

# 人内皮抑素在毕赤酵母中的表达尧纯化及其对小鼠肺腺癌 LA795 细胞生长的抑制

夏 虎袁张 琳袁金序袁黎万成渊第一军医大学南方医院呼吸科袁广东 广州 510515冤

**摘要**目的 通过基因重组技术获得能高效分泌表达人内皮抑素的毕赤酵母菌株观察纯化的重组人内皮抑素(rhES)对小鼠肺腺癌 LA795 生长的抑制作用遥方法 利用氯化铯转化法将人内皮抑素基因整合入毕赤酵母基因组袁获得可分泌表达人内皮抑素 (endostatin) 的菌株遥用肝素亲和层析的方法纯化目的蛋白遥观察人内皮抑素对碱性纤维生长因子 (bFGF)刺激的人血管内皮细胞系 ECV-304 细胞增殖的作用遥将接种 LA795 肺腺癌细胞的 T739 小鼠随机分成 2 组袁分别给予 rhES 和磷酸缓冲盐液(PBS)皮下注射袁每日 1 次袁连续 14 d遥观察 2 组小鼠肿瘤生长情况遥结果 经筛选获得表达量较高的转化菌株袁其表达的 rhES 能明显抑制 bFGF 刺激的人血管内皮细胞系 ECV-304 细胞的增殖袁与对照组比较具有显著差异( $P<0.001$ )遥动物实验表明其有效抑制小鼠肺腺癌 LA795 的生长( $P<0.001$ )遥结论 用毕赤酵母作为宿主分泌表达的 rhES 具有良好的生物学活性袁能有效抑制小鼠肺腺癌 LA795 的生长遥

**关键词**重组人内皮抑素 血管生成 毕赤巴斯德酵母 肺腺癌 LA795

中图分类号 院 785 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588-002-05-0393-04

## Expression and purification of human endostatin in *Pichia pastoris* and its inhibition on the growth of mouse pulmonary adenocarcinoma cell line LA795

XIAHu,ZHANGLin,WENJin-xu,TONGWan-cheng

Department ofRespiratoryDiseases,NanfangHospital,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

**Abstract:** Objective Toobtainyeaststrain *Pichia pastoris* thathighlyexpresseshumanendostatinbygene recombination technology, andtoevaluatetheinhibitoryeffectofrecombinanthumanendostatin(rhES)onthegrowthofmousepulmonary adenocarcinomacelllineLA795. Methods Thegenecodingforhumanendostatinwasclonedintothegenomeof *Pichiapastoris* through LiCltransformationmethod, and thecloneswithhighsolublerhESexpressionwereselected. Purificationof rhESwasperformedwithheparinaffinitychromatography.EffectsofhrhESonbFGF-inducedproliferationofhumanendothelialcelllineECV-304cellswereobserved. T739micewithsubcutaneousinoculationofLA795cellsweretreatedwithinjectionsofeitherhrhESorPBSfor14consecutivedays,andthevolumeofthetumorsweremeasured. Results Cloneswithhigh rhES expression were obtained and purified rhES potently inhibited the proliferation of ECV-304 cells and the growth of LA795cellsintT739mice. Conclusion rhESproducedby *Pichia pastoris* possesseshgoodbiologicalactivitiesandconspicuouslyinhibitsthegrowthofLA795cells.

**Key words:** recombinanthumanendostatin;angiogenesis; *Pichiapastoris*;lungadenocarcinomaLA795

内皮抑素(endostatin)是 O'Reilly 等<sup>[1]</sup>1997 年从小鼠血管内皮瘤 EOMA 细胞的培养上清中分离出的一种新的血管内皮细胞生长抑制因子袁并被证实是胶原愈峪 NC1 结构域 C 末端 M<sub>r</sub> 为 20 000 的氨基酸片段袁由 184 个氨基酸组成袁具有肝素亲和性遥体外实验显示内皮抑素能抑制由碱性纤维生长因子(bFGF)及血管内皮生长因子(VEGF)刺激的血管内皮细胞的增殖遥动物实验表明其能显著抑制肿瘤的生长和转移袁并且反复用药未发现耐药性及毒副作用的产生遥毕赤巴斯德酵母 *Pichia pastoris* 是甲醇营养酵母袁其内含的 AOX1 启动子具有较强的诱导作用袁能有效地诱导下游外源基因的表达遥作为一种真核表达系统

它可以对外源基因表达产物进行翻译后修饰袁同时经人工构建的带有信号肽的外源基因产物可以被分泌到细胞外袁使目的蛋白易于纯化袁具有原核表达系统所具有的良好操作性遥我们用毕赤酵母作为宿主袁将人内皮抑素基因整合入酵母基因组使其表达重组人内皮抑素 rhES 袁并观察其对小鼠肺腺癌 LA795 生长的抑制效果遥

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

重组质粒 pPIC9/hendostatin 为本室构建袁宿主菌为毕赤巴斯德酵母 GS115 (*Pichia pastoris* GS115)袁购自 Invitrogen 公司遥人血管内皮细胞系 ECV-304 由本院心血管内科惠赠遥 Agarose 尧crylamide 等购于美国 Sigma 公司 生物素 尧酵母提取物 尧NB(W/O) 尧P-MI1640 等购自 Difco 公司遥兔抗人内皮抑素多克隆

收稿日期 院 001-11-30

基金项目 院 广东省科委重点科技攻关项目 院 9G172001 冤

作者简介 院 夏 虎 院 1974- 冤男 袁 江苏南京人 袁 1996 年毕业于第一军医大学 袁 现为在读硕士研究生 袁 电话 院 20-85141574

抗血清冻干粉为美国 ALPHA 公司产品袁山羊抗兔 IgG-HRP 购自晶美生物工程公司袁heparin-Sepharose CL6B 为 Pharmacia 公司产品袁其余试剂均为国产分析纯遥AKTA 色谱层析系统为 Pharmacia 公司制造袁蛋白核酸垂直电泳系统渊mini-protein域冤半干式印迹转移仪为美国 Bio-Radg 公司造遥

1.2 动物及分组

6~8 周龄平均体质量 20 g 的雄性 T739 近交系小鼠 20 只及 LA795 荷瘤鼠均购自中国医学科学院肿瘤研究所实验动物室遥将接种 LA795 的 T739 小鼠随机分成治疗组和对照组袁每组 10 只遥

1.3 酵母宿主菌的转化

挑取酵母表达宿主菌 Pichia pastoris GS115 单菌落至 50ml YPD 培养基中袁0 益振荡至 D<sub>600</sub>=1.0遥收集细胞袁用 25ml 无菌蒸馏水冲洗袁室温下 1 500 r/min 离心 10min遥弃去水袁ml 0.1mol/L LiCl 重悬细胞遥转入 1.5ml 微量离心管中袁高速离心 15 s 后收集细胞遥用吸管吸去 LiCl袁再用 400 滋 0.1mol/L LiCl 重悬细胞遥离心 LiCl 细胞悬液袁用吸管吸去 LiCl遥依次加入下列试剂院40 滋 50% PEG 尧6 滋 1mol/L LiCl 尧5 滋 2 mg/ml 单链 DNA 尧AL1 酶切线性化质粒 DNA 10 滋 于 50 滋 无菌蒸馏水遥振荡混匀细胞袁0 益静置孵育 30min袁继以 42 益水中热休克 20min袁000r/min 离心袁吸去转化液袁用 1ml 无菌蒸馏水重悬细胞袁将 100 滋 转化细胞悬液涂布于 MD/His- 平板上袁0 益孵育 3 d 至出现转化子菌落遥

1.4 表达菌株的筛选

挑取各转化子用 MM 和 MD 平板鉴定其为 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 株后按 Invitrogen 公司说明书先用 BMGY 培养基培养 24 h遥换 BMMY 培养基诱导各菌株表达袁保持通风良好遥 30 益振荡渊转速为 250r/min冤每日加甲醇至终浓度为 1% 袁分别于 12 尧4 尧6 尧8 尧0 尧2 尧4 尧6 h 各时间点取 1ml 菌液高速低温离心渊5000 r/min冤 益袁0min 冤取上清袁用 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达高峰时间及各菌株表达量对比遥

1.5 人内皮抑素的诱导表达

取筛选出的 GS115-endostatin 高表达株接种于 75ml BMGY 培养基中袁 30 益尧50r/min 振荡培养 18 h 至 D<sub>600</sub>抑 6.0遥将菌液于室温 3000r/min 离心 10min遥弃上清袁用 500ml BMMY 培养基重悬沉菌于 30 益袁 250r/min 振荡进行 rhES 的诱导表达遥每隔 24 h 加甲醇至终浓度为 1% 袁 4 h 后离心沉菌留取上清袁并用 SDS-PAGE 检测遥

1.6 蛋白质的纯化<sup>渊冤</sup>

将表达上清过滤除菌袁用终浓度 70% 的硫酸铵沉淀袁 10 000r/min 尧 益离心 20 min袁收集沉淀蛋

白袁用 1 倍体积达 PBS 液重悬袁并用 20mmol/L Tri 窑 Cl 渊.1mol/L NaCl 尧 H7.4 冤缓冲液平衡 24 h遥用 heparin Sepharose CL-6B 填装层析柱袁 倍柱床体积的 20mmol/L Tris 窑 Cl 渊.1mol/L NaCl 尧 H7.4 冤结合缓冲液平衡层析柱遥平衡完毕后将透析过的样品按 20 cm/h 的流速上样遥上样完毕后用结合缓冲液洗柱至 A280<0.01袁用分别含不同浓度 NaCl 的洗脱液洗脱蛋白 渊.2 尧.3 尧.4 尧.6 尧.8 尧.0 尧.0 mol/L NaCl 尧 0 mmol/L Tri 窑 Cl 尧 H7.4 尧 梯度洗脱液 冤遥收集各蛋白洗脱峰袁SDS-PAGE 分析遥将目的蛋白洗脱峰液用 PBS 透析 16 h 后于 -20 益保存遥蛋白浓度测定用 BCA 法遥

1.7 纯化蛋白的 Western-blot 鉴定

取表达上清于 12% SDS-PAGE 电泳分离各蛋白袁用半干转印仪将蛋白转移至 PVDF 膜上渊4V, 15min 冤袁丽春红染色 5min 袁观察蛋白条带并标记蛋白相对分子质量标准遥蒸馏水洗膜至退色袁用 PBS+5% milk+0.1% Tween-20 封闭液封闭 PVDF 膜 2 h袁加兔抗人内皮抑素多克隆抗血清室温孵育 1.5 h遥清洗后加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗孵育 1 h袁漂洗后加入 DAB 显色液显示遥显色条带出现后立即终止反应遥

1.8 内皮细胞增殖抑制实验渊MTT 法冤

将生长良好的人血管内皮细胞系 ECV-304 细胞用无血清 1640 培养基清洗 3 次袁再用含 10% FCS 的 1640 培养基悬细胞并调整细胞数为 1伊10<sup>6</sup> 个 /ml 遥向 96 孔细胞培养板中各孔加入 100 滋 细胞悬液袁于 37 益尧5% CO<sup>2</sup> 孵箱中孵育 24 h 袁换含 2% FCS 的 1640 培养基培养 12 h 遥分别加入 5ng/ml 的 bFGF 袁再加入不同浓度的 rhES 袁BS 滴加组作为对照遥继续培养 24 h 袁每孔加入 20 滋 MTT 继续培养 4 h 遥吸去培养基加入 150 滋 DMSO 放置 15min 遥充分溶解后吸去上清袁用酶联免疫比色仪在波长 490nm 处检测遥

1.9 动物模型的制备

培养的 LA795 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液袁用 1640 培养液调整细胞密度为 1伊10<sup>6</sup> /ml 遥接种于 T739 小鼠背部皮下渊.5ml/ 只冤遥

1.10 纯化 rhES 的疗效观察

对治疗组的 10 只小鼠袁自接种后第 6 日起每日给予纯化 rhES 20mg/kg s.w. 渊.5ml 蛋白液冤于肿瘤边缘外 3 cm 处皮下注射曰对照组给予等量的 PBS 液袁连续 14 d 遥治疗期间隔日测量肿瘤大小袁按 a<sup>2</sup>伊伊 0.52 渊为短径 尧 为长径 冤计算肿瘤体积<sup>渊冤</sup>同时观察小鼠生存状态遥 治疗结束后将小鼠处死袁取下肿瘤置于 10% 福尔马林液中固定袁组织切片 HE 染色行病理学观察遥

1.11 统计学分析

rhES 对血管内皮细胞系 ECV-304 增殖作用的

抑制结果采用单因素方差分析。rhES 肿瘤治疗组与对照组肿瘤体积大小对比采用重复测量方差分析。以上数据处理均由 SPSS10.0 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 酵母转化子的筛选

挑取在 MD/His- 平板上生长的酵母菌株。用 BMGY 培养后转入 BMMY 培养基中诱导表达。经 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析诱导表达。上清液中有  $M_r$  为 20000 的蛋白出现。并具有人内皮抑素的抗原活性。图 1 为在 MD/His- 平板上生长的酵母菌落编号。并确定表达高峰出现在甲醇诱导后 84 h。根据各株表达量的不同筛选出 1 株高表达株。其表型为 Mut。

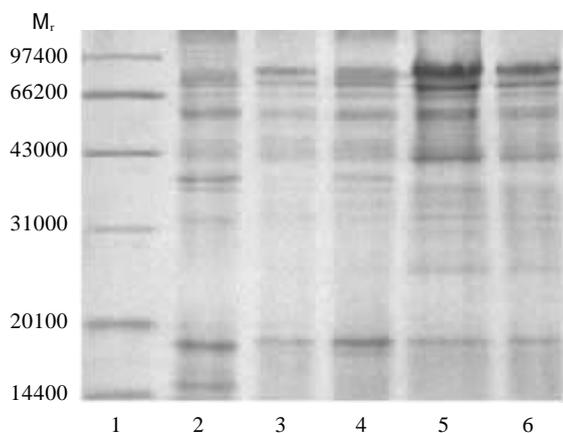


图 1 rhES 诱导表达的 SDS 结果

Fig.1 SDS-PAGE result after induction of rhES expression  
1: Molecular weight marker; 2: No. 4 strain; 3: No. 11 strain; 4: No. 14 strain; 5: No. 14 strain; 6: No. 26 strain; 7: No. 43 strain



图 2 rhES 的 Western-blot 检测

Fig.2 Western-blot analysis of recombinant human endostatin

### 2.2 人内皮抑素的表达和纯化

将经筛选的高表达株扩大体积进行诱导表达。取表达上清用 70% 浓度的硫酸铵沉淀蛋白。透析后用肝素亲和层析的方法进行目的蛋白纯化。经 SDS-PAGE 分析发现。当洗脱液中 NaCl 浓度为 0.3 mol/L 时 rhES 从层析柱上被洗脱下来。图 3 为薄层扫描分析。纯度达到 91.8%。

### 2.3 rhES 的细胞生物学活性测定

血管内皮细胞具有摄取 MTT 的能力。并在细胞内被转变为蓝色物质。活细胞数多则吞噬的 MTT 越多。呈现蓝色越深。因此通过颜色的深浅比较可间接反映细胞的增殖状态。内皮细胞增殖抑制实验中 rhES 可以明显抑制人血管内皮细胞系 ECV-304 细

胞的增殖。 $P < 0.001$ 。并具有剂量效应表现。图 4。

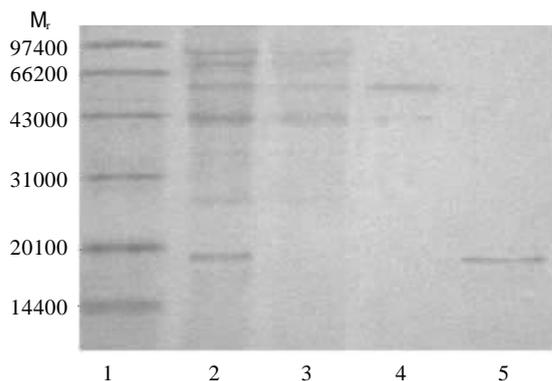


图 3 rhES 纯化的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified rhES  
1: Molecular weight marker; 2: Supernatant after induction; 3: Supernatant through column; 4: Elution of 0.2 mol/L NaCl; 5: Elution of 0.3 mol/L NaCl

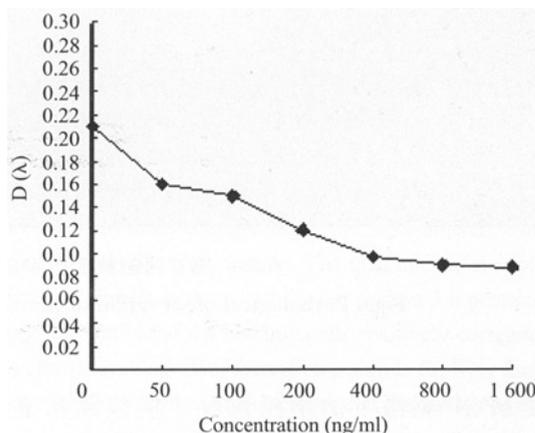


图 4 rhES 对 bFGF 刺激的 ECV-304 细胞增殖的抑制

Fig.4 Inhibitory effect of rhES on proliferation of ECV-304 in response to stimulation by bFGF

### 2.4 rhES 对肿瘤生长抑制作用的观察

接种 LA795 的 T739 小鼠于第 6 天背部可见皮下肿瘤。肿瘤生长加快。接受 PBS 治疗的小鼠肿瘤继续生长。明显增大。而接受 rhES 治疗的小鼠肿瘤生长缓慢。明显受到抑制。2 组肿瘤大小对比出现明显差异。 $P < 0.001$ 。如图 5 为病理学观察发现。PBS 组腺癌细胞生长良好。而 rhES 组肿瘤组织出现大片坏死。图 6。同时在整个治疗期间观察小鼠发现。经 PBS 组小鼠在接受治疗后第 5 天起出现摄食活动减少。精神状态差。反应明显迟钝。而 rhES 组未见明显异常反应出现。

## 3 讨论

自 20 世纪 70 年代初 Folkman 首先提出肿瘤生长依赖于新生血管生成以来。血管生成抑制剂在肿瘤治疗方面的研究日趋活跃。内皮抑素作为一种新近发现的血管生成抑制剂亦受到重视。国外研究显示其具有较强的抑制新生血管生成的作用。从而抑制肿瘤

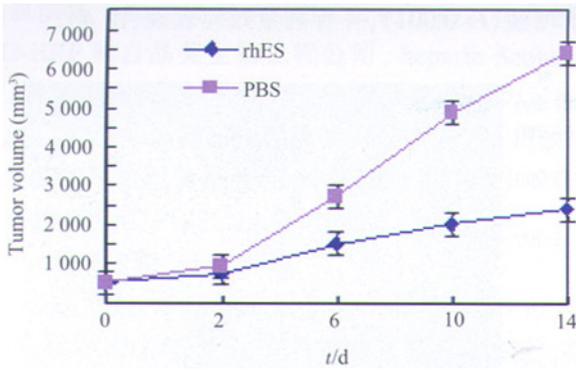


图 5 肿瘤小鼠接受治疗后肿瘤的体积变化  
Fig.5 Changes in tumor volumes in the 2 groups before and after treatment with rhES or PBS

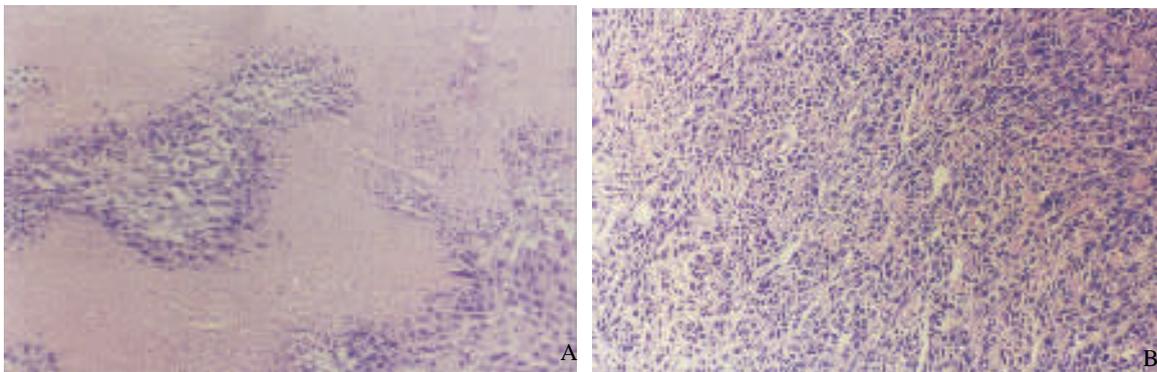


图 6 两组肿瘤组织病理切片观察结果 苏E染色, 伊0冤  
Fig.6 Pathological observation of tumor sections in different groups (HE staining, 伊0冤)  
A:rhES;B:PBS

细胞在 bFGF 刺激下的增殖情况遥实验结果显示 rhES 能明显抑制 ECV-304 细胞的增殖袁并存在剂量效应关系遥

LA795 是一株低免疫原性小鼠肺腺癌细胞株袁具有高度恶性袁瘤率达 100%遥本实验也证实了这一点遥进一步动物实验表明袁纯化的 rhES 能显著抑制接种小鼠肺腺癌 LA795 的 T739 小鼠的肿瘤生长袁病理观察显示 rhES 治疗组肿瘤内出现大片坏死袁而 PBS 治疗组肿瘤继续生长袁病理观察未见明显片状坏死袁腺癌细胞生长良好遥同时我们还观察了各组小鼠在治疗期间的一般状况袁发现 rhES 组小鼠未见明显异常袁而 PBS 治疗组小鼠于治疗后第 5 天起摄食减少袁反应迟钝遥

由于天然内皮抑素很难获得袁难以满足实验研究和临床应用研究的需要袁所以我们通过基因工程来获得足量的 rhES遥我们选用毕赤巴斯德酵母作为宿主是考虑其既有原核表达系统的可操作性袁又有真核表达系统的翻译后修饰功能遥实验结果证实我们所得到的 rhES 具有良好的生物学活性袁显著抑制接种小鼠肺腺癌 LA795 细胞的 T739 小鼠身上肿瘤的生长遥这为进一步研究酵母真核表达系统表达的 rhES 的功能和结构打下一个良好的基础袁并且为其早日应用于临

的生长和转移袁且反复用药不产生耐药性及毒副作用遥

在本研究中我们用毕赤巴斯德酵母为宿主袁以酵母表达质粒 pPIC9 为载体介导将人内皮抑素基因整合入酵母基因组 HIS4 段袁在强启动子 AOX1 下游获得了高效分泌表达 rhES 的菌株袁初步分析表达量达到 20mg/L遥经肝素亲和层析方法纯化到 M<sub>r</sub> 约 20000 的 rhES袁纯度达到 91.8%遥

活细胞具有摄取 MTT 的能力袁在细胞内部被转化为蓝色物质袁细胞数越多袁则蓝色越深遥 bFGF 可以刺激人血管内皮细胞系 ECV-304 细胞的增殖遥因此袁可以通过酶标仪检测蓝色深浅来间接反应血管内皮

床研究作出一定的探索遥

参考文献院

咱暂 O'Reilly MS, Boehm T. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth 咱暂 Cell, 1997, 88(2): 277-85.  
 咱暂 Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution 咱暂 EMBO J, 1998, 17(6): 1656-64.  
 咱暂 Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R. Endostatin: yeast production, mutants, and anti-tumor effect in renal cell carcinoma 咱暂 Cancer Res, 1999, 59(1): 189-97.  
 咱暂 Boehm T, Folkman J. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance 咱暂 Nature, 1997, 390(6658): 404-7.  
 咱暂 Yokoyama Y, Green JE. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model 咱暂 Cancer Res, 2000, 60(16): 4362-5.  
 咱暂 Blezinger P, Wan J, Margatet G. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene 咱暂 Nature Biotechnol, 1999, 17(4): 343-8.  
 咱暂 Cregg JM, Vedick TS. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* 咱暂 Biol Technol, 1993, 11(8): 905-10.  
 咱暂 张兆伟, 张金芝, 孙文义, 等. 小鼠肺腺癌 LA-795 细胞株的建立及一些生物学特性的研究 咱暂 中华肿瘤杂志, 1985, 7(2): 83-5.  
 咱暂 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications 咱暂 N Eng J Med, 1971, 285: 1182-6.