

抑制肿瘤生长活性的内皮生长抑制剂 EDI-8t

周庆玮, 杜鹏, 钱悦, 张倩, 冯宝山, 丁红珍, 甘人宝, 张辉

上海普洛康裕药物研究院有限公司, 上海 201314

摘要: 对内源性的内皮生长抑制剂的序列来源分析后, 用 RT-PCR 方法从人脐带中获得了 417 bp 的 cDNA, 并克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9, 然后转化毕赤酵母 GS115 获得重组表达菌株。表达菌株通过甲醇诱导表达后, 将发酵液通过分离纯化获得重组蛋白纯品, 命名为 EDI-8t。体外实验结果表明, 这个胶原蛋白 VIII 来源的 rhEDI-8t 蛋白能特异性地抑制牛主动脉内皮细胞的增殖和迁移, 并能引起内皮细胞的凋亡。动物体内实验结果表明, rhEDI-8t 蛋白样品可有效抑制裸鼠皮下肝癌肿瘤的生长, 抑制效果和参照品 endostatin 相同。但在小鼠黑色素瘤肺转移模型中, rhEDI-8t 显示了高于参照品的抑癌效果。

关键词: 内皮细胞生长抑制剂, EDI-8t, 肿瘤

Endothelial genesis inhibitor-8t (EDI-8t) against tumor growth

Qingwei Zhou, Peng Du, Yue Qian, Qian Zhang, Baoshan Feng, Hongzhen Ding, Renbao Gan, and Hui Zhang

Shanghai Apeloa Pharmaceutical Research Institute, Shanghai 201314, China

Abstract: On the basis of the origin comparison of known endothelial genesis inhibitors, a 417-bp cDNA fragment was amplified from umbilical cord by RT-PCR and cloned into the expression vector pPIC9, followed by transformation into *Pichia pastoris* GS115. The resulted yeast was induced with methanol to express recombinant protein. The resulted protein was purified from culture broth and designated as EDI-8t. The *in vitro* study showed that EDI-8t, originated from collagen VIII, could specifically inhibit the growth and migration of bovine aortic endothelial cells (BAEC) stimulated by basic fibroblast growth factor (bFGF). The protein also exhibited the activity to cause cell apoptosis. *In vivo* EDI-8t showed the identical activity comparing with endostatin to inhibit the growth of liver tumor transplanted into nude mice. Interestingly, EDI-8t showed higher activity than endostatin to inhibit tumor growth in metastatic model of melanoma mice.

Keywords: endothelial genesis inhibitor, EDI-8t, tumor

胶原蛋白 (Collagen) 是组成各种细胞外间质的聚合物, 主要以不溶性纤维蛋白的形式存在。在人体的组成中, 胶原带白约占蛋白质总量的 33%。1997 年美国哈佛医学院的 Folkman 教授发现了第一个胶原蛋白来源的内皮细胞生长抑制剂 angiostatin^[1],

随后另一个胶原蛋白来源的内皮细胞生长抑制剂 endostatin 也被从尿液中提取^[2]。Angiostatin 和 endostatin 这 2 个内皮抑制剂分子的发现和动物实验的成功掀起了这个领域的研究热潮。随后一系列胶原蛋白来源的内皮细胞抑制剂被发现, 如来源于胶

原蛋白 XV 的 Restin^[3]、来源于胶原蛋白 IV 的 canstatin^[4]等。在已知的内源性的血管生长抑制剂中, 约有 50% 是蛋白降解片段 (图 1), 它们的前体蛋白并不抑制血管形成, 但是参与加工它们产生内生抑制剂的蛋白却大多也是参与血管生成的组分, 这可能也是调节生理稳态的一种方式^[5]。这些内源性的血管生长抑制剂均能专一性地抑制内皮细胞的生长, 但是对正常细胞如成纤维细胞和肿瘤细胞的生长没有抑制活性。

肿瘤可以看作是一个异常生长的无序器官, 也需要血管为之提供养分, 运走代谢废物, 否则肿瘤就不能迅速地生长^[6-7]。肿瘤的生长和迁移与血管生长密切相关, 研究表明, 肿瘤直径达到 1~2 mm 时如果没有相应的血管生成提供养料便停止生长^[8]; 血管生长对于肿瘤的转移也很重要, 为肿瘤细胞离开原发癌组织进入循环系统提供了有效的路径; 对于具有转移性的癌来说, 减少其血管生成可减少进入循环系统的细胞数目进而减少转移癌的数目^[9]。因此可以通过抑制血管生成来抑制实体瘤的生长, 这为治疗肿瘤提供了一种新的思路, 常被形象地称作“饿死癌细胞”的疗法^[10]。这种新思路相比以前的各种肿瘤治疗方法具有许多优点, 它具有广谱的治疗范围, 对绝大多数肿瘤的生长都有效, 且不容易产生抗药性^[11]。

根据已发现的来源于胶原蛋白非胶原结构域的血管生成抑制剂, 我们推测胶原蛋白 VIII 的 NC1 结构域可能也具有血管生成抑制活性。因此我们设计了引物, 利用 RT-PCR 方法, 扩增出胶原蛋白 VIII 的 NC1 结构域的 cDNA, 克隆入真核表达载体 pPIC9, 诱导表达后利用 Ni-NTA 亲和柱纯化出重组蛋白, 并命名为内皮细胞生长抑制剂-8t (EDI-8t) (图 1)。EDI-8t 全长 435 bp, 编码 145 个氨基酸 (含 6×His tag) (图 2), 分子量 16 kDa, 含 2 个半胱氨酸, 可形成 1 对二硫键。我们的研究表明, rhEDI-8t 蛋白在体外可特异性地抑制内皮细胞的增殖和迁移, 并可诱导内皮细胞发生凋亡; 在体内, 重组蛋白相比对照组可显著减缓裸鼠体内肿瘤的生长速度。

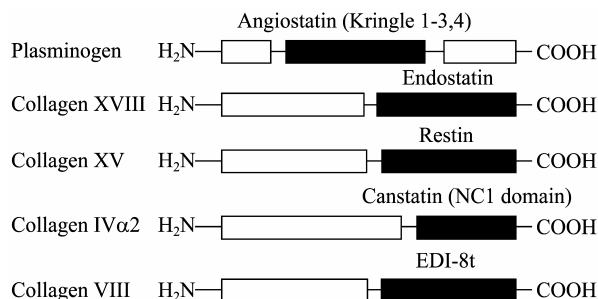


图 1 内源蛋白来源的新生血管抑制剂

Fig. 1 Endothelial genesis inhibitor derived from endogenous protein.

A

```

1 GGCAAGAAATG GAGGGCCAGC CTATGAGATG CCTGCATTTA CCGCCGAGCT
51 AACCGCACCT TTCACCCGG TGGGGGCCCC AGTGAAGTTT AACAAACTGC
101 TGTATAACCG CAGACAGAAC TACAACCCGC AGACAGGCAT CTTACACCTGT
151 GAGGTCCTGT GTGTCTACTA CTTTGCATAC CACGTTCACT GCAAGGGGGG
201 CAACGTGTGG GTTGCTCTAT TCAAGAACA CGAGCCCGTG ATGTACACGT
251 ACGACGAGTA CAAAAGGGC TTCCTGGACC AGGCATCTGG GAGTGCAGTG
301 CTGCTGCTCA GGCCCGGAGA CCGGGTGTTC CTCCAGATGC CCTCAGAACA
351 GGCTGCAGGA CTGTATGCCG GGCAGTATGT CCACTCCTCC TTTTCAGGAT
401 ATTTATTGTA TCCCATGCAC CACCACCACC ACCAC

```

B

```

10 20 30 40 50 60
GKNGGPAYEM PAFTAELTAP FPPVGPAPVKF NKLLYNGRQN YNPQTGIFTC EVPGVVYFAY
70 80 90 100 110 120
HVHCKGGNVW VALFKNNEPV MYTYDEYKKG FLDQASGSAV LLLRPGDRVF LQMPSEQAAG
130 140
LYAGQYVHSS FSGYLLYPMH HHHHHH

```

图 2 EDI-8t DNA 序列 (A) 和氨基酸序列 (B)

Fig. 2 DNA sequence (A) and the amino acid sequence (B) of EDI-8t.

1 材料与方法

1.1 引物

用于扩增编码 EDI-8t 基因片段的引物序列: 引物 1, ATCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGCAAGAATGGAGGGCCA (下划线部分为引入的 *Xho* I 酶切位点); 引物 2, ATCGAATTCATTAGTGA TGGTGATGGTGATGCATGGGATACAATAAATA (下划线部分为引入的 *Eco*R I 酶切位点), 斜体部分为引入的 6×His tag。以上引物均由上海生工生物工程有限 (Sangon) 公司合成。DNA 测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.2 酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 分子量标准、*Taq* 酶及反转录试剂盒购自天根公司; RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Gibco BRL 公

司; 毕氏酵母转化及表达试剂盒购自 Invitrogen 公司; 镍离子亲和柱购自 Pharmacia 公司; 酵母氮碱(含硫酸铵/无氨基酸) 购自 Difco 公司; 酵母抽提物购自 Oxoid 公司; 蛋白胨购自 Nihon Seiyaku 公司; 其余试剂均为国产分析纯。Endostatin 标准品购自 PEPROTECH 公司。动物实验阳性对照品: 恩度 (Endostar, 重组人血管内皮抑制素注射液, 15 mg/3 mL/支, 山东先声麦得津生物制药有限公司生产), 购自上海市肿瘤医院。

1.3 菌株、质粒、细胞株和实验动物

大肠杆菌 Top10F'、毕氏酵母 GS115 以及表达载体 pPIC9 均购自 Invitrogen 公司。牛主动脉内皮细胞 BAEC、小鼠成纤维细胞 Balb/3T3 及肝细胞癌 HepG2 细胞株为本室自存。肝癌细胞 BEL-7404、小鼠黑色素瘤细胞 B16 由上海医药工业研究院药理室保存。BALB/C 裸鼠 (SPF 级)、C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克实验动物责任有限公司。

1.4 重组表达载体构建

取新鲜人脐带, 用 Trizol 法抽提总 RNA。以此为模板, 用天根公司反转录试剂盒和引物 1、2 进行 RT-PCR。PCR 产物用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 和同样酶切处理的 pPIC9 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 16℃过夜, 连接产物转化 Top10F'感受态细胞, 涂板氨苄平板, 37℃培养过夜。筛选阳性克隆后经测序验证, 获得阳性重组质粒。

1.5 重组载体在毕赤酵母中的表达和分离纯化

将上述重组质粒 pPIC-EDI-8t 用 *Bgl* II 酶切后抽提, 电转化毕赤酵母表达菌株 GS115, 将转化产物涂布 MD 平板, 30℃培养 3~5 d。PCR 鉴定重组表达菌株, 获得阳性克隆后通过摇瓶筛选获得重组表达菌株。

摇瓶诱导的培养基和条件参照表达试剂盒说明书。发酵条件如下: 挑取在 YPD 平板上活化的转化子单克隆接入种子培养基 (每升含 13.4 g 酵母氮碱, 10 mL 甘油, 0.4 mg 生物素, 100 mL 1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g), 30℃培养过夜, 按 7% 转接入发酵培养基中 (每升中含 18.2 g K_2SO_4 , 7.45 g $MgSO_4$, 0.93 g $CaSO_4$, 26.7 mL 85% H_3PO_4 , 4.13 g KOH, 40 g 甘油, 用 28% 氨水调节 pH 至 5.0, 加入 4.35 mL PTM1 溶液) (每升

PTM1 中含 65 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 6 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 20 g $ZnSO_4$, 3 g $MnSO_4$, 5 mL H_2SO_4 , 0.2 g HBO_3 , 2 g $NaMoO_4$, 0.8 g KI, 0.2 g 生物素)。发酵过程中温度控制在 30℃, pH 为 5.0, 通气量在 1~1.5 vvm。培养约 17 h 后开始流加甲醇和 LB, 流加速度通过甲醇电极和溶氧振荡控制, 保持甲醇浓度在 3~8 g/L, 诱导约 60 h 后放罐。发酵液经离心弃沉淀后, 用截留分子量为 100 K 和 10 K 的超滤膜进行超滤浓缩, 超滤液调 NaOH 调 pH 至 8.0, 加入 Tris-HCl, NaCl 至终浓度为 20 mmol/L 和 0.5 mol/L, 过滤后上 Ni Sepharose 6 Fast Flow 进行柱层析, 收集 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑洗脱组分, 稀释 10 倍后, 用 Q sepharose Fast Flow 进行纯化, 缓冲液为 50 mmol/L, 硼砂-氢氧化钠 (pH 10.0), 收集 1 mol/L NaCl 洗脱组分, 再用 Sephadex G-25 进行脱盐, 缓冲液为 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.9)。收集组分用 C8 反相 HPLC 分析纯度。

1.6 重组蛋白体外活性研究

1.6.1 抑制内皮细胞生长检测

3~5 代的牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 培养于 DMEM+10% FBS 中。按 3 000 个细胞/孔接种于 96 孔板中, 待 2~3 h 细胞贴壁后, 吸去培养基。加入 100 μ L 含 2% FBS 的 DME, 分别加入样品和对照品至不同的待测浓度。37℃孵育 1 h, 补加含有碱性成纤维细胞生长因子的 DMEM+2% FBS 100 μ L 使 bFGF 终浓度为 5 μ g/L, 37℃培养 3 d。每孔加入 10 μ L 10 g/L 的 MTT (噻唑蓝), 37℃放置 4 h, 吸去 180 μ L 培养基, 加入 50 μ L 二甲基亚砷, 振荡溶解后测定 A_{570} 。

1.6.2 促内皮细胞凋亡的检测

将内皮细胞以一定的比例接种到 60 mm 培养皿, 等细胞贴壁后用 DMEM+2% FBS 的培养基培养 24 h。吸去培养基, 加入含 20 μ g/mL 蛋白样品 (Endostatin) 的培养基, DMEM+10% FBS 培养 24 h。PBS 清洗细胞 1 次, 胰酶消化细胞; 离心取细胞, PBS 清洗 1 次; 离心取细胞, 加入 1×结合缓冲液, 再离心, 在细胞中加入 200 μ L 的 1×结合缓冲液。加入 1 μ L 的 ApoAlert Annexin V-FITC (终

浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在黑暗处放置 10 min 后加入 10 μL PI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。流式细胞仪测定及数据处理由中国科学院生化细胞研究所流式细胞仪实验室完成。

1.6.3 促内皮细胞迁移的检测

将 6 孔 Transwell 上的膜用明胶包被 1 h, 把牛主动脉细胞按 1.0×10^5 接种在上层培养皿, 培养 2 h 等待细胞贴壁。然后在上层培养基中加入重组蛋白 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n=2$), 对照组加入等体积 PBS, 在下层培养基中加入 bFGF (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后将膜取出, PBS 清洗 2 遍, 加入甲醇固定 15 min, 再用 PBS 清洗 1 遍, 利用棉签刮去膜上表面的细胞, 这样只剩下迁移到膜下层的细胞, 再利用 Gimsa 染料染色 30 min, 大量水冲洗后在显微镜下拍照、观察计数。

1.7 重组蛋白体内活性研究

1.7.1 人体肝癌 BEL-7404 裸鼠实验

取液氮冻存的人体肿瘤肝癌 BEL-7404 细胞株, 复苏后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。经传代培养后, 取对数生长期的细胞, 用生理盐水制备成浓度为 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 细胞/mL 的细胞悬液, 接种于裸鼠右腋皮下。无菌条件下取体内生长旺盛人体肿瘤肝癌 BEL-7404 第 2 代异种移植模型的肿瘤组织, 制备成约 2 mm^3 瘤块, 于裸鼠右腋皮下接种一块, 待肿瘤生长至约 100 mm^3 后, 随机分组。所应用的饲料、垫料、笼具及接触的器械等均高压消毒后使用, 裸鼠置于层流架中饲养。rhEDI-8t 样品以 50 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、20 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、5 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量, 按照 it $\times 24$ qd (皮下连续注射 24 d) 方案给药, 空白对照组注射对照溶剂 (10 mmol/L PB)。观察和测试肿瘤大小及荷瘤鼠体重, 每 4 天用卡尺测量各裸鼠肿瘤的短径 (a) 及长径 (b), 按 $(a^2 \times b)/2$ 公式计算肿瘤体积。根据测量计算的肿瘤体积计算出相对肿瘤体积 (RTV), $\text{RTV} = V_t/V_0$ 。其中 V_0 为随机分组 (即 d_0) 时的肿瘤体积, V_t 为每一次测量 (即 d_n) 时的肿瘤体积。实验结束时, 处死各组动物, 剖取肿瘤称重, 按下列公式计算肿瘤抑制率及相对肿瘤增长率:

肿瘤抑制率 (%) = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

相对肿瘤增殖率 (%) = (给药组 RTV / 对照组 RTV) $\times 100\%$ 。

1.7.2 B16 小鼠黑色素瘤肺转移模型实验

取液氮冻存的 B16 小鼠黑色素瘤培养细胞株, 复苏后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。经传代培养后, 无菌条件下取对数生长期的 B16 小鼠黑色素瘤培养细胞, 制备成约 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液, 于 C57BL/6 小鼠尾静脉接种 0.2 mL/鼠。rhEDI-8t 样品以 50 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、20 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、5 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量, 按照 it $\times 27$ qd (静脉连续注射 27 d) 方案给药, 空白对照组注射对照溶剂 (10 mmol/L PB)。实验结束时, 处死各组动物, 剖取各组小鼠的肺脏, 计测每鼠肺脏所转移的集落数, 以各组肿瘤平均集落数, 按下列公式计算肿瘤抑制率:

肿瘤抑制率 (%) = (对照组平均集落数 - 给药组平均集落数) / 对照组平均集落数 $\times 100\%$ 。

以上 2 个肿瘤模型实验由上海医药工业研究院完成。

2 结果

2.1 重组载体的构建

根据已发现的来源于胶原蛋白非胶原结构域的血管生成抑制剂, 我们推测胶原蛋白 VIII 的 NC1 结构域可能也具有血管生成抑制活性。设计了引物, 提取脐带 RNA 后通过 RT-PCR 获得的 rhEDI-8t cDNA, 如下图 3 所示。用 *Xho* I 和 *Eco* R I 酶切后, 与经同样酶切处理的 pPIC9 载体连接, 获得重组表达, 经测序表明序列正确 (数据未显示)。

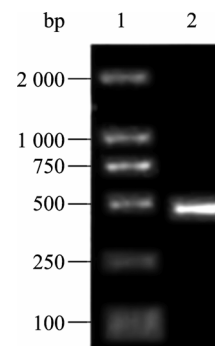


图 3 RT-PCR 获得的 EDI-8t cDNA

Fig. 3 Isolation of EDI-8t cDNA by RT-PCR. 1: DNA molecular marker. 2: EDI-8t cDNA.

2.2 重组蛋白的发酵和纯化

将上述重组质粒转化毕赤酵母表达菌株 GS115, 获得重组表达菌株。经甲醇诱导发酵后, 将发酵液离心, 超滤, 在碱性条件下进行镍柱亲和层析、阴离子交换、凝胶过滤, 最终得到的目的蛋白如图 4 所示。经分子量测定结果表明表达的目的蛋白中含极少量的二聚体, 和 Western blotting 结果一致 (数据未显示)。

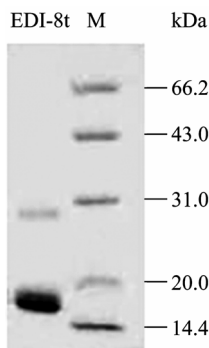


图 4 rhEDI-8t 蛋白纯品的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified rhEDI-8t.

发酵上清样品经纯化后, 用 C8 反向柱分析 EDI-8 纯度。A 液: 0.1% TFA; B 液: 0.1% TFA+100% 甲醇, 梯度 0~100%, 时间 20 min, 结果如下图 5 所示, 按峰面积积分计算纯度为 97.9%。

2.3 体外活性研究

用牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 来测定 EDI-8t 样品的生物活性^[12], 发现 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhEDI-8t 加药培养 72 h 后, BAEC 细胞形态发生明显变化, 大量细胞回缩变圆 (结果未显示); 加药后还可特异性抑制

bFGF 诱导的 BAEC 细胞的生长 (图 6A), 抑制活性和 endostatin 标准品相同。但 rhEDI-8t 蛋白对成纤维细胞 Balb/c 3T3 和肝癌细胞 BEL7404 的生长没有影响 (图 6B)。说明和 endostatin 一样, EDI-8t 只特异性地作用于内皮细胞, 对其他正常细胞的生长没有影响。

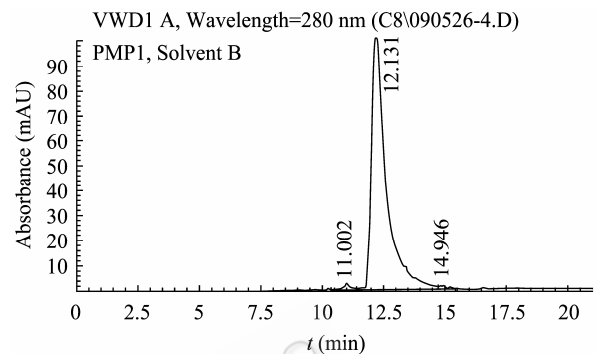


图 5 rhEDI-8t 纯化样品的 HPLC 纯度分析图
Fig. 5 Purity of rhEDI-8t analyzed by HPLC.

另外, 我们用 Transwell 实验测定了 EDI-8t 对内皮细胞迁移的影响, 孔内加入细胞和 EDI-8t 样品 (对照组孔内只加细胞), 孔下方加入 bFGF, 在 bFGF 的诱导下内皮细胞将通过孔膜上的孔迁移到膜的下方。如图 7 所示, EDI-8t 可显著抑制内皮细胞的迁移, 6.25、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDI-8t 加药培养 18 h 后, 相对空白对照组加药组迁移的细胞量大大减少。

用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 发现相比空白对照组 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加药后细胞大量发生凋亡, 凋亡率由 5.7% 增加到 41.38% (图 8)。

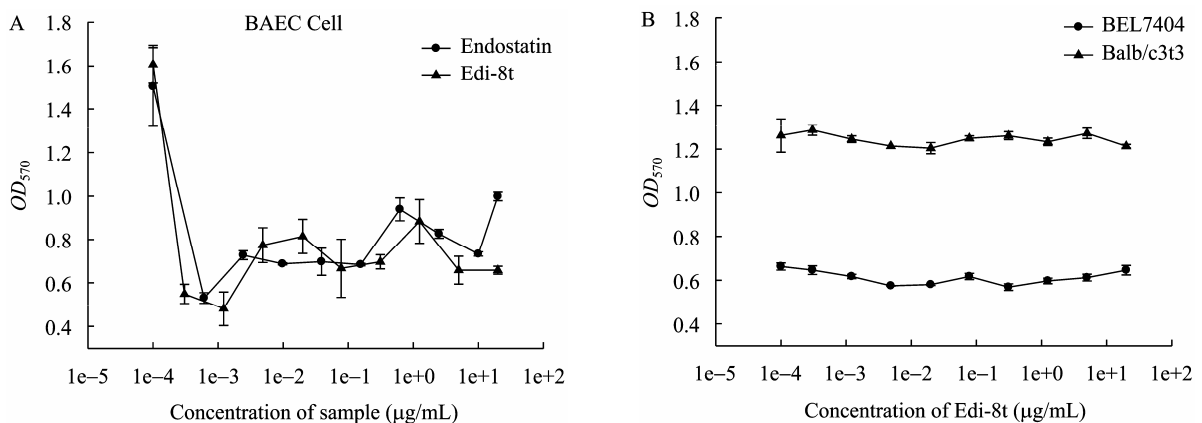


图 6 rhEDI-8t 蛋白对内皮细胞 (A) 和成纤维细胞、肝癌细胞 (B) 生长的影响
Fig. 6 Effect of rhEDI-8t on the growth of endothelial cell (A) fibroblast cell and liver cancer cell (B).

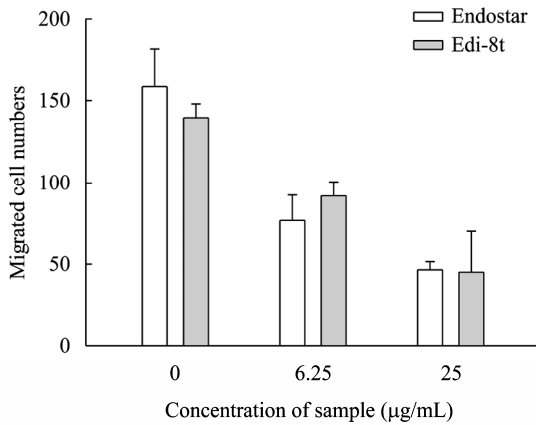


图7 rhEDI-8t 蛋白纯品对内皮细胞迁移的抑制
Fig. 7 rhEDI-8t inhibited the migration of endothelial cell.

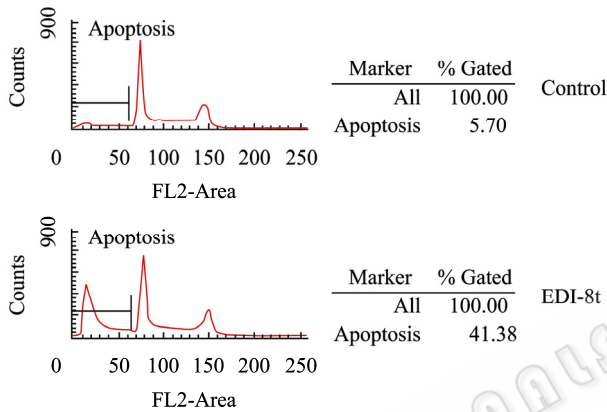


图8 rhEDI-8t 蛋白纯品促使内皮细胞发生凋亡
Fig. 8 rhEDI-8t cause apoptosis of endothelial cell.

2.4 体内活性的研究

2.4.1 rhEDI-8t 对异种移植于裸鼠的人体肿瘤肝癌生长的影响

rhEDI-8t 样品以 50 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d)、5 mg/(kg·d) 剂量, 按照 it×24qd 方案给药, 对移植于裸鼠的人体肝癌 BEL-7404 的相对肿瘤增殖率分别为 24.67%、33.11%、41.98%。阳性对照组恩度

(重组人血管内皮抑制素注射液) 以 20 mg/(kg·d) 剂量, 按照 it×24qd 方案给药, 相对肿瘤增殖率为 30.84%。实验结果详见表 1 和图 9。

rhEDI-8t 样品以 50 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d)、5 mg/(kg·d) 剂量, 按照 it×24qd 方案给药, 对移植于裸鼠的人体肝癌 BEL-7404 的肿瘤抑瘤率分别为 53.81%、51.08%、24.46%。阳性对照组恩度以 20 mg/(kg·d)剂量, 按照 it×24qd 方案给药, 抑瘤率为 51.65%。实验结果详见表 1、图 9。

实验过程中肿瘤动态变化见表 2、图 10。rhEDI-8t 样品的溶剂对照组的瘤重 (解剖时平均瘤重 1.39±0.19) g 与 PBS 对照组的瘤重 (解剖时平均瘤重 1.40±0.23) g 无明显差异。

2.4.2 rhEDI-8t 对动物肿瘤 B16 黑色素瘤肺转移生长的影响

以 50、20、5 mg/(kg·d) rhEDI-8t 的剂量对动物肿瘤 B16 黑色素瘤静脉接种肺转移的实验显示了一定的抗肿瘤疗效, 其肺肿瘤集落的抑制率分别为 35.08%、27.02%、19.24% (表 3)。而阳性对照组恩度以 20 mg/(kg·d) 剂量对肺肿瘤集落的抑制率仅为 9.8%。

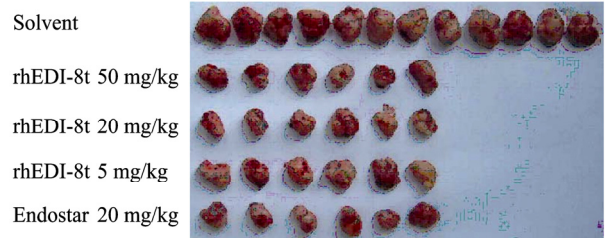


图9 rhEDI-8t 样品人体肿瘤肝癌 BEL-7404 抗肿瘤疗效肿瘤实像

Fig. 9 Tumors from the nude mouse transplanted with human liver cancer call BEL-7404 after therapy.

表 1 rhEDI-8t 样品对移植于裸鼠的人体肿瘤肝癌 BEL-7404 的抗肿瘤疗效 (以肿瘤相对增长率统计)

Table 1 Effect of rhEDI-8t on the growth of human liver cancer call BEL-7404 transplanted to nude mouse (by tumor relative growth rate)

Sample	Dosage (mg/kg)	Dosage regimen	Amount of animal (start/end)	Weight of animal (g) (start/end)	TV ($\bar{x} \pm s$, cm ³)		RTV V_n/V_0	Relative tumor growth rate(T/C%)
					$V_0(D_0)$	$V_n(D_{24})$		
Blank	Solvent	it×27qd	12/12	21.4/28.4	0.100±0.01	1.670±0.20	16.70	
rhEDI-8t	50	it×27qd	6/6	21.4/26.7	0.103±0.01	0.424±0.05	4.12**	24.67
rhEDI-8t	20	it×27qd	6/6	21.4/26.8	0.104±0.01	0.575±0.08	5.53**	33.11
rhEDI-8t	5	it×27qd	6/6	21.1/27.7	0.103±0.01	0.722±0.13	7.01**	41.98
Endostar	20	it×27qd	6/6	21.2/27.6	0.095±0.01	0.489±0.09	5.15**	30.84

** P<0.01 vs negative.

表 2 rhEDI-8t 样品对移植于裸鼠的人体肿瘤肝癌 BEL-7404 的抗肿瘤疗效中肿瘤动态变化

Table 2 Effect of rhEDI-8t on the growth of human liver cancer call BEL-7404 transplanted to nude mouse (by tumor volume)

Sample	Dosage (mg/kg)	Tumor volume (cm ³)						
		D0	D4	D8	D12	D16	D20	D24
Blank	Solvent	0.100±0.01	0.232±0.03	0.332±0.04	0.496±0.04	0.766±0.09	1.120±0.16	1.670±0.20
rhEDI-8t	50	0.103±0.01	0.140±0.01	0.162±0.01	0.200±0.02	0.280±0.05	0.353±0.05	0.424±0.05
rhEDI-8t	20	0.104±0.01	0.142±0.02	0.184±0.02	0.223±0.01	0.299±0.05	0.435±0.07	0.575±0.08
rhEDI-8t	5	0.103±0.01	0.147±0.01	0.208±0.02	0.359±0.07	0.447±0.07	0.518±0.08	0.722±0.13
Endostar	20	0.095±0.01	0.126±0.01	0.165±0.02	0.215±0.01	0.282±0.04	0.351±0.05	0.489±0.09

表 3 rhEDI-8t 样品对动物肿瘤 B16 黑色素瘤静脉接种肺转移的试验 (以肺肿瘤集落计算)

Table 3 Effect of rhEDI-8t on the transfer of tumor in metastatic model of melanoma in mice (by amount of colonies produced in the lung)

Sample	Dosage (mg/kg)	Dosage regimen	Amount of animal (start/end)	Weight of animal (g) (start/end)	Amount of tumor colony in lung ($\bar{x} \pm s$)	Inhibition rate of tumor growth (%)
Blank	Solvent	iv×27qd	20/20	19.6/26.5	45.0±10.5	
rhEDI-8t	50	iv×27qd	10/10	19.4/26.2	29.8±9.0**	35.08
rhEDI-8t	20	iv×27qd	10/10	19.4/26.1	33.5±7.1**	27.02
rhEDI-8t	5	iv×27qd	10/10	19.4/26.1	40.2±9.9	12.42
Endostar	20	iv×27qd	10/10	19.4/26.1	41.4±11.8	9.80

** $P < 0.01$ vs blank.

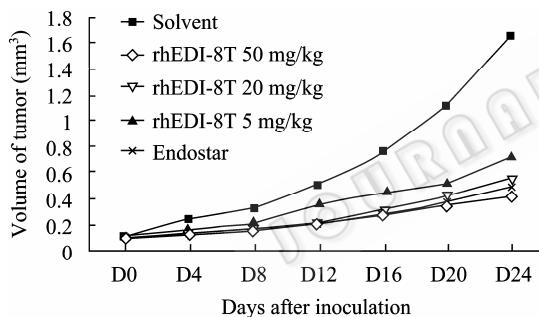


图 10 rhEDI-8t 蛋白纯品对裸鼠表皮接种的肝癌细胞生长速度的影响

Fig. 10 Effect of rhEDI-8t on the growth rate of human liver cancer call BEL-7404 transplanted to nude mouse.

3 结论

根据已发现的来源于胶原蛋白非胶原结构域的血管生成抑制剂,我们推测胶原蛋白 VIII 的 NC1 结构域可能也具有血管生成抑制活性。据此通过 RT-PCR 方法获得了基因片段,命名为 EDI-8t,并克隆到毕赤酵母表达载体。毕氏酵母作为新近发展起来的表达宿主,具有发酵上清液中杂蛋白少、可以高菌密度发酵、遗传学稳定等优点^[13]。我们将重组表达载体转化毕赤酵母后诱导分泌表达,将发酵液通过分离纯化获得蛋白纯品。经过连续多批次样

品纯度分析均大于 95% (数据未显示),分离纯化工艺非常稳定。体外实验中我们最初使用市售药恩度 (Endostatin) 作为对照蛋白,但是没有检测到恩度对内皮细胞生长的影响 (数据未显示),因而我们选择了 Peptrotech 公司生产的 endostatin 标准品最为对照蛋白。我们发现重组蛋白能特异性地抑制内皮细胞的生长和迁移,并引起内皮细胞凋亡,抑制效果与 endostatin 相当。

初步的体内实验结果表明:rhEDI-8t 样品以 50 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d)、5 mg/(kg·d) 剂量,按照 it×24qd 方案给药,对移植于裸鼠的人体肿瘤肝癌 BEL-7404 的生长有明显抑制作用,阳性对照恩度以 20 mg/(kg·d)剂量,按照 it×24qd 方案给药,也同样显示了明显的抑瘤作用。在这个模型中,EDI-8t 显示了与对照品恩度相当的抑瘤活性。但在小鼠肿瘤 B16 黑色素瘤肺转移模型中,EDI-8t 显示了和对照品恩度截然不同的抑瘤活性。rhEDI-8t 样品以 50 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d)、5 mg/(kg·d) 剂量,按照 iv×27qd 方案给药,显示了具有一定量效关系的抑瘤活性,且抑制效果明显高于对照品恩度。这些数据示 rhEDI-8t 蛋白可有效抑制裸鼠体内肝癌肿

瘤的生长,尤其是可明显抑制肺部转移肿瘤的生长,抑制率高于市售同类药物恩度。尽管动物实验结果显示了 EDI-8t 高于恩度的抗癌活性,但是 EDI-8t 相比细胞毒药物 DDP 的抗癌活性还是相差不少(数据未显示)。目前临床上一般将恩度与化疗药物(如顺铂)或放疗联和使用治疗肿瘤病人,联合用药相比单用可大大增加临床治疗效果^[14-18]。

以上结果表明, rhEDI-8t 具有良好的体内外活性,动物实验的结果优于同类上市药物恩度,具有潜在的临床应用价值和药用开发潜力,为以后进一步研究 EDI-8t 蛋白的应用提供了方向。

致谢: 上海医药工业研究院药理试验室李炳生老师、陆宏祺老师协助完成论文中的动物实验,对此深表感谢!

REFERENCES

- [1] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79**(2): 315-328.
- [2] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, **88**(2): 277-285.
- [3] Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, *et al.* Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **255**(3): 735-739.
- [4] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*, 2000, **275**(2): 1209-1215.
- [5] Sage EH. Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biology*, 1997, **7**(5): 182-186.
- [6] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med J*, 1995, **1**(1): 27-30.
- [7] Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol*, 1983, **97**(1): 153-165.
- [8] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 1990, **82**(1): 4-6.
- [9] Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, 1998, **49**: 407-424.
- [10] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *J N Eng J Med*, 1971, **285**(21): 1182-1186.
- [11] Twardowski P, Gradishar WJ. Clinical trials of antiangiogenic agents. *Curr Opin Onco*, 1997, **9**(6): 584-589.
- [12] Xin L, Zhang L, Xu R, *et al.* Expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* and the detection of its anti-angiogenic activity. *Acta Biochimica Et Biophysica Sin*, 2001, **33**(3): 291-295.
辛利, 张励, 徐韧, 等. 人血管抑素在毕氏酵母中的表达及其活性测定. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(3): 291-295.
- [13] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotech*, 1995, **6**(5): 527-533.
- [14] Luo XH, Liu W. Endostar. 2006, **15**(21): 1893-1895.
罗兴洪, 刘武, 恩度. *中国新药杂志*. 2006, **15**(21): 1893-1895.
- [15] Wang JY, Sun Y, Liu YY, *et al.* Results of randomized, multicenter, double-blind phase III trial of rh-endostatin (YH-16) in treatment of advanced non-small cell lung cancer patients. *Chin J Lung Cancer*, 2005, **8**(4): 283-290.
王金万, 孙燕, 刘永煜, 等. 重组人血管内皮抑素联合 NP 方案治疗晚期 NSCLC 随机、双盲、对照、多中心 III 期临床研究. *中国肺癌杂志*, 2005, **8**(4): 283-290.
- [16] Shi HL, Xu LY, Liu Z. Phase II clinical trial of homemade human rh-endostatin in the treatment of patients with stage IIIB-IV non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2004, **8**(7): 325-328.
史鹤玲, 徐丽艳, 刘哲, 重组人血管内皮抑制素 (YH-16) 注射液治疗晚期非小细胞肺癌期临床研究. *中国肺癌杂志*, 2004, **8**(7): 325-328.
- [17] Yang L, Wang JW, Cui CX, *et al.* Rh-endostatin (YH-16) in combination with vinorelbine and cisplatin for advanced non-small cell lung cancer: a multicenter phase II trial. *Chin New Drugs J*, 2005, **14**(2): 204-207.
杨林, 王金万, 崔成旭, 等. 重组人血管内皮抑制素 YH-16 联合药物治疗晚期非小细胞肺癌的多中心 II 期临床试验. *中国新药杂志*, 2005, **14**(2): 204-207.
- [18] Wen LC, Zh LZ. The observation of short-term effects of YH-16 combined with concurrent three dimensional conformal radiotherapy on locally advanced non-small cell lung cancer. *J Basic Clin Oncol*, 2009, **22**(3): 218-220.
温林春, 章龙珍. 恩度联合放疗治疗局部晚期非小细胞肺癌的疗效观察. *肿瘤基础与临床*, 2009, **22**(3): 218-220.