

## 肿瘤抑素抗肿瘤相关肽对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

王淑静<sup>1,2,3</sup>, 刘兴汉<sup>4</sup>, 季宇彬<sup>1</sup>, 陈宁<sup>3</sup>

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 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076

4 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:** 肿瘤抑素抗肿瘤相关肽-19肽是由肿瘤抑素 185~203 位氨基酸组成, 具有直接抑制黑色素瘤细胞生长作用, 但其对肝癌细胞增殖和凋亡是否有影响, 对肝癌是否具有治疗作用还需进一步研究。本研究中采用基因工程技术将合成 19 肽基因与载体 pTYB2 重组后进行蛋白表达、纯化获得 19 肽。通过 MTT 法、生长曲线观察 19 肽对人肝癌细胞生长抑制作用; TUNEL 标记法、流式细胞仪细胞周期检测法、透射电镜观察 19 肽对肝癌细胞凋亡的影响; 小鼠 H22 腹水型转移型肝癌实体瘤抑瘤实验证明其体内的抑瘤作用。MTT 实验和生长曲线实验表明随着 19 肽浓度的增加肝癌细胞的存活率下降。在相同 19 肽浓度下, 随着作用时间延长存活细胞逐渐减少。电镜观察治疗组细胞出现明显凋亡, 流式细胞仪可检测到前 G1 峰, TUNEL 标记法也证实治疗组可见明显的凋亡细胞, 体内 19 肽作用的小鼠 H22 腹水型转移型肝癌的抑瘤率达 48.46%。可见, 肿瘤抑素 19 肽可抑制肝癌细胞生长, 促进肝癌细胞凋亡, 对肝癌具有一定的治疗作用。

**关键词:** 肿瘤抑素, 细胞增殖, 细胞凋亡, 肿瘤治疗

## Effect of Tumstatin Anti-tumor Peptide on Proliferation and Apoptosis of Hepatocarcinoma Cell

Shujing Wang<sup>1,2,3</sup>, Xinghan Liu<sup>4</sup>, Yubin Ji<sup>1</sup>, and Ning Chen<sup>3</sup>

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

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

3 Pharmacological College, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China

4 Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province – Incubator of State Key Laboratory, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

**Abstract:** In this study, the basic sequences of 19peptide were synthesized and inserted into vector pTYB2. After being expressed and purified, the soluble 19peptide was obtained. The inhibiting effect on hepatocarcinoma cell was selected by 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay and cell growth curve. The apoptosis index was observed using TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), flow cytometry and transmission electron microscope (TEM). Its anti-tumor activity *in vivo* was verified in H22 ascitic fluid transfevent hepatocarcinoma of mice. 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-di-

**Received:** March 26, 2007; **Accepted:** September 17, 2007.

**Supported by:** the National Natural Science Foundation (No.30472035), Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No.TD2005-21) and the Research project from Department of Education of Heilongjiang Province (No. 11511104).

**Corresponding author:** Shujing Wang. Tel: +86-451-84838207; E-mail: misswsj@163.com

国家自然科学基金资助项目(No.30472035), 黑龙江省自然科学基金资助项目(No.TD2005-21), 黑龙江省教育厅自然科学基金资助项目(No. 11511104)。

phenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay and cell growth curve showed cell viability decrease with the 19peptide. Survival hepatocarcinoma cell decreased with time. In the treatment group, obvious change of apoptosis, the appearance of sub-G1 phase and dyed brown cells were seen by transmission electron microscope (TEM), flow cytometry and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), The inhibition rate of mouse H22 ascitic fluid transfevent hepatocarcinoma growth was 48.46%. As a whole, 19peptide could directly inhibit hepatocarcinoma cell proliferation and promote hepatocarcinoma cell apoptosis.

**Keywords:** Tumstatin, cell proliferation, cell apoptosis, tumor therapy

肿瘤抑素(Tumstatin)是胶原蛋白 IV $\alpha$ 3 链的非胶原区, 80 年代作为肺-肾出血综合症的自身抗原被发现<sup>[1]</sup>。2000 年, Kamphaus 及其同伴发现它有两个不同的抗肿瘤活性区, 执行直接和间接的抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。一个是具有直接抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡作用的靠近 C 端的 185~203 位氨基酸所组成的 19 肽, 另一个是具有抑制肿瘤血管生成、发挥间接抗肿瘤作用的接近 N 端 74~98 位氨基酸所组成的 T7 肽(25 肽)。目前, 对于肿瘤抑素抗血管生成活性研究比较多, 而对于其直接抗肿瘤活性研究较少, 其直接抗肿瘤机制还不明确。另外, 肿瘤抑素虽然具有较强的抗肿瘤活性, 但肿瘤抑素因其分子量较大(28 kD), 含有肺-肾出血综合症的自身抗原, 提取较为困难并对机体具有副作用而影响其进一步的研究应用。再者, 19 肽虽然具有直接抗肿瘤作用, 但作为肿瘤抑素整体的一部分时, 并不显示抗肿瘤活性, 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<sup>[3]</sup>。因此, 为了获得分子量小, 可溶性高, 提取方便, 使用安全的直接抗肿瘤活性肽, 进一步明确其抗肿瘤作用机制。我们采用基因工程技术获得了肿瘤抑素 19 肽, 通过体内外实验研究其对肝癌细胞生长和凋亡的影响, 这将对肝癌等肿瘤的临床治疗具有重要意义。

## 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 Promega 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; 人肝癌细胞由哈尔滨医科大学组胚教研室提供。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; RPMI1640 细胞培养基、胰酶购自 Sigma 公司; 胎牛血清购自灏洋生物公司; TUNEL 试剂盒购自武汉博士德生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 19 肽基因工程菌的构建以及表达、纯化

根据肿瘤抑素 185~203 位氨基酸所对应的碱基序列, 采用大肠杆菌偏爱密码子, 设计合成肿瘤抑素 19 肽的碱基序列。将合成的 19 肽基因磷酸化、退火成为双链后与载体 pTYB2 进行重组转化到大肠杆菌 BL-21(DE3)中, 0.1 mmol/L IPTG, 28 $^{\circ}$ C 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 肽的纯化, 具体方法参照以往发表的文章<sup>[4,5]</sup>。19 肽碱基序列如下:

5' TATG 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'

#### 1.2.2 MTT 比色实验

取经过 1640 培养基培养的生长状态良好的人肝癌细胞, 0.25%胰酶溶液消化, 制备细胞悬液, 用细胞计数板调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔 100  $\mu$ L 加入 96 孔板, 待细胞培养 24 h 贴壁后加入不同浓度 19 肽, 每个浓度设定 6 个复孔。对照组加入同等体积的 PBS。19 肽终浓度梯度为: 0  $\mu$ g/mL, 44  $\mu$ g/mL, 88  $\mu$ g/mL, 132  $\mu$ g/mL, 176  $\mu$ g/mL, 220  $\mu$ g/mL。培养 48 h 后, 于每孔加入 5 mg/mL MTT 20  $\mu$ L, 4 h 后弃培养液, 加入 100  $\mu$ L DMSO, 培养板振荡 10~20 min。空白对照调零, 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(A 值), 绘制 19 肽浓度与细胞存活率曲线图。细胞存活率 = 实验组吸光值/对照组吸光值  $\times$  100%。

#### 1.2.3 生长曲线

取生长状态良好的人肝癌细胞, 采用常规方法

消化细胞,调整细胞浓度至  $5 \times 10^4$  个/mL。在 24 孔板各孔中准确接种 400  $\mu$ L 细胞悬液,继续培养 24 h。吸弃培养液,向各孔重新加入 400  $\mu$ L 培养液。19 肽组各孔加入终浓度为 44  $\mu$ g/mL 的 19 肽。对照组各孔加入同等体积的 PBS。每天每组各取 3 孔,充分消化后,经台盘蓝染色,细胞计数板计数,测出每孔细胞浓度,求出平均值,持续 6 d。绘制细胞浓度-时间曲线。

#### 1.2.4 凋亡细胞原位末端标记试验(TUNEL)

取生长状态良好的人肝癌细胞,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  $5 \times 10^4$  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,培养 24 h。19 肽组各孔加入终浓度为 44  $\mu$ g/mL 的 19 肽,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  $\mu$ 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  $\mu$ L 的转化剂 PDB 和 50~100  $\mu$ L DAB 底物溶液,冲洗,封片,在光镜下分析结果。同时可在光镜下随机取 10 个视野进行凋亡细胞计数,得到细胞凋亡率。

#### 1.2.5 流式细胞仪细胞周期试验

取培养状态良好的人肝癌细胞,调整细胞浓度至  $2 \times 10^5$  个/mL。分两组,对照组加入 PBS,实验组加入 19 肽使之终浓度为 44  $\mu$ g/mL。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,将正常组和实验组细胞用 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,1000 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,每个样品的细胞浓度至少为  $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$  个/mL,轻轻混匀,使之呈单细胞悬液,4 $^{\circ}$ C 固定 24 h。用 Cycle TEST<sup>TM</sup> PLUS DNA Reagent Kit 进行流式细胞仪检测细胞在不同周期的细胞数。

#### 1.2.6 透射电镜观察

取对数生长期人肝癌细胞,调整细胞浓度至  $2 \times 10^5$  个/mL。分两组,对照组加入 PBS,实验组加入 19 肽使之终浓度为 44  $\mu$ g/mL。培养 24 h,0.25% 胰酶消化,1500 g,15 min 离心,弃上清,PBS 冲洗,4 $^{\circ}$ C 戊二醛固定 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。

#### 1.2.7 动物活性检测

将建立的小鼠腹水型转移型肝癌模型体重在 18~22 g 的 24 只雄性昆明小鼠随机分成 2 组:对照组,19 肽组。待到小鼠皮下可触及到皮下结节时开始给药。对照组:100  $\mu$ L 生理盐水;19 肽组:4.88  $\mu$ g/kg 的 19 肽,每日注射 1 次,连续给药 7 d 后,将小鼠处死,称其瘤重并进行统计学分析。同时将小鼠肿瘤切成组织块、经固定、包埋、切片、H.E 染色后,显微镜观察,进行病理分析。

## 2 结果

### 2.1 19 肽获得

19 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,19 肽重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达、几丁质亲和层析柱亲和和层析后,就可得到 19 肽,经高效液相检测纯度可达 90%以上。具体结果参照以往文献报道<sup>[5]</sup>。

### 2.2 细胞活性检测

#### 2.2.1 MTT 比色实验

MTT 实验结果表明(图 1),根据存活率—浓度曲线,19 肽对人肝癌细胞生长具有抑制作用,随着 19 肽浓度的增加,肝癌细胞存活率明显下降,表现为剂量依赖性。不同 19 肽浓度与细胞对照组相比,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

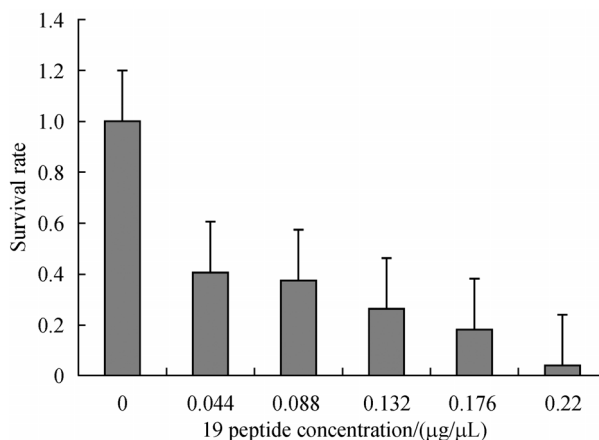


图 1 19 肽对人肝癌细胞生长的抑制作用  
Fig. 1 The inhibitory effect of 19peptide on human hepatocarcinoma cell

### 2.2.2 生长曲线

与对照组相比, 19 肽对人肝癌细胞有抑制作用, 随着 19 肽对肝癌细胞作用时间的增加, 其细胞浓度明显降低, 细胞生长抑制明显, 存在时间依赖性, 肝癌细胞在 19 肽用药后的第三天细胞密度接近 0, 无法计数(图 2)。

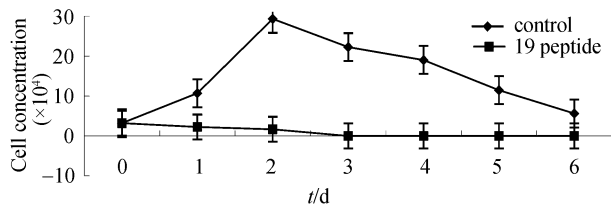


图 2 人肝癌细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of human hepatocarcinoma cell

### 2.2.3 细胞凋亡原位末端标记检测

正常肝细胞呈淡蓝色圆形, 19 肽作用后的肝癌细胞经 TUNEL 染色有大量凋亡细胞存在, 荧光显微镜下实验组有大量的强荧光, 光镜下实验组可见一些细胞的周围出现类似凋亡小体的凸起小泡, 细胞形态变化较明显, 部分细胞裂解。光镜下随机取 10 个视野进行凋亡细胞计数, 细胞凋亡率可达  $33.9\% \pm 3.48\%$ (图 3)。

### 2.2.4 流式细胞仪细胞周期检测

流式细胞仪细胞周期检测发现 19 肽作用的肝癌细胞在 G1 期前有一凋亡峰, 细胞凋亡率为  $10.07\% \pm 1.75\%$ 。与对照组比较其 G0-G1、G2-M 期细胞所占的比例明显增多, 而 S 期细胞数量减少 ( $P < 0.05$ )。进一步证明 19 肽可引起肝癌细胞 G0/G1 阻滞, 具有抑制肝癌细胞的分裂增殖, 促进肝癌细胞凋亡的作用。

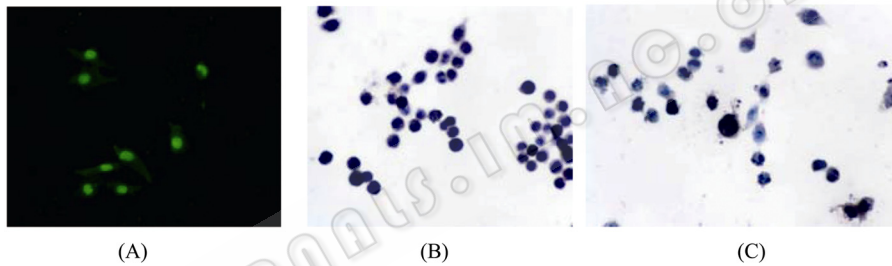


图 3 凋亡细胞原位末端标记法观察人肝癌细胞形态改变

Fig. 3 Morphological observation of human hepatocarcinoma cell using TUNEL assay

(A) Experiment under fluorescent microscopy; (B) Control under optical microscopy; (C) Experiment under optical microscopy

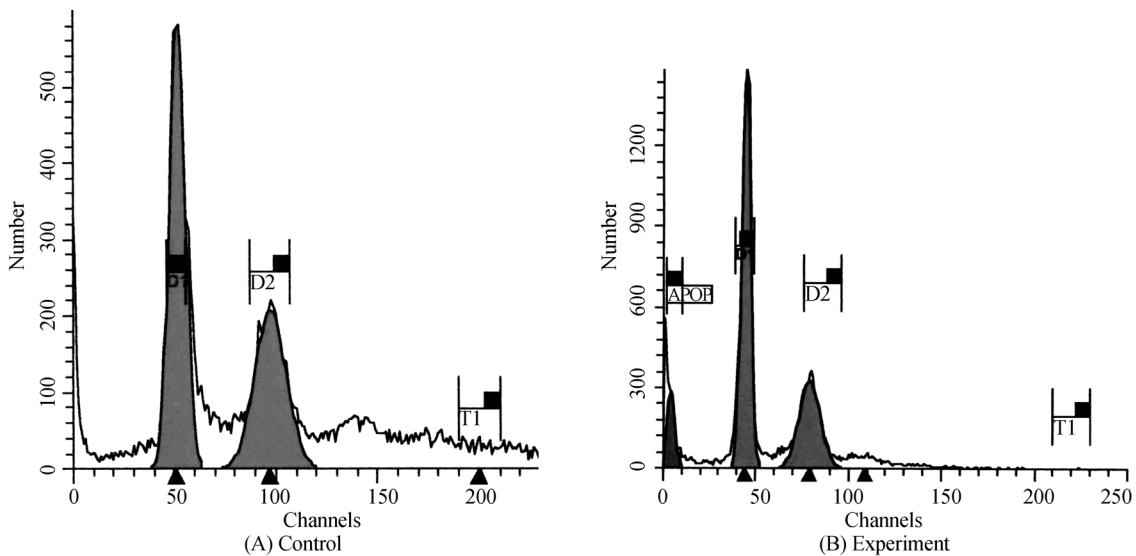


图 4 流式细胞仪细胞周期实验检测 19 肽对肝癌细胞周期的影响

Fig. 4 The effect of 19peptide on cell circle of human hepatocarcinoma cell using FAC

### 2.2.5 透射电镜细胞形态学观察

电镜观察结果显示人肝癌细胞对照组的细胞呈圆形或多边形, 绒毛丰富, 核仁明显, 细胞核表面有切迹, 核周细胞器发达。19肽组细胞大小不一, 形态不规则, 坏死和凋亡细胞数量明显增多, 凋亡细胞核崩解, 核内染色质形成颗粒状, 核膜清晰, 部分细胞质膜含有细胞器脱落, 内膜结构不清, 细胞呈现凋亡状态。

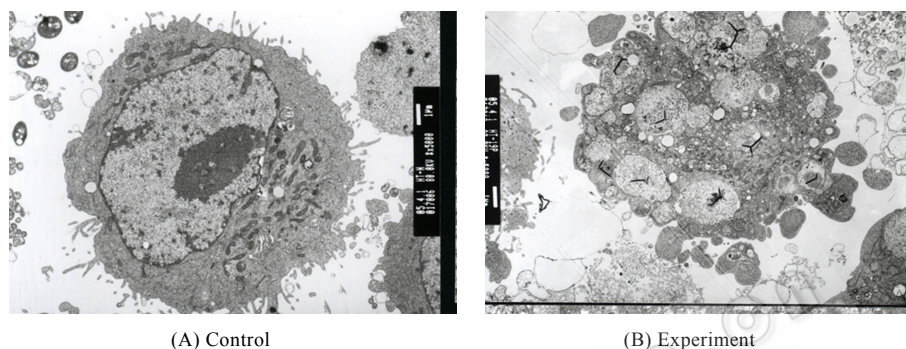


图5 透射电镜检测肝癌细胞形态结构

Fig. 5 Morphological changes of human hepatocarcinoma cell using TEM

表1 19肽对H22小鼠腹水转移性肝癌的影响

Table 1 Effect of 19peptide on H22 ascitic fluid transfevent hepatoma of mice growth( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

	$x_i/g$	$\bar{x}_i/g$	IR/%
Control	1.0152 3.1523 2.7645 2.9969 2.5083 2.6511 2.4325 3.0718 2.8947 1.7968 2.0356 2.8568	$2.5147 \pm 0.6247$	
19 peptide	1.4224 1.7016 0.6547 2.1896 0.8616 0.9472 1.3080 0.8116 1.7822 1.8980 0.7315 1.2459	$1.2962 \pm 0.5095$	48.4551

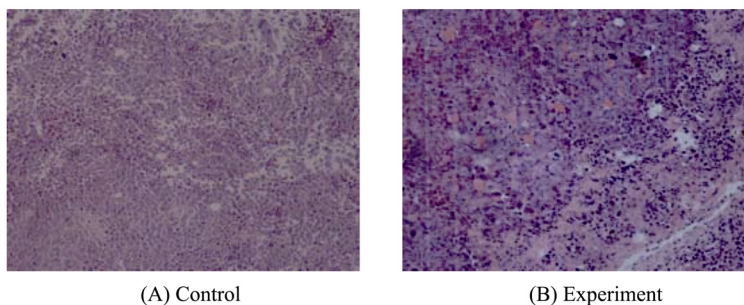


图6 19肽对小鼠腹水型转移性肝癌中癌组织的影响

Fig. 6 The effect of 19peptide on tumor tissue in murine H22 ascitic fluid transfevent hepatocarcinoma

## 3 分析与讨论

目前, 原发性肝癌的治疗仍采用以手术为主的综合治疗, 包括放射治疗、化疗等, 手术、放疗和化疗难以彻底消灭肿瘤细胞, 同时又损伤正常组织和

## 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19肽组小鼠肿瘤继续生长, 但19肽组肿瘤明显小于对照组。经  $t$  检验, 19肽组与对照组比较差异显著,  $P < 0.05$ 。抑瘤率可达48.46% (表1)。

### 2.3.2 小鼠肿瘤病理组织切片(x20)

对照组肝癌细胞长势良好, 组织无坏死。19肽组肿瘤组织出现大量坏死(图6)。

细胞。近年来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。因此研究、开发直接抑制肿瘤细胞生长的治疗肝癌药物具有重要意义。肿瘤抑素 19 肽被发现具有直接抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的直接抗肿瘤特性, 因其具有分子量小, 可溶性高, 副作用低, 使用安全而受到关注。

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- 序列有关<sup>[6]</sup>。此序列是抑制黑色素瘤细胞粘附和增生所必需的。我们在以往的实验中证实了肿瘤抑素 19 肽对黑色素瘤作用的敏感性<sup>[5]</sup>, 但其是否对其它肿瘤细胞有作用, 对肿瘤细胞作用有无特异性<sup>[7]</sup>, 文献上还没有明确的报导, 迄今为止, 国内外研究也没有具体报道其对肝癌细胞影响, 为此, 我们设计了体内外实验来初步研究其对肝癌的治疗作用。

MTT 法和细胞生长曲线法分别检测同一时间、不同浓度的 19 肽和同一浓度、在不同时间 19 肽对肝癌细胞增殖抑制作用的整体趋势。结果显示随着 19 肽浓度的增加, 肝癌细胞的存活率下降, 表现为剂量依赖性, 与空白对照组比较均有明显差异。当 19 肽浓度为 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 肝癌细胞的生长在加药后逐渐被抑制, 大约 2~3 d, 细胞就无法计数, 结果与我们曾经做过的 19 肽对黑色素瘤细胞抑制作用较为接近, 可初步说明肿瘤抑素 19 肽对肝癌细胞和黑色素瘤细胞的增殖都具有较强的抑制作用。TUNEL 试验、电镜、流式的细胞周期试验都说明了 19 肽促人肝癌细胞凋亡作用较明显, 通过电子显微镜观察, 肿瘤抑素作用后肝癌细胞凋亡崩解, 核偏于一侧, 细胞体积缩小, 核内染色质形成颗粒状, 部分细胞质膜含有细胞器脱落, 内膜结构不清, 证明细胞以凋亡为主。流式细胞仪细胞周期结果和 TUNEL 实验也证明 19 肽对肝癌细胞具有明显的抑制生长和促凋亡作用, 并引起肝癌细胞一定程度的 G0/G1 期阻滞。同时, 体内试验也证实了 19 肽对肝癌的抑制作用, 19 肽属于内源性的小分子多肽, 序列保守, 人鼠间相同, 我们选用小鼠腹水转移性肝

癌实体瘤模型进行动物体内的抑瘤实验, 19 肽对小鼠的腹水转移性肝癌抑瘤作用明显, 抑瘤率可达 48.46%, 病理切片上可见肝癌组织内细胞大量坏死, 与体外试验结果相一致。

这些结果进一步说明 19 肽对非黑色素瘤细胞-肝癌细胞具有抑制作用, 它可通过抑制肝癌细胞增殖, 促进肝癌细胞凋亡达到治疗肝癌的目的。同时也说明其对肿瘤治疗具有一定的广谱性, 这将对今后 19 肽的开发应用和肿瘤的治疗具有重要意义。

## REFERENCES

- [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 anti-tumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, 2000, **275**(28): 21340-21348.
- [3] Floquet N, Pasco S, Ramont L, *et al.* The antitumor properties of the alpha3(IV)-(185-203) peptide from the NCI domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *J Biol Chem*, 2004, **279**(3): 2091-2100.
- [4] Yu Q, Zhou LY, Lin XS, *et al.* Expression, purification and activity of recombinant human osteogenic growth peptide (rhOGP). *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20**(4): 467-472. 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.
- [5] Wang SJ, Liu Y, Lin XS, *et al.* Cloning and biological activity of anti-tumor peptide of Tumstatin. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, **21**(3): 322-328. 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.
- [6] 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.
- [7] Maeshima Y, Yerramalla UL, 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.