

世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)



14/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 7 月 28 日

第 13 卷

第 14 期

(总第142期)

述 评

- 1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来
1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿

胃 癌

- 1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响
黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众

肝 癌

- 1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓
1663 肝癌组织中TGF- β 1、TGF- β 1R II和NF- κ B的表达
缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春
1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达
吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛
1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义
吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛
1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林
1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达
丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌

病毒性肝炎

- 1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因
张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠
1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛
1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕
1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳

基础研究

- 1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用
路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚
1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进
1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成
1721 ^{103}Pd 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响
何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯

文献综述

- 1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建
1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐
1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣
1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建
1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华
1747 聚乙二醇 α -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江
1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣

研究快报

- 1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏
1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓
1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周
1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋
1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定
温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿
1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛
1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wjgd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

www.wjgnet.com

重组人内皮抑素真核表达载体 pCD-sEndo 的构建和表达

邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林

邵俊伟, 卢绮萍, 广州军区武汉总医院普通外科 湖北省武汉市 430070
刘然义, 黄文林, 中山大学肿瘤研究所 广东省广州市 510060
易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科
湖北省武汉市 430030
邵俊伟, 男, 1970-01-15 生, 湖北省孝感市人, 汉族, 2004 年华中科技大学
同济医学院医学博士毕业, 主治医师, 主要从事肝胆外科治疗和基础研究。
通讯作者: 邵俊伟, 430070, 湖北省武汉市武昌珞狮路 76 号书香门第 801,
广州军区武汉总医院普通外科。sjwsjw555555@yahoo.com
电话: 027-87164789
收稿日期: 2005-05-19 接受日期: 2005-06-08

Construction of recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and its expression in liver cancer cell line SMMC-7721

Jun-Wei Shao, Ran-Yi Liu, Ji-Lin Yi, Ji-Ping Lu, Wen-Lin Huang

Jun-Wei Shao, Ji-Ping Lu, Department of General Surgery, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China
Ran-Yi Liu, Wen-Lin Huang, Institute of Oncology, Zhongshan University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China
Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Jun-Wei Shao, Department of General Surgery, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command of Chinese PLA, 801 Shuxiang Mendi, 76 Wuchang Lushi Road, Wuhan 430070, Hubei Province, China. sjwsjw555555@yahoo.com
Received: 2005-05-19 Accepted: 2005-06-08

Abstract

AIM: To construct the recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and express it in human liver cancer cell line SMMC-7721, and to observe its anti-angiogenesis activity *in vitro*.

METHODS: Human endostatin cDNA containing interleukin-2 (IL-2) secreting peptide was cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.0 to construct recombinant plasmid pCD-sEndo. The plasmid pCD-sEndo was transfected into SMMC-7721 cells by cationic liposome. The positive cell clones were selected by G418 and named SMMC/sEndo. The expression of endostatin protein was analyzed by Western-blot. The activity of endostatin protein in the supernatant of SMMC/sEndo cells was explored by the angiogenesis experiment of chicken chorioallantoic membrane (CAM).

RESULTS: The eukaryotic expression vector pCD-sEndo

was successfully constructed and was confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. The endostatin protein was expressed in the supernatant of SMMC/sEndo cells, about 20 ku in size. No expression of endostatin protein was found in the control cells. There were fewer blood vessels in the CAM treated with endostatin protein, and the blood vessel density markedly decreased. Furthermore, the density decreased with the increase of endostatin protein.

CONCLUSION: The recombinant eukaryotic expression vector is correctly constructed. The human endostatin protein with the activity of anti-angiogenesis can be expressed and secreted in the supernatant of SMMC-7721 cells tranfected with pCD-sEndo.

Key Words: Endostatin; Recombinant eukaryotic expression vector; Liver cancer

Shao JW, Liu RY, Yi JL, Lu JP, Huang WL. Construction of recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and its expression in liver cancer cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(14):1679-1683

摘要

目的: 构建表达人内皮抑素的重组真核表达载体, 并将其转染人肝癌 SMMC-7721 细胞, 观察其体外抑制血管生成的活性。

方法: 将含有 IL-2 分泌肽的人 endostatin 全长 cDNA 插入真核表达载体 pcDNA3.0 产生重组质粒 pCD-sEndo, 利用阳离子脂质体介导将其体外转染人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞, G418 筛选后得到阳性克隆, 并被命名为 SMMC/sEndo, 采用 Western-blot 检测转染细胞上清中 endostatin 蛋白的表达, 鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 血管生成实验检测转染细胞上清中内皮抑素蛋白的生物活性。

结果: 成功构建 endostatin 基因的真核表达质粒 pCD-sEndo 并经酶切和序列测定证实, 通过阳离子脂质体转染 SMMC-7721 细胞, Western-blot 显示转染细胞上清有人 endostatin 蛋白的表达, M_r 20 000, 而转染空质粒对照组未检测到目的蛋白。CAM 实验显示在给予内皮抑素蛋白的鸡胚绒毛膜血管稀疏, 血管密度明显减少, 并且随着蛋白量的增加, 血管减少程度加强。

结论: 重组 endostatin 真核表达质粒构建正确, 转染

SMMC-7721 细胞后可有效表达具有生物学活性的人 endostatin 蛋白并能分泌到细胞外。

关键词: 内皮抑素; 重组真核表达载体; 肝癌

邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林. 重组人内皮抑素真核表达载体 pCD-sEndo 的构建和表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1679-1683 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1679.asp>

0 引言

肿瘤的生长和转移依赖于血管生成, 在缺乏血管供血的条件下, 肿瘤将趋向于休眠状态, 肿瘤细胞发生坏死和凋亡, 这为肿瘤治疗提供了一条新思路^[1]. 目前已发现多种因子具有抑制肿瘤血管生成的活性, 其中内皮抑素(endostatin)效果最为理想^[2-3]. 内皮抑素理化性质活泼, 易变性, 分离提纯过程复杂, 大量获取比较困难, 价格昂贵, 采用基因治疗方法, 在体内直接、持续表达内皮抑素, 可避免其体外失活快和需反复注射的缺点. 我们成功构建了分泌型人内皮抑素的真核表达质粒 pCD-sEndo, 将其转染肝癌细胞系 SMMC-7721, 为肝癌的基因治疗奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 携带人内皮抑素基因的质粒 pGEM-sEndo 由中山大学肿瘤防治中心黄文林教授赠送, 含人 IL-2 信号肽序列, IL-2 信号肽序列加内皮抑素序列 endostatin cDNA 全长为 666 bp, 位于克隆载体 pGEM-T 的 2 个 *Xba*I 酶切位点间; 真核表达载体 pcDNA3.0, 购自 Invitrogen 公司, 其全长 5.4 kb, 含有 CMV 启动子, 多克隆位点, 氨苄青霉素 (Amp^r) 和新霉素 (Neo^r) 抗性基因选择标记; DNA 大量制备纯化试剂盒、限制性内切酶 *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I 和小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP) 及 T4 连接酶, TaqDNA 聚合酶, Oligo(dT), 购自 Promega 公司; 脂质体 Dosper Liposomal Transfection Reagent 购自 Boehringer Mannheim 公司; 兔抗人 endostatin 多克隆抗体购自 Chemicon International 公司, 二抗及其他免疫组织化学试剂购自武汉博士德公司.

1.2 方法 采用互补黏性末端连接构建质粒 pCD-sEndo: pGEM-sEndo 与 pcDNA3.0 经 *Xba*I 酶切、电泳鉴定后, 冻融法凝胶回收 DNA 片段; 线性化真核表达载体 pcDNA3.0 去磷酸化处理; 将 pcDNA3.0 0.1 μg, sEndostatin 片段 0.1 μg, T4DNA 连接酶 2U 混匀后, 置 12-16℃ 保温瓶中温育 16 h, 取连接物 (pCD-sEndo) 5 μL 转化感受态大肠杆菌 DH-5α. 应用 Primer 软件辅助设计 endostatin 基因 PCR 引物 (上海博亚生物技术有限公司合成) 为: Sense: 5'-CGACTTCCAGTGCTTCCAG-3'

(Endo90-108) Antisense: 5'-ACGATGTAGGCGTGATGGC-3' (Endo515-497), 扩增片段约 426 bp, 挑取 LB 培养基中氨苄青霉素筛选的抗性克隆菌落, 加入 500 μL Amp^r LB 培养液中, 培养 3 h, 取出 100 μL 煮沸, 12 000 g 离心 10 min, 取上清作为 PCR 模板, 用 pGEM-sEndo 菌种作为阳性对照, 阴性对照为 DH5α 菌种, 反应体系: 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺) 5.0 μL, 10 μmol/L dNTPs mix 1.0 μL, Sense (10 μmol/L) 2.0 μL, Antisense (10 μmol/L) 2.0 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 MU/L) 0.5 μL, ddH₂O 38.5 μL, 模板 1.0 μL (总共 50.0 μL); PCR 反应条件: 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min. 35 次循环后, 在 72℃ 继续延伸 10 min, 取 PCR 产物 5 μL 于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 挑取经过 PCR 筛选的阳性克隆菌落, 接种培养扩增, 小量抽提重组质粒 pCD-sEndo, 分别与 *Eco*RI、*Xba*I 内切酶混匀后, 置于 37℃ 水浴 3 h, 取各酶切样品 5 μL 在 80V 恒压下电泳 2 h, 紫外灯下观察结果, 用 Olympus 电泳成像系统成像. 将构建的重组质粒 pCD-sEndo 送上海博亚生物技术有限公司, 检测载体 pcDNA3.0 上 2 个多克隆位点之间插入片段序列, 测序引物为 T7 和 Sp6 通用引物.

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由华中科技大学同济医学院免疫学教研室馈赠, 复苏后用 100 mL/L 新生牛血清 RPMI 1640 培养基, 在 37℃ 50 mL/L CO₂ 条件下培养, 培养液中加入青霉素 100 KU/L, 链霉素 100 mg/L, 常规传代. 脂质体 Dosper 介导重组质粒 pCD-sEndo 转染 SMMC-7721 细胞: 参见 Dosper 转染试剂盒制备脂质体 Dosper 和质粒的混合液, 6 孔培养板中每孔接种 3 × 10⁵ 个 SMMC-7721 细胞, 至细胞长满约 50% 左右, 更换细胞培养板中的培养液, 加入脂质体质粒混合液, 37℃ 50 mL/L CO₂ 温育 6 h, 去掉脂质体质粒混合液, 重新加入新鲜培养基 2.5 mL. 抗性克隆细胞筛选: (1) SMMC-7721 细胞培养于 24 孔培养板, 给予 G418 分别用 100、200、300、400、500、600 mg/L 加入, 各浓度 3 复孔, 设正常对照 3 复孔, 以 10-14 d 细胞全部死亡的浓度为 G418 筛选浓度, 结果为 400 mg/L. (2) 转染细胞继续培养 12-36 h, 使转移基因得到表达, 用含 400 mg/L G418 的完全培养基进行加压筛选, 持续培养 14 d 后, 筛选出来的抗性克隆细胞命名为 SMMC/sEndo. 挑取单个阳性克隆, 继续在 G418 抗性培养液内筛选 2 wk, 将筛选转染成功的细胞扩大培养, 待细胞接近汇合时, 换无血清的培养基 2 mL 继续培养 24 h, 收集培养液, 于 4℃ 下, 10 000 g 离心 5 min, 除去死细胞和碎片, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 用离心式超滤浓缩装置 (美国 Millipore 公司) 浓缩, 将转染空质粒的 SMMC-7721 细胞培养上清

同法处理作为对照, 进行 SDS-PAGE 电泳, 利用电转法将蛋白质转到硝酸纤维素膜上, 封闭液处理, 加入兔抗人 endostatin 多抗(用 0.01 mol/L PBS 按 1:200 比例稀释)温育, 用 0.01 mol/L PBS 分别洗膜, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(用 0.01 mol/L PBS 按 1:500 比例稀释)温育, 充分洗膜后, 加入显色液, 避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应, 以 10 g/L BSA 取代一抗作为阴性对照重复实验. 检测转染重组质粒的 SMMC-7721 细胞培养上清对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响: 将 2 d 龄的鸡胚用碘酒和酒精消毒后, 在超净工作台用眼科尖嘴镊小心敲开蛋壳, 用一次性注射器在壳膜下胎盘细胞周围的绒毛尿囊膜中分别注射 0.005, 0.01, 0.02 mg 浓缩后含内皮抑素蛋白的细胞分泌上清, 但不要损坏胎盘细胞, 然后用无菌的保鲜膜覆盖蛋壳缺口, 避免蛋清直接与空气接触, 放入 37℃ 培养箱中培养 4 d, 每 4 h 翻动一次, 5 d 后打开保鲜膜, 扩大蛋壳缺口, 观察鸡胚绒毛膜血管生成情况, 并用彩色相机摄影保存.

2 结果

质粒 pGEM-sEndo 经 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切后, 电泳结果与其基因酶切图谱一致(图1). 将重组质粒 pCD-sEndo 转化大肠杆菌 DH5 α , 取培养细菌裂解上清为模板, 行 PCR 检测, 结果显示菌落 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 皆扩增出与阳性对照相同的约 430 bp 条带, 与实验设计的预期结果一致, 说明菌落 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 皆为转化了 pCD-sEndo 的阳性克隆(图2). 把 PCR 筛选的阳性克隆菌落, 继续接种培养, 重组质粒抽提纯化后经过 *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI* 以及 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切鉴定, *HindIII* 仅切出一约 6.1 kb 片段, *XbaI* 切出 5.4 kb 和 670 bp 2 个片段, 说明阳性克隆中已插入含 IL-2 信号肽序列的 endostatin cDNA 片段(sEndostatin), *EcoRI* 酶切切出 6.0 kb 和 130 bp 2 个片段(130 bp 片段在电泳时看不到), *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切切出 5.4 kb、580 bp、84 bp 和 45 bp 4 个片段(84 bp 和 45 bp 2 个片段在电泳时看不到), 说明 sEndostatin 插入方向正确(图3). 将纯化的重组质粒用 T7 和 Sp6 通用引物检测 pcDNA3.0 载体上的外源插入片段, 测得外源基因插入片段全长 666 bp, 包含人内皮抑素的完整序列和人 IL₂ 信号肽序列, 无任何碱基错配, 证实重组质粒构建正确(图4). 转染内皮抑素基因的 SMMC-7721 细胞上清, 离心过滤后, BCA 比色法检测培养液蛋白浓度为 50 mg/L, 浓缩后行 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测, 结果在转染 endostatin 基因的 SMMC-7721 细胞

培养液上清中可以检测到能与 endostatin 抗体发生特异性抗原抗体反应的条带, M_r 20 000, 与人内皮抑素蛋白分子量一致, 说明转染 endostatin 基因的 SMMC-7721 细胞上清中有目的蛋白的表达(分泌型), 而转染空质粒对照组未检测到目的蛋白(图5). 鸡胚绒毛尿囊膜实验显示在给予内皮抑素蛋白的鸡胚绒毛膜血管稀疏, 血管密度明显减少, 并且随着蛋白量的增加, 血管减少程度加强(图6).

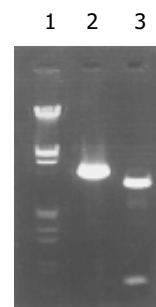


图1 质粒 pGEM-sEndo 酶切鉴定. 1: λ DNA/*HindIII*+*EcoRI* Marker; 2: pGEM-sEndo/*EcoRI*; 3: pGEM-sEndo/*XbaI*.

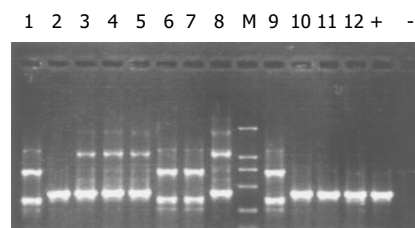


图2 PCR 筛选阳性菌落. M: DL2000 DNA marker; 1-12 为菌落编号; +: 阳性对照; -: 阴性对照.

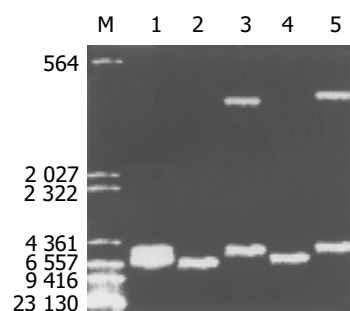


图3 pCD-sEndo 的酶切分析. M: λ -*Hind III*; 1: pcDNA3.0; 2: pCD-sEndo; 3: pCD-sEndo/*XbaI*; 4: pCD-sEndo/*EcoRI*; 5: pCD-sEndo 经 *XbaI* 和 *EcoRI* 双酶切.

3 讨论

研究显示, 在乳腺癌^[4]、前列腺癌^[5]、肺癌^[6-8]、胃癌^[9-10]、宫颈癌^[11]、卵巢癌^[12-13]及头颈部鳞状上皮癌^[14]等患者中其肿瘤的转移率、预后及存活率和肿瘤的血管密度呈正相关. 因此, 抑制血管生成可能是治疗肿瘤的有效方法, 但是一般抗血管形成药物只能使肿瘤生长减缓, 而不能使之完全消除^[15], 从肿瘤组织中

TCTAGATAAGATCCGGCGAAGGAGGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGTCAT
 TGCCTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGGCCACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGT
 GCTCCACCTGGTTGCGCTCAACAGCCCCCTGTGAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGG
 CCGACTTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGCGCC
 TTCTGTCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCATCGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGC
 CGTGCCCATCGTCAACCTCAAGGACGAGCTGCTGTTTCCAGCTGGGAGGCTCTGTCTTC
 AGGCTCTGAGGGTCCGCTGAAGCCCCGGGGCACGCATCTTCTCCTTTGACGGCAAGGACG
 TCCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGTGGCATGGCTCGGACCCCAACGG
 GCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACG
 GGCCAGGCCTCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGAGCTGCC
 ATCACGCCTACATCGTGTCTGCTTGAAGACAGCTTCATGACTGCCTCCAAGTAGGCTA
 GATCCGATCCACCGGATCTAGA

图4 重组质粒测序结果。“—”为人内皮抑素基因序列，“—”为IL₂信号肽序列，“- -”为XbaI位点，“- - -”为EcoRI位点。

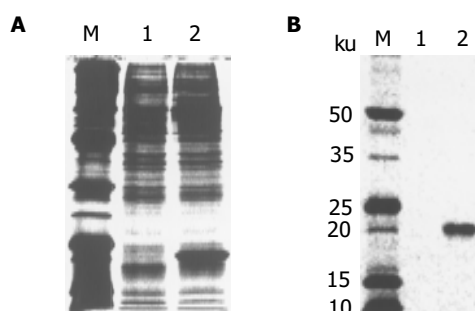


图5 SMMC-7721 细胞培养液上清中endostatin 蛋白检测分析. A: SDS-PAGE; B: Western-blot; M: 分子质量标准; 1: 对照组; 2: 导入endostatin 基因组.

发现的血管形成抑制因子, 包括 angiostatin^[16-17], endostatin^[18], 他们对血管生成抑制作用更强^[19-21]. 内皮抑素为胶原蛋白 XVIII 的C端球形末端部分片段或其类似物^[2-3], 在体外和体内已证实能对多种移植的实体肿瘤及其转移物有完全抑制作用^[22-25], Boehm *et al*^[26]发现在经过6轮重复治疗后, 肿瘤对之仍然敏感, 而且未发现毒性和耐药性. 有报道用病毒载体在小鼠身上可明显抑制肿瘤的生长^[27-30], 然而病毒载体的毒性问题限制了其基因治疗的推广, 用质粒载体可以显著降低毒性. 我们采用分子重组技术, 从质粒 pGEM-sEndo 上切下内皮抑素与人IL₂信号肽序列, 定向插入真核表达载体 pcDNA3.0, 构建人内皮抑素分

泌型真核表达质粒 pCD-sEndo, 通过酶切和测序显示, 其中的Endostatin cDNA序列与已知的人Endostatin cDNA序列完全相同, 全长552 bp, 无任何碱基错配, 融合基因全长666 bp, 读码框架和插入方向完全正确, 保证了表达产物的正确性. 重组质粒具有载体pcDNA 3.0的优点, 具有原核和真核细胞的筛选标志, 便于阳性细胞的筛选, 并且由于携带有人IL₂信号肽序列, 因此转染细胞具有外分泌的功能, 可以成功分泌内皮抑素蛋白到组织中发挥其生物学活性, 插入的片段位于CMV启动子下游, 基因的转录是由CMV启动子启动, CMV启动子转录效率较其他的启动子高, 这也有助于内皮抑素高效的表达. 我们通过阳离子介导内皮抑素基因转染肝癌细胞后, 实验证明在稳定转染endostatin基因的SMMC-7721细胞培养液中Western-blot检测到 M_r 20000的endostatin蛋白, 表明带有IL-2分泌信号肽的内皮抑素基因转染SMMC-7721细胞后, 可以诱导细胞分泌表达内皮抑素蛋白, 并且通过鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验证实了其具有抑制血管生成的活性, 其活性呈剂量依赖关系, 血管内皮抑素只特异性作用于处于增殖状态的新生血管内皮细胞, 而不影响静止的血管内皮细胞及其他正常细胞. 因此重组人血管内皮抑素可有效抑制供肿瘤生长的新生血管, 而对正

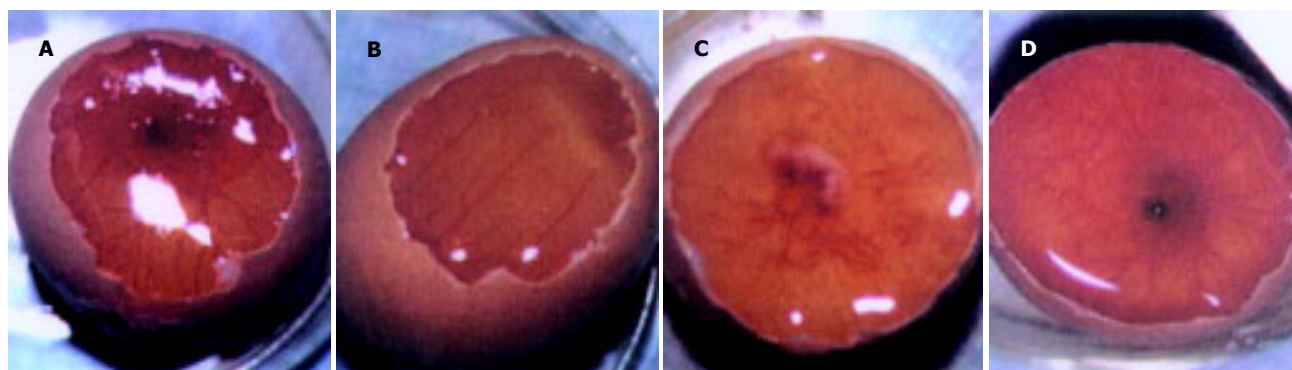


图6 浓缩的细胞上清抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成. A: 5 μ g; B: 10 μ g; C: 20 μ g; D: 对照组.

常组织无作用, 更因血管内皮抑素并不直接作用于肿瘤细胞, 因此不存在形成肿瘤耐药的问题, 本研究为内皮抑素基因治疗实验打下了基础。

4 参考文献

- Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000;79:1-38
- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1998;17:4249-4256
- Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2000;25:97-101
- Cao Y, Paner GP, Kahn LB, Rajan PB. Noninvasive carcinoma of the breast: angiogenesis and cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:893-896
- Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 2000;17:445-451
- Zou D, Shibuya M, Shinoda K, Hibino S, Matsuda K, Takenaka K, Gemma A, Kudoh S. The difference of angiogenesis in human lung adenocarcinoma cell lines with different metastatic potency. *J Nippon Med Sch* 2004;71:181-189
- Kim TE, Murren JR. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: a new target for therapy. *Am J Respir Med* 2002;1:325-38
- Angeletti CA, Lucchi M, Fontanini G, Mussi A, Chella A, Ribecchini A, Vignati S, Bevilacqua G. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2). impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer* 1996;78:409-415
- Wada N, Otani Y, Kubota T, Kimata M, Minagawa A, Yoshimizu N, Kameyama K, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Fujii M, Kumai K, Okada Y, Kitajima M. Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:431-435
- Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-1606
- Terlikowski S, Lenczewski A, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Kulikowski M. Tissue expression of VEGF as a prognostic factor in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;2:112-113
- Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res* 2000;60:2190-2196
- Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken EO, Schuppan D. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:1540-1545
- Shemirani B, Crowe DL. Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. *Oral Oncol* 2000;36:61-66
- Cao Y, Chen C, Weatherbee JA, Tsang M, Folkman J. Gro-beta, a C-X-C-chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp Med* 1995;182:2069-2077
- Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999;340(Pt 1):77-84
- O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 1997;79:273-294
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285
- Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4605-4610
- Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2811-2816
- Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:345-352
- Lee CH, Wu CL, Shiao AL. Endostatin gene therapy delivered by Salmonella choleraesuis in murine tumor models. *J Gene Med* 2004;6:1382-1393
- Kruger EA, Duray PH, Tsokos MG, Venzon DJ, Libutti SK, Dixon SC, Rudek MA, Pluda J, Allegra C, Figg WD. Endostatin inhibits microvessel formation in the ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:183-191
- Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, Singhal A, Sullivan S, Rolland A, Ralston R, Min W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the Endostatin gene. *Nat Biotechnol* 1999;17:343-348
- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721-11726
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407
- Calvo A, Feldman AL, Libutti SK, Green JE. Adenovirus-mediated endostatin delivery results in inhibition of mammary gland tumor growth in C3 (1)/SV40 T-antigen transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:3934-3938
- Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
- Heideman DA, van Beusechem VW, Bloemena E, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Derksen PW, de Bruin M, Witlox MA, Molenaar B, Meijer CJ, Gerritsen WR. Suppression of tumor growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer by adenovirus-mediated expression of NK4. *J Gene Med* 2004;6:317-327
- Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, Bartlett DL, Hwu P, Seth P, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res* 2000;60:1503-1506

编辑 潘伯荣 审读 张海宁