

重组人 kallistatin 蛋白在毕赤酵母中的高效表达及生物活性分析

黄晓平¹, 王晓¹, 董浩¹, 赵小峰¹, 李招发^{1,2}, 王启钊^{1,2}, 许瑞安^{1,2}, 刁勇^{1,2}

1 华侨大学分子药理学研究所, 泉州 362021

2 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021

摘要: 为了研究 kallistatin (Kal) 的生物活性, 本实验构建了可分泌表达 Kal 的毕赤酵母菌株。首先通过 PCR 方法从 pAAV-Kal 中扩增出 Kal cDNA, 并克隆至酵母表达载体 pPIC9, 得到甲醇酵母分泌型表达载体 pPIC9-Kal, 然后将载体线性化并电击转化毕赤酵母 GS115 (his4), 通过 MD 平板筛选出阳性表达菌株。阳性表达菌株在 BMMY 培养基 (pH 7.0) 中 29°C 培养, 经 2% 甲醇诱导表达 96 h, 摇瓶表达量可达 14 mg/L。表达上清经 Phenyl Superose、Heparin Sepharose FF 分离纯化, 目的蛋白纯度达到 98%, 分子量为 58 kDa。生物活性实验显示, 所得到的 Kal 蛋白具有较好的抗氧化活性, 过氧化物酶活性达到 (163±4) U/(mg·min), 可有效降低 H₂O₂ 对 LX-2 细胞的氧化损伤。另外, 重组产生的 Kal 还能抑制 HUVEC 细胞的增殖。本研究首次成功地利用毕赤酵母表达系统分泌表达了有生物活性的 Kal, 为继续开展其抗肿瘤活性奠定了基础。

关键词: kallistatin, 毕赤酵母, 表达, 活性

High level expression of recombinant human kallistatin in *Pichia pastoris* and its bioactivity

Xiaoping Huang¹, Xiao Wang¹, Hao Dong¹, Xiaofeng Zhao¹, Zhaofa Li^{1,2}, Qizhao Wang^{1,2}, Ruian Xu^{1,2}, and Yong Diao^{1,2}

1 Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

2 Molecular Medicine Engineering Research Center of the Ministry of Education, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

Abstract: In order to research the bioactivity of kallistatin (Kal), we obtained the recombinant Kal using *Pichia pastoris* expression system. Kal cDNA was amplified from pAAV-Kal and inserted into pPIC9 vector to generate a recombinant vector of pPIC9-Kal. Then, pPIC9-Kal was linearized and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 (His4) by electroporation. The positive transformants were selected by MD plate and confirmed by PCR. High level of Kal was obtained in BMMY medium (pH 7.0) after 96 hours induction of 29°C and 2% methanol, with the highest yield of 14 mg/L in shake flask culture. Kal protein was purified from the supernatant with Phenyl Superose and Heparin Sepharose FF chromatograph. The recombinant Kal had a molecular

Received: November 3, 2009; **Accepted:** December 25, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA02Z135), National Special Key Program of China (No. 2009ZX09103-643), National Natural Science Foundation of China (No. 30973591).

Corresponding author: Yong Diao. Tel/Fax: +86-595-22692516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA02Z135), 国家科技重大专项课题 (No. 2009ZX09103-643), 国家自然科学基金 (No. 30973591) 资助。

weight of 58 kDa with 98% purity, showing by SDS-PAGE. Moreover, it had a high peroxidase activity (163 ± 4) U/(mg·min), which could protect LX-2 cell against oxidation of H_2O_2 . Recombinant Kal also effectively inhibited HUVEC proliferation. In this report, we successfully established the expression system using *Pichia pastoris* and obtained the bioactive recombinant human Kal. It lays a foundation for its further anti-cancer therapy.

Keywords: kallistatin, *Pichia pastoris*, expression, activity

Kallistatin (Kal) 是由 401 个氨基酸组成、分子量为 58 kDa 的内源性蛋白, 具有多种生物学活性, 如降血压^[1]、舒张血管^[2]、促进血管新生内膜的形成^[3]、抗炎^[4]和抗氧化^[5]等。最近的研究表明, Kal 具有广谱的抗肿瘤活性, 符合抗肿瘤药物应具有多靶点和多信号通路阻断的要求, 值得深入开发。其抗血管生成作用与已上市药物内皮抑素 (Endostatin) 类似, 可以与 VEGF 和 bFGF 等生长因子竞争结合硫酸肝素糖蛋白 (HSPGs) 受体, 因此可阻断这些生长因子引发的血管生成。本课题组发现, 在 Kal 的作用下, 肿瘤细胞中作为细胞增殖的标志物 Ki-67 染色降低, 显示 Kal 可以直接抑制肿瘤细胞增殖^[6]。Kal 可以从不同途径抑制血管生成, 是肿瘤抗血管生成治疗的良好候选者, 又可以直接作用于肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞增殖, 是一种广谱的抗肿瘤内源性因子。

1989 年 Chao 等^[7]首次从人血浆中分离出 Kal 蛋白, 并鉴定其为激肽释放酶 (Kallikrein) 抑制蛋白, 主要功能集中于心血管系统, 如降血压、舒张血管、促进血管新生内膜形成等。1993 年 Chao 等^[8]曾采用大肠杆菌表达 Kal 重组蛋白, 但表达量很低。之后进行的 Kal 的功能研究, 基本上均采用基因转导的方法进行。在最近一篇有关 Kal 抗炎和抗氧化的研究论文中, Chao 等提议应开展 Kal 蛋白的功能研究^[4]。

自从 2002 年 Miao 等^[6]首次报道 Kal 具有抑制新生血管生成, 并抑制肿瘤生长的作用后, 其抗肿瘤活性引起广泛的关注。本课题组采用基因治疗的方法, 进行了大量的 Kal 抗肿瘤作用的研究, 发现 Kal 基因药物具有广谱的抗肿瘤活性, 既可以抑制肿瘤新生血管的形成^[9-10], 又可以直接诱导肿瘤细胞的凋亡, 具有很好的开发前景。但研究采用的方法均为基因治疗手段, 而基因治疗一般需要采用病毒载体, 其长期应用的风险是各国卫生部门重点关注的

问题, 目前尚不明朗, 很难在短期内实现上市并广泛应用于肿瘤病人。而多种重组蛋白药物已广泛地应用于临床, 相关技术比较成熟, 是开发基因重组药物最常规的手段。所以本实验试图建立一种高效生产 Kal 重组蛋白的方法, 研究其蛋白形式对肿瘤的作用, 为新型抗肿瘤药物的开发奠定基础。

本课题组也曾使用 *E. coli* 表达人 Kal 蛋白, 但表达量极低, 且杂蛋白多难以纯化。毕赤酵母表达系统是近年来建立起来的一种真核表达系统, 已成功地表达了大量的重组蛋白^[11], 它既具有原核表达系统繁殖快、操作简单的优点, 同时又具有原核表达系统所没有的优势: 如能对表达的目的蛋白进行正确加工、折叠及适度糖基化, 分泌表达的杂蛋白少, 易于分离纯化等, 因此越来越广泛地用于重组蛋白的表达。国内外文献尚未有利用毕赤酵母表达 Kal 蛋白的报道。本研究利用毕赤酵母表达人 Kal 蛋白, 以克服 *E. coli* 表达人 Kal 蛋白遇到的表达量小、杂蛋白多难以纯化的困难。所表达纯化的人 Kal 蛋白能有效地抑制血管内皮细胞 HUVEC 的增殖, 且表现出很好的过氧化物酶等生物活性, 有望进行深度的抗肿瘤药物开发研究。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 、GS115 (His4)、pPCI9 和 pAAV-Kal 均为本实验室保存。血管内皮细胞 (HUVEC) 购自 ScienCell。T4 DNA 连接酶为 NBI 公司产品。*Xho* I、*Eco*R I、*Stu* I 等内切酶购自大连宝生物公司。凝胶回收试剂盒购自 OMGE 公司。酵母氮基 (含硫酸铵/无氨基酸 Yeast Nitrogen Base) 购自 BD 公司。D-生物素、D-山梨醇 (D-Sorbitol) 购自 Sigma 公司。层析介质 Heparin Sepharose FF、Phenyl Superose 均购自 Amersham Pharmacia Biotech (GE) 公司。鼠抗

人 kallistatin 单抗、山羊抗鼠二抗均购自 Santa Cruz。ELISA 试剂购自 R & D 公司。

1.2 方法

分子生物学操作参见《细胞生物技术实验指南》^[11], 酵母发酵操作参见 Invitrogen 公司的 *Pichia* Fermentation Process Guidelines 操作手册, 纯化介质的使用参见 GE 公司的实验手册。

1.2.1 表达载体 pPIC9-kal 的构建

选用 pAAV-Kal 为模板, 上游引物 HK-F5: 5'-aacctcgagaaaagagatggtgagagttgcagtaacagct-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点) 和下游引物 HK-R5: 5'-ccagaattcctatggtttctggggctgacgacc-3' (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点), 用 Pyrobest DNA 聚合酶, 经 PCR 得到人 Kal 成熟蛋白对应的 DNA。目的片段回收、酶切后插入至 pPIC9 载体的 *Xho* I/*Eco*R I 位点之间。转化后经菌落 PCR、酶切等方法筛选出符合要求的阳性克隆, 委托大连宝生物公司对 pPIC9 中插入的 Kal 基因序列进行测序。

1.2.2 工程菌株的构建与鉴定

pPIC9-Kal 表达载体经 *Stu* I 线性化, 电转化毕赤酵母 GS115 (His4) 宿主菌, 涂布 MD 平板, 菌落 PCR 鉴定。将阳性克隆接种于含有 3 mL BMMY 酵母培养液的试管中, 培养 24 h, 用 2% 甲醇诱导 48 h, ELISA 法测定目的蛋白含量。发酵上清液经 SDS-PAGE 分离后电转至硝酸纤维素膜上, 用封闭液封闭 2 h, 滴加一抗室温孵育 2 h, 洗涤液洗 3 次, 滴加二抗室温孵育 2 h, 洗涤液洗 3 次, 最后使用 BeyoECL 荧光检测试剂检测目的蛋白, X 胶片曝光后显影、定影。

1.2.3 发酵条件的优化

对筛选出的阳性菌株进行发酵培养基、pH、培养时间、甲醇浓度等条件的优化, 以得到摇瓶内最佳发酵工艺, 为在反应器内批量生产奠定条件。

1.2.4 Kal 蛋白的分离纯化

发酵上清液经硫酸铵溶液 (终浓度 1.5 mol/L) 预处理后, 通过疏水作用 (Phenyl Sepharose) 及肝素亲和 (Heparin Sepharose FF) 两步层析得到 Kal 蛋白, SDS-PAGE 电泳检测纯度。

1.2.5 表达产物活性分析

1) Kal 蛋白对血管内皮细胞 HUVEC 增殖的影响: 采用 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 培养 HUVEC 细胞, 待细胞丰度达到 80%, 以 0.25% 胰酶消化, 制备成 1×10^5 细胞/mL 的细胞悬液, 接种至 96 孔板, 100 μ L/孔。贴壁后按照设置的浓度梯度加入 Kal 蛋白, 孵育 48 h 后 MTT 法检测细胞存活率。

2) Kal 蛋白过氧化物酶活性的测定: 利用愈创木酚法测定重组 Kal 蛋白的过氧化物酶活性。将波长 470 nm 处反应体系每分钟吸光值 A 变化 0.01 定义为一个过氧化物酶活性单位 (U/(mg·min))。实验重复 3 次, 得出纯化后的重组 Kal 蛋白过氧化物酶活性。

3) Kal 蛋白抗氧化作用: 利用 H₂O₂ 对 LX-2 细胞的氧化模型来研究 Kal 蛋白抗氧化作用。以 DMEM 培养 LX-2 至丰度达到 80%, 0.25% 胰酶消化, 制备成 1×10^5 细胞/mL 的细胞悬液, 接种至 96 孔板, 每孔 100 μ L。贴壁后按照设置的浓度梯度分别加入 Kal 蛋白和 GSH, 随后加入 H₂O₂ (终浓度为 300 μ mol/L) 氧化刺激, 培养 48 h 后 MTT 法检测细胞存活率。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pPIC9-Kal 的构建与鉴定

PCR 法从 pAAV-Kal 中扩增人 Kal 基因序列, 回收 DNA 片段长度约 1200 bp, 与预计值相符。*Xho* I/*Eco*R I 酶切 PCR 产物与 pPIC9 载体连接并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞; 菌落 PCR、质粒酶切图谱 (图 1) 及测序结果显示 pPIC9-Kal 重组质粒构建成功。

2.2 工程菌株的构建与筛选

pPIC9-Kal 经 *Stu* I 线性化后, 电转化 GS115 (His4) 宿主菌, 涂布 MD 平板, 经菌落 PCR 扩增出 1200 bp 片段的菌落为阳性克隆 (图 2)。阳性克隆按甲醇酵母发酵的常规方法进行发酵。3 个候选克隆的发酵液经 ELISA 法测定, 均检出 Kal 蛋白的表达, 其中 1 个克隆表达水平较高, 其发酵液经 Western blotting 分析, 呈现 Kal 表达阳性结果 (图 3), 而未转化的 GS115/pPIC9 菌落未检出 Kal。

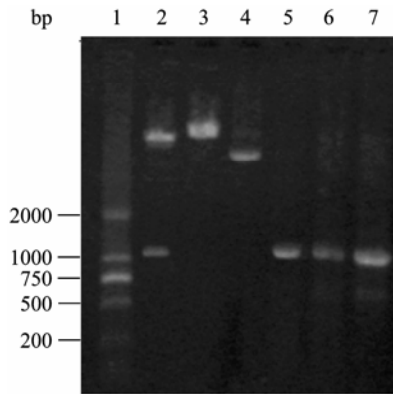


图1 重组表达质粒 pPIC9-Kal 的 PCR 和酶切鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant expression vector pPIC9-Kal by PCR and enzyme digestion. 1: DNA ladder; 2: pPIC9-Kal digested with *EcoRI* and *XhoI*; 3: pPIC9-Kal digested with *EcoRI*; 4: pPIC9-Kal; 5-7: PCR products of pAAV-Kal, *E. coli* DH5 α /pPIC9-Kal, and pPIC9-Kal.

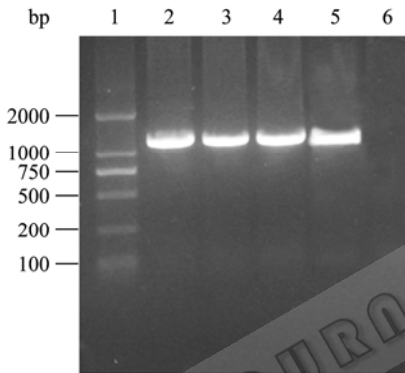


图2 菌落 PCR 法鉴定 GS115 (His4) 阳性转化子
Fig. 2 GS115 (His4) positive transformants identified by PCR. 1: DNA ladder; 2: pAAV-Kal cDNA; 3-5: GS115/pPIC9-Kal cDNA; 6: GS115/pPIC9 cDNA.

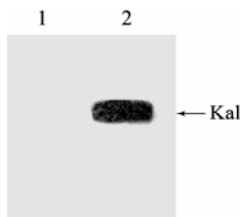


图3 Western blotting 鉴定发酵液中的 Kal 蛋白
Fig. 3 Western blotting analysis of Kal expression in fermentation supernatant. 1: sample from GS115 /pPIC9; 2: sample from GS115/pPIC9-Kal.

2.3 发酵条件的优化

2.3.1 培养基

选取 BMM 和 BMMY 两种常用培养基进行培养, 将培养上清进行电泳分离, BMMY 培养基的上清液可见清晰的 Kal 条带, 而 BMM 培养基的上清

液中 Kal 蛋白条带非常模糊。经 ELISA 测定 BMM、BMMY 培养基中的 Kal 表达水平见表 1。可能由于 BMM 培养基缺少胰蛋白胍和酵母浸膏, 导致水解蛋白酶将诱导表达的 Kal 蛋白水解。

2.3.2 pH 值

选用不同 pH 的 BMMY 培养基进行发酵, ELISA 测得发酵上清液中 Kal 蛋白含量 (表 2)。可见该菌种表达的最佳 pH 值为 7.0。

2.3.3 甲醇浓度

选用不同浓度的甲醇诱导 Kal 蛋白的表达, ELISA 法测得发酵上清液 Kal 蛋白含量 (表 3)。可见诱导 Kal 蛋白表达的最佳甲醇浓度为 2%。

2.3.4 发酵时间

在不同的发酵时间取样, ELISA 法测定发酵上清中 Kal 蛋白含量。随着发酵时间的延长, Kal 的表达逐渐增加, 产物的时间积累效果显著, 在 96 h 达到最高水平 (图 4), 之后上清中杂蛋白条带增多, Kal 蛋白含量降低 (图 5)。

表1 培养基成份对 Kal 蛋白表达量影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Effect of culture medium on the expression of Kal ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Medium	Kal concentration (mg/L)
BMM	4.6 \pm 0.9
BMMY	13.6 \pm 1.2

表2 pH 对 Kal 蛋白表达量影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 Effect of pH on the expression of Kal ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

pH	Kal concentration (mg/L)
5.0	5.4 \pm 0.8
6.0	8.0 \pm 1.2
7.0	14.0 \pm 1.4
8.0	12.2 \pm 0.7

表3 甲醇浓度对 Kal 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 3 Effect of methanol concentration on the expression of Kal ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Methanol concentration (%)	Kal concentration (mg/L)
0.25	1.8 \pm 0.5
0.5	3.5 \pm 0.6
1	9.5 \pm 1.1
2	13.8 \pm 1.1

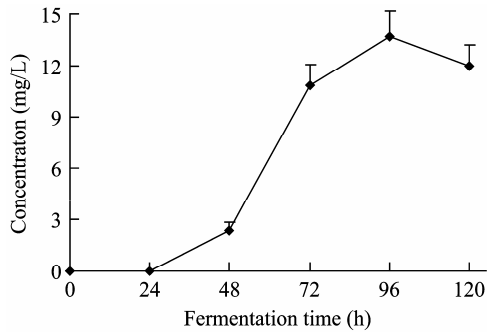


图4 发酵时间对重组 Kal 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effects of fermentation time on the expression of Kal ($\bar{x} \pm s, n=3$).

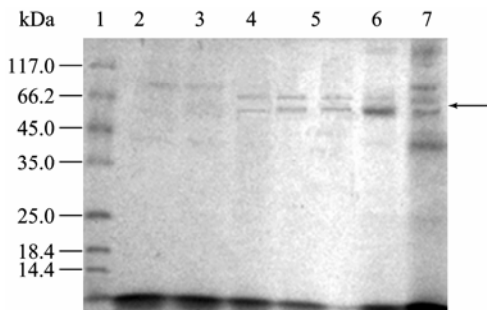


图5 发酵时间对重组 Kal 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effects of fermentation time on the expression of Kal, the arrow indicates the band of Kal. 1: protein marker; 2: GS115/pPIC9 incubated for 96 h; 3-7: GS115/pPIC9-Kal incubated for 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h, respectively.

2.4 Kal 蛋白的纯化条件

Kal 蛋白纯化过程包括发酵上清液的硫酸铵预处理和连续的两步层析: 预处理后的上清液经过 Phenyl Superose 介质疏水层析, 平衡缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mol/L 硫酸铵, pH 6.0, 用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L 硫酸铵, pH 6.0) 洗脱; 洗脱液透析后经过 Heparin Sepharose FF 介质亲和层析, 用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 6.0) 洗脱, 此步洗脱液经过透析后过滤除菌就得到 Kal 蛋白原液。纯化的 Kal 蛋白经 Western blotting 鉴定为阳性, 用 ELISA 测定 Kal 蛋白原液浓度为 0.404 mg/L。通过该纯化工艺, 可以从每升发酵上清中获得 7 mg 纯度大于 98% 的 Kal 蛋白。纯化过程中 Kal 蛋白产物的纯度分析见图 6。

2.5 活性分析

2.5.1 对血管内皮细胞 HUVEC 增殖的影响

将 HUVEC 细胞 (1×10^5 细胞/mL) 接种至 96 孔

板, 每孔 100 μ L, 细胞贴壁后加入重组 Kal 蛋白, 培养 48 h 后 MTT 法检测细胞活性。结果发现, 3 μ mol/L Kal 蛋白组抑制率为 55% \pm 3%, 1.5 μ mol/L Kal 蛋白组抑制率为 25% \pm 3%, 0.75 μ mol/L Kal 蛋白组抑制率为 12% \pm 3%, 表现出量效关系, 阳性对照药内皮抑素 (3 μ mol/L) 抑制率为 35% \pm 4% (图 7)。

2.5.2 过氧化物酶活性

利用愈创木酚法测得纯化后的 Kal 蛋白的过氧化物酶的比活为 (163 \pm 4) U/(mg \cdot min)。

2.5.3 抗氧化作用

将 LX-2 细胞 (1×10^5 细胞/mL) 接种至 96 孔板, 每孔 100 μ L, 贴壁后加入 Kal 蛋白 (终浓度 0.6 μ mol/L 和 0.2 μ mol/L), 阳性对照组加入 GSH (0.6 μ mol/L), 随后加入 H₂O₂ (终浓度 300 μ mol/L)。12 h 后阴性对照组细胞变圆、死亡, 而加入 Kal 蛋白

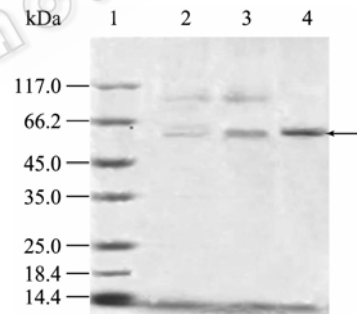


图6 SDS-PAGE 法分析纯化过程中重组 Kal 蛋白的纯度
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of different products from Kal purification process. 1: protein marker; 2: fermentation supernatant of GS115/pPIC9-Kal; 3: purified of Phenyl Superose; 4: purified of Heparin Sepharose FF.

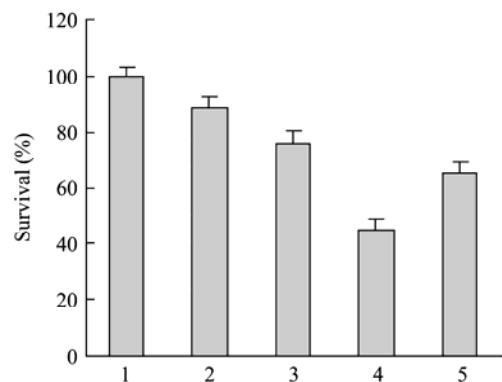


图7 Kal 蛋白对 HUVEC 细胞增殖的影响
Fig. 7 Effects of Kal protein on HUVEC cell proliferation. 1: normal control; 2: 0.6 μ mol/L Kal; 3: 1.5 μ mol/L Kal; 4: 3 μ mol/L Kal; 5: 3 μ mol/L endostatin.

和 GSH 的细胞状态良好。培养 48 h 后经 MTT 法检测, 结果阴性对照组细胞存活率为 $51\% \pm 5\%$, 而加入 $0.6 \mu\text{mol/L}$ Kal 蛋白组细胞存活率为 $102\% \pm 10\%$, 加入 $0.6 \mu\text{mol/L}$ GSH 组细胞存活率为 $85\% \pm 7\%$ (图 8)。

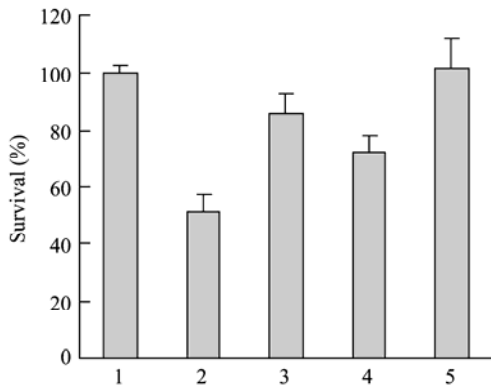


图 8 Kal 蛋白的抗氧化作用

Fig. 8 The antioxidation of Kal protein. 1: normal control; 2: $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; 3: $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 and $0.6 \mu\text{mol/L}$ GSH; 4: $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 and $0.2 \mu\text{mol/L}$ Kal; 5: $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 and $0.6 \mu\text{mol/L}$ Kal.

3 讨论

本实验首次选择毕赤酵母表达系统, 采用廉价的 BMMY 培养基成功分泌表达 Kal 蛋白。由于毕赤酵母自身分泌的蛋白成分少, 下游纯化非常方便, 克服了采用大肠杆菌表达量小、表达后需要经过离心收集菌体和超声破碎细胞才能获得表达蛋白的缺点, 降低了生产成本, 且纯度也可以达到更高。表达上清经疏水和肝素亲和层析即可得到纯度达 98% 的目的蛋白。

本试验得到的 Kal 分子量约为 58 kDa, 与从人血浆中纯化得到的 Kal 蛋白基本吻合, 分子量要比大肠杆菌表达的 Kal 蛋白 (40 kDa) 大。这种差异可能是由于毕赤酵母表达的 Kal 蛋白具有一定程度的糖基化。

本试验初步的活性研究表明 $3 \mu\text{mol/L}$ 重组 Kal 蛋白对血管内皮细胞的增殖作用与内皮抑素类似^[11], 也具有较好的抗氧化活性, 与 Kal 可以抑制 H_2O_2 诱导的胞内过氧化物形成的报道一致^[12]。

肿瘤生长依赖于血管生成, 通过抑制肿瘤血管生成从理论上就能够饿死肿瘤细胞, 并且阻止肿瘤的转移。研究人员建立了一系列模型对饿死肿瘤的假说进行了验证, 并在实验基础上奠定了整个肿瘤

新生血管生成的框架。Kal 可以抑制肿瘤新生血管的形成^[7-8], Kal 不仅可以抑制 VEGF 或 bFGF 诱导的体外培养血管内皮细胞的增殖、迁移和粘附, 还可以抑制小鼠皮下埋植 Matrigel Plug 中经 VEGF 或 bFGF 诱导的毛细血管密度和血红蛋白含量, 是一种极具开发潜力的新型血管生成抑制蛋白, 日益受到药物研究人员的关注。本研究所制备的重组 Kal 蛋白能有效抑制血管内皮细胞的增殖, 表明其具有抑制肿瘤新生血管形成的能力, 而且其活性与已上市药物内皮抑素基本类似。

肿瘤的发生发展都与体内的氧化系统有关, 体内的氧化物质过度积累使细胞膜脂质过氧化而破坏细胞的 DNA 而引起肿瘤的产生。实验证实抗氧化剂对多种肿瘤的生长有抑制作用, 对肿瘤细胞凋亡则有促进作用^[13]。其机制一方面可能是抗氧化剂封闭自由基在肿瘤细胞增殖中的信号传导; 另一方面是它们通过提高非特异免疫增加了 NO 的释放, 因此直接抑制肿瘤细胞的增殖^[14]。本研究首次报道纯化的 Kal 蛋白具有过氧化物酶活性, 可以抑制 H_2O_2 引起的细胞死亡。而 Kal 的转基因表达还可以提高 eNOS 的活性, 从而使 NO 表达水平提高, 且能抑制 NADPH 氧化活性^[12]。这也预示 Kal 的抗氧化作用与其抗炎和抗肿瘤功效密切相关, 是有别于单纯抗肿瘤新生血管生成药物的独特优点, 值得深入研究。

REFERENCES

- [1] Chao J, Chao L, Robert Q, *et al.* Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling. *Bio Chem*, 2001, **382**(1): 15-21.
- [2] Chao J, Chao L, John N, *et al.* Kallistatin is a potent new vasodilator. *J Clin Invest*, 1997, **100**(1): 11-17.
- [3] Miao RQ, Murakami H, Song Q, *et al.* Kallistatin stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration *in vitro* and neointima formation in balloon-injured rat artery. *Circ Res*, 2000, **86**(4): 418-424.
- [4] Chao J, Yin H, Chao L, *et al.* Novel role of kallistatin in protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Hum Gen Ther*, 2006, **17**(12): 1201-1213.
- [5] Shen B, Chao J, Hagiwara M, *et al.* Salutary effect of

- kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. *Hypertension*, 2008, **51**(5): 1358–1365.
- [6] Miao RQ, Agata J, Chao L, *et al.* Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 2002, **100**(9): 3245–3252.
- [7] Wang MY, Day J, Chao L, *et al.* Human kallistatin, a new tissue kallikrein-binding protein: purification and characterization. *Adv Exp Med Biol*, 1989, **247**: 1–8.
- [8] Chai KX, Chen LM, Chao J, *et al.* Kallistatin: a novel human serine proteinase inhibitor. Molecular cloning, tissue distribution and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1993, **268**(32): 24498–24505.
- [9] Diao Y, Ma J, Xiao WD, *et al.* Inhibition of angiogenesis and HCT-116 xenograft tumor growth in mice by kallistatin. *World J Gastroenterol*, 2007, **13**(34): 4615–4619.
- [10] Tse LY, Xu RA, Sun XY, *et al.* Adeno-associated virus-mediated expression of kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas. *J Gene Med*, 2008, **10**(5): 508–517.
- [11] Zhao X, Huo KK, Li YY. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(3): 308–312.
- 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. *生物工程学报*, 2000, **16**(3): 308–312.
- [12] Diao Y, Xu RA. *Protocols of Cellular and Molecular Biotechnology*. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 208–216.
- 刁勇, 许瑞安. *细胞生物技术实验指南*. 北京: 化学工业出版社, 2008: 208–216.
- [13] Ye Q, Qin SK, Yin XJ, *et al.* Effect of Endostar on angiogenesis and inhibition of angiogenesis induced by liver cancer. *China Pres Drug*, 2008, **9**(78): 81–81.
- 叶庆, 秦叔逵, 殷晓进, 等. Endostar 对血管新生和肝癌诱导的血管新生的抑制作用. *中国处方药*, 2008, **9**(78): 81–81.
- [14] Gao L, Yin H, Smith S, *et al.* Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction. *Lab Invest*, 2008, **88**(11): 1157–1166.
- [15] Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(2): 157–170.
- [16] Locigno R, Castronovo V. Reduced glutathione system: role in cancer development, prevention and treatment. *Int J Oncol*, 2001, **19**(2): 221–236.

期刊网

JOURNALS. IM. AC. CN

快 讯

首次不经 iPS 直接将皮肤细胞转化为神经细胞

美国斯坦福大学医学院研究人员 27 日宣布,他们在实验中绕过诱导多功能干细胞(iPS)这一步骤,首次直接将实验鼠皮肤细胞转化为神经细胞。研究人员首先选择了 19 个与细胞重组或神经发展有关的基因,然后利用慢病毒将这些基因植入来自实验鼠胚胎的皮肤细胞中。32 d 后,其中一些皮肤细胞开始向神经细胞转化。研究人员随后筛选出 3 个基因,并再次利用慢病毒将其植入来自成年实验鼠尾部的皮肤细胞。一周内,约 20%的实验鼠皮肤细胞转化为神经细胞。这些神经细胞不但可以表达神经蛋白,而且可与实验室中的其他神经细胞形成突触。这项研究成果 27 日发表在《自然》杂志网络版上。该研究目前尚处于动物研究阶段,不过研究人员已决定将利用人类皮肤细胞开展类似研究。这项成果对理解细胞分化及再生医学研究均具有重要意义。

来源: 新华网