

改良内皮抑素对人脐静脉内皮细胞抑制作用的实验研究*

肖楠 田霏 罗鑫 齐东华 倪双 刘平[△]

(哈尔滨医科大学第一临床医学院眼科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨改良内皮抑素(RGDRGD-ES)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的抑制作用,摸索 RGDRGD-ES 对 HUVEC 细胞抑制作用的相对最佳作用浓度和时间。方法 通过快速定点诱变 PCR 方法获得含有 RGDRGD 膜序的改良人内皮抑素基因,并构建其原核表达载体。表达、纯化改良内皮抑素(RGDRGD-ES) 运用 MTT 法和流式细胞仪检测 RGDRGD-ES 对人脐静脉内皮细胞的抑制作用。结果 1.诱变了 ES 基因,获得了改良的 RGDRGD-ES 基因,并成功构建其原核表达载体。2.获得了 RGDRGD-ES 蛋白。3.改良的 RGDRGD-ES 能够有效抑制人脐静脉内皮细胞的生长($P < 0.01$) 抑制率随着药物浓度(10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$)的增加和作用时间(24 h、48 h、72 h)的延长而逐渐增加,具有浓度和时间依赖性($P < 0.01$);而 30 $\mu\text{g/ml}$ 与 40 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 组间、72 h 与 96 h 组间无明显差异($P > 0.05$)。4.细胞凋亡率(作用 24 h)具有药物浓度(10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$)依赖性($P < 0.01$),30 $\mu\text{g/ml}$ 与 40 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 组间凋亡率无明显差异($P > 0.05$)。结论 成功构建了改良 RGDRGD-ES 基因的原核表达载体, RGDRGD-ES 蛋白在 30 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用 72 小时条件下能够有效抑制人脐静脉内皮细胞的生长,改良内皮抑素(RGDRGD-ES)对 HUVEC 的抑制作用较 ES 明显提高。

关键词 改良内皮抑素(RGDRGD-ES);内皮抑素(ES);人脐静脉内皮细胞(HUVEC);角膜新生血管(CNV)

中图分类号 Q813 R772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)14-2632-06

Inhibitory Effect of Modified Endostatin on Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

XIAO Nan, TIAN Pei, LUO Xin, QI Dong-hua, NI Shuang, LIU Ping[△]

(Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect of RGDRGD-ES on HUVEC in vitro. **Methods:** A modified human endostatin gene containing RGDRGD motif was obtained by rapid site-directed mutagenesis. The RGD mutated endostatin gene was expressed by a prokaryotic expression vector and purified by Ni-NTA resin. Automated gene sequencing and Western blot analysis were used to identify RGDRGD-ES gene and protein respectively. HUVEC cultured in vitro were exposed to RGDRGD-ES protein at different concentrations (0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$) and ES at 30 $\mu\text{g/ml}$ for different time duration (24 h, 48 h, 72 h, 96 h). Cell viabilities were monitored by 3,4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The apoptosis rates at 24 h were detected by flow cytometric analysis. **Results:** Modified endostatin gene containing RGDRGD motif was confirmed by automated gene sequencing. The prokaryotic expression vector containing RGDRGD-ES was successfully constructed, and RGDRGD-ES expression was identified by Western blot. RGDRGD-ES clearly reduced HUVEC viability compared to control group ($P < 0.01$) and ES group ($P < 0.01$). RGDRGD-ES induced loss of cell viability by a dose dependant manner among 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ groups ($P < 0.01$), while no significant differences were found in 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ groups ($P < 0.01$). RGDRGD-ES also induced loss of cell viability by a time dependant manner within 72 h ($P < 0.01$), however, there was no significant difference between 72 h and 96 h ($P > 0.05$). Consistent with MTT assay, RGDRGD-ES induced HUVEC apoptosis by a dose dependant manner among 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ groups ($P < 0.01$), while no significant differences were found in 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** RGDRGD-ES can be obtained by rapid site-directed mutagenesis and prokaryotic expression vector. RGDRGD-ES inhibits HUVEC cell viability and induces cell apoptosis significantly. The optimal dose and time of RGDRGD-ES incubation are 30 $\mu\text{g/ml}$ and 72 h. Modified endostatin with the RGDRGD motif is more effective than ES in inhibition of HUVEC cell viability and induction of HUVEC cell apoptosis.

Key words: RGDRGD-endostatin (RGDRGD-ES); Endostatin (ES); Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); Corneal neovascularization(CNV)

Chinese Library Classification(CLC): Q813, R772.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)14-2632-06

* 基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(QC2010113)

作者简介 肖楠(1984-)女 硕士研究生 主要研究方向 角膜病 晶状体病 E-mail: xiaonan9907@163.com

[△]通讯作者 刘平 E-mail: Ping_Liu53@hotmail.com

(收稿日期 2012-03-01 接受日期 2012-03-26)

前言

角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)是角膜移植术后排斥反应等疾病发生的高危因素^[1,2],也是最难治愈的眼病之一^[3]。抑制新生血管生成是治疗这类疾病的关键。内皮抑素(endostatin, ES)是近几年发现的一种内源性血管生成抑制剂,具有特异性^[4]。近年来,国内外学者对内皮抑素的研究多在对肿瘤的治疗方面^[5]。CNV形成的过程、结构特征等与肿瘤组织的新生血管相似,因此可以推测ES对CNV也具有抑制作用。改良内皮抑素(RGDRGD-ES)具有重复RGD序列,与整合素的结合能力增强,竞争性地与细胞表面的整合素受体相结合,抑制细胞-细胞和细胞-基质的粘附过程,从而抑制新生血管内皮细胞的黏附,更有效地发挥了其抑制新生血管的作用。该实验通过改良内皮抑素(ES)获得RGDRGD-ES,作用于人脐静脉内皮细胞,探讨其对角膜新生血管的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器和试剂 内皮抑素(endostatin, ES)、PCI载体、感受态大肠杆菌JM109和PCI/endostatin由本实验室保存,胎牛血清、DMEM(美国GIBCO);二甲基亚砷(DMSO,美国Sigma公司);MTT(瑞士Fluka公司);DNA marker、限制性内切酶Sal I和Xba I(日本Takara公司);T4连接酶、DpnI酶(美国New England Biolabs公司);pfu DNA polymerase(美国promega公司);Tryptone、Yeast Extract(美国Oxid公司);氨苄青霉素IPTG、X-Gal(哈尔滨宏博生物有限公司);胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(上海华舜公司);PCR仪、电泳仪、酶标分析仪(德国Eppendorf公司);175型CO₂培养箱(日本三洋公司);倒置显微镜(日本Olympus);Canon照相机(日本G10);台式低速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 PCI-endostatin质粒两端,分别为引入的Sal I和Xba I酶切位点,上游增添了加强表达的GCCAGC序列。本研究设计诱变RGDRGD的背对背引物^[6],TF: 5'-CGGGGCGA-CCGCGGGGACTTCCAGT-3'; TR: 5'-ACTGGAAGTCCCCGG-CGGTGCAGCCCG-3'。

1.2.2 快速定点诱变PCR和乙醇沉淀反应 以pCI/endostatin作为模板,建立定点诱变PCR的反应体系,反应体系为25 μl。其中模板为0.05 μl, 25 mmol/L dNTP 1.5 μl, 上、下游的突变引物各为0.5 μl, 3 U/μl Pfu高保真酶为0.5 μl, 10× pfu Buffer 2.55 μl。反应的条件为预变性为95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 56℃ 60 s, 72℃ 5 min, 共15个循环, 72℃延伸10 min。25 μl定点诱变PCR产物移入1.5 ml离心管中,加入25 μl ddH₂O补充体积至50 μl。加入5 μl的3 M CH₃COONa(Ph 5.2)后,再加入-20℃预冷的125 μl无水乙醇,混匀,过夜。次日4℃ 12,000 rpm×10 min离心后,回收沉淀。加入-20℃预冷的95%乙醇125 μl,混匀,4℃ 12,000 rpm×10 min离心后,回收沉淀。加入-20℃预冷的70%乙醇250 μl,混匀清洗沉淀,4℃ 12,000 rpm×10 min离心后,弃上清后室温下干燥。

1.2.3 DpnI酶消化和endostatin突变子克隆载体的构建与鉴定 向上述乙醇沉淀后的离心管内加入1 μl DpnI酶, 10× NEB Buffer 2 μl,再加入ddH₂O补充体系至20 μl。37℃条件下水浴2 h。取10 μl DpnI消化产物转化感受态大肠杆菌JM109,涂布含有氨苄青霉素、X-Gal和IPTG LB平板,37℃,温箱孵化12~16 h,取单个蓝斑菌落后接种于LB培养液中,37℃ 200 r/min条件下振荡培养10 h~12 h,精提质粒,按Invitrogen公司的产品说明书操作。提取的质粒分别用双酶切和基因测序进行鉴定所筛选的阳性克隆。

1.2.4 表达质粒pET32a(+)/Endostatin的构建及鉴定 PCR扩增阳性克隆,克隆RGDRGD-ES的反应完毕后,通过10 g/L琼脂糖电泳鉴定PCR产物,回收DNA片段(约2100 bp)。用Sal I和Xba I双酶切PCR产物和pET32a环形质粒后,回收酶切片段,采用T4连接酶进行连接,连接的产物转化感受态大肠杆菌JM109,涂布含氨苄青霉素的LB平板,取重组菌落培养后提取质粒分别经过PCR、双酶切后,进行基因测序(上海英俊生物公司)鉴定筛选的阳性克隆。

1.2.5 融合蛋白的诱导表达和Western blot鉴定 取含有重组原核表达载体的单个菌落接种于LB培养液,振荡培养过夜(37℃ 200 r/min),以1%浓度接于5 ml LB培养基中,37℃条件下进行150 r/min振荡培养至A_{600nm}为0.6时,加IPTG使终浓度至1.0 mmol/L诱导表达4 h后,取1 mL检测诱导结果。将其移入1.5 mL Eppendorf管6000 r/min离心5 min,收集菌液后,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),对PDGF的表达量进行薄层扫描检测。将上述的表达产物通过15% SDS-PAGE后移至硝酸纤维素膜上,10 g/L牛血清白蛋白封闭过夜后,抗endostatin抗体进行Western blot鉴定。阴性对照菌液以同样方法处理。

1.2.6 Ni亲和层析柱纯化表达蛋白 将含有重组质粒PET32a/endostatin的表达菌株接种于500 mL LB中进行大量表达,离心后收集诱导表达后的细菌,超声波破碎菌体,再离心沉淀包涵体,缓冲液A(8 mol/L尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.1 mol/L pH6.3 Tris-HCL)裂解包涵体,裂解的上清过Ni-NTA树脂层析柱,缓冲液A和缓冲液B(8 mol/L尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.1 mol/L pH6.3 Tris-HCL)洗柱至A280nm小于0.01,缓冲液C(8 mol/L尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.1 mol/L pH6.3 Tris-HCL, 250 mmol/L咪唑)对目的蛋白进行洗脱。行SDS-PAGE电泳分析,同时逐步降低尿素的浓度,透析去除纯化蛋白溶液的尿素,使变性的蛋白在此过程中自然复性。-70℃保存纯化的RGDRGD-ES。

1.3 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)复苏后完全培养液(高糖DMEM,含20%胎牛血清,100 μg/ml青链霉素)培养,置于37℃、5%CO₂孵箱中培养,细胞贴壁生长,2-3天细胞生长达瓶底的80%-90%时,进行传代。实验采用处于对数生长期的细胞,每次试验均采用同一代细胞进行。

1.4 MTT检测(3,4,5-dimethyliazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)

将200 μl细胞悬液(约2×10⁴个/ml)接种于96孔培养

板,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 24 h,待细胞贴壁良好后,弃掉原培养液,加入无血清的 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞同步化生长。实验 1 组为阴性对照组,加入 200 μl DMEM 完全培养液,2-6 组加入 200 μl 工作浓度依次为 10 μg/ml、20 μg/ml、30 μg/ml、40 μg/ml、50 μg/ml RGDRGD-ES 的培养液,第 7 组加入 200 μl 工作浓度为 30 μg/ml 的 ES,作为阳性对照组。每一浓度均设 5 个复孔,分别在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h、48 h、72 h、96 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl,继续原条件培养 4 h,弃掉上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)200 μl,将培养板置于脱色摇床上低速震荡 10 分钟,在全自动酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度。上述实验操作重复三次。

1.5 流式细胞仪检测

使用细胞膜磷脂酰丝氨酸 Annexin-V/碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染试剂盒检测细胞的凋亡量。将 5 ml 单细胞悬液(1×10^5 个/ml)接种于 T25 细胞培养瓶中,培养 24 h 后,弃掉培养液后,加入工作浓度为 10 μg/ml、20 μg/ml、30 μg/ml、40 μg/ml、50 μg/ml 的 RGDRGD-ES、30 μg/ml 的 ES,每个浓度下设四组。作用 24 h 后,胰酶消化收集细胞。调整细

胞密度后,取 400 μl(1×10^6 个/ml)细胞悬液按 Annexin-V/碘化丙啶双染试剂盒的说明书进行操作处理细胞,1 h 内使用流式细胞仪进行检测,结果取四组均值数据进行分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS15.0 软件分析系统对所得数据进行分析处理。系列浓度 RGDRGD-ES 不同作用时间下对 HUVEC 细胞的抑制率,采用两因素 7×4 方差分析设计;组间及组内采用 LSD 方法两两比较,建立回归方程,计算 72 h 半数抑制率,即 50% 抑制浓度(IC₅₀)。流式细胞仪测定 RGDRGD-ES 导致 HUVEC 细胞凋亡采用单因素方差分析设计。

2 结果

2.1 Endostatin 突变体测序

通过快速定点诱变 PCR 方法,获得的 endostatin 突变体测序结果显示野生型 endostatin 核酸序列中编码第 27 位异亮氨酸的 ATC 已经变为编码天冬氨酸的密码子 GAC,编码 30 位的丙氨酸的 CCG 已被去掉,其他序列无变化。这样在野生 endostatin 中产生了 RGDRGD 的序列,命名为 pCI-RGDRGD-endostatin。测序结果如图 1 所示。

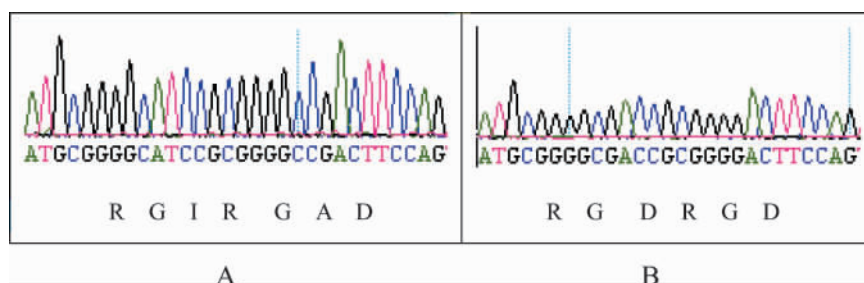


图 1 改良前后 endostatin 突变子序列分析

Fig.1 The sequence analysis of the endostatin and modified RGDRGD-ES genes :A 野生型 endostatin 碱基测序结果。B:诱变型 RGDRGD-ES 基因碱基测序结果。测序结果显示,通过删除一个丙氨酸(A),将异亮氨酸(I)改变成天冬氨酸(D),将 endostatin 改变成含 RGDRGD 模序的 RGDRGD-ES。

A:The sequence analysis of the endostatin gene . B :The sequence analysis of the modified RGDRGD-ES gene . The sequence analysis indicated that a modified endostatin gene was obtained by delete alanine ala (A) and isoleucine ile(I) changed to aspartic acid asp(D),and that the RGDRGD motif was successfully constructed.

2.2 原核表达载体(pET32a-ES/ pET32a-RGDRGD-ES)的构建

2.2.1 PCR 鉴定 XbaI、SalI 双酶切 pCI-ES/pCI-RGDRGD-ES,回收 550 bp 的 endostatin/RGDRGD-ES 基因,T4 连接酶连入 pET32a 的 XbaI、SalI 位点,构建含 ES/RGDRGD-ES 基因的原核表达载体 pET32a-ES/pET32a-RGDRGD-ES,转化大肠杆菌 JM109,筛选出阳性克隆。扩增抽提 pET32a-ES/pET32a-RGDRGD-ES 后,分别以 ES 特异性引物 F/R 进行 PCR 扩增,扩增产物在 1%琼脂糖凝胶电泳,可得一约 550 bp 的单一一条带,与 ES 基因大小一致,且电泳未见非特异性扩增带,证明扩增是特异的(图 2)。

2.2.2 双酶切鉴定 分别用 XbaI、SalI 双切 pET32a-ES 和 pET32a-RGDRGD-ES 质粒,可获得 550 bp 及约 4.0 kb 的两条带(图 3),与预期结果一致。

2.2.3 Western blot 鉴定 在 37℃ 200 r/min 通气振荡培养至 OD600=0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mM,继续通气振荡 4 h,4000r/min 离心 20 min 收集菌体,可获得目的蛋白。将诱变与

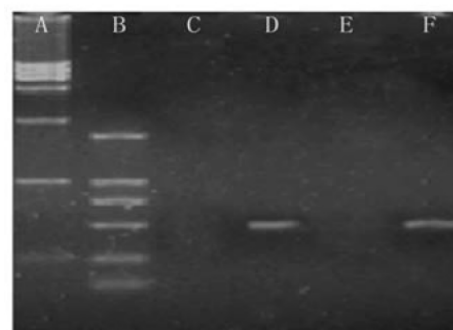


图 2 原核表达载体 pET32a-ES/ pET32a-RGDRGD-ES 的 PCR 结果
Fig.2 PCR result of pET32a-ES/ pET32a-RGDRGD-ES :A:15,000 DNA Marker ;B:2,000 DNA Marker ;C:阴性对照(pET32a-T) ;D:以 pET32a-ES 为模板扩增的 PCR 产物 ;E 阴性对照 ;F :以 pET32a-RGDRGD-ES 为模板扩增的 PCR 产物。A:DL15,000 DNA Marker ;B:DL2,000 DNA Marker ;C: Negative control(pET32a-T) ;D:Positive recombinant plasmid (pET32a-ES) ;E: Negative control(pET32a-T);F: Positive recombinant plasmid (pET32a-RGDRGD-ES)

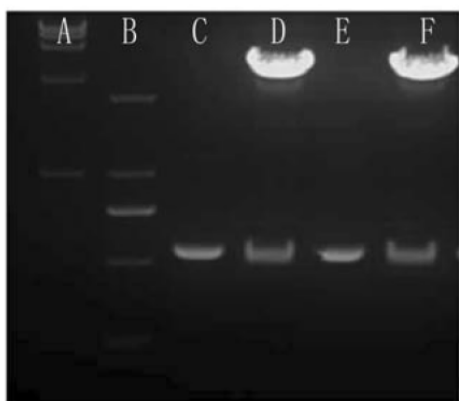


图3 原核表达载体 pET32a-ES/pET32a-RGDRGD-ES 的酶切鉴定结果

Fig.3 The results of expression plasmids pET32a-endostatin/pET32a-endostatin-RGDRGD Digested By XbaI, SalI : A:15,000 DNA Marker; B:2,000 DNA Marker; C:野生型 ES; D: 双酶切的 pET32a-ES; E: 改良的 RGDRGD-ES; F: 双酶切的 pET32a-RGDRGD-ES. A:15,000 DNA Marker; B:2,000 DNA Marker; C:ES; D: pET32a-ES/XbaI + SalI ; E: RGDRGD-ES; F: pET32a-RGDRGD-ES/ XbaI + SalI

野生 ES 行 SDS-PAGE, 可见 RGDRGD-ES 高效表达条带, 位于 52KD 处(图 4)。经凝胶成像分析系统分析, 目的蛋白占菌体蛋白总量 65%, RGDRGD-ES 与 ES 表达结果区别不大。在 Western 显示 52KD 处特异性条带, 而在未加 IPTG 剂组, 条带非常弱, RGDRGD-ES 与 ES 表达结果区别不大(图 5)。全长的融合蛋白 ES/RGDRGD-ES 在 BL21 中过表达, 重组蛋白均在包涵体中。通过 BugBuster Ni-NTA His Bind 纯化试剂盒和 FoldIt screening kit 试剂盒, 得到高纯度、高活性的重组蛋白。平均 1L 菌中可纯化到 7.5 mg 蛋白, 65% 复性率。蛋白复性后, 纯化后的蛋白在 Western 显示 52 KD 处特异性条带, 纯度超过 93%, RGDRGD-ES 与 ES 表达结果区别不大。

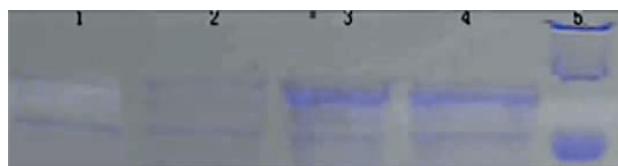


图4 含 ES/RGDRGD-ES 基因重组阳性菌培养上清的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE result of recombinant positive clones. Recombinant ES and RGDRGD-ES proteins were 52KDa by SDS-PAGE. 1: 诱导前的野生型 ES; 2: 诱导前的改良 RGDRGD-ES; 3: 诱导后的野生型 ES; 4: 诱导后的改良 RGDRGD-ES; 5: 蛋白 Marker。Lane 1: recombinant native ES without IPTG induction; Lane 2: recombinant RGDRGD-ES without IPTG induction; Lane 3: recombinant ES after IPTG induction; Lane 4: recombinant RGDRGD-ES after IPTG induction; Lane 5: standard protein markers (kDa)

2.3 RGDRGD-ES 对 HUVEC 细胞生长的抑制作用

两因素 7×4 方差结果显示, 系列浓度的 RGDRGD-ES 主效应具有统计学意义, 在不同作用时间下对细胞的抑制作用有统计意义, 二者相互作用也有统计意义。在相同作用时间下, 两两比较观察不同浓度的 RGDRGD-ES 对 HUVEC 的抑制作用, 各

实验组均受到不同程度的抑制, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在相同浓度 RGDRGD-ES 作用下, 两两比较观察 RGDRGD-ES 在不同作用时间下对 HUVEC 的抑制作用, 各实验组均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 72 h 和 96 h 时间段, $40 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 浓度组间抑制作用提高缓慢, 与 $30 \mu\text{g/ml}$ 浓度组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。抑制率随着药物浓度的增加和作用时间的延长而逐渐增加, 具有浓度和时间依赖性。在 $30 \mu\text{g/ml}$ 浓度组内两两比较, 随作用时间的增加抑制作用在 72 h 达到顶峰, 72 h 和 96 h 抑制率没有明显差异 ($P > 0.05$)。在 $40 \mu\text{g/ml}$ 浓度组和 $50 \mu\text{g/ml}$ 浓度组, 72 h 与 96 h 比较也无明显差异 ($P > 0.05$, 如表 1, 图 6)。ES 组与阴性对照组比较各组均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。随着作用时间的延长抑制率随之升高, $30 \mu\text{g/ml}$ 浓度组达到顶峰, 具有作用时间依赖性。ES $40 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 浓度组间抑制率提高缓慢, 与 $30 \mu\text{g/ml}$ 组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。通过以上统计学分析, 可以得出 $30 \mu\text{g/ml}$ 作用 72 h 为相对最佳作用浓度和时间。RGDRGD-ES ($30 \mu\text{g/ml}$ 作用 72 h) 与 ES ($30 \mu\text{g/ml}$ 作用 72 h) 比较抑制率提高, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。通过回归方程计算, 得出 72 h 内 RGDRGD-ES 对 HUVEC 细胞的 IC_{50} 为 $23.1 \mu\text{g/ml}$ 。

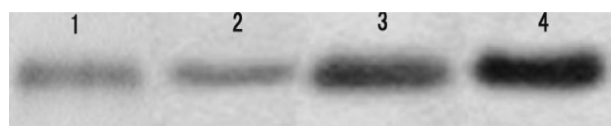


Fig.5 Western blot assay for recombinant ES protein expression :1:诱导前的野生型 ES; 2:诱导前的改良 RGDRGD-ES; 3:诱导后的野生型 ES; 4:诱导后的改良 RGDRGD-ES。Lane 1: recombinant native ES without IPTG induction; Lane 2: recombinant RGDRGD-ES without IPTG induction; Lane 3: recombinant ES after IPTG induction; Lane 4: recombinant RGDRGD-ES after IPTG induction

2.4 流式细胞仪检测结果分析

通过系列浓度 RGDRGD-ES 处理的 HUVEC 细胞, 呈现不同程度的凋亡率, 如图 7。单因素方差分析显示, 随着药物浓度的提高细胞早期凋亡率不断增加, $30 \mu\text{g/ml}$ 达到高峰, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 $40 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 则进入平台期, 与 $30 \mu\text{g/ml}$ 组比较无统计学意义 ($p > 0.05$, 如表 2)。

3 讨论

角膜在正常情况下处于无血管状态, 维持角膜无血管状态的机制可能有: (1) 角膜解剖的机械结构; (2) 角膜免疫赦免和其对前房相关性免疫偏移 (anterior chamber associated immune deviation, ACAID) 的依赖; (3) 角膜上皮细胞的抗血管化; (4) 角膜受到各种因素的广泛刺激和房水流动; (5) 前血管源性基质金属蛋白酶家族 (metalloproteases, MMPs) 维持于较低水平; (6) 内稳态情况下和无血管角膜损伤修复中血管生长因子维持在较低水平甚至缺失; (7) 抗血管生成因子合成活跃而与内稳态和无血管损伤修复中的前血管生成刺激相平衡; (8) 角膜缘细胞的屏障功能^[7,8]。以上机制共同作用, 使角膜保持透明无血管状态。在各种因素作用下如角膜炎、角膜创伤、手术、感染等等, 角

表 1 系列浓度 RGDRGD-ES 不同浓度不同作用时间下对 HUVEC 细胞的抑制率(%)($\bar{x} \pm s$, n=7)
Table 1 The effects of endostatin(different concentrations at different time) on HUVEC cell(%)($\bar{x} \pm s$, n=7)

RGDRGD-ES ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	作用时间(Action time)			
	24h	48h	72h	96h
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
10	11.52 $\pm$ 0.01 ^a	19.21 $\pm$ 0.03 ^{ab}	31.17 $\pm$ 0.02 ^{ab}	43.64 $\pm$ 0.04 ^{ab}
20	19.86 $\pm$ 1.25 ^{ab}	27.06 $\pm$ 1.09 ^{ab}	44.36 $\pm$ 1.18 ^{ab}	55.19 $\pm$ 0.64 ^{ab}
30	29.67 $\pm$ 0.85 ^{abc}	41.28 $\pm$ 1.08 ^{abc}	65.74 $\pm$ 2.36 ^{abc}	65.75 $\pm$ 0.38 ^{ab,c,d}
40	44.76 $\pm$ 2.09 ^{ab}	49.98 $\pm$ 2.87 ^{ab}	65.74 $\pm$ 1.09 ^{ab,d}	65.74 $\pm$ 0.56 ^{ab,d}
50	44.76 $\pm$ 2.09 ^{ab}	57.59 $\pm$ 3.11 ^{ab}	65.74 $\pm$ 1.12 ^{ab,d}	65.75 $\pm$ 3.49 ^{ab,d}
ES(30 $\mu\text{g} / \text{ml}$)	20.51 $\pm$ 0.76 ^{ab}	29.23 $\pm$ 1.07 ^{ab}	47.39 $\pm$ 1.17 ^{ab,d}	47.39 $\pm$ 2.76 ^{ab,d}

Note: a compared to control group $P < 0.01$,b compared to the same group $P < 0.01$; c compared to ES group $P < 0.01$;d compared to RGDRGD-ES group (30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 72 h) $P > 0.05$.

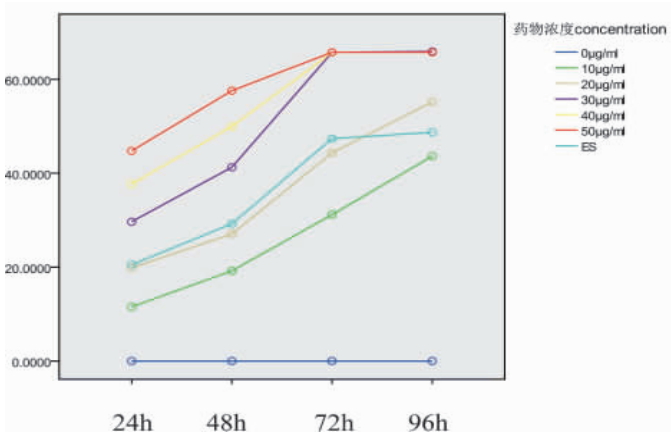


图 6 系列浓度 RGDRGD-ES 不同浓度不同作用时间下对 HUVEC 细胞的抑制作用
Fig.6 The effects of RGDRGD-ES (different concentrations at different time) on HUVEC cell

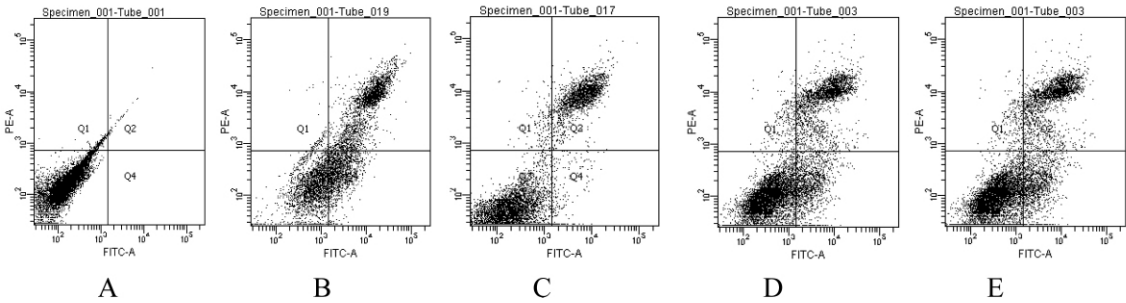


图 7 流式细胞仪检测结果
Fig.7 The result of flow cytometer

A:空白对照(control group);B:ES(30 $\mu\text{g} / \text{ml}$);C:RGDRGD-ES 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$;D:RGDRGD-ES 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$;E:RGDRGD-ES 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$

表 2 系列浓度 RGDRGD-ES 不同浓度作用 24 h 后 HUVEC 细胞的凋亡率(%)($\bar{x} \pm s$, n=4)
Table 2 Apoptosis of HUVEC cell with the effects of RGDRGD-ES (different concentrations at 24 h)

RGDRGD-ES							
浓度(μg / ml)	0	ES	10	20	30	40	50
早期凋亡率 (Early apoptosis rate)	0± 0	20.9± 1.1 ^a	2.0± 1.07 ^a	12.7± 1.2 ^{ab}	28.4± 1.07 ^{abc}	28.6± 3.0 ^a	27.9± 2.7 ^a

Note:a compared to control group $P < 0.01$,b compared to the same group $P < 0.01$,c compared to ES group $P < 0.01$.

膜的血管赦免机制遭到破坏就会导致角膜新生血管。角膜新生血管是形成于角膜缘血管网的新生毛细血管侵入角膜组织而形成的, CNV 在清除病原微生物和促进组织修复的同时, 也严重的影响了角膜的透明性, 是愈后视力障碍和致盲的重要原因之一, 目前, 尚无特效疗法。角膜新生血管的生成是一个复杂的病理过程, 与血管内皮细胞的生长增殖关系密切^[9]。因此, 抑制血管内皮细胞的生长增殖, 可以抑制角膜新生血管的生成。

目前已知的抑制新血管形成的因子主要有 IL-12、血小板反应蛋白(TSP)、内皮抑素(endostatin, ES)、血管抑素(angiotatin, AS)、色素上皮源性因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)等。Maatta 等发现 ES 在眼部的很多组织结构中均有表达, 如结膜和角膜上皮、角膜后弹力层、睫状上皮的无色素上皮层和色素上皮层、虹膜前表面层和后色素上皮层以及视网膜色素上皮层的基底膜和内界膜等^[10]。在泪液、房水、玻璃体液中检出 ES 片段的存在, ES 在眼部组织内的定位可能与保持眼部组织的无血管状态相关。血管内皮抑制素(endostatin, ES)由 O'REILLY 在 1997 年获得的一种血管内皮细胞抑制剂, 由胶原蛋白的 C-末端非胶原区内的 184 个氨基酸片段构成, 相对分子质量为 20000, 能特异性的抑制血管内皮细胞的增生和移行^[11]。ES 与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 相结合抑制了内皮细胞与纤维素相结合, 阻断整合素与 ECM 的连接, 从而抑制了内皮细胞的黏附^[12]。抑制 c-myc 表达而抑制内皮细胞迁移^[13, 14]。任明华等对 ES 的序列进行分析和比较, 发现了 RGIRGAD 序列与 RGD 相似, 通过定点诱变, 改变一个氨基酸的同时去除一个氨基酸, 获得了 RGDRGD 重复序列, 得到了改良内皮抑素(RGDRGD-ES)^[15]。它含有 RGD 两个连续的 RGD 序列。RGD 具有“聚合物效应”, RGD 聚合多肽由于半衰期延长而对肿瘤的抑制作用强于单肽, 且可减少用药剂量^[16]。含 RGD 序列的环肽比相应线肽作用强 20 倍^[17]。含有重复 RGD 序列的改良内皮抑素(RGDRGD-ES)与整合素的结合能力增强, 抑制了新生血管内皮细胞的黏附, 更有效地发挥了其对新生血管的抑制作用。目前, 各种改良(重组)人内皮抑素已成功用于多种肿瘤的治疗。改良人内皮抑素可以有效地下调 VEGF 的表达而抑制新生血管的生成^[18]。有研究显示改良 ES 通过诱导 HUVEC 凋亡^[19, 20]发挥作用, 而有研究显示其并不诱导细胞凋亡, 只是抑制细胞生长增殖。作者的实验结果则与前者相符, 通过流式细胞检测 HUVEC 早期凋亡率具有剂量依赖性。

作者实验成功构建了 RGDRGD-ES 的定点突变体, 并纯化表达了 RGDRGD-ES 蛋白, 将其作用于 HUVEC 细胞, 验证了 RGDRGD-ES 对 HUVEC 的抑制作用, 即能够抑制新生血管的生成^[21]。同时, 得出了 RGDRGD-ES 对 HUVEC 抑制作用的剂量-效应关系、时间-效应关系以及相对最佳作用时间和最佳作用药物浓度。在相同条件下 RGDRGD-ES 与 ES 组比较, 其对 HUVEC 的抑制作用增强。在 72 小时内 HUVEC 的抑制率随着 RGDRGD-ES 浓度的增加而升高, 具有剂量依赖性; 在相同作用时间下, 随着 RGDRGD-ES 浓度的增加 HUVEC 细胞的抑制率增长迅速, 当增长到 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时增长的抑制率达到顶点, 之后进入平台期, 因此可以推断 72 小时 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 是 RGDRGD-ES 对 HUVEC 抑制作用的敏感作用时间和药物浓度, 即也可以推测 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物浓度作用 72 小时可能是

RGDRGD-ES 对 HUVEC 的最佳作用浓度和时间。RGDRGD-ES 对 HUVEC 的相对最佳作用时间和最佳作用药物浓度将在今后进一步的动物实验奠定理论基础。

当前, 内皮抑素的各种基因治疗方法为角膜新生血管的治疗带来了新的思路 and 探索, 但是现在内皮抑素的基因治疗尚未成熟, 将外源性 DNA 近似随机的整合到宿主细胞中, 理论上认为可能使肿瘤抑制基因失活或者激活原癌基因, 这种风险现今尚未完全得到解决。相比之下, 改良人内皮抑素在眼部新生血管性疾病治疗的相关实验研究中显示了良好的效果, 特异性的抑制新生血管的生长, 而不引起免疫反应, 无毒、不产生耐药, 但其蛋白仍存在一定的不足, 如何提高 RGDRGD-ES 的蛋白表达及纯化技术, 增强其活性和稳定性, 提高其生物利用度及安全性, 仍有待我们进一步研究探索, 为角膜新生血管疾病的治疗, 尤其是角移术后排斥反应等方面的治疗提供新的选择。

参考文献(References)

- [1] Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review[J]. Surv Ophthalmol, 1998, 43(3):245-269
- [2] Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, et al. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(6):461-466
- [3] 腾旭, 孙旭光, 王智群. 血管内皮生长因子与小鼠角膜新生血管生长及退化的相关性实验研究[J]. 眼科新进展, 2002, 22(3):163-165
Teng Xu, Sun Xu-guang, Wang Zhi-qun. Experimental study on correlation of VEGF with the growth and regression of neovascularization in the rat cornea[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2002, 22(3):163-165
- [4] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1999, 59(1):189-197
- [5] 吴松, 黄斌, 陈国强, 等. 原发性肺癌患者血清内皮抑素含量检测及其临床意义[J]. 江苏医药, 2011, 37(2):188-189
Wu Song, Huang Bin, Chen Guo-qiang, et al. Expression and significance of serum endostatin in patients with primary lung cancer[J]. Jiangsu Med J, 2011, 37(2):188-189
- [6] 殷秀丽, 张春梅, 张晶旭, 等. 内皮抑素基因定点突变体的构建[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(2):277-279
Yin Xiu-li, Zhang Chun-mei, Zhang Jing-xu, et al. Construction of a site-directed mutant of endostatin[J]. Int J Ophthalmol, 2009, 9(2):277-279
- [7] 张研, 陆晓和. 角膜血管新生机制与调控新进展[J]. 眼科新进展, 2008, 28(9):708-714
Zhang Yan, Lu Xiao-he. Progression of corneal neovascularization mechanism and regulation[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2008, 28(9):708-714
- [8] Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing[J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 2006, 104(2):264-302
- [9] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. Nature, 2000, 407:242-248
- [10] Maatta M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, et al. Collagen / endostatin shows a ubiquitous distribution in human ocular tissues and endostatin-containing fragments accumulate in ocular fluid samples [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245(1):74-81

(下转第 2641 页)

任何不良反应。这表明番茄红素联合 CIK 可进一步激活荷瘤鼠免疫并对肿瘤细胞进行杀伤。

综上所述,番茄红素能够通过提高宿主免疫水平而显著增强 CIK 治疗的抗肿瘤效果。番茄红素素作为新型的抗肿瘤药物进一步临床应用的潜在价值值得进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Campoio TR, Oliveira FA, Otton R, et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables [J]. *Molecules*, 2011,16(2): 1710-1738
- [2] Nitsche C, Simon P, Weiss FU, et al. Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *Dig Dis*, 2011,29(2): 235-242
- [3] Gupta SC, Kim JH, Kannappan R, et al. Role of nuclear factor κ B-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011,236(6):658-671
- [4] Khoo HE, Prasad KN, Kong KW, et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables [J]. *Molecules*, 2011,16(2): 1710-1738
- [5] Nagao A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids[J]. *Biofactors*, 2011,37(2):83-87
- [6] Capanoglu E, Beekwilder J, Boyacioglu D, et al. The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2010,50(10):919-930
- [7] Reynolds JV, Donohoe CL, Doyle SL. Diet. Obesity and cancer[J]. *Ir J Med Sci*, 2011,180(2):521-527
- [8] Lu R, Dan H, Wu R, et al. Lycopene: features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions [J]. *J Oral Pathol Med*, 2011,40(5):361-368
- [9] Chang CC, Chen WC, Ho TF, et al. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011,111(5):501-511
- [10] Takei F. LAK cell therapy of AML: Not to be lost in translation[J]. *Exp Hematol*, 2011,39(11):1045-1046
- [11] He M, Wang Y, Shi WJ, et al. Immunomodulation of inducible co-stimulator (ICOS) in human cytokine-induced killer cells against cholangiocarcinoma through ICOS/ICOS ligand interaction[J]. *J Dig Dis*, 2011,12(5):393-400
- [12] Huang X, Chen YT, Song HZ, et al. Cisplatin pretreatment enhances anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(25):3002-3011
- [13] Zhong R, Teng J, Han B, et al. Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011,60(10):1497-1502
- [14] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011,17(11):1679-1687
- [15] Han H, Peng JR, Chen PC, et al. A novel system of artificial antigen-presenting cells efficiently stimulates Flu peptide-specific cytotoxic T cells in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011,411(3):530-535
- [16] Minhthly L, Ngugen, Steven J, et al. Lycopene :Chemical and Logical Properties[J]. *Food Technology*,1999,53(2):38-45
- [17] Palozza P, Parrone N, Simone R, et al. Role of lycopene in the control of ROS-mediated cell growth: implications in cancer prevention[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(12):1846-1860
- [18] Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, et al. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(7):875-896
- [19] Tabassum A, Bristow RG, Venkateswaran V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing?[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010,36(3):230-234
- [20] Yin X, Yan X, Yang Q, et al. Antitumor mechanism of recombinant murine interleukin-12 vaccine[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(3):263-268
- (上接第 2637 页)
- [11] O'reilly MS, Boehm T, Folkman J, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997,88(2):277-285
- [12] Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3):1024-1029
- [13] Bloch W, Huggel K, Sasaki T. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing [J]. *FASEB J*, 2000, 14 (45):2373-2376
- [14] MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, et al. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27):25190-25196
- [15] 任明华,王淑静,林雪松,等.重组人内皮抑素的结构改造及抗肿瘤活性变化 [J].*中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(1):45-52
Ren Ming-hua, Wang Shu-jing, Lin Xue-song, et al. Structural Modification and Anti-tumor Activity Change of Recombinant Human Endostatin [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(1):45-52
- [16] Saiki I, Murata J, Matsuno K, et al. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990,81(6-7):660-667
- [17] Kumagai H, Tajima M, Ueno Y, et al. Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 31:177(1):74-82
- [18] X W, Ye P, Li Z, et al. Endostar, a recently introduced recombinant human endostatin, inhibits proliferation and migration through regulating growth factors, adhesion factors and inflammatory mediators in choroid-retinal endothelial cells [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2010,44(4): 664-670
- [19] Feng R, Huang Xj. Preliminary study on the anti-leukemia effect of recombinant human endostatin [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2010, 31(7):461-465
- [20] Xiao H, Kan X, Jin DJ, et al. The inhibitory mechanism of endostatin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2006, 6(7):24-26
- [21] Mao W, Kong J, Dai J, et al. Evaluation of recombinant endostatin in the treatment of atherosclerotic plaques and neovascularization in rabbits[J]. *Zhejiang Univ Sci B*, 2010, Aug,11(8):599-607