

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.03

· 研究快报 ·

hTERT 启动子驱动的肿瘤抑素靶向肝癌细胞表达及其抗血管形成的作用

李倩倩, 邓志华, 郎伟宁, 贺丹丹(山西医科大学第二医院消化科, 山西太原 030001)

专家点评 血管生成是肿瘤生长和转移的关键。自1971年美国科学家尤达·福克曼提出肿瘤生长对血管生成依赖性的假说以来,通过抑制血管生成、切断肿瘤营养供给等方法治疗肿瘤一直是肿瘤生物治疗的研究热点。目前,抑制肿瘤血管形成已成为肿瘤治疗的一个具有广阔前景的研究方向,全球约有25种内源性血管生成抑制剂应用于肿瘤治疗的临床研究和临床前试验中。

本期刊登了邓志华、李倩倩等人的论文,作者成功构建了具有外分泌功能的 *phTERT-tumstatin* 质粒,并在肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 L02 中验证了 *tumstatin* 在肝癌细胞中特异性表达、在正常肝细胞中无表达;同时,作者还发现含 *tumstatin* 蛋白的条件培养基能显著抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)的增殖及其血管结构的形成。该研究不仅创新性较强,而且实际应用意义广泛。其创新和意义在于:(1) *hTERT* 基因启动子驱动的 *tumstatin* 抗血管基因治疗的研究报道甚少。(2) *hTERT* 基因启动子驱动的 *tumstatin* 在肝癌细胞中特异性表达、在正常肝细胞中不表达,以 *hTERT* 启动子调控的靶向性抗血管治疗具有肿瘤特异性;(3) *hTERT* 基因在肿瘤中广谱表达,以 *hTERT* 启动子调控的靶向肿瘤治疗具有广谱性;(4)初步证实 *tumstatin* 具有显著抑制 HUVEC 增殖及其血管结构形成的作用。该研究结果提示, *hTERT* 基因启动子驱动的 *tumstatin* 抗血管基因治疗有望成为肿瘤基因治疗的一个新策略。

解放军东方肝胆外科医院肿瘤免疫与基因治疗研究中心
主任, 全军肿瘤学专业委员会委员, 上海市曙光人才、浦
江人才、优秀学科带头人, 《Cell & Bioscience》杂志编委

[摘要] 目的:观察人端粒酶逆转录酶基因(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)启动子驱动的肿瘤抑素(*tumstatin*)基因在肝癌细胞 HepG2 内特异性表达及其体外抗血管形成的作用。方法:构建 *phTERT-tumstatin*、*pCMV-tumstatin*(阳性对照)、*phTERT-EGFP*(阴性对照)质粒,脂质体介导转染 HepG2 肝癌细胞、L-02 正常肝细胞,荧光显微镜检测 EGFP 的表达。Western blotting 检测 *tumstatin* 在 HepG2 细胞内的表达,MTS 法检测稳定转染后 HepG2 细胞的增殖以及含或不含 *tumstatin* 蛋白的条件培养基对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)增殖的影响。通过计数管样分支数检测 *tumstatin* 蛋白对 HUVEC 管道结构形成的影响。结果:成功构建 *phTERT-tumstatin*、*pCMV-tumstatin* 和 *phTERT-EGFP* 质粒,质粒转染后 *tumstatin* 基因在肝癌细胞 HepG2 中特异地表达,在正常肝细胞 L-02 中无表达。*phTERT-tumstatin* 和 *phTERT-EGFP* 转染均不影响 HepG2 细胞的增殖。含 *tumstatin* 蛋白的条件培养基 CM-T 抑制 HUVEC 的增殖[抑制率为(56.49 ± 0.33)%];CM-T 与不含 *tumstatin* 蛋白的条件培养基 CM-N、CM-NT 相比显著抑制了 HUVEC 血管结构的形成[(3.33 ± 1.53)% vs (24.44 ± 3.11)%、(23.94 ± 2.92)% , $P < 0.01$]。结论:*phTERT* 基因启动子可驱动 *tumstatin* 靶向表达于肝癌细胞,并抑制 HUVEC 血管管道结构形成。

[关键词] 肿瘤抑素;肝肿瘤;*hTERT* 启动子;基因治疗;抗血管生成

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0251-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672405)资助。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672405)

[作者简介] 李倩倩(1984-),女,山西省太原市人,硕士生,主要从事肝癌基因治疗的研究。E-mail: liqianqian222729@163.com

[通信作者] 邓志华(DENG Zhi-hua, corresponding author), E-mail: ykdzh@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1655.001.html>

***hTERT* promoter-induced targeting expression of tumstatin in hepatocarcinoma cells and its antiangiogenic effect**

LI Qian-qian, DENG Zhi-hua, LANG Wei-ning, HE Dan-dan (Department of Gastroenterology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the specific expression of tumstatin in hepatocarcinoma HepG2 cells induced by the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene promoter and its antiangiogenic effect *in vitro*. **Methods:** phTERT-tumstatin, pCMV-tumstatin (positive control), phTERT-EGFP (negative control) plasmids were constructed and transfected into HepG2 and L-02 normal liver cells. The expression of EGFP was examined by fluorescence microscope. The expression of tumstatin protein in HepG2 cells was detected by Western blotting analysis; the proliferation of HepG2 cells after stably transfected with plasmids was measured by MTS assay; the effect of conditioned medium (containing tumstatin protein or not) on proliferation of human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) was detected by MTS assay. The effect of tumstatin protein on cellular tube structure formation of HUVEC was examined through counting the number of tube branches. **Results:** phTERT-tumstatin, pCMV-tumstatin, and phTERT-EGFP plasmids were successfully constructed. The specific expression of tumstatin was only observed in hepatocarcinoma HepG2, not in normal liver L-02 cells. phTERT-tumstatin and phTERT-EGFP transfection did not affect the proliferation of HepG2 cells; conditioned medium (CM) containing tumstatin protein (CM-T) inhibited the proliferation of HUVEC cells, with the inhibition rate being (56.49 ± 0.33)%. The cellular tube structure formation of HUVEC cells on matrigel-coated plates supplemented with CM-T was significantly inhibited compared with conditioned medium CM-N and CM-NT ([3.33 ± 1.53]% vs [24.44 ± 3.11]%, [23.94 ± 2.92]%, $P < 0.01$). **Conclusion:** phTERT gene promoter can induce targeting expression of tumstatin in hepatocarcinoma cells and inhibit cellular tube structure formation of HUVEC cells.

[**Key words**] tumstatin; hepatocellular carcinoma; *hTERT* promoter; gene therapy; antiangiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 251-257]

靶向抑制肿瘤新生血管的生成可间接抑制肿瘤的生长和转移。肿瘤抑素(tumstatin)是目前已知的活性最强的内源性血管生成抑制剂^[1]。有研究^[2]将 tumstatin 基因的片段(Tum 54 ~ 244)克隆到 pSecTag2B 分泌型表达载体,证实使用 tumstatin 抗血管生成的基因疗法是治疗肝癌的有效策略。

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)是端粒酶的基本成分,是端粒酶激活的限速因子,其启动子是这一功能的核心^[3]。研究^[4]证实, *hTERT* 基因启动子在肿瘤细胞内完全开启,是肿瘤特异性启动子。 *hTERT* 启动子驱动的改进型溶瘤腺病毒 telomelysin 已通过 I 期临床试验,应用于进展期实体瘤患者的治疗。

研究^[5]证实,肝癌细胞中端粒酶活性高表达。原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是高度血管化的肿瘤,抗其血管形成的治疗将是一个很有前景的策略。本研究构建真核表达载体 phTERT-tumstatin,使重组的抗血管形成基因 tumstatin 在 *hTERT* 基因启动子调控下靶向表达于肝癌细胞周围,并在细胞水平观察目的蛋白 tumstatin 对人

脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)生长及血管结构形成的抑制效应。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要材料

人肝癌细胞 HepG2 购自中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物研究所,正常肝细胞 L-02 为本实验室保存, HUVEC 购自武汉生命科学院细胞库。 HepG2、L-02 细胞培养在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 湿润条件; HUVEC 培养在含 15% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 湿润条件。

含信号肽 tPA-tumstatin-flag 标签融合基因序列的质粒购自北京诺赛公司,引物由北京诺赛公司合成; pGL3-*hTERT*-tk 由实验室保存; pIRES2-EGFP 载体为武汉大学生命科学院提供。 T4DNA 连接酶、限制性内切酶、JM109 大肠杆菌感受态细胞、Marker 均为 TaKaRa 公司产品, LipofectamineTM 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司。琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒为北京艾比根生物技术有限公司,质粒抽提试剂盒购

自 Omega 公司,细胞增殖检测试剂盒购自 Promega 公司。Amicon Ultra 0.5 ml 离心超滤管购自 Millipore 公司。

1.2 质粒构建

1.2.1 质粒 pCMV-tumstatin 的构建 限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切质粒 pIRES2-EGFP 及含目的基因 tumstatin 的质粒,酶切片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化回收。纯化的目的片段 tumstatin 以及载 pIRES2-EGFP 经 T4 DNA 连接酶连接后转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞,涂平板 37 °C 培养过夜,挑出阳性克隆,摇菌扩增、抽提纯化,再次酶切鉴定,测序正确后 -20 °C 保存备用。

1.2.2 pH₃TERT-tumstatin 质粒的构建 以 pGL3-hTERT-tk 为模板,PCR 扩增 *hTERT* 基因启动子序列,在 *hTERT* 基因启动子上下游分别加入限制性内切酶 *Nde* I、*Bag* II 酶切位点。对质粒 pCMV-tumstatin、hTERT 扩增产物进行 *Nde* I、*Bag* II 双酶切,酶切片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化回收,纯化的目的片段经 T4 DNA 连接酶连接后构成 pH₃TERT-tumstatin 重组质粒,转化扩增、抽提纯化及鉴定同上。测序正确后 -20 °C 保存备用。设计引物,上游引物 P1 为 5'-GGGAATTCATATGAGTGGATTTCGCGGCACA-3',下游引物 P2 为 5'-GGAAGATCTCGCGGGGCTGGCCGGGCCAGGGC-3'。

1.2.3 pH₃TERT-EGFP 质粒的构建 pH₃TERT-tumstatin 用 *Xba* I、*Bam*H I 限制性内切酶双酶切,去除 tumstatin 基因序列,用 T4 DNA 连接酶连接,构建不含 tumstatin 基因的质粒 pH₃TERT-EGFP,重组质粒的转化、鉴定同上方法。

1.3 荧光显微镜观察瞬时转染 pH₃TERT-tumstatin、pCMV-tumstatin 质粒后细胞中 EGFP 的表达

按照 Lipofectamine™ 2000 脂质体操作说明,将 pH₃TERT-tumstatin、pCMV-tumstatin(阳性对照)分别转染 HepG2、L-02 细胞,转染 4 h 后更换含 10% 胎牛血清的新鲜培养基,细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,荧光倒置显微镜下观察。

1.4 Western blotting 检测质粒瞬时转染后细胞外液中目的蛋白的表达

pH₃TERT-tumstatin、pCMV-tumstatin 分别转染 HepG2、L-02 细胞,转染 4 h 后,更换含 10% 胎牛血清的新鲜培养基,细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,更换不含胎牛血清的新鲜培养基,48 h 后收集细胞外液。0.5 ml 离心超滤管浓缩细胞外液,取浓缩后细胞外液进行 SDS-PAGE,电泳产物半干转移至 NC 膜上,30 ml 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,

PBST 洗膜,用鼠抗 FLAG M2 单克隆抗体(1:500 稀释)室温下杂交 15 min,4 °C 过夜,室温下 TBST 洗膜 3 次(每次 5~10 min),并与相应的二抗共孵育 1 h。TBST 快速洗膜 5 次,PBS-T 清洗后,ECL 增强化学发光试剂盒检测蛋白的表达。

1.5 质粒 pH₃TERT-tumstatin 稳定转染肝癌细胞

将质粒 pH₃TERT-tumstatin、pH₃TERT-EGFP(阴性对照)进一步稳定转染 HepG2 细胞,以提高表达量。转染 48 h 后用含 800 g/ml G418 的培养基筛选,每 2~3 d 更换 1 次含 G418 筛选浓度的培养基,10 d 后挑取单克隆,改用 400 g/ml G418 继续筛选 2 周,建立稳定表达目的基因的 HepG2 细胞系。荧光显微镜下 488 nm 激发波长处观察稳定转染后细胞内 EGFP 报告基因的表达,Western blotting 检测稳定转染后肝癌细胞外液中目的蛋白 tumstatin 的表达。

1.6 收集含或不含目的蛋白的条件培养基

将稳定转染了 pH₃TERT-tumstatin 或 pH₃TERT-EGFP 的 HepG2 细胞培养在 25 cm² 的培养瓶中,24 h 后更换不含胎牛血清的新鲜培养液 5 ml 继续孵育 48 h,收集条件培养基。稳定转染 pH₃TERT-tumstatin 的 HepG2 细胞外液中包含目的蛋白 tumstatin,称为条件培养基 CM-T;转染 pH₃TERT-EGFP 以及未转染的 HepG2 细胞外液不含目的蛋白,分别称为条件培养基 CM-NT、CM-N。

1.7 MTS 法检测稳定转染 pH₃TERT-tumstatin 或 pH₃TERT-EGFP 对 HepG2 细胞增殖活性的影响

MTS 法检测稳定转染质粒 pH₃TERT-tumstatin 或 pH₃TERT-EGFP 对 HepG2 细胞增殖活性的影响。按照细胞增殖检测试剂盒说明,将稳定转染 pH₃TERT-tumstatin 或 pH₃TERT-EGFP 的 HepG2 细胞培养在 96 孔板(细胞密度为 5 000 个/孔)含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中(以未转染的 HepG2 为对照组),72 h 后往每孔中加入 20 μl 的 MTS/PMS 混合液,37 °C 孵育 4 h,490 nm 处检测光密度值(D_{490})。

1.8 MTS 检测条件培养基对 HUVEC 增殖的影响

HUVEC 培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的 96 孔板(5 000 个/孔)中,第 2 天将培养基分别置换为 CM-T、CM-NT、CM-N,继续培养 48 h,每孔中各加入 5 mg/ml 的 MTS/PMS 混合液 10 μl,37 °C 继续孵育 4 h,490 nm 处测其光密度值(D_{490})。细胞生长抑制率(GIR)按下式计算:GIR(%) = (对照孔 D_{490} 值 - 实验孔 D_{490}) / 对照孔 D_{490} × 100%。

1.9 基质胶上检测条件培养基对 HUVEC 管道结构形成的影响

HUVEC 在基质胶 matrigel 上能够形成血管微

结构。将 HUVEC 接种在铺有基质胶的 96 孔板上 (1 000 个/孔), 分别加入条件培养基 CM-N、CM-NT、CM-T 各 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 倒置显微镜下计数细胞间形成的血管分支数(每孔取 6 个视野, 每组计数 3 个孔, 取均值), 观察各条件培养基对 HUVEC 管道结构形成的影响。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 软件进行 One-Way ANOVA 统计学分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定结果

重组质粒 pCMV-tumstatin、phTERT-tumstatin、phTERT-EGFP 在经相应限制性内切酶酶切 4 h 后, 酶切产物在琼脂糖凝胶上出现了与其大小相对应的清晰条带(图 1)。

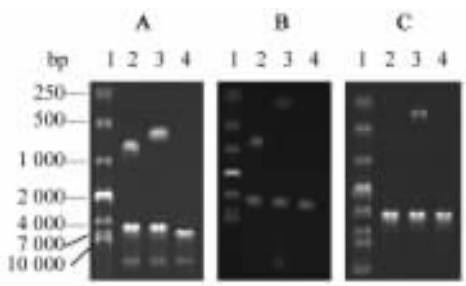


图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒的酶切片段

Fig.1 Identification of enzyme digestion products of plasmids

A: pCMV-tumstatin; B: phTERT-tumstatin; C: phTERT-EGFP
1: Marker; 2: Digested by *Xho* I and *Bam*H I ;
3: Digested by *Nde* I and *Bag* II ; 4: Undigested plasmid

2.2 瞬时转染后细胞中 EGFP 和 tumstatin 的表达

质粒 pCMV-tumstatin、phTERT-tumstatin 瞬时转染 HepG2 和 L-02 细胞, 转染 24 h 后在荧光倒置显微镜下观察。pCMV-tumstatin 在 HepG2 和 L-02 中均有荧光表达; phTERT-tumstatin 仅在 HepG2 中有荧光表达, L-02 细胞中几乎无表达(图 2)。以转染 pCMV-tumstatin 质粒的 HepG2 荧光表达量为 100%, 转染 phTERT-tumstatin 的 HepG2 相对荧光表达量为 70%、L-02 为 5%。

Western blotting 结果可见, 转染 pCMV-tumstatin 的 HepG2 和 L-02 细胞外液中均检测到 tumstatin 蛋白; 而转染了 phTERT-tumstatin 质粒的 HepG2、L-02 细胞, 仅在 HepG2 细胞外液中出现了蛋白(图 3)。这些结果证实了本研究构建的 pCMV-tumstatin、

phTERT-tumstatin 质粒的正确性, 同时也证实 hTERT 启动子在肝癌细胞中有很强的转录活性, 能够驱动 tumstatin 基因在肝癌细胞中靶向表达, 在正常的肝细胞中则无表达。

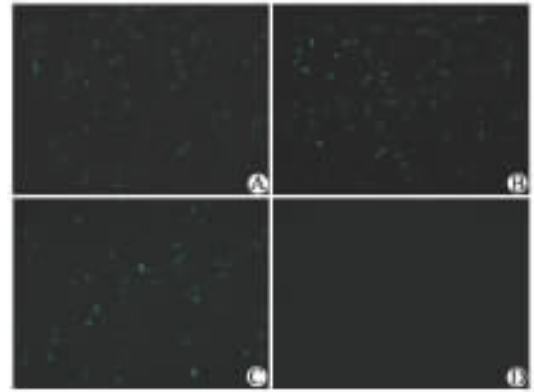


图 2 荧光显微镜检测瞬时转染 pCMV-tumstatin、phTERT-tumstatin 质粒后 HepG2、L-02 细胞中 EGFP 的表达($\times 200$)

Fig.2 Expression of EGFP in HepG2 and L-02 cells after transient transfection with pCMV-tumstatin or phTERT-tumstatin plasmids as detected by fluorescent microscope($\times 200$)

A: pCMV-tumstatin transfected HepG2 cells;
B: pCMV-tumstatin transfected L-02 cells;
C: phTERT-tumstatin transfected HepG2 cells;
D: phTERT-tumstatin transfected L-02 cells

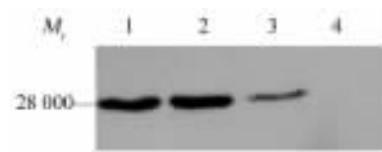


图 3 Western blotting 检测瞬时转染 pCMV-tumstatin、phTERT-tumstatin 质粒的 HepG2、L-02 细胞外液中 tumstatin 蛋白的表达

Fig.3 Expression of tumstatin protein in extracellular fluid of HepG2 and L-02 cells transiently transfected with pCMV-tumstatin or phTERT-tumstatin plasmids as analyzed by Western blotting

1: pCMV-tumstatin transfected HepG2 cells;
2: pCMV-tumstatin transfected L-02 cells;
3: phTERT-tumstatin transfected HepG2 cells;
4: phTERT-tumstatin transfected L-02 cells

2.3 稳定转染后 HepG2 中 EGFP 的表达及细胞外液中 tumstatin 蛋白的表达

稳定转染了质粒 phTERT-tumstatin 或 phTERT-

EGFP 的 HepG2 细胞,在荧光倒置显微镜下可以看到很强的绿色荧光蛋白表达,与瞬时转染 pH_{hTERT}-tumstatin 的 HepG2 细胞相比,稳定转染的绿色荧光蛋白的表达量提高了近 3 倍(图 4)。

Western blotting 检测稳定转染 pH_{hTERT}-tumstatin 或 pH_{hTERT}-EGFP 的 HepG2 细胞外液中 tumstatin 蛋白的表达,经 SDS-PAGE 后,转染 pH_{hTERT}-tumstatin 的细胞外液在 28 000 处出现明显的条带,而转染 pH_{hTERT}-EGFP 的细胞外液中则检测不到目的蛋白条带。且与瞬时转染相比较,稳定转染后获得的目的条带更深,说明稳定转染显著提高了目的蛋白的表达量。

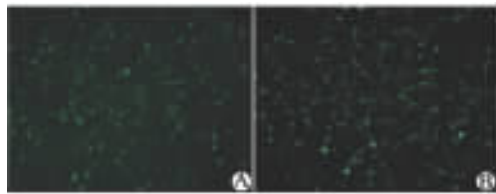


图 4 荧光显微镜检测稳定转染 pH_{hTERT}-tumstatin、pH_{hTERT}-EGFP 质粒的 HepG2 细胞中 GFP 的表达(×100)
Fig. 4 Expression of EGFP in HepG2 cells stably transfected with pH_{hTERT}-tumstatin or pH_{hTERT}-EGFP plasmids as analyzed by fluorescent microscope(×100)
A: pH_{hTERT}-tumstatin stably transfected HepG2;
B: pH_{hTERT}-EGFP stably transfected HepG2

2.4 稳定转染 pH_{hTERT}-tumstatin 或 pH_{hTERT}-EGFP 对 HepG2 细胞活力影响

用 MTS 法在 24、48、72 h 分别检测转染 pH_{hTERT}-tumstatin 和空载体 pH_{hTERT}-EGFP 对 HepG2 细胞增殖的影响。如图 5 示,3 组间 *D* 值无统计学差异($P > 0.05$),表明导入 HepG2 细胞的目的基因 tumstatin,不影响细胞的增殖。

2.5 条件培养基 CM-N、CM-NT、CM-T 对 HUVEC 细胞的增殖影响

MTS 法检测条件培养基中 tumstatin 蛋白对 HUVEC 细胞增殖的影响。CM-N 组与 CM-NT 组比较无统计学差异($P > 0.05$),CM-T 组相对于 CM-N、CM-NT 组对 HUVEC 细胞的增殖抑制率分别为(56.49 ± 0.33)%、(56.31 ± 0.33)%($P < 0.01$)。因此,含 tumstatin 蛋白的条件培养基 CM-T 显著抑制了 HUVEC 细胞的增殖。

2.6 条件培养基对 HUVEC 血管微结构形成的影响

HUVEC 在包被有基质胶 matrigel 的培养板上

能够形成血管微结构,利用此特点,本研究将条件培养基添加到包被有基质胶的培养板上,检测 tumstatin 对 HUVEC 血管管道形成的影响。如图 6 所示, HUVEC 在不含 tumstatin 蛋白的条件培养基 CM-N、CM-NT 中形成的管道分支分别为(24.44 ± 3.11)%、(23.94 ± 2.92)%,而在含 tumstatin 蛋白的条件培养基 CM-T 中形成的管道分支为(3.33 ± 1.53)%。CM-T 显著抑制了管道结构的形成($P < 0.01$),证明分泌到细胞外液中的 tumstatin 蛋白能够抑制 HUVEC 血管微结构的形成。

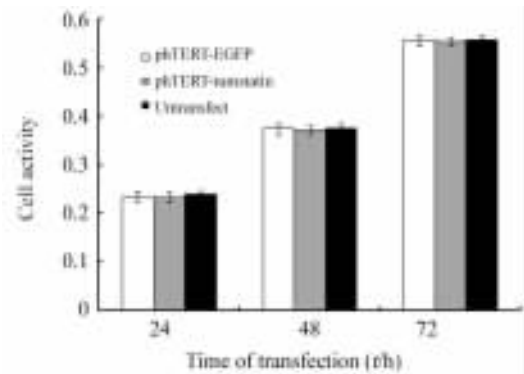


图 5 MTS 法检测稳定转染 pH_{hTERT}-tumstatin、pH_{hTERT}-EGFP 质粒后 HepG2 细胞的增殖
Fig. 5 Proliferation of HepG2 cells stably transfected with pH_{hTERT}-tumstatin or pH_{hTERT}-EGFP plasmids as determined by MTS assay

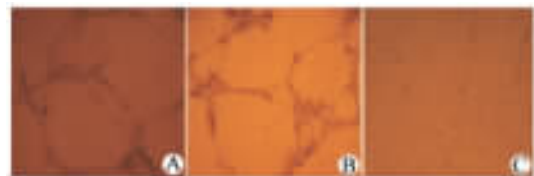


图 6 条件培养基 CM-N、CM-NT、CM-T 对 HUVEC 管道结构形成的影响(×100)
Fig. 6 Effects of conditioned medium CM-N, CM-NT, CM-T on tube formation of HUVEC cells(×100)
A: CM-N; B: CM-NT; C: CM-T

3 讨论

血管生成是肿瘤生长和转移的关键,抑制肿瘤血管形成已成为肿瘤治疗的一个新的具有广阔前景的研究方向。目前大约有 25 种内源性血管生成抑制剂应用于肿瘤治疗的临床研究和临床前试验中。美国肝病学会最新的治疗指南推荐抑制血管形成的激酶抑制剂索拉非尼,可作为不适用于标准治疗的进展期

肝癌患者的一线治疗药物^[6]。

内源性血管生成抑制剂的研究为肿瘤的基因治疗开拓了一个新的领域。Tumstatin 作为目前已知的活性最强的内源性血管生成抑制剂,在肿瘤治疗领域有着强大的潜力。研究^[7]显示,tumstatin 通过复杂的信号机制调控肿瘤的血管形成,tumstatin 结合 $\alpha V\beta 3/\alpha 3\beta 1$ 整合素以及通过 PI3K/Akt/mTOR/4E-BP1/COX-2 信号途径导致低氧肿瘤血管形成和蛋白合成的抑制^[8-9]。Tumstatin 能够抑制内皮细胞在基质胶上的血管结构形成,并诱导内皮细胞 G_1 期生长阻滞,通过下调 cyclin D1 的表达使细胞阻滞在 G_1 期^[10-11]。慢病毒介导的表达信号肽 TNF α -tumstatin(45 ~ 132) 的间充质干细胞显著抑制前列腺癌细胞移植瘤的血管生成^[12]。

与传统的抗血管生成药物相比,基因治疗可以将目的基因选择性表达达到特定组织,并且长期高水平表达,避免重组蛋白质药物稳定性差、可溶性差、产品生产数量有限等问题,有潜在的优势^[13]。

正常组织细胞 *hTERT* 表达受抑制,而端粒酶阳性的肿瘤细胞和永生化细胞中 *hTERT* 高表达,*hTERT* 基因启动子具有肿瘤特异性。*hTERT* 启动子驱动的溶瘤腺病毒 telomelysin 在 I 期临床试验中显示了其治疗的安全性^[14]。利用 *hTERT* 启动子在肝癌细胞内高表达的特性,本研究首次将 *hTERT* 启动子调控的 tumstatin 特异性表达于 HepG2 细胞中。人组织型纤溶酶原激活物 (tPA) 信号肽常用于目的蛋白的分泌^[15-16]。为使 tumstatin 蛋白能够分泌到细胞外,利用基因重组技术,将 tPA 信号肽与 tumstatin 基因融合,构建了真核表达载体 pH $TERT$ -tumstatin,并以 pC-MV-tumstatin 为阳性对照、pH $TERT$ -EGFP 为阴性对照。虽然 *hTERT* 启动子的转录活性较 CMV 启动子稍弱,但能够使目的基因选择性地表达于 *hTERT* 阳性的肝癌细胞 HepG2 内,提高了基因治疗的靶向性,避免了目的基因在正常组织和细胞的表达。

过去的研究^[17]已证实,全长的 tumstatin 以及包含 N 端核心区域的 tumstatin 片段只有抗血管活性,不能直接抑制肿瘤细胞生长。有研究^[18]显示,tumstatin 对表达 $\alpha V\beta 3$ 并伴 *PTEN* 突变的胶质瘤细胞无直接抑制作用,但不伴 *PTEN* 突变的胶质瘤细胞则能够被 tumstatin 抑制,*PTEN*/Akt 途径参与 tumstatin 对胶质瘤细胞的抑制作用。本研究中质粒 pH $TERT$ -tumstatin 稳定转染到 HepG2 细胞后,不抑制 HepG2 细胞的增殖。 $\alpha V\beta 3$ 表达于多种 HCC 细胞系^[19],但肿瘤抑制因子 *PTEN* 的突变和缺失在许多人类肿瘤(包括 HCC)中频繁出现^[20],也许 *PTEN* 的突变、缺失

导致了 HepG2 细胞对 tumstatin 的不敏感。

pH $TERT$ -tumstatin 质粒稳定转染于 HepG2 细胞后,在细胞外基质中检测到了目的蛋白 tumstatin 的表达,且较瞬时转染后的表达量显著提高。通过 MTS 法检测出含 tumstatin 蛋白的条件培养基 CM-T 与不含 tumstatin 蛋白的条件培养基 CM-N、CM-NT 相比,对 HUVEC 的增殖抑制达到近 60%。在包被基质胶的培养板上,tumstatin 明显抑制了 HUVEC 微血管结构的形成。

本研究成功构建 pH $TERT$ -tumstatin 质粒,经体外初步研究证实,其在肿瘤特异性 *hTERT* 启动子的调控下,能选择性地仅在 *hTERT* 阳性的肝癌细胞表达,并分泌目的蛋白 tumstatin,有效发挥抗血管形成作用,为进一步深入的体内外研究奠定了基础。利用 *hTERT* 启动子驱动抗血管生成基因,靶向抑制肿瘤血管生成,从而间接抑制肿瘤细胞生长和转移,有望成为肿瘤基因治疗的一个新策略。

[参考文献]

- [1] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6): 589-601.
- [2] Goto T, Ishikawa H, Matsumoto K, et al. Tum-1, a tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(1): 33-40.
- [3] Ohsako Y, Tsutsumi K, Li X, et al. Studies on RNA-protein interactions and enzyme activity by mutational analysis of telomerase [J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 2007 (51): 419-420.
- [4] Indran IR, Hande MP, Pervaiz S. Tumor cell redox state and mitochondria at the center of the non-canonical activity of telomerase reverse transcriptase [J]. *Mol Aspects Med*, 2010, 31(1): 21-28.
- [5] Ribeiro-Silva A, Becker de Moura H, Ribeiro do Vale F, et al. The differential regulation of human telomerase reverse transcriptase and vascular endothelial growth factor may contribute to the clinically more aggressive behavior of p693-positive breast carcinomas [J]. *Int J Biol Markers*, 2005, 20(4): 227-234.
- [6] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1020-1022.
- [7] Boosani CS, Varma AK, Sudhakar A. Validation of different systems for tumstatin expression and its *in vitro* and *in vivo* activities [J]. *J Cancer Sci Ther*, 2010, 2009: 8-18.
- [8] Boosani CS, Mannam AP, Cosgrove D, et al. Regulation of COX-2 mediated signaling by alpha3 type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1168-1177.
- [9] Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8): 4766-4771.

- [10] Hamano Y, Kalluri R. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 292-298.
- [11] Yang YP, Xu CX, Hou GS, et al. Effects of eukaryotic expression plasmid encoding human tumstatin gene on endothelial cells *in vitro* [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(16): 2269-2273.
- [12] Zhang X, Xu W, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells modified to express lentivirus-TNF alpha-tumstatin 45-132 inhibit the growth of prostate cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(2): 433-444.
- [13] Persano L, Crescenzi M, Indraco S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: Current status and future prospects [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(1): 87-114.
- [14] Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, et al. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 429-434.
- [15] Yang S, Wang C, Fang X, et al. Fusion of C3d molecule with neutralization epitope(s) of hepatitis E virus enhances antibody avidity maturation and neutralizing activity following DNA immunization [J]. *Virus Res*, 2010, 151(2): 162-169.
- [16] Luo M, Tao P, Li J, et al. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice [J]. *J Virol Methods*, 2008, 154(1/2): 121-127.
- [17] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21340-21348.
- [18] Kawaguchi T, Yamashita Y, Kanamori M, et al. The PTEN/Akt pathway dictates the direct alpha V beta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(23): 11331-11340.
- [19] Mayoral R, Fernandez-Martinez A, Bosca L, et al. Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(4): 753-761.
- [20] Peyrou M, Bourgoin L, Foti M. PTEN in liver diseases and cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(37): 4627-4633.
- [收稿日期] 2011 - 04 - 10 [修回日期] 2011 - 05 - 15
[本文编辑] 韩丹

· 简讯 ·

第十二届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知(第一轮通知)

“中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会”和“中国抗癌协会生物治疗专业委员会”联合主办,由山东大学药学院免疫药理与免疫治疗研究所和《中国肿瘤生物治疗杂志》联合承办的“第十二届全国肿瘤生物治疗学术会议”定于2011年10月8-10日在山东省济南市召开。诚邀国内各位专家与同行踊跃投稿、参加会议交流。会议期间将邀请国内外著名专家介绍本领域基础及临床研究的新进展。

征文主题:

1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略;2. 肿瘤生物治疗和诊断的新技术;3. 肿瘤生物治疗的临床应用与评价;4. 细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植);5. 新型肿瘤相关抗原的研究;6. 细胞因子治疗;7. 抗体治疗;8. 疫苗治疗;9. 基因治疗;10. 生物反应调节剂(包括中药);11. 与生物治疗相关的综合治疗;12. 肿瘤干细胞;13. 肿瘤微环境和逃逸机制研究等。

征文要求:

凡未在国内外公开刊物发表过的研究论文和相关领域国内外研究进展的综述文章均可向会议投稿。请用 word 文档的电子邮件投稿。学会为本次大会投稿注册了临时邮箱。稿件为 800~1000 字的中文摘要。如希望大会报告请附带全文。摘要包括:研究目的、方法、结果、结论,及 3~5 个关键词。请注明作者的单位、通讯作者的联系地址、电话和电子邮箱。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言。所接受的论文摘要将录入会议文集。

征文截稿日期:2011 年 8 月 8 日

收稿电子邮箱:biotherapy12@163.com

联系人:张建,张彩

联系电话:0531-88381980,0531-88383782

联系地址:山东省济南市文化西路 44 号

邮编:250012