

# 血管生成抑制因子 K4K5 cDNA 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

官孝群<sup>1</sup> 王跃祥<sup>1</sup> 吴良成<sup>2</sup> 宋后燕<sup>1\*</sup>

( 复旦大学医学院基础医学院分子遗传学研究室 ,上海 200032 )

( 复旦大学医学院附属眼耳鼻喉科医院眼科 ,上海 200031 )

**摘 要** 应用 PCR 方法 ,扩增人纤溶酶原 cDNA 基因中 K4K5 cDNA 片段 ,与酵母表达载体 pPIC9K 重组 ,获得表达质粒 p9kkk-18。该质粒转化毕赤酵母菌 GS115 ,用 G418-YPD 筛选高拷贝表型 ,PCR 筛选 K4K5 cDNA 与酵母染色体整合形成的阳性克隆 ,阳性克隆用甲醇诱导表达。表达产物 r-K4K5 分子量约 21.5kD ,占分泌总蛋白 80% 以上 ,产物浓度为 150~250mg/L。初步纯化产物抑制牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞增殖与鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 新生血管生成。

**关键词** K4K5 cDNA ,克隆表达 ,毕赤酵母 ,新生血管生成

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0126-05

新生血管生成 (Angiogenesis) 在胚胎发育、创伤愈合、侧支循环建立、炎症过程、糖尿病视网膜病变、银屑病及肿瘤组织等生理和病理过程中起重要作用。若抑制或破坏新生血管生成 ,则能阻止依赖新生血管生成的病变如肿瘤的发生与发展<sup>[1]</sup>。新生血管生成抑制因子 Angiostatin 是 O' Reilly M S 等在 1994 年发现的内源性血管生成抑制因子 ,在体外能特异抑制血管内皮细胞的增生和迁移<sup>[1,2]</sup> ,动物实验表明 ,Angiostatin 能抑制多种肿瘤的生长与转移<sup>[2,3]</sup>。

Angiostatin 是纤溶酶原 (plg) 的降解片段 ,相当于 plg N 端 3~4 个三角区 K1-K3 或 K1-K4<sup>[1,2,4]</sup> ,天然纤溶酶原 (Glu-plg) 具有 5 个结构相似而功能相对独立三角区 (K 区 ,K1 ,K2 ,K3 ,K4 ,K5) ,每个 K 区大约由 80 个氨基酸组成 ,其中 6 个半胱氨酸残基相当保守 ,形成三对二硫键维持 K 区空间构象。K5 与 K1 一级结构高度同源 ,能有效、特异地抑制牛毛细血管内皮 (Bovine capillary endothelial ,BCE) 细胞增殖<sup>[4,5]</sup>。Ji WR 等报道 ,K5 能有效抑制 BCE 细胞和人脐静脉内皮细胞迁移 ,而赖氨酸结合位点 (lysine-binding sites ,LBS) 与迁移抑制活性无关 ,作用方式类似 Angiostatin ;K5 被还原或烷基化后 ,迁移抑制作用增强 ,提示还原剂或烷基化剂破坏 K5 内二硫键 ,原来隐藏的活性部分暴露 ,消除了天然 K5

对内皮细胞的屏蔽作用 ,有利于 K5 与内皮细胞间相互作用。尽管作用机制不明确 ,K5 仍可能是有效的内源性血管生成抑制因子之一<sup>[6]</sup>。重组 K4K5 cDNA 克隆在毕赤酵母 GS 115 中的表达未见报道。

本文报道应用 PCR 方法扩增人纤溶酶原 K4K5 cDNA ,与分泌型酵母表达质粒重组 ,转化甲醇营养型酵母 ,获得高效表达 K4K5 cDNA 的克隆 ,表达产物 r-K4K5 能显著抑制 BCE 细胞增殖与鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 新生血管的生成。这对深入研究 K5 构效关系有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒** :大肠杆菌 JM109、质粒 pBS-S1 和 pUC18 为本实验室冻存 ;pPIC9K 质粒和 GS115 酵母菌购自美国 Invitrogen 公司。

**1.1.2 试剂和仪器** :限制酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司、BRL 公司 ,dNTPs、G418 购自 Promega 公司 ,耐热 DNA 聚合酶试剂盒 (Expand<sup>TM</sup> High Fidelity System) 购自 Roche (BM) 公司 ,QIAGEN Plasmid Mini/Midi Kit 购自 QIAGEN Inc. (德国) ,酵母表达试剂盒 (Multi-copy pichia expression kit) 购自 Invitrogen 公司 ;丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺及培养基 YNB (Yeast nitrogen base) 蛋白胨 (Peptone) 购自

Sigma 公司, 酵母提取物购自 Difco 公司, *r*-bFGF 为暨南大学生物工程研究所研制, Sephadex G50 为 Amersham Pharmacia 公司产品, 图像分析系统 Image-Master<sup>R</sup> VDS 购自 Pharmacia Biotech 公司, PCR 扩增仪 (Gene Cyclor<sup>TM</sup>)、可见紫外分光光度计、蛋白质检测试剂盒 (Protein Assay) 为 Bio-Rad 公司产品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 K4K5 cDNA 片段的扩增、克隆与鉴定

根据酵母表达载体多克隆位点区特点和 K4K5 cDNA 区 N、C 端氨基酸顺序设计引物, 上游、下游引物分别引进 *Eco*RI 位点, 终止密码 (TAA) 和 *Bam*HI 位点, 以含人纤溶酶原全长 cDNA 的质粒 pBS-S1 为模板, PCR 扩增 K4K5 cDNA, 琼脂糖凝胶电泳分析产物。产物经 Klenow 补平、*Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶消化后, 与 pUC18 重组。重组质粒经限制酶鉴定、DNA 序列分析<sup>[7]</sup>筛选阳性克隆, 阳性克隆命名 p4-5-a (图 1)。

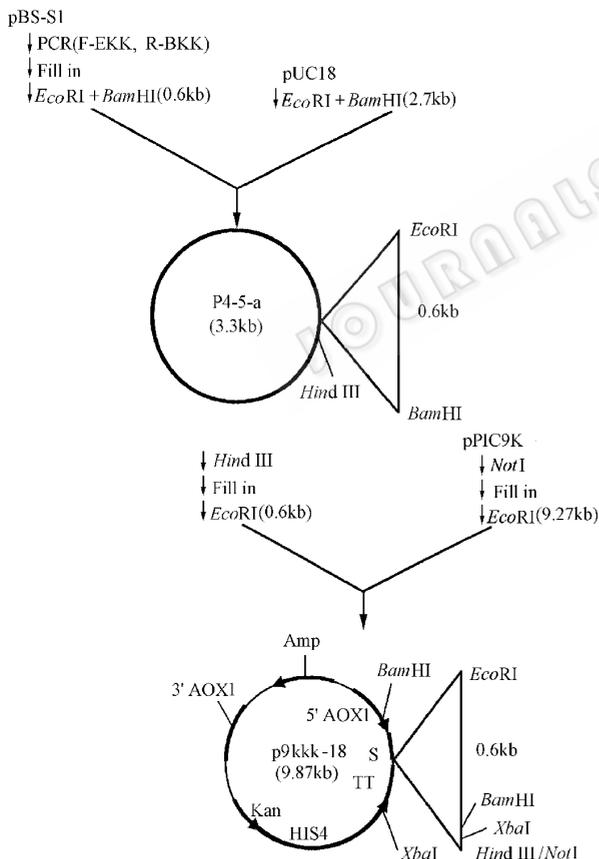


图 1 质粒 p9kkk-18 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid p9kkk-18

### 1.2.2 酵母表达质粒 (p9kkk-18) 的构建

p4-5-a 经 *Hind*III 酶解、Klenow 补平、*Eco*RI 酶解, 回收目的片段 (618bp); pPIC9K 经 *Not*I 酶解、Klenow 补平、*Eco*RI 酶解, 回收载体片段 (9.3kb); 两片段连接并

转化大肠杆菌 JM109, 扩增, 重组质粒经限制酶鉴定、DNA 序列分析<sup>[7]</sup>筛选阳性克隆, 阳性克隆命名 p9kkk-18 (图 1)。

### 1.2.3 p9kkk-18 的转化与阳性克隆的筛选

*Bgl*II 将 p9kkk-18 线性化, 用电穿孔法转化 GS115, K4K5 cDNA 通过同源重组与酵母染色体整合, 所有转化子在 MIX 葡萄糖最低限培养基) 平板培养 48h 后, 再先后转至 96 孔板、YPD-G418 平板 (G418 终浓度为 0, 0.25, 0.50, 1.0mg/mL) 生长筛选生长表型, 仅能在 G418 终浓度为 0, 0.25mg/mL 的 YPD-G418 平板生长的克隆定义为低拷贝转化子, 能在 G418 终浓度不小于 0.50mg/mL 的 YPD-G418 平板生长的克隆定义为多拷贝转化子。选择抗 G418 的克隆用 YPD 培养液培养过夜后, 抽取酵母染色体作为模板, 以酵母醇氧化酶 1 (Alcohol oxidase 1, AOX1) 5'-端和 3'-端的测序引物为 PCR 正向、逆向引物扩增 DNA 片段, 验证目的 cDNA 与酵母染色体整合的状态。

### 1.2.4 p9kkk-18 在酵母菌 GS115 中的诱导表达

挑取数个阳性克隆, 并以转入空载体的 GS115 克隆作对照, 接种于甘油复合培养基 (BMGY) 培养液中, 30℃ 培养至菌体  $OD_{600nm}$  达到 2~6 时, 离心去除培养液, 无菌水洗涤 1 次, 沉淀以 1/10 体积甲醇复合培养基 (BMMY) 甲醇最低限度缓冲培养基加 1% 酪蛋白水解物 (BMM-CA), 甲醇最低限度缓冲培养基 (BMM), 甲醇最低限度培养基 (MM) 继续培养, 0.5% 甲醇诱导培养 7d, 每 24h 取样并补加甲醇维持甲醇浓度 0.5% 于 30℃ 诱导表达。每次取样保留培养液上清。15% SDS-PAGE 鉴定培养液上清中表达产物, 用图像分析系统计算目的产物百分比, 依据 Bradford 方法参照试剂盒说明书操作测定培养液上清中总蛋白质浓度, 由此推算目的产物在培养液上清的浓度。

诱导培养液上清于 4℃ 搅拌加入硫酸铵分级沉淀, 磷酸缓冲液 (0.02mol/L, pH7.4) 溶解, 上 Sephadex 50 分子筛层析, 收集、合并  $OD_{280nm}/OD_{260nm} > 1.7$  的样品, 冷冻抽干。

### 1.2.5 生物活性测定

*r*-K4K5 对 BCE 增殖的影响<sup>[1]</sup> 对照组为 SPC-A1 肺腺癌细胞。用含 3ng/mL 重组碱性成纤维细胞生长因子 [*r*-bFGF] 的培养液 M (含 10% 灭活的胎牛血清 [FBS], 1% 抗生素 [antibiotics] 的 DMEM 培养基), 在 37℃、5%  $CO_2$  条件下传代培养 BCE, 该细胞经 PBS 漂洗、胰酶消化, 用培养液 M 制成细胞悬液 ( $1.5 \times 10^5$  cells/mL), 接种到 24

孔板继续培养(2mL/孔,即  $3 \times 10^5$  细胞/孔),24h 后,吸弃培液,加入 1mL 培液 M 和 20 $\mu$ L r-K4K5 样品,室温孵育 20min,加入 r-bFGF 和培液 M 使每孔培液体积为 2mL,r-bFGF 终浓度 1.5ng/mL,24、48、72h 后计数细胞,分析各剂量组差异;r-K4K5 对鸡胚 CAM 血管生成的影响<sup>[18]</sup>。受精卵孵化第 7 天加样,PBS 为试剂对照。处理浓度为 0.4、0.8、1.6  $\mu$ g/mL,加样 50  $\mu$ L,继续孵育 72h,制备标本,观察新生血管生成。

## 2 结果

### 2.1 K4K5 cDNA 片段的扩增、克隆与鉴定

#### 2.1.1 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物约 600bp

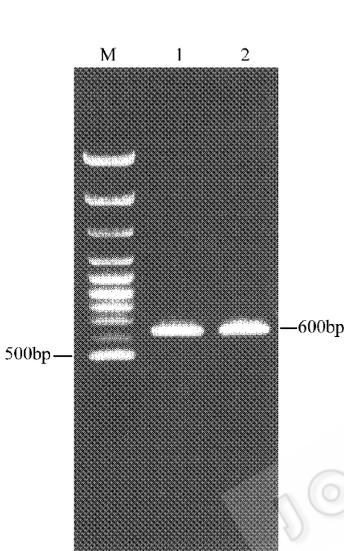


图 2 PCR 扩增产物的鉴定

Fig.2 Analysis of PCR product

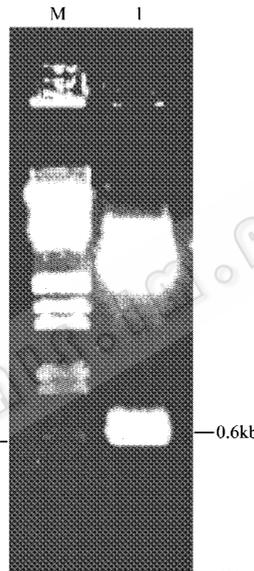


图 3 质粒 p4-5-a 酶切图谱

Fig.3 Restriction Analysis of p4-5-a

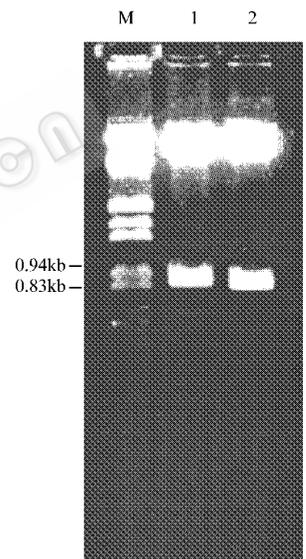


图 4 质粒 p9kkk-18 酶切图谱

Fig.4 Restriction Analysis of p9kkk-18

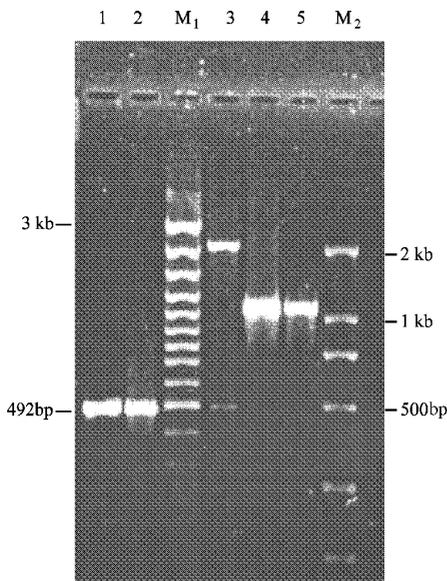


图 5 PCR 鉴定 K4K5 cDNA 与酵母染色体整合

Fig.5 Analysis of transformants by PCR

(图 2)。限制酶鉴定、DNA 序列分析证实扩增片段与预计长度(588bp)相符(图 3),且阅读框架(ORF)正确,该质粒命名为 p4-5-a。

#### 2.2 酵母表达质粒(p9kkk-18)的鉴定

重组质粒 p9kkk-18 经 *Bam*HI、*Xba*I 酶切后,分别释放特异小片段 0.9kb、0.7kb,表明插入片段的长度与方向正确(图 4),序列分析显示 pPIC9K 的特征位点 *Bam*HI、连接位点 *Eco*RI,阅读框架(ORF)正确,该质粒命名为 p9kkk-18。

#### 2.3 PCR 鉴定高拷贝转化子

图 5 所示,以 *AOX1* 基因 5'-端和 3'-端的测序引物为 PCR 正向、逆向引物,以空载体 pPIC9K 为模板和以空载体 pPIC9K 转化子的染色体为模板,

其扩增产物均为 0.5kb(图中 1、2),以空白酵母菌 GS115 的染色体为模板扩增出 2.2kb 的片段(图中 3),以重组质粒 p9kkk-18 转化子的染色体为模板,其扩增产物均为 1.1kb(图中 4、5),上述结果表明:空载体 pPIC9K DNA 片段、K4K5 cDNA 基因取代酵母醇氧化酶 I(*AOX1*)基因而整合于酵母染色体中。

#### 2.4 表达产物的含量、浓度

SDS-PAGE 电泳显示,表达菌在 21.5kD 处有一浓集条带,而仅转入空载体的对照菌未见该条带。同为高拷贝转化子但表达水平差别明显不同,其中最高表达者呈明显时相分布,第 3、4 天表达水平较高,而且产物在培液中无明显降解,产物约占分泌总蛋白 80%(图 6),培液上清浓度为 150~250mg/L。多次传代后表达产物无明显改变,表明该酵母表达系统能高效稳定表达外源基因。

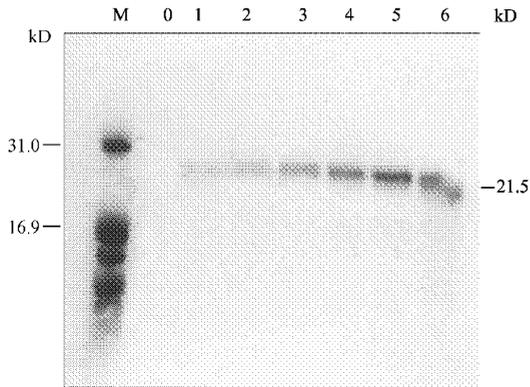


图 6 SDS-PAGE 分析表达产物

Fig. 6 Analysis of the expression product by SDS-PAGE

### 2.5 表达产物的活性分析

r-K4K5 通过拮抗 r-bFGF 抑制 BCE 增殖, 24h 内作用不明显, 48h 后作用明显, 48~72h 抑制作用无显著差别(表 1), 而对 SPC-A1 肺腺癌细胞无明显影响。光学显微镜下可观察到 PBS 组鸡胚 CAMs 血管生长良好, 血管分支适中, r-K4K5 处理组直径小于  $50\mu\text{m}$  小血管明显减少, 表明 r-K4K5 抑制鸡胚 CAM 新生血管生成(图 7)。

### 3 讨论

天然纤溶酶原 K 区氨基酸残基同源与空间构象相似使得它们能不同程度地抑制血管内皮细胞增殖与迁移<sup>[4, 5, 6]</sup>。Cao Y 等<sup>[5]</sup>曾在大肠杆菌中表达小鼠 K5 cDNA 基因, K5 区是含有二硫键的真核

表 1 r-K4K5 对血管内皮(BCE)细胞增殖的抑制作用

Table 1 Inhibition of BCE cell proliferation by r-K4K5

r-K4K5 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $\times 10^5$ cells/well)	24h ( $\times 10^5$ cells/well)	48h ( $\times 10^5$ cells/well)	72h ( $\times 10^5$ cells/well)
0	$6.77 \pm 0.06^*$	$22.67 \pm 0.58^*$	$22.67 \pm 0.58^*$
10	$6.57 \pm 0.06$	$12.67 \pm 0.58$	$12.00 \pm 1.00$
15	$6.37 \pm 0.06$	$5.83 \pm 0.15$	$5.80 \pm 0.20$
20	$6.23 \pm 0.06$	$3.92 \pm 0.13$	$3.80 \pm 0.20$
25	$5.93 \pm 0.12$	$3.32 \pm 0.13$	$2.93 \pm 0.21$
30	$5.97 \pm 0.06$	$2.73 \pm 0.06$	$2.37 \pm 0.15$
40	$5.60 \pm 0.10$	$1.93 \pm 0.06$	$1.80 \pm 0.10$
60	$5.50 \pm 0.10$	$1.43 \pm 0.06$	$1.30 \pm 0.10$

\* mean  $\pm$  SEM

蛋白质, 但大肠杆菌是原核生物, 除其周边膜腔隙可以形成二硫键外, 蛋白质分子不能形成含有二硫键的、有活性的表达产物, 近年来发展起来的酵母表达系统, 具有高等真核表达系统的许多优势如组装二硫键和糖基化等蛋白质翻译后加工和修饰、蛋白质折叠等, 其操作同大肠杆菌一样简便<sup>[9, 10]</sup>。因此, 我们采用该系统表达 K4K5 cDNA 基因, 并获得了有活性的表达产物 r-K4K5。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是甲醇营养型酵母, 有 2 个醇氧化酶基因——AOX1 和 AOX2, 分别编码醇氧化酶 1 和 2, AOX1 基因负责细胞内大部分醇氧化酶活性, 该基因表达受甲醇严格调节和诱导; AOX2 基因序列与 AOX1 基因 97% 同源, 利用甲醇的效率比 AOX1 低得多。我们所用的 pPIC9K 是

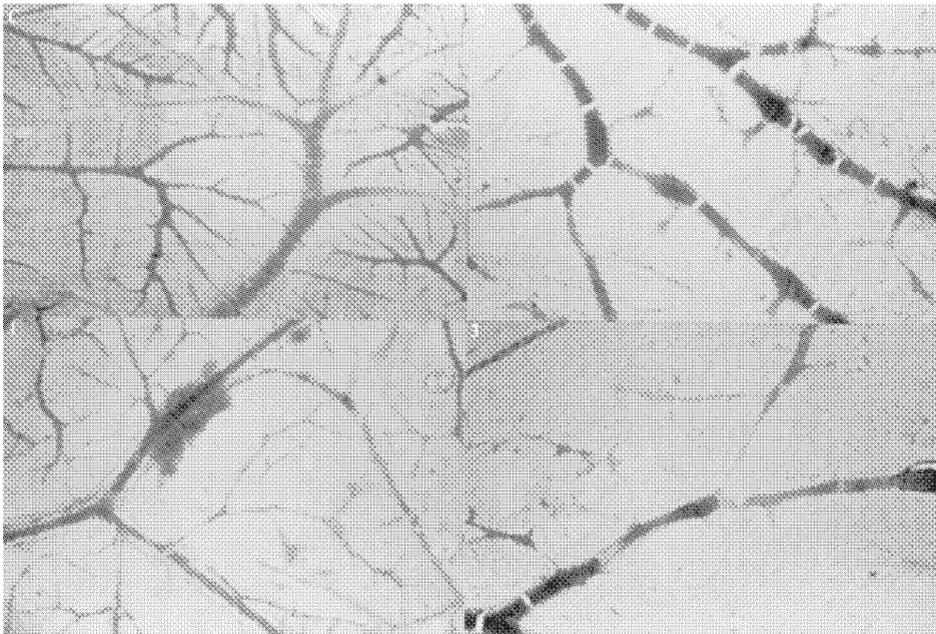


图 7 r-K4K5 对鸡胚 CAM 新生血管生成的抑制作用(光镜  $40\times$ )

Fig. 7 Antiangiogenesis effect of r-K4K5 on the chick embryo CAMs

分泌型表达载体,具有 AOX1 基因的调控元件,如启动子、转录终止和  $\alpha$ -肽的编码序列,K4K5 cDNA 与 pPIC9K 重组获得表达质粒 p9kkk-18,转化 GS115 后,K4K5 cDNA 基因取代 GS115 的 AOX1 基因整合于染色体中,表现为甲醇利用缓慢(Methanol utilization slow, Mut<sup>S</sup>);通过  $\alpha$ -因子进行分泌表达,使产物 r-K4K5 进入培液中。分别利用 BMMY、BMM-CA、BMM、MM 培养基诱导表达,结果显示,r-K4K5 在 BMM 训的表达水平明显高于 BMM-CA、BMM、MM,提示 BMMY 促进了酵母菌中 K4K5 cDNA 基因的表达。

我们成功地克隆与高效表达了 K4K5 cDNA 基因,初步实验表明,r-K4K5 能够抑制 BCE 细胞增殖,抑制鸡胚 CAM 新生血管生成。r-K4K5 的活性鉴定为血管生成抑制因子 r-K4K5 的研制和开发及其作用机制的研究奠定了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] 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**: 315~328
- [ 2 ] Gately S, Twardowski P, Stack S *et al.* Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res*, 1996, **56**(21): 4887~4890
- [ 3 ] O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C *et al.* Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 1996, **2**: 689~692
- [ 4 ] Cao Y, Ji R W, Davidson D *et al.* Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 29461~29467
- [ 5 ] Cao Y, Chen A, An S S A *et al.* Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 22924~22928
- [ 6 ] Ji W R, Barrientos L G, Llinas M *et al.* Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**(2): 414~419
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- [ 8 ] ZHANG S (张树成), WU Z K (吴志奎), WANG L (王雷) *et al.* Application of chicken chorioallantoic membrane as a model for study of effects of chinese medicine on angiogenesis. *Chinese Journal of Basic Chinese Medicine*(中国中医基础医学杂志), 1999, **5**: 16~19
- [ 9 ] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current opinion in Biotechnology*, 1995, **6**: 527~533
- [ 10 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology N Y*, 1993, **11**(8): 905~910

## Molecular Cloning and Expression of the cDNA Encoding Angiogenesis Inhibitor K4K5 with *Pichia pastoris*

GUAN Xiao-Qun<sup>1</sup> WANG Yue-Xiang<sup>1</sup> WU Liang-Cheng<sup>2</sup> SONG Hou-Yan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Genetics, School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Eye, Ear, Nose & Throat Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200031, China

**Abstract** Kringles of human plasminogen except kringle 4 can inhibit the endothelial cell growth. To determine whether recombinant plasminogen kringle 4-5 (r-K4K5) can inhibit the growth of bovine capillary endothelial (BCE) cell and the angiogenesis of chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), we cloned and constructed the modified cDNA region encoding kringles 4 and 5 (K4K5) of human plasminogen and expressed it with *Pichia* multi-copy expression system. One clone, with the most productive expression, was selected from hundreds of transformants. Our data showed that the expression product r-K4K5 (MW 21.5kD) amounted to 150~250mg/liter, over 80% of the total secreted protein. It could, dose-dependently, inhibit BCE cell proliferation and inhibit chick embryo CAM angiogenesis.

**Key words** K4K5 cDNA, cloning and expression, *Pichia pastoris*, angiogenesis

Received July 12, 2000

This work was supported by Shanghai Medical University Venture Fund (SMUVF9902).

\* Corresponding author. Tel 86-21-64033738; Fax 86-21-64033738; E-mail: hysong@shmu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>