

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.004

## 融合蛋白 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> 的表达及其抑制血管新生和诱导细胞凋亡的作用

宗英<sup>1</sup>, 王梁华<sup>2</sup>, 孙铭娟<sup>2</sup>, 董晓毅<sup>2</sup>, 王燕<sup>3</sup>, 陆国才<sup>1</sup>, 焦炳华<sup>2\*</sup> (1. 第二军医大学新药评价中心, 上海 200433; 2. 第二军医大学生物化学和分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学病理生理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 采用原核表达系统表达 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> 融合蛋白, 并对其生物学活性进行研究。方法: PCR 技术扩增 Kininogen D5<sub>60-148</sub> 和 TRAIL<sub>114-281</sub> 的编码序列, 分别构建原核表达载体 pMAL-Kininogen D5<sub>60-148</sub> (pMAL-KD5)、pMAL-TRAIL<sub>114-281</sub> (pMAL-TRAIL) 和 pMAL-Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> (pMAL-KT), 重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达融合蛋白 MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT, 并经亲和层析纯化。MTT 法检测细胞的增殖, 管状形成实验检测内皮细胞血管形成, 流式细胞仪和电镜检测细胞凋亡。结果: 成功构建原核表达载体 pMAL-KD5、pMAL-TRAIL 和 pMAL-KT, 并获得纯化的融合蛋白 MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT。融合蛋白 MBP-KT 与 MBP-KD5、MBP-TRAIL 相比可显著抑制内皮细胞 ECV304 和胰腺癌细胞 SW1990 的增殖、明显抑制 ECV304 细胞体外管腔的形成, 同时, MBP-KT 剂量依赖性地诱导 SW1990 细胞凋亡。结论: 融合蛋白 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> 既能诱导肿瘤细胞凋亡又能抑制血管生成, 为进一步开发靶向性抗肿瘤药物奠定了基础。

[关键词] 高分子量激肽原; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 血管生成抑制因子; 胰腺肿瘤细胞

[中图分类号] R735.9; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0336-06

## Expression of Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> fusion protein and its angiogenesis-inhibiting and apoptosis-inducing effect

ZONG Ying, WANG Liang-hua<sup>2</sup>, SUN Ming-juan<sup>2</sup>, DONG Xiao-yi<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>3</sup>, LU Guo-cai<sup>1</sup>, JIAO Bing-hua<sup>2\*</sup> (1. Center for Drug Evaluation, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pathophysiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To express Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> fusion protein using prokaryotic system and observe its biological functions. **Methods:** The Kininogen D5<sub>60-148</sub> gene and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL<sub>114-281</sub>) gene were amplified by PCR and were cloned into pMAL expression vector to construct recombinant pMAL-Kininogen D5<sub>60-148</sub> (pMAL-KD5), pMAL-TRAIL<sub>114-281</sub> (pMAL-TRAIL) and pMAL-Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> (pMAL-KT) plasmids, respectively. The plasmids were transformed into *E. coli* BL21 and were efficiently expressed after IPTG induction. The purified MBP-KD5, MBP-TRAIL and MBP-KT proteins were obtained by amylose resin affinity purification column. The proliferation of cells was measured by MTT; tube formation of endothelial cell was detected by tube formation assay; and the apoptosis of cells were observed by electron microscopic and FCM. **Results:** Prokaryotic expression vectors pMAL-KD5, pMAL-TRAIL and pMAL-KT and their purified fusion proteins MBP-KD5, MBP-TRAIL and MBP-KT were successfully obtained. MBP-KT significantly inhibited the proliferation of ECV304 endothelial cells, SW1990 pancreatic cancer cells and the tube formation of ECV304 cells compared with those of MBP-KD5 and MBP-TRAIL. Meanwhile, MBP-KT dose-dependently induced the apoptosis of SW1990 cells. **Conclusion:** Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> fusion protein can

[基金项目] 上海市现代生物与新药产业发展基金(No. 024319115)。Supported by the Modern Industrial Development Foundation for Biology and New Drugs of Shanghai (No. 024319115)

[作者简介] 宗英(1977-),女,硕士,江苏省宜兴市人,主要从事新型抗肿瘤药物的研究。E-mail:standyp@hotmail.com

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail:jiaobh@uninet.com.cn

inhibit the proliferation of tumor cells and angiogenesis of endothelial cells, which lays a foundation for further research on tumor-targeting drugs.

[ **Key words** ] high molecular weight kininogen; tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand( TRAIL ); anti-angiogenesis; pancreatic neoplasms cell

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16( 4 ): 336-341 ]

自从 Folkman<sup>[1-2]</sup>提出“肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成”的论断后,抗肿瘤治疗进入了一个新时期。高分子量激肽原( high molecular weight kininogen, HK )是一种在血浆中存在的糖蛋白,有 6 个结构域,当 HK 和内皮细胞接触后,产生接触活化作用,其第五结构域( D5 )暴露<sup>[3-4]</sup>,形成活化的高分子量激肽原( HKa )<sup>[5]</sup>。HKa 具有抑制内皮细胞增殖和诱导内皮细胞凋亡的生物学活性。Hasan 和 Reddigari 等<sup>[6-8]</sup>证明 HKa 通过其 D5 区域与内皮细胞连接。Zhang 等<sup>[9]</sup>发现了 D5 区域中诱导细胞凋亡的活性部位为 HKD5<sub>60-148</sub>( HKa 的 438-526 位)。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体( tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL )是 TNF 超家族的成员,能选择性诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常组织无明显损伤。膜表面 TRAIL 由 281 个氨基酸组成,胞外段为 114-281 位氨基酸,但是体内没有发现可溶性 TRAIL 分子<sup>[10]</sup>。本研究将 HKa 和 TRAIL 的活性片段用重组 PCR 的方式连接,探讨融合蛋白对内皮细胞血管形成和肿瘤细胞凋亡的作用,为开发新型抗肿瘤生物治疗药物提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

*E. coli* BL21, 质粒载体 pMAL-c2、pBV220、pBV220/TRAIL, 人脐静脉内皮细胞 ECV304 和人胰腺癌上皮细胞 SW1990 为本室保存。pGnen/v5-His kininogen 由 Dr. McCrae( Case Western Reserve University School of Medicine )惠赠。小量质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司; PCR 试剂盒、各种限制酶及连接酶购自 TaKaRa 公司。RPMI 1640 购自 Invitrogen 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物有限公司。DNA ladder 购自 TIANGEN 生物技术公司。亲和层析柱 MBP( 麦芽糖结合蛋白 )融合蛋白纯化柱 Amylose Resin Beads 购自 New England Biolabs 公司。细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻试剂盒购自 Oncogene 公司, 体外管腔形成检测试剂盒购自 Millipore 公司。

### 1.2 原核表达载体 pMAL-Kininogen D5<sub>60-148</sub>-

### TRAIL<sub>114-281</sub> 的构建

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中的 HK ( GenBank No. ABB59550 )和 TRAIL( GenBank No. NM\_003810 )的编码序列设计引物: 引物 1( P1 ): 5'-GCGAATTCACAATGAAACATAATCTTGGCCATG-3', 5'端加入 *EcoR* I 酶切位点; 引物 2( P2 ): 5'-AGATC-CACCTGAGCCACCACCGCTTGCCAAATGCTCTG-3', 5'端加入氨基酸连接臂; 引物 3( P3 ): 5'-GGCGGCT-CAGGTGGATCTGGTGTGAGAGAAAGAGGTCC-3', 5'端加入和 P2 互补的氨基酸连接臂; 引物 4( P4 ): 5'-TTGGATCCTTAGCCAACTAAAAAG-3', 5'端加入 *Bam*H I 酶切位点; 引物 5( P5 ): 5'-TTGAATTCA-CAATGGTGAGAGAAAGAGGTC-3', 5'端加入 *EcoR* I 酶切位点; 引物 6( P6 ): 5'-TTGGATCCTTAGCTTGC-CAAATGCTCT-3', 5'端加入 *Bam*H I 酶切位点。所有引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2.2 原核表达载体的构建 分别以 P1 和 P2、P3 和 P4、P1 和 P4 为引物, 以 pGnen/v5-His Kininogen、pBV/TRAIL 及其 PCR 产物为模板, 用重组 PCR 的方法, 扩增带有编码氨基酸连接臂的 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> 的基因片段( KT )。以 P1 和 P6 为引物, pGnen/v5-His Kininogen 为模板; 以 P4 和 P5 为引物, pBV/TRAIL 为模板, PCR 扩增得到基因片段 Kininogen D5<sub>60-148</sub> 和 TRAIL<sub>114-281</sub>。将得到的基因产物分别用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, 然后与经同样双酶切后的 pMAL-C2 克隆载体连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 BL21, 阳性克隆进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pMAL-KT、pMAL-KD5 和 pMAL-TRAIL, 上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

### 1.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

分别挑取含 pMAL-KD5 和 pMAL-TRAIL 以及 pMAL-KT 质粒的 *E. coli* BL21 单克隆, 常规接种至 LB 固体培养基( 含氨卞青霉素 100 mg/L ), 于 37 °C 培养 24 h。挑取单个菌落接种到 LB 培养基, 于 37 °C 振荡培养 12 ~ 14 h, 然后按 1: 100 的比例接种同样培养基, 37 °C 振荡培养 4 ~ 6 h。在培养至  $D_{600}$  值为 0.5 ~ 0.8 后, 加入 0.3 mmol/L 的 IPTG 继续诱导 4 h, 离心收集菌体。以未诱导菌株作阴性对照。

将 -20 ℃ 保存过夜的菌体重悬于过柱缓冲液( 20 mmol/L BPS Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA ), 超声破壁( 300 W, 超声 5 s, 间隔 15 s ), 7 000 × g 离心, 过柱缓冲液 15 倍体积平衡柱子( 20 mV, 1A ), 以 1 ml/min 的流速将上清过柱, 收集未结合蛋白, 待基线恢复后用 5 倍洗脱液( 过柱缓冲液 + 10 mmol/L 麦芽糖 ) 洗脱, 分部收集纯化的重组蛋白。对照、pMAL-KD5、pMAL-TRAIL 和 pMAL-KT 质粒表达的重组蛋白分别命名为: MBP、MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT。

1.4 MTT 检测细胞的增殖

收集传代培养状态良好的 ECV304 细胞或 SW1990 细胞, 接种 96 孔板, 1 × 10<sup>3</sup> 个/孔。常规培养 4 ~ 6 h 后弃上清, 分别加入不同浓度的 MBP、MBP-TRAIL、MBP-KD5 和 MBP-KT, 每孔 150 μl。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱中继续培养, 48 h 后加入 5 mg/ml MTT 20 μl/孔, 继续孵育 4 h, 终止培养。小心吸去孔内培养上清, 加入 DMSO 每孔 150 μl, 震荡 10 min, 使甲臞溶解完全, 在酶联检测仪上检测 D<sub>595</sub> 值, 计算不同融合蛋白对 ECV304 细胞增殖的抑制率<sup>[11]</sup>。抑制率( % ) = ( 空白对照组 D - 实验组 D ) / 空白对照组 D × 100%。

1.5 管状形成实验检测内皮细胞血管形成

将 50 μl 稀释的 ECMatrix<sup>TM</sup>( Chemicon ) 加入 96 孔培养板, 37 ℃ 孵育 1 h 待 ECMatrix<sup>TM</sup> 凝固, 将 150 μl 不含抗生素的 ECV304 细胞接种到上述包被 ECMatrix<sup>TM</sup> 的培养板中, 每孔 5 × 10<sup>3</sup> ~ 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞, 然后加入 1 μg/ml MBP-KT 和 1 μg/ml 的 MBP-KD5, 对照加入等量的 BSA。细胞在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 2、6、8 h 后, 观察实验组和对照组内皮细胞管状排列情况、单位面积内管状结构数量和完整程度的差异<sup>[12]</sup>。实验重复 3 次。具体过程和判断标准依据试剂盒说明书。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将对数生长期胰腺癌 SW1990 细胞, 用胰酶和 EDTA 联合消化以后, 制成 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 每孔接种 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后, 加入 MBP-KT, 终质量浓度分别为 5 ng/ml 和 25 ng/ml。作用 3 h 后, 光镜下观察细胞形态。收集细胞, 进行流式细胞检测, 用 Annexin V-FITC 和 PI 双标记法检测细胞凋亡<sup>[13]</sup>。

1.7 电镜检测细胞凋亡

在生长良好的 SW1990 细胞中加入 MBP-KT, 终质量浓度为 10 ng/ml。作用 2 h 后, 光镜下观察细

胞形态, 弃去培养基, PBS 漂洗 2 遍, 用胰酶消化后小心吹打细胞, 400 × g 离心收集细胞, 再用 PBS 重悬细胞, 离心收集细胞后, 用 4% 的多聚甲醛固定, 电镜下观察细胞并拍照。

2 结果

2.1 Kininogen D5<sub>60-148</sub>、TRAIL<sub>114-281</sub> 基因和 KT 基因片段的扩增

PCR 分别扩增带有氨基酸连接臂的 Kininogen D5<sub>60-148</sub> 基因片段 A( 306 bp ) 和 TRAIL<sub>114-281</sub> 基因片段 B( 528 bp ), 以 A、B 为模板, PCR 扩增得到带有氨基酸连接臂的 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> 的基因片段 KT( 795 bp ) ( 图 1 )。

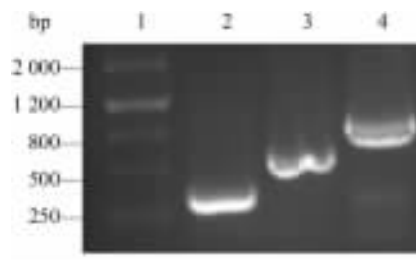


图 1 Kininogen D5、TRAIL 和 KT 基因片段的 PCR 扩增  
Fig.1 Kininogen D5, TRAIL and KT fragment amplified by PCR  
1: DNA ladder; 2: Kininogen D5; 3: TRAIL; 4: KT

2.2 pMAL-KT、pMAL-KD5 和 pMAL-TRAIL 表达载体的构建及鉴定

将 Kininogen D5<sub>60-148</sub>、TRAIL<sub>114-281</sub> 和 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub> PCR 产物纯化回收, 用 EcoR I 和 BamH I 双酶切后和同样的双酶切后的 pMAL-C2 克隆载体连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 BL21, 挑取阳性克隆进行 PCR 和酶切鉴定( 图 2 )。结果证明 pMAL-KT、pMAL-KD5 以及 pMAL-TRAIL 的酶切结果与预测相符。进一步对阳性克隆 pMAL-KT、pMAL-KD5 以及 pMAL-TRAIL 进行测序, 结果也证明 KT、KD5 以及 TRAIL<sub>114-281</sub> 序列和实验的设计完全一致, 故质粒构建正确。

2.3 融合蛋白诱导表达及纯化

分别挑取含 pMAL-KD5 和 pMAL-TRAIL 以及 pMAL-KT 质粒的 E. coli BL21 单克隆常规培养, IPTG 诱导 4 h 后, 进行 SDS-PAGE。结果( 图 3 ) 表明, 与对照泳道相比, 在相对分子质量 52 000、62 000 以及 72 000 处分别有 MBP-KD5、MBP-TRAIL 及 MBP-KT 的条带; 经 Syngene 扫描分析, 表达量占细菌总蛋白的 20% 以上。亲和层析柱纯化得到的

MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT 融合蛋白, 相对分子质量分别约为 52 000、62 000 以及 72 000。

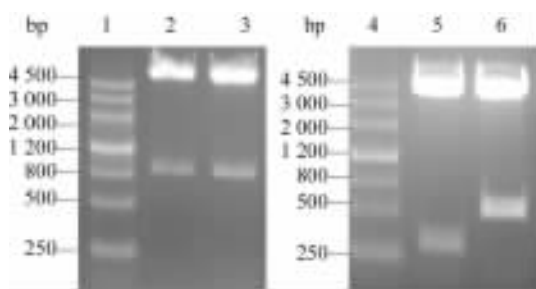


图2 pMAL-KT、pMAL-KD5、pMAL-TRAIL 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pMAL-KT, pMAL-KD5 and pMAL-TRAIL recombinant plasmids by endonuclease digestion

1: DNA ladder; 2,3: pMAL-KT; 4: DNA ladder; 5: pMAL-KD5; 6: pMAL-TRAIL

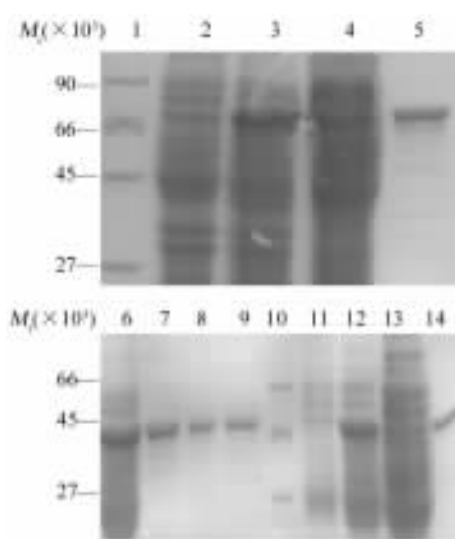


图3 SDS-PAGE 分析 MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT 融合蛋白

Fig.3 Analysis of MBP-KD5, MBP-TRAIL and MBP-KT fusion proteins by SDS-PAGE

1: Marker; 2: Negative control; 3: pMAL-KT; 4: Unbinding protein; 5: Purified MBP-KT; 6: pMAL-KD5; 7-9: Purified MBP-KD5; 10: Marker; 11: Negative control; 12: MBP-TRAIL; 13: Unbinding protein; 14: Purified MBP-TRAIL protein

#### 2.4 融合蛋白对 ECV304 和 SW1990 细胞增殖的抑制作用

实验结果(图4)表明:MBP-KT 和 MBP-KD5 显著抑制 ECV304 内皮细胞的增殖,其作用呈剂量依赖性,且 MBP-KT 的作用较 MBP-KD5 强;而 MBP-TRAIL 和 MBP 对内皮细胞的增殖没有明显影响。

4 种蛋白对 SW1990 细胞作用的结果(图5)显示:MBP-KT 和 MBP-TRAIL 可以明显地抑制 SW1990 细胞的增殖,MBP-KT 的作用较 MBP-TRAIL 更强,两者之间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。上述结果提示与单独 MBP-KD5 或 MBP-TRAIL 相比,MBP-KT 能更有效地抑制 ECV304 内皮细胞的增殖。

#### 2.5 融合蛋白抑制内皮细胞管状形成

相同浓度 MBP-KD5、MBP-TRAIL 和 MBP-KT 作用 ECV304 内皮细胞 6 h 后,检测内皮细胞的管状形成。结果(图6)表明:对照组管腔形成完整,MBP-TRAIL 管腔几乎完整,MBP-KD5 组管腔的完整性发生破坏,MBP-KT 组管腔的完整性破坏较 MBP-KD5 组更显著。提示 MBP-KT 可抑制内皮细胞管状形成,且作用强于 MBP-KD5。

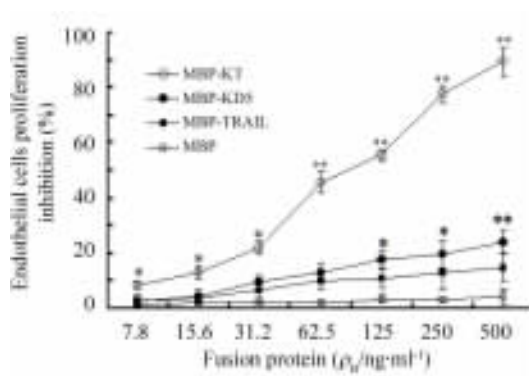


图4 不同融合蛋白对 ECV304 细胞增殖的影响

Fig.4 Effects of different fusion proteins on proliferation of ECV304 endothelial cells

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs MBP

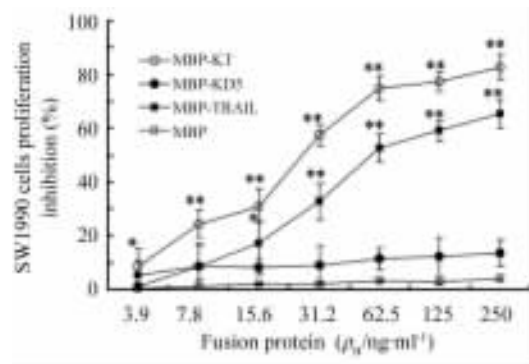


图5 不同融合蛋白对 SW1990 肿瘤细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of different fusion proteins on proliferation of SW1990 tumor cells

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs MBP

#### 2.6 MBP-KT 促进 SW1990 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果(图7)表明:胰腺癌

SW1990 细胞在 MBP-KT 作用后, 短时间内细胞有明显的凋亡, 而且凋亡率随着 MBP-KT 浓度的增加而上升。在 MBP-KT 以 5 ng/ml 的浓度作用时, SW1990 细胞的凋亡率是( 34. 83 ± 2. 31 )%; 在 MBP-KT 以 25 ng/ml 的浓度作用时, SW1990 细胞的

凋亡率是( 65. 84 ± 3. 45 )%。透射电镜显示经过 MBP-KT 作用后的 SW1990 细胞, 细胞在微观结构上明显地呈现出了凋亡样的改变( 图 8A ), 表现为细胞核染色质凝集( 图 8B )和边缘化( 图 8C ), 细胞皱缩, 细胞膜收缩内陷, 凋亡小体形成等( 图 8D )。



图 6 不同融合蛋白对内皮细胞管状形成的影响( ×400 )

Fig. 6 Effects of different fusion proteins on tube formation of endothelial cells ( ×400 )

A: Negative control; B: MBP-TRAIL; C: MBP-KD5; D: MBP-KT

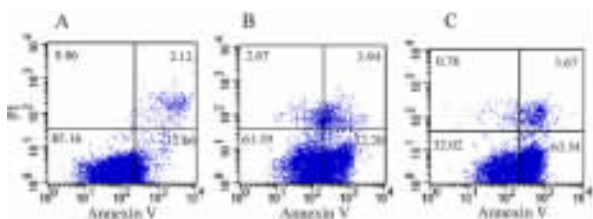


图 7 MBP-KT 诱导 SW1990 细胞凋亡

Fig. 7 MBP-KT induced apoptosis of SW1990 cells

A: Control; B: 5 ng/ml; C: 25 ng/ml

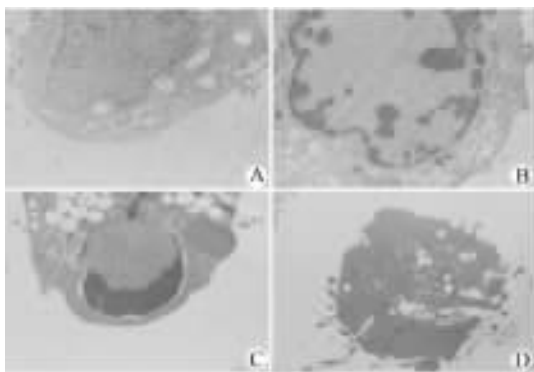


图 8 MBP-KT 诱导 SW1990 细胞凋亡( ×6 000 )

Fig. 8 MBP-KT induced apoptosis of SW1990 cells( ×6 000 )

A: Control; B-D: MBP-KT

### 3 讨论

高分子量激肽原是血浆中的一种多功能糖蛋白, 是体内组成接触系统的蛋白质之一, 参于内源性凝血, 同时在促纤溶、抗血栓、抗黏附、抑制新生血管

形成、介导炎症反应以及肾素-血管紧张素系统相互作用等方面起着重要作用<sup>[14]</sup>。自从发现其具有潜在的抗肿瘤活性<sup>[15]</sup>以来, 对它的研究不断深入。活化型高分子量激肽原 HKa 是 HK 的活性中心, 它通过取代纤维蛋白原、竞争性抑制纤维蛋白原与体外连接蛋白结合等方式抑制细胞黏附<sup>[16-17]</sup>。此外还通过与体外连接蛋白竞争尿激酶受体, 或与体外连接蛋白形成复合物, 抑制内皮细胞迁移、黏附和增殖。Kawasaki 等<sup>[18]</sup>利用高转移的黑素瘤细胞, 在小鼠体内建立肿瘤模型, 结果显示 HK D5 区的甘氨酸、赖氨酸序列, 是抑制体外连接蛋白介导的肿瘤细胞黏附和侵袭的核心序列。Liu 等<sup>[19-20]</sup>的研究结果表明 HKa 和 KD5 通过 EGFR/PAR 信号途径抑制人前列腺癌细胞的迁移、侵袭。

抗癌治疗的失败很大程度上是由于肿瘤的高侵袭、高转移, 但是肿瘤发生转移的机制很复杂, 单纯依靠抑制血管新生对肿瘤生长的抑制作用有限。因此, 本研究将具有抑制血管新生的 KD5 和仅对肿瘤细胞有很强杀伤作用的 TRAIL 融合, 得到了融合蛋白 Kininogen D5<sub>60-148</sub>-TRAIL<sub>114-281</sub>( KT)。在体外细胞学实验中发现, 融合蛋白 KT 对于内皮细胞 ECV304 的增殖抑制作用较 KD5 明显增强; 同时在诱导肿瘤细胞 SW1990 的凋亡方面, KT 较 TRAIL 有着更明显的诱导作用, 因此 KT 具有双功能的抗肿瘤活性。本研究还利用流式细胞仪和电镜进一步验证了 KT 可诱导肿瘤细胞凋亡, 同时也证实 KT 可以作用于内皮细胞, 抑制体外管腔形成。

本实验室还将融合基因 KT 转入原核表达载体 pBV220, 得到了高活性的不含 MBP 的非融合蛋白

KT,为进一步开发临床抗肿瘤新药奠定了基础。但是其体内的活性以及代谢情况有待于进一步的研究。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent [ J ]? Natl Cancer Inst, 1990, 82( 1 ): 4-7.
- [ 2 ] Hanahan D, Forlman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [ J ]. Cell, 1996, 86( 3 ): 353-364.
- [ 3 ] Herwald H, Morgelin M, Svensson HG. Zinc-dependent conformational changes in domain D5 of highmolecular mass kininogen modulate contact activation [ J ]. Eur J Biochem, 2001, 268( 2 ): 396-404.
- [ 4 ] Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, *et al.* The shape of high molecular weight kininogen [ J ]. J Biol Chem, 1994, 269( 13 ): 10100-101006.
- [ 5 ] Guo YL, Colman RW. Two faces of high-molecular-weight kininogen ( HK ) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK ( HKa ) turns it off [ J ]. J Thromb Haemost, 2005, 3( 4 ): 670-676.
- [ 6 ] Hasan AA, Cines DB, Herwald H, *et al.* Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5 [ J ]. J Biol Chem, 1995, 270( 33 ): 19256-19261.
- [ 7 ] Reddigari SR, Kuna P, Miragliotta G, *et al.* Human high molecular weight kininogen binds to human umbilical vein endothelial cells via its heavy and light chains [ J ]. Blood, 1993, 81( 5 ): 1306-1311.
- [ 8 ] McCrae KR, Donate F, Merkulov S. *et al.* Inhibition of angiogenesis by cleaved high molecular weight kininogen ( HKa ) and HKa domain 5 [ J ]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5( 7 ): 519-528.
- [ 9 ] Zhang JC, Claffey K, Sakthivel R, *et al.* Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5 [ J ]. FASEB J, 2000, 14( 15 ): 2589 -2600.
- [ 10 ] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [ J ]. Immunity, 1995, 3( 6 ): 673-682.
- [ 11 ] Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [ J ]. Cell, 1997, 88( 2 ): 277-285.
- [ 12 ] Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin [ J ]. FASEB J, 2001, 15( 6 ): 1044-1053.
- [ 13 ] Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, *et al.* Endostatin's antiangiogenic signaling network [ J ]. Mol Cell, 2004, 13( 5 ): 649-663.
- [ 14 ] Colman RW. Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system [ J ]. Curr Pharm Des, 2006, 12( 21 ): 2599-2607.
- [ 15 ] 徐秀月, 杨威. 活化型高分子量激肽原潜在的抗肿瘤作用及其分子机制 [ J ]. 2006, 22( 9 ): 691-696.
- [ 16 ] Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes [ J ]. Blood, 1997, 90( 10 ): 3819-3843.
- [ 17 ] 吕刚, 杜培革, 张秀娟, 等. 高分子量激肽原第5结构域研究进展 [ J ]. 北华大学学报: 自然科学版, 2007, 8( 6 ): 513-516.
- [ 18 ] Kawasaki M, Maeda T, Hanasawa K, *et al.* Effect of His-Gly-Lys motif derived from domain 5 of high molecular weight kininogen on suppression of cancer metastasis both *in vitro* and *in vivo* [ J ]. J Biol Chem, 2003, 278( 49 ): 49301-49307.
- [ 19 ] Liu Y, Pixley R, Fusaro M, *et al.* Cleaved high-molecular-weight kininogen and its domain 5 inhibit migration and invasion of human prostate cancer cells through the epidermal growth factor receptor pathway [ J ]. Oncogene, 2009, 28( 30 ): 2756-2765.
- [ 20 ] Liu Y, Cao DJ, Sainz IM, *et al.* The inhibitory effect of HKa in endothelial cell tube formation is mediated by disrupting the uPA-uPAR complex and inhibiting its signaling and internalization [ J ]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295( 1 ): C257-267.

[ 收稿日期 ] 2009-04-18 [ 修回日期 ] 2009-06-15

[ 本文编辑 ] 徐红梅

### · 简 讯 ·

## 本刊已被英国《公共健康研究数据库》( GH )收录

2009年4月28日,本刊收到中国科学技术期刊国际交流委员会通知,《中国肿瘤生物治疗杂志》已被英国《公共健康研究数据库》( Global Health, GH )收录。该数据库是由英国国际农业和生物科学研究中心主办的国际权威公共健康数据库,收集来自全球158个国家、50种语言、5000余种文献、最终译为英语的文献内容。到目前为止,本刊已先后进入了8个国际著名检索系统:美国《化学文摘》( CA )、美国《剑桥科学文摘》( CSA )、美国《乌利希国际期刊指南》( Ulrich IPD )、荷兰《医学文摘》( EMBASE )、俄罗斯《文摘杂志》( AJ )、英国《农业与生物科学研究文摘》( CABA )、英国《公共健康研究数据库》( GH )、波兰《哥白尼索引》( IC )。《中国肿瘤生物治疗杂志》的国际显示度和学术影响又得到进一步的提升。