09-29

CRT N 区的 N58 DNA 序列. 扩增条件为第一循环 94℃ 5 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min; 第二循环开始每个循环 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min 共 30 个循环. PCR 产物的 DNA 序列分析由博亚生物技术有限公司完成.

1.2.3 N58 DNA 的表达: 将含 N58 DNA 序列的重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 在含氨苄青霉素 (Amp) (100 mg/L) 的平板上筛选转化子, 挑取转化子单菌落接种于含 Amp (100 mg/L) 的 2 × YT 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日转接至新鲜的 2 × YT 培养基中, 37℃ 培养至 $A_{600} = 0.5$, 加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 继续培养 6 h. 取 1 ml 培养液离心收集菌体, 悬浮于 40 μl TE 缓冲液, 加等体积 2 × 上样缓冲液 100℃ 煮沸 5 min, 取 10 μl 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析.

1.2.4 表达产物的纯化: 菌体悬浮于 STE 中, 用超声波破碎, 离心收集沉淀即为粗制包涵体. 用含有 0.05% Triton X-100 的 4 mol/L 尿素反复洗涤包涵体, 除去细胞碎片、核酸等杂质. 纯净的包涵体溶于变性液 (50 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, 0.5% β-巯基乙醇) 中, 室温下放置过夜进行变性溶解. 次日, 离心除去不溶物质, 上清液在磁力搅拌下缓慢加入 20 倍体积复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA-2 mmol/L 还原型谷胱甘肽-1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽), 室温过夜进行复性. 复性液用 Millipore TFF 超滤器浓缩并除去尿素等部分杂质. 超滤液上 Sephadex G75 层析柱 (1.6 cm × 50 cm), 样品 4 ml, 用 50 mmol/L 的 pH 8.0 Tris-HCl 平衡和洗脱, 每管 2 ml, 共收集 20 管, 用考马斯亮蓝 G250 检测, 含蛋白质的管进行 SDS-PAGE 分析.

1.2.5 内皮细胞增殖试验: 采用 MTT 法^[12], 实验用细胞均培养在含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中至

对数生长期, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 再用 RPMI-1640 培养液调节细胞浓度为 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml. 按 0.1 ml/孔细胞悬液的量加入 96 孔细胞培养板. 按试验设计每组为 3 个重复孔, 空白对照孔不加细胞, 在 37℃ 5% CO₂ 中培养 24 h, 更换新鲜培养液, 试验组各加入 0.05 ml N58 蛋白样品, 培养 72 h 后, 加入 0.02 ml MTT, 继续培养 4 h 后, 吸去上清, 加 0.1 ml DMSO, 振荡 10 min, 测 A_{570} .

$$\text{抑制率 (CI)} = \left[\frac{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{对照组}}} \right] \times 100\%$$

1.2.6 鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 测定法: 选用孵育 6 天的鸡胚, 以灭菌滤纸片 (0.5 mm × 0.8 mm) 作为样品载体, 对照组 ($n = 5$) 加入 10 μl PBS 溶液, 实验组 ($n = 5$) 加 10 μl 浓度为 0.5 g/L 的 N58 蛋白样品, 培养 48 h 观察结果^[13].

1.2.7 抑癌活性实验: 接种 0.2 ml 细胞浓度为 0.5×10^6 个/ml 的 B16 黑色素瘤细胞于 C57BL/6 小鼠的右前肢跟部上方. 待瘤体长出后用游标卡尺测量肿瘤的长径 (L) 和短径 (W), 按公式 $V = 1/2LW^2$ 计算瘤体积, 单位 mm³. 待肿瘤长至 100 mm³ 左右时, 将 C57BL/6 小鼠随机分组: 实验组 ($n = 5$) 在靠近肿瘤部位皮下注射 100 μg (0.2 ml) 待测样品; 对照组 ($n = 4$) 皮下注射 0.2 ml 的 PBS. 每 24 小时重复注射一次, 持续 8 天, 观察肿瘤生长情况, 测量肿瘤体积, 然后取出肿瘤称重, 计算抑癌率,

$$\text{抑癌率} = \left[\frac{(m_{\text{对照组平均肿瘤}} - m_{\text{实验组平均肿瘤}})}{m_{\text{对照组平均肿瘤}}} \right] \times 100\%$$

2 结 果

2.1 N58 DNA 片段的克隆

2.1.1 PCR 引物的合成: 根据已发表的 CRT cDNA 的序列^[14] 合成了如下两对 PCR 引物.

Sac I
P1: 5' GAGCTCACCATGCTGCTATCCGTGC 3'

P2: 5' TCTAGAGGCAGGCCTCTCTACAG 3'

Xba I

EcoR I Nde I

P3: 5' GGAATTCATATGCACGGAGACTCAGAATAC 3'

P4: 5' CTGCGGCCGCGGATCCTTAGTTGTCTGGCGGCACAATCAG 3'

Not I BamH I

2.1.2 N58 DNA 片段的扩增: 先以 P1、P2 为引物用 PCR 技术从人胎脑总 cDNA 中扩增 CRT cDNA, 经序列分析后克隆至 pUC19 的 *Sac* I 和 *Xba* I 位点, 然后以 CRT cDNA 为模板, P3、P4 为引物扩增 N58 DNA 片段. 经琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增产物约为 200 bp (图 1), DNA 序列分析结果如图 2. PCR 产物大小为 206 bp, 除去两端的限制酶切位点和终止密码, 实际的编码区为 177 bp, 相当于 CRT 的 N 端 122 ~ 180 位氨基酸 (图 2).

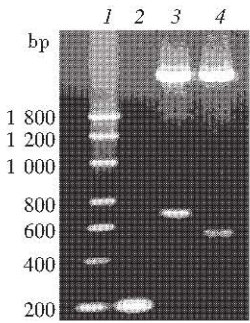


Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR product and restriction analysis of plasmid pET-N58

1: DNA marker; 2: PCR product; 3: pET-N58/*Xba* I + *Eco*R I; 4: pET-3c/*Xba* I + *Eco*R I.

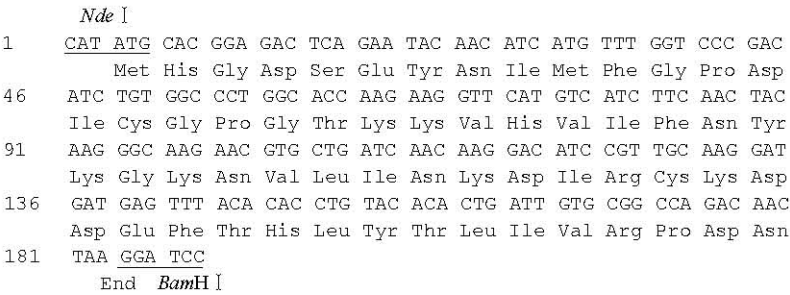


Fig. 2 DNA sequence and encoded amino acid sequence of PCR product

2.2 含 N58 DNA 的表达载体 pET-N58 的构建
PCR 产物经 DNA 回收试剂盒纯化和序列分析后, 用 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切后, 与同样经过

Nde I 和 *Bam*H I 酶切的质粒 pET-3c 连接, 获得 N58 DNA 的表达载体 pET-N58 (图 3). 根据 pET-3c 图谱和序列分析, pET-3c 经过 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切应切出一条 589 bp 的小带, 而重组质粒 pET-N58 应切出一条 766 bp 的小带, 图 1 显示的结果与预期吻合. 电泳与序列分析结果显示 N58 DNA 已克隆至质粒 pET-3c 且连接部分的序列正确.

2.3 N58 DNA 在大肠杆菌中的诱导表达

将重组质粒 pET-N58 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后获得的转化子 *E. coli* BL21 (DE3, pET-N58) 在 2 × YT 培养液培养至 *A*₆₀₀ 约为 0.5 时加 IPTG 诱导, 表达产物进行 SDS-PAGE. 图 4 结果显示, 经 IPTG 诱导 6 h 后, *E. coli* BL21 (DE3, pET-N58) 泳道上在 6.2 ku 附近出现一条新的蛋白质带, 而未经诱导的 BL21 (DE3, pET-N58) 和经诱导的 BL21 (DE3, pET-3c) 泳道上不出现相应的带. 用薄层激光扫描仪进行扫描分析, 估算出 N58 的表达量约占菌体总蛋白的 35.4%. SDS-PAGE 结果还显示, 菌体经超声破碎后, 目标蛋白主要集中在沉淀部分, 以包涵体的形式存在.

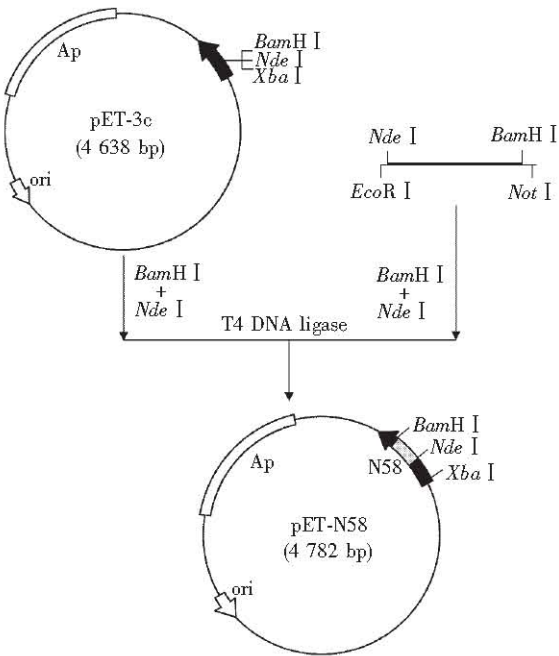


Fig. 3 Construction of recombinant plasmid pET-N58

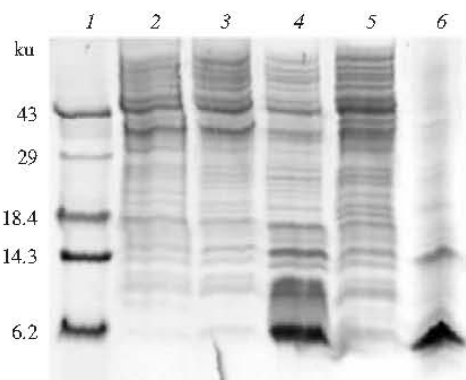


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed products
1: Protein marker; 2: BL21 (DE3, pET-3c), induced; 3: BL21 (DE3, pET - N58), not induced ; 4: BL21 (DE3 , pET - N58), induced ; 5 : Supernatant of sonicated cells; 6: Pellet of sonicated cells.

2.4 N58 蛋白的初步纯化

超声破菌后收集的包涵体经洗涤液 I , II 反复洗涤后, 溶解于 8mol/L 尿素中, 然后稀释于 20 倍体积的复性液中复性, 得到的复性产物经超滤浓缩后, 上 Sephadex G75 层析柱纯化蛋白质样品. 经纯化后的目标蛋白纯度达到 91.5% (图 5).

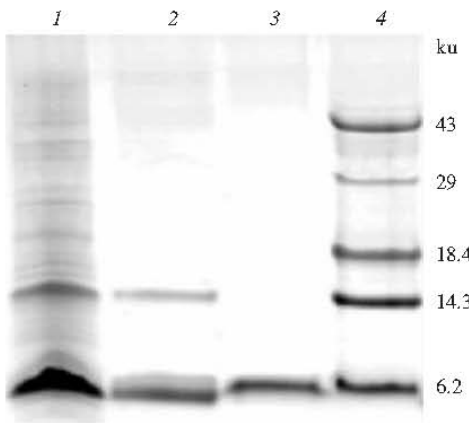


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified product
1: inclusion body; 2: renatured product; 3: Sephadex G75 purified product.

2.5 重组 N58 蛋白对血管内皮细胞增殖的抑制作用

本实验用 50 mg/L 和 0.5 mg/L 的重组 N58 蛋白作用于人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 及 B16 黑色素瘤细胞、人胚肺成纤维细胞 HLF 和人乳腺癌细胞 MCF-7 等 3 种非内皮细胞, 用 MTT 比色法测定 A_{570} , 并计算抑制率.

图 6 结果显示 0.5 mg/L 浓度的重组 N58 蛋白

即能抑制人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 的生长. 抑制率为 74.28%, 50mg/L 浓度时抑制率上升至 85.52%. 而重组 N58 蛋白对 3 种非内皮细胞的抑制率都很低. 可见重组 N58 蛋白能专一地抑制血管内皮细胞的增殖, 而对非内皮细胞的生长没有明显的抑制作用.

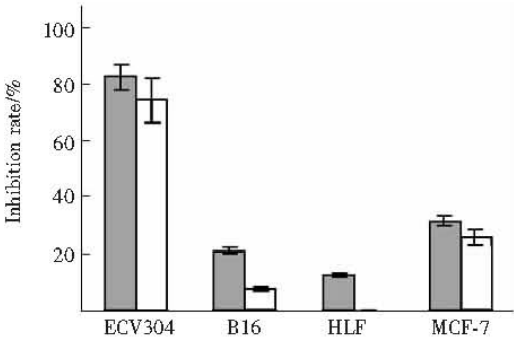


Fig.6 N58 protein inhibits the growth of human umbelical vein endothelial cells
■: 50 mg/L; □: 0.5 mg/L.

2.6 重组 N58 蛋白对 CAM 血管生成的抑制作用

按 1.2.6 的方法测定 N58 蛋白的抗血管生成作用, 从图 7 可见, 经 N58 蛋白处理的实验组鸡胚血管稀疏, 与对照组比较分支明显减少, 说明表达产物 N58 蛋白具有抑制 CAM 血管生成的作用.

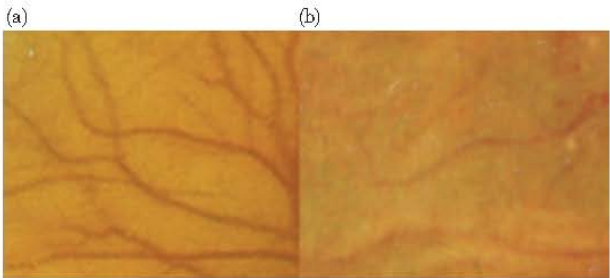


Fig. 7 Inhibition of N58 protein on CAM angiogenesis
(a) PBS; (b) N58 protein.

2.7 N58 蛋白抑制黑色素瘤的生长

按 1.2.7 的方法进行抑瘤活性分析, 图 8 及表 1 的结果显示, 注射 PBS 的对照组小鼠黑色素瘤迅速生长, 8 天后平均瘤体积达到 $(1970 \pm 546) \text{ mm}^3$, 而经重组 N58 蛋白处理的试验小鼠黑色素瘤生长受到抑制, 其平均瘤体积仅为 $(470 \pm 90) \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$). 将小鼠处死, 剥下瘤体称重, 发现对

照组小鼠平均瘤体重为 (1.720 ± 0.49) g, 实验组平均瘤体重为 (0.56 ± 0.12) g, 抑瘤率为 71.4%.

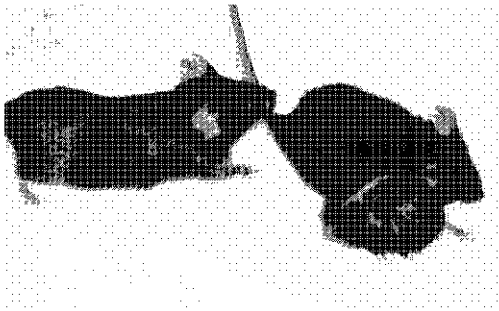


Fig. 8 N58 protein inhibits the growth of mouse melanoma

Left: Treated with N58 protein; Right: Treated with PBS.

Table 1 Inhibition of N58 protein on the growth of mouse melanoma

Group	No.	Tumor size /mm ³	Tumor mass /g	Inhibition level/%
Control	1	3 562	3.180 0	71.4%
	2	1 108	1.176 9	
	3	1 734	1.362 5	
	4	1 476	1.163 3	
		$\bar{x} = 1\,970$	$\bar{x} = 1.972$	
Treated	1	304	0.391 4	
	2	325	0.337 7	
	3	599	0.733 5	
	4	652	0.791 4	
		$\bar{x} = 470$	$\bar{x} = 0.563\,5$	

3 讨 论

本文应用 PCR 技术扩增编码钙网蛋白 N 端第 122~180 位氨基酸 (N58) 的 DNA 片段, 实现了其在大肠杆菌中的高效表达, 表达产物在体外能抑制内皮细胞的增殖, 在体内抑制新生血管的生成, 并能阻止实验性肿瘤的生长. N58 蛋白的这些生物学活性与 Pike 等^[10]报道的 N 端第 1~180 位氨基酸片段的生物学活性相似. 如本文用 100 μg/d 剂量的 N58 蛋白样品, 与 Pike 等用 100 μg/d 剂量的 N 端第 1~180 位氨基酸片段样品处理荷瘤小鼠其抑制肿瘤的效果相似. 钙网蛋白的抗血管生成活性区是否就在 122~180 位氨基酸片段或更小的片段, 正在进一

步研究中. 与已发现的血管生成抑制因子, 如 Angiostatin、Endostatin、Restin、Arestin 等相比, N58 蛋白是一个很小的可溶性分子, 它的分子质量只有 6 ku 左右, 是迄今已报道的最小血管生成抑制因子, 而且生物活性稳定, 易于重组蛋白的制备和药物的传输. 另外, 本研究用 100 μg/d 相当于 5 mg/(kg·d) 的剂量处理实验小鼠就能有效抑制肿瘤的生长, 而分别使用 100 mg/(kg·d)、10 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d) 剂量的 Angiostatin、Endostatin、Restin 才能抑制肿瘤的生长, 可见 N58 蛋白的使用剂量要比其他血管生成抑制因子低得多, 这有利于降低生产成本和产品开发的难度. Lange-Asschenfeldt 等^[15]最近报道, 1~180 位氨基酸片段在抑制肿瘤生长的剂量下, 不会影响损伤组织的修复, 以上特点显示, N58 蛋白在肿瘤防治中是一种很有潜力的, 以血管生成为靶点的药物.

参 考 文 献

1 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. J Natl Cancer Inst, 1989, **82** (1): 4~6

2 O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell, 1994, **79** (2): 315~328

3 O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 1997, **88** (2): 277~285

4 Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R. Antiangiogenesis activity of Restin, NC10 domain of human collagen X V: comparison to endostatin. Biochem Biophys Res Commun, 1999, **255** (3): 735~739

5 徐 韧, 辛 利, 张金梅, 等. 体内表达的休眠蛋白抑制裸鼠肿瘤的生长. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34** (5): 571~575

Xu R, Xin Li, Zhang J M, *et al.* Acta Biochim Biophys Sin, 2002, **34** (5): 571~575

6 Kamphaus G D, Colorado P C, Panka D J, *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth, J Biol Chem, 2000, **275** (2): 1209~1215

7 Maeshima Y, Colorado P C, Torre A, *et al.* Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. J Biol Chem, 2000, **275** (28): 21340~21348

8 Krause K H, Michalak M. Calreticulin. Cell, 1997, **88** (4): 439~443

9 Pike S E, Yao L, Jones K D, *et al.* Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. J Exper Med, 1998, **188** (12): 2349~2356

10 Yao L, Pike S E, Setsuda J, *et al.* Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. Blood, 2000, **96** (5): 1900~1905

11 Sambrook J F, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~572

12 Carmichael J, de Graff W G, Gazdar A F, *et al.* Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated calorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 1987, **47** (4): 936~942

- 13 Nguyen M, Shing Y, Folkman J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in chicken embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res*, 1994, **47** (1): 31 ~40
- 14 McCauliffe D P, Lux F A, Lieu T S, *et al.* Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J Clin Invest*, 1990, **85** (5): 1379 ~1391
- 15 Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Streit M, *et al.* The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor-inhibiting doses. *J Invest Dermatol*, 2001, **117** (5): 1036 ~1041

Calreticulin 122 ~ 180 Fragment Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth *

CHEN Hong, ZHANG Tian-Yuan, LUO Jin-Xian **, HU Zhi-Shang

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education and Department of Biochemistry, Zhuangshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Calreticulin is an calcium binding protein existed in all animal cells. It was found that calreticulin and its N terminal 1 ~180 amino acid inhibit the proliferation of endothelial cells and angiogenesis. In order to search for efficient and small molecular angiogenesis inhibitor, the DNA sequence coding for the N terminal 122 ~180 amino acid was amplified by PCR and cloned into the prokaryotic vector pET-3c. The recombinant plasmid pET-N58 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was expressed efficiently in *E. coli* BL21 (DE3, pET-N58) as inclusion body with a yield of about 35.4% of the bacterial total protein. The partial purified recombinant protein inhibits the proliferation of human umbelical vein endothelial cells and the CAM angiogenesis. The recombinant protein also suppresses the growth of primary B16 murine melanoma in C57BL/6 mice.

Key words 122 ~180 fragment, calreticulin, gene expression, endothelial cells, angiogenesis, tumor growth

* This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of Guangdong Province (011207).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84112397, E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

Received: August 5, 2003 Accepted: September 29, 2003