

# 人血管内皮生长因子-C 基因编码区 cDNA 的克隆与测序

潘 剑 华成舸 温玉明 李 珉 王 刚 王昌美 李龙江 陈绍维

**【摘要】** 目的 克隆人舌癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)-C 功能片段的 cDNA,为进一步研究 VEGF-C 在口腔鳞癌中表达的意义及与淋巴转移的关系打下基础。方法 以 RT-PCR 法从舌鳞癌组织中克隆 VEGF-C 基因功能片段的 cDNA,用限制性内切酶消化和 PCR 筛选出阳性克隆 pCRII-VEGF-C,以 SP6 和 T7 引物完成 VEGF-C cDNA 的全序列测定。结果 从人舌癌组织总 RNA 中克隆到约 1.1 kb 大小的 VEGF-C 基因 cDNA,经测序与 Genbank 公布的人 VEGF-C 基因 cDNA 序列的同源性为 99.6%。结论 从人舌癌组织中克隆得到的 VEGF-C 基因功能片段 cDNA,为进一步研究 VEGF-C 在口腔癌颈淋巴结转移中的功能效应提供了物质基础。

**【关键词】** 血管内皮生长因子-C; 分子克隆; DNA 序列测定

## Cloning and Sequencing of Human Vascular Endothelial Growth Factor-C Encoded cDNA

PAN Jian<sup>\*</sup>, HUA Chengge, WEN Yuming, et al. (<sup>\*</sup> Department of Oral Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**【Abstract】 Objective** A functional VEGF-C cDNA was cloned from a patient with squamous cell carcinoma (SCC) of tongue in order to study the important role of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in lymphatic dissemination of malignancies in gene level. **Methods** RT-PCR was employed to clone the human VEGF-C encoded cDNA from a surgical specimen of a lingual SCC patient. Then it was subcloned into plasmid vector pCRII and sequenced. **Results** A 1.1 kb human VEGF-C cDNA fragment was amplified from the lingual SCC. The sequencing results of the fragment demonstrated that it had 99.6% similarity with the reported human VEGF-C cDNA (representing the 559 ~ 1 611 bp according the sequence of Genbank Entry X94216).

**Conclusion** An encoded fragment VEGF-C cDNA was successfully cloned from a lingual SCC and provided a necessary material for further study.

**【Key words】** vascular endothelial growth factor (VEGF)-C; molecular cloning; DNA sequencing

血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)属 VEGF 家族成员,其主要功能为增强淋巴管内皮细胞的趋化性,增强细胞增殖和增加淋巴管,包括管径的增大和数量的增加,因此亦称之为淋巴管内皮生长因子。文献及本课题组的前期研究发现 VEGF-C 在恶性肿瘤及淋巴转移灶中的表达远远强于正常组织,因此推测 VEGF-C 可能是原发灶肿瘤细胞和周围淋巴管内皮细胞之间相互旁分泌关系的重要调节因素,在淋巴转移中可能起着重要的作用<sup>1,2</sup>。为了进一步在基因水平证实其对肿瘤淋巴转移的作用,本研究拟从新鲜人舌癌组织 RNA 中克

隆 VEGF-C 基因编码区 cDNA,并作全序列测定,以期为进一步研究 VEGF-C 在口腔癌颈淋巴结转移中的功能效应提供物质基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本来源 舌癌组织来自临床低分化舌鳞状细胞癌患者,该患者术前未曾接受过任何抗癌治疗,行舌癌根治术后有明确的颈淋巴结转移,病理学分期为 T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>。手术中无菌操作取下部分新鲜舌癌组织迅速置于液氮罐中-70℃保存待用。

1.1.2 菌株、质粒、工具酶及试剂 *E. coli* JM109 菌株(四川大学生命科学院分子生物学重点实验室),组织细胞总 RNA 提取试剂盒(上海华舜生物工程公司),克隆与测序载体 pCRII 质粒(Introgen 公司,美国),AMV 逆转录酶和 DNA 分子量标准等试剂(华美生物工程公司和大连宝生物工程公司),限制性内切酶 *EcoR* 和 *Xho* (TakaRa 公司,大连),T<sub>4</sub>DNA 连接酶

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39970796)

作者单位: 610041 四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(潘剑,华成舸,温玉明,王昌美,李龙江,陈绍维),四川大学生命科学院(李珉,王刚)

(MBI公司,美国),UNIQ-10柱式DNA回收试剂盒(上海生物工程公司)。

1.1.3 PCR引物 根据人VEGF-C基因mRNA的功能编码片段特点,设计VEGF-C基因特异性引物。正向引物为:5'-AGCGAATTCGTTATGACTGTACTCTACCCAGAATATF3,在其5'端引入了EcoR内切酶位点。逆向引物为:5'-AGCCTCAGFTAGCTCATTTGTTGTTCTTTTCCAATA-3,在其5'端引入了Xho酶切位点。引物由上海生物工程公司合成。两酶切位点之间对应于人VEGF-C mRNA(全长1997 bp)中第559~1661 bp,编码VEGF-C蛋白质氨基酸序列(总长419)第70~419位氨基酸。

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取 将新鲜冷冻舌鳞癌组织100 mg用预冷的匀浆器研成粉末状,加入匀浆缓冲液匀浆后用RNA提取试剂盒提取总RNA。经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳确认总RNA无降解。

1.2.2 逆转录反应 在二乙基焦碳酸盐(diethyl pyrocarbonate,DEPC)处理过的0.5 ml Eppendorf管中加入癌组织细胞的总RNA溶液20 μl,5×逆转录酶反应缓冲液10 μl,270 pmol/L随机引物1 μl,100 pmol/L的Oligo(dT)<sub>14</sub> 2 μl,4×10<sup>7</sup> U/L RNA-sin 2 μl,2.5 mmol/L的dNTP10 μl,5 μl DEPC处理过的双蒸水。混匀上述溶液,于42℃水浴中加热2 min,加入AMV逆转录酶300 U,室温放置15 min,42℃水浴50 min,最后在70℃水浴中加热15 min灭活逆转录酶。

1.2.3 PCR反应 反应体积40 μl(各引物0.5 μmol/L,逆转录反应产物2 μl),共分3管,癌组织2管,空白对照1管,反应条件:98℃热变性2 min,平衡于65℃并加入TaqDNA聚合酶2.5 U。首先按94℃ 1 min,65℃ 2 min循环10个周期,暂停,补加TaqDNA聚合酶2.5 U,再按94℃ 1 min,65℃ 2 min,72℃ 4 min循环25个周期,最后在72℃延伸5 min。RT-PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,切取大小约为1.1 kb的DNA区带,回收、纯化特异性扩增片段。

1.2.4 目的基因的克隆 纯化后的RT-PCR扩增产物及载体pCRII,分别用EcoR和Xho双酶切后,用T<sub>4</sub>DNA连接后电泳检查连接效果。连接产物转化E. coli JM109,用含氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)培养基37℃培养过夜。从转化的平板上挑取单克隆,提取质粒。用EcoR和Xho双酶切,1%含溴乙锭的琼脂糖电泳检查酶切产物。将具有1.1 kb插入片段的质粒用EcoR单酶切线性化后,重新用前述RT-PCR引物和反应条件作PCR反应,经1%含溴乙锭的琼脂糖电泳检查,出现1.1 kb特异条带者为阳性克隆。

1.2.5 VEGF-C cDNA的序列测定及分析 取筛选鉴定得到的目的克隆质粒5 μg,由上海基康生物技术有限公司在AbI377型全自动测序仪上行末端终止法四色荧光测序。测序反应分别从SP6和T7两个方向进行,SP6和T7引物不能达到的中间段序列,由T7方向所测得的结果重新设计合成步移引物延伸完成测序。根据参考文献报道的VEGF-C基因序列及查询Genbank Blastn服务器进行同源性比较。

2 结果

2.1 RT-PCR反应

用经逆转录反应仅合成一条cDNA链的总RNA为模版,以VEGF-C基因特异性的引物进行PCR扩增后,舌癌组织标本出现了一条大小在1.1 kb左右的特异性条带(图1)。

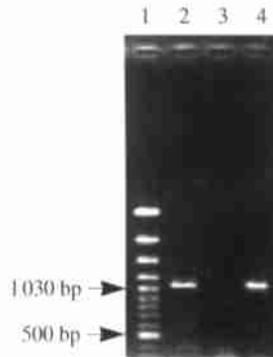


图1 RT-PCR扩增产物

1 分子量标准DNA ladder,2和4 舌癌RT-PCR产物,3 空白对照无产物

Fig 1 RT-PCR amplification of VEGF-C cDNA

2.2 重组质粒pCRII-VEGF-C的筛选和鉴定

用EcoR和Xho双酶消化少量制备的质粒,见重组质粒含有1.1 kb的插入片段。再用RT-PCR的引物和反应条件,对含有插入片段的质粒进行的PCR反应显示均出现了1.1 kb的特异条带(图2)。

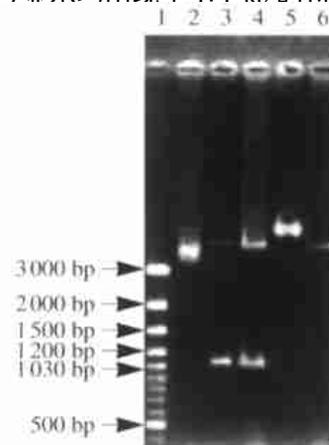


图2 重组质粒的鉴定

1 分子量标准DNA ladder,2 pCRII-VEGF-C,3 以重组质粒为模版的PCR,4 pCRII-VEGF-C/EcoR + Xho,5 pCRII-VEGF-C/EcoR,6 pCRII为模版的PCR

Fig 2 Identification of pCRII-VEGF-C by restriction endonuclease and PCR

2.3 VEGF-C cDNA全序列测定及同源性分析

对阳性克隆质粒上的插入片段进行全序列测定,整理结果得克隆到的VEGF-C cDNA片段全序列与

Altschoul 等报告的人 VEGF-C 基因 cDNA 全序列几乎一致,在互联网上通过 Genbank Blastn 服务器对克隆到的人舌癌 VEGF-C 蛋白编码区 cDNA 序列与人前列腺癌 PC-3 细胞系的 VEGF-C mRNA 序列具有 99.6% 的同源性。其中克隆片段编码区第 68 位氨基酸由半胱氨酸(TGT)同义突变为半胱氨酸(TGC),第 124 位氨基酸由丝氨酸(TCT)突变为苏氨酸(ACT),第 189 位氨基酸由丙氨酸(GCT)突变为丝氨酸(TCT),第 243 位氨基酸由精氨酸(AGA)突变为甘氨酸(GGA)。

### 3 讨 论

VEGF-C 属于生长因子中血管内皮生长因子/血小板衍生生长因子(VEGF/PDGF)家族,自 1996 年被分离纯化以来有关研究进展迅速<sup>2-6</sup>。人类 VEGF-C 基因定位于染色体 4q34,功能区含 7 个外显子:外显子 1 编码信号序列和 N-端前肽的首位氨基酸;外显子 2 编码 N-端前肽的 C-端部分以及 VEGF 同源区的氨基端;VEGF 同源区的大部分保守序列由外显子 3 和 4 编码;其中外显子 4 还编码 VEGF-C 前体多肽链中 VEGF 同源区与 C-端前体多肽链间的主要蛋白水解位点区。外显子 5 和 7 编码 C6C10CRC 型富含半胱氨酸残基序列;外显子 6 编码 5 个重复的 C10XCXCX 序列,即 BR3P 同源区,该序列是丝蛋白的典型序列<sup>7-9</sup>。

人类的 VEGF-C cDNA 长 1 997 bp,开放阅读框架包括信号序列(SS),N-端前肽(N),VEGF 同源区以及 Balbiani 环 3 蛋白同源区(BR3P)4 部分,两端的 ATG 与 TAA 分别为翻译起始、终止密码子<sup>3</sup>。VEGF-C 最初的发现是因为其可以刺激 Flt4(即 VEGF 受体-3,vascular endothelial growth factor receptor-3,VEGFR-3)的自身磷酸化,后者是与 VEGFR-1 和 VEGFR-2 结构同源的受体,在 VEGF-C 发现之前曾被认为是一个孤儿受体。VEGF-C cDNA 的开放阅读框架编码具有 419 个氨基酸残基的蛋白质<sup>2</sup>。VEGF-C 是分泌性多肽,经蛋白水解加工,绝大部分分泌出细胞外的 VEGF-C 都经过了从蛋白多肽链前体逐步蛋白水解的过程<sup>10</sup>。在应用 VEGF-C 基因转染乳腺癌与胃癌肿瘤细胞后,移植瘤较对照组出现了明显的淋巴结转移。由此可认为,VEGF-C/VEGFR-3 的信号传导可介导特异性的淋巴管生成,引起肿瘤细胞的转移与扩散<sup>11,12</sup>。

用 RT-PCR 法克隆 VEGF-C 基因 cDNA 省去了常规克隆 cDNA 必须进行的 cDNA 文库构建、特异性探针杂交筛选等繁琐工作,却能达到同样的效果。本实

验采用 RT-PCR 法成功地克隆了人舌癌组织 VEGF-C 基因 cDNA,其编码的氨基酸序列为 VEGF-C 的第 70~419 位的多肽片段,包含了与 VEGF-C 表达、激活和实现生理功能所必须的 VEGF 同源序列和主要的高度保守的半胱氨酸基团以及编码多克隆抗体识别位点的序列,其 5 端和 3 端分别带有 *EcoR* 和 *Xho* 两个酶切位点,为进行原核表达检测以及进一步的恶性肿瘤 VEGF-C 基因转染研究奠定了物质基础。

### 参考文献

- 1 温玉明,于大海,王昌美,等.血管内皮生长因子-C在口腔癌中的表达及与颈淋巴结转移关系.华西口腔医学杂志,2001,19(1):5-8
- 2 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. EMBO J, 1996,15(2):290-298
- 3 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. Science (Washington DC), 1997,276(5317):1423-1425
- 4 Valtola R, Salven P, Heikkila P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. Am J Pathol, 1999,154(5):1381-1390
- 5 St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. Science (Washington DC), 2000,289(5482):1197-1202
- 6 Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. Br J Cancer, 1999,80(1-2):309-313
- 7 Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergises with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis *in vitro*, and alters endothelial cell proteolytic properties. J Cell Physiol, 1998,177(3):439-452
- 8 Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, et al. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34 respectively. Circulation, 1996,93(6):1079-1082
- 9 Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, et al. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. Curr Opin Biotechnol, 1999,10(6):528-535
- 10 Joukov V, Kumar V, Jeltsch M, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. EMBO J, 1997,16(13):3898-3911
- 11 Yanai Y, Furuhashi T, Kimura Y, et al. Vascular endothelial growth factor C promote human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice. J Exp Clin Cancer Res, 2001,20(3):419-428
- 12 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumour lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med, 2001,7(2):192-198

(2002-09-29 收稿,2003-05-15 修回)

(本文编辑 刘 怡)