

基质金属蛋白酶-2 C端片段 PEX 的原核表达 及其对血管发生的抑制作用*

李金萍¹⁾ 张光谋²⁾ 柯 杨¹⁾ 林本耀¹⁾ 赵 威¹⁾
胡 颖¹⁾ 宁 涛¹⁾ 林仲翔¹⁾ 张志谦¹⁾**

(¹⁾北京大学临床肿瘤学院暨北京市肿瘤防治研究所, 北京肿瘤医院, 北京 100034; ²⁾新乡医学院细胞生物室, 新乡 453000)

摘要 为了克隆表达鸡的基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的 C 端片段 PEX, 并探讨其对血管发生的抑制作用, 利用 RT-PCR 从鸡胚成纤维细胞克隆 MMP-2 C 端片段 PEX, 构建原核表达载体 pCa⁺n-PEX; 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) -pLys, 异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导产生 PEX 融合蛋白, 包涵体蛋白用盐酸胍法变性、复性; 生长曲线观察 PEX 融合蛋白对人脐静脉血管内皮细胞增殖的影响; 鸡胚绒毛尿囊膜血管发生实验研究其对血管发生的抑制作用。结果表明融合蛋白 CBP/PEX 具有抑制人脐静脉血管内皮细胞的生长和鸡胚绒毛尿囊膜血管发生的作用。提示 PEX 是有待进一步开发的潜在抑制血管发生的药物。

关键词 MMP-2, PEX 融合蛋白, 血管发生

学科分类号 R730.54

许多病理过程如糖尿病性视网膜炎、风湿性关节炎及肿瘤的发生和转移与过度的血管生成或其调节紊乱密切相关^[1,2], 对血管发生的抑制有可能达到对这些疾病的有效治疗。近年来, 许多抗血管发生的物质被发现, 它们多是体内一些蛋白质或酶原的水解片段或隐藏序列, 如血管抑素 (angiostatin) 是人纤溶酶原的 C 端片段^[3], 内皮抑素 (endostatin) 是胶原蛋白 X VIII 的 C 端片段^[4], 在动物实验中显示出良好的抗肿瘤活性。

血管生成有赖于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导的内皮细胞的粘附^[5]。在侵袭细胞表面, 整合素直接结合基质金属蛋白酶-2 (MMP-2), 提示内皮细胞这些表面蛋白质间存在某种功能性联系^[5]。基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 是一 Zn^{2+} 离子依赖性的基质降解酶家族, 它们可选择性降解各种细胞外基质蛋白和基膜, 与各种细胞类型的侵袭行为相关^[6], 在肿瘤的浸润、转移和血管形成中发挥关键作用。Brooks 等^[7]发现 MMP-2 可通过 C 端与整合蛋白家族成员 $\alpha_v\beta_3$ 结合激活自身催化活性, 产生一分子质量为 29 ku 到 32 ku 的 C 端类血红蛋白结合蛋白片段 PEX (hemopexin), 该片段可以通过阻断 MMP-2 与 $\alpha_v\beta_3$ 结合抑制血管的发生。提示其有可能成为与血管发生相关疾病治疗新的生物活性药物。本文中我们克隆了鸡的 MMP-2 C 端片段 PEX, 进行原核表达, 融合蛋白在体外可抑制人脐静脉血管内皮细胞的增殖, 在体内鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验中具有抑制血管生成的活性。

1 材料与方法

1.1 PEX 的克隆及 CBP 融合蛋白原核表达载体的构建

10 日龄鸡胚皮肤成纤维细胞原代培养后, 提取总 RNA, 以 Oligo-dT (Promega 公司) 为引物逆转录合成第一链 cDNA, 用正义引物: 5'-C GGA TCC TCT GCA AGC ACG-3' (带 *Bam*H I 内切酶位点) 和反义引物: 5'-CCT CTA GAG CAA GTC CTC TTC AGA AAT CAG TTT TTG CTC GAG GCA ACC CAA CCA GTG-3' (带 *myc*10 肽抗原决定基便于免疫检测和 *Xba*I 内切酶位点) PCR 扩增 PEX 片段 (630 bp)。 *Bam*H I 和 *Xba*I 酶切后重组到 pcDNA3/*myc*-N 载体, 以 T7 为引物 ABI Prism377 测序仪测序证明正确。常规 DNA 重组技术修饰改造插入原核表达载体 pCa⁺n (Stratagene) 钙调蛋白结合肽 (calmodulin-binding peptide, CBP) 的 C 端阅读框, 得到 pCa⁺n-PEX 重组体。

1.2 CBP/PEX 融合蛋白的表达及纯化

上述重组质粒转化的大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) pLys 于 37℃ 振荡培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$ 时, 加异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度

* 国家重点基础研究发展规划项目“973”(G2000057002), 国家自然科学基金资助项目 (39880016), 北京市自然科学基金资助项目 (7002009), 北京市肿瘤分子生物学高技术实验室、北京大学人类疾病基因中心 (2000-A-28), 北京市卫生重点学科 (1998-卫科重字 10 号)、CMB 专项人才基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66179250, E-mail: zqzhang@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2001-04-25, 接受日期: 2001-05-24

0.1 mmol·L⁻¹, 诱导 4~6 h, 离心收菌. 重新悬浮于破碎缓冲液 (1 mmol·L⁻¹ PMSF、1% Triton X-100/PBS) 中, 冰浴 30 min, 超声破碎, 重复 4~5 次, 13 000 r/min 离心, 沉淀即为包涵体融合蛋白 CBP/PEX. 将沉淀用变性缓冲液 (6 mol·L⁻¹ 盐酸胍, 20 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 8.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA pH 8.0, 10 mmol·L⁻¹ DTT) 4℃溶解, 离心, 在上清中缓慢滴加复性液 (0.9 mmol·L⁻¹ 谷胱甘肽 (GSH)、0.1 mmol·L⁻¹ GSSG, 20 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 8.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA pH 8.0) 至蛋白质浓度为 0.1 g/L, 4℃孵育 24 h, 透析液 (0.5 mol·L⁻¹ 盐酸胍, 20 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 8.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA pH 8.0) 4℃过夜透析, 蔗糖包埋约 2~4 h, 1×PBS 透析后用于下列实验.

1.3 人脐静脉血管内皮细胞生长曲线实验

人脐静脉血管内皮细胞培养在 10% 胎牛血清 (购自天津市川页生化制品有限公司) 1640 培养基内. 生长曲线测定按文献[8]进行, 即接种 1×10^4 细胞/孔与 24 孔培养板内, 次日以 PBS 为对照组, 实验组每日分别加入 2 nmol·L⁻¹、10 nmol·L⁻¹ 的 CBP/PEX, 每日取每组三孔, 连续 4 d 血球计数板计数, 求平均值, 绘制生长曲线.

1.4 鸡胚尿囊膜血管发生实验

同文献[9]. 3 日龄鸡胚从蛋壳移至平皿中继续培养至第 5 天, 将直径 2 mm 的无菌玻璃纤维滤纸圆片置于尿囊膜血管分枝处, 每片滴加不同浓度 CBP/PEX 10 μl, 连续给药三天, 观察血管生长情况, Kodak 21°胶卷照相记录.

2 结果

2.1 融合蛋白 CBP/PEX 的提取、纯化鉴定

RT-PCR 克隆得到的 PEX 片段测序证明为鸡

MMP-2 的 C 端序列. 酶切鉴定后的重组子 PEX/pCa⁺n 转化大肠杆菌菌株 BL21 (Des) pLys, 经 IPTG 诱导, 融合蛋白 CBP/PEX (约 35 ku) 以包涵体形式表达 (图 1), 其在上清中含量极微, 融合蛋白占菌体总蛋白的 15% 左右; 包涵体经包涵体洗液充分洗涤, 盐酸胍变性复性后, CBP/PEX 纯度大于 90%, 接近电泳纯, 直接用于实验研究.

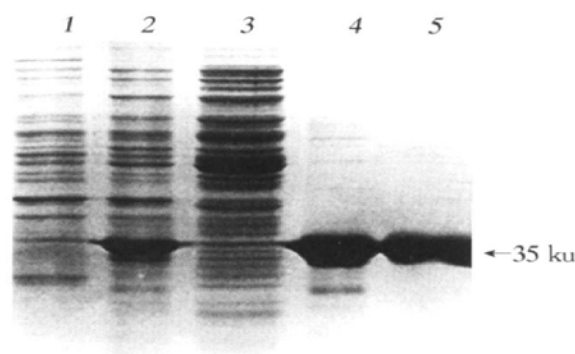


Fig. 1 SDS PAGE analysis of CBP/PEX fusion protein

1: Total cellular lysates of *E. coli* harboring empty vector pCa⁺n induced by IPTG; 2: Total cellular lysates of *E. coli* harboring PEX/pCa⁺n induced by IPTG; 3: Supernatant of *E. coli* harboring PEX/pCa⁺n induced by IPTG; 4: Inclusion bodies of *E. coli* harboring PEX/pCa⁺n induced by IPTG; 5: Purified CBP/PEX after extensively wash of inclusion bodies.

2.2 融合蛋白 CBP/PEX 对血管发生的影响

为验证复性后的 CBP/PEX 是否具有生物活性, 我们利用鸡胚绒膜囊血管发生实验检查其对血管发生的影响. 结果发现, 对照 PBS 处理组玻璃纤维滤纸圆片下可见正常血管生长 (图 2a), 而 2 nmol·L⁻¹ CBP/PEX 处理 3 d, 92.5% (37/40) 鸡胚的血管生长受阻, 表现为玻璃纤维滤纸圆片下血管阻断 (图 2b) 或淤血 (图 2c). 这表明, 在体内 PEX 具有明显的抑制血管生成的作用.

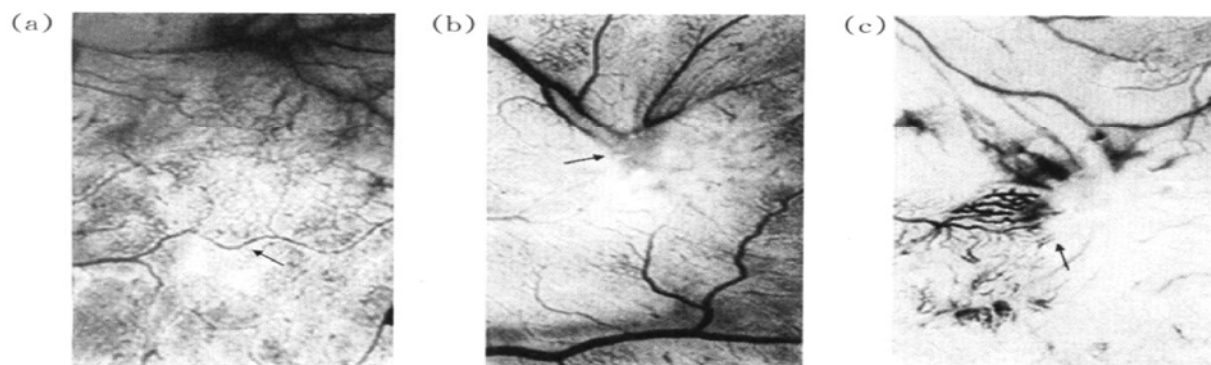


Fig. 2 Inhibition of angiogenesis of CBP/PEX in chick chorioallantoic membranes.

(a) Control treated with 1×PBS; (b) and (c) Treated with 2 nmol·L⁻¹ of CBP/PEX, indicate different forms of disruption of blood vessel formation (Photographed under 10× Stereomicroscope).

2.3 CBP/PEX 对血管内皮细胞增殖的影响

为进一步探讨 CBP/PEX 抑制血管发生的机制, 我们观察了其对人脐静脉血管内皮细胞增殖的影响. $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下的 CBP/PEX 对内皮细胞未见毒性效应. 与 PBS 对照组比较, $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CBP/PEX 处理内皮细胞 48 h, 即可见对其生长具有显著抑制效应, 且具有时间和剂量效应 (图 3).

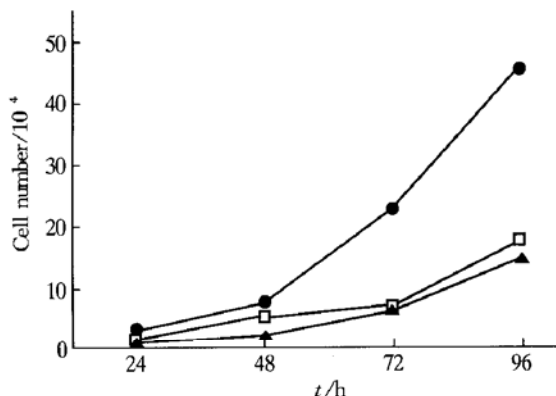


Fig. 3 Growth curve of human umbilical vein endothelial cells treated with CBP/PEX

●—●: PBS; □—□: PEX (2 nmol/L); ▲—▲: PEX (10 nmol/L).

3 讨 论

在血管发生过程中, 迁移的内皮细胞需要基质金属蛋白酶重建细胞外基质和基底膜. 在 MMP 家族中, 以 MMP-2 和 MMP-9 降解基底膜主要成分 IV 型胶原的活力最强. MMP-2 分布最广, 其表达与细胞的浸润表型相关^[10]. 近期有证据表明, MMP-2 可通过 C 端与整合蛋白家族成员 $\alpha_v\beta_3$ 结合激活自身催化活性, 产生一分子质量为 29 ku 到 32 ku 的 C 端类血红素结合蛋白片段 PEX^[7]. PEX 在体内的形成具有血管发生的阶段依赖性: 在血管发生的早期开始累积, 血管生成完成时达到最大量. 由体内提取的 PEX 可与 MMP-2 竞争结合 $\alpha_v\beta_3$, 从而抑制血管发生. 因此, PEX 是一内源性的 MMP-2 活化抑制剂, 具有抑制血管发生的作用. 本结果利用重组的原核表达产物达到了类似的结果, 并证明其具有抑制血管内皮细胞增殖的效应, 提示 PEX 对血管发生的抑制效应作用机制的多样性. 该结果和其他已发现的血管发生拮抗剂

多是内源性、参与血管形成完整分子的功能结构域片段这一事实表明, 以已知功能分子的功能结构域为目标, 筛选血管发生抑制因子, 针对性强, 是一条可行的新思路.

外源基因在大肠杆菌中高效表达目的蛋白通常以包涵体形式存在, 这里表达的 CBP/PEX 融合蛋白亦如此. 选用盐酸胍变性包涵体可克服蛋白质的降解. 复性时采用从一定浓度的变性剂透析再过渡到无变性剂缓冲液中的复性过程, 可减少无活性蛋白的沉淀, 在复性时加入一定量的氧化型谷胱甘肽, 以获得天然二硫键^[11]. 本文结果提示本法所得到的 PEX 具有生物活性, 为进一步研究探索其在治疗与血管发生相关疾病的应用前景打下基础.

参 考 文 献

- 1 Blood C H, Zetter B R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1032** (1): 89~ 118
- 2 Brooks P C, Anthony M P, Rosenfeld M M, *et al.* Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, **79** (7): 1157~ 1164
- 3 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
- 4 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
- 5 Brooks P C, Stromblad S, Sanders L C, *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Cell*, 1996, **85** (5): 683 ~ 693
- 6 Byzova T V, Rabbani R, D'Souza S E, *et al.* Role of integrin $\alpha_v\beta_3$ in vascular biology. *Thromb Haemost*, 1998, **80** (5): 726~ 734
- 7 Brooks P C, Silletti S, von Schalscha T L, *et al.* Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 1998, **92** (3): 391~ 400
- 8 Zhang Z Q, Lin Z X, Wang N Q, *et al.* Expression of gap junctions and inhibition of cell growth in communication-defected cells after transfection with gap junction gene Cx43 cDNA. *Chinese Sci Bullet*, 1997, **42** (5): 417~ 421
- 9 Glatt H J, Vu M T, Burger P C, *et al.* Effect of irradiation on vascularization of corneas grafted onto chorioallantoic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, **26** (11): 1533~ 1542
- 10 Sato H, Takino T, Okada Y, *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 1994, **370** (6484): 61~ 65
- 11 张 毅, 腾家波, 叶棋浓, 等. 重组人 GST/MCP-1 融合蛋白纯化及其抗肿瘤作用的研究. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, **5** (3): 208~ 211

Zhang Y, Teng J B, Ye Q N, *et al.* *Chin J Cancer Biother*, 1998, **5** (3): 208~ 211

Prokaryotic Expression of PEX: a C-terminal Fragment of Matrix Metalloproteinase 2 and Its Effect on The Inhibition of Angiogenesis^{*}

LI Jir-Ping¹⁾, ZHANG Guang-Mou²⁾, KE Yang¹⁾, LIN Ben-Yao¹⁾,
ZHAO Wei¹⁾, HU Ying¹⁾, NING Tao¹⁾, LIN Zhong-Xiang¹⁾, ZHANG Zhi-Qian¹⁾^{**}

(¹⁾ Department of Cell Biology, School of Oncology and Beijing Institute for Cancer Research, Beijing University, Beijing 100034, China;

(²⁾ Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract To express chick MMP-2 C-terminal hemopexin-like fragment in *E. coli* and to explore whether it has the biological effect on the inhibition of angiogenesis, a 630 bp of MMP-2 C-terminal coding fragment (PEX) was cloned into prokaryotic expression vector pCa⁺n from primary cultured day 10 chicken embryo fibroblasts using RT-PCR. The relatively pure inclusion bodies of CBP/PEX fusion protein were denatured and renatured by guanidine-HCl method from PEX/pCa⁺n plasmid transformed log phase *E. coli* BL21 (Des) pLys induced with IPTG. Growth curve of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay were performed to examine the effects on the inhibition of angiogenesis. The prokaryotic expressed CBP/PEX fusion protein has the biological activity and can inhibit the growth of HUVEC *in vitro* and the angiogenesis on chick CAM *in vivo*. These results suggest that the expressed PEX is to be a novel potential therapeutic inhibitor of diseases associated with angiogenesis.

Key words MMP-2, PEX, calmodulin-binding peptide fusion protein, angiogenesis

^{*} This work is supported by grants from the National "973" Program (G2000057002), National Natural Science Foundation of China (39880016), Natural Science Foundation of Beijing (7002009), Beijing High Technology Key Laboratory of Molecular Cancer Biology, Beijing University Human Disease Center Project (2000-A-28) and Chinese Medical Board Foundation Beijing Health Project (1998-10).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-66179250, E-mail: zqzhang@public3.bta.net.cn

Received: April 25, 2001 Accepted: May 24, 2001