

人纤维蛋白溶酶原 kringle5(K5)抑制小鼠肝癌的血管生成和肿瘤生长

刘倩平¹, 杨霞¹, 李朝阳², 杨中汉¹, 蔡卫斌¹, 宋志宏¹葛啸虎¹, 周世豪¹, 高国全¹

(中山大学 1. 基础医学院生化教研室, 广东 广州 510000; 2. 中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】体内、体外实验观察人纤维蛋白溶酶原 kringle5(K5)对肝癌血管生成和肿瘤生长的影响。【方法】大肠杆菌中表达, 组氨酸结合柱亲和层析、纯化获得 K5 蛋白, SDS-PAGE 和 Western blot 方法鉴定 K5 蛋白的表达; MTT 法分析 K5 对牛视网膜毛细血管内皮细胞(BRCEC)和肝癌细胞株 Bel-7402、HepG2 增殖的影响; 建立皮下种植肝癌鼠模型, 瘤内注射 K5, 检测抑瘤率及肝癌组织微血管密度(MVD)。【结果】SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定获得 K5 纯化蛋白; K5 特异性地抑制 BRCEC 的增殖, $IC_{50}=160$ nmol/L, 而对肝癌细胞株 Bel-7402、HepG2 的增殖无抑制作用; K5 显著抑制小鼠肝癌生长, 治疗组肝癌组织 MVD 明显低于对照组。【结论】K5 抑制移植性小鼠肝癌血管生成和肿瘤生长, 特异性抑制血管内皮细胞的增殖可能是 K5 抑制肝癌血管生成的主要机制。K5 具有治疗肝癌的潜在临床价值。

关键词: 纤溶酶原 K5; 肝癌; 血管生成; 内皮细胞

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0380-04

Inhibition of K5 on Neovascularization and Growth of Mouse Hepatocarcinoma

LIU Qian-ping¹, YANG Xia¹, LI Chao-yang², YANG Zhong-han¹, CAI Wei-bin¹, SONG Zhi-hong¹,
GE Xiao-hu¹, ZHOU Shi-hao¹, GAO Guo-quan¹

(1. Department of Biochemistry, Preclinical Medical College, 2. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of human plasminogen kringle 5(K5) on the neovascularization and growth of hepatocarcinoma, *in vitro* and *in vivo*.【Methods】K5 was expressed in *E. coli* BL-21(DE3) induced by IPTG and purified by Ni^{2+} -His Bind Resin affinity chromatography. The purity and identity of K5 is examined by SDS-PAGE and Western blot analysis. The anti-proliferative effects of K5 on primary bovine retinal capillary endothelial cell (BRCEC), hepatoma Bel-7402 and HepG2 cell lines were examined by MTT assay. To evaluate K5 activity *in vivo*, the mouse hepatocarcinoma xenograft model was established by injection of mouse hepatoma cells subcutaneously into the oter of Kunming mice. The mice then received a direct intratumoral injection of K5 or PBS as control. The tumor suppressing rate and microvessel density (MVD) in hepatoma tissues were assayed.【Results】The purity of recombinant K5 was over 90% according to the analysis of SDS-PAGE and Western blot analysis. K5 inhibited proliferation of primary endothelial cells in dose-dependent manner, IC_{50} is 160 nmol/L, but no effect on Bel-7402 and HepG2 tumor cell lines, suggesting cell type-specific inhibition. K5 significantly inhibited the growth of hepatocarcinoma xenograft and decreased microvessel density (MVD) in hepatoma tissues, compared with PBS control group ($P < 0.05$).【Conclusion】K5 inhibits the neovascularization and the growth of hepatocarcinoma in xenografted hepatocarcinoma model of Kunming mice. The effect may be associated with its specifically anti-proliferation on endothelial cell. These results suggest that angiogenesis inhibitor of K5 could have therapeutic benefits in hepatocarcinoma.

Key words: plasminogen kringle 5; hepatocarcinoma; neovascularization; endothelial cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4): 380-383]

收稿日期: 2004-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NO.30370313); 广东省自然科学基金资助项目(A04009426); 中华医学基金会资助项目(CMB-SUMS 学者项目 98-677); 教育部回国人员基金资助项目(2003); 广东省医学科研基金资助项目(A2003153); 广州市科技攻关重点基金资助项目(2003Z2-E4091)

作者简介: 刘倩平(1973-), 女, 湖南衡阳人, 硕士生; 高国全, 教授, 通讯作者, 课题负责人. E-mail: gaog@gzsums.edu.cn

人纤维蛋白溶酶原 kringle5 (简称纤溶酶原 K5, 或称 K5)是目前发现的相对分子质量较小、性质稳定、活性最强的新型的内源性血管增生抑制因子之一^[1]。既往实验研究主要集中在血管增生性眼病动物模型上,研究表明 K5 能够显著抑制视网膜血管增生动物模型的血管增生^[2-4]。K5 在肿瘤治疗方面的研究却少有报道。本研究运用基因工程方法获得人纤溶酶原 K5 纯化蛋白,观察 K5 对血管内皮细胞、肝癌细胞增殖的影响,并在小鼠移植性肝癌体内模型上观察了 K5 抑制肝癌血管生成和肿瘤生长的效应,为深入探讨 K5 作用机制及其临床应用提供基础性研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 和 T4 DNA 连接酶 (美国 New England BioLabs); *Pfu* DNA 聚合酶 (美国 STRATAGENE 公司); PCR 引物和 DNA 片段测序 (上海生物工程有限公司); His-tag 鼠源性单克隆抗体 (一抗)、HRP 标记的抗鼠多克隆抗体 (二抗, 美国 Oncogene 公司); His Bind Resin 和 His Bind Buffer (美国 NOVAGEN 公司); 克隆菌株 *E.coli* BL21、表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 和表达载体 pET-22b (+) 质粒均购自美国 NOVAGEN 公司。培养 DMEM、RPMI1640 及 MTT 为 GIBCO 公司产品, Von Willebrand (VIII) 因子多克隆抗体购自美国 Dako 公司, 过氧化物酶标记的二 S-P 超敏试剂盒、二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品。

1.2 实验动物

昆明小鼠 50 只, 雌雄各半, 4~6 周鼠龄, 体重 19~20 g, 购自广东省实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2003-0002。瘤源: 腹水型肝癌 (hepatoma) 小鼠, 购自中山大学肿瘤防治中心。均饲养于无特殊病原环境。

1.3 细胞

人肝癌细胞株 Bel-7402、HepG2 由本室保存, 采用常规传代培养; 牛视网膜微血管内皮细胞 (BRCEC) 按文献[3]从牛眼中分离得到, 原代培养。其形如鹅卵石, 取 BRCEC 第 3 代细胞, Von Willebrand (VIII) 因子抗体, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化氢酶 (SP 免疫组织化学方法) 法进行鉴定, 被证实为 BRCEC。

1.4 pET-22b(+)/K5 重组体的构建

以人肝细胞总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 方

法扩增得到人 K5 cDNA 片断。PCR 上游引物为 5'-TGTGAATTCG CCATGTAGAGACTCCTTC-3', 其 5' (端含 *EcoR* I 识别序列 (5'-G↓AATTC-3')); 下游引物 5'-GGAAAGCTTGGCAGACTGAGGGACA TCACA G-3'), 5'端含 *Hind* III 识别序列 (5'-A↓AGCTT-3')。PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后定向克隆进入 pET22b(+) 载体, 在 K5 cDNA 插入位点的 5'端具有编码信号引导肽的序列, 在 3'端含有编码 6 个组氨酸的序列。pET-22b (+)/K5 重组体连接的准确性和正确读码框架均经 DNA 序列测定确认。

1.5 K5 的表达、纯化和鉴定

将 pET22b (+)/K5 重组体导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 株中, IPTG 低温 (25 °C) 10~14 h 诱导蛋白表达, 用溶菌酶裂解细菌, 使蛋白释放, 然后离心分离蛋白质, 通过组氨酸结合柱纯化 K5 蛋白, K5 重组体蛋白的纯度和鉴定采用 SDS-PAGE 和 Western blot 方法。

1.6 K5 对 BRCEC 和肝癌细胞 Bel-7402、HepG2 增殖的影响

取对数生长期的细胞 BRCEC、Bel-7402、HepG2, 以 1×10^4 /mL 的细胞密度接种到 24 孔平板, 细胞贴壁 6 h 后, 吸出上清, 加入含 K5 的无血清培养液 600 μ L, 肿瘤细胞组 K5 的终浓度分别为 160、320、640、1280、2560 nmol/L, BRCEC 细胞组 K5 的终浓度分别为 40、80、160、320、640 nmol/L, 阴性对照组均为等量无血清培养液, CO₂ 孵箱培养 68 h, 加 MTT (5 mg/mL) 60 μ L/孔, 继续孵育 4 h, 吸出上清液, 每孔加入 600 μ L DMSO, 分光光度计在 570 nm 处测定每孔的吸光度 (A)。

1.7 K5 抑制小鼠肝癌实体瘤生长的效应

处死肝荷瘤种鼠, 抽取乳白色浓稠腹水, 加无菌生理盐水混匀稀释至细胞数 1×10^7 /mL, 并以 0.2 mL 的量接种于昆明 (KM) 小鼠右前肢腋下, 接种 72 h 后, 小鼠腋下肿瘤直径 3~4 mm, 随机分 5 组, 每组小鼠 10 只, 以无菌的 PBS 为溶剂, K5 等比稀释成 1.25、2.50、5.00、10.00 mg/kg 4 组的药物, 3 d 1 次, 连续 3 次, 分别瘤内注射 0.3 mL 相应浓度的药物, 对照组给 PBS, 第 11 天处死小鼠, 剥瘤测定瘤质量, 以各处理组瘤的均质量与对照组瘤的均质量比较, 计算抑瘤率, 抑瘤率 = $(1 - \text{治疗组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}) \times 100\%$ 。抑瘤率 $\geq 30\%$ 为有效。

1.8 肝癌组织微血管密度检测

小鼠肝癌瘤块用 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 继而二甲苯, 梯度酒精脱蜡, 采用 Von

Willebrand因子抗体,链霉素抗生物素蛋白-过氧化氢酶(SP免疫组织化学方法)法进行鉴定,DAB显色,苏木素复染,棕黄色环形为血管阳性表达。肿瘤间质微血管密度(micro-vessel density,MVD)的测定参照Weidner方法,即先在低倍镜($\times 10$)下扫视整个切片,选取高血管密度区,再在高倍镜($\times 40$)下计数被染成棕黄色的血管数目,取3个视野的平均值。

1.9 统计学处理

所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,通过SPSS11.0软件检测完成。采用方差分析,并用最小有意义差异 t 检验(least significant difference- t ,LSD- t)进行均数间的多重比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 K5的构建、表达和纯化

K5在大肠杆菌BL21(DE3)株中表达,组氨酸亲和柱纯化,SDS-PAGE考马斯亮蓝染色显示纯化K5相对分子质量 $M_r=16\times 10^3$,与从序列理论推算而来的相对分子量相符合(图1A),经凝胶成像系统扫描分析,K5纯度在90%以上;采用组氨酸特异性抗体进行Western blot分析进一步证实了该条带为K5重组蛋白(图1B),1 L培养物可获得15 mg纯化K5蛋白。

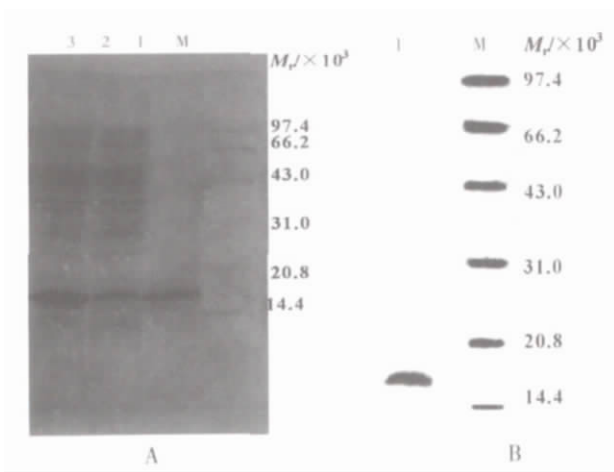


图1 重组K5的表达和纯化

Fig.1 expression and purification of K5 recombinant protein

A: SDS-PAGE M: protein marker; 1: purified K5; 2: before IPTG induction; 3: after IPTG induction; B: Western blot; M: protein marker; 1: purified K5

2.2 K5对内皮细胞特异性抑制作用

K5蛋白能特异性地抑制BRCEC增殖,而对肝癌细胞Bel-7402、HepG2增殖则无明显影响。K5

蛋白在40 nmol/L即能抑制BRCEC的增殖,当K5浓度达80 nmol/L时,差别具有统计学意义($P<0.01$),这种对BRCEC增殖抑制作用随着K5浓度的增加而增大,呈明显地浓度依赖关系, IC_{50} 为160 nmol/L(图2)。

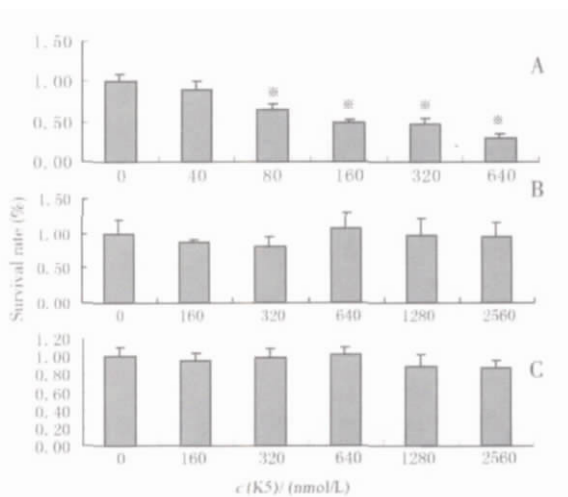


图2 K5对BRCEC和肝癌细胞Bel-7402、HepG2增殖的影响

Fig.2 Effect of K5 on the proliferation of BRCEC, hepatoma Bel-7402 and HepG2 cell lines

A: BRCEC; B: Bel-7402; C: HepG2. * $P<0.01$, $n=3$

2.3 K5抑制小鼠肝癌实体瘤生长

第11天处死小鼠,称鼠质量,PBS对照组与各相应浓度药物组鼠质量均在23~26 g,统计学分析无明显差异;剥瘤称质量,结果PBS对照组与不同浓度药物组瘤均质量与K5给药量呈明显地剂量依赖关系,K5能够抑制小鼠肝癌实体瘤生长。K5剂量为1.25 mg/kg时,对肿瘤生长只有轻微抑制作用;剂量为5.00 mg/kg抑瘤率为34.18%,差异有统计学意义($P<0.01$),剂量为10.00 mg/kg时,抑瘤率达到46.24%,对肿瘤的生长有显著的抑制作用(图3,表1)。

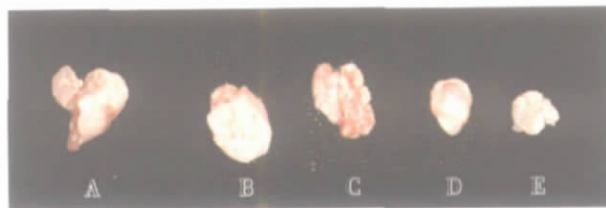


图3 K5抑制小鼠肝癌生长形态表现

Fig.3 The inhibition of K5 on hepatocarcinoma growth in mice

A: PBS group; B: K5 1.25 mg/kg group; C: K5 2.50 mg/kg group; D: K5 5.00 mg/kg group; E: K5 10.00 mg/kg group

表1 K5 抑制小鼠肝癌实体瘤的生长作用

Table 1 The inhibition of K5 on hepatocarcinoma growth in mice (n=10)

$D_{K5}/(\text{mg/kg})^{1)}$	Tumor mass(g, $\bar{x} \pm s$)	Inhibition of Tumor(%)	P
PBS	1.32 $\pm$ 0.17		
1.25	1.13 $\pm$ 0.13	14.66	< 0.05
2.50	1.08 $\pm$ 0.36	18.67	0.08
5.00	0.87 $\pm$ 0.15	34.18	< 0.01
10.00	0.71 $\pm$ 0.29	46.24	< 0.01

1) Prescription: i.p. $\times$ 3, q3d; 2) $F = 8.884$, $P < 0.001$

2.4 K5 抑制肝癌血管生成的效应

①PBS 对照组:MVD 为 (23.77 $\pm$ 1.35);②K5 治疗组:1.25、2.50、5.00 和 10.00 mg/kg 组,MVD 分别是 (22.53 $\pm$ 2.58)、(22.53 $\pm$ 1.51)、(17.43 $\pm$ 3.41) 和 (12.57 $\pm$ 1.69)。K5 5.00 mg/kg、10.00 mg/kg 两个治疗组 MVD 明显少于 PBS 对照组, $P < 0.05$, 说明 K5 具有抑制肿瘤微血管生成作用。

3 讨 论

血管生成是恶性实体瘤主要病理特征之一, 血管生成在肿瘤的发生、发展过程中扮演重要的角色。肿瘤的生长依赖于血管生成, 血管生成成为恶性肿瘤的迅速增殖提供充足的营养物质, 同时肿瘤的转移也依赖于血管生成, 血管生成过程是原位癌向侵袭性癌转变的关键点, 并且也为肿瘤播散建立了一条直捷路径, 加速肿瘤的转移过程。所以抑制肿瘤血管生成, 可以抑制肿瘤的生长及转移^[5,6]。

K5 是纤溶酶原(plasminogen)的水解片段, 人纤溶酶原含有 5 个环状结构域(kringle), 水解后可产生一组具有抑制血管增生的小分子片段: 血管抑素(kringle1-4)、kringle1-5、kringle1-3 和 kringle5 (K5)^[7,8]。血管抑素作为研究最早的内源性血管抑制因子而为广大研究者所熟悉, 血管抑素用于肿瘤的治疗已进入临床 I 期试验, 但血管抑素的分子量较大且性质较不稳定^[9]。较之血管抑素(相对分子质量 $M_r \approx 45 \times 10^3$), K5 具有相对分子质量小 ($M_r = 16 \times 10^3$)、活性稳定, 具有更强的抑制血管内皮细胞增殖活性的优点^[1]。K5 的功能和作用目前主要局限在眼血管增生领域, 在肿瘤治疗方面的研究少有报道。我们以往的研究发现 K5 具有抑制糖尿病性视网膜病血管增生的作用^[2], 提示 K5 可能对肿瘤血管生成和肿瘤生长也有作用。因此, 本研究拟探讨 K5 在细胞和动物整体水平对肝癌血管生成和肿瘤生长的影响。

本研究观察 K5 对血管内皮细胞 BRCEC、肝癌细胞 Bel-7402 和 HepG2 体外增殖的影响, 结果表明 K5 特异性抑制血管内皮细胞增殖而对肝癌细胞的增殖没有作用。为进一步探讨 K5 抗肿瘤生长作用, 本研究在体外实验基础上建立了小鼠皮下移植性肝癌实体瘤模型, 瘤内注射 K5, 观察 K5 体内抗肿瘤生长及抑制血管生成的效应, 结果证实 K5 具有显著抑制肝癌血管生成及肿瘤生长的效应。

本研究首次证明了 K5 具有抑制肝癌实体瘤小鼠模型肿瘤血管生成及肿瘤生长的效应, 提示 K5 具有治疗肝癌的潜在临床价值, 为靶向抑制肿瘤新生血管生成提供新的有效候选药物。

(本文在资料收集、实验室准备方面得到了陈静和骆晓枫两位老师的协助, 谨此致谢)

参考文献:

- [1] Cao Y, Chen A, An SS, *et al.* Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36):22924-8.
- [2] Zhang D, Kaufman PL, Gao G, *et al.* Intravitreal injection of plasminogen kringle 5, an endogenous angiogenic inhibitor, arrests retinal neovascularization in rats[J]. Diabetologia, 2001, 44(6):757-65.
- [3] Gao G, Li Y, Gee S, *et al.* Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(2-3):9492-7.
- [4] Gao G, Li Y, Zhang D, *et al.* Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. FEBS Lett, 2001, 489(2-3):270-6.
- [5] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、协和医科大学联合出版社出版, 1997. 163-9.
- [6] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [7] 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[J]. Cell, 1994, 79(2):315-28.
- [8] Castellino FJ, McCance SG. The kringle domains of human plasminogen[J]. Ciba Found Symp, 1997, 212: 46-65.
- [9] Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target[J]. Drug Discov Today, 2001, 6(19):1005-24.

(编辑 张敏瑞)