

· 论 著 ·

人血管生成素相关家族蛋白-1 angioarrestin 基因真核表达载体的构建与鉴定

孙铭娟,王梁华,董晓毅,宗英,高云,焦炳华*

(第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**克隆人血管生成素相关家族蛋白-1 angioarrestin 基因,构建 angioarrestin 基因的真核表达载体。**方法:**从人肝 cDNA 文库中经 PCR 扩增出 angioarrestin 基因及其 C-端 FD domain,经纯化、回收目的片段,将其插入克隆载体 pcDNA3.1/His-Myc(-)B,构建重组质粒 pcDNA3.1-ARP 和 pcDNA3.1-FD,稳定转染大细胞肺癌 NCI-H460 细胞,RT-PCR 和 Western 印迹法鉴定。**结果:**从人肝 cDNA 文库中扩增出 1 473 bp 的 angioarrestin 目的片段及其 C-端 560 bp FD domain,构建的重组质粒 pcDNA3.1-ARP 和 pcDNA3.1-FD 经 PCR 及酶切鉴定与预期相符,经 RT-PCR 和 Western 印迹法确定稳定转染 NCI-H460 细胞成功。**结论:**成功构建了 angioarrestin 和 C-FD 基因的真核表达重组质粒并转染 NCI-H460 细胞,为 angioarrestin 抗肿瘤血管形成作用机制的研究奠定了初步基础。

[关键词] 血管生成素 1;angioarrestin;遗传载体;转染

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0134-05

Construction and identification of eukaryotic expression vector of human angiopoietin-related protein-1 angioarrestin

SUN Ming-juan, WANG Liang-hua, DONG Xiao-yi, ZONG Ying, GAO Yun, JIAO Bing-hua* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To clone human angiopoietin-related protein-1 angioarrestin genes and construct their recombinant eukaryotic expression vector. **Methods:** Full length sequence of angioarrestin gene and its C-FD domain were amplified from human liver cDNA library by PCR and were subsequently inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1/His-Myc(-)B. Then angioarrestin and FD recombinant plasmids were stably transfected in NCI-H460 cell line. The positive clones were identified by RT-PCR and Western blot. **Results:** Full length fragment of angioarrestin gene (1 473 bp) and C-FD domain (560 bp) were successfully amplified from human liver cDNA library by PCR. The pcDNA3.1-ARP and pcDNA3.1-FD recombinant plasmids were also constructed successfully as identified by PCR and enzyme digestion, RT-PCR and Western blot showed the expression of target mRNA and protein in NCI-H460 cells. **Conclusion:** The eukaryotic expression vectors of angioarrestin and C-FD gene have been successfully constructed and expressed in NCI-H460 cells, which pave a way for further study on the anti-angiogenesis function of angioarrestin in cancer.

[KEY WORDS] angiopoietin 1;angioarrestin;genetic vectors;transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 134-138]

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康。肿瘤的生长、转移依赖于血管生成^[1]。血管新生是在原有的毛细血管或微静脉基础上,通过内皮细胞的增殖和迁移,从先前存在的血管处以芽生或非芽生的形式生成新的毛细血管,是胚胎形成时期和产后组织正常生成时血管形成的主要方式,同时也是病理组织形成和发展时血管形成、增多的主要方式^[2]。血管新生主要受两方面因素的调控,一是促血管形成因子的增加,二是抑制血管形成因子的减少^[3]。

通过抑制肿瘤相关的血管生成可以抑制肿瘤的生长。2002年,Dhanabal等^[4]通过基因同源性途径分离出一种血管生成素相关的 cDNA,其序列与 1999年 Kim等^[5]所发现的血管生成素相关家族蛋

白 1(ARP1)基因序列一致,鉴于其在体内外均具有抑制血管生成的特性,将其更名为 angioarrestin。Angioarrestin 作为一种主要的内源性血管生成抑制因子,其在抑制内皮细胞增殖、迁移,以及内皮细胞管状结构形成等方面具有重要作用^[4-6]。

为进一步深入研究 angioarrestin 基因在抗肿瘤血管形成中的作用机制,本研究拟克隆人 angioarrestin 基因,构建 angioarrestin 基因及其 C-端纤维

[基金项目] 上海市科学技术发展基金(024319115)。Supported by the Science and Technology Development Foundation of Shanghai (024319115)。

[作者简介] 孙铭娟,博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

蛋白原同源区(FD domain)的真核表达载体。

1 材料和方法

1.1 载体、菌株和分子克隆试剂 真核表达载体 pcDNA3.1/His-Myc(-)B, 购自 Invitrogen Inc., 含 CMV 启动子、SV40 复制起点、新霉素(neomycin)抗性基因, 可进行目的基因的瞬时表达和稳定表达; 其外源基因克隆位点的下游, 含有 myc 表位和 6 个连续的组氨酸(6His)编码序列和该读框的终止密码子, 因此可根据需要表达 C-端连有 myc 表位和 6His 的融合蛋白。真核表达载体 pEGFP-C2, 购自 BD Biosciences Clontech Inc., 可表达绿色荧光蛋白, 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 为本室常规保存。

1.2 细胞培养液和相关试剂 DMEM 培养基购自 GIBCO BRL 公司; 胎牛血清(FBS), 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 胰酶, 1:250, Amresco 进口分装。

1.3 检测试剂 HRP 标记的 IgG 二抗以及其他各种无机及有机试剂均为国产 AR 级试剂。His Tag Monoclonal Antibody 购自 Novagen 公司。

1.4 真核表达载体的构建 (1) 构建 ARP(ARP 全长片段)和 FD(ARP C-端纤维蛋白原同源区)真核表达载体 pcDNA3.1/His-Myc(-)B 的引物。ARP/pcDNA3.1(-)B: 上游 5'-CGT CTC GAG ATG AAG ACT TTT ACC TGG AC-3'(Xho I), 下游 5'-CG GAA GCT TGG GTC AAT AGG CTT GAT CAT-3'(Hind III)。FD/pcDNA3.1(-)B: 上游 5'-GGT CTC GAG ATG TTC AAA GAC TGT CAG C-3'(Xho I), 下游 5'-GC GAA GCT TGG CTT GCT TCT GTA ATG GC-3'(Hind III)。

(2) 构建真核表达载体 pEGFP-C2 的引物。ARP/pEGFP: 上游 5'-GT CAG ATC TCG AAG ACT TTT ACC TGG ACC C-3'(Bgl II), 下游 5'-CG AAG CTT AGT CAA TAG GCT TGA TCA T-3'(Hind III)。FD/pEGFP: 上游 5'-GT CAG ATC TTC AAA GAC TGT CAG-3'(Bgl II); 下游 5'-GCG CTG CAG TTA CTT GCT TCT GTA ATG GCC-3'(Pst I)。PCR 扩增产物经酶切后, 插入相应的表达载体, 最后进行测序、PCR 及酶切鉴定。

1.5 细胞的瞬时转染与稳定转染 美国 BD 公司 FACSCALIBUR 型流式细胞仪。瑞士 Heraeus 公司 Megafuge 2.0R 型可控温水平离心机。

瞬时转染: 将构建的真核表达重组质粒 pcDNA3.1-ARP、pcDNA3.1-FD、对照 pcDNA3.1/His-Myc(-)B 经 Lipofectamine 2000 转染 COS-7 细胞^[5], 同时设立荧光表达重组质粒 pEGFP-ARP、pEGFP-FD、pEGFP-C2 作为转染效率参照。于含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 37°C, 5% CO₂, 培养 72 h 收集备用^[7-8]。流式细胞仪检测分析转染效率。

稳定转染: 将 pcDNA3.1-ARP、pcDNA3.1-FD、对照 pcDNA3.1/His-Myc(-)B 转染大细胞肺癌 NCI-H460 细胞后, 更换含 500 μ g/ml G418 的选择培养基筛选阳性克隆, 备用。

1.6 RT-PCR

1.6.1 RT-PCR 引物设计 ARP 引物序列(预期产物 1 473 bp)同 pcDNA3.1-ARP 所用引物; FD 引物序列(预期产物 580 bp): 正义链 5'-GGA CCA TTC AAA GAC TGT CAG CA-3', 反义链 5'-TGC TCT TAA GGA GTA TGA CCC GC-3'。 β -actin 引物序列(预期产物 838 bp): 正义链 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3', 反义链 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'。按 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1 说明书操作, 在 PCR 仪中进行 RT-PCR 反应。

1.6.2 反转录反应体系(10 μ l) MgCl₂, 2 μ l; 10 \times RNA PCR Buffer, 1 μ l; RNase free dH₂O, 3.75 μ l; dNTP Mixture(各 10 mmol/L), 1 μ l; RNase Inhibitor, 0.25 μ l; AMV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l; Oligo dT-Adaptor Primer, 0.5 μ l; 样本总 RNA, 1 μ l。反应条件: 30°C 10 min, 42°C 30 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min。

1.6.3 PCR 反应 配制下列 PCR 反应液(40 μ l), 加入反转录反应体系中, 形成总体积 50 μ l 的 PCR 反应体系。MgCl₂, 3 μ l; 10 \times RNA PCR Buffer, 4 μ l; dH₂O, 31.75 μ l; P1(20 pmol/ μ l), 0.5 μ l; P2(20 pmol/ μ l), 0.5 μ l; TaKaRa ExTag Hs, 0.25 μ l。ARP 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 40 s, 58°C 40 s, 72°C, 90 s, 共 35 个循环; 72°C, 10 min。FD 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 40 s, 58°C 40 s, 72°C 40 s, 共 35 个循环; 72°C 10 min。 β -actin 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 共 27 个循环; 72°C 10 min。

1.6.4 Western 印迹分析 将转染细胞裂解后经蛋白定量调整到相同浓度行 SDS-PAGE, 继而行 Western 印迹分析, ECL 化学发光显色^[9]。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 重组质粒 pcDNA3.1/Myc-

His(-)B 和 pEGFP-C2 载体插入片段 ARP 和 FD 测序结果经 Blastn 比对,与 GenBank 登陆序列一致;PCR 及酶切鉴定结果与预期相符(图 1、2)。

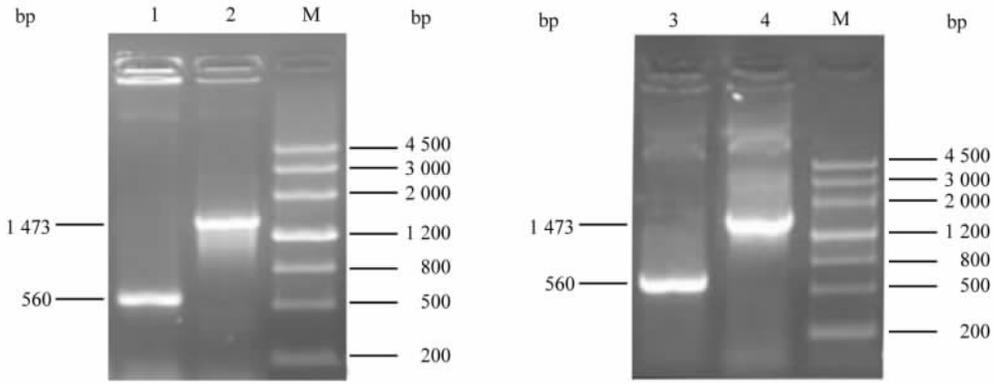


图 1 质粒 PCR 鉴定图

Fig 1 Identification of recombinant plasmid by PCR

1: PCR production of pEGFP-C2-FD; 2: PCR production of pEGFP-C2-ARP; M: TIANGEN marker III; 3: PCR production of pcDNA3.1-FD; 4: PCR production of pcDNA3.1-ARP

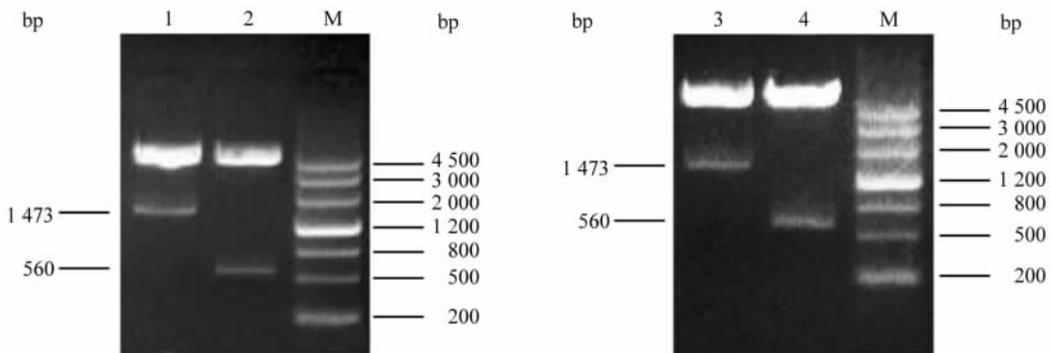


图 2 质粒酶切鉴定图

Fig 2 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion identification

1: *Bgl* II and *Pst* I digestion products of pEGFP-C2-FD; 2: *Bgl* II and *Hind* III digestion products of pEGFP-C2-ARP; M: TIANGEN marker III; 3: *Xho* I and *Hind* III digestion products of pcDNA3.1-FD; 4: *Xho* I and *Hind* III digestion products of pcDNA3.1-ARP

2.2 流式细胞仪检测瞬时转染效率 因分子量的差异造成 3 种荧光表达重组质粒 pEGFP-ARP、pEGFP-

FD 和 pEGFP-C2 转染 COS-7 细胞的效率略有不同,分别为 9.83%、11.31% 和 13.11%(图 3)。

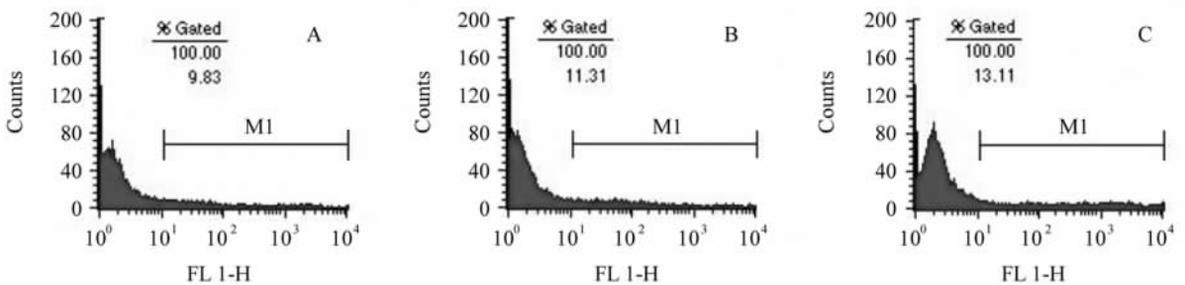


图 3 流式细胞仪检测 pEGFP-C2 转染效率

Fig 3 Flow cytometric analysis of transfection efficiency of pEGFP-C2

A: Indicating the percentage of cells transfected with pEGFP-C2-ARP; B: Indicating the percentage of cells transfected with pEGFP-C2-FD; C: Indicating the percentage of cells transfected with pEGFP-C2

2.3 RT-PCR 筛选阳性克隆 结果从 6 株 ARP-H460 中,筛选到 3 株阳性菌株;6 株 FD-H460 中,筛选到 1 株阳性克隆。

从细胞 RNA 电泳图中(图 4),可见 28 S、18 S 和 5 S 3 条完整的条带,且 28 S 是 18 S 的 2 倍左右,说明所抽细胞 RNA 比较完整。分光光度计检测各样品 D 值均在 1.8~2.0 之间,说明所抽提细胞 RNA 没有降解或蛋白污染。各细胞总 RNA 浓度已调至一致。

RT-PCR 电泳图中(图 5),泳道 1~3 分别代表野生型 NCI-H460、pcDNA3.1-ARP 和 pcDNA3.1-FD,与野生型 NCI-H460 相比,转染细胞中 ARP 和 FD 均具有显著表达,从 mRNA 水平提示 ARP、FD

基因转染成功。

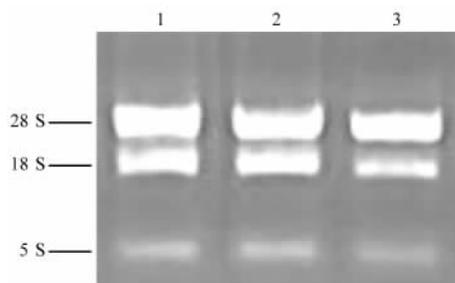


图 4 NCI-H460 细胞 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳图

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of RNA from NCI-H460
1:RNA of NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-ARP;2:RNA of NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-FD;3:RNA of NCI-H460 cells

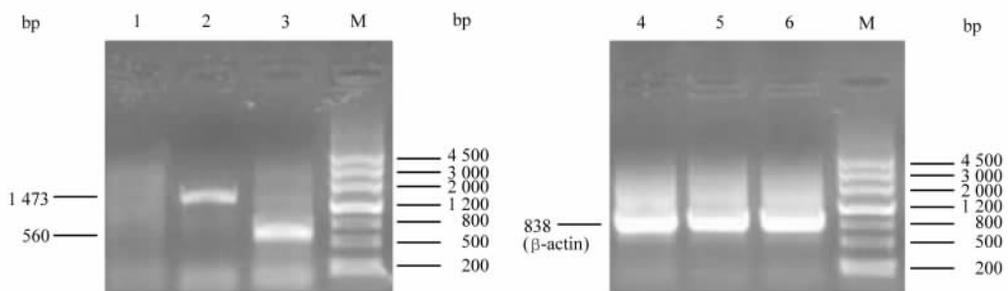


图 5 NCI-H460 细胞 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 5 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR from NCI-H460

1:RT-PCR of NCI-H460 cells;2:RT-PCR of NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-ARP;3:RT-PCR of NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-FD;M:TIANGEN marker III;4-6: β -actin

2.4 Western 印迹分析 转染细胞裂解后经蛋白定量调整到相同浓度,行 Western 印迹分析,ECL 化学发光显色,与泳道 1 野生型 NCI-H460 相比,泳道 2 pcDNA3.1-ARP 和泳道 3 pcDNA3.1-FD 转染细胞中分别表达有约 66 000 和 21 000 的相应蛋白条带,从蛋白水平再次证明转染成功(图 6)。

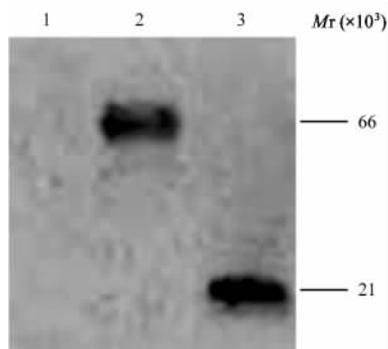


图 6 NCI-H460 细胞 Western 印迹分析

Fig 6 Western blot analysis of ARP and FD protein expression in NCI-H460 cell line

1:NCI-H460 cells;2: NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-ARP;3: NCI-H460 cells transfected with pcDNA3.1-FD

3 讨论

新生的实体瘤组织在形成血管前,快速增殖的肿瘤细胞始终处于缺氧的选择压力下,缺氧一方面可以诱导肿瘤细胞的凋亡,但另一方面还可以选择凋亡抗性细胞。同时还可诱导血管内皮生长因子的表达及促进血管的形成。一旦肿瘤血管形成,血管内皮细胞、巨噬细胞以及宿主的良性细胞产生的生长因子通过新生血管运至肿瘤细胞,导致肿瘤的快速生长。实验研究^[10-11]证实,抑制肿瘤血管的形成可抑制原发及转移瘤的生长。对稳定转染肺癌细胞株的实验研究结果显示:angioarrestin 不仅具有通过抑制肿瘤血管的形成从而抑制肿瘤生长的活性,还具备一定直接抑制肿瘤生长的活性。

Angioarrestin 基因全长 1 473 bp,按其开放阅读框架,本研究自行设计引物,扩增其全长片段以及 C-端 FD 区 560 bp 的目的片段。将构建的相应真核重组表达质粒转染大细胞肺癌 NCI-H460 细胞,经过 RT-PCR 和 Western 印迹分析分别从 mRNA 水平和蛋白水平证明我们所构建的含有目的基因的真

核重组表达质粒能够成功地在真核细胞内转录翻译。

综上所述,本实验室已经成功构建了稳定转染 angiostatin 及其 FD domain 表达质粒的肺癌细胞株 NCI-H460,该工作为今后 angiostatin 抗肿瘤作用机制的研究奠定了良好的基础。

[参考文献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285: 1182-1186.

[2] Staton C A, Stribbling S M, Tazzyman S. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Exp Pathol, 2004, 85: 233-248.

[3] Beckner M E. Factors promoting tumor angiogenesis [J]. Cancer Invest, 1999, 17: 594-623.

[4] Dhanabal M, LaRochelle W J, Jeffers M. Angiostatin: an antiangiogenic protein with tumor-inhibiting properties [J]. Cancer Res, 2002, 62: 3834-3841.

[5] Kim I, Moon S O, Koh K N. Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. Angiopoie-

tin-related protein induces endothelial cell sprouting[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 26523-26528.

[6] Dhanabal M, Jeffers M, LaRochelle W J. Angiostatin: A unique angiopoietin-related protein with anti-angiogenic properties[J]. BBRC, 2005, 333: 308-315.

[7] Smagur A, Szary J, Szala S. Recombinant angiostatin secreted from mouse melanoma cells inhibits growth of primary tumours[J]. Acta Biochim Pol, 2005, 52: 875-879.

[8] Kim I, Kwak H J, Ahn J E. Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3 [J]. FEBS Lett, 1999, 443: 353-356.

[9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1723-1745.

[10] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86: 353-457.

[11] O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice [J]. Nat Med, 1996, 2: 689-705.

[收稿日期] 2006-10-21 [修回日期] 2006-12-26
 [本文编辑] 孙岩

· 消息 ·

欢迎订阅《第二军医大学学报》

《第二军医大学学报》是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊。本刊面向全国和海外作者征稿,主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由中国科学院院士、肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超教授任主编。辟有:院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、个案报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药院校的师生。本刊自1980年创刊以来,一直连续被确认为“中国基础医学类核心期刊”、“中国综合性医药卫生类核心期刊”;被权威机构确定为“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”;被包括万方数据——中国数字化期刊群、中国学术期刊综合评价数据库等在内的国内所有重要检索系统,以及20多种重要的文摘性刊物收录,被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)、波兰《哥白尼索引》收录。本刊2002年荣获“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”,2004年荣获“第三届国家期刊奖提名奖”和全国高校优秀科技期刊评比一等奖,2006年荣获首届中国高校精品科技期刊奖。

本刊为月刊,A4开本,80g铜版纸彩色双胶印刷,2007年起每期定价15元,全年共180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路800号 《第二军医大学学报》编辑部,邮编:200433
 联系人:商素芳。电话:021-25074352,021-25074340 转 824 分机
 E-mail:bxue@smmu.edu.cn, bxue304@yahoo.com.cn
 http://journals.smmu.edu.cn