

两个改造后的肿瘤抑素抗肿瘤活性肽活性研究*

王淑静^{1,2,3)} 刘兴汉^{3)**} 季宇彬¹⁾ 陈 宁¹⁾

¹⁾ 哈尔滨商业大学药物研究所, 哈尔滨 150076; ²⁾ 东北农业大学兽医学博士后流动站, 哈尔滨 150030;

³⁾ 黑龙江省生物医药工程重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 哈尔滨 150081)

摘要 为了研究改造后的肿瘤抑素 2 个抗肿瘤活性肽的作用机制, 明确其不同的抗肿瘤活性, 采用基因工程技术原理, 人工合成肿瘤抑素中 185~203 位氨基酸所对应的 19 肽和 T7 肽 (74~98 位氨基酸) 基础上改造的 21 肽碱基序列, 将其与融合蛋白表达载体 pTYB2 重组后转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 用几丁质亲和层析柱一步纯化, 直接获得 19 肽和 21 肽, 利用 MTT 法、细胞生长曲线、TUNEL 法、流式细胞仪早期细胞凋亡检测和细胞周期检测, 小鼠 H22 腹水型转移型肝癌实体瘤抑瘤实验并结合组织病理学切片, 来研究 19 肽和 21 肽单独应用或联合应用对肿瘤细胞和内皮细胞生长和凋亡的影响以及对体内肿瘤的抑制情况。体内外实验表明: 获得的 19 肽抗肿瘤活性以直接作用肿瘤细胞为主, 也有抑制新生血管生成的作用。基因重组 21 肽抗肿瘤作用是通过抑制肿瘤组织新生血管生成实现的。19 肽、21 肽联合应用对肿瘤细胞、内皮细胞生长抑制和促凋亡作用明显增强, 抗肿瘤活性大大提高。联合用药弥补了单独用药不足, 产生协同抗肿瘤作用, 可能会成为今后肿瘤治疗的一个主要方向。

关键词 肿瘤抑素, 蛋白质表达, 细胞增殖, 细胞凋亡, 肿瘤治疗

学科分类号 Q78, Q25

肿瘤抑素(tumstatin)是胶原蛋白 IV α_3 链的非胶原区, 在 20 世纪 80 年代作为肺-肾出血综合症的自身抗原被发现^[1]。2000 年, Kamphaus 及其同伴发现它有 2 个不同的抗肿瘤活性区, 分别执行直接和间接抗肿瘤作用^[2]。一个是具有直接抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡作用的 185~203 位氨基酸组成的 19 肽。另一个是具有抑制肿瘤血管生长、间接抑制肿瘤生长作用的 T7 肽 (74~98 位氨基酸)。目前, 肿瘤抑素因其双重的抗肿瘤作用而受到人们的普遍关注^[3]。但肿瘤抑素的分子质量较大 (28 ku), 而且本身还含有肺-肾出血综合症的自身抗原, 对机体会产生一定的副作用, 同时研究表明, 19 肽作为肿瘤抑素整体的一部分时, 并不显示其抗肿瘤细胞增殖的功能, 可能是此活性区域被掩盖, 阻碍与受体结合, 影响功能的发挥^[4]。因此, 为了获得分子质量小、可溶性高、提取方便、使用安全的抗肿瘤活性肽, 我们对肿瘤抑素的结构进行改造, 通过基因工程技术获得了肿瘤抑素 19 肽和在 T7 肽基础上改造的 21 肽, 为了进一步明确 2 种小肽对肿瘤细胞和内皮细胞生长和凋亡影响、2 种小肽抗肿瘤作用机制, 我们对 2 种小肽进行单独和联合

应用抗肿瘤和抗血管生成活性比较, 研究发现, 19 肽和 21 肽同时具有不同程度的抗肿瘤细胞和内皮细胞生长的双重作用, 而且联合应用抑制肿瘤生长和血管生成的作用更强, 两者对肿瘤治疗具有协同作用。通过对 19 肽、21 肽抗肿瘤活性的比较研究, 我们对肿瘤抑素的作用机制有了新的了解, 为肿瘤治疗药物进一步开发应用、肿瘤的临床治疗提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒. 大肠杆菌 JM109 和 BL-21 (DE3) 购自 Promaga 公司, pTYB2 载体购自 NEB 公司。

1.1.2 细胞和动物. 小鼠 H22 肝癌细胞由哈尔滨医科大学免疫教研室提供, 人脐静脉内皮细胞、人

* 国家自然科学基金资助项目(30472035), 黑龙江省自然科学基金资助项目(TD2005-21)和黑龙江省教育厅自然科学基金资助项目(11511104)。

** 通讯联系人. Tel: 0451-86676570, E-mail: lxlxhs@163.com

收稿日期: 2007-03-09, 接受日期: 2007-09-07

宫颈癌细胞由哈尔滨医科大学生化教研室提供。昆明小鼠购自哈尔滨医科大学附属三院。

1.1.3 试剂及试剂盒. 限制性内切酶 *Nde* I、*Sma* I、*Xho* I、几丁质亲和层析树脂购自 NEB 公司; T4DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Promaga 公司; DNA 分子质量标准、蛋白质分子质量标准、考马斯亮蓝 G250、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、二硫苏糖醇 (DTT) 为 TakaRa 公司产品; RPMI1640 细胞培养基、胰酶、DMSO、MTT、台盼蓝购自 Sigma 公司; 胎牛血清购自灏洋生物公司。

1.2 方法

1.2.1 19 肽和 21 肽基因的设计合成. 根据 GenBank 中肿瘤抑素 (tumstatin) 185~203 位氨基酸和 75~95 位氨基酸所对应的碱基序列, 采用大肠杆菌偏爱密码子, 分别设计肿瘤抑素 19 肽和 21 肽的碱基序列, 同时 5' 端加上 *Nde* I 限制酶酶切产生的粘端 TATG, 内含翻译的起始密码。3' 端为平端和融合蛋白载体 pTYB2 所含有的内含肽基因的 5' 端连接。具体序列如下, 19 肽和 21 肽基因由上海生物工程公司合成。

19 肽基因: 5' T ATG GCT AGC CCT TTC CTA GAA TGT CAT GGA AGA GGA ACG TGC AAC TAC TAC TCA AAC TCC 3'; 3' AC CGA TCG GGA AAG GAT CTT ACA GTA CCT TCT CCT TGC ACG TTG ATG ATG AGT TTG AGG 5'。21 肽基因: 5' T ATG CCG TTC TTA TTC TGC AAT GTT AAC GAT GTA TGC AAC TTC GCA TCT CGT AAT GAT TAC TCC 3'; 3' AC GGC AAG AAT AAG ACG TTA CAA TTG CTA CAT ACG TTG AAG CGT AGA GCA TTA CTA ATG AGG 5'。

1.2.2 19 肽和 21 肽基因工程菌的构建以及蛋白质表达、纯化. 合成的 19 肽基因和 21 肽基因经过磷酸化、退火成为双链后, 分别与用 *Nde* I 和 *Sma* I 限制酶酶切载体 pTYB2 进行重组, 转化到大肠杆菌 JM109 中, 经 *Xho* I 限制酶酶切验证和基因测序验证后, 再将 19 肽基因和 21 肽基因重组质粒分别转化到大肠杆菌 BL-21 (DE3) 中, 0.1 mmol/L IPTG, 28℃ 诱导表达 6 h 后, 取菌体沉淀进行裂解、超声后用几丁质亲和层析柱进行 19 肽和 21 肽的纯化, 具体方法参照以往发表的文獻[5, 6]。

1.2.3 MTT 比色实验. 分别取经过 RPMI 1640 培养基培养的生长状态良好的人脐静脉内皮细胞、人

宫颈癌细胞, 0.25% 胰酶溶液消化, 培养终止后, 用细胞计数板调整细胞密度为 5×10^4 个/ml, 每孔 100 μ l 加入 96 孔板, 待细胞培养 24 h 贴壁后加入不同浓度 19 肽、21 肽及 19 肽和 21 肽浓度的半量。每个浓度设定 4 个复孔。19 肽和 21 肽的终浓度梯度为 15 mg/L, 30 mg/L, 45 mg/L, 60 mg/L。联合用药组浓度取 19 肽和 21 肽浓度的半量。继续培养 48 h 后, 于每孔加入 5 g/L MTT 20 μ l, 4 h 后弃培养液, 加入 100 μ l DMSO, 将培养板振荡 10~20 min。酶联仪测定吸光度, 做出细胞抑制率-浓度曲线, 计算 3 种用药方式对不同细胞的细胞生长半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.2.4 生长曲线. 分别取生长状态良好的人脐静脉内皮细胞、人宫颈癌细胞, 采用常规方法消化细胞, 制备成细胞悬液。计数, 调整其浓度至 5×10^4 个/ml。在 24 孔板各孔中准确接种 400 μ l 细胞悬液, 继续培养 24 h。吸弃培养液, 向各孔重新加入 400 μ l 培养液。19 肽和 21 肽实验组各孔分别加入终浓度为 44 mg/L 的 19 肽和 21 肽, 联合组加入 19 肽与 21 肽半量 (终浓度为 22 mg/L 的 19 肽和 22 mg/L 的 21 肽)。对照组各孔加入同等体积的 PBS, 每组每天取 3 个孔计数, 测出每孔中的细胞浓度, 求出平均值, 持续计数 6 天, 绘制生长曲线。

1.2.5 凋亡细胞原位末端标记试验 (TUNEL). 分别取生长状态良好的人宫颈癌细胞, 人脐静脉内皮细胞, 采用一般方法消化细胞, 制备成细胞悬液。计数, 调整其浓度至 5×10^4 个/ml。将处理好的盖玻片放入 6 孔板各孔中。在 6 孔板各孔中准确接种 1 ml 细胞悬液, 继续培养 24 h。19 肽、21 肽实验组各孔分别加入终浓度为 44 mg/L 的 19 肽、21 肽, 联合应用组同时加入 19 肽和 21 肽使其终浓度都达到 44 mg/L, 对照组各孔加入同等体积的 PBS, 继续培养 24 h。上述片子经空气干燥后, 用新制备的 4% 多聚甲醛溶液固定 20~30 min。内源性过氧化物酶阻断和细胞通透后, 加 50 μ l TUNEL 反应混合液标记, 荧光显微镜下分析结果。然后再加入 50 μ l 的转化剂 PDB 和 50~100 μ l DAB 底物溶液, 冲洗, 封片, 在光镜下分析结果。同时将每种细胞在光镜下取 10 个视野进行凋亡细胞计数, 得到不同药物下的肿瘤细胞及内皮细胞的凋亡率, 进行比较分析。

1.2.6 流式细胞仪检测。

a. 早期凋亡检测。分别将培养瓶培养、生长状态良好的人脐静脉内皮细胞、人宫颈癌细胞分为 4

组, 19肽、21肽实验组分别加入19肽、21肽, 使其终浓度为44 mg/L, 联合应用组同时加入19肽和21肽使其终浓度都达到44 mg/L, 对照组加入同等体积的PBS, 37℃ 培养24 h, 将正常组和加药组的细胞用0.25%的胰酶消化, 调整细胞数量为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$. 按照Annexin V -FITC Apoptosis Detection Kit 1试剂盒进行操作, 用流式细胞仪进行细胞早期凋亡检测.

b. 细胞周期试验. 分别将培养瓶培养、生长状态良好的人脐静脉内皮细胞、人宫颈癌细胞分为4组, 19肽、21肽实验组分别加入19肽、21肽, 使其终浓度为44 mg/L; 联合应用组同时加入19肽和21肽使其终浓度都达到44 mg/L; 对照组加入同等体积的PBS. 37℃ 培养24 h后, 将正常组和加药组的细胞用PBS洗2次, 去除坏死细胞和凋亡细胞碎片, 0.25%的胰酶消化, 制成单细胞悬液, 1 000 g 离心 10 min, 弃上清, PBS洗2次, 每管加入1~1.5 ml 70%的冰乙醇, 使每个样品的细胞浓度至少为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$, 轻轻混匀, 使之呈单细胞悬液, 4℃固定24 h. 用Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit进行流式细胞仪检测不同周期细胞所占的比率.

1.2.7 透射电镜观察. 分别将培养瓶培养、生长状态良好的人脐静脉内皮细胞、人宫颈癌细胞分为4组, 19肽、21肽实验组分别加入19肽、21肽, 使其终浓度为44 mg/L, 联合应用组同时加入19肽和

21肽使其终浓度都达到44 mg/L, 对照组加入同等体积的PBS, 继续培养24 h. 将对照组和加药组的细胞0.25%的胰酶消化, PBS洗涤, 戊二醛4℃ 固定 24 h, 经过包埋、固定、制成超薄切片(50~80 nm)后进行透射电镜观察.

1.2.8 动物活性检测. 将建立的小鼠腹水转移型肝癌模型、体重在18~22 g的48只雄性昆明小鼠随机分成4组: 对照组, 19肽组, 21肽组, 联合用药组. 待到小鼠皮下可触及到皮下结节时开始给药. 对照组: 100 μ l 生理盐水; 19肽组: 4.88 μ g/kg的19肽, 21肽组: 1.48 μ g / kg的21肽, 联合用药组: 4.88 μ g/kg的19肽和1.48 μ g/kg的21肽. 每日注射一次, 连续给药7天后, 每组随机处死6只小鼠, 称其瘤重并进行统计学分析. 同时将上述处死小鼠的肿瘤切成组织块, 经固定、包埋、切片、H.E 染色后, 电子显微镜观察, 进行病理学分析.

2 结 果

2.1 19肽和21肽基因的克隆、表达及蛋白质纯化

19肽和21肽基因与载体pTYB2重组后经酶切验证和基因测序后, 结果与设计的完全一致(图1, 2), 19肽和21肽重组质粒在大肠杆菌BL21(DE3)中进行诱导, 表达后经丁基亲和层析柱一步亲和层析, 就可得到19肽和21肽, 经高效液相检测纯度可达90%以上, 再经透析后进行相应的活性检测. 具体结果参照以往文献报道^[6].

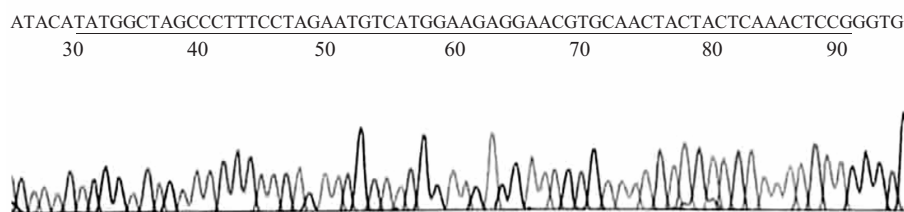


Fig. 1 The local sequencing result of recombinant plasmid pTYB2-19 peptide

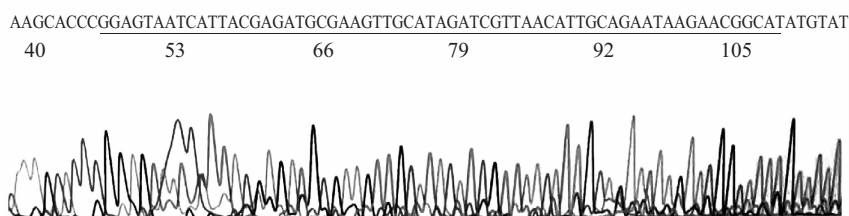


Fig. 2 The local sequencing result of recombinant plasmid pTYB2-21 peptide

2.2 细胞活性检测

2.2.1 MTT比色实验. 根据存活率-浓度曲线, 19肽、21肽和半量联合应用组对人宫颈癌细胞和内皮细胞都具有增殖抑制作用, 随着药物浓度增加抑制作用增强, 呈剂量依赖性, 应用线性回归分析计算出不同药物作用不同细胞所得到细胞生长半数抑制浓度(IC50). 由表1可以得出, 19肽对肿瘤细胞的抑制作用较强, 而21肽对内皮细胞的抑制作用较强, 半量联合应用对肿瘤细胞和内皮细胞的抑制作用接近.

Table 1 MTT assay for 19peptide, 21peptide, 19 + 21peptide/2 effect on 50% inhibitory concentration (IC50) of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human cervical carcinoma cell (HeLa)

	mg/L		
	19 peptide	21 peptide	19+21peptide/2
HUVEC	43.75	37.50	46.25
HeLa	37.42	57.54	47.63

2.2.2 生长曲线. 与对照组相比, 19肽、21肽、19肽与21肽半量联合用药对人宫颈癌细胞、人脐静脉内皮细胞均有抑制作用. 但比较来说, 19肽对宫颈癌细胞的抑制作用强于内皮细胞, 宫颈癌细胞在19肽用药后的第3天就无法计数, 而21肽仅引起宫颈癌细胞数目的降低. 对内皮细胞而言, 21肽对内皮

细胞作用远远强于19肽. 半量联合应用组对于肿瘤细胞和内皮细胞的作用介于19肽和21肽之间(图3).

2.2.3 细胞凋亡原位末端标记检测(TUNEL法). 对人宫颈癌细胞来说, 荧光显微镜下21肽仅显示较弱的荧光, 凋亡细胞较少, 电镜下偶见染上棕色的细胞, 细胞凋亡率(9.52±2.34)%. 19肽及联合用药组有大量的强荧光, 光镜下可见有较大量的染色细胞, 凋亡细胞较多. 联合用药组较19肽组更强, 细胞凋亡率分别为(34.62±4.74)%和(23.34±5.67)%. 对内皮细胞而言, 19肽与21肽对内皮细胞形态改变不明显, 二者荧光强度都较弱, 联合用药组绿色荧光较前两组强, 凋亡细胞较多, 细胞形态改变较明显(图4).

2.2.4 流式细胞仪早期凋亡检测. 19肽、21肽以及联合用药作用的人宫颈癌细胞均出现细胞凋亡, 细胞凋亡率分别为(3.01±0.88)%, (1.78±0.56)%, (37.27±2.03)%, 19肽和联合用药作用较21肽强, 联合用药作用更明显. 对人内皮细胞而言, 3种用药虽然与对照组比较都有一定的细胞凋亡, 但凋亡率较低分别为(1.67±0.39)%, (1.44±0.29)%, (4.09±0.32)%, 联合用药作用较前两者强(图5).

2.2.5 流式细胞仪细胞周期检测. 对于宫颈癌细胞来说, 19肽组、21肽组及联合用药组G0-G1期细胞所占的比例明显增多, 而S期细胞数量减少(P<0.05), 具有较明显的细胞阻滞作用, 其中联合作用细胞阻滞作用较强. 同时, 3种用药还可引起宫颈癌细胞不同程度的细胞凋亡. 19肽和联合用药引起细胞凋亡较明显, 细胞凋亡率分别为(8.97±1.67)%、(19.27±2.18)%. 21肽对宫颈癌细胞的凋亡影响较弱, 细胞凋亡率为(3.57±1.57)%. 19肽、21肽组对内皮细胞影响较少, 仅联合应用组有明显的细胞G0/G1阻滞现象, 3个实验组均未发现凋亡细胞(表2).

2.2.6 透射电镜下细胞凋亡的形态学观察. 19肽与联合用药对人宫颈癌细胞影响较大, 加药24 h后, 19肽组大量细胞开始出现凋亡的特征性形态改变, 一些细胞出现核崩解或细胞完全崩解, 但膜结构完好. 联合组出现中、晚期凋亡细胞和大量坏死细胞. 21肽组只是少量细胞的细胞器形态发生改变, 个别细胞出现早期凋亡的形态学特征. 19肽与21肽对内皮细胞的影响相差不多, 细胞体积变小, 21肽组将近1/3的细胞有细胞器的改变, 出现细胞早期凋亡的形态特征. 联合组凋亡细胞较多, 有凋亡小体的脱落和细胞器形态改变(图6).

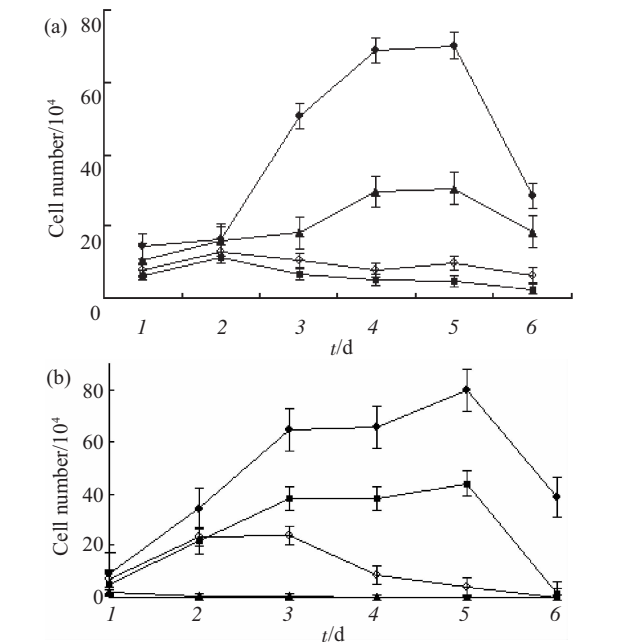


Fig. 3 The growth curve of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human cervical carcinoma cell (HeLa)

(a) Growth curve of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). (b) Growth curve of human cervical carcinoma cell (HeLa). ◆—◆: Control; ▲—▲: 19peptide; ■—■: 21peptide; ◇—◇: 19+21peptide/2.

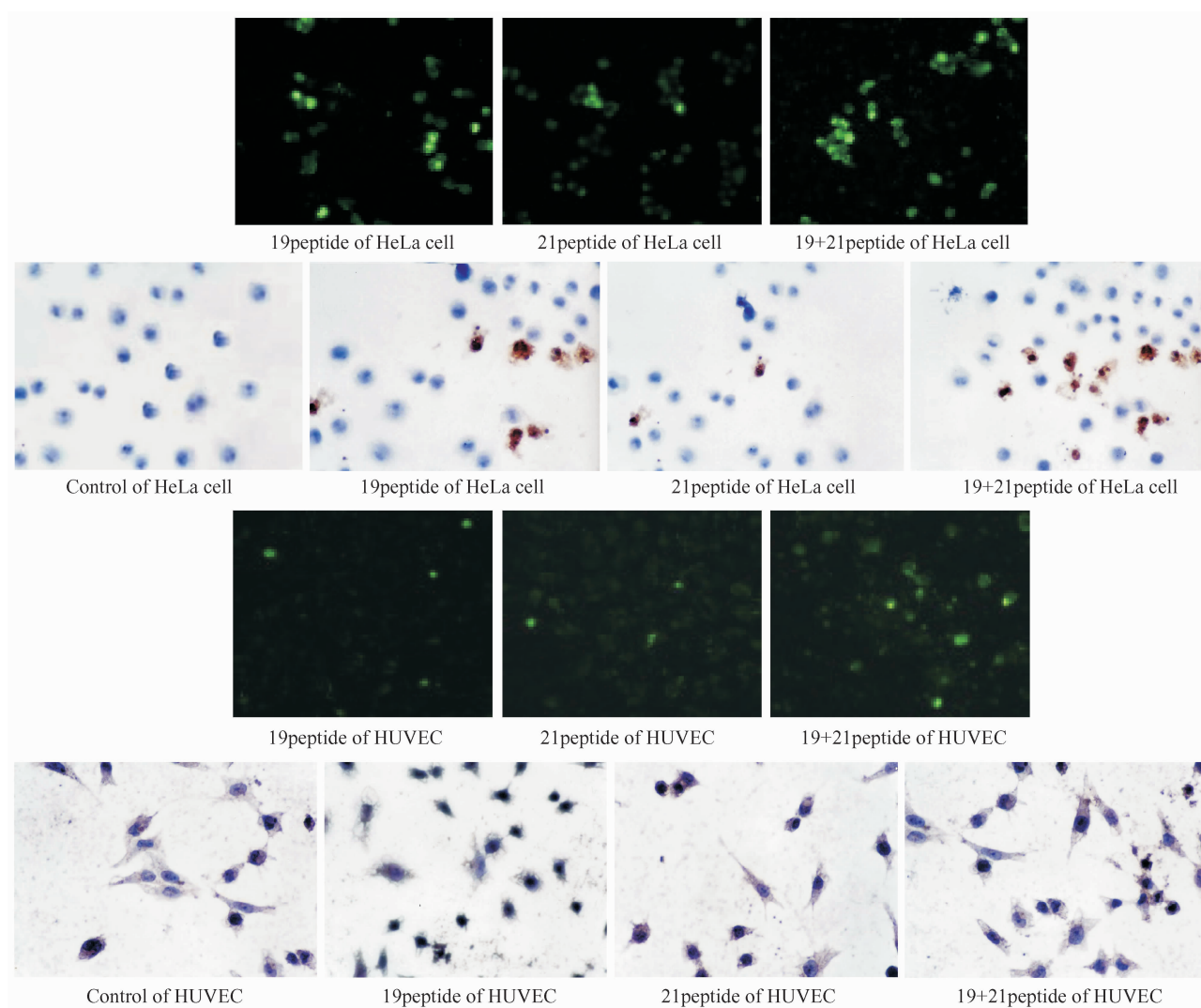


Fig. 4 The result of TUNEL assay of HeLa cell and HUVEC cell

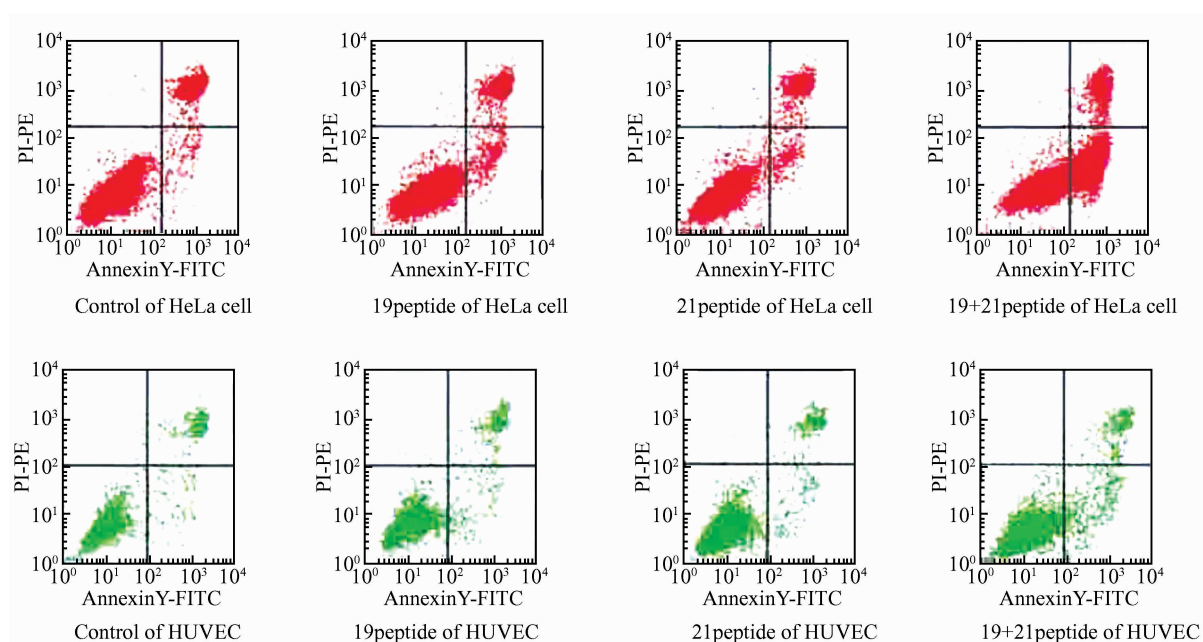


Fig.5 The result of early apoptosis (FAC) of HeLa cell and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)

Table 2 The effect of 19peptide,21peptide,19+21peptide on cell circle progression (FAC) of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human cervical carcinoma cell (HeLa)

		G0-G1	G2-M	S
HeLa cell	Control	58.25±1.95 *	19.65±1.93	22.11±0.61 *
	19peptide	67.22±1.59 *	16.69±1.39	16.73±1.31 *
	21peptide	69.46±0.85 *	15.89±1.41	15.15±0.94 *
	19+21peptide	78.24±5.28 *	11.94±1.51	9.46±1.71 *
HUVEC	Control	57.43±4.20	34.62±2.97	7.95±1.65
	19peptide	58.97±3.37	33.23±3.18	7.79±1.41
	21peptide	59.72±4.66	33.08±3.11	7.20±1.85
	19+21peptide	72.10±4.11	21.07±4.70 *	6.82±1.39

$\bar{x} \pm s=3.$ * $P<0.05$.

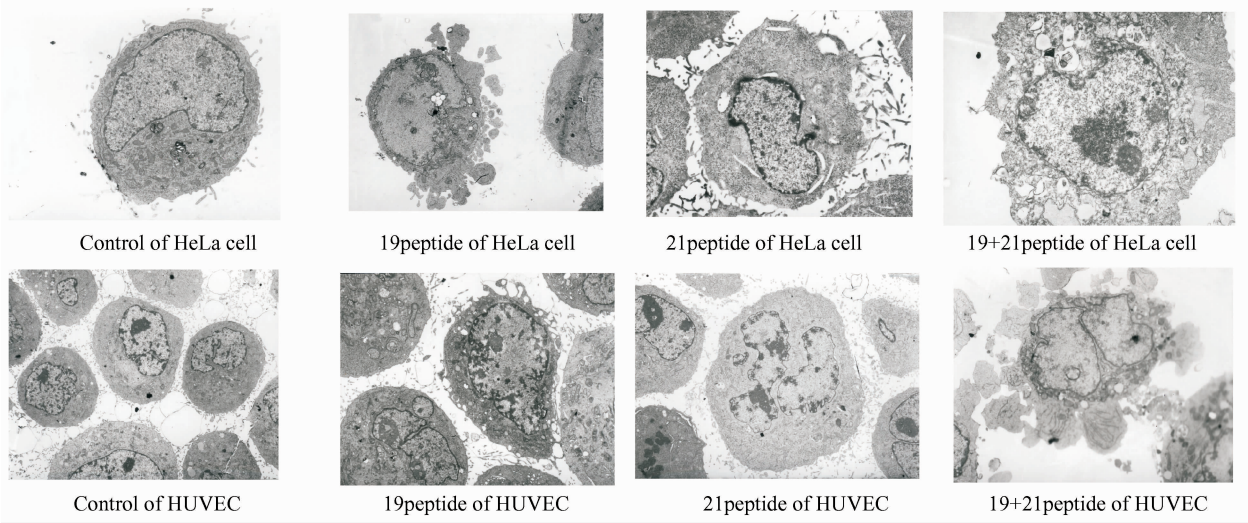


Fig. 6 The result of morphology observation (TEM) of HeLa cell and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)

2.3 动物活性检测

2.3.1 小鼠肿瘤抑制实验. 用药后对照组与实验组小鼠肿瘤继续生长, 但实验组肿瘤明显小于对照组. 经t检验, 19肽组, 21肽组与对照组比较差异

显著, $P<0.05$, 联合组与对照组比较差异显著, $P<0.01$. 联合用药组的抑瘤率高于19肽、21肽单独用药组 (表3).

Table 3 The effect of 19peptide,21peptide,19+21peptide on tumor weight of H22 murine ascitic fluid transfevent hepatoma

	Dose /(mg•kg ⁻¹)	Tumor weight WT / g	Inhibition rate IR / %
Control	0.2ml	2.51±0.62	
19peptide	4.88	1.30±0.51*	48.46
21peptide	1.48	1.44±0.61*	42.86
19+21peptide	4.88(19peptide)+1.48(21peptide)	1.16±0.72**	53.94

$\bar{x} \pm s, n=12.$ * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.3.2 小鼠肿瘤病理组织切片($\times 20$). 对照组血管丰富, 数量较多; 肝癌细胞长势良好, 组织无坏死. 19肽组血管数量较少, 仅有一处视野可见血管; 肿瘤组织出现大量坏死. 21肽组血管数量更

少, 仅一处视野下可见少量新生血管; 坏死灶面积较大. 联合组血管数量最少, 整个视野仅见3条血管. 肿瘤组织的坏死面积明显大于前几组(图7, 8).

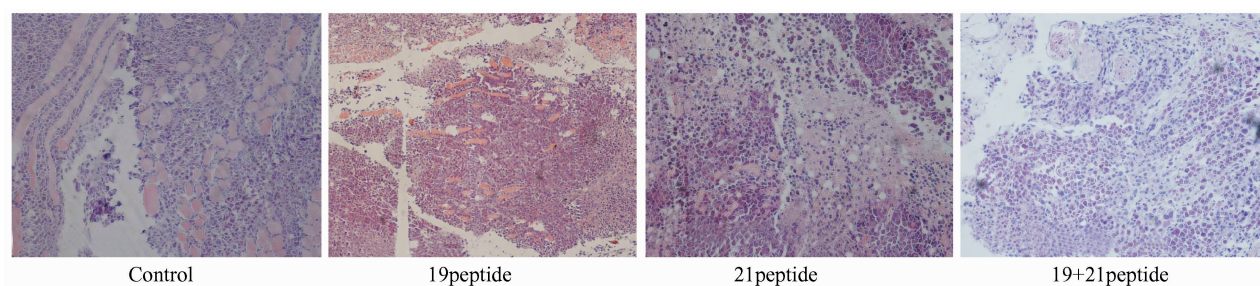


Fig. 7 The effect of 19peptide, 21peptide, 19+21peptide on tumor vascularization of murine H22 ascitic fluid transfevent hepatoma

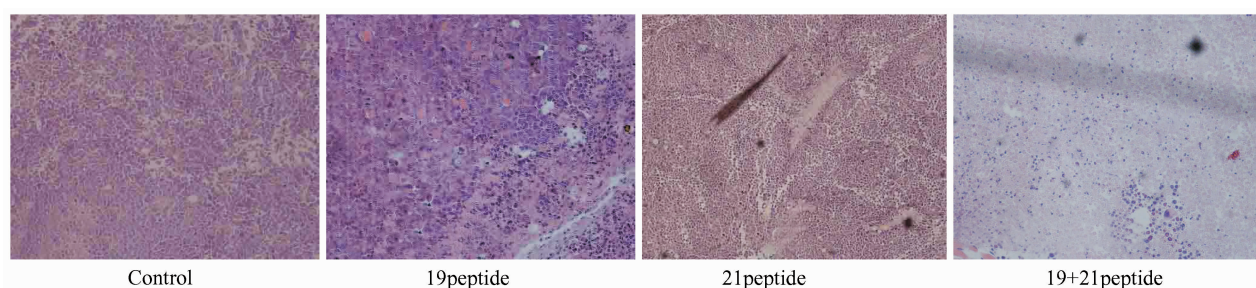


Fig. 8 The effect of 19peptide, 21peptide, 19+21peptide on tumor tissue necrosis of murine H22 ascitic fluid transfevent hepatoma

3 分析与讨论

目前肿瘤的治疗药物依据其作用的靶细胞不同而分为2类^[7], 一类作用于内皮细胞, 通过抑制新生血管的生成达到抗肿瘤目的, 另一类直接作用于肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞凋亡. 通过抑制血管生成的抗肿瘤药物因具有抗癌谱广、毒副作用小、没有抗药性等优点而受到人们的重视. 但血管生成抑制剂只限制肿瘤组织中的血管生成, 并不直接促进肿瘤细胞凋亡, 用药后肿瘤细胞因得不到血液供应而退回到原初状态, 潜伏下来, 停药后这些肿瘤细胞还会重新生长. 因此应用血管生成抑制剂治疗肿瘤同时需要有促进肿瘤细胞凋亡的药物配合使用, 即使在抗血管生成抑制剂广泛用于临床后, 研究、开发高效、低毒、直接抑制肿瘤细胞生长的抗肿瘤药物仍具有重要意义. 2000年, 肿瘤抑素被发现具有直接和间接的双重抗肿瘤作用^[2], 其有2个活性区,

一个是位于接近N端74~98位氨基酸所对应的25肽具有抑制血管生长间接抗肿瘤作用, 另一个是接近C端的185~203位氨基酸所对应的19肽具有抑制肿瘤细胞生长和促进肿瘤细胞凋亡的直接抗肿瘤作用, 两者的分子量较小, 都是一种内源性蛋白, 副作用较小, 具有不同的作用机制和不同的作用靶细胞, 同时应用可能会提高肿瘤的治疗效果. 为此, 我们设计合成19肽基因和T7肽基础上改造的21肽基因进行蛋白质表达、纯化和抗肿瘤活性的比较研究和联合应用抗肿瘤活性研究, 这将对探讨各自的作用机制和肿瘤的治疗具有重要的理论和实际应用价值.

为了提高目的基因的表达, 我们在设计19肽和21肽基因时, 根据大肠杆菌密码子的偏爱性, 选用在大肠杆菌中出现频率高的密码子. 同时选用pTYB2载体(含有内含肽和几丁质结合蛋白), 19肽和21肽以可溶性融合蛋白表达, 蛋白质表达量可以

达到菌体蛋白总量的50%以上。融合蛋白通过几丁质结合蛋白与几丁质亲和吸附,在有硫醇化合物(DTT, β -巯基乙醇)存在时,在柱上内含肽直接断裂,获得19肽和21肽。仅经一步亲和层析即纯化出目的多肽,不需要蛋白酶的再次水解。用高效液相色谱检查19肽、21肽的纯度为90.83%和92.14%。我们曾用这种方法纯化和检测重组成骨生长肽,取得满意结果。因这种方法具有蛋白质损失少,回收率高,提高产量,降低成本等优点有利于小肽的开发应用。

文献报道,19肽对黑色素瘤细胞具有强抑制作用,可能与其—SNS—有关^[8]。此序列构成2个 β 片层之间的转角,是抑制黑色素瘤细胞粘附和增生所必需的。19肽除对黑色素瘤细胞起作用外是否对其他肿瘤细胞有作用,对肿瘤细胞作用有无特异性^[9],文献上还没有明确的报道,另外,19肽与抗血管活性肽-T7肽的作用机制有一些共同之处^[10],都是不依赖于RGD序列与整合素 $\alpha V\beta 3$ 结合,通过FAK、PI3K信号传导通路起到不同的作用。前者是抑制内皮细胞蛋白质合成而使肿瘤血管的生成受到抑制达到间接抗肿瘤作用,后者是抑制腺苷酸环化酶和基质金属蛋白酶的活性,直接抑制肿瘤细胞的增殖、浸润及转移^[11]。两者有无交叉作用,19肽和T7肽改造的21肽是否对肿瘤细胞和内皮细胞的生长和凋亡都有影响?两者是否具有协同抗肿瘤作用?这都是我们所要解决的问题。为此,我们对2种小肽进行了肿瘤细胞和内皮细胞的活性比较研究和体内的抑瘤实验。

通常MTT法和细胞生长曲线法分别检测同一时间、不同浓度的药物和同一浓度、不同作用时间药物对细胞增殖的影响。我们通过对2种细胞在不同药物作用下对细胞增殖情况比较研究可得到19肽和21肽特异作用的靶细胞,寻求其进一步的作用机制。实验中19肽21肽采用同一浓度、同一体积用药。联合用药组采用在与19肽、21肽相同体积情况下,19肽和21肽半量联合用药方式,因为96孔板及24孔板所容纳的细胞数量较少,既要保证细胞密度不能太大,又要保证所有的实验条件保持一致。通过比较得出19肽、21肽及半量联合用药都对细胞增殖有影响。19肽对肿瘤细胞的增殖抑制作用较强,对宫颈癌细胞的半数抑制量达到37.75 mg/L,在细胞生长2~3天就无法计数。对内皮细胞的作用相对较弱,半数抑制量为43.75 mg/L。21肽正好相反,其对肿瘤细胞的抑制程度远远小于19肽,而对内皮

细胞的作用较强,半数抑制量可达37.5 mg/L。联合用药组虽然采取了19肽和21肽2种药物半量用药,但无论对肿瘤细胞还是对内皮细胞的抑制程度都在19肽与21肽之间,这说明19肽、21肽主要分别对肿瘤细胞和内皮细胞生长具有抑制作用。

HE染色、TUNEL试验、电镜、流式早期凋亡实验和细胞周期实验都说明了19肽、21肽、联合用药24 h后,肿瘤细胞和内皮细胞形态出现不同程度的改变。几种检测方法的结果基本平行。19肽和联合用药组对宫颈癌细胞的作用较明显,大量细胞形态改变,凋亡细胞明显增多。联合组的作用强于19肽组,出现中晚期凋亡细胞同时,大量细胞发生坏死,细胞碎片较多。21肽组相对作用较弱,细胞的形态基本正常,细胞器有轻度的改变,偶见凋亡的细胞。对于内皮细胞而言,3种给药方式在作用24 h时细胞形态变化不如肿瘤细胞显著,仅联合组出现较多的凋亡细胞。21肽组虽然无大量凋亡细胞,但接近1/3的细胞出现凋亡早期细胞器的形态改变。细胞周期结果还显示,19肽21肽及联合组都能使肿瘤细胞及内皮细胞在作用24 h时会造成不同程度的G1期阻滞,联合用药组强于19肽组、21肽组,19肽组强于21肽组,肿瘤细胞的作用强于内皮细胞。

这些结果不同于以往文献的报道,进一步说明19肽对非黑色素瘤细胞也具有抑制作用,对内皮细胞生长也具有一定的抑制作用。21肽抗肿瘤血管生成作用主要通过抑制内皮细胞增殖,其促凋亡作用不明显。联合用药通过抑制内皮细胞和肿瘤细胞生长和促进肿瘤细胞凋亡治疗肿瘤,作用强于单独应用组,两者具有协同作用。

另外,19肽、21肽属于内源性的小分子多肽,序列保守,人鼠间相同,可选用小鼠实体瘤模型进行动物体内的抑瘤实验。在小鼠的腹水转移型肝癌动物模型中,19肽、21肽及联合组在相同时间内都具有抑瘤作用,而21肽在使用剂量低的情况下其抑瘤水平与剂量较大的19肽相差不多,联合用药组的作用强于19肽和21肽组。病理上反映出21肽组血管较19肽组明显减少,联合组的血管更少,肿瘤坏死面积最大。这些与体外细胞实验相一致。但21肽在体内的动物实验中显示较19肽强的抗肿瘤作用,这又与体外实验不一致。需要说明的一点是,本试验是为了对3种用药生物活性进行比较,所以尽量保证在同一浓度统一作用时间进行活性测定,但在细胞形态学观察中发现19肽和21肽在对内皮细胞作

用24 h无明显的改变, 48 h作用较明显. 电镜结果也显示21肽组虽然无大量凋亡的细胞, 但接近1/3的细胞出现凋亡早期的细胞器形态改变. 这些是否说明不同药物对不同细胞具有不同的作用机制, 发挥作用的时间不同所致. 另外, 通过基因工程技术获得了基因重组的21肽, 较T7肽提高了可溶性, 降低了分子质量. 并证实了改造后的21肽具有较强的抑制内皮细胞增殖, 抗新生血管生成作用, 但在一定的时间内缺乏促细胞凋亡的活性, 这与文献上报道的其抗血管生成活性区具有抑制内皮细胞增殖和促进内皮细胞凋亡的作用有出入, 具体的机制还要与T7肽及肿瘤抑素全长进行比较来进一步研究. 再者, 各种细胞凋亡的实验都显现出联合组的促凋亡程度远远大于19肽与21肽单独应用组, 能否说明19肽、21肽在抗肿瘤细胞生长和抗血管生成的作用机制有交叉, 两者可能都具有双重作用, 同时应用有协同抗肿瘤作用. 这些问题都有待于更进一步的研究.

总之, 肿瘤抑素2个改造的活性肽具有不同的作用机制和作用靶细胞, 两者单独或者联合应用都显示出了不同的抗肿瘤活性, 尤其是两者联合应用对肿瘤细胞、内皮细胞生长抑制和促凋亡作用都明显增强, 抗肿瘤活性大大提高, 这将对今后肿瘤抑素的进一步研究和肿瘤治疗具有重要的意义.

参 考 文 献

- 1 Saus J, Wieslander J, Langeveld J P, *et al.* Identification of the goodpasture antigen as the alpha 3 (IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem*, 1988, **263** (26): 13374~13380
- 2 Maeshima Y, Colorado P C, Torre A, *et al.* Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, 2000, **275** (28): 21340~21348
- 3 王淑静, 刘兴汉. 肿瘤抑素的研究进展. *生命的化学*, 2004, **24** (2): 128~130
Wang S J, Lui X H. *Chem Life*, 2004, **24** (2): 128~130
- 4 Floquet N, Pasco S, Ramont L, *et al.* The antitumor properties of the alpha3(IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *J Biol Chem*, 2004, **279** (3): 2091~2100
- 5 余 琼, 周凌云, 林雪松, 等. 重组人成骨生长肽的表达、纯化和活性研究. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2004, **20** (4): 467~472
Yu Q, Zhou L Y, Lin X S, *et al.* *Chin J Bioc hem mol Biol*, 2004, **20** (4): 467~472
- 6 王淑静, 刘 岩, 林雪松, 等. 肿瘤抑素抗肿瘤相关肽的克隆及生物活性. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2005, **21** (3): 322~328
Wang S J, Liu Y, Lin X S, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, **21** (3): 322~328
- 7 Kalluri R. Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2002, **67**: 255~266
- 8 Maeshima Y, Colorado P C, Kalluri R. Two RGD-independent alpha v beta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem*, 2000, **275** (31): 23745~23750
- 9 Maeshima Y, Yerramalla U L, Dhanabal M, *et al.* Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276** (34): 31959~31968
- 10 Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, *et al.* Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*, 2001, **276** (18): 15240~15248
- 11 Maeshima Y, Sudhakar A, Lively J C, *et al.* Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*. 2002, **295** (5552): 140~143

Study on Biological Activity of Two Modified Anti-tumor Peptide of Tumstatin*

WANG Shu-Jing^{1,2,3)}, LIU Xing-Han^{3)**}, JI Yu-Bin¹⁾, CHEN Ning¹⁾

¹⁾Institute of Pharmacology, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China;

²⁾ Postdoctoral Station of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

³⁾Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province-Incubator of State Key Laboratory, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract To study biological activity and mechanism of two modified anti-tumor peptide of tumstatin, the nucleotide sequences of 19peptide (amino acid 185~203) and 21peptide based on modified T7 peptide (amino acid 75~95) of tumstatin were designed, artificially synthesized and inserted into the fusion protein vector pTYB2. After transformed and expressed in *E. coli* BL-21 (DE3) by means of fusion protein, the soluble 19peptide and 21peptide were obtained from one step chitin affinity chromatograph. By such experiment as MTT assay, cell growth curve, TUNEL assay, flow cytometry, the effect of the H22 ascitic fluid transplanted hepatoma of mice and histopathological slice, the biological activity of 19peptide and 21peptide were studied. Experiments *in vitro* and *in vivo* identified that 19peptide could inhibit tumor cell proliferation, promote tumor cell apoptosis and stop tumor cell in G0/G1 cycle. It also could inhibit human umbilical vein endothelial cell proliferation to some extent. The anti-tumor activity of 19peptide mainly relied on affecting tumor cell directly and partly on inhibiting vascularization. 21peptide inhibited proliferation of human umbilical vein endothelial cell much better than that of tumor cell. It almost could not promote endothelial cell and tumor cell apoptosis. 21peptide mainly exhibited indirect anti-tumor activity by anti-angiogenesis. The combination of 19peptide and 21peptide obviously inhibited endothelial cell and tumor cell proliferation and promoted them apoptosis. A combination application could markedly enhance anti-tumor activity, make up the defect of 19peptide, 21peptide alone and bring about synergism. It would be an efficient method for tumor therapy in future, which will lay foundation on its mechanism of action research and clinical tumor therapy.

Key words tumstatin, protein expression, cell proliferation, cell apoptosis, tumor therapy

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30472035), Heilongjiang Province Natural Science Foundation of China (TD2005-21) and Heilongjiang Province Educational Science Foundation of China (11511104).

**Corresponding author. Tel: 86-451-86676570, E-mail: lxlxhs@163.com

Received: March 9, 2007 Accepted: September 7, 2007