

人血管能抑素 canstatin 基因的分子克隆

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

何小平, 女, 1973-06-26 生, 江苏省灌南县人, 汉族, 主治医师, 2003 年第二军医大学博士生, 研究方向为肿瘤基因治疗。

上海市自然科学基金资助课题, No. 03JC14007

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科, zsli@online.sh.cn

电话: 021-25070556 传真: 021-25074635

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-19

Molecular cloning of human canstatin gene

Xiao-Ping He, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Xue Pan, Yan-Fang Gong, Jun Gao, Jing Jin

Xiao-Ping He, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Xue Pan, Yan-Fang Gong, Jun Gao, Jing Jin, Department of Gastroenterology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China Supported by the Municipal Science Foundation of Shanghai, No. 03JC14007

Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. zsli@online.sh.cn

Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To clone human canstatin gene and to detect and analyze its coding sequence.

METHODS: The total RNA was extracted from human placenta. The canstatin gene fragment was synthesized and amplified from the total RNA by RT-PCR. pUCm-T vector was cloned into the RT-PCR product to obtain recombinant pUCm-T/canstatin. The pUCm-T/canstatin was then transformed into *E.coli* DH 5 α , and sequence of the gene was detected.

RESULTS: The extracted total RNA was separated into three clear bands indicating 28 S, 18 S, and 5 S after electrophoresis. The values of A_{260} and A_{280} were 0.879 and 0.410 respectively ($A_{260} : A_{280} = 2.095$). The concentration of total RNA was 1.8 g/L. The PCR product was the same as target gene canstatin. *Bam*HI and *Hind*III digestion proved the final product positive. The sequence of the cloned gene (684 bp) completely matched with that of canstatin gene in Genbank.

CONCLUSION: Human canstatin gene is successfully cloned, which establishes the foundation for further study of its anti-tumor activity.

He XP, Li ZS, Tu ZX, Pan X, Gong YF, Gao J, Jin J. Molecular cloning of human canstatin gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10): 2329-2332

摘要

目的: 克隆血管能抑素 canstatin 基因, 测定并分析其基因序列。

方法: 从人胎盘组织中提取总 RNA, 经逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增出 canstatin 基因, 克隆进载体 pUCm-T 获得重组质粒 pUCm-T/canstatin, 转化 *E.coli* DH 5 α , 挑选出阳性克隆, 测定基因序列。

结果: 从人胎盘组织中提取出 RNA, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示 3 条清晰条带, 分别对应 28 S, 18 S, 5 S。分光光度计测定总 RNA 的 $A_{260}=0.879$, $A_{280}=0.410$, $A_{260} : A_{280} = 2.095$, 总 RNA 浓度为 1.8 g/L。RT-PCR 扩增产物与预期的目的基因 canstatin 长度一致。RT-PCR 产物与载体 pUCm-T 连接过夜后, 转化 *E.coli* DH 5 α , 在 LB 平板上生长出蓝色和白色菌落。挑选 6 个白色菌落做酶切鉴定, 其中一个菌落经 *Bam*HI 酶切后, 只出现 1 条特异性条带, 位置与酶切前质粒相近, 而经 *Hind*III 酶切后, 出现 2 条特异性条带, 其中 1 条与酶切前质粒位置相近, 另 1 条与目的基因位置基本一致, 证实为阳性克隆。测定该阳性克隆基因序列, 结果显示其与 Genbank 中公布的 canstatin 基因序列完全一致。

结论: 成功克隆了 canstatin 基因, 为进一步研究其抗肿瘤作用打下基础。

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶. 人血管能抑素 canstatin 基因的分子克隆. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2329-2332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2329.asp>

0 引言

新血管生成是肿瘤生长转移的关键步骤, 抗血管生成治疗以肿瘤新生血管为靶点, 目的是切断肿瘤生长转移所依赖的“命脉”, 已发展成重要抗癌策略^[1-5], 成为近年来肿瘤治疗领域的研究热点^[6-11]。Canstatin 是 2000 年由 Kamphaus *et al*^[12]发现的一种新的血管生成抑制素, 初步研究表明其具有抑制新生血管的形成, 抑制肿瘤生长作用, 受到广泛关注。为深入研究 canstatin 抗血管生成和抗肿瘤作用, 我们克隆了其基因序列。

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* DH 5 α 由本实验室保存。克隆质粒 pUCm-T 购自上海申能博彩生物科技有限公司; 限制性内切酶

*Bam*HI, *Hind*III, T4 DNA 连接酶及 DNA 分子大小标准购于 NEB 公司(基因公司代理); Trizol 购自晶美公司; RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 胶回收试剂盒购自上海宾国医疗科技有限公司; IPTG, X-gal, 质粒回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司. 胎盘组织自本院妇产科一剖腹产产妇获得. 引物根据 GenBank 中报告的 *canstatin* 序列设计而成. 上下游引物 5'-端分别携带 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点, 由上海生工生物工程公司合成. 上游引物: 5'-CGGGATCCTGTCAGCATCGGCTACCTC-3' 下游引物: 5'-CCCAAGCTTCAGGTTCTTCATGCACAC-3'.

1.2 方法 将液氮冻存的新鲜胎盘组织约 100 mg 放入研钵中, 倒入少许液氮, 尽力研磨使其成为粉末状. Trizol 一步法提取总 RNA, 分光光度法测定 RNA 纯度和量. 取胎盘组织总 RNA, 按照 RT-PCR 试剂盒提供的方法扩增 *canstatin* 基因. 反应体系为: 10 × 一步法 PCR 反应缓冲液 5 μL; 25 mmol/L MgCl₂ 10 μL; 10 mmol/L dNTP 5 μL; 40 MU/L 核糖核酸酶抑制剂 1 μL; 5 MU/L AMV 逆转录酶 1 μL; 5 MU/L AMV-Optimized Taq DNA 聚合酶 1 μL; 25 μmol/L 上下游引物各 1 μL; 1.8 g/L RNA 模板 1 μL; 无核酸酶双蒸水 24 μL. RT-PCR 反应条件: 50 °C 40 min, 94 °C 2 min, 94 °C 40 s, 52.6 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 次循环后, 72 °C 延伸 5 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物. 按照胶回收试剂盒提供的方法, 回收目的基因片段. PCR 产物的克隆. 连接反应体系 10 μL, 为连接缓冲液 1 μL, pUCm-T 1.5 μL (50 ng), 纯化 PCR 产物 6.5 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, 16 °C 连接过夜, 得到连接产物 pUCm-T/*canstatin*. 取 3 μL 上述连接反应液电转化感受态 *E. coli* DH5 α. 涂布铺有 IPTG 及 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养过夜, 进行蓝白斑筛选. 挑取白色菌落 6 个, 接种于含 5 μL 0.1 g/L 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜. 用按试剂盒提供的碱裂解法制备质粒, 用 *Bam*HI, *Hind*III 分别做 2 次单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定阳性克隆, 命名为 pUCm-T/*canstatin*. 取含有重组质粒的菌液 1 mL, 以 M13-/T7 为序列分析引物正反两端对 pUCm-T 中目的基因进行序列分析, 所测序列与 GenBank 中 *canstatin* 基因序列进行分析比较.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增人 *canstatin* 基因 总 RNA 抽提产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下见 3 条清晰条带, 分别为 28 S, 18 S, 5 S(图 1). 分光光度计测定 50 倍稀释的总 RNA $A_{260}=0.879$, $A_{280}=0.410$, $A_{260}:A_{280}=2.095$, 根据公式, 计算总 RNA 浓度 = $40 \times A_{260} \times$ 稀释倍数 / 1 000 = 1.8 g/L. RT-PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, PCR 产物长度与目的基因 *canstatin* cDNA 长度 684 bp 一致(图 2).

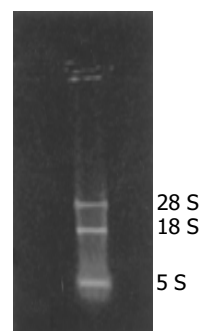


图 1 RNA 提取产物电泳分析.

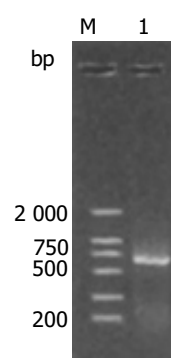


图 2 人 *canstatin* RT-PCR 扩增产物. M: DNA 标准; 1: RT-PCR 扩增产物.

2.2 PCR 产物的克隆及酶切鉴定 纯化的 PCR 产物在连接酶的作用下直接克隆到 pUCm-T 载体中, 经蓝白斑筛选后, 挑选 6 个白色克隆, 小量提取质粒, 分别经 *Bam*HI 和 *Hind*III 做两次单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 其中一个克隆, 经 *Bam*HI 酶切后, 只出现 1 条特异性条带, 位置与酶切前质粒相近, 而经 *Hind*III 酶切后, 出现 2 条特异性条带, 其中 1 条与酶切前质粒位置相近, 另 1 条与目的基因大小基本一致, 证实扩增片段插入该菌落载体中, 且为反向连接(图 3).

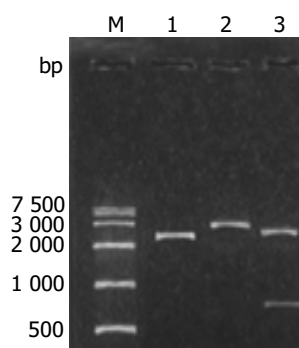


图 3 pUCm-T/*canstatin* 质粒的酶切鉴定. M: DNA 标准; 1: 质粒 pUCm-T/*canstatin*; 2: *Bam*HI 酶切质粒; 3: *Hind*III 酶切质粒.

2.3 人 *canstatin* cDNA 序列分析 挑选阳性克隆, 碱裂解法抽提重组质粒 pUCm-T/*canstatin*. 测序结果显示插入片段为 684 bp, 与 GenBank 中公布的 *canstatin* 基因序列进行匹配, 二者同源性的 100%(图 4, 5).

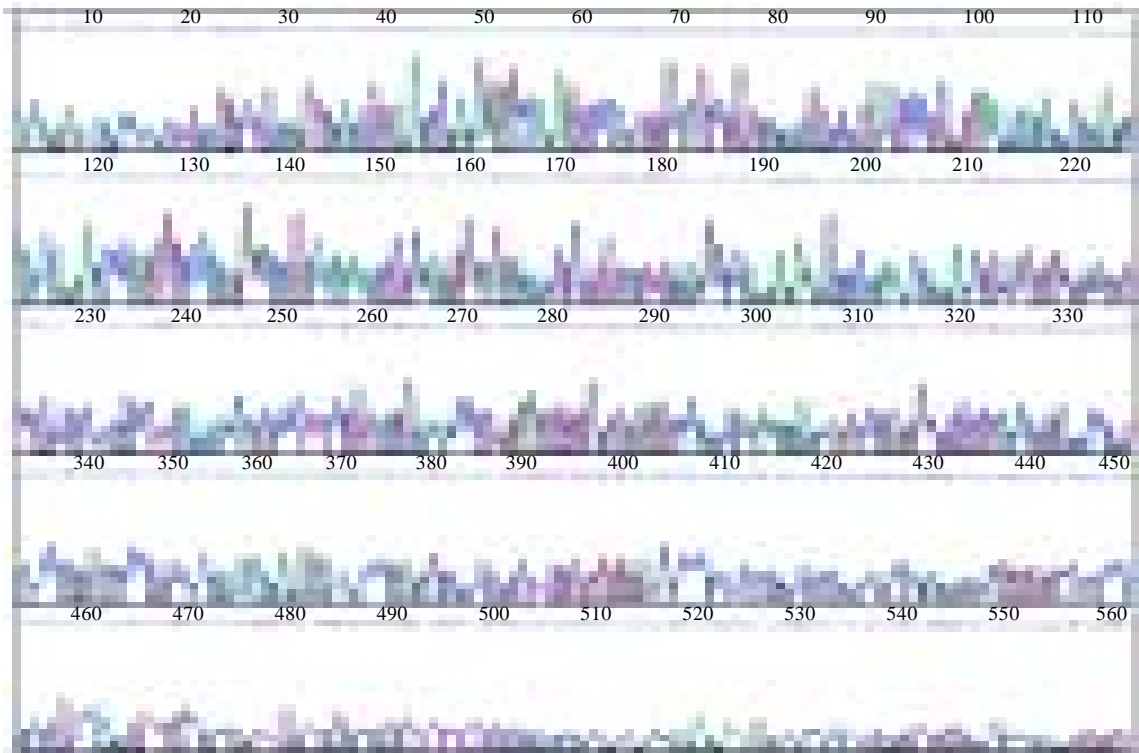


图4 正向引物 M13- 测序结果.

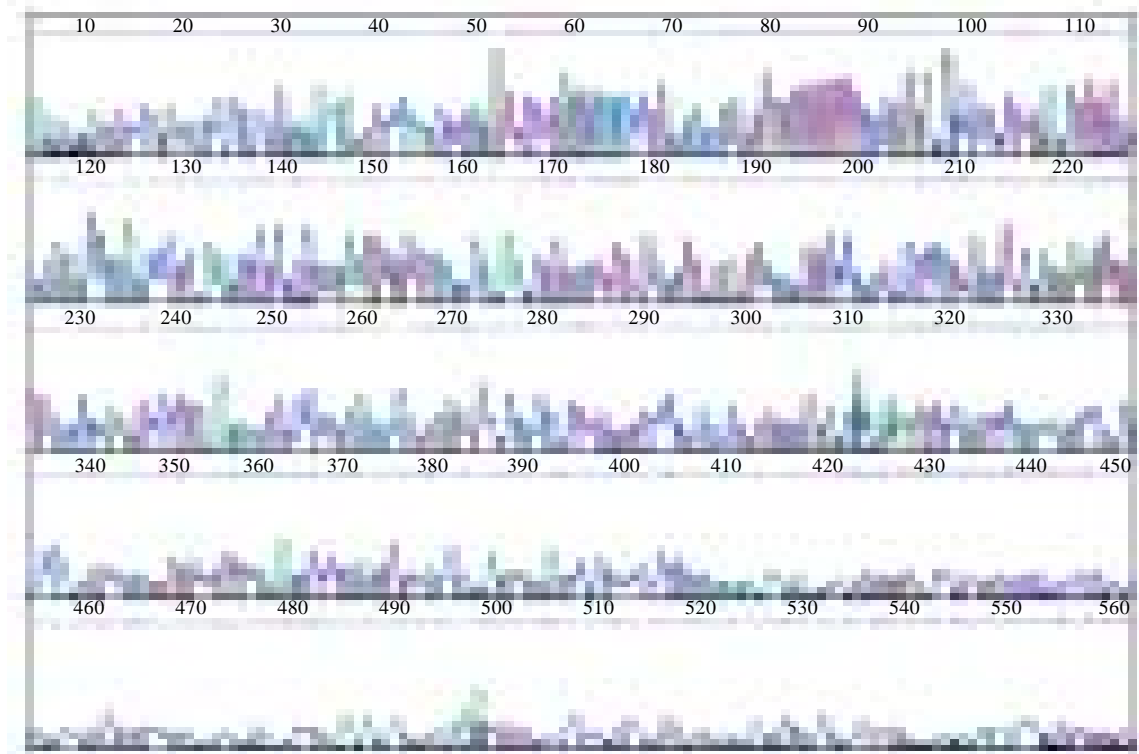


图5 反向引物 T7 测序结果.

3 讨论

随着对肿瘤血管生成分子机制认识的不断深入, 抗血管生成治疗作为肿瘤治疗的新视野, 引起医学界极大的热情和关注. 理论上, 对多数实体瘤, 该方法在多方面优于使用细胞毒药物^[13-14]: 首先是毒性低; 其次肿瘤内血管不成熟, 对药物反应较敏感; 某一根毛细血管塌

陷使血流中断, 可能会产生放大效应; 而且内皮细胞遗传性状稳定, 不同于肿瘤细胞, 产生耐药的机会少. 从 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离得到血管抑素后^[15], 很快又发现了抗血管生成活性更强的内皮抑素^[16-19]. IV 型胶原是血管基底膜的主要成分, 可以促进细胞黏附, 迁移, 分化和生长, 而 IV 型胶原网络的装配及基底膜

的组织主要由IV型胶原C端球形非胶原区(NC1)调控^[20-22]。Canstatin系IV型胶原 $\alpha 2$ 链NC1结构域,是继血管抑素和内皮抑素后新发现的又一内源性血管生成抑制因子。Kamphaus *et al*^[12]发现, canstatin可呈剂量依赖性地抑制体外培养的牛肺主动脉内皮细胞和人脐静脉内皮细胞的增生,而对肾癌细胞,前列腺癌细胞,人肾胚胎细胞等则无增生抑制作用。Canstatin还能抑制内皮细胞的迁移和管状结构的形成,诱导内皮细胞凋亡,抑制新生血管生成。此外, canstatin还抑制大鼠异种移植人前列腺肿瘤的生长,作用强于endostatin。我国学者贺国安 *et al*^[23-25]研究表明, canstatin C端片段能特异性抑制内皮细胞增生,从而抑制血管生成,抑制小鼠体内肿瘤生长,而其N端片段则有诱导内皮细胞凋亡的活性。Canstatin作用机制尚未完全明了, Panka *et al*^[26]研究表明其诱导细胞凋亡作用与抑制Akt磷酸化有关。Canstatin的生物学作用已引起广泛关注,有望成为抗肿瘤新药。

研究表明, RT-PCR中,以靶基因特异序列为反转录引物合成cDNA进行靶基因扩增,比Oligo dT为引物进行扩增有更好的特异性^[27-28]。因此,我们根据GenBank中报告的canstatin序列设计了上下游引物,顺利克隆出目的基因。我们选用pUCm-T作为克隆质粒,因为其具有如下优点: pUCm-T的多克隆位点和 β -半乳糖苷酶阅读框架大大方便了克隆和蓝白斑筛选;同时利用引物和质粒上的BamHI和HindIII酶切位点,通过2次单酶切不仅能做鉴定还可以明确PCR产物在载体上的连接方向;插入的PCR产物可以用M13通用引物和T7启动子引物进行测序。构建好的克隆质粒pUCm-T/canstatin,经酶切鉴定和序列分析测定,均证实克隆成功。Canstatin基因克隆的成功,为进一步深入研究canstatin作用及其机制,开发其临床应用价值奠定了基础。

4 参考文献

- Ranieri G, Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001;1:241-253
- Dudek AZ, Pawlak WZ, Kirstein MN. Molecular targets in the inhibition of angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:527-541
- Fishman M, Antonia S. Novel therapies for renal cell carcinoma-an update. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:593-609
- Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:45-49
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH, Chen ZQ, Meng K. Correlation of CT enhancement, tumor angiogenesis and pathologic grading of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2100-2104
- Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:71-87
- Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, Hornicek FJ. Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:1211-1217
- Camp-Sorrell D. Antiangiogenesis: the fifth cancer treatment modality? *Oncol Nurs Forum* 2003;30:934-944
- Qin RY, Fang RL, Gupta MK, Liu ZR, Wang DY, Chang Q, Chen YB. Alteration of somatostatin receptor subtype 2 gene expression in pancreatic tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:132-135
- Caceres W, Gonzalez S. Angiogenesis and cancer: recent advances. *P R Health Sci J* 2003;22:149-151
- Shimamura M, Nagasawa H, Ashino H, Yamamoto Y, Hazato T, Uto Y, Hori H, Inayama S. A novel hypoxia-dependent 2-nitroimidazole KIN-841 inhibits tumour-specific angiogenesis by blocking production of angiogenic factors. *Br J Cancer* 2003;88:307-313
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000;275:1209-1215
- Kieran MW, Billett A. Antiangiogenesis therapy: current and future agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:835-851
- Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, Herbst RS. Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials. *Br J Cancer* 2003;89:8-14
- Cao Y, Cao R, Veitonmaki N. Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr Med Chem Anti Canc Agents* 2002;2:667-681
- Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:97-107
- Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and Endostatin: Endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:181-190
- Kirsch M, Schackert G, Black PM. Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. *J Neurooncol* 2000;50:173-180
- Ren B, Hoti N, Rabasseda X, Wang YZ, Wu M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:215-224
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 2000;60:2520-2526
- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000;275:21340-21348
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbada S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001;276:15240-15248
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Hu ZS, Wang FY. The C-terminal domain of canstatin suppresses in vivo tumor growth associated with proliferation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:354-360
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Wang FY, Li RF. Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:801-805
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Hu ZS, Gu QL. Expression and purification of the N-domain of human canstatin and its bioactivity. *Shengwu Xue Yu Shengwu Xue Bao* 2003;35:483-487
- Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:37632-37636
- Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interaction between tumor cells and endothelial cells: the "angiogenesis progression" hypothesis. *Eur J Cancer* 1996;32:2438-2450
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumor-genesis. *Cell* 1996;86:353-364