

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )04-0266-06

## 含 MMP-9 信号肽、人 MMP-2 PEX 片段腺病毒载体的构建及其生物学活性

纪素娟, 张志谦 ( 北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所, 北京 100036 )

**[ 摘 要 ] 目的:** 构建含 MMP-9 信号肽、人 MMP-2 PEX 片段融合蛋白的重组腺病毒( ET-M9-PEX ), 通过基因治疗策略建立患者体内药物生物反应器, 以期利用抗血管因子的体内表达实现肿瘤的有效治疗。 **方法:** 利用 PCR、基因重组等技术, 构建含 M9-PEX 融合蛋白的腺病毒载体, 经 L293 细胞包装、扩增后得到有感染力的 ET-M9-PEX 重组腺病毒。用 Western blotting 和免疫荧光检测其感染细胞后 PEX 的表达和分泌, 通过生长曲线观察其感染内皮细胞( endothelial cell, EC )的培养上清对 EC 增殖的影响, 利用鸡胚绒毛尿囊膜( chicken chorioallantoic membrane, CAM )实验检测其对血管发生和种植瘤生长的影响。 **结果:** ET-M9-PEX 构建成功, 感染细胞后有 PEX 的表达和分泌。体外实验表明, ET-M9-PEX 感染细胞的培养上清能抑制 EC 增殖。体内实验证实, ET-M9-PEX 感染后的 PG 细胞接种于 CAM, 与 E-T 相比, 对瘤重的抑制率为 57.57% (  $P < 0.01$  ), 对一级血管的抑制率为 33.52% (  $P < 0.01$  ); 而 E-T 和 PBS 组之间瘤重和一级血管数均无显著性差异。 **结论:** 构建的 ET-M9-PEX 重组腺病毒能显著抑制 EC 细胞增殖, 抑制 CAM 种植瘤生长和血管发生, ET-M9-PEX 有望成为肿瘤基因治疗的有效药物。

**[ 关键词 ]** PEX; MMP-2; 信号肽; 重组腺病毒; 基因治疗

**[ 中图分类号 ]** R730.54 **[ 文献标识码 ]** A

## Construction of a recombinant adenovirus containing MMP-9 signal peptide and PEX domain of human MMP-2 and study of its activity

Ji Su-juan, Zhang Zhi-qian ( School of Oncology, Peking University; Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China )

**[ Abstract ] Objective:** To construct a recombinant adenovirus ( abbreviated as ET-M9-PEX ) containing MMP-9 signal peptide and noncatalytic carboxyl-terminal hemopexin domain of human MMP-2, and to use the constructed adenovirus as a drug bioreactor *in vivo* to enhance the expression of an anti-angiogenesis factor for treatment of tumor by a gene therapy strategy. **Methods:** Adenovirus vector containing M9-PEX gene was constructed by PCR and gene recombination, and was packaged and amplified in L293 cells to obtain ET-M9-PEX recombinant adenovirus with infective ability. The expression and secretion of PEX in ET-M9-PEX-infected cells were detected by Western-blotting and immunofluorescent staining. The inhibitory effect of ET-M9-PEX-conditioned medium on EC cells proliferation was detected by growth curve and its inhibitory effects on angiogenesis and tumor growth were determined by chicken chorioallantoic membrane ( CAM ) assay *in vivo*. **Results:** ET-M9-PEX was successfully constructed and the expression and secretion of PEX in ET-M9-PEX-infected cells were verified. The ET-M9-PEX conditioned medium significantly inhibited the proliferating rate of EC cells. The tumor weights from ET-M9-PEX-infected PG cells in CAM and grade I vessel number were reduced by 57.57% (  $P < 0.01$  ) and 33.52% (  $P < 0.01$  ), respectively, compared with E-T. However, neither the tumor weight nor the vessel number was significantly different between E-T and PBS groups. **Conclusion:** ET-M9-PEX constructed in the present study shows remarkable inhibitory effects on EC proliferation, tumor growth and angiogenesis on CAM, suggesting that ET-M9-PEX may be a promising candidate for tumor gene therapy.

**[ Key words ]** PEX; MMP-2; signal peptide; recombinant adenovirus; gene therapy

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13( 4 ): 266-271 ]

血管生成是实体肿瘤生长的必要条件<sup>[1]</sup>, 抑制肿瘤血管发生被认为是药物治疗实体肿瘤的有效手段<sup>[2]</sup>。目前的抗血管生物制品药物( 如 endostatin、angiostatin )主要是多肽或蛋白类因子, 存在价格昂贵、在

**[ 基金项目 ]** 国家自然科学基金( 30572160 ); 北京市自然科学基金( 7002009 ); 国家人事部留学回国人员重点项目  
**[ 作者简介 ]** 纪素娟( 1978- ), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗研究  
**[ 通讯作者 ]** 张志谦, E-mail: zlzqzhang@bjmu.edu.cn

体内降解迅速、需长期反复给药、靶部位有效浓度低等问题,在临床应用中受到很大限制。本研究拟利用基因治疗策略,将此类药物导入肿瘤发生部位使之在患者体内长期表达,制造成体内药物生物反应器,以期实现肿瘤治疗领域的新突破。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是降解细胞外基质成分的主要酶类,因参与血管发生和肿瘤侵袭转移成为肿瘤生物治疗的新靶点<sup>[3-4]</sup>。其中,MMP-2与细胞表面整合素家族成员 $\alpha_3\beta_3$ 的相互作用是控制血管发生时内皮细胞浸润的关键步骤。PEX是MMP-2 C末端血红蛋白样结构域,在MMP-2活化过程中被水解为游离片段,游离PEX与活化MMP-2竞争结合 $\alpha_3\beta_3$ 而抑制血管发生<sup>[5]</sup>。由于PEX作用的靶点位于细胞外,必须将细胞表达的PEX输送到细胞外才能发挥活性。信号肽在体内分泌型蛋白质的成熟和定向转运过程中十分重要,近年来发现其亦可使非分泌性蛋白质或短肽分泌到细胞外<sup>[6-7]</sup>。不同信号肽引导蛋白分泌的效率不同,选择高效、适宜的信号肽也是影响该体系性能的重要因素。本室的前期工作表明,MMP-9信号肽具有较强的引导蛋白分泌功能。因此本研究构建了MMP-9信号肽、人MMP-2 PEX融合蛋白,并将其克隆到腺病毒载体内。利用腺病毒宿主范围广、转导效率高、安全性好和便于纯化易得到高滴度病毒等特点,作为目的基因的转移载体,以抗血管发生为切入点,探讨建立患者体内药物生物反应器的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

质粒 human-PEX-pet28a、m9-IGF-pcDNA3.0、pAdTrack-CMV-IFN-chicken PEX及腺病毒空载体 E-T均由本室构建保存; *E. Coli* 菌株感受态 DH5 $\alpha$ 、BJ5183由本室制备保存;细胞系 L293、EC、Cos-7、PG均由本室保存;细胞培养基 RPMI 1640、DMEM购自 GIBCO/BRL,胎牛血清购于 PAA Laboratories GmbH Co;PCR 级蛋白酶 K 购自 Roche Co;限制性内切酶购自 NEB;T4 DNA ligase、Lipofectamine2000 购自 Invitrogen Co;Taq DNA polymerase 及 dNTP 购自北京天为时代公司;引物由上海生工合成;一抗为 PEX 多克隆抗体由本室制备,二抗为 Rhodamine 荧光标记的羊抗兔 IgG、HRP 羊抗兔 IgG 购自 Jackson Co;DAPI 购自 Sigma Co;PCR 产物回收试剂盒购自北京法特捷公司,来航鸡白皮种蛋由中国农业大学提供。

### 1.2 m9-PEX-pAdTrack-CMV 穿梭质粒的构建

以 human-PEX-pet28a 质粒为模板扩增 human-pex 片段(578 bp)。上游引物:5'-CTGGGATCC(*Bam*H I )

CGATCTGCAAACAGGACAT-3';下游引物:5'-CATCTC-GAG(*Xho* I )TCAGCCTAGCCAGTC-3'。m9-IGF-pcDNA3.0 质粒和 PCR 纯化产物均以 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切,前者回收载体大片段(m9-pcDNA3.0)与 PCR 酶切产物分别过柱纯化,连接得到 m9-PEX-pcDNA3.0,连接产物转化 *E. Coli*. DH5 $\alpha$ CaCl<sub>2</sub>感受态,用 Amp 筛选阳性克隆。取 m9-PEX-pcDNA3.0 和 pAdTrack-CMV-IFN-chickenPEX 质粒均以 *Hind* III / *Xba* I 双酶切,前者回收 m9-pex 小片段,后者回收 pAdTrack-CMV 大片段,纯化后连接得到 m9-PEX-pAdTrack-CMV,用 Kan 筛选阳性克隆。

### 1.3 病毒质粒的同源重组和包装纯化

1.3.1 BJ5183-AD-1 电转感受态的制备 pAdEasy-1 是缺失 E1、E3 编码区的人血清 V 型腺病毒骨架载体,具有 Amp 抗性。重组后 Amp 抗性丢失保留穿梭质粒的 Kan 抗性。取 pAdEasy-1 质粒 1  $\mu$ l(100 ng/ $\mu$ l)电穿孔转化 40  $\mu$ l BJ5183 感受态细胞(2 500 V、200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F, Bio-Rad 基因电转仪),Amp 筛选阳性克隆。将阳性克隆(BJ5183-AD-1)大量摇菌,制备电转感受态细胞<sup>[8]</sup>。

1.3.2 M9-PEX-pAdTrack-CMV 与 pAdEasy-1 的同源重组 取 *Pme* I 线性化的 M9-PEX-pAdTrack-CMV 1  $\mu$ l(约 100 ng)电转 40  $\mu$ l BJ5183-AD-1 感受态(电转条件同 1.3.1),用 Kan 筛选克隆,提取的 ET-M9-PEX 重组质粒分别用 *Hind* III / *Xba* I 双酶切和 *Pac* I 单酶切鉴定。鉴定的阳性质粒转化 DH5 $\alpha$ ,大量扩增提取质粒以备转染。

1.3.3 ET-M9-PEX 重组腺病毒质粒的包装、扩增、纯化和滴度测定 取 *Pac* I 酶切的 ET-M9-PEX 质粒转染密度约 80%~90%的 L293 细胞(具体方法参见 Lipofectamine 2000 说明书)。转染后 6~7 d,细胞呈 CPE(cytopathic effects)表现。细胞反复冻融的裂解液感染一瓶 75 cm<sup>2</sup>、传代 24 h,80%~90%融合的 L293 细胞。24~36 h 后细胞呈 CPE 表现,收集细胞裂解后再感染 5 瓶 75 cm<sup>2</sup> 细胞,依次循环。收集细胞离心后用无菌 PBS 轻悬细胞沉淀,再次离心沉淀于 -70 $^{\circ}$ C 保存。多次收集的细胞沉淀加少量 PBS 反复冻融裂解,上清用 CsCl 密度梯度超速离心法纯化<sup>[9]</sup>。取纯化病毒倍比稀释,用 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 稀释液各 100  $\mu$ l 分别感染传代 24 h、80%~90%融合的 L293 细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 2 h 更换完全培养基,继续培养 22 h,于荧光显微镜下计数 GFP 标记的细胞。选取每个视野下绿色细胞数目为 20~100 的培养皿,计算病毒滴度(物镜 16 $\times$ ),公式如下:病毒滴度(pfu/ml) = GFP 阳性细胞数  $\times$  培养皿直径<sup>2</sup> / (上样病毒液体积  $\times$  稀释度  $\times$  所用放大倍数下实

视场直径<sup>2</sup>)。

1.4 ET-M9-PEX 基因组中 *pex* 基因及其表达鉴定

1.4.1 PCR 鉴定 取纯化病毒 ET-M9-PEX 和 E-T 对照各 10 μl,用 PCR 级蛋白酶 K 37℃ 消化 2 h,65℃ 灭活蛋白酶 K 10 min 后进行真空抽干浓缩,分别取 1 μl 为模板,用 1.2 中相同的引物进行 PCR。

1.4.2 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定 ET-M9-PEX 和 E-T 各按 MOI = 10 和 PBS 分别处理 Cos-7 细胞 2 h,更换无血清培养基继续培养 24 ~ 48 h,收集细胞和上清。细胞以 RIPA 裂解,培养上清用半透膜浓缩 10 倍,处理后各取 10 μl 上样。浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%,10 mA 恒流电泳继之 75 V 恒压转膜,PVDF 膜用一抗 anti-*pex* 多抗(1:2 000 稀释)室温孵育 2 h,HRP 标记的二抗(1:40 000 稀释)室温孵育 1 h,最后加 ECL Plus 试剂室温反应 5 min,暗室压片、显影、定影。

1.4.3 免疫荧光鉴定 分别用 ET-M9-PEX 和 E-T 感染 EC 细胞 24 ~ 48 h。2% 甲醛/PBS 液室温固定 3 min,0.5% Triton X-100/PBS 漂洗,细胞盖片与一抗(1:60 稀释)37℃ 孵育 1 h,洗涤后用 Rhodamine 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:300 稀释)37℃ 孵育 1 h,用 DAPI/0.9% NaCl(1:2 000 稀释)室温染核 2 min,60% 甘油/PBS 封片,荧光显微镜观察。

1.5 功能检测

1.5.1 血管内皮细胞( EC )生长曲线 ET-M9-PEX 和 E-T 各按 MOI = 10 感染 EC 细胞 2 h,更换完全培养基,继续培养 48 ~ 72 h 收集培养上清。接种 EC 细胞 1 × 10<sup>4</sup>/孔于 24 孔板,实验分 4 组进行,即每组细胞培养 24 h 后分别更换完全培养基、1:2 及 1:10 稀释的 ET-M9-PEX 培养基、1:2 稀释的 E-T 培养基。每组每天计数 3 孔,连续计数 5 d,取均数绘制曲线。

1.5.2 鸡胚绒毛尿囊膜( CAM )种植瘤实验<sup>[10]</sup> 实验共分 3 组,每组 8 只鸡蛋,各组接种的 PG 细胞分别于接种前 24 h 用 PBS、MOI = 10 的 ET-M9-PEX、ET 处理。取受精 10 d 白皮蛋分别在鸡蛋钝端气室处和侧面血管丰富处开窗,用吸耳球在钝端开窗处吸引,造成侧面的人工气室。窗口用无菌胶条封闭,保持侧窗朝上 37℃ 培养 24 h,每只鸡蛋于侧窗处接种 2 × 10<sup>6</sup> 个 PG 细胞,封闭侧窗 37℃ 培养 7 d,第 8 天开窗计数肿瘤周边一级血管数目<sup>[11]</sup>,并摘取瘤体测重量。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验分析,*P* < 0.05 为差异有显著性意义,*P* < 0.01 为差异有高度显著性意义。

2 结 果

2.1 3 种质粒酶切鉴定

M9-PEX-pcDNA3.0、M9-PEX-pAdTrack-CMV、ET-M9-PEX 分别经 *Hind*III/*Xba*I 双酶切均产生一条 670 bp 片段(与 M9-PEX 片段理论值大小相符),证明 M9-PEX 序列存在于重组腺病毒质粒中(图 1)。ET-M9-PEX 经 *Pac*I 酶切(图 2)产生 30 kb 和 4.5 kb 两条片段,证实同源重组成功。M9-PEX-pcDNA3.0 以 T7 和 Sp6 启动子为引物送上海生工公司测序,显示该质粒含 MMP-9 信号肽和 human-*pex* 两个片段,序列一致,读码框架正确。

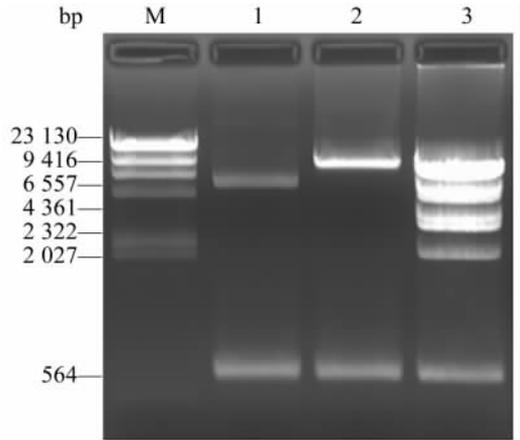


图 1 3 种质粒酶切图谱

Fig.1 Enzyme digestive map of three plasmids M:λDNA /*Hind*III Marker; 1: M9-PEX-pcDNA3.0 (*Hind*III/*Xba*I); 2: M9-PEX-pAdTrack-CMV (*Hind*III/*Xba*I); 3: ET-M9-PEX(*Hind*III/*Xba*I)

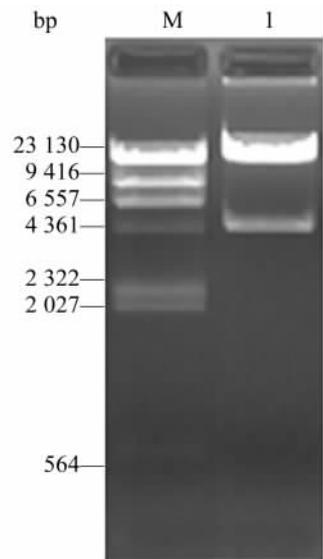


图 2 重组腺病毒质粒用 *Pac*I 酶切鉴定

Fig.2 Identification of ET-M9-PEX digested with *Pac*I M:λDNA /*Hind*III Marker; 1: ET-M9-PEX(*Pac*I)

2.2 病毒滴度测定

ET-M9-PEX 滴度为  $9.3 \times 10^9$  pfu/ml, E-T 滴度为  $7.4 \times 10^9$  pfu/ml。

2.3 ET-M9-PEX 基因组中 *pex* 基因及其表达鉴定

2.3.1 PCR 结果 以病毒基因组 DNA 为模板、human-*pex* 特异性引物进行 PCR, ET-M9-PEX 的扩增产物位于 564 bp 附近, 与 *pex* 大小理论值 578 bp 相符; E-T 扩增后没有任何产物(图 3)。

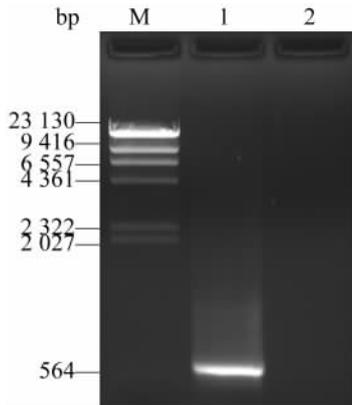


图 3 PCR 鉴定 ET-M9-PEX 基因组中 *pex* 基因

Fig. 3 Identification of *pex* gene in ET-M9-PEX by PCR  
M:  $\lambda$ DNA / *Hind* III marker; 1: ET-M9-PEX amplified with human-*pex* primer; 2: E-T amplified with human-*pex* primer

2.3.2 Western blotting 检测 ET-M9-PEX 感染 Cos-7 细胞中 PEX 蛋白的表达 ET-M9-PEX 感染的 Cos-7 细胞裂解液、培养上清中均有一条 25 000 的蛋白条带, 而

E-T 感染及 PBS 处理的 Cos-7 细胞裂解液和培养上清均无此蛋白条带。说明 ET-M9-PEX 感染的细胞中有 PEX 蛋白的表达(分子大小与理论值相符), MMP-9 信号肽能有效引导 PEX 的分泌(图 4)。

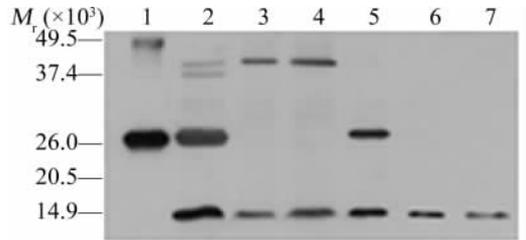


图 4 Western blotting 检测 ET-M9-PEX 感染后 Cos-7 细胞中 PEX 的表达和分泌

Fig. 4 Expression and secretion of PEX in Cos-7 cells infected with ET-M9-PEX detected by Western blotting  
1: Purified human-*pex* protein; 2,3,4: Cell lysates of Cos-7 infected by ET-M9-PEX, E-T and PBS, respectively; 5,6,7: Supernatant of Cos-7 infected by ET-M9-PEX, E-T and PBS, respectively

2.3.3 免疫荧光检测 ET-M9-PEX 感染 EC 细胞中 PEX 蛋白的表达 DAPI 染核呈蓝色, GFP 呈绿色, Rhodamine 标记的二抗呈红色。由图 5 可见 ET-M9-PEX 与 E-T 感染后 EC 细胞均有 GFP 表达, 但只有 ET-M9-PEX 感染的 EC 细胞表达和分泌 PEX 蛋白, 在胞质中呈分散的红色颗粒状, 在胞膜上呈局部聚集现象(帽沿征)。

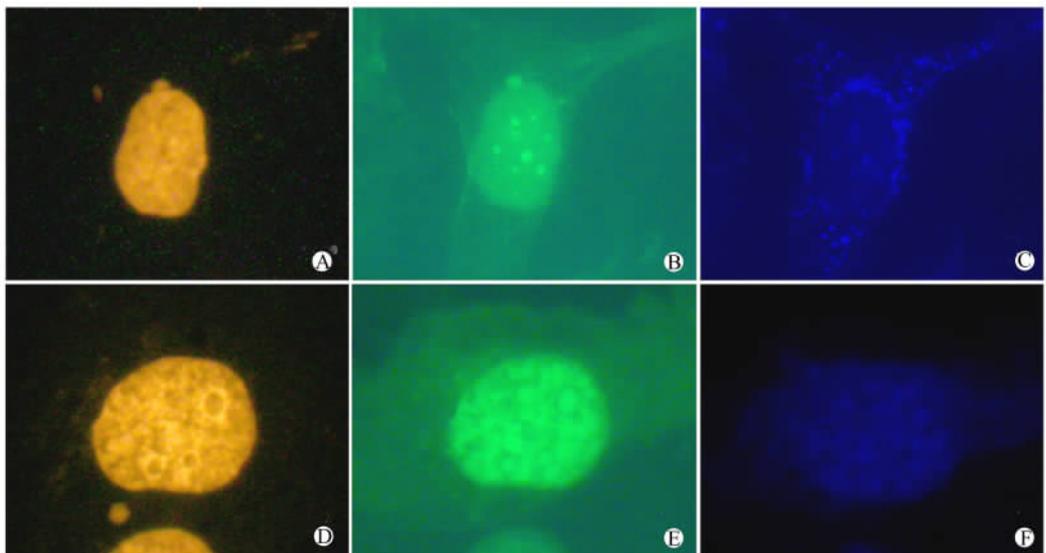


图 5 免疫荧光检测 ET-M9-PEX 感染后 EC 细胞中 PEX 的表达(  $\times 400$  )

Fig. 5 Expression of PEX in ET-M9-PEX-infected EC cells by immunofluorescent staining(  $\times 400$  )  
A, B, C: EC cells infected by ET-M9-PEX; D, E, F: EC cell infected by E-T

### 2.4 ET-M9-PEX 感染靶细胞表达的 PEX 蛋白对 EC 细胞增殖的影响

从图 6 的 EC 细胞生长曲线可以看到,在 1:2 相同稀释倍数下,ET-M9-PEX 组 EC 生长速度从第 4 天开始显著低于 E-T 对照组 ( $P < 0.05$ ),在第 5 天该差异有高度显著性 ( $P < 0.01$ ),说明实验组培养基中的 PEX 蛋白能有效抑制 EC 增殖。1:2 稀释的实验组对 EC 增殖的抑制作用较 1:10 稀释的实验组明显,说明 PEX 对 EC 增殖的抑制作用随蛋白浓度的增加而增强。

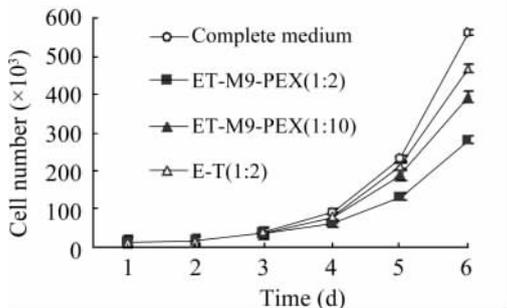


图 6 ET-M9-PEX 感染靶细胞表达 PEX 蛋白对 EC 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effect of PEX produced by ET-M9-PEX infected cells on EC proliferation

### 2.5 ET-M9-PEX 感染对种植瘤增殖和血管生长影响

由表 1 可见,ET-M9-PEX 组的瘤重和血管数均显著低于 PBS 组和 E-T 组 ( $P < 0.01$ ),而 PBS 组和 E-T 组之间的瘤重和血管数无显著性差异。这表明 ET-M9-PEX 具有明显抑制肿瘤生长和血管发生的活性,此抑制作用并非由腺病毒载体本身的毒性作用引起。

表 1 CAM 实验种植瘤的重量和血管数

Tab.1 Tumor weight and vessels in CAM assay ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Tumor weight( g )	Vessel number
PBS( n = 6 )	0.036 ± 0.012	49.00 ± 5.05
E-T( n = 8 )	0.031 ± 0.007	57.12 ± 12.28
ET-M9-PEX( n = 7 )	0.013 ± 0.002 **	34.25 ± 9.38 **

\*\*  $P < 0.01$  vs PBS or E-T group

## 3 讨论

血管发生和浸润转移是肿瘤恶性发展的重要指标,血管发生也是肿瘤细胞浸润转移的前提和结构基础<sup>[12]</sup>。诸多动物实验表明抑制血管发生可抑制肿瘤生长<sup>[13-15]</sup>。Lorenzo<sup>[16]</sup>等人报道纯化 PEX 蛋白能同

时抑制血管发生和体外培养的肿瘤细胞增殖、浸润转移。这一特性使 PEX 比其他仅作用于血管内皮细胞的抗血管药物(如血管抑素、内皮抑素)具备更强的抑瘤潜力。作为体内蛋白自然降解的片段,PEX 没有免疫原性。PEX 特异性阻断 MMP-2 和  $\alpha_v\beta_3$  的结合而不影响两者各自与其他配体的结合,很少引起副作用。内皮细胞特性稳定,不易对 PEX 产生耐受是 PEX 发挥长期作用的有利条件。

腺病毒载体有易于包装和扩增、易获得高滴度病毒、宿主范围广、感染效率高、安全性好、整合突变可能性小等特点,在基因治疗领域已有广泛的应用。研究证实 MMP-9 信号肽具有高效引导分泌功能。因此,本研究构建了含 M9-PEX 融合蛋白的重组腺病毒载体,旨在通过腺病毒的介导使受体细胞不断表达分泌活性 PEX,建立起患者体内药物生物反应器,实现稳定持久抗血管发生的目标。

ET-M9-PEX 组培养上清可明显抑制 EC 增殖,表明 PEX 能在靶细胞内表达和分泌,细胞分泌的 PEX 具有良好的生物活性。CAM 种植瘤实验中 ET-M9-PEX 组的瘤重和血管数均显著低于 E-T 组 ( $P < 0.01$ ),为 ET-M9-PEX 应用于患者体内提供了实验依据。ET-M9-PEX 体系含有高效、通用性信号肽,可引导其他多种分泌和非分泌蛋白的细胞外定位,表达的目的蛋白具有良好的生物活性,目的蛋白能在体内源源不断地表达,克服了外源蛋白需长期反复给药的缺点。

总之,本研究建立的 ET-M9-PEX 重组腺病毒具有明显抗血管发生和抑瘤效应,为肿瘤基因治疗体内药物生物反应器的建立奠定了基础,也可推广至其他蛋白类药物,用于许多非肿瘤疾病的治疗,为这些药物的临床应用开辟了新的途径,具有广阔的应用前景。

### [参考文献]

- [1] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [2] Lin P, Buxton JA, Acheson A, et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15): 8829-8834.
- [3] Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases[J]. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21491-21494.
- [4] Stetler-Stevenson WC. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention[J]. J Clin Invest, 1999, 9(103): 1237-1241.
- [5] Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity[J]. Cell, 1998, 92(3): 391-400.
- [6] Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, et al. Novel vectors for the

- expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction[ J ]. *Immunol Methods*, 1992, 152 ( 1 ): 89-104.
- [ 7 ] Liu Y C , Kawagishi M, Mikayama T, *et al.* Processing of a fusion protein by endoprotease in COS21 cells for secretion of mature peptide by using a chimeric expression vector[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90( 19 ): 8957-8961.
- [ 8 ] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, *et al.* Current protocols in molecular biology[ M ]. USA: John Wiley & Sons, Inc. 1997: 184-185.
- [ 9 ] Channon KM, Blazing MA, Shetty GA, *et al.* Adenoviral gene transfer of nitric oxide synthase: High level expression in human vascular cells[ J ]. *Cardiovasc Res*, 1996, 32( 5 ): 962-972.
- [ 10 ] Pfeifer A, Kessler T, Silletti S, *et al.* Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97( 22 ): 12227-12232.
- [ 11 ] 付生发, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术[ J ]. *军事医学科学院院刊*, 1993, 17( 4 ): 294-296.
- [ 12 ] Friedlander M, Brooks PC, Shiller RW, *et al.* Definition of two angiogenic pathways by distinct alphav integrins[ J ]. *Science ( Washington )*, 1995, 270 ( 5241 ): 1500-1502.
- [ 13 ] Kirsch M, Strasser J, Allende R, *et al.* Angiostatin suppresses malignant glioma growth *in vivo*[ J ]. *Cancer Res*, 1998, 58( 20 ): 4654-4659.
- [ 14 ] Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, *et al.* Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor[ J ]. *Mol Ther*, 2003, 8( 1 ): 72-79.
- [ 15 ] Oliner J, Min H, Leal J, *et al.* Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiotensin-2[ J ]. *Cancer Cell*, 2004, 6( 5 ): 507-516.
- [ 16 ] Bello L, Lucini V, Carrabba G, *et al.* Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 24 ): 8730-8736.
- [ 收稿日期 ] 2006 - 05 - 22 [ 修回日期 ] 2006 - 07 - 30  
[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 正确使用数的修约规则

在生物医学领域的各种研究中,对实验测定和计算所得的数值往往都要进行修约。过去习惯使用“四舍五入法”进行数的修约,该方法是不正确的,我们应将其废除。根据国家标准《出版物上数字用法的规定》,数的修约应遵照“四舍六入”的法则进行,具体介绍如下:

- ( 1 ) 数的修约规则的简明口诀: 4 舍 6 入 5 看后, 5 后有数便进 1, 5 后为 0 看左数, 左数奇进偶舍弃。  
( 2 ) 数的修约操作示例见表 1。

表 1 数的修约操作示例

口 诀	示 例	
	已知数	修约数( 设保留 1 位小数 )
4 舍 6 入 5 看后	5. 7418	5. 7
	5. 7618	5. 8
5 后有数便进 1	5. 7518	5. 8
	5 后为 0 看左数	
左为奇数要进 1	5. 7500	5. 8
右为偶数全舍弃	5. 6500	5. 6
	5. 0500	5. 0( 0 为偶数 )
无论舍弃多少位	5. 74546	5. 7( 不是由 5. 7455
均须一次修完毕		→5. 746→5. 75→5. 8 )