

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0322-06

## 突变减毒志贺样毒素 I 真核表达载体的抗肿瘤血管活性

魏 枫, 曹 水\*, 任秀宝, 刘 虹, 于津浦, 付晓达, 郝希山 (天津医科大学 附属肿瘤医院 免疫学研究室, 天津市 肿瘤防治重点实验室, 天津, 300060)

[ 摘 要 ] 目的: 考察突变减毒志贺样毒素 I ( Shiga-like toxin 1, Stx1 ) 真核表达载体抗肿瘤血管的活性。方法: 使用流式细胞仪检测突变减毒 Stx1 真核表达载体转染对 CHO 细胞的影响; 分别建立稳定表达 1/10 毒性、1/100 毒性的突变减毒 Stx1 的 CHO 细胞株, 使用这 2 个细胞株和对照细胞株的培养上清分别处理人脐静脉内皮细胞( human umbilical vein endothelial cell, HUVEC ), 观察其对 HUVEC 的增殖、迁移能力和形成管样结构能力的影响; 使用人卵巢癌 SKOV3 荷瘤裸鼠模型, 不同毒性突变减毒 Stx1 真核表达载体经脂质体包裹后肿瘤局部注射给药, 观察突变减毒 Stx1 对肿瘤新生血管的作用。结果: 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染的 CHO 细胞未出现明显的凋亡或坏死改变; 获得稳定表达 1/10 毒性、1/100 毒性的突变减毒 Stx1 的基因工程细胞株, 这些细胞株的培养上清与正常 CHO 细胞培养上清相比, 能够在体外实验中抑制 HUVEC 的生长(  $P < 0.05$  ), 且该作用可以被 Stx1 B 亚基抗体阻断; 突变减毒 Stx1 能够抑制 HUVEC 的迁移能力和管样结构形成能力; 体内实验显示 1/10 毒性、1/100 毒性的突变减毒 Stx1 真核表达载体治疗组与空载体对照组或生理盐水对照组相比, 肿瘤微血管密度明显下降(  $P < 0.01$  )。结论: 成功建立了分泌性表达突变减毒 Stx1 的 CHO 细胞株。证实突变减毒 Stx1 能够有效地抑制 HUVEC 的生长及正常功能的发挥。体内实验显示突变减毒 Stx1 真核表达载体可以抑制裸鼠体内 SKOV3 移植瘤的血管生成。

[ 关键词 ] 志贺样毒素 I ; 突变减毒; 真核表达; 内皮细胞; 抗血管生成; 卵巢肿瘤

[ 中图分类号 ] R392.12 [ 文献标志码 ] A

## Antiangiogenic activity of recombinant eukaryotic expression vectors carrying genes encoding attenuated Shiga-like toxin I mutant

WEI Feng, CAO Shui\*, REN Xiu-bao, LIU Hong, YU Jin-pu, FU Xiao-da, HAO Xi-shan ( Department of Immunology, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China )

[ Abstract ] **Objective:** To study the antiangiogenic activity of recombinant eukaryotic expression vectors carrying genes encoding attenuated Shiga-like toxin I ( Stx1 ) mutant *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** CHO cells were transfected with two eukaryotic expression plasmids harboring attenuated Stx1 mutant genes ( pcDNA3.1-Stx1D10 and pcDNA3.1-Stx1D100 ) by liposome and FACS was used to study its influence on CHO cells. CHO cells stably expressing 1/10 and 1/100 attenuated Stx1 mutants were established. The culture supernatants of the above 2 cell lines and the control cells were used to treat human umbilical vein endothelial cells ( HUVEC ), and their influences on the proliferation, migration, and the tubule forming ability HUVEC were observed. Eukaryotic expression vectors carrying Stx1 mutants were locally injected into nude mice bearing human ovarian cancer cells SKOV3 to observe its antiangiogenic effect in tumors. **Results:** CHO cells showed no obvious apoptosis or necrosis after transfected by attenuated Stx1 mutants. The transcription and stable expression of Stx1 mutants were verified by RT-PCR and by Western blotting analysis in mutant Stx1 gene-integrated CHO cells. The supernatants of mutant Stx1 gene-integrated CHO cells had antiproliferative effect on HUVEC compared with control supernatant (  $P < 0.05$  ), and this effect could be blocked by monoclonal antibody against Stx1 B-subunit; furthermore, these supernatants significantly decreased migration and capillary tube formation of HUVEC at a low dose. A significant decrease of microvessel density was observed in transplanted SKOV3 tumors in immunodeficient mice treated with pcDNA3.1-Stx1D10 or pcDNA3.1-Stx1D100 (  $P < 0.01$  ). **Conclusion:** Two mutant Stx1 gene-integrated CHO cell

[ 基金项目 ] 天津市卫生局科技基金( No.05KY32 ). Supported by Medical Science Research Fund of Tianjin( No.05KY32 )

[ 作者简介 ] 魏 枫( 1974- ), 男, 天津市人, 博士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: Xishan\_hao@yahoo.com

lines which stably express attenuated mutants of Stx1 have been successfully established. The attenuated Stx1 mutants in this study can effectively inhibit the growth and function of HUVEC; they also have *in vivo* antiangiogenic activity on transplanted SKOV3 tumors in immunodeficient mice.

[ **Key words** ] Shiga-like toxin I ( Stx1 ) ; mutation; attenuation; eukaryotic expression; endothelial cell; antiangiogenesis; ovarian neoplasms

志贺样毒素 I ( Shiga-like toxin 1, Stx1 ) 由 1 个相对分子质量约 32 000 的毒性亚基( A 亚基)和 5 个约 7 700 的受体结合亚基( B 亚基)组成。B 亚基 5 聚体通过与敏感细胞表面的受体 Gb3 结合介导完整的毒素进入细胞。A 亚基为生物活性单位,在细胞质中通过阻止延伸因子-1 依赖的氨酰-tRNA 与核糖体结合而抑制蛋白质合成,引起细胞病变与死亡。其作用机制与常规肿瘤化疗药物不同,因此许多已知的肿瘤抗药机制并不能抵消 Stx1 的作用,这使得 Stx1 成为杀灭肿瘤抗药克隆的候选药物之一。Stx1 的受体 Gb3 在卵巢癌、乳腺癌、星形细胞瘤及一些血液肿瘤中均有表达。研究者们已使用多种肿瘤细胞系检验了 Stx1 的体内抗瘤活性,这些细胞系包括人恶性脑膜瘤细胞系 IOMM-Lee<sup>[1]</sup>,人膀胱癌细胞系 ECV304<sup>[2]</sup>,肾癌细胞系 ACHN<sup>[3]</sup>,宫颈癌细胞系 HeLa、表皮样癌细胞系 HEp2、肺癌细胞系 A549<sup>[4]</sup>及结肠癌细胞系 HT29<sup>[5]</sup>等。研究者发现 Stx1A 亚基与血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF)的融合蛋白对于高表达 VEGF2 型受体的细胞系具有选择性细胞毒性<sup>[6-7]</sup>。Stx1 B 亚基还是运载显影剂或抗肿瘤分子的理想载体<sup>[8]</sup>。此外,Stx1 B 亚基或双突变无毒性的 Stx1 还具有免疫佐剂功能<sup>[9-10]</sup>。但 Gb3 也表达在正常人体多个部位的上皮细胞和内皮细胞上,原型 Stx1 的强大毒性使得其在肿瘤治疗中的应用受到了很大限制。

在本课题前期的研究中,以定点突变技术构建了突变后毒性为原型毒素毒性 1/10 和 1/100 的减毒 Stx1 编码序列,并克隆入真核表达载体,初步考察了这 2 种突变减毒 Stx1 抗卵巢癌的活性<sup>[11]</sup>;本研究则进一步考察 1/10 毒性和 1/100 毒性的突变减毒 Stx1 抗肿瘤血管的活性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 载体和菌株

真核表达载体 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。分别携带突变减毒 Stx1 编码序列 Stx1D10、Stx1D100 的真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 由本室构建并保存<sup>[11]</sup>,两质粒分

别编码原毒性 1/10 和 1/100 的减毒 Stx1。

### 1.2 试剂

脂质体 Lipofectamine 2000、无血清培养液 Opti-MEM1、细胞培养液 RPMI 1640、G418、Trizol、Super-script II 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;胎牛血清( fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司;内皮细胞生长因子购自 Sigma 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 I、Matrigel 基质胶购自 BD Bioscience 公司;rTaq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、Oligo-(dT)<sub>15</sub> 购自 TaKaRa 公司;小鼠抗 Stx1 B 亚基单克隆抗体 13C4 购自 Hycult Biotechnology 公司;SuperSignal West Pico 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司;小鼠抗 CD31 单克隆抗体 MEM-05 购自 Zymed Laboratories 公司;其余试剂均为国产分析纯产品。

### 1.3 细胞系

中国仓鼠卵巢细胞系 CHO、人卵巢癌细胞系 SKOV3 由本室保存。人脐静脉内皮细胞( human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)由北京协和医科大学提供,在含 1% 内皮细胞生长因子及 20% FBS 的 1640 中,5% CO<sub>2</sub>、37 °C 下单层贴壁培养。本研究中使用的 HUVEC 为第 4 至 8 代。

### 1.4 流式细胞仪检测减毒 Stx1 基因转染对 CHO 细胞的影响

用脂质体 Lipofectamine 2000 分别将重组真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染 CHO 细胞,以未转染 CHO 细胞作对照。24 h 后收集细胞,调密度为 1 × 10<sup>6</sup>/ml,Annexin V-FITC 和 PI 双染色,流式细胞术检测细胞坏死与凋亡。

### 1.5 基因转染和细胞克隆筛选

同上法分别将 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染 CHO 细胞,同时设 pcDNA3.1 空载体转染组及未转染组作对照。转染 24 h 后更换培养液,48 h 后改用含 G418(1 mg/ml)的培养液加压筛选。培养 4 周,收集抗性克隆扩大培养。

### 1.6 RT-PCR 及 Western blotting 检测突变 Stx1 基因的表达

提取阳性克隆的基因组 DNA,用 PCR 法检测减毒 Stx1 基因整合情况,引物同参考文献[11]的 P1、

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 322-327 ]

P4。Trizol 法提取阳性克隆的总 RNA,使用 Super-script II 逆转录试剂盒,以 Oligo-(dT)<sub>15</sub> 为引物获取 cDNA 第一链,然后常规 PCR 扩增减毒 Stx1 序列,引物同前。收集阳性克隆的培养上清,以小鼠抗 Stx1 B 亚基单克隆抗体 13C4 为一抗行 Western blotting 检测,观察培养上清中减毒 Stx1 的存在情况。

### 1.7 CHO 工程细胞株的克隆化

G418 筛选的 CHO 抗药克隆经检测确认已整合减毒 Stx1 基因并分泌减毒 Stx1 后,以有限稀释法进行克隆化。经 2 次连续克隆化,把反复检测证实的阳性克隆扩大培养并冻存,2 种抗药克隆各选 1 株生长良好的工程细胞株扩大培养,分别命名为 CHO/Stx1D10、CHO/Stx1D100。作为对照的 1 株来自 pcDNA3.1 空载体转染组的 G418 抗性 CHO 克隆命名为 CHO/neo。

### 1.8 HUVEC 生长抑制实验

取  $2 \times 10^6$  CHO/Stx1D10、CHO/Stx1D100、CHO/neo 或正常 CHO 细胞,各以 5 ml 不含 G418 的新鲜培养液培养,24 h 后收集培养上清并分装冻存于  $-80^\circ\text{C}$ 。将 HUVEC 接种于 24 孔板,每孔 0.5 ml 新鲜培养液,含  $2 \times 10^4$  个细胞,分为 4 个上清处理组和 4 个上清加抗体处理组,每组 3 个复孔。上清处理组每孔加入 0.5 ml 上述 4 种 CHO 上清之一,上清加抗体处理组除加入同样的 CHO 上清外,每孔另加入 1  $\mu\text{g}$  小鼠抗 Stx1 B 亚基单克隆抗体 13C4,该抗体可以阻断 Stx1 的生物活性。48 h 后,计数各孔细胞数。细胞死亡率(%)按如下公式计算:

细胞死亡(%) = (对照组细胞数 - 处理组细胞数) / 对照组细胞数  $\times 100\%$

### 1.9 HUVEC 损伤迁移实验

取 HUVEC 接种于 24 孔板中,培养至 70% ~ 80% 融合,形成单细胞层。更换培养液,每孔 0.8 ml 新鲜培养液及 0.2 ml 4 种 CHO 上清之一,每种 3 个复孔。用移液器无菌吸头在孔底部单细胞层中划等宽的“一”字型划痕,并于相差显微镜下拍照记录。24 h 后再观察 HUVEC 迁移通过划痕情况。

### 1.10 HUVEC 管形成实验

内皮细胞在含基质胶平皿中能够形成中空的管样结构。根据说明书以 Matrigel 基质胶涂布 24 孔板,0.1 ml/孔,37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min。将 HUVEC 种植到 Matrigel 基质胶上,每孔 0.8 ml 新鲜培养液,含  $1 \times 10^5$  个细胞。然后每孔加入 0.2 ml 4 种 CHO 上清之一,每种 3 个复孔。18 h 后相差显微镜下观察 HUVEC 形成微血管样结构的情况。

### 1.11 突变减毒 Stx1 真核表达载体体内对肿瘤血

管的作用

SPF 级雌性 6 周龄 BALB/c nu/nu 裸小鼠 20 只购自北京大学医学部实验动物科学部,实验动物合格证号为 SCXK(京)2002-0001。每只小鼠于左侧腹股沟皮下注射 SKOV3 细胞  $2 \times 10^6$ ,10 d 后均成瘤;随机分为 4 组,每组 5 只。第 1、2、3 组分别使用 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 或 pcDNA3.1 空载体经脂质体包裹后肿瘤局部注射给药,第 4 组仅注射等量生理盐水。质粒每次用量为 5  $\mu\text{g}$ /只,每周 2 次,持续 4 周。4 周后无痛苦处死小鼠,剥离皮下移植瘤组织,10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  厚连续切片,以小鼠抗 CD31 单克隆抗体 MEM-05 为一抗行免疫组化染色,镜下评估不同组肿瘤切片的微血管密度(microvessel density, MVD)。

MVD 评估方法:参照 Gasparini 等<sup>[12]</sup>提出的标准,先在 40 $\times$  视野下找到微血管最丰富的区域,然后转到 200 $\times$  视野计数微血管数量。如果血管的面积较大(大于 8 个红细胞),则应用 Tanigawa 等<sup>[13]</sup>的改进方法,即每 40  $\mu\text{m}$  长度的血管计为一个微血管。MVD 以每 0.74  $\text{mm}^2$ (200 $\times$  视野)中的微血管数目表示,每个切片计数 3 个视野,作为该切片的 MVD。

### 1.12 统计学处理

以 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 法进行检验。

## 2 结果

### 2.1 减毒 Stx1 基因转染对 CHO 细胞的影响

重组真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染 CHO 细胞 24 h 后,Annexin V-FITC 和 PI 双染色,流式细胞术检测,与未转染的 CHO 细胞相比,未出现明显的凋亡或坏死改变。

### 2.2 转染细胞的 G418 筛选及有限稀释法克隆化

未转染组的细胞于 1 ~ 2 周间全部死亡。转染组细胞 2 周时亦出现大量死亡,并出现散在抗性克隆。4 周后收集抗性克隆扩大培养,经 PCR、RT-PCR、Western blotting 检测,确认抗性克隆的细胞基因组中已整合减毒 Stx1 基因,并转录出相应的 mRNA(图 1),在抗性克隆的培养上清中存在 Stx1 B 亚基蛋白(图 2)。经 2 次连续克隆化,获得反复检测证实的阳性克隆 CHO/Stx1D10 和 CHO/Stx1D100。

### 2.3 CHO 细胞分泌的减毒 Stx1 对 HUVEC 生长的抑制作用

各组 HUVEC 数目见表 1,CHO/Stx1D10、CHO/

Stx1D100 上清处理组与正常 CHO 上清处理组差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 而各上清加抗体处理组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。CHO/Stx1D10、CHO/Stx1D100 上清处理组 48 h 后的细胞死亡率分别为  $(29.83 \pm 3.24)\%$  和  $(20.58 \pm 5.10)\%$ , 而相应的上清加抗体处理组的细胞死亡率均小于 5%, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

但若在实验中每孔加入 0.8 ml 新鲜培养液及 0.2 ml 上述 4 种 CHO 上清之一, 则未观察到对 HUVEC 的明显的生长抑制作用。

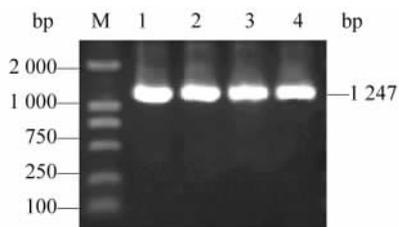


图 1 PCR 和 RT-PCR 检测减毒 Stx1 基因的整合与转录

Fig. 1 Transcription and integration of mutant Stx1 genes into CHO cells detected by PCR and RT-PCR

M: DL2000 Marker; 1: PCR product of CHO/Stx1D10 genome; 2: PCR product of CHO/Stx1D100 genome; 3: RT-PCR product of CHO/Stx1D10 total RNA; 4: RT-PCR product of CHO/Stx1D100 total RNA

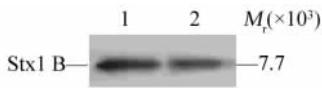


图 2 Western blotting 检测 CHO/Stx1D10 和

CHO/Stx1D100 培养上清中减毒 Stx1 B 亚基的表达

Fig. 2 Stx1 B-subunits secreted by mutant Stx1 gene-integrated CHO cells verified by Western blotting analysis

1: Stx1 B-subunits secreted by CHO/Stx1D10;  
2: Stx1 B-subunits secreted by CHO/Stx1D100

表 1 CHO 细胞分泌的减毒 Stx1 对 HUVEC 生长的抑制作用(%)

Tab. 1 Antiproliferative effect of supernatants of mutant Stx1 gene-integrated CHO cells on HUVEC(%)

Groups	Supernatant ( $\times 10^4$ )	Supernatant + Ab ( $\times 10^4$ )
CHO	$5.42 \pm 0.38$	$5.50 \pm 0.50$
CHO/neo	$5.33 \pm 0.53$	$5.42 \pm 0.29$
CHO/Stx1D100	$4.17 \pm 0.38^*$	$5.33 \pm 0.52$
CHO/Stx1D10	$3.75 \pm 0.50^*$	$5.25 \pm 0.43$

\*  $P < 0.05$  vs supernatant + Ab

## 2.4 减毒 Stx1 对 HUVEC 迁移的抑制作用

如图 3 所示, CHO/Stx1D10、CHO/Stx1D100 上清处理组 HUVEC 的细胞划痕区 24 h 后未见明显细胞迁移或仅有少量细胞进入, 而 CHO/neo、正常 CHO 上清处理组细胞划痕区 24 h 后有大量细胞进入, 提示减毒 Stx1 对 HUVEC 迁移有明显的抑制作用。

## 2.5 减毒 Stx1 对 HUVEC 形成管样结构能力的抑制作用

如图 4 所示, CHO/Stx1D10、CHO/Stx1D100 上清处理组的 HUVEC 在 Matrigel 基质胶上不能形成或形成少量的血管样结构, 而 CHO/neo 上清处理组、正常 CHO 上清处理组则可以形成明显的血管样结构, 提示减毒 Stx1 能够抑制 HUVEC 形成管样结构的能力。

## 2.6 减毒 Stx1 体内抑制肿瘤血管生成的作用

pcDNA3. 1-Stx1D10 治疗组、pcDNA3. 1-Stx1D100 治疗组、空载体对照组和生理盐水对照组裸小鼠皮下移植瘤经注射处理后, 各组瘤组织 MVD 分别为  $(54.0 \pm 7.6)$ 、 $(60.4 \pm 6.8)$ 、 $(221.8 \pm 17.3)$  和  $(227.0 \pm 21.9)$ , 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。组间比较, 任意治疗组与任意对照组之间 MVD 差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 治疗组间或对照组间 MVD 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

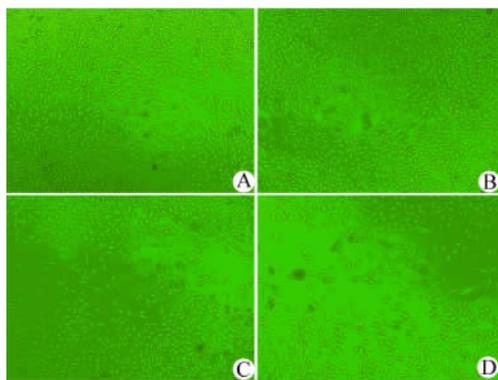


图 3 减毒 Stx1 对 HUVEC 迁移能力的抑制作用 ( $\times 100$ )

Fig. 3 Effect of attenuated Stx1 on HUVEC migration( $\times 100$ )

A: HUVECs treated with growth medium; HUVECs can normally migrate across the gap; B: HUVECs treated with supernatant from CHO/neo; HUVECs migrated across the gap like the HUVECs treated with growth medium alone; C: HUVECs treated with supernatant from CHO/Stx1D100; D: HUVECs treated with supernatant from CHO/Stx1D10. C and D showed a significant inhibitory action on HUVEC migration by the supernatants of CHO/Stx1D10 or CHO/Stx1D10.

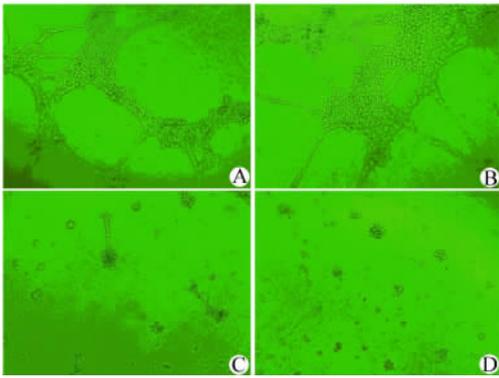


图4 减毒 Stx1 对 HUVEC 管腔形成能力的抑制作用( ×40 )

Fig. 4 Effect of attenuated Stx1 on HUVEC tube formation( ×40 )

A: HUVECs treated with growth medium; HUVECs can form considerable capillary-like structures on matrigel; B: HUVECs treated with supernatant from CHO/neo; HUVECs form capillary-like structures on matrigel like the HUVECs treated with growth medium alone; C: HUVECs treated with supernatant from CHO/Stx1D100; HUVECs only formed a few capillary-like structures on Matrigel; D: HUVECs treated with supernatant from CHO/Stx1D10; HUVECs are unable to form capillary-like structures on matrigel

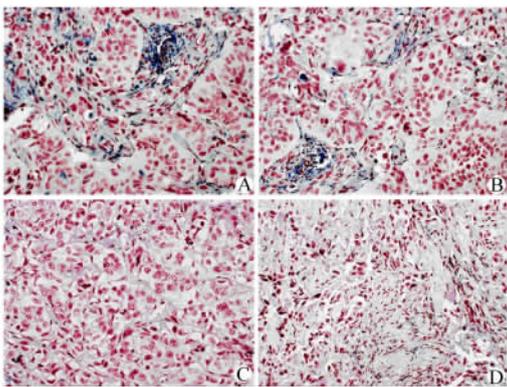


图5 减毒 Stx1 真核表达载体治疗对 SKOV3 移植瘤微血管密度的影响( ×200 )

Fig. 5 Effect of pcDNA3.1-Stx1D10/liposome or pcDNA3.1-Stx1D100/liposome therapy on MVD of SKOV3 tumors ( ×200 )

A: SKOV3 tumor treated with NS; B: SKOV3 tumor treated with pcDNA3.1; C: SKOV3 tumor treated with pcDNA3.1-Stx1D100; D: SKOV3 tumor treated with pcDNA3.1-Stx1D10. The MVD was significantly decreased in the tumor tissues from the treatment groups compared to control groups. Anti-CD31 staining of tumors revealed that pcDNA3.1-Stx1D10/ liposome or pcDNA3.1-Stx1D100/liposome therapy resulted in a significant decrease of MVD in contrast to control groups

### 3 讨论

前期研究中,课题考察了突变减毒 Stx1 真核表达载体体内抗肿瘤能力<sup>[11]</sup>。发现减毒 Stx1 基因转染可导致人卵巢癌细胞株 SKOV3 的细胞周期阻滞并可引起 SKOV3 细胞坏死。

研究中所构建的突变减毒 Stx1 编码序列包含 A、B 亚基各自的信号肽编码序列。使用互联网服务器 SignalP 3.0 ( <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> )对 Stx1 信号肽进行了生物信息学分析<sup>[14]</sup>,结果显示,Stx1 A、B 亚基各有一个可以被真核细胞识别的信号肽,且服务器提示的信号肽与 Stx1 A、B 亚基的天然信号肽完全相同。CHO 细胞不表达 Stx1 的受体,所以若减毒 Stx1 基因转染后不在 CHO 细胞的胞质中表达而是分泌出来,则 CHO 细胞不受所分泌的减毒 Stx1 的影响。流式细胞术检测显示,与未转染 CHO 相比,质粒 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染 24 h 的 CHO 细胞未出现明显的坏死或凋亡改变。该结果与生物信息学分析结果一致。为进一步研究突变减毒 Stx1 对肿瘤及其血管的作用,本研究构建并筛选获得了突变减毒 Stx1 基因整合的 CHO 细胞株 CHO/Stx1D10 和 CHO/Stx1D100。Western blotting 检测证实,这 2 个细胞株的培养上清中存在 Stx1 B 亚基蛋白。由于本研究所涉及的突变减毒 Stx1 均在 A 亚基保守位点上存在突变,故未进行针对 Stx1 A 亚基的 Western blotting 检测。体外实验显示,CHO/Stx1D10 和 CHO/Stx1D100 的培养上清可以抑制对 Stx1 敏感的 HUVEC 的生长,且这一抑制作用可以被 Stx1 B 亚基的单克隆抗体阻断。结果一方面进一步证明 CHO/Stx1D10 和 CHO/Stx1D100 能够分泌性表达相应的减毒 Stx1,另一方面也证明这 2 种突变减毒 Stx1 能够抑制 HUVEC 的生长。HUVEC 损伤迁移、管腔形成实验结果显示,在对 HUVEC 无明显生长抑制作用的低浓度下,减毒 Stx1 仍可抑制 HUVEC 的迁移能力和形成血管样结构的能力,提示减毒 Stx1 对血管生成具有明显抑制作用。

结合以上结果,可考虑在以前的研究中观察到的这 2 种突变减毒 Stx1 在体内对肿瘤的生长抑制作用可能有毒素对肿瘤血管的作用参与其中。抗 CD31 免疫组化检测证实了我们的假设,无论 pcDNA3.1-Stx1D10 还是 pcDNA3.1-Stx1D100 治疗的 SKOV3 移植瘤标本,其中的微

血管密度均明显低于对照组,提示本实验中这 2 种突变减毒 Stx1 是通过抗肿瘤和抗血管生成的双重活性抑制裸鼠体内 SKOV3 移植瘤生长的。值得注意的是,pcDNA3.1-Stx1D100 在体内显示了与 pcDNA3.1-Stx1D10 相近的抗肿瘤血管生成活性,而其直接的抗肿瘤增殖活性则明显弱于后者<sup>[11]</sup>。这一结果提示,抗血管生成活性可能在减毒 Stx1 抑制肿瘤生长的作用中占据重要地位。检索文献,对原型 Stx1 抗血管活性的研究取得了一定的进展<sup>[15]</sup>,但尚未发现关于减毒 Stx1 抗血管活性的报道,减毒 Stx1 抗血管活性的分子机制有待于进一步深入探讨。

本研究证实 Stx1 A、B 亚基的天然信号肽可以被真核细胞识别,从而使该毒素被基因转移后的真核细胞分泌。因此,本研究中在 SKOV3 肿瘤局部应用真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 进行治疗后,被转染细胞可以局部短期分泌相应的减毒 Stx1,从而进一步作用于未转染的 SKOV3 细胞及同样表达 Stx1 受体的血管内皮细胞,达到抗肿瘤和抗血管生成的双重作用。增殖活跃的肿瘤细胞和肿瘤局部新生毛细血管内皮细胞由于 Gb3 的表达更高,故对 Stx1 更为敏感。瞬时转染表达期短,且 SKOV3 转染后分泌的减毒 Stx1 还会作用于宿主细胞,肿瘤细胞死亡后不再分泌减毒 Stx1,有利于避免毒素持续分泌带来的系统毒性。本研究中未观察到实验小鼠出现体重减轻、腹泻等毒性反应,但小鼠对 Stx1 的承受能力强于人类,故要将突变减毒 Stx1 应用于肿瘤治疗,还需要更多更深入的研究。结合以前的工作,本研究证明了减毒 Stx1 能够通过抗肿瘤增殖作用和抗血管生成作用来抑制肿瘤生长,这一结果提示减毒 Stx1 基因有可能成为肿瘤基因治疗的理想候选者。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Salhia B, Rutka JT, Lingwood C, *et al.* The treatment of malignant meningioma with verotoxin [ J ]. *Neoplasia*, 2002, 4( 4 ): 304-311.
- [ 2 ] Heath-Engel HM, Lingwood CA. Verotoxin sensitivity of ECV304 cells *in vitro* and *in vivo* in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker [ J ]. *Angiogenesis*, 2003, 6( 2 ): 129-141.
- [ 3 ] Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, *et al.* Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice [ J ]. *J Urol*, 2004, 171( 3 ): 1309-1313.
- [ 4 ] Nakayama K, Pergolizzi RG, Crystal RG. Gene transfer-mediated pre-mRNA segmental trans-splicing as a strategy to deliver intracellular toxins for cancer therapy [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 1 ): 254-263.
- [ 5 ] Kovbasnjuk O, Mourtazina R, Baibakov B, *et al.* The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102( 52 ): 19087-19092.
- [ 6 ] Backer MV, Budker VG, Backer JM. Shiga-like toxin-VEGF fusion proteins are selectively cytotoxic to endothelial cells overexpressing VEGFR-2 [ J ]. *J Control Release*, 2001, 74( 1-3 ): 349-355.
- [ 7 ] Backer MV, Elliot J, Gaynutdinov TI, *et al.* Assembly of targeting complexes driven by a single-chain antibody [ J ]. *J Immunol Methods*, 2004, 289( 1-2 ): 37-45.
- [ 8 ] Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, *et al.* *In vivo* tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 14 ): 7230-7236.
- [ 9 ] Haicheur N, Benchetrit F, Amessou M, *et al.* The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization [ J ]. *Int Immunol*, 2003, 15( 10 ): 1161-1171.
- [ 10 ] Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, *et al.* Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation [ J ]. *Infect Immun*, 2005, 73( 7 ): 4088-4097.
- [ 11 ] 魏 枫,任秀宝,刘 虹,等. 突变减毒志贺样毒素 I 真核表达载体的构建及其抗卵巢癌的活性 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13( 6 ): 435-441.
- [ 12 ] Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool [ J ]. *J Clin Oncol*, 1995, 13( 3 ): 765-782.
- [ 13 ] Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, *et al.* Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance [ J ]. *Hepatology*, 1997, 26( 5 ): 1216-1223.
- [ 14 ] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [ J ]. *J Mol Biol*, 2004, 340( 4 ): 783-795.
- [ 15 ] Brigotti M, Carnicelli D, Ravanelli E, *et al.* Molecular damage and induction of pro-inflammatory cytokines in human endothelial cells exposed to shiga toxin 1, Shiga toxin 2 and  $\alpha$ -sarcin [ J ]. *Infect Immun*, 2007, 75( 5 ): 2201-2207.

[ 收稿日期 ] 2007-04-24

[ 修回日期 ] 2007-07-04

[ 本文编辑 ] 王 莹