

[ 文章编号 ] 1007-385X(2003)01-0009-04

## 腺病毒介导人血管抑素抑制乳腺癌生长的研究

罗春霞<sup>1,2</sup>, 邹卫国<sup>2</sup>, 邱松波<sup>2</sup>, 马建岗<sup>1</sup>, 刘新垣<sup>2</sup>(1. 西安交通大学生命科学与技术学院, 西安 700049; 2. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞研究所, 上海 200031)

[ 摘要 ] 目的: 研究腺病毒介导的重组人血管抑素 Plasminogen K5 基因对乳腺癌的治疗作用。方法: 通过 PCR 将人血纤维蛋白酶原的信号肽基因加至 Plasminogen 的 K5 结构域基因, 克隆到质粒 pCA13, 并在 293 细胞中同源重组, 得到腺病毒 Ad-K5。将 Ad-K5 体外感染乳腺癌细胞 B-Cap-37 和血管内皮细胞 ECV304, 观察其对细胞生长的影响, 同时在乳腺癌的裸鼠动物模型上, 检测其对肿瘤生长的抑制作用。结果: 在感染 Ad-K5 的 B-Cap-37 细胞中检测到 K5 基因 mRNA 的表达。Ad-K5 对血管内皮细胞 ECV304 有抑制作用, 但对癌细胞 B-Cap-37 没有直接抑制作用。动物实验表明 Ad-K5 能显著抑制肿瘤的生长。结论: K5 基因能抑制乳腺癌实体瘤的生长。

[ 关键词 ] 腺病毒; Plasminogen K5; 基因治疗; 乳腺癌

[ 中图分类号 ] R737.9 [ 文献标识码 ] A

## Recombinant Kringle 5 of Human Plasminogen for Mammary Cancer Gene Therapy Mediated by Adenovirus

LUO Chun-xia<sup>1,2</sup>, ZOU Wei-guo<sup>2</sup>, QIU Song-bo<sup>2</sup>, MA Jian-gang<sup>1</sup>, LIU Xin-yuan<sup>2</sup>(1. Life of Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710049; 2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of Ad-K5 on the proliferation of endothelial cells and the growth of mammary cancer. **Methods:** Kringle 5 of human plasminogen was constructed by PCR, and then cloned to plasmid pCA13. Recombinant adenovirus Ad-K5 was obtained through homologous recombination in 293 cells. The inhibition effect of Ad-K5 on cell proliferation was observed *in vitro*. The tumor size was measured at different intervals to observe the antitumoral effect of Ad-K5 *in vivo*. **Results:** The mRNA expression of K5 gene was detected in Ad-K5 infected B-Cap-37 cells. Ad-K5 inhibited the growth of ECV-304 cells, but had almost no effects on B-Cap-37 cells. It seemed that Ad-K5 could inhibit endothelial cells but not kill the cancer cells directly. Ad-K5 could also inhibit the tumor growth *in vivo*.

**Conclusion:** Ad-K5 could inhibit the growth of solid mammary tumor.

[ Key words ] adenovirus; plasminogen K5; gene therapy; mammary tumor

\* 新生血管的生成在大多数实体瘤的发展过程中起重要作用<sup>[1]</sup>, 因此增强血管抑素的表达, 已成为当今肿瘤治疗的热点。人血纤维蛋白酶原(Plasminogen)共有 5 个环(kringle), Angiostatin(新生血管抑素)是其 Kringle 1~4 片段, 是目前运用非常广泛的新生血管抑素<sup>[2-3]</sup>。但研究发现, plasminogen 的更小片段对血管内皮细胞生长具有更强的抑制作用, 其中 K1-3 的活性大于 K1-4, K5 的活性大于 K1-3<sup>[4-6]</sup>。然而此类血管抑素在体外极不稳定且易失活, 体内作用时间短需反复注射, 因而使用重组蛋白制剂治疗肿瘤非常昂贵而且烦琐。鉴于此, 我们重组了一个携带信号肽的人 plas-

minogen K5 基因, 以腺病毒为载体使目的基因 K5 在体内稳定表达, 在体外和裸鼠乳腺癌模型中研究其对肿瘤的抑制效果。

### 1 材料与方法

[ 基金项目 ] 本课题受中科院 95 重大项目(No. KSCX2-3-06)、国家自然科学基金(No. 30120160823)和国家“863”高科技项目(No. 2001AA217031)资助。

[ 作者简介 ] 罗春霞(1972-), 女, 硕士, 主要从事基因病毒治疗研究。

[ 通讯作者 ] 刘新垣, E-mail: xyliu@sibs.ac.cn

### 1.1 主要材料

293 细胞购自加拿大; pBluescript SK( II )-K5 由上海生化与细胞所郭礼和研究员惠赠; bFGF 由上海生化与细胞所甘人宝研究员惠赠; pCA13 和 pBHGE3 质粒, ECV-304 细胞和 B-Cap-37 细胞, Ad-EGFP 病毒等为本实验室保存; 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; Pfu 酶、Taq 酶、RT-PCR 试剂盒购自上海生工; Lipofectamine, DMEM, 小牛血清及胎牛血清购自 Gibco 公司; QIAamp DNA Blood Mini Kit 购自 Qiagen 公司。

### 1.2 重组腺病毒包装载体 pCA13-K5 的构建

以 pBluescript SK( II )-K5 为模板通过 PCR 将 K5 基因大量扩增并在其上游加入一段 19 个氨基酸的信号肽和 EcoR I 酶切位点, 下游引入终止密码子和 BamH I 酶切位点。PCR 扩增的引物分别为 P1: 5'-GGGGTTCGACCAAAATGGAACATAAGGAAGTGGTTCTTCTACTTCTTTTATTTCTGAAATCAGGTCAAGGACTGCTTCCAGATGTAGAGACTCCTTCCGAAGA-3'; P2: 5'-GATGGATTCTCACTATGAAGGGGCCGCACACTGA-3'。回收的重组 K5 片段克隆至 pCA13 质粒, EcoR I + BamH I 酶切鉴定正确后进一步测序鉴定。

### 1.3 腺病毒 Ad-K5 的构建、筛选、鉴定及扩增

质粒 pCA13-K5 与 pBHGE3 共转染 293 细胞, 在其中同源重组, 低熔点胶进行空斑筛选, 挑斑感染 24 孔板 293 细胞。再用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit 抽提病毒 DNA, PCR 鉴定可以扩增 K5 内部 (1456-1735) 含 279 个碱基的片段。引物为 P3: 5'-GGACTGCTTCCAGATGTAGA-3'; P4: 5'-CACACTGAGGGACATCACA-3'。

经 PCR 鉴定正确的 Ad-K5 再通过空斑纯化, 尽量减少野生型病毒的污染。纯化鉴定后在 10 cm dish 上扩增, 氯化铯梯度超速离心, 4℃透析过夜, 于 -70℃ 保存。

### 1.4 内皮细胞增殖分析<sup>[1,5]</sup>

分别用 20, 50, 100 MOI Ad-K5 和对照病毒 Ad-EGFP 感染血管内皮细胞 ECV-304 和乳腺癌细胞 B-Cap-37, 12 h 后, 细胞用胰酶消化, 重悬于培养液中。将重悬的细胞种入 96 孔板, 每孔 5 000 个细胞, 培养 72 h 后, 用 MTT 染色法测活细胞数。另外, 为进一步证明 K5 能正确分泌及其对内皮细胞的抑制作用, 分别用 100 MOI 的 Ad-K5 和 Ad-EGFP 感染 B-Cap-37 细胞, 48 h 后收集上清, 过滤除菌, 56℃ 30 min 灭活病毒。将处理好的上清按 10%, 20%, 40% 的比例分别加至已经培养 24 h 的 ECV-304 细胞培养皿中, 培养 72 h 后, 光镜下检测, 拍照。同时进行 MTT 染色, 测活细胞数。

### 1.5 RT-PCR 分析 K5 mRNA 的表达

100 MOI 的 Ad-K5 和 Ad-EGFP 分别感染 B-Cap-37 细胞 2 d 后, 用 Trizol 试剂抽提总 RNA。再用 MMLV cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA, 再进行 PCR。PCR 引物为上述 P3 和 P4。

### 1.6 Ad-K5 在体内对乳腺癌的抑制分析

大量培养 B-Cap-37 乳腺癌细胞, 胰酶消化, 细胞重悬于 PBS 中, 计数并稀释至  $5 \times 10^6$  ml, 每只 4 周龄的裸鼠皮下注射 200  $\mu$ l 癌细胞悬浮液, 5 d 后移植的肿瘤生长至直径 4 mm 左右, 将其随机分组, 每组 6 个, 对照组和治疗组分别注射  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml 的 Ad-EGFP 和 Ad-K5 100  $\mu$ l。2 d 后再注射 1 次。观察肿瘤生长情况并用游标卡尺测量肿瘤大小。肿瘤体积计算 ( $\text{mm}^3$ ): 长  $\times$  宽  $\times$  高/2。

### 1.7 统计学处理

数据用 *t* 检验进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 K5 的修饰与鉴定

pCA13-K5 经 EcoR I 和 BamH I 酶切出现和目的片段大小 362 bp 相一致的条带, 进一步测序分析表明, K5 基因在 N 端加上了 plasmidogen 信号肽, 有起始密码子, C 端有终止密码子。

### 2.2 Ad-K5 的筛选和鉴定

P3, P4 引物和 K5 基因配对。抽提病毒 DNA, 用 P3, P4 引物进行 PCR 鉴定, Ad-K5 出现 279 bp 的片段, 而 Ad-EGFP 没有该条带出现 (见图 1)。证明重组腺病毒 Ad-K5 中含有 K5 基因。

图 1 PCR 鉴定腺病毒 Ad-K5 中重组入 K5 基因

Fig. 1 The verification of K5 gene included in Ad-K5 by PCR

1: Ad-K5; 2: Positive control (pCA13-K5);  
3: Ad-EGFP; 4: DL2000 marker;

### 2.3 RT-PCR 检测 K5 mRNA 的表达

用引物 P3 和 P4 进行 RT-PCR, 在 Ad-K5 感染的 B-Cap-37 细胞中检测到 K5 基因 mRNA 的表达 (得到

的片段大小为 279 bp, 与阳性对照 pCA13-K5 质粒直接 PCR 扩增出的片段一致), 而对照病毒 Ad-EGFP 没有出现此片段(见图 2)。

72 h 后, 光镜下检测发现 Ad-K5 感染后的细胞上清能抑制内皮细胞的生长, 引起细胞死亡。而 Ad-EGFP 感染后的细胞上清不能抑制内皮细胞的生长(见图 4, 为 40% 上清的抑制情况)。表明 Ad-K5 感染 B-Cap-37 后, 细胞培养液中分泌有 K5 蛋白, 能抑制血管内皮细胞的生长。

图 2 RT-PCR 检测 K5 的 mRNA 的表达

Fig. 2 The analysis of K5 expression by RT-PCR

1: Ad-K5; 2: Ad-EGFP; 3: Positive control (pCA13-K5);  
4: Negative control; 5: DL2000 marker

#### 2.4 抑制内皮细胞增殖分析

分别用一定剂量 Ad-K5 和 Ad-EGFP 感染 ECV-304 血管内皮细胞和 B-Cap-37 乳腺癌细胞发现, Ad-K5 对内皮细胞的增殖的抑制作用随剂量的增加而增强, 100 MOI 时抑制效率达 81% (见图 3A), 对乳腺癌细胞则没有相似抑制作用(见图 3B)。

为进一步排除病毒对分析的干扰, 用病毒感染乳腺癌细胞, 2 d 后收集细胞培养液并灭活病毒, 再按 10%, 20%, 40% 的比例加入 ECV-304 细胞培养液中;

图 3 体外 Ad-K5 对内皮细胞及癌细胞的增殖抑制分析

Fig. 3 The analysis of inhibition effect on endothelial cells and mammary cancer cells infected by Ad-K5 *in vitro*

A: Endothelial cells ECV-304; B: Mammary cancer cells B-Cap-37

图 4 感染不同病毒的癌细胞上清液对 ECV-304 内皮细胞的抑制

Fig. 4 The supernatant of B-Cap-37 cells infected by Ad-EGFP or Ad-K5 inhibits the proliferation of ECV-304 cells

A: Control (no adenovirus infected); B: Ad-EGFP; C: Ad-K5.

## 2.5 Ad-K5 在体内对肿瘤的抑制作用

皮下接种 B-Cap-37 细胞的裸鼠,5 d 后均长出肿瘤,重组病毒治疗后,对照组和治疗组不同时间肿瘤的生长状况见图 5,发现 Ad-K5 能明显抑制肿瘤的生长。

## 3 讨论

新生血管生成(angiogenesis)在胚胎发育、伤口愈合、组织和器官的再生中起非常重要的作用。在糖尿病、视网膜病、肿瘤生长及其迁移等病理条件下,均可导致异常的新生血管生成。实验和临床研究表明,原发肿瘤可因为其肿瘤细胞增殖和凋亡间维持平衡而保持静止,但一旦新生血管生成,就会引发肿瘤发展。血管内皮生长因子(VEGF)或者碱性成纤维生长因子(bFGF)的上调和/或血管抑素 angiostatin 等的下调会引发肿瘤的新生血管生成<sup>[7]</sup>,因此,抑制血管生长因子或者增强血管抑素的表达,已经成为肿瘤治疗的热点。由于新生血管生成在大多数实体肿瘤的发展过程中起重要作用,因此研究血管抑素在肿瘤治疗中的作用其意义就更显突出。

图 5 在体内 Ad-K5 对乳腺癌的抑制作用

Fig. 5 Ad-K5 inhibits the growth of mammary tumor *in vivo*

Angiostatin 即 plasminogen 的 Kringle 1~4 片段,最初从患 Lewis 肺癌的老鼠中分离所得,它主要通过抑制肿瘤新生血管生成使肿瘤细胞的凋亡达到抑制肿瘤的生长。实验证明将 angiostatin 直接注射入 6 种不同的肿瘤,能明显抑制肿瘤的生长而没有明显的毒副作用<sup>[8]</sup>。然而 angiostatin 的作用持续时间很短,在其作用消失后常常导致肿瘤重新快速生长。因此,怎样保持 angiostatin 的持久作用就成为一个非常重要的研究课题。

Plasminogen 有 5 个环,研究发现其更小片段对肿瘤具有更强的抑制作用。Cao 等人发现 K1-4 对牛毛细血管内皮细胞达到半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)需 135

nmol/L,K1-3 需 70 nmol/L 而 K5 只需 50 nmol/L<sup>[4,6]</sup>。由于 K5 注射同样存在作用时间短的问题,为了达到长期有效的抑制体内血管生成,我们采用人 plasminogen K5 进行了基因治疗研究。因为 K5 只是 plasminogen 的第 5 个环,为了能得到分泌到胞外的活性因子,我们设计了一个 101 bp 包含 plasminogen 信号肽的引物,用 PCR 的方法在 K5 的 N 端加入一段信号肽。由于国际上没有 K5 的抗体,我们没有在蛋白水平上检测 K5 基因的表达。但我们用 RT-PCR 的方法,在 mRNA 水平上检测到 K5 基因的表达。并且细胞实验显示,Ad-K5 能抑制内皮细胞的生长,Ad-K5 感染癌细胞后,收集的细胞培养液也能抑制内皮细胞的生长。

运用腺病毒作为载体介导重组 K5 基因较有效的解决了蛋白治疗的弊端,通过对裸鼠人乳腺癌模型的治疗研究,发现有较好的抑癌效果。由于该基因治疗对肿瘤细胞并没有直接的杀伤作用,因此若能将 K5 基因与其他抑癌基因如 TRAIL 等联合治疗<sup>[9]</sup>,在肿瘤发生发展初期抑制其快速生长,将有望取得更好的疗效,这些工作正在进一步研究中。

## [参考文献]

- [1] Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, *et al.* Angiostatin gene transfer: Inhibition of tumor growth *in vivo* by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6367-6372.
- [2] 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: 315-328.
- [3] Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(1-2): 97-107.
- [3] 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: 22924-22928.
- [4] Lu H, Dhanabal M, Volk R, *et al.* Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(3): 668-673.
- [5] Lu H, Yuan H, Li Y. Expression of human plasminogen kringle 5 as fusion protein with truncated hIFN $\gamma$  gene in *Escherichia coli*[J]. *J Biotechnol*. 2002, 94(3): 277-285.
- [6] Gyorffy S, Palmer K, Gaudie J, *et al.* Adenoviral vector expressing murine angiostatin inhibits a model of breast cancer metastatic growth in the lungs of mice[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 1137-1147.
- [7] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, *et al.* Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice[J]. *Nat Med*, 1996, 2(6): 689-692.
- [8] O'Reilly MS. The combination of antiangiogenic therapy with other modalities[J]. *Cancer*, 2002, 8(1): s89-s99
- [9] 张波, 邹卫国, 刘新垣, 等. 人内皮抑素转基因治疗 B16 黑色素瘤的实验研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(5): 451-454.