

研究简报

一步法从人血浆中制备天然血管生成抑制素*

李福洋 何 鹏 刘新平 张英起¹⁾ 杨静华²⁾ 樊代明²⁾ 药立波

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 血管生成抑制素(angiotatin)能特异地抑制新生血管生成,有潜在的临床应用价值.利用亲和层析从人血浆中纯化纤溶酶原,并在原位进行弹性蛋白酶有限消化产生 angiotatin 片段,经过洗涤,然后用 0.2 mol/L 6-氨基己酸溶液将 angiotatin 特异性洗脱.此改进使整个制备过程变得简单、快速和高效.体外对牛主动脉内皮细胞的生长抑制实验以及体内鸡胚尿囊膜血管生成抑制分析结果证实所制备的 angiotatin 有较强的抑制血管生成活性.

关键词 血管生成抑制素,血管生成,蛋白质,纯化

学科分类号 Q71

新生血管生成抑制因子的研究是抗肿瘤研究的一个热点.血管生成抑制素(angiotatin)是特异的新生血管生成抑制蛋白,由纤溶酶原(plasminogen)内部的四个同源性很高的环状赖氨酸结合结构域 Kringle1~4 (K1~4)组成,目前认为 angiotatin 是由纤溶酶原经体内特定的蛋白酶系水解而来,在体外也可通过弹性蛋白酶有限水解、尿激酶催化等方法产生. Angiotatin 无论在体内还是体外都显示出强而特异的抑制新生血管生成作用,在抗实体肿瘤转移的治疗中显示出良好的应用前景,因而研究从血浆中制备天然 angiotatin 有一定的应用价值.我们曾利用两步亲和层析法从人血浆中制备和纯化天然 angiotatin^[1],在此基础上我们又进行了改进,省略了许多中间步骤,使制备方法更简单省时并高效.

1 材料和方法

1.1 主要原料与试剂

人血浆由第四军医大学西京医院检验科提供.弹性蛋白酶、胶原酶为 Sigma 公司产品,蛋白质分子质量标准购自华美公司,盐酸赖氨酸、6-氨基己酸为上海化学试剂厂产品,溴化氰活化的 Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品,胎牛血清为 Hycone 公司产品,DMEM、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为 Gibicol 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 L-Lysine Sepharose 4B 亲和层析柱的制备:方法参照文献[2].

1.2.2 Angiotatin 的制备:将 200 ml 血浆或血清以蒸馏水作 2 倍体积稀释,以三层 Watman 滤纸过滤,过 L-lysine Sepharose 4B 亲和层析柱(柱床体积分约 6 ml, Φ 2 cm),流速 40 ml/h;以 5~8 倍柱床体积的 0.3 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤至 $A_{280} < 0.005$;再以两倍柱床体积的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤,加入一倍柱床体积分含 20 mg/L 弹性蛋白酶的 0.1 mol/L 磷酸盐溶液(pH 7.4),用吸管将层析介质悬起,室温静置过夜;以 5~8 倍柱床体积的 0.3 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤至 $A_{280} < 0.005$;以 0.2 mol/L 6-氨基己酸溶液洗脱,取 2 μ l 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.

1.2.3 血管内皮细胞生长抑制实验:牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cell, BAEC)的分离与培养方法参照文献[3].BAEC 细胞生长抑制分析,参照文献[4],采用四唑盐(MTT)显色法,细胞在含 10% 胎牛血清和 3 μ g/L bFGF 的 DMEM 中,以 $2 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ /孔将细胞接种于 96 孔板,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养 4 h,向培养液中加入经过滤除菌的蛋白质溶液,继续孵育 72 h 后每孔加 100 μ g MTT,温育 4 h,甩去培养上清,加 150 μ l 二甲基亚砜,混合仪振荡溶解 10 min,酶联免疫

* 国家杰出青年自然科学基金资助课题(39825113, 3962503).

¹⁾ 第四军医大学生物技术中心.

²⁾ 第四军医大学西京医院消化病研究所.

Tel: (029) 3374516-11, E-mail: bioyao@fmmu.edu.cn

收稿日期: 1999-04-23, 修回日期: 1999-08-02

检测仪检测 A_{450} 。将处理组与对照组 (只加同样体积 0.2 mol/L 6-氨基己酸) A_{450} 比较求得抑制率。

1.2.4 鸡胚尿囊膜血管生成抑制分析: 方法参考文献 [5]。将新鲜鸡胚于 $60\% \sim 70\%$ 湿度、 37°C 孵育 5 d 后, 将 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质溶液注射入膜下, 孵育 48 h 后观察尿囊膜上血管生成情况。

2 结 果

2.1 Angiostatin 的制备

经 5 倍柱床体积的 0.3 mol/L 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 7.4$) 洗涤即可将吸收曲线达到基线水平, $A_{280} < 0.005$ 。以 0.2 mol/L 6-氨基己酸洗脱, 当流出液体积接近 $1/3$ 柱床体积出现即单一洗脱峰, 洗脱体积与柱床体积相当 (图 1)。取 2 ml 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果显示其成分为 38 ku 和 35 ku 的两个蛋白质, 与原先的两步亲和层析法制备的 angiostatin 蛋白质带型相同, 纯度也无区别 (图 2)。经紫外吸收法定量推算产量可达到每升血浆中含 $25 \sim 30 \text{ mg}$ 。将洗脱蛋白质成分与纤溶酶原温育 48 h, 纤溶酶原没有发生水解反应, 说明纯化的蛋白质内无弹性蛋白酶残留。

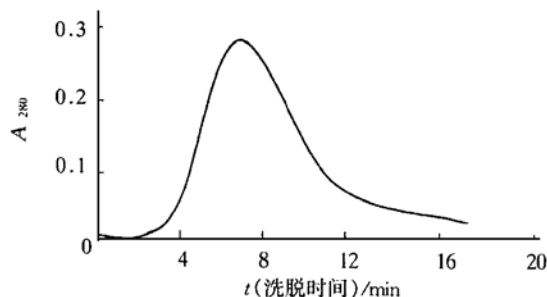


图 1 L-lysine Sephrose 4B 亲和层析图谱

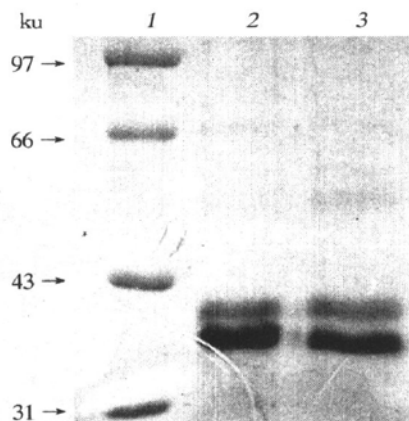


图 2 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化的蛋白质
1: 分子质量标准; 2: 一步法纯化的蛋白质; 3: 二步法纯化的蛋白质。

2.2 血管内皮细胞生长抑制实验

所制备的 angiostatin 蛋白特异地抑制牛主动脉静脉内皮细胞生长, 且呈剂量依赖性, ED_{50} 约为 17 mg/L 。

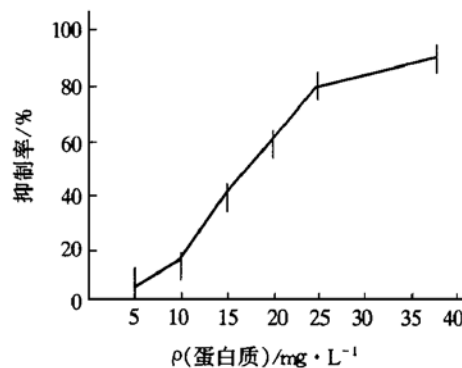


图 3 纯化的 angiostatin 蛋白对 BAE 细胞的生长抑制曲线

2.3 鸡胚尿囊血管生成抑制分析

肉眼下观察即可见处理组血管密度较对照组明显稀少, 而且血管的连续性差。

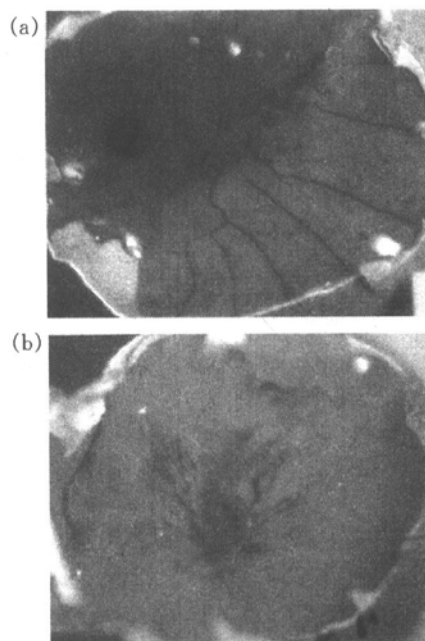


图 4 鸡胚尿囊膜血管生成抑制分析 (CAM)

(a) 用 0.2 mol/L 6-氨基己酸溶液处理的对照;

(b) Angiostatin 蛋白溶液处理。

在已经发现的新生血管生成抑制因子中, angiostatin 作用强而特异, 因此作为抗肿瘤药物有潜在的临床应用前景。基因工程是作为大量生产 angiostatin 的首选, 但目前基因工程生产的 angiostatin 产量很低^[6,7], 仍停留在仅供实验研究用的水平, 远远不能满足实际应用需要, 因而从血

清中制备天然的 angiostatin 应该是当前的首选.

天然的 angiostatin 来源于血浆中的纤溶酶原 (plasminogen), 但在体内的产生机理尚未阐明. Cao 等^[4]发现弹性蛋白酶水解纤溶酶原得到的 K1~3 和 K1~4 片段有较强的抑制血管内皮细胞增殖活性. 利用纤溶酶原对 L 型赖氨酸的高亲和性我们制备了 L 型赖氨酸偶联 Sepharose 4B, 以亲和层析法从人血浆中提取和纯化纤溶酶原, 利用弹性蛋白酶有限水解产生 angiostatin 片段; 这些片段实际上都是由赖氨酸结合结构域组成, 因而可以赖氨酸 Sepharose 亲和层析柱进一步纯化获得, 实验结果表明所制备的蛋白质有较强的体外抑制血管内皮细胞增殖和体内抑制鸡胚血管生成活性^[1]. 制备过程中我们发现, 纤溶酶原纯化后去除 6-氨基己酸这一步骤既费事又降低产率, 在实际操作中我们尝试省略这一过程, 即第一步纯化纤溶酶原中不把纤溶酶原洗脱下来, 而是在原位进行弹性蛋白酶有限消化, 产生 angiostatin 片段, 最后特异性洗脱获得, 这等于将二步亲和层析过程简化为一步亲和层析过程. 这一改进简化了制备过程, 极大地缩短了制备的时间, 使小量制备过程由原来的 3~4 d 缩短到 1~2 d; 同时该方法使产率也提高约 30%. 本实验方法更加简单、可行, 为实验研究应用型制备和实际应用性生产提供有价值的参考.

参 考 文 献

- 1 Li F Y, He P, Liu X P, *et al.* The preparation of angiostatin and its antiangiogenic effects. *J Fourth Med*, 1999, **20** (10): 832~834
- 2 Jar-Chister J, Lars R. Protein Purification: principles, High Resolution Methods and Applications. New York: VCH publisher Inc, 1989. 275~330
- 3 Folkman J. Long term primary culture of vascular endothelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5217~5221

- 4 Cao Y H, Ji R W, Davidson D, *et al.* Kringle domain of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 29461~29467
- 5 Brook P C, Montgomery A M, Rosenfeld M, *et al.* Aantagonists of integrin disrupt angiogenesis *in vivo*. *Cell*, 1994, **79** (4): 1157~1164
- 6 Sim B K L, O'Reilly M S, Liang H, *et al.* A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Research*, 1997, **57** (4): 1329~1334
- 7 Wu Z G, O'Reilly M S, Folkman J, *et al.* Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Comm*, 1997, **236** (2): 651~654

Single-step Method to Prepare Native Angiostatin From Human Plasma. LI Fu-Yang, HE Peng, LIU Xin-Ping, ZHANG Ying-Qi¹⁾, YANG Jing-Hua²⁾, FAN Dai-Ming²⁾, YAO Li-Bo (The Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University; ¹⁾ The Center of Biotechnology; ²⁾ The Institute of Gastrology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

Abstract As a specific angiogenesis inhibitor, angiostatin can inhibit new vascular formation, and it has potential clinical practical value. Human plasminogen was purified from human plasma by affinity chromatograph, and then *in situ* digestion of plasminogen by elastase was carried out to produce angiostatin fragments. After washing, angiostatin was eluted specifically by 0.2 mol/L 6-aminocaproic acid solution. This improvement made this method be simpler, rapider and more efficient. *In vitro* and *in vivo* experiments indicated that this purified protein has potent antiangiogenic activity.

Key words angiostatin, angiogenesis, protein, purification

红细胞嘧啶-5'-核苷酸酶的纯化及其抗血清的制备

黄建国¹⁾ 李建婴 闵碧荷

(第二军医大学长海医院血液科, 上海 200433)

摘要 利用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析的方法纯化正常人红细胞嘧啶-5'-核苷酸酶 (P5'N, EC. 3.1.3.5). 结果表明: 利用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱可有效、专一性吸附 P5'N, 纯化液经聚丙烯酰胺凝胶电泳显

¹⁾ 现工作单位: 兰州军区乌鲁木齐总医院血液内分泌科, 乌鲁木齐 830000.