**分类号：**

**UDC:**

**密级:**

**肝靶向肽 CSP I-plus 修饰的重组人内皮抑素对**

**HepG2 肝癌细胞的作用研究**

**The effect of liver-targeting peptide CSP I-plus modified recombinant human Endostatin on human**

**hepatocellular carcinoma**

|  |  |
| --- | --- |
| **姓** **名***：* | **鲍冬梅** |
| **学** **号**： | 2111243011 |
| **院** **系**： | 基础学院 |
| **专** **业**： | 病原生物学 |
| **研究方向**： | 药用生物活性物质的功能研究 |
| **导师姓名**： | 朱家勇 教授 |
| **论文提交日期**： | 2015.03.13 |
| **论文答辩日期**： | 2015.05.07 |
| **学位授予单位：** | 广东药学院 |

二○一五 年 五 月

目 录

[摘 要](#_Toc686750813) 3

[结 论](#_Toc686750814) 4

**[Abstract](#_Toc686750815)** 5

[第一章 序言](#_Toc686750816) 6

**[1.1](#_Toc686750817)** [研究背景](#_Toc686750817) 6

**[1.2](#_Toc686750818)** [研究思路](#_Toc686750818) 7

**[2.1](#_Toc686750819)** [前言](#_Toc686750819) 7

**[2.2](#_Toc686750820)** [实验材料](#_Toc686750820) 7

**[2.3](#_Toc686750821)** [实验方法](#_Toc686750821) 9

**[2.4](#_Toc686750822)** [实验结果](#_Toc686750822) 10

**[2.5](#_Toc686750823)** [讨论](#_Toc686750823) 13

**[第三章 rES-CSP](#_Toc686750824)**[的体外抗](#_Toc686750824)**[HCC](#_Toc686750824)**[作用研究](#_Toc686750824) 13

**[3.1](#_Toc686750825)** [前言](#_Toc686750825) 13

**[3.2](#_Toc686750826)** [实验材料](#_Toc686750826) 13

**[3.3](#_Toc686750827)** [实验方法](#_Toc686750827) 15

**[3.4](#_Toc686750828)** [实验结果](#_Toc686750828) 17

**[3.5](#_Toc686750829)** [讨论](#_Toc686750829) 27

**[第四章 rES-CSP](#_Toc686750830)**[的体内抗](#_Toc686750830)**[HCC](#_Toc686750830)**[作用研究](#_Toc686750830) 28

**[4.1](#_Toc686750831)** [前言](#_Toc686750831) 28

**[4.2](#_Toc686750832)** [实验材料](#_Toc686750832) 28

**[4.3](#_Toc686750833)** [实验方法](#_Toc686750833) 29

**[4.4](#_Toc686750834)** [实验结果](#_Toc686750834) 30

**[4.5](#_Toc686750835)** [讨论](#_Toc686750835) 33

[全文总结](#_Toc686750836) 33

[研究展望](#_Toc686750837) 34

[参考文献](#_Toc686750838) 34

[附录](#_Toc686750839)**[3](#_Toc686750839)** [攻读学位期间科研情况及所受奖励](#_Toc686750839) 36

[附录Ⅰ：英文缩写语中文对照](#_Toc686750840) 36

[文献综述](#_Toc686750841) 39

**[References:](#_Toc686750842)** 40

**肝靶向肽CSP I-plus修饰的重组人内皮抑素对HepG2**

**肝癌细胞的作用研究**

**硕士研究生：鲍冬梅专业：病原生物学导师：朱家勇教授**

摘 要

肝细胞性肝癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）的发生是一个多因素多阶段的复杂过程，迄今没有有效的根治办法。寻求新的治疗方法和治疗新靶标是目前肝细胞性肝癌治疗的迫切需求。目前国内外研究一直致力于通过阻断肿瘤新生血管形成来达到治疗肿瘤的目的。血管生成抑制剂，特别是多肽或内源性肽可能成为异常血管生成依赖性疾病最安全最低毒的治疗措施。内皮抑制素（endostatin）是胶原蛋白XVIII羧基末端水解而来的20 kDa多肽片段，是一种内源性血管形成抑制因子，特异性地抑制内皮细胞增生和迁移，对血管形成及肿瘤生长具有明显抑制作用。此外研究证实内皮抑素对乳腺癌、大肠癌等肿瘤细胞也具有直接的抑制作用。但正如许多血管生成抑制剂一样，内皮抑素单一给药并不能获得显著地疗效，加之蛋白制剂存在的问题从而使美国于2003年终止对内皮抑素的临床开发。近年来靶向制剂的研究俨然已经成为国内外药剂研究的热点之一。CSP I-plus是从疟原虫环子孢子蛋白（Circumsprozoite protein, CSP）中筛选得到的能够特异识别并黏附在肝细胞表面的多肽序列。利用CSP I-plus的这一特性，本实验室采用基因工程技术和原核表达系统成功制备新型肝靶向人内皮抑素rES-CSP。目前，该融合蛋白对内皮细胞的抑制作用以及肝靶向性已经得到证实，但对肝癌细胞的作用尚无研究报道，有待进一步探讨。

本论文意在进一步从体内原位肝癌模型验证rES-CSP肝靶向性的基础上，采用

HepG2细胞和裸鼠原位肝癌模型从细胞和动物整体水平评价其抗肝癌效果并初步探讨凋亡相关的分子机制。

**研究目的**

本论文通过研究新型肝靶向人内皮抑素rES-CSP对肝癌细胞的直接抑制作用，为rES-CSP抑制肝癌生长的作用靶点进行了补充，从而为肝癌靶向治疗提供新的科学依据和药物开发思路。

**研究方法**

**1. 探讨rES-CSP的肝靶向性**

1.1 rES-CSP的裸鼠体内分布实验：建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型，通过瘤块种植法法建立肝原位移植瘤模型。将裸鼠随机分为空白对照（生理盐水）组，重组人血管内皮抑素（rEndostatin）组，融合蛋白（rES-CSP）组。建模1月后单次尾静脉给药，分别于5、30和60 min取血后处死动物，取心、肝、脾、肺、肾、肿瘤组织制备匀浆，ELISA方法测定各样品中内皮抑素浓度。

**2. 探讨rES-CSP的体外抗HCC作用及凋亡相关分子机制**

2.1 MTS方法分别检测给予终浓度为12µM、6µM、1.2µM、0.6µM、0.06µM的重组人血管内皮抑制素、CSP I-plus和肝靶向人内皮抑素rES-CSP作用24 h和48 h后对HepG2、Chang's和A549细胞的毒性作用，以选择合适的药物浓度进行后续的活性研究。其后，分别从迁移分析、流式细胞术和透射电镜来考察rES-CSP抗肝癌细胞迁移及对细胞周期和凋亡的影响。

2.2 Western Blot检测rES-CSP诱导肝癌细胞凋亡的相关分子机制，分别给予终浓度为

0.6µM、6µM的重组人内皮抑制素和肝靶向人内皮抑素rES-CSP作用24 h后收集细胞并裂解，提取蛋白后分别与凋亡蛋白Caspase 8抗体、凋亡抑制蛋白Bcl-2抗体进行免疫印迹实验，检测并分析细胞内Caspase 8和Bcl-2的表达变化。

**3. 探讨rES-CSP的体内抗HCC作用**

3.1建立肝原位移植瘤模型，实验动物随机分为3组，每组10只：①空白组（生理盐水），②rEndostatin (6µM)组，③rES-CSP (6µM)组。建模1周后隔天静脉给药，连续用药30天。处死动物，观察肝脏肿瘤生长情况，剥离肝组织中的瘤块称瘤重，计算抑瘤率；

3.2取肝癌组织做石蜡切片，HE染色观察组织的病理学改变。免疫组化比较肝癌组织中CD31的表达变化。

4. **数据统计与分析：**实验数据均以均数与标准差（*x**s*）表示，应用SPSS 13.0统计

软件分析处理实验数据。采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐时多重比较采用LSD法；方差不齐时，多重比较采用Dunnett T 3法。*P*﹤0.05为差异有统计学意义。

**实验结果**

**1. 探讨rES-CSP的肝靶向性:**

1.1肝原位种植瘤模型制备：取人肝癌细胞系HepG2制备皮下移植瘤，后将肿瘤组织接种于裸鼠肝内，建立裸鼠肝原位移植瘤模型。

1.2 rES-CSP的裸鼠体内分布实验：荷肝癌原位裸鼠尾静脉给药，ELISA方法测定给药后5、30和60 min时裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肿瘤组织和血液中内皮抑素浓度，结果显示肝靶向内皮抑素与普通重组人内皮抑素组相比，各脏器内皮抑素浓度均有显著性差异（*P*﹤0.05）；各时间点肝靶向人内皮抑素rES-CSP组肝脏及肝癌组织内皮抑素浓度均高于普通内皮抑素组（*P*﹤0.01）。

**2. 探讨rES-CSP的体外抗HCC作用及凋亡相关分子机制**

2.1细胞毒性实验：MTS结果显示rES-CSP对HepG2细胞的增殖有抑制作用，且呈时间和剂量的依赖性。而CSP I-plus、rEndostatin均对肝癌细胞的增殖几乎无影响。同时在低浓度时，rES-CSP对肝癌细胞的抑制作用明显高于Chang's和A549细胞

（*P*﹤0.01）。在6 µM 时，HepG2细胞的存活率为46.3±2.31%，Chang's和A549

细胞的存活率分别为92.8±2.11%、93.2±2.96%。

2.2细胞迁移实验：随着时间的推移，rES-CSP组能显著抑制肝癌细胞划痕的愈合，与重组人内皮抑素组相比，差异具有统计学意义（*P*﹤0.05）。同时Transwell小室实验显示，与空白对照组相比，经6μM rEndostatin或rES-CSP处理后的肝癌细胞迁移到下室的数量明显减少(*P* 值均﹤0.05)，迁移抑制率分别为27±1.75%、

65.5±2.95%。

2.3流式细胞术检测细胞周期和凋亡：结果显示，6μM rEndostatin作用24 h和48 h后，肝癌细胞的周期分布和凋亡几乎不受影响（*P*＞0.05）。而rES-CSP显著诱导肝癌细胞G2/M期细胞数目增加同时伴随着G0/G1和S期细胞减少(*P*﹤0.01)，同时肝癌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率显著高于对照组细胞（*P*﹤0.01）。

2.4透射电镜观察细胞的凋亡：结果显示rES-CSP处理后，肝癌细胞多出现中晚期凋

亡，可见细胞膜出芽，凋亡小体形成，内含有退变的细胞器。核碎裂，核固缩，胞核染色质边集、成碎块状，核膜消失。

2.5 Western blot检测凋亡相关蛋白的表达变化：rES-CSP可显著降低Bcl-2蛋白表达水平，同时可能上调Caspase 8蛋白的表达。rEndostatin处理组对Bcl-2和Caspase

8两种蛋白的表达影响不明显。

**3. 探讨rES-CSP的体内抗HCC作用及相关分子表达变化**

3.1体内对裸鼠肝癌原位移植瘤的抑制作用：rES-CSP组与重组人血管内皮抑素组、对照组相比，瘤重和瘤体积均有显著性差异（*P*＜0.05），结果表明rES-CSP能显著抑制人肝癌裸鼠原位移植瘤的生长，重组人内皮抑素对肝癌的生长抑制作用不明显；rES-CSP和rEndostatin组的人肝癌裸鼠荷瘤的抑瘤率为29.6±4.39 %和5.30±1.23 %。

3.2 HE染色观察组织的病理变化：肝癌细胞呈浸润性生长，rES-CSP组同实验对照组相比，rES-CSP组癌组织多发生坏死，间质血管少于对照组，癌细胞核分裂相对减少，可见有大量白细胞和淋巴细胞浸润，表明rES-CSP组对癌细胞生长有一定的抑制作用。然而部分肺病理切片观察可见肺泡间隔增厚，肺泡壁和细支气管壁有较多炎性细胞浸润，显示出较重的间质性肺炎病变。

3.3免疫组织化学检测肝癌组织中微血管密度和凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达变化：与

对照组相比，rEndostatin组和rES-CSP组肿瘤组织微血管密度相对减小，两组间差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。

结 论

肝靶向肽CSP I-plus修饰的重组人内皮抑素能靶向结合于肝细胞表面分子HSPG，从而在肝脏组织得到明显富集。体外抗HCC活性实验证实rES-CSP可显著抑制肝癌细胞的增殖和迁移，阻滞细胞的复制周期，并且增加肝癌细胞的凋亡率。动物实验证实，rES-CSP能够显著抑制裸鼠原位肝癌的生长，作用效果显著强于重组人血管内皮抑制素，并且肝癌组织CD31蛋白表达下调与重组人血管内皮抑制素组相比具有显著差异。综上所述，肝靶向肽CSP I-plus修饰的重组人内皮抑素能在肝脏组织富集，从而提高内皮抑素对肝癌细胞的靶向抑制作用，为肝癌的靶向治疗提供新的科学依据与药物开发依据。

**关键词：**重组人血管内皮抑制素；肝靶向肽；融合蛋白；肝细胞性肝癌

**The effect of liver-targeting peptide CSP I-plus modified recombinant human Endostatin on human hepatocellular carcinoma**

**Cell line HepG2**

**Graduate:** Bao-Dongmei Major: Pathogen **Biology**

**Supervisor:** Professor **Zhu-Jiayong**

**Abstract**

**Introduction**

The occurrence of Hepatocellular carcinoma (HCC) is a complex process of multi-factor and multi-stage. So far there is no effective cure for this disease. Looking for new treatment and new therapeutic molecular target for the treatment of hepatocellular carcinoma is fitting for the urgent demands. Angiogenesis inhibitors, particularly polypeptides or endogenous peptides, may become the safest and least toxic therapy for disease associated with abnormal angiogenesis. At present, the domestic and foreign research has been committed by preventing the tumors from creating blood vessels. Endostatin, a 20 kD C-terminal fragment of collagen XVIII, is one of the most effective anti-angiogenesis agents availabe. Endostatin could inhibit endothelial cell proliferation, migration, tube formation and eventually interrupting angiogenesis and tumor growth. In addition to its antiangiogenic activity, rEndostatin exerts a direct anticancer action in certain tumor cell lines such as breast cancer and colon cancer cells. But like many angiogenesis inhibitors, the signal administration of Endostatin can't get significant curative effects, in addition to the existing problem of protein preparation thus the USA terminate the clinical development of Endostatin in 2003. In recent years, targeting drug research has become one of the hot spot. CSP I-plus peptide screened from *Plasmodium falciparum* Circumsprozoite protein (CSP) can specifically targeting liver. Thus, we have successfully synthesized liver targeting rEndostatin by using genetic engineering technology and prokaryotic expression

System. At present, the inhibitory effect of the fusion protein on endothelial cells has been confirmed, But on HCC cells has not been reported, which need to be further discussed.

In this study, the liver-targeting function of rES-CSP will be futher verified in the models with nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma, and than HepG2 and nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma were used to evaluate anti-HCC effect of rES-CSP. The molecular mechanism of anti-HCC effect of rES-CSP was also

investigated.

**Objective**

The objectives of the present study are to investigate the direct inhibition of liver targeting rEndostatin (rES-CSP) on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, which supplemented the inhibitory target of rES-CSP on hepatocellular carcinoma. Thus provide new scientific evidence and drug development ideas in targeting therapy of HCC.

**Methods**

**1. To study the Liver-target function of rES-CSP**

1.1 The establishment of models with nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma: nude mice subcutaneous transplantation tumor model was established, and serially planted the subcutaneous transplantation tumor into liver.

1.2 Animal in vivo distribution of rES-CSP: Nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma were randomly divided into blank control (saline) group, rEndostatin group and rES-CSP group. One month after signal tail vein administration of

RES-CSP and rEndostatin, the heart, liver, spleen, lung, kidney, blood, tumor tissues of nude mice were homogenized on 5、30 and 60 min. The endostatin concentration in each sample was measured by ELISA method.

**2. In vitro anti-HCC and apoptosis related molecular mechanism of rES-CSP**

2.1 Cytotoxicity test: The HCC cell line HepG2, human liver cell Chang's and lung carcinoma cell A549 were added rEndostatin, rES-CSP and CSP I-plus in equimolar concentrations (12µM, 6µM, 1.2µM, 0.6µM, 0.06 µM), the cytotoxicity was determined by MTS method. Thus the appropriate drug concertration was selected for subsequent

Functional studies. Than we analyzed the migration、cell cycle and apoptosis of rES-CSP

And rEndostatin on hepatocellular carcinoma cells.

2.2 Western blot assay detected apoptosis related molecular mechanism: HepG2 cells were added rEndostatin, rES-CSP in equimolar concentrations (6 µM). After 24 hours, protein

Was extracted from cells and incubated with anti-Caspase 8、anti-Bcl-2 antibody for

Analysis of intracellular expression of apoptosis related proteins by western blot assay.

**3. Anti-HCC effect of rES-CSP in vivo**

3.1 Nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma was used as animal model, randomly divided into 3 groups, each with 10 mices. ①blank group (saline), ②rEndostatin (6µM), ③rES-CSP (6µM). Two weeks after intravenous administration once two days for 28 days. After the last administration, dissected the liver

Cancer and observed the tumor growth status, finally calculated the inhibition rate.

3.2 Nude mice tissue paraffin sections were stained with HE staining and observed pathological changes. The expression changes of microvessel density CD31 was detected by immunohistochemistry.

**4. Statistical analysis**

All datas were expressed as the mean±standard error of the mean ( *x**s* ). All statistical analyses were performed by SPSS (version 13.0 for Windows) statistical software. Quantitative variables were analyzed by one-way analysis of variance. When the data are

Homogeneity, multiple comparison use LSD method. When the data are not homogeneity, multiple comparison use Dunnett T 3 method. The difference was statistically significant

When *P*＜0.05.

**Result**

**1. The Liver-target function of rES-CSP**

1.1 The subcutaneous tumor formation rate was 100.0%, tumors were grown by nine-tenths mice which were injected subcutaneous transplantation tumor, and all of the mice survived.

1.2 In-vivo distribution of rES-CSP in the transplantation tumor bearing mice liver: to determine whether rES-CSP was able to accumulate rapidly in liver for potential treatment of HCC, the concentration of rES-CSP in liver and liver cancer as a functional of time were

Obtained after i. v. administration of rES-CSP or rEndostatin to mice. The levels of endostatin in the liver and liver cancer at 5、30 and 60 min post-administration were analyzed by ELISA. The results showed that the concentrations of Endostatin in heart, liver,

Spleen, lung, kidney, blood and tumor between rES-CSP and rEndostatin groups were significantly different (*P*＜0.05). At the three time intervals post-administration, the liver and liver cancer Endostatin levels in rES-CSP group higher than in the rEndostatin group (*P*＜0.01).

**2. In vitro anti-HCC and apoptosis related molecular mechanism of rES-CSP**

2.1 Cytotoxicity test: MTS results showed that the strong inhibitory effect of rES-CSP on the proliferation of HepG2 showed a concentration-dependent manner. However, CSP I-plus、rEndostatin can hardly affect the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. At

The dose of 6µM, rES -CSP showed the strongest inhibitory effect on the proliferation of HepG2 with an survival ratio of 46.3±2.31%. However the A549 and Chang's cells were 92.8±2.11% and 93.2±2.96% respectively.

2.2 Inhibition of rES-CSP suppresses HepG2 cells migration in vitro: Wound healing assay and Transwell assay showed that the rates of migration in the cells treated with rES-CSP were significantly lower compared with rEndostatin.

2.3 Flow cytometry detected the cell cycle and apoptosis: At 24 and 48 h of treatment with rES-CSP (6µM), an increase in G2/M phase concomitant with a decrease in G0/G1 and S

Phase was observed when compared with rEndostatin group, and both early and late apoptosis rates in HepG2 cells significantly higher than rEndostatin group (*P*＜0.01).

2.4 Transmission electron microscope observe the HepG2 cell apoptosis morphologic changes: the results showed that hepatocellular carcinoma cells almostly appeared the mid and late stage apoptosis, visible cell membrane budding and apoptotic bodies with degenerated organelles inside.

2.5 Western blotting assay detected the expression changes of apoptosis related protein: the results showed that rES-CSP can significantly decrease the expression of Bcl-2 protein, while up regulate the expression of Caspase 8 protein compared with rEndostatin-treated

group.

**3. In vivo anti-HCC and related molecular mechanism of rES-CSP**

3.1 The inhibition of human hepatocellular carcinoma in vivo nude mice orthotopic transplantation tumor: compared with rEndostatin group and control group, the tumor weight and tumor volume in rES-CSP group were significantly reduced. The tumor inhibition rates of rEndostatin and rES-CSP groups were 5.30±1.23 % and 29.6±4.39 %.

3.2 HE staining observed the tissue pathological changes: the results showed the hepatocellular carcinoma cells were infiltrating growth, the tumor in rES-CSP group occurred necrosis, and the pathological karyokinesis and interstitial blood vessel were fewer, and the inflammatory cell infiltration. That is to say the rES-CSP has certain inhibitory

Effect on HepG2 cell growth.

3.3 Immunohistochemistry detected the expression changes of CD31 in tumor: the results showed that the tumor microvessel density in rEndostatin and rES-CSP groups were significantly reduced, statistically significant differences between the two groups（*P*＜0.05）.

**Conclusion**

Liver-targeting peptide CSP I-plus modified recombinant human Endostatin (rES-CSP) could target binding to hepatocellular carcinoma cells surface molecular HSPG and improve liver homing. Anti-HCC effect of rES-CSP in vitro assay confirmed that rES-CSP can significantly inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells, inducing cell cycle arrest and increasing the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. Animal experiments confirmed that rES-CSP can significantly inhibit the growth of HCC in nude mice orthotopic transplantation tumor, the down regulated-expression of CD31 protein was more abvious. In sum, liver target recombinant human endostatin has obvious liver-target potency, can accumulate in liver tissue, which can improve the specificity of rEndostatin in the treatment of HCC and provide new scientific evidence and drug development ideas for the targeted therapy of HCC.

**Key words:** recombinant human endostatin; Liver-targeting peptide; Fusion protein; Hepatocellular carcinoma

## 第一章 序言

### **1.1** 研究背景

#### **1.1.1**肝细胞性肝癌的危害

肝细胞性肝癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）是最常见的恶性肿瘤，在世界范围内占肿瘤发生的第五位，死亡率占第三位[1]。乙型肝炎和肝硬化是90%以上HCC的主要癌前状态，在肝硬化患者中肝癌的发病率接近3~5%。在亚洲和撒哈拉以南非洲东部主要危险因素是慢性乙型肝炎感染（连同接触黄曲霉素B1）。欧美等西方发达国家的发病率伴随着丙型肝炎和饮酒也呈上升趋势[2]。在我国尤其是华南地区，肝癌的发病率和死亡率仅次于肺癌和胃癌，居我国恶性肿瘤的第三位[3, 4]。目前治疗肝癌最有效的方法是手术切除和肝移植，但约85%的患者就诊时已不具备手术的指征和条件，加上术后的高复发率，导致肝癌患者5年生存率极低[5, 6]。而放疗和化疗对身体副作用较大，在杀伤肿瘤细胞的同时，对正常组织细胞也有影响。因此，寻找疗效较高而毒副作用较小的新型抗癌药物已成为肝癌创新药物研究中的重点问题。

#### **1.1.2**肝细胞性肝癌的信号转导通路

肝细胞性肝癌的发生是一个多途径的复杂病理发展过程，涉及到肝细胞生存、增殖、凋亡和分化等方面的相关机制。近年来，在肝癌中发现许多重要信号转导通路的异常活化会影响原癌基因过表达、抑癌基因低表达、细胞周期紊乱、抑制细胞凋亡等。细胞凋亡的分子生物学机制极为复杂，涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用。主要分为外源性（死亡受体）途径和内源性（线粒体）途径。因此了解这些信号转导通路中的关键分子将有利于肝癌的分子靶向治疗。外源性途径始于细胞表面死亡受体，主要包括Fas，肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)，TNF相关凋亡诱导配体（TRAIL）受体1（TRAIL-R1或DR4）和TRAIL受体2（TRAIL-R2或DR5）。受体与配体结合后发生寡聚化，募集接头蛋白FADD（Fas-associated death domain）和Caspase 8形成DISC(death inducing signaling complex)，Caspase 8自身切割活化，进一步激活下游的Caspases包括Caspase 3, 6，7，启动细胞凋亡[7]。内源性细胞凋亡途径始于线粒体，由于受到氧化应激或凋亡信号的刺激等，引起线粒体通透性转运孔道开放，线粒体外膜通透性发生改变，促使细胞色素C从线粒体内释放到细胞浆中，与凋亡酶激活因子

-1（apoptosis protease-activating factor 1, Apaf-1）和Caspase 9结合形成凋亡体，Caspase

9自我剪切活化，启动CASPASE级联反应导致细胞的凋亡。这两条途径并不是相互独立的，而是相互交错的[8]。①PI3K/Akt信号转导通路：PI3K可以与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或链接蛋白相互作用，还可直接结合Ras和p11O导致PI3K的活化，进而促进Akt磷酸化，激活或抑制其下游靶蛋白Bad、Caspase 9、mTOR、NF-κB等，从而调节肝癌细胞的增殖、分化和凋亡[9, 10]。②MAPK信号转导通路：可激活JNK途径上调凋亡前体因子TNF-α和CD95L的表达，通过线粒体途径间接调节Bcl-2和Bcl-XL磷酸化，使其凋亡能力减弱。③IKK/NF-κB信号转导通路：肝细胞中NF-κB持续异常激活，在细胞凋亡抑制蛋白IAPs、Bcl-2家族、TNFR相关因子、JNK等作用下发挥抗细胞凋亡作用[11, 12]。这些分子通路可能是肝癌或其治疗药物重要的作用靶点。

#### **1.1.3**内皮抑制素

内皮抑制素（Endostatin, ES）是1997年O'Reilly在鼠血管瘤细胞株的培养上清中分离得到的一种广谱的内源性血管形成抑制因子，分子量约为20 kDa，测序发现该蛋白与胶原蛋白XVIII C末端的非胶原结构域132AA-315AA位的氨基酸序列一致，证实内皮抑制素是以胶原蛋白XVIII 为前体由弹性蛋白酶（elastase）和组织蛋白酶

（cathepsin-L）切割而来[13, 14, 15]。ES结构中包含16个酸性氨基酸和29个碱性氨基酸。X射线结晶学分析发现内皮抑制素分子表面暴露着由11个精氨酸位点构成的紧密球形折叠结构，介导ES与肝素/硫酸肝素蛋白聚糖的结合。另外由N末端1、3、

11三个组氨酸残基和76位的天门冬氨酸构成的锌离子结合位点，用以保护ES的 N

末端不被蛋白酶水解，防止其失活[16, 17]。

#### **1.1.4**内皮抑制素的功能

Folkman 等[18]首次提出“肿瘤生长必须依赖于新生血管的形成”，抑制肿瘤血管的形成可作为治疗肿瘤的新的治疗方法。内皮抑制素作为一种能强烈抑制血管形成的内源性抑制因子，成为肿瘤治疗学研究的一个热点。内皮抑制素生物学活性的“靶点”包括肿瘤细胞、成纤维细胞、细胞外基质和微血管系统在内的多种成分。其主要靶点是血管内皮细胞，通过特异抑制激活的血管内皮细胞增殖和迁移，抑制新血管的生成，从而抑制肿瘤的生长和转移。此外研究证实内皮抑素对肿瘤细胞具有直接的抑制作用。①内皮抑素在消化道恶性肿瘤方面的研究：何本夫等[19]研究，内皮抑素能抑制食管癌细胞Eca-109和人脐静脉内皮细胞HUVEC的增殖，并有效抑制食管癌移植瘤的

生长；体外研究证实[20]，内皮抑素可抑制人胃癌NCI-N87细胞增殖和侵袭，诱导细胞凋亡，其机制可能与内皮抑素导致细胞中Snail表达下降、E-cadherin表达增强有关。同时内皮抑素基因治疗也明显抑制了结肠癌的生长，显著诱导了结肠癌细胞的凋亡

[21]. ②内皮抑素在乳腺肿瘤方面的研究：申维喜等[22]研究发现，恩度、紫杉醇均可诱

导Her-2过表达的乳腺癌细胞凋亡，且成剂量依赖关系，二者联合使用凋亡作用增强。

③内皮抑素在妇科恶性肿瘤方面的研究：内皮抑素可与卵巢癌细胞表面的整合素α5β1结合，从而抑制卵巢癌细胞对腹膜壁的黏附[23]；④在AID相关卡波氏肉瘤中，内皮抑素直接进入肿瘤细胞内，与tropomyosin结合，抑制细胞因子介导的肿瘤细胞迁徙和侵袭[24]。内皮抑素也能下调肿瘤细胞表达VEGF，通过减少促血管形成因子的分泌，降低肿瘤细胞的转移能力[25]。这些研究充分说明内皮抑素作为血管生成抑制剂具有抗血管形成和抗肿瘤的双重作用。

#### **1.1.5**内皮抑制素的信号转导通路

内皮抑制素作为细胞表面多个非特异性受体的配体，可激活或阻断相应的信号转导，来调节肿瘤及其微环境中多种成分的生物学活性。①血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）和碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth

factor，bFGF）是目前发现最主要的血管生成刺激因子，内皮抑制素可竞争性结合生长因子信号通路中硫酸肝素蛋白聚糖受体，抑制内皮细胞的增殖[26]；②整合素家族通过识别胞外基质蛋白介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞间的黏附反应。内皮抑素同时以高亲和力结合内皮细胞表面的αv、α5β1 integrin，以低亲和力结合Glypican从而定位于“脂筏”结构域中，诱导锚定蛋白caveolin-1聚集，下调RhoA-GTPase活性，抑制Ras和Raf蛋白家族激酶介导的信号通路，进而达到抑制内皮细胞黏附、迁移和管化形成的作用[27, 28, 29]；③内皮抑素结合于受体KDR/FIK-1细胞膜外的结构域，阻断VEGF诱导的KDR/FIK-1酪氨酸磷酸化，抑制血管内皮细胞内ERK、P38 MAPK、和P125 FAK的活化，从而抑制内皮细胞的增殖和迁徙[26]；④内皮抑素通过下调抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-XL的表达，上调caspase-3的活性促进内皮细胞的凋亡[30, 31]；⑤内皮抑素作为内源性的血管生成抑制剂还可调节基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2)、HIF-1α（缺氧诱导因子-1α）、ephrin (肝细胞受体)、Tumor necrosis factor-α(TNFα)、nuclear factor-κB (NFκB)、粘附分子和Wnt/β-catenin等多种信号通路

[32, 33, 34]。

#### **1.1.6**内皮抑制素的应用现状

重组人血管内皮抑制素（Recombinant Human Endostatin Injection, 恩度rEndostatin, YH-16）是由我国学者罗永章博士等自主研发成功的一种新型可溶性重组人ES，其氨基末端经过基因修饰加上了9个氨基酸，使其活性及稳定性得到明显提高。恩度作为国家一类新药，中国食品药品监督管理局（SFDA）在2005年9月批准恩度联合NP（长春瑞滨+顺铂）治疗初治或复治的Ⅲ/Ⅳ期非小细胞肺癌。目前临床上多将恩度联合化疗、放疗来治疗多种肿瘤。内皮抑素基因治疗使用特定的载体将内皮抑素基因序列整合到肿瘤细胞内，从而使肿瘤细胞长期稳定地过分泌内皮抑素，提高内皮抑素在肿瘤细胞外基质或血浆中的浓度，达到比注射效果更佳的治疗目的。Wen-guo Jiang[35]等将内皮抑素基因与抗肿瘤抗生素力达霉素进行重组，获得融合蛋白ES-LDP，以期通过内皮抑素的肿瘤血管靶向性将力达霉素转运至肿瘤部位，通过引起DNA链的损伤来诱导肿瘤细胞的凋亡。然而，目前重组人内皮抑素的应用中主要存在以下问题①内皮抑素的受体或靶分子尚未明确；②具有生物活性的重组人内皮抑素蛋白的生成需要正确的折叠，临床上采用皮下反复注射，在体外不稳定，需长期、大剂量用药，这就不可避免地引起较严重的毒副作用，尤其会对胚胎形成、伤口愈合等生理状态下的血管形成产生潜在的不良影响；③目前对内皮抑素的研究大多局限于体外试验或动物移植肿瘤，其血管尚未形成或仅为血管形成的初期，而临床患者多属晚期肿瘤，血管基本成熟，重组人内皮抑素是否具有同样效果尚有待进一步深入研究。以上因素对重组人内皮抑素在临床应用中的疗效有一定影响，但国内外学者仍围绕着内皮抑素进行不断的改造和替代性疗法。同时筛选高效特异并低毒的新型靶向内皮抑素的靶向载体/导向分子也至关重要。

#### **1.1.7**环子孢子蛋白的功能特性及应用

靶向制剂是一类能使药物选择性地浓集定位于病变组织、器官、细胞或细胞内的新型给药制剂，具有疗效高、药物用量小、毒副作用小等优点。靶向多肽是继脂质体、纳米粒、单克隆抗体偶联物等之后一种全新的靶向载体，该多肽载体可将所携带的药物直接定位于细胞膜表面受体发挥其药理作用，亦可通过受体介导的内吞作用进入胞内，在胞浆或胞核发挥作用[36, 37]。随着对肝细胞肝癌分子水平研究的深入，肝癌细胞表面具有独特的表面分子—硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（heparan sulfateproteoglycans,

HSPG），其糖胺聚糖链（gly-cosaminoglycan chain, GAG）的硫酸化程度显著高于其

他组织，尤其是GAG链的N和O位的硫酸化程度决定了肝脏HSPG的特异性[38]。此外，研究发现肝癌组织中HSPG表达与正常肝组织有显著差异[39, 40]，且表达水平与癌细胞转移潜能成正比，提示HSPG分子在肝癌细胞的分化，肿瘤的形成与转移过程中具有十分重要的意义[41, 42]。干扰肝癌细胞HSPG受体功能，是抑制肝癌生长的新策略

[43, 44]。

感染性按蚊叮咬宿主后，子孢子表面均匀覆盖的一层表被蛋白-环子孢子蛋白

（Circumsprozoite protein, CSP）参与子孢子的感染过程，特别在与按蚊的唾液腺细胞和哺乳动物肝细胞特异性结合中起关键作用[45]。随疟原虫不同的发育阶段其蛋白构象发生改变：子孢子增殖阶段和入侵中间宿主靶细胞阶段，CSP的C-末端细胞黏附区暴露在外的黏附构象；在子孢子随按蚊的唾液进入中间宿主到入侵哺乳动物肝细胞前的迁徙阶段，CSP的N-末端遮蔽黏附区形成非黏附构象[46, 47]。研究显示CSP的N末端保守Ⅰ区是疟原虫子孢子吸附与入侵肝细胞的关键。CSP I-plus除包含I区5个氨基酸组成的保守序列（KLKQP）还含有上游硫酸肝素结合序列[46, 48]。研究发现针对I区上游的硫酸肝素序列的特异性抗体可有效抑制重组CSP与肝细胞结合，表明CSP I-plus可特异靶向结合肝细胞表面受体HSPG[49]. Longmuir等[50]将CSP I-plus 19个氨基酸的肽段制备成含CSP脂质体，体内观察其血浆清除率和组织分布情况，结果显示小鼠肝脏CSP脂质体的浓度是心脏、肾脏和肺脏的数百倍，是脾脏的数十倍；并且肝组织切片免疫荧光显示脂质体结合部位对肝素酶敏感。目前应用该肝靶向脂质体已成功将抗肿瘤抗生素阿霉素以及其他化疗药物选择性地运输到肝脏[51]。以上研究结果提示CSP I-plus可以作为肝靶向多肽载体，用于靶向治疗多种肝部疾病。

#### **1.1.8**本实验室前期研究结果及本课题研究目的

肝靶向肽CSP I-plus修饰的重组人内皮抑素作为肝癌靶向治疗的潜在有效抗血管生成药物，在前期工作中，本实验室采用DNA重组技术将高效而特异的肝细胞靶向肽CSP I-plus与抑制血管生成的重组人内皮抑素（rEndostatin, Endostar）有机融合，利用原核表达系统表达并制备高浓度的融合蛋白rES-CSP。实验发现，该融合蛋白不仅能抑制人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移、小管形成，抑制鸡胚尿囊膜模型新生血管的形成，同时通过体外细胞结合实验和小鼠体内分布实验验证其具有肝靶向性。荧光显微镜观察显示肝靶向人内皮抑素rES-CSP主要分布在肝癌细胞的细胞膜上，细胞质中有少量存在。流式检测发现，融合蛋白在肝癌细胞HepG2和正常肝细胞Chang's 中

的荧光强度均显著增强，而在肺癌细胞A549中的荧光强度与rEndostatin无明显差异

（*P*＞0.05）。进而通过小鼠尾静脉给药，ELISA方法观察发现各个时间点融合蛋白在肝脏组织的分布比例明显高于rEndostatin组，差异具有统计学意义。但是rES-CSP在裸鼠肝癌原位移植瘤模型中肝靶向性尚无研究报道，融合蛋白rES-CSP是否具有直接抗肝癌的作用？其作用效果和机制如何？值得研究。

### **1.2** 研究思路

本课题拟在前期成功构建的rEndostatin和CSP I-plus融合蛋白（rES-CSP）具有抑制血管形成并与肝癌HepG2细胞结合的基础上，选取人源肝癌细胞株HepG2和裸鼠原位肝癌模型为研究对象，进一步从体内和体外实验确定rES-CSP靶向性抑制肝细胞癌的作用。首先采用ELISA法检测rES-CSP各时间点在裸鼠原位肝癌移植瘤模型各组织器官的药物浓度，进一步验证rES-CSP的肝靶向性；MTS、细胞划痕和Transwell法观察rES-CSP对HepG2肝癌细胞增殖、迁移的影响；流式细胞术、电镜技术和Western blot检测rES-CSP对细胞周期和凋亡的影响及机制；最后观察rES-CSP对裸鼠原位肝癌移植瘤的瘤体大小、血管密度，裸鼠肝脾肾等主要器官的影响。

总体研究思路如下图：

**体外抗HCC效果**

**（HepG2 cell）**

**体内肝靶向性研究**

**（裸鼠原位肝癌移植瘤模型）**

裸鼠体内分布实验验证rES-CSP的肝靶向性；ELISA检测各时间点各组织器官的药物浓度。

以rEndostatin和 CSP I-plus 为对照，MTS

检测rES-CSP对细胞增殖的影响；细胞划痕和Transwell法观察rES-CSP对细胞迁移的影响；流式细胞术检测rES-CSP对细胞周期和凋亡的影响；电镜技术和Western

blot检测肿瘤细胞凋亡机制。

观察rES-CSP作用后对瘤体增殖、裸鼠生

长状况等情况的影响；观察rES-CSP作用后对裸鼠肝脾肾等主要器官的影响；免疫组化检测瘤体组织血管密度。

**体内抗HCC效果**

**（裸鼠原位肝癌移植瘤模型）**

**前期研究结果：**

① 细胞结合实验和小鼠体内分布实验证实rES-CSP的肝靶向性

② MTS方法发现rES-CSP抑制HepG2细胞增殖

③ 免疫组化实验证实rES-CSP抑制裸鼠皮下移植瘤血管生成

**靶向性抑制肝细胞癌的作用？**

#### **第二章rES-CSP**的肝靶向作用研究

### **2.1** 前言

体外培养细胞缺乏三维的组织结构，缺乏与非实质细胞的相互作用以及一些特异的细胞外因素等，因此在体外实验中获得的结果还需要有体内实验的验证。自20世纪初获得小鼠自发性肝癌动物模型以来，人们对肝癌动物模型的研究不断深入，逐渐建立了诱发性肝癌动物模型、移植性肝癌动物模型及转基因动物肝癌模型。但诱发性肝癌动物模型起病隐匿、病程较长，肿瘤多为弥漫结节型，诱导周期长，常需3-5 个

月或1-2年，在诱癌的过程中死亡率较高，因此多用于肝癌病因学、发生学、发病机理、遗传及生物学方面研究；转基因肝癌动物模型不仅是研究癌基因活性和肝癌发生的一种极为重要的方法，同时也为肝炎病毒相关性肝癌的研究提供了新的途径，但该模型制作技术要求极高，价格昂贵，国内开展尚少。移植性肝癌动物模型是指用肝癌

（源于动物或人）移植到动物体内（肝脏、肝外组织或器官）所形成的荷肝癌动物模型。用移植法制作的肝癌模型周期一般较短，肿瘤的大小和位置比较容易控制，但瘤源多种多样，有自发的、诱发的、切除的肝癌标本或肝癌细胞株，常用的受体动物有小鼠或大鼠，我们采用瘤块种植法制作裸鼠肝癌原位移植瘤模型。

本研究采用瘤块种植法成功建立了裸鼠HepG2肝癌原位移植瘤模型，该模型制作需要注意一下几点：（1）首先建立皮下肝癌移植瘤模型，其所需的肝癌细胞悬液的浓度要高于5×10 6个细胞/0.1 ml，同时细胞需处于对数生长期，生长旺盛。（2）待肿瘤长至1 cm3大小时，无菌选取无坏死组织的瘤块。（3）完善的麻醉和熟练地手术技巧是保证模型制作成功的关键，移植完毕后，常规用无菌纱布轻压肝脏止血，避免瘤块随血液流出肝脏。

前期通过体外细胞结合实验和小鼠体内分布实验分别来验证其是否具有肝靶向性，本章将选用裸鼠肝癌原位移植瘤模型以进一步验证前期rES-CSP肝靶向性的结果。

### **2.2** 实验材料

#### **2.2.1**细胞株

人肝癌细胞HepG2由本实验传代保存。

#### **2.2.2**实验动物

SPF级雌性Balb/c裸鼠，4-6周龄，体重18-22 g，购自广东省医学实验动物中心。相关动物实验均在SPF级动物实验室进行，严格无菌操作。

#### **2.2.3**主要试剂和耗材

恩度（rEndostatin）（ft东先声麦得津生物制药有限公司）、重组融合蛋白rES-CSP由广东省生物活性药物研究重点实验室制备、DMEM高糖培养基（GIBCO）、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, GIBCO)、青/链霉素（Hyclone）、磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline, PBS）（武汉博士德）、细胞培养瓶（Corning）、24 孔细胞培养板

(Corning)、Human Endostatin ELISA试剂盒(RayBiotech)。

#### **2.2.4**主要仪器设备

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 规格与型号 | 产家 |
| CO2 培养箱 | HERAS150 | 德国 HERAS |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olympus |
| 超低温冰箱 | Ultra low | 日本 SANYO |
| 超净工作台 | SW-CJ-2F | 江苏净化 |
| 超纯水纯化系统 | PROG00002 | 美国 Millipore |
| PH 计 | PB-10 | SARTORIUS |
| 电子分析天平 | BSA223S | SARTORIUS |
| 制冰机 | LQP-B-4 | 上海安亭 |
| 高压灭菌锅 | Labo Autoclave | 日本 SANYO |
| 酶标仪 | Model 680 | 美国 BIO-RAD |

#### **2.2.5**主要溶液配制

1）PBS溶液(pH7.4)：一袋PBS粉加入去离子水800 ml，搅拌使盐充分溶解，调pH7.4-7.6，定容至1000 ml配制成2×PBS浓缩液，使用时稀释2倍，1.034×105 Pa高压蒸汽灭菌20 min，4℃冰箱储存备用。

2）细胞培养液：DMEM高糖培养基/RPMI 1640培养基，加上10%胎牛血清、100μg/ml

链霉素、100 U/ml青霉素。

3）0.25%胰蛋白酶：100 mlPBS缓冲液溶解0.25 g胰蛋白酶（调PH 7.3），0.22μm微孔滤膜过滤除菌，-20℃保存。

4)含EDTA的0.25%胰蛋白酶：100 ml PBS缓冲液中溶解0.25 g胰蛋白酶，0.015 g EDTA（调PH 7.3），0.22μm微孔滤膜过滤除菌，-20℃保存。

5）0.4%戊巴比妥钠：称取0.4 g戊巴比妥钠，加入1×PBS 100 ml溶解过滤，4℃保存。

### **2.3** 实验方法

#### 2.3.1细胞复苏和培养：从液氮罐中取出冻存的细胞迅速放入约40℃水浴中不断摇动使其使其迅速解冻，用75%酒精消毒冻存管外表后,转移至15 ml离心管中，加入5 ml培养基并充分混匀，1000 rmp离心10 min，弃上清，重复一次。用10 ml含10%FBS, 100 U/ml青霉素、100μg/ml链霉素的培养基重悬细胞，转移至培养瓶中，置于37℃，

5%CO2的湿度孵箱中培养，每3天传代一次。其中HepG2/Chang's细胞用DMEM高糖培养基。

**细胞计数：**细胞计数采用血细胞计数板。将吹打成均匀的单一的细胞悬液从空隙里加入（50 μl左右），将计数板置于倒置相差显微镜下观看，并用计数器手动记录4个大方格内（共64个小方格）内的细胞总数。计数原则为：数上不数下，数左不数右，连在一起不能分清的细胞按一个算，连在一起能数清的按每个来算。将最后记录到的总数代入公式1中即得悬液的细胞浓度。

细胞浓度=（总细胞数/4）×104个/ml。

**细胞冻存：**按DMSO: FBS培养基为1: 9的比例配制细胞冻存液，离心收集细胞，弃上清，加入1 ml细胞冻存液重悬细胞，装至冻存管中再放置于细胞冻存盒里，于

-80℃保存，24 h后转入液氮罐中长期保存。

#### **2.3.2**肝原位种植瘤模型制备

1）将人肝癌细胞HepG2培养于DMEM高糖培养基（含有10%胎牛血清，100μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素）中，5%CO2、37℃孵箱中培养，体外培养至对数生长期时，用含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化，收集细胞用无血清DMEM高糖培养基浓缩成5×10 6个细胞/0.1 ml浓度细胞悬液。

2）按每个部位0.1 ml的细胞悬液接种于裸鼠右肢腋下，共10只，待肿瘤长至1 cm3

大小时，无菌选取无坏死组织的瘤块，放入生理盐水中剪碎成1 mm3的瘤块，备用。

3）裸鼠用0.4%戊巴比妥钠0.3 ml/20 g腹腔麻醉后，常规消毒，沿腹腔右肋缘下行1 cm的斜切口，挤出肝脏，用接种针将瘤块注入裸鼠的肝实质内，挤压3-5分钟后，高压过的纱布止血，关腹缝合，放回笼中SPF条件饲养，逐日观察裸鼠的伤口愈合状况。

#### **2.3.3****rES-CSP**裸鼠体内分布实验

**2.3.3.1实验动物分组及给药**

30只肝癌原位裸鼠模型随机分为3组：空白对照（生理盐水）组，等摩尔剂量（15

mg/kg）重组人血管内皮抑素（rEndostatin）组和融合蛋白（rES-CSP）组，建模1月后单次尾静脉注射，分别于注射后5 min、30 min、60 min取血脱颈椎处死，然后迅速解剖取出心、肝、脾、肺、肾、肿瘤等组织，以生理盐水洗净，滤纸吸干，精确称取各组织0.1-1 g，剪碎，按1 ml/1g加入生理盐水，转移到组织匀浆器，制成组织匀浆，8000 rpm低温离心10 min，取上清，-20℃冰箱冷藏。

**2.3.3.2 ELISA检测rES-CSP在裸鼠体内的组织分布**

①按照ELISA试剂盒使用说明，使用前，将样品和所需试剂全部置于室温（18-25℃）；

②用diluent A稀释human Endostatin标准品和待测样品。加入100μl 1×diluent B制备biotinylated anti-human Endostatin检测抗体储备溶液，继续稀释80倍即为1×biotinylated anti-human Endostatin标准液。HRP-Streptavidin(HRP标记二抗)使用前需用1×diluent B稀释400倍配成试验用浓度；

③向微孔板中加入100μl标准品或样品，室温下孵育2.5 h或4℃过夜，置于摇床上

缓慢摇晃；

④弃去溶液，每孔加入300μl 1×Wash Solution洗板4次，每次尽量全部弃去孔中液体，最后一次要求完全吸干，尽量减少误差；

⑤每孔加入100μl稀释好的1×biotinylated anti-human Endostatin检测抗体，室温缓慢摇晃孵育1 h，重复洗涤步骤④；

⑥每孔加入100μl稀释好的HRP-Streptavidin二抗溶液，室温缓慢摇晃孵育45 min，重复洗涤步骤④；

⑦每孔加入100μl TMP(3,3’，5, 5’-tetramethylbenzidine) One-Step Substrate Reagent

显色底物，室温缓慢摇晃孵育30 min；

⑧最后每孔加入50μl Stop Solution终止液，立即使用酶标仪测定在450 nm波长处吸光度，根据标准曲线计算各组织中内皮抑素的含量及百分比。

#### **2.3.4**数据统计与分析

使用SPSS 13.0软件进行数据处理，实验数据以平均数与标准差（*x**s*）表示。数据进行方差分析之后进行t-检验分析，*P*﹤0.05显示统计学差异有显著性，*P*﹤0.01为统计学差异极显著。

### **2.4** 实验结果

#### **2.4.1**人肝癌裸鼠原位移植瘤模型建立成功

裸鼠皮下成瘤率为100%（5/5），肝内接种肿瘤，裸鼠存活率100%（30/30），成瘤率90%（27/30），肉眼观察肝脏表面见移植瘤，部分与腹壁、胸骨柄粘连。肿瘤呈不规则球形，大小不等。色灰白，质脆，部分肿瘤切面可见坏死。



图2-1 人肝癌裸鼠原位移植瘤模型的建立

Fig 2-1 The establishment of models with nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma

#### **2.4.2****ELISA**检测**rES-CSP**在裸鼠体内的组织分布

肝癌原位裸鼠模型尾静脉给药，ELISA方法测定给药后在5 min、30 min、60 min时裸鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和肿瘤组织、血液中的内皮抑素浓度，结果显示生理盐水对照组小鼠心、肝、脾、肺、肾、肿瘤和血液中均检出有微量的内源性内皮抑素，且含量没有显著差异（*P*﹥0.05），表明裸鼠体内内源性鼠内皮抑素不会干扰ELISA法测定人内皮抑素样品。肝靶向肽修饰的人内皮抑素rES-CSP组和重组人内皮抑素rEndostatin组的结果见表2-1和表2-2。肝靶向人内皮抑素rES-CSP组与普通内皮抑素组各脏器内皮抑素浓度均有显著差异；各时间点肝靶向人内皮抑素rES-CSP组肝脏内皮抑素浓度均高于普通内皮抑素组（*P*﹤0.01），其中给药后5分钟时相差最大，达6.85倍；30分钟rES-CSP在肝组织的浓度是rEndostatin组的6.45倍；而肝癌组织中的rES-CSP浓度也高于普通内皮抑素组（*P*﹤0.01），其中给药后30分钟时相差最大，达4.98倍；60分钟rES-CSP在肝组织的浓度是rEndostatin的4.55倍。rES-CSP组的内皮抑素浓度在脾脏组织中比rEndostatin组也有所升高外，在其余心、肺和肾脏组织中则是降低的。上述结果表明肝靶向内皮抑素具有明显的肝靶向性，且在肝癌组织的富集能力增强。

表2-1 rES-CSP在肝癌原位裸鼠组织内的分布（*x**s*，n=6）

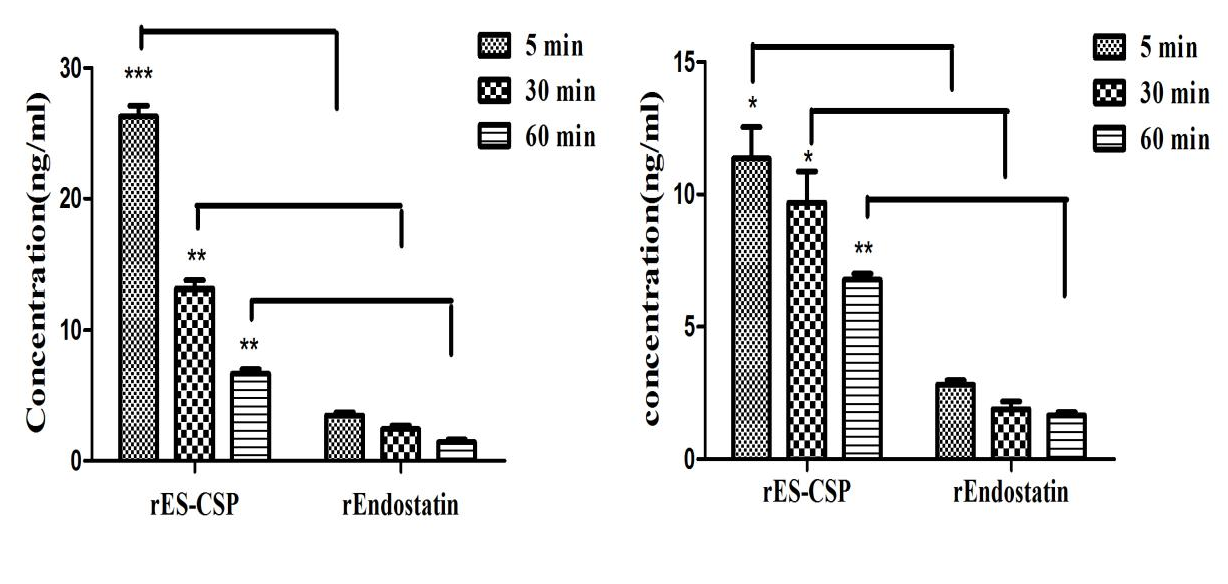
Table 2-1 Destribution in tissue after*i. v.* rES-CSP in the transplantation tumor bearing mice

| Tissue | Concentration (ng/ml) at different time point | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 5 min | 30 min | 60 min |
| Heart | 0.237±0.046 | 0.187±0.067 | 0.151±0.039 |
| Liver | 25.469±0.937 | 13.768±0.537 | 6.373±0.681 |
| Spleen | 6.729±0.463 | 6.694±0.78 2 | 2.414±0.390 |
| Lung | 0.194±0.024 | 0.229±0.031 | 0.283±0.058 |
| Kidney | 19.389±0.495 | 20.682±0.391 | 8.274±0.672 |
| Blood | 92.848±2.383 | 24.452±1.392 | 3.856±1.962 |
| Tumor | 12.543±0.219 | 10.871±0.196 | 7.010±0.321 |
| F | 3658.637 | 710.587 | 2021.742 |
| P | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（P＞0.05），用 LSD 法。 | | | |

表2-2 rEndostatin在肝癌原位裸鼠组织内的分布（*x**s*，n=6）

Table 2-2 Destribution in tissue after*i. v.* rEndostatin in the transplantation tumor bearing mice

| Tissue | Concentration (ng/ml) at different time point | |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 5 min | 30 min | 60 min |
| Heart | 0.198±0.029 | 0.933±0.062 | 0.573±0.049 |
| Liver | 3.718±0.331 | 2.135±0.239 | 1.647±0.691 |
| Spleen | 5.579±0.187 | 1.324±0.270 | 1.753±0.320 |
| Lung | 0.635±0.134 | 0.915±0.091 | 0.391±0.108 |
| Kidney | 49.212±0.365 | 16.489±0.561 | 15.687±0.290 |
| Blood | 91.090±2.993 | 21.940±1.722 | 6.488.±1.302 |
| Tumor | 2.980±0.169 | 2.180±0.076 | 1.540±0.091 |
| F | 38512.249 | 7516.226 | 12981.454 |
| P | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（P＞0.05），用 LSD 法。 | | | |



A

B

图2-2 rES-CSP和rEndostatin在裸鼠肝和肝癌组织内的分布比较(A：肝组织；B：肝癌组织)

Fig 2-2 Liver and tumor tissues distribution comparison at 5、30 and 60 min time points after intravenous administration of rES-CSP and rEndostatin(A: liver; B: tumor)

### **2.5** 讨论

由于重组人内皮抑制素注射液给药后在体内分布广泛，对病理部位缺乏特异的亲和力，这将不可避免的产生非特异性毒性。我们以CSP I-plus为导向分子，制备了新型肝靶向人内皮抑素rES-CSP。前期通过体外细胞结合实验和动物体内分布实验分别来验证其是否具有肝靶向性。荧光显微镜观察显示肝靶向人内皮抑素rES-CSP主要分布在肝癌细胞的细胞膜上，细胞质中有少量存在。流式检测发现，融合蛋白在肝癌细胞HepG2和正常肝细胞Chang's中的荧光强度均显著增强，而在肺癌细胞A549中的荧光强度与rEndostatin无明显差异（*P*＞0.05）。

靶向药物研究中一般采用动物体内分布验证靶向性，且衡量靶向药物疗效的指标应是靶向部位的药物浓度，因此我们通过肝内瘤块种植法建立裸鼠原位肝癌移植瘤模型，以尾静脉单次注射给药，用ELISA法对重组人内皮抑素和融合蛋白rES-CSP的体内分布情况进行研究。生理盐水对照组裸鼠心、肝、脾、肺、肾、血、肿瘤组织中均检出有微量的内源性内皮抑素，但含量没有显著差异（*P*﹥0.05），表明裸鼠体内内源性鼠内皮抑素不会干扰ELISA法测定人内皮抑素样品。给药后，普通重组人内皮抑素主要分布在肾、脾组织、血液中。肝靶向肽内皮抑素rES-CSP组与普通内皮抑素

组相比，各脏器内皮抑素浓度均有显著差异（*P*﹤0.05）；各时间点肝脏及肝癌组织内皮抑素浓度rES-CSP组均显著高于普通内皮抑素组（*P*﹤0.01），分别在给药后5分钟和30分钟时达到最大差异，为6.85和4.98倍。60分钟rES-CSP在肝癌组织中的浓度是普通内皮抑素组的4.55倍。结果说明靶向内皮抑素对内皮抑素自然条件下的定向分布产生了影响，可能是由于CSP I-plus具有载体靶向性，能使靶向内皮抑素滞留于靶部位，延长了药物与靶区的接触，提高了肝癌组织对靶向内皮抑素的生物利用度。

上述动物体内分布实验结果显示，在相同摩尔质量的给药剂量下，肝靶向内皮抑素在肝脏及肝癌组织的浓度及滞留时间均显著提高，基于内皮抑素的药理特性，靶区局部药物浓度上的差异可能导致药效的极大差异，从而提高抗HCC疗效，同时肝靶向内皮抑素在心脏、脾脏和肾脏等非靶区的浓度及滞留时间均显著降低，提示在需要大剂量给药治疗时，能提高药物疗效的同时，可能减少药物对非靶器官的毒性，大大增加药物的安全性。

## **第三章 rES-CSP**的体外抗**HCC**作用研究

### **3.1** 前言

内皮抑素作为一种能强烈抑制血管形成的抑制因子，可有效抑制肿瘤细胞的生长和转移，因此成为肿瘤领域的研究热点。但在临床初步应用中疗效尚不肯定，其分子作用机制也尚未完全清楚。研究发现重组人内皮抑素尚可直接作用于肿瘤细胞，发挥直接抑制肿瘤细胞增殖和转移的能力。在AIDS相关卡波氏肉瘤中，内皮抑素直接进入肿瘤细胞内，与

tropomyosin结合，抑制细胞因子介导的肿瘤细胞迁徙和侵袭[24]。内皮抑素也能下调肿瘤细胞表达VEGF，通过减少促血管形成因子的分泌，降低肿瘤细胞的转移能力[25]。内皮抑素可与卵巢癌、结肠癌细胞表面的整合素α5β1结合，从而抑制肿瘤细胞对腹膜壁的黏附，显著诱导了肿瘤细胞的凋亡[21, 23]。同时发现内皮抑素对宫颈癌、肺癌等也具有不同程度的抑制作用[52]。

本研究将高效而特异的肝细胞靶向肽CSP I-plus与重组人内皮抑素基因融合，借助其靶向性增加内皮抑素在肝癌细胞的富集，发挥对肝癌细胞的直接抑制作用。为了检测融合蛋白rES-CSP是否具有抗HCC活性，本实验选用HepG2细胞模型来进行体外药效学检测，通过细胞生长抑制实验、肝癌细胞迁移、流式细胞术以及透射电镜检测肝癌细胞的周期及凋亡试验，以期对rES-CSP的抗HCC作用作一个初步判断；同时拟通过考察rES-CSP对凋亡信号分子表达的影响，来初步探讨其发挥抗HCC作用的分子机制。以期为下一步的动物整体实验建立理论依据。

### **3.2** 实验材料

#### **3.2.1**实验细胞

人肝癌细胞HepG2、人正常肝细胞Chang's和肺癌细胞株A549由本实验室保种。

#### **3.2.2**主要试剂和耗材

恩度（rEndostatin）（ft东先声麦得津生物制药有限公司）、重组融合蛋白rES-CSP由广东省生物活性药物研究重点实验室制备、环子孢子蛋白CSP I-plus (DNEKLRKPKHKKLKQPADG-NH2)（上海強耀生物，纯度达97.41%）、RPMI 1640培养

基（GIBCO）、DMEM高糖培养基（GIBCO）、胎牛血清（Fetal Bovine Serum, GIBCO）、

青/链霉素（Hyclone）、二甲基亚砜（DMSO, Omega）、盐酸盐缓冲液（Phosphate buffered

saline，PBS）（武汉博士德）、10×BindingBuffer 缓冲液（BD 公司）、Alexa Fluor® 647 Annexin V（Biolegend）、细胞培养瓶（Corning）、48孔细胞培养板（Corning）、CellTiter

96 Aqueous One Solution （MTS, Promega）、辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔lg(H+L)

（Beyotime Biotechnology）、Rabbit Anti-GAPDH（博士德）、Rabbit Anti-BCL-2（博士德）、Rabbit Anti -Caspase 8（博士德）、Goat Anti-Rabbit lgG（博士德）、PVDF膜（Millipore）、

BCA蛋白定量试剂盒（Beyotime Biotechnology）、RIPA裂解液（强）( Beyotime Biotechnology)、PMSF（Beyotime Biotechnology）、超敏ECL化学发光试剂盒（Beyotime

Biotechnology）、脱脂奶粉（leagene）、X-光胶片（柯达）、通用显影粉和定影粉（华兴科诺）、1 M Tris-Hcl pH 6.8和1.5 M Tris-Hcl pH 8.8(Beyotime Biotechnology)

#### **3.2.3**主要仪器设备

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 规格与型号 | 产家 |
| CO2 培养箱 | HERAS150 | 德国 HERAS |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olympus |
| 酶标仪 | Model 680 | 美国 BIO-RAD |
| 超净工作台 | SW-CJ-2F | 江苏净化 |
| 台式低温高速离心机 | UNIVERAL 32R | 德国 Hettich |
| 台式常温离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
| 流式细胞仪 | FACS Calibur | 美国 BD |
| 透射电子显微镜 | JEM-100CX | 美国 Beckman |

#### **3.2.4**主要溶液配制

1) PBS溶液（含2 mM EDTA, 0.5%BSA）: 配制好的1×PBS（PH 7.2, 含2 mM EDTA）溶液100 ml，加入0.5 g BSA，搅拌混匀，过滤除菌，于4℃保存备用。

2）4%多聚甲醛：称取多聚甲醛粉末40 g，溶于500 ml PBS中加热至60℃，边加热边搅拌，同时滴加2 M NaOH至清澈透明。自然冷却后再加PBS至1000 ml，最后调PH至7.4-7.6。

3）结晶紫：用冰醋酸溶解过滤，配制成浓度为0.5%结晶紫母液，于室温保存，使用时用

PBS稀释成0.1%的工作液。

4）PI工作液：用PBS将PI粉末溶解至终浓度为2 mg/ml，于4℃下密封避光保存。

5）30%聚丙烯酰胺：称取双丙烯酰胺1 g、丙烯酰胺29 g配制成200 ml的溶液后，用带滤纸的漏斗过滤一次，于棕色瓶避光保存于4℃。

6）10%过硫酸铵：称取过硫酸铵1 g，用水配制成10 ml溶液，分装并储存于-20℃。

7) 5×Tris-甘氨酸电泳液：取Tris 15.15 g，甘氨酸72 g, SDS 5 g，三蒸水定容至1000 ml，混匀。

8) 10×TBS: 称取Tris 24.2 g, Nacl 80 g定容到1 L, Hcl调PH至7.6.1×TBS/T: 10×TBS稀释到1×，每1 L TBS中加入Tween-20 1 ml，混匀。

9)奶粉封闭液：取1.5 g奶粉溶于30 ml TBS/T中，混匀。

10) 5×蛋白上样缓冲液：1.0 mol/L Tris (PH 6.8) 2.5 ml，1 g SDS, 0.05 g溴酚蓝，甘油5 ml，补加双蒸水至10 ml。

11）1×电转缓冲液：取Tris 3 g，甘氨酸14.9 g, SDS 0.5 g溶于适量水中，定容到800 ml，再加入甲醇200 ml定容至1000 ml，混匀。储存于4℃

12) 0.2 M磷酸缓冲液（PB）: 取0.2 M的Na2HPO4溶液81 ml和0.2 M 的NaH2PO4

溶液19 ml混匀，调节PH至7.2-7.4.

13）2.5%戊二醛固定液：取25%戊二醛原液10 ml，加0.2 mol PB液50 ml，再加蒸馏水40 ml混匀，4℃避光保存。

### **3.3** 实验方法

#### **3.3.1**细胞毒性实验

采用MTS评价CSP I-plus、rEndostatin、rES-CSP对肝癌细胞、正常肝细胞以及肺癌细胞的毒性作用。MTS是一类对MTT改良的产品，此试剂被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原成为一种有色的甲臢产物，可直接溶解于培养基中，而死细胞无此功能，用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其吸光度值，可间接反映活细胞数量。实验步骤如下：

##### 1） HepG2、Chang’s、A549细胞培养于5%CO2，37℃饱和湿度的恒温箱中，培养基为含

10%胎牛血清（FBS），100 U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的高糖DMEM/RPMI 1640，将对数生长期的细胞用0.25%胰蛋白酶消化后，制成单细胞悬液，准确计数。

##### 2） 调整细胞浓度为1×10 5 cell/ml，接种于96孔细胞培养板，每孔加100μl细胞悬液。待

细胞贴壁后，弃去培养液，分别加入终浓度为12µM，6µM，1.2µM，0.6µM，0.06µM的CSP I-plus、rEndostatin或rES-CSP细胞培养液，每组3个复孔，阴性对照组为不含药物的完全培养基。

##### 3) 培养24 h和48 h后，每孔加入20μl MTS溶液，继续培养4 h。

##### 4） 取出培养板,酶标仪测定各孔490 nm光吸收值，计算细胞的生长抑制率。抑制率（%）

=（1-实验组平均OD值/对照组平均OD值）×100%，实验重复三次取平均数。

#### **3.3.2**细胞迁移实验

**3.3.2.1细胞划痕**

1）将对数生长期的肝癌细胞HepG2用0.25%的胰蛋白酶消化后，用含10%FBS的完全培养基重悬细胞，取600μl/孔接种到24孔板中。

2）待细胞铺满后，小心吸出培养基，避免碰到底部造成局部空白，用PBS 洗2遍。用

Marker笔在24孔板背后，直尺比着，用中枪头均匀地划两条平行直线横穿过孔。

3）用PBS洗去划下的细胞，分别加入含6μM rEndostatin或rES-CSP的无血清培养基，以无血清培养基作为空白对照。

4）5%CO2, 37℃饱和湿度的恒温箱中培养0、12、24 h，倒置显微镜下拍照，观察细胞的迁移能力。

**3.3.2.2 Transwell实验**

1）将对数生长期的HepG2细胞消化重悬于无血清的DMEM高糖培养基中，调整细胞浓度为2×10 5/ml, Transwell上室每孔接种200μl，5%CO2, 37℃饱和湿度的恒温箱中饥饿

培养3 h。

2）下室每孔加入600μl含10%胎牛血清的完全培养基，上室分别加入6μM rEndostatin或 rES-CSP，尽量避免下层培养基和小室之间产生气泡，继续培养 12 h。3）将Transwell小室取出，用PBS洗两遍。4%多聚甲醛室温固定30 min，继续用PBS洗两遍。

4）用棉签轻轻擦去上室膜上未迁移的细胞，各孔加入500μl 0.1%结晶紫常温染色10 min，清水漂洗干净。

5）倒置显微镜下观察拍照，随机计数5个不重复视野下的细胞数，计算平均值。取其平均值，计算迁移抑制率。

6）拍照后，各上室加入100μl 33%醋酸抽提10 min，将各组抽提液置于96孔板中，酶标仪测定各孔560 nm的吸光度值。实验重复三次。迁移率（%）=（1-实验组穿膜细胞数/对照组穿膜细胞数）×100%。

#### **3.3.3**细胞周期和凋亡实验

**3.3.3.1乙醇固定法检测细胞周期**

##### 1） 体外培养的HepG2 细胞贴壁生长近融合后，分成加入含0（阴性对照组）、6 μM

rEndostatin和6μM rES-CSP，37℃饱和湿度的恒温箱中继续培养24 h和48 h。

2）制备单细胞悬液收集于流式管内，4℃，1500 rpm离心5 min, PBS洗涤2次弃去上清，将细胞轻轻打散，以大约1滴/秒逐滴加入预冷的70%乙醇，-20℃固定过夜。

##### 3） 固定完成后振荡一下，PBS洗涤2次除去乙醇，100μl PBS重悬细胞加入RNaseA 和

PI至终浓度50μg/ml，弹匀后37℃温育10 min。

##### 4） 每管补加400μl PBS，流式细胞仪检测，ModFit软件分析细胞周期。

**3.3.3.2 Annexin-V-FITC凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡**

1）药物处理24 h后，用不含EDTA的胰蛋白酶消化收集各组细胞于流式管中，1500 rpm，

4℃离心5 min。

2）加入预冷的2 ml PBS，离心后去除上清。将细胞重悬于100μl 1×Annexin-V Binding

Buffer，轻轻吹打，混匀细胞。

3）加入5μl Alexa fluor 647 Annexin V试剂混匀，室温避光孵育25 min, 然后加入PI 5μl再避光孵育5 min, 最后加入1×Binding Buffer使总体积为500μl，流式细胞仪检测，分析细胞凋亡比例。

**3.3.3.3透射电镜检测细胞凋亡**

1）将生长旺盛的HepG2细胞消化接种于6孔板内，过夜贴壁后加入终浓度为6μM 的

rES-CSP，以未给药组细胞为对照组。

2）用细胞刮将贴壁的细胞刮下，收集所有悬浮和贴壁细胞，1000 rpm离心10 min弃上清后用预冷的PBS洗两遍，然后沿管壁缓缓加入预冷的2.5%戊二醛，4℃固定2 h。

3）用PBS浸洗后，1%四氧化锇在4℃固定30 min，再用PBS浸洗两次。将细胞用系列梯度酒精（30%、50%、70%、80%、90%、95%和100%）脱水。

4） 用Epon 812树脂包埋，将包埋块用切片机切成超薄切片，并用醋酸双氧铀和柠檬酸铅

染色后在透射电镜下观察细胞超微结构变化。

#### **3.3.4****Western Blot**检测细胞中凋亡蛋白的表达

**3.3.4.1细胞总蛋白提取**

##### 1） 对数生长期HepG2细胞消化后分组（共分5组，每组2个复孔：空白对照组、0.6μM

rEndostatin、6μM rEndostatin和0.6μM rES-CSP、6μM rES-CSP），5%CO2，37℃培养24 h。

##### 2） 用0.1 M PH7.4预冷的PBS轻摇洗涤两次。吸尽PBS后，将培养板置于冰上，加入200

μl 细胞裂解液（含终浓度为 10 mmol/L 的 PMSF）冰上裂解 30 min。3）用刮棒小心将细胞刮至一侧后，转移至离心管中，用4℃离心机以12000 rpm离心10 min，取上清冻存于-20℃备用。

**3.3.4.2蛋白定量（BCA法）**

BCA（Bicinchoninic acid）法蛋白浓度定量试剂盒是在BCA法基础上改进而成。根据二价铜离子在碱性的条件下，可以被蛋白质还原成一价铜离子（biuret reaction），一价铜离子和独特的BCA Solution(含有BCA)相互作用产生敏感的颜色反应。两分子的BCA螯合一价铜离子，形成紫色的反应复合物。该水溶性的复合物在562 nm处显示强烈的吸光性，吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系，因此根据吸光度值可以推算出蛋白浓度。具体实验步骤如下：

##### 1） 取0.8 ml蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准（20 mg BSA）中，充分溶解后配制成

25 mg/ml的蛋白标准溶液。

##### 2） 取适量25 mg/ml蛋白标准，稀释至终浓度为0.5 mg/ml。根据样品数量，按50体积

BCA试剂A加1体积试剂B（50:1）配制适量BCA工作液，充分混匀。

##### 3） 将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20μl加入96孔板的标准品孔中，加标准品稀释液不足到20μl。

##### 4） 加适当体积样品到96孔板的样品孔中，加标准品稀释液到20μl。

##### 5） 各孔加入200μl BCA工作液，37℃放置20-30分钟。测定562 nm波长处的吸光度，根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

**3.3.4.3制胶、电泳、转膜、抗体孵育和显影**

1）15%SDS-PAGE凝胶的配制

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 溶液 | 15%分离胶（10 ml） | 5%浓缩胶（4 ml） |
| 双蒸水 | 2.3 ml | 2.7 ml |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 5.0 ml | 0.67 ml |
| 1.0 M Tris-HCl(PH 6.8) |  | 0.50 ml |
| 1.5M Tris-HCl(PH 8.8) | 2.5 ml |  |
| 10% SDS | 100 μl | 40 μl |
| 10% APS | 100 μl | 40 μl |
| TEMED | 4 μl | 4 μl |

2）蛋白样品前处理：30μg蛋白样品与5×Loading Buffer混合，使得上样总体系为30μl，在沸水中煮沸10 min, 10000 rpm离心10 min。

3）使用进样针给每孔加样，浓缩胶电压为80 V，电泳30 min带到溴酚蓝前沿进入分离

胶后，将电压调整到120 V，电泳60-80 min，待到溴酚蓝电泳到分离胶底部。按照膜的大小和预染Marker的指示条带切割凝胶，剪取合适大小的PVDF膜，用甲醇浸泡5 min，然后SDS-PAGE凝胶以及PVDF膜浸于电转液中10-20 min。

4）转膜按照经典Western三明治负极朝下依次放置海绵、厚滤纸、凝胶、PVDF膜、厚滤纸以及海绵，注意赶走每层中的气泡。带有正点的PVDF膜具有很强的疏水性，注意使用干净的眼科镊和无粉手套，在PVDF膜的角落区域进行夹持操作，尽量不要触碰中央。电转条件为恒压100 V，4℃60 min。

5）封闭：转膜完成后，膜正面朝上，用1×TBST将膜清洗三次，每次5 min，然后将膜浸泡于含有5%脱脂奶粉的1×TBST中，室温封闭1 h。

6）一抗孵育：参照一抗说明书使用一抗稀释液将抗体稀释至适宜的浓度Anti-Bcl-2

（1:250）、Anti-Caspase 8(1:400)、Anti-GAPDH（1:1000），封闭好的PVDF膜用1×TBST轻轻洗去表面的牛奶后，将一抗均匀覆盖在膜的表面，置于4℃冰箱中摇床上孵育过夜。孵育完成后，用1×TBST摇床上清洗三次，每次10 min。

7）二抗孵育：参照二抗说明书使用二抗稀释液将抗体稀释至适宜的浓度（Anti-Rabbit

1: 4000）均匀地覆盖在PVDF膜上，室温下孵育1 h，然后用1×TBST摇床上清洗三次，每次10 min。

8）显影：将溶液A和溶液B等体积均匀混合配制ECL发光液，按照每张膜大约1 ml

用量进行配制。在暗室下，将PVDF膜沥干水后置于塑料盒中，使含蛋白面朝上，均匀滴

加发光液，使得发光液完全覆盖住膜的表面，反应3-5 min后将膜包于保鲜膜中铺平，注意避免保鲜膜产生皱褶并赶走其中的气泡。将准备好的膜放入X-光片夹中，放入胶片。压片和曝光的时间依据实际情况而定，进行显影和定影。

9）凝胶成像分析：将胶片进行扫描，用IPP图像分析软件分析目标带的分子量和累计光密度（IOD）。

#### **3.3.5**统计分析

使用SPSS 13.0软件进行数据处理，实验数据以平均数与标准差（*x**s*）表示。采用单因素方差分析（one-way ANOVA），*P*﹤0.05为差异有统计学意义.

### **3.4** 实验结果

#### **3.4.1****rES-CSP**对肝癌细胞的毒性作用

将CSP I-plus、rEndostatin和rES-CSP稀释成相同的浓度梯度，分别处理HepG2细胞并进行MTS检测，单因素方差分析结果显示各组间比较有统计学差异，rES-CSP对HepG2细胞的增殖有抑制作用，而CSP I-plus、rEndostatin均对肝癌细胞的增殖几乎无影响。不同实验时间和不同试剂类型均会影响HepG2细胞的增殖抑制率，对于同一试剂，不同浓度对抑制率亦有影响。相同浓度下rES-CSP对HepG2细胞的增殖抑制率显著高于CSP I-plus和rEndostatin组，且表现出浓度和时间依赖性。

将rES-CSP稀释成相同的浓度梯度，分别处理Chang's和A549细胞进行MTS检测，单因素方差分析的结果显示各细胞组间比较有统计学差异，rES-CSP对Chang's和A549细胞有抑制作用。与HepG2细胞相比较，在低浓度时，rES-CSP对肝癌细胞的抑制作用明显高于Chang's和A549细胞。在6µM时，HepG2细胞的存活率为46.3±2.31%，Chang's和A549细胞的存活率分别为92.8±2.11%、93.2±2.96%。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 药物浓度（µM） | 24 h  (OD490) | 存活率（%） | 48 h  (OD490) | 存活率（%） | F | P |
| 12 µM | 2.28±0.11 | 100.4±2.71 | 2.43±0.02 | 96.0±1.31 | 177.528 | 0.006 |
| 6 µM | 2.22±0.08 | 97.5±1.86 | 2.44±0.05 | 96.5±0.99 | 14.222 | 0.064 |
| 1.2 µM | 2.35±0.16 | 104.0±3.01 | 2.47±0.11 | 97.8±1.05 | 395.765 | 0.003 |
| 0.6 µM | 2.26±0.14 | 99.6±3.51 | 2.42±0.06 | 95.3±1.21 | 105.985 | 0.009 |
| 0.06 µM | 2.24±0.21 | 98.8±2.89 | 2.39±0.06 | 94.2±1.9 6 | 104.985 | 0.009 |
| F |  | 90.196 |  | 28.000 |  |  |
| P |  | 0.000 |  | 0.001 |  |  |
| 注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（*P*＞0.05），用 LSD 法。 | | | | | | |

表3-1 rES-CSP对肝癌细胞增殖的影响( *x**s*，n=3)

Table 3-1 Survival rates of rES-CSP on HepG2

| 药物浓度（µM） | 24 h  (OD490) | 存活率（%） | 48 h  (OD490) | 存活率（%） | F | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 12 µM | 0.78±0.02 | 25.0±1.25 | 0.39±0.17 | 5.2±0.96 | 323.446 | 0.003 |
| 6 µM | 1.33±0.05 | 52.8±2.31 | 1.20±0.09 | 41.3±2.01 | 521.907 | 0.002 |
| 1.2 µM | 1.92±0.13 | 82.3±3.03 | 1.79±0.15 | 64.6±2.59 | 151.211 | 0.007 |
| 0.6 µM | 2.02±0.08 | 87.5±2.79 | 1.88±0.13 | 71.5±1.88 | 213.16 | 0.005 |
| 0.06 µM | 2.21±0.15 | 96.9±3.15 | 2.38±0.17 | 93.7±1.59 | 4.798 | 0.16 |
| F |  | 470.511 |  | 1553.914 |  |  |
| P |  | 0.000 |  | 0.000 |  |  |
| 注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（P＞0.05），用 LSD 法。 | | | | | | |

表3-2 rEndostatin对肝癌细胞增殖的影响( *x**s*，n=3)

Table 3-2 Survival rates of rEndostatin on HepG2

| 药物浓度（µM） | 24 h  (OD490) | 存活率（%） | 48 h  (OD490) | 存活率（%） | F | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 12 µM | 2.24±0.03 | 98.4±0.58 | 2.38±0.10 | 93.5±1.77 | 40.763 | 0.024 |
| 6 µM | 2.25±0.06 | 99.0±1.78 | 2.41±0.13 | 95.0±2.03 | 94.118 | 0.01 |
| 1.2 µM | 2.25±0.14 | 99.3±2.17 | 2.36±0.07 | 92.8±3.07 | 132.031 | 0.007 |
| 0.6 µM | 2.28±0.11 | 100.4±2.01 | 2.36±0.14 | 94.6±3.31 | 147.059 | 0.007 |
| 0.06 µM | 2.31±0.08 | 102.4±2.86 | 2.41±0.11 | 97.2±3.77 | 784.692 | 0.001 |
| F |  | 48.607 |  | 21.394 |  |  |
| P |  | 0.000 |  | 0.002 |  |  |
| 注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（P＞0.05），用 LSD 法。 | | | | | | |

表3-3 CSP I-plus对肝癌细胞增殖的影响( *x**s*，n=3) Table 3-3 Survival rates of CSP I-plus on HepG2

表3-4 rES-CSP对三种细胞增殖的影响( *x**s*，n=3)

Table 3-4 Survival rates of rES-CSP on HepG2、Chang’s and A549

###### HepG2

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (OD490) | （%） | (OD490) | （%） | (OD490) | （%） |  |
| 12 µM | 0.78±0.02 | 25.0±1.25 | 1.80±0.85 | 56.0±1.78 | 1.29±0.09 | 38.0±1.07 | 3009.13 0 |
| 6 µM | 1.33±0.05 | 46.3±2.31 | 2.89±1.74 | 92.8±2.11 | 2.85±0.18 | 93.2±2.96 | 3147.92 0 |
| 1.2 µM | 1.92±0.13 | 82.3±3.03 | 2.90±0.24 | 96.1±2.56 | 3.33±0.21 | 93.5±2.57 | 742.086 0 |
| 0.6 µM | 2.02±0.08 | 87.5±2.79 | 2.97±0.31 | 98.6±2.01 | 3.36±0.27 | 98.4±3.00 | 551.337 0 |
| 0.06 µM | 2.21±0.15 | 96.9±3.15 | 2.92±0.17 | 102.6±3.03 | 3.41±0.25 | 101.3±2.86 | 70.65 0.003 |
| F |  | 470.511 |  | 1596.689 |  | 3847.699 |  |
| P |  | 0 |  | 0 |  | 0 |  |

药物浓度（µM ）

存活率

Chang's

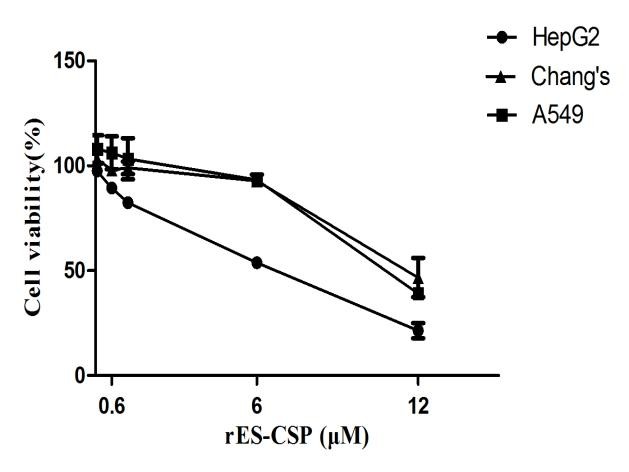
存活率

A549

存活率

F P

注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（*P*＞0.05）,用LSD法。



A

B

C

图3-1 MTS法检测rES-CSP对细胞增殖的抑制作用

（A：肝癌细胞24 h的抑制作用；B：肝癌细胞48 h 的抑制作用；rES-CSP对HepG2、Chang's、A549

三种细胞的抑制作用。）

Fig 3-1 Inhibition of cell proliferation in HepG2, Chang's and A549 cells were assessed by MTS assay.

HepG2 cells were seeded in three duplicates and treated with same concentrations of rES-CSP, rEndostatin or CSP I-plus for 24 h (A) and 48 h (B). HepG2, Chang's and A549 cells were treated with same concentrations of rES-CSP for 24 h (C). Cell viability (%) = mean of the experimental group (OD490) / mean of the control group (OD490)×100

#### **3.4.2****rES-CSP**对肝癌细胞迁移的作用

肝癌细胞划痕后经6μM rEndostatin或rES-CSP的无血清培养基处理，5%CO2, 37℃条件下培养一段时间发现（如图3-2），随着时间的推移，细胞划痕渐渐愈合，但经药物处理的肝癌细胞愈合效果比对照组的要慢，24 h后对照组已重新融合92.5%, rEndostatin组愈合率为47.6%, rES-CSP组愈合率仅为21.5%.48 h后对照组已完全愈合成完整的单细胞层，rEndostatin组愈合率为79.2%, rES-CSP组愈合率仅为47.1%。说明药物处理组与对照组相比迁移力明显下降，差异有统计学意义，*P*﹤0.05，并且rES-CSP对肝癌迁移能力的影响更加明显。

为了更准确的评价rES-CSP对肝癌细胞迁移能力的影响，进行了Transwell小室实验，结果表明：与空白对照组相比，经6μM rEndostatin或rES-CSP处理后的肝癌细胞迁移到下室的数量明显减少，如图3-3所示，rEndostatin和rES-CSP组迁移细胞数与空白对照组相比，迁移抑制率分别为27±1.75%、65.5±2.95%。

A



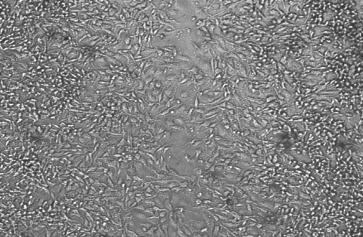
0 h

24 h



48 h





空白对照6μM rEndostatin 6μM rES-CSP



B

图3-2 细胞划痕检测rES-CSP对肝癌细胞的迁移作用（100×）

Fig 3-2 rES-CSP inhibits HepG2 cells migration. (A) Wound healing assay was conducted on HepG2 cells treated with rES-CSP, rEndostatin or the negative control (NC). After 24, 48 h, the migration rate was significantly lower in the cells treated with rES-CSP compared with treated with rEndostatin. (B) Migration rate was expressed as a percentage of the negative control. Results from a representative experiment are shown. Magnification, 100×. Data are presented as the mean±SD, n=3, \**P*<0.05 compared with the control

Group; \*\**P*<0.01 compared with the control group.

A

空白对照6μM rEndostatin 6μM rES-CSP

B



图3-3 Transwell检测rES-CSP对肝癌细胞的迁移作用，×200

Fig 3-3 rES-CSP inhibits HepG2 cells migration. (A) Transwell assay was conducted on HepG2 cells treated with rES-CSP, rEndostatin or the negative control (NC). After 24 h, the migration rate was significantly lower in the cells treated with rES-CSP compared with treated with rEndostatin. (B) Migration rate was expressed as a percentage of the negative control. Results from a representative experiment are shown. Magnification,

×200. Data are presented as the mean±SD, n=3, \**P*<0.05 compared with the control group; \*\**P*<0.01 compared with the control group.

#### **3.4.3****rES-CSP**对肝癌细胞周期分布的影响

为了了解rES-CSP抑制肝癌细胞生长的可能机制，我们分别用6μM的rEndostatin和rES-CSP作用人肝癌细胞HepG2, 24和48 h后PI单标法检测肿瘤细胞周期分布情况。结果显示（见图3-4），rEndostatin作用24 h或48 h后，肝癌细胞的周期分布几乎不受影响，而rES-CSP显著诱导肝癌细胞G2/M期细胞数目增加同时伴随着G0/G1和S期细胞减少。24 h空白对照组、rEndostatin组和rES-CSP组G0/G1期、S期和G2/M期细胞比例分别为(G1 51.63%; S 23.66%; G2 24.71%)、(G1 48.26%; S 11.53%; G2 40.20%)、(G1

50.50%; S 21.92%; G2 27.57%); 48 h空白对照组、rEndostatin组和rES-CSP组G0/G1期、

S期和G2/M期细胞比例分别为（G1 55.38%; S 11.13%; G2 33.49%）、（G1 53.66%; S 11.17%;

G2 35.17%）、（G1 48.26%; S 11.53%; G2 40.20%）。其中rES-CSP组同对照组、rEndostatin组之间具有显著性差异，*P*﹤0.01.

A

400

24 h

Number

160 240

400

Number

**51.63%**

**23.66%**

Dip G0-G1 Dip G2-M

Dip S

Number

200 300

200

**50.50%**

**21.92%**

100

Dip G0-G1 Dip G2-M

Dip S

320

**47.08%**

**22.39%**

80

Dip G0-G1 Dip G2-M

Dip S



**24.71%**

0

100

**27.57%**

0

0

**30.53%**

0 50 100 150 200 2500 50 100 150 200

0 250

30 60 90 120 150

Channels (FL2-A)

Channels (FL2-A)

Channels (FL2-H)

Dip G0-G1 Dip G2-M

400

**55.38**

Dip S

400

**53.66**

Dip G0-G1 Dip G2-M

Dip S

Dip G0-G1 Dip G2-M

Dip S

48 h

200

400



**11.13**

100

**33.49**

100

**11.17**

Number

200 300

Number

200 300

Number

**35.17**

**48.26%**

**11.53%**

**40.20%**

0 40 80 120 160 2000

0

0

Channels (FL2-H)

40 80 120 160 2000

Channels (FL2-H)

50 100 150 200 25

0

Channels (FL2-A)

空白对照组6μM rEndostatin组6μM rES-CSP 组

B



图3-4 流式细胞术检测肝癌细胞周期分布

Fig 3-4 rES-CSP induces cell cycle arrest of HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with 6µM rES-CSP or rEndostatin for 24、48 h and then the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. (B) Proportions of cells in the G0/G1, S and G2/M phases exhibited significant differences between three groups. \*\**P*<0.01

#### **3.4.4****rES-CSP**对肝癌细胞凋亡的影响

用Annexin V-FITC/PI双染细胞，结果发现，6μM rEndostatin处理组的肝癌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率分别为2.20%、3.27%和5.47%；而6μM rES-CSP处理组的肝癌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率分别为4.68%、21.30%和25.98%。其中rEndostatin组同对照组比较不具有统计学差异(*P*＞0.05)，rES-CSP组处理的肝癌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均高于对照组细胞（*P*﹤0.05）。

A

对照 6

μM rEndostatin

6 μM rES-CSP



**0.42**

**0.49**

**1.09**

**3.27**

**2.84**

**21.30**

**98.78**

**0.32**

**93.44**

**2.20**

**71.19**

**4.68**

PI

Annexin V

B



图3-5 流式细胞术检测肝癌细胞的凋亡

Fig 3-5 Effects of native rES-CSP on the apoptosis of HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with 6µM rES -CSP or rEndostatin for 24 h, Annexin V-Alexa Fluor 647/PI staining and flow cytometric analysis of cell death(B). The upper right quadrant of each plot indicates late apoptotic cells. \*\*\**P*<0.001

#### **3.4.5**透射电镜观察细胞的凋亡

为了更加直观地观察rES-CSP对肝癌细胞的作用，我们采用透射电镜方法观察肝癌细胞凋亡过程的超微结构变化。透射电镜下，rES-CSP处理组肝癌细胞具有细胞凋亡的典型特征。凋亡早期：细胞核染色质边集，染色质发生固缩，电子密度增强，核形不规整，核膜表面凹凸不平，核仁凝固，细胞体积变小，细胞浆浓缩，线粒体数目轻度增加和轻度肿胀，细胞质内可见空泡增多（见图3-6B）。凋亡中晚期：可见细胞膜出芽，凋亡小体形成，核碎裂，核固缩，胞核染色质边集、成碎块状，核膜消失，形成凋亡小体，内含有退变的细胞器（见图3-6C），其中rES-CSP处理后，肝癌细胞多出现中晚期凋亡。

C



A



B



C

图3-6 透射电镜观察肝癌细胞凋亡（×6000）

（A：正常细胞；B：早期凋亡细胞；C：晚期凋亡细胞）

Fig 3-6 Electron Microscopic Observation on Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. Magnification, ×6000.

(A) the ultrastructure of normal HepG2 cells; (B) early apoptotic changes of rES-CSP-treated HepG2 cells;

(C) terminal apoptotic changes of rES-CSP-treated HepG2 cells

#### **3.4.6****rES-CSP**对**HepG2**刺激后**Bcl-2**、**Caspase 8**表达的影响

药物作用24 h后收集细胞，裂解提取各组细胞中总蛋白组分，其中凋亡抑制基因Bcl-2编码的蛋白质产物和死亡受体激活途径中的关键起始者Caspase 8在细胞凋亡过程中发挥着重要的作用。为了初步探讨rES-CSP诱导HepG2细胞凋亡的分子机制，我们利用Western

blot分析rES-CSP作用HepG2细胞后Bcl-2和Caspase 8蛋白的表达变化。如图3-7所示，

rEndostatin处理组对Bcl-2和Caspase 8这两种蛋白的表达几乎不影响，而rES-CSP可显著降低Bcl-2蛋白表达水平，同时可能上调Caspase 8蛋白的表达。

A B

低ES高ES低rES-CSP高rES-CSP对照组高ES低ES高rES-CSP低rES-CSP对照组

GAPDH

Bcl-2

GAPDH

Caspase 8



C

D

图 3-7 Western blot检测凋亡蛋白的表达变化（A: Bcl-2蛋白Western blot条带，C: IPP软件分析后Bcl-2

与GAPDH IOD比值百分数；B: Caspase 8蛋白Western blot条带，C: IPP软件分析后Caspase 8与GAPDH

IOD比值百分数；）

Fig 3-7 Changes in the expression of apoptosis-related proteins was analyzed by Western blotting assay.

Optical densities of the Bcl-2 and Caspase 8 proteins were analyzed using IPP software.

### **3.5** 讨论

近年来，内皮抑素的直接抗肿瘤作用已经有了初步报道。①内皮抑素在消化道恶性肿瘤方面的研究：何本夫等[32]研究，内皮抑素能抑制食管癌细胞Eca-109和人脐静脉内皮细胞HUVEC的增殖，并有效抑制食管癌移植瘤的生长；体外研究证实[33]，内皮抑素可抑制人胃癌NCI-N87细胞增殖和侵袭，诱导细胞凋亡，其机制可能与内皮抑素导致细胞中Snail表达下降、E-cadherin表达增强有关。Dkhissi等[21]揭示了Endostatin在体外直接抑制鼠C51和人HT29结肠癌细胞的生长，并可诱导这些细胞的凋亡。②内皮抑素在乳腺肿瘤肿瘤方面的研究：申维喜等[22]研究发现，恩度、紫杉醇均可诱导Her-2过表达是乳腺癌细胞凋亡，且成剂量依赖关系，二者联合使用凋亡作用增强。③内皮抑素在妇科恶性肿瘤方面的研究：内皮抑素可与卵巢癌细胞表面的整合素α5β1结合，从而抑制卵巢癌细胞对腹膜壁的黏附[23]。这提示Endostatin不仅直接对内皮细胞有抑制作用，对肿瘤细胞同样存在直接抑制作用。

肝癌作为我国主要癌症死因之一，其发病率呈逐年上升趋势，而目前各种治疗肝癌的手段效果并不佳，且近几年来都未取得明显的进步。因此进一步对肝癌进行研究，寻找治疗肝癌新的方法和药物，也就显得很有意义。目前重组人内皮抑素直接抑制肝癌的研究，在国内外已有相关的报道，但发现作用并不明显[53, 54]。研究显示疟原虫子孢子表面均匀覆盖的一层表被蛋白-环子孢子蛋白（CSP）的N末端保守Ⅰ区是子孢子吸附与入侵肝细胞的关键[54]。我们期望借助CSP I-plus靶向性增加内皮抑素在肝癌细胞的富集，增强对肝癌细胞的直接抑制作用。

体外细胞活性试验是进行体内抑瘤实验的基础和依据，同时也是检验蛋白药物活性的重要指标。本章体外活性研究采用肝癌细胞增殖实验、迁移实验来验证rES-CSP对人肝癌细胞增殖和迁移的影响。通过流式细胞术和透射电镜观察rES-CSP对肝癌细胞周期以及凋亡的影响发现，rES-CSP显著诱导肝癌细胞G2/M期细胞数目增加，而G0/G1和S期细胞减少，同时还可诱使细胞进入中晚期凋亡。

有研究显示，Bcl-2家族中，以凋亡基因Bcl-2在癌组织中表达的阳性率明显高于癌旁组织，Bcl-2家族蛋白在HBV感染的肝癌组织中过量表达，参与肝细胞的凋亡调控，与肝癌的发生和发展有关[55]。而Caspase 8作为哺乳动物细胞中程序性死亡的起始因子，在死亡受体（Fas、DR4和DR5等）介导的细胞凋亡途径中起关键性地位，几乎能激活所有凋亡级联反应下游的Caspase而诱导凋亡[56, 57]。在本研究中，我们通过Western blot方法初步探讨了rES-CSP诱导肝癌细胞凋亡过程中Bcl-2和Caspase 8的表达变化，发现rES-CSP可显著降低胞浆中Bcl-2的表达，而可能上调Caspase 8的表达。这说明rES-CSP可能通过内源性的激活途径和受体介导的凋亡途径来诱导肝癌细胞的凋亡，这有待我们进一步验证。

## **第四章 rES-CSP**的体内抗**HCC**作用研究

### **4.1** 前言

我们在第一章已成功构建裸鼠原位肝癌移植瘤模型并验证肝靶向人内皮抑素的肝靶向性。同时上一章的体外实验表明，rES-CSP具有抑制肝癌细胞增殖的能力，那么rES-CSP在体内是否也具有抗肝癌的功能。本章利用裸鼠肝癌原位移植瘤模型，通过对比重组人内皮抑素、肝靶向人内皮抑素和空白对照组肝脏病理学指针，从动物整体水平评价肝靶向肽修饰的内皮抑素的抗HCC效果。在此基础上采用免疫组化技术检测肝癌组织中CD31蛋白表达水平变化，初步探讨肝靶向内皮抑素对肝癌组织中新生血管生成的影响。

### **4.2** 实验材料

#### **4.2.1**细胞株

人肝癌细胞HepG2由本实验传代保存。

#### **4.2.2**实验动物

SPF级雌性Balb/c裸鼠，4-6周龄，体重18-22 g，购自广东省医学实验动物中心，饲养在SPF条件下的超净层流架中，灭菌处理的水和饲料供动物自由摄取，严格无菌操作。

#### **4.2.3**主要试剂和耗材

恩度（rEndostatin）（ft东先声麦得津生物制药有限公司）、重组融合蛋白rES-CSP由广东省生物活性药物研究重点实验室制备、DMEM高糖培养基（GIBCO）、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, GIBCO)、青/链霉素（Hyclone）、磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline, PBS）（武汉博士德）、Rabbit Anti-CD31 antibody（ab32457, Abcam）、辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔lgG(H+L)（Beyotime Biotechnology）、Goat Anti-Rabbit

lgG（博士德）、苏木素（迈新）、封片剂（迈新）、多聚赖氨酸防脱片（世泰）、30% H2O2

（科龙）、二甲苯（天津百世化工）、无水乙醇（天津百世化工）

#### **4.2.4**主要仪器设备

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 规格与型号 | 产地 |
| CO2 培养箱 | HERAS150 | 德国 HERAS |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olympus |
| 超净工作台 | SW-CJ-2F | 江苏净化 |
| 台式常温离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
| 组织脱水机 | 日本樱花（SAKURA） | Tissue-Tek |
| 组织包埋机 | 德国 Leica | EG1160 |
| 切片机 | 德国 Leica | RM2145 |
| 摊片烤片机 | 孝感宏业医用仪器有限公司 | CS-VI |

#### **4.2.5**主要溶液配制

##### 1） 0.01 M PH6.0柠檬酸-柠檬酸盐修复液：称取柠檬酸0.4 g、柠檬酸三钠3 g定容至

1 L单蒸水，最后调PH至6.0。

##### 2） 3%过氧化氢液：量取25 ml的30%H2O2溶液稀释到225 ml的PBS溶液中。

3）苏木素-伊红（HE）染色：

苏木素配方（hematoxylin）: A: 苏木素1 g加无水乙醇10 ml完全溶解。B：硫酸铬钾20 g蒸馏水加温溶解。AB液混合完全后，继续加温，煮沸后退火，冷却过滤后隔天使用。

伊红配方（Eosin）: 伊红0.5-1 g，用95%酒精100 ml 完全溶解后皆可使用。

### **4.3** 实验方法

#### **4.3.1**实验动物分组及给药

##### 1） 裸鼠原位肝癌模型的建立（同2.3.2.1）

##### 2） 30只模型裸鼠随机分为3组：每组10只，建模1周后尾静脉隔日给药，连续给药

30天。

空白对照组：尾静脉注射生理盐水100µl。

重组人血管内皮抑素组：尾静脉注射rEndostatin溶液100µl（2.5 mg/ml）。融合蛋白组：尾静脉注射rES-CSP溶液100µl（3 mg/ml）。

#### **4.3.2**裸鼠体内抑瘤实验

末次给药后各鼠称重，断颈处死裸鼠，快速剥离肝组织上的瘤块，秤瘤重，并按下式计算抑瘤率（%）：抑瘤率（%）=（1-给药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重）

×100%，用卡尺测量移植瘤的最大长径（a）和横径（b）按公式计算瘤体积（V）=ab2/2。肉眼观察各组肺组织表面有不同程度的斑片状出血，外观呈现暗红色，有轻微的水肿。其他组织器官均未发现实质性病变。

#### **4.3.3**组织取材及病理切片制作

制备肝癌组织、心、肝、脾、肺、肾等组织的常规病理切片，通过苏木素-伊红（HE）染色，观察各组药物治疗后瘤块内肿瘤细胞的生长状况，以及对体内主要脏器的毒性作用等。

1）固定：将新鲜的组织放包埋盒中于4%多聚甲醛固定液固定过夜

2）脱水与透明：采用全自动脱水机按照以下程序进行脱水：75%乙醇(30 min)、80%乙醇(30 min)、85%乙醇(30 min)、90%乙醇(30 min)、95%乙醇(30 min)、100%乙醇(1 h)、二甲苯Ⅰ液(1 h)、二甲苯Ⅱ液(1 h)，最后浸蜡。

3）包埋：预先在自动包埋机熔化高熔点蜡，并保持其熔化状态，将浸蜡后的组织调整到切片需要的状态放入包埋盒，注入高熔点蜡并将包埋盒平放在包埋盒上，以便标记蜡块，再置于冰上进行冷却凝固，最后将包埋盒去掉收好。

4）切片：先将蜡块修片至需要的组织截面后预冷半小时以上，并将展片池的水温调节为42℃，然后将切片厚度调节为4μm开始切片。将切片放入展片池进行展片以防止组织折叠，展片时间要严格控制，因为时间稍长就会破坏组织结构，对于难展的切片可辅以25%乙醇。展片完成后用预先涂有APES的载玻片捞取组织，标记好后置于60℃烘箱4小时或者37℃烘箱过夜烤干后于4℃长期保存。

#### **4.3.4****HE**染色

##### 1） 取出切片脱蜡至水：放入二甲苯Ⅰ液20 min、二甲苯Ⅱ液20 min、100%乙醇Ⅰ液

5 min、100%乙醇Ⅱ液5 min、95%乙醇5 min、90%乙醇5 min、80%乙醇5 min、

70%乙醇5 min、50%乙醇5 min、三蒸水中水化5 min；

##### 2） 苏木精染液染色5～15 min；

3）洗去玻片上多余染液，0.5～1%盐酸酒精（70%酒精配制）分化片刻。可在显微镜下观察，大约数10 s可见细胞核与染色质较清晰即可；

4）用自来水冲洗约15～30 min，也可放入碳酸锂饱和液中进行碱化或蓝化；

5）细胞核呈现蓝色后，以蒸馏水冲洗；

6）用0.1～0.5%伊红染色5 min左右；

7）梯度酒精脱水：顺序依次是70% 5 min、85% 5 min、95% 3 min、100% 5 min；

8）二甲苯透明（二次），共约10 min；

9）封片：待组织切片周围的二甲苯挥发后，即可滴加适量中性树胶，加盖玻片封片即可，注意封片前切勿让组织干涸。

#### **4.3.5**免疫组化

##### 1） 取出石蜡切片，室温复温10 min，42℃烤片过夜；

##### 2） 切片脱蜡至水：同上

3）抗原修复：将切片放入柠檬酸缓冲液中，微波炉中高火煮沸后，以中火继续加热

10 min，冷却后以PBS洗涤5 min×3次；

4）3%过氧化氢液提前置于37℃预热，将玻片放入其中避光浸泡15 min, PBS洗涤5 min×3次；

5）擦干组织周围的PBS，用免疫组化笔在组织周围画圈，加ft羊血清封闭液37℃，30 min；

6）取出后，擦干组织周围的血清封闭液，加Rabbit Anti-CD31 antibody（1:50稀释），

4℃孵育过夜；

7）取出后，室温复温20 min, PBS洗涤5 min×3次，擦干，加HRP-ft羊抗兔lg

（H+L）(1:50稀释)，37℃孵育60 min；

8）PBS洗涤5 min×3次，擦干，滴加DAB显色液，在显微镜下观察用单蒸水终止反应；

9）苏木素轻微复染，0.1%盐酸酒精分化，PBS冲洗返蓝。

10）封片：梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察并拍照。

### **4.4** 实验结果

#### **4.4.1****rES-CSP**对裸鼠肝癌原位移植瘤的抑制作用

根据测定的动物体重的变化对药物毒性进行评价，即末体重/初体重≥0.8时为无毒性反应，末体重/初体重＜0.8时为有毒性反应。结果表明，各组间的初体重/末体重无显著性差异（*P*＞0.05），且各实验组末体重/初体重值均大于0.8。

实验结果显示，rES-CSP组与重组人血管内皮抑素组、对照组相比，瘤重和瘤体积均有显著性差异（*P*＜0.05, 表4-1），结果表明rES-CSP能显著抑制人肝癌裸鼠原位移植瘤的生长，重组人内皮抑素对肝癌的生长抑制作用不明显；rES-CSP 和

rEndostatin组的人肝癌裸鼠荷瘤的抑瘤率为29.6±4.39 %和5.30±1.23 %。



对照组rEndostatin组rES-CSP 组

图4-1 药物对人肝癌裸鼠原位移植瘤的影响

Fig 4-1 Result of nude mice orthotopic transplantation tumor in human hepatocellular carcinoma

表4-1 药物对人肝癌裸鼠原位移植瘤的影响（*x**s* ）

Table 4-1 The effect of drug to the tumor volue and tumor weight \**P*＜0.05 vs 实验对照组

| 组别 | 例数 | 初体重/末体重 | 瘤重（g） | 瘤体积（mm3） | 抑瘤率（%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验对照组 | 9 | 1.16±0.03 | 0.19±0.06 | 216.34±102.17 |  |
| rEndostatin 组 | 9 | 1.14±0.05 | 0.18±0.1 0 | 208.19±113.17 | 5.30 |
| （15mg/kg）  rES-CSP 组 | 9 | 1.10±0.07 | 0.09±0.03\* | 160.73±43.82 \* | 29.6 |
| （15mg/kg） |  |  |  |  |  |

注：析因设计，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性（*P*＞0.05），用LSD法。

#### **4.4.2****HE**染色观察组织的病理变化

如图4-7所示，瘤源中肝脏正常组织结构消失，部分肝小叶被结节状的肿瘤组织取代（尤其是靠近肝包膜的肝小叶），周围的肝小叶受压质地变实。肝癌细胞呈浸润性生长，形态大小不一，呈现圆形、椭圆形及不规则形，细胞界限模糊，癌细胞较为松散，癌细胞的核仁较大，染色质深染，胞浆所占比例小，可见核分裂，癌组织血窦丰富。裸鼠的心脏、肝脏（未浸润肿瘤组织部位）、脾脏、肾脏等重要脏器均未见明显病变或炎症细胞浸润（见图4-2、4-3、4-4、4-6），而肺病理切片观察未见典型的肺转移结节，但肺泡间隔增厚，肺泡壁和细支气管壁有较多炎性细胞浸润，显示出较重的间质性肺炎病变，肺泡壁破坏明显（见图4-5）。

实验对照组肝癌正常组织结构消失，癌细胞的形态差异较大，有椭圆形、圆形及不规则形等多种形态，细胞的大小差异大，核大，深染，病理性核分裂象多见，胞浆部分少，癌组织血窦丰富。rES-CSP组同实验对照组相比（见图4-8），癌组织基本结构和癌细胞形态未发现明显变化，所不同之处是rES-CSP组癌组织多发生坏死，间质血管少于对照组，癌细胞核分裂相对减少，可见有大量白细胞和淋巴细胞浸润，表明rES-CSP组对癌细胞生长有一定的抑制作用。



A



B

图4-2 融合蛋白rES-CSP治疗组裸鼠心脏组织HE染色图（A为HE×100，显示肌纤维横纹清楚，无变性、坏死等改变；B为HE×400，显示心肌细胞形态正常，间质无炎性浸润。）

Fig 4-2 HE staining pictures of heart tissue after rES-CSP treated (A: HE×100, B: HE×400 )



A



B

图4-3 融合蛋白rES-CSP治疗组裸鼠的肝脏组织(未浸润肿瘤组织部分) HE染色图（A为HE×100，显示肝小叶结构完整，肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列；B为HE×400，显示肝细胞核大而圆，胞浆丰富，肝窦较清晰。）

Fig 4-3 HE staining pictures of liver tissue after rES-CSP treated (A: HE×100, B: HE×400 )



A



B

图4-4 融合蛋白rES-CSP治疗组裸鼠脾脏组织HE染色图（A为HE×100，显示脾结节形态完整，轮廓清晰可见；B为HE×400，显示脾实质内红髓分布在白髓之间，可见泡沫状的巨噬细胞。） Fig 4-4 HE staining pictures of spleen tissue after rES-CSP treated (A: HE×100, B: HE×400 )



A



B

图4-5裸鼠肺组织HE染色图(A为HE×100，显示肺泡间隔增厚，有较重的间质性肺炎病变，肺泡壁破坏明显；B为HE×400，肺泡壁和细支气管壁有较多炎性细胞浸润，肺泡腔内有浆液性渗出。) Fig 4-5 HE staining pictures of lung tissue after 0.9%NaCl treated (A: HE×100, B: HE×400 )



A



B

图4-6 融合蛋白rES-CSP治疗组裸鼠肾脏组织HE染色图（A为HE×100，B为HE×400；显示肾单位结构完整，肾小管管腔呈圆形，上皮细胞轮廓清晰、无肿胀。）

Fig 4-6 HE staining pictures of kidney tissue after rES-CSP treated (A: HE×100, B: HE×400 )



A



B

图4-7 裸鼠的肝癌组织与正常肝组织交界部位(A为HE×100，显示癌细胞生长活跃，细胞密度增大，周围的肝小叶受肿瘤组织压迫；B为HE×400，显示癌细胞较正常肝细胞的核仁增大，染色质深染。)

Fig 4-7 HE staining pictures of the junction site between hepatocellular carcinoma tissue and normal liver (A: HE×100, B: HE×400 )



A1



A2



A3



B1



B2



B3

图4-8 各组移植瘤裸鼠肝癌组织的坏死程度(箭头表示坏死部位，显示癌组织中心出现不同程度的坏死。1: 对照组，2：rEndostatin组，3: rES-CSP组；A为HE×100，B为HE×400。)

Fig 4-8 Necrosis changes in the transplantation tumor bearing mice liver (A: HE×100, B: HE×400 )

#### **4.4.3****rES-CSP**对裸鼠肝癌原位移植瘤血管密度的抑制作用

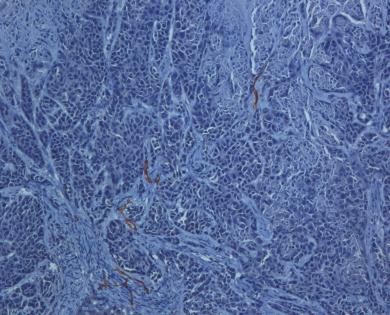
为进一步证实融合蛋白裸鼠体内抗新生血管形成和抗肿瘤活性，对生理盐水对照组、rEndostatin组和rES-CSP组肿瘤组织进行CD31免疫组化染色，结果显示（见图4-6和图4-7），肿瘤组织内血管多数分布于肿瘤组织边缘，周围正常肝小叶中几乎无新生血管，且与对照组相比，rEndostatin组和rES-CSP组肿瘤组织微血管密度均有不同程度的减少，两组间差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。



A



B



C

图4-6 肝癌组织CD31免疫组化染色(A: 对照组，B：rEndostatin组，C: rES-CSP组，×100) Fig 4.6 CD31 immunohistochemical staining in tissues of hepatoma



图4.7 MVD计数统计

Fig 4.7 The result of MVD. n=6,

*X**s*, \**P*<0.05 compared with the control group; \*\**P*<0.01

Compared with the control group.

### **4.5** 讨论

前一章中，我们以HepG2细胞为模型，比较了肝靶向内皮抑素rES-CSP与普通重组人内皮抑素rEndostatin的体外药效，结果表明rES-CSP较rEndostatin对肝癌细胞的增殖、迁移、周期及凋亡具有更强的抑制作用，并可促进凋亡蛋白Caspase 8的表达，下调凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达来促进肝癌细胞的凋亡。本章中我们以裸鼠HepG2肝癌原位移植瘤为模型，从动物水平评价肝靶向内皮抑素的抗HCC效果并与普通内皮抑素进行比较。根据测定的动物体重的变化对药物毒性进行评价，结果表明各组间的初体重/末体重无显著性差异（*P*＞0.05），且各实验组末体重/初体重值均大于0.8，证实表达的肝靶向内皮抑素无明显毒性反应。通过测定裸鼠的终末瘤重及体积，结果显示rES-CSP组抑瘤效果明显优于rEndostatin组和生理盐水组，瘤重及体积相比差别具有显著统计学差异（*P*＜0.05）。病理组织切片观察发现rES-CSP组癌组织多发生坏死，间质血管少于对照组，癌细胞核分裂相对减少，可见有大量炎性细胞浸润，表明rES-CSP组对癌细胞生长有一定的抑制作用。同时肺组织部分出现水肿，表面有散在的出血性斑块，表现出不同程度的间质性肺炎症状，但未见典型的肺转移结节。从

CD31免疫组织化学染色结果检测肝癌组织中微血管表达结果来看，rEndostatin组和

rES-CSP 组肿瘤组织微血管密度均有不同程度的减少，两组间差异具有统计学意义

（*P*＜0.05）。

实验中采用瘤块种植法成功建立了裸鼠HepG2肝癌原位移植瘤模型，该模型比裸鼠皮下移植瘤模型能更好地模拟人肝癌的解剖学特征，并且该方法成瘤周期短，成瘤率高，动物死亡率低，证明了该方法的可行性。然而该模型对肿瘤的观察需要再次剖腹探查，会对动物造成一定损伤，存在不足，如何完善这一模型还需进一步探讨和实践。

# 全文总结

本论文分别从体外和体内两部分对肝靶向肽CSP I-plus修饰的重组人内皮抑素对肝癌细胞的抑制作用展开研究。首先成功构建裸鼠肝癌原位移植瘤模型，ELISA检测在不同时间点rES-CSP和rEndostatin 在动物体内的分布情况，验证前期rES-CSP具有肝靶向性的结果。在此基础上，通过MTS法检测rES-CSP、rEndostatin和CSP I-plus对肝癌细胞抑制作用的强弱，同时比较rES-CSP对不同细胞（包括肝癌细胞、正常肝细胞和肺癌细胞）的抑制作用。利用细胞迁移试验，比较rES-CSP和rEndostatin对肝癌细胞迁移能力的抑制作用。进一步通过流式细胞术检测rES-CSP对肝癌细胞周期及凋亡的影响，采用透射电镜更加直观地展现rES-CSP诱导肝癌细胞凋亡的超微结构改变。Western blot检测两种凋亡相关蛋白Bcl-2和Caspase 8的表达变化，以初步探讨rES-CSP诱导肝癌细胞凋亡的分子机制。在体外实验的基础上，利用裸鼠肝癌原位移植瘤模型，观察rES-CSP诱导肝癌组织病理结构的改变以及对原位移植瘤生长的抑制作用。最后通过免疫组化的方法，观察肿瘤组织中微血管密度的表达改变。

**所得结果简述如下：**

1. 裸鼠体内分布实验证实rES-CSP对肝脏的靶向性增强，从而提高在肝癌组织的富集浓度。

2. 体外抗HCC活性实验证实肝靶向人内皮抑素rES-CSP较普通重组人内皮抑素具有更强的抗HCC效果，主要可能通过抑制细胞的增殖以及诱导凋亡来发挥作用；并且可能通过同时激活细胞内外两种途径来诱导凋亡。

3. 肝癌原位移植瘤裸鼠模型证实rES-CSP能够显著抑制原位肝癌组织的生长，作用效果明显强于普通重组人内皮抑素，并且抑制肿瘤血管的生成。

# 研究展望

肝细胞性肝癌的发生是一个多因素多阶段的复杂过程，迄今没有有效的根治办法。寻求新的治疗方法和治疗新靶标是目前肝细胞性肝癌治疗的迫切需求。内皮抑制素（endostatin），作为一种内源性血管形成抑制因子，可直接作用于肿瘤细胞而达到抗肿瘤作用的研究也已有了初步报道。目前在临床上作为抗HCC药物因无组织和器官选择性，疗效不够理想，因此开展内皮抑素靶向治疗HCC的药物研究意义重大。

本论文通过对肝细胞靶向肽CSP I-plus修饰地重组人内皮抑素的抗HepG2肝癌细胞的生物学活性进行研究，表明其可利用CSP I-plus高效特异的肝靶向性将重组人内皮抑制素导向肝脏，增加肝癌组织的富集浓度，提高药物疗效、减少用药量，为肝癌患者的治疗提供一种新型、有效的治疗手段，为肝癌靶向治疗提供新的科学依据与药物开发思路。

然而，从基础到临床应用仍有不少问题有待解决：⑴实验用HepG2细胞和裸鼠原位移植瘤模型作为本实验抗HCC药效评价系统，但因各自存在的局限性对实验的结果存在着一定的影响。人体环境十分复杂，与荷原位移植瘤裸鼠的体内环境差别较大，靶向人内皮抑素rES-CSP在人体是否发挥其抗HCC作用尚需进一步验证。⑵该融合蛋白保存剂型、临床使用剂型以及药代动力学等也有待解决。⑶本实验主要基于细胞株和动物实验水平，初步探讨了靶向内皮抑素rES-CSP体内外抗HCC效果，还有很多关于作用机制和动物、人体的安全性评价等研究工作要做。

参考文献

[[1] Iliescu L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Iliescu%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411) [Mindrut E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mindrut%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411), [Grasu M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grasu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411) [Orban C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Orban%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411), [Tanase A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tanase%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411), [Toma L.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Toma%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24742411) Management of hepatocellular carcinoma -- experience of a single center[J]. [Chirurgia (Bucur).](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24742411/) 2014; 109(2): 204-207.

[[2] Cucchetti A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cucchetti%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23864773) [Piscaglia F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Piscaglia%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23864773) [Cescon M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cescon%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23864773), [Ercolani G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ercolani%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23864773), [Pinna AD.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pinna%20AD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23864773) Systematic review of surgical resection vs radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma[J][. World J Gastroenterol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864773/) 2013; 19(26): 4106-4118.

[[3] Chen JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21144900) [Zhang SW.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20SW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21144900) Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. [Semin Cancer Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144900) 2011; 21(1): 59-69.

[[4] Chen WQ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20WQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23489585) [Zheng RS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zheng%20RS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23489585) [Zhang SW.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20SW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23489585) Liver cancer incidence and mortality in China, 2009[J]. [Chin J Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489585) 2013; 32(4): 162-169.

[5] Varo Perez E, Castroagudin JF. The future of liver transplantation[J]. Trannsplant Proc. 2010; 42(2): 613-616.

[[6] Andreou A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Andreou%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22948836) [Vauthey JN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vauthey%20JN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22948836), [Cherqui D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cherqui%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22948836), et al. Improved long-term survival after major resection for hepatocellular carcinoma: a multicenter analysis based on a new definition of major hepatectomy[J]. [J Gastrointest Surg.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948836) 2013; 17(1): 66-77.

[[7] Cho S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cho%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20403046), [Lee JH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20JH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20403046) [Cho SB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cho%20SB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20403046), et al. Epigenetic methylation and expression of caspase 8 and survivin in hepatocellular carcinoma. [Pathol Int.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403046) 2010; 60(3): 203-211.

[[8] Lu Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lu%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21669575) [Zhang BY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20BY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21669575) [Jia ZX,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jia%20ZX%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21669575) et al. Hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis and caspase-8 and Bcl-2 expression induced by injectable seed extract of Coix lacryma-jobi. [Hepatobiliary Pancreat Dis Int.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669575) 2011; 10(3): 303-307.

[[9] Grabinski N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grabinski%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23167739), [Ewald F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ewald%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23167739) [Hofmann BT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hofmann%20BT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23167739), et al. Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. [Mol Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167739) 2012; 11: 85.

[[10] Zhou Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhou%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21992728), [Lui VW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lui%20VW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21992728) [Yeo W.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yeo%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21992728) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. [Future Oncol[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992728) 2011; 7(10): 1149-1167.

[[11] Elsharkawy AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Elsharkawy%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17661407) [Mann DA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mann%20DA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17661407) Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-

Fibrosis-cancer axis[J]. [Hepatology.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nuclear%2Bfactor-kappaB%2Band%2Bthe%2Bhepatic%2Binflammation-fibrosis-cancer%2Baxis) 2007; 46(2):590-597.

[[12] Calvisi DF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Calvisi%20DF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23393659) [Frau M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Frau%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23393659) [Tomasi ML.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tomasi%20ML%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23393659) Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: novel insights from interspecies comparison[J]. [Biochim Biophys Acta.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393659) 2012; 1826(1): 215-237.

[13] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis antitumor growth[J]. Cell. 1997; 88(2): 277-285.

[[14] SertiéAL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Serti%C3%A9%20AL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10942434) [Sossi V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sossi%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10942434) [Camargo AA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Camargo%20AA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10942434), et al. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome)[J]. [Hum Mol Genet.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=collagen%2B%2Ccontaining%2Ban%2Bendogenous%2Binhibitor%2Bof%2Bangiogenesis%2Band%2Btumor%2Bgrowth%2Cplay%2Ba%2Bcritical%2Brole%2Bin%2Bthe%2Bmainta) 2000; 9(13): 2051-2058.

[15] Felbor U, Dreier L, Bryant RA, et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII [J]. EMB0 J. 2000; 19(6): 1187-1194.

[16] Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 A resolution[J]. EMBO J. 1998; 17: 1656-1664.

[17] Sasaki T, Fukai N, Mann K, et al. Structure, function and tissue forms of theC-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin[J]. EMBO J. 1998; 17: 4249-4256.

[18] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med. 1971; 285(21): 1182-1186.

[19] 何本夫, 张罗生, 罗荣城. 重组人血管内皮抑制素对食管癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 临床肿瘤学杂志. 2010; 15: 605-607.

[20] 姜睿, 赵春明, 宋美娟, 等. 恩度对胃癌细胞的增殖抑制效应及机制探讨[J]. ft东医学. 2011; 51: 19-21.

[[21] Dkhissi F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dkhissi%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12869217) [Lu H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12869217) [Soria C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Soria%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12869217), et al. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells[J]. [Hum Gene Ther.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=endostatin%2Bexhibits%2Ba%2Bdirect%2Bantitumor%2Beffect%2Bin%2Baddtion%2Bits%2Bantiangiogenic) 2003, 14(10): 997-1008.

[22] 申维喜, 赵妍, 闫玉等. 恩度联合紫杉醇对Her-2 过表达乳腺癌细胞的诱导凋亡研究[J]. 肿瘤学杂志. 2012; 18: 844-847.

[[23] Yokoyama Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yokoyama%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18006826), [Sedgewick G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sedgewick%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18006826) [Ramakrishnan S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ramakrishnan%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18006826). Endostatin binding to ovarian cancer

Cells inhibits peritoneal attachment and dissemination[J]. [Cancer Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006826) 2007; 67(22): 10813-10822.

[[24] Mallery SR,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mallery%20SR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12682914) [Morse MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Morse%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12682914) [Wilson RF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wilson%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12682914), et al. AIDS-related Kaposi's sarcoma cells rapidly internalize endostatin, which co-localizes to tropomysin microfilaments and inhibits cytokine-mediated migration and invasion[J]. [J Cell Biochem](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=aids-related%2Bkaposi%27s%2Bsarcoma%2Bcells%2Brapidly%2Binternalize%2Bendostatin%2C%2Bwhich%2Bcolocalizes%2Bto). 2003; 89(1): 133-143.

[[25] Hajitou A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hajitou%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12354694) [Grignet C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grignet%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12354694) [Devy L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Devy%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12354694) et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells[J]. [FASEB J.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Bantitumoral%2Beffect%2Bof%2Bendostatin%2Band%2Bangiostatin%2Bis%2Bassociated%2Bwith%2Ba%2Bdown-regulation%2Bof%2Bvasculare) 2002; 16(13): 1802-1804.

[[26] Kim YM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20YM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12029087) [Hwang S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hwang%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12029087) Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=endostatin%2Bblocks%2Bvascular%2Bendothelial%2Bgrowth%2Bfactor%2B-mediated%2Bsignaling%2Bvia%2Bdirect%2Binteraction%2Bwith) 2002; 277(31): 27872-27879.

[[27] Karumanchi SA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Karumanchi%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11336704) [Jha V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jha%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11336704) [Ramchandran R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ramchandran%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11336704), et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors[J]. [Mol Cell.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cell%2Bsurface%2BGlypicans%2Bare%2Blow-affinity%2Bendostatin%2Breceptor) 2001; 7(4): 811-822.

[[28] Faye C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Faye%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19502598) [Moreau C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Moreau%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19502598), [Chautard E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chautard%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19502598), et al. Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=molecular%2Binterplay%2Bbetween%2Bendostatin%2C%2Bintegrin%2Cand%2Bheparan%2Bsulfate) 2009; 284(33): 22029-22040.

[[29] Schaffner F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schaffner%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216697) [Ray AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ray%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216697) [Dontenwill M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dontenwill%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216697). Integrinα5β1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors[J]. [Cancers (Basel).](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=integrin%2Bthe%2Bfibronectin%2Breceptor%2Bas%2Ba%2Bpertinent%2Btherapeutic%2Btarget%2Bin%2Bsolid%2Btumor) 2013; 5(1): 27-47.

[[30] Dhanabal M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dhanabal%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10206987), [Ramchandran R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ramchandran%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10206987), [Waterman MJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Waterman%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10206987), et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206987) 1999; 274(17): 11721-11726.

[31] Ling Y, Lu N, Gao Y, Chen Y, Wang S, et al. Endostar induces apoptotic effects in HUVECs through activation of caspase-3 and decrease of Bcl-2[J]. Anticancer Res. 2009; 29: 411–417.

[[32] Xu X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25232946) [Mao W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mao%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25232946) [Chen Q,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25232946) et al. Endostar, a modified recombinant human endostatin, suppresses angiogenesis through inhibition of Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. [PLoS One.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232946) 2014; 9(9): e107463.

[[33] Jin F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jin%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23071744) [Ji H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ji%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23071744) [Jia C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jia%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23071744), et al. Synergistic antitumor effects of endostar in combination with oxaliplatin via inhibition of HIF and CXCR4 in the colorectal cell line SW1116[J]. [PLoS One.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071744) 2012; 7(10): e47161.

[[34] Lee SJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20SJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12023034) [Jang JW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jang%20JW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12023034) [Kim YM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20YM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12023034) et al. Endostatin binds to the catalytic domain of

Matrix metalloproteinase-2[J]. [FEBS Lett.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=endostatin%2Bbinds%2Bto%2Bthe%2Bcatalytic%2Bdomain%2Bof%2Bmatrix%2Bmetalloproteinase) 2002; 519(1-3):147-152.

[[35] Jiang WG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jiang%20WG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24128285) [Lu XA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lu%20XA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24128285) [Shang BY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shang%20BY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24128285), et al. Genetically engineered endostatin-lidamycin fusion proteins effectively inhibit tumor growth and metastasis. [BMC Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=genetically%2Bengineered%2Bendostatin-lidamycin%2Bfusion%2Bproteins%2Beffectively%2Binhibit%2Btumor%2Bgrowth) 2013; 13: 479.

[[36] Lee TY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20TY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15520208) [Wu HC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wu%20HC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15520208) [Tseng YL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tseng%20YL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15520208) [Lin CT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lin%20CT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15520208). A novel peptide specifically binding to nasopharyngeal carcinoma for targeted drug delivery[J]. [Cancer Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520208) 2004; 64(21): 8002-8008.

[[37] Yang W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18765541) [Luo D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Luo%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18765541) [Wang S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18765541) et al. TMTP1, a novel tumor-homing peptide specifically targeting metastasis[J]. [Clin Cancer Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765541) 2008; 14(17): 5494-5502.

[[38] Vongchan P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vongchan%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15652173) [Warda M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Warda%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15652173) [Toyoda H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Toyoda%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15652173), et al. Structural characterization of human liver heparan sulfate[J]. [Biochim Biophys Acta.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652173) 2005; 1721(1-3): 1-8.

[[39] Liu Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17786358) [Zhu X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17786358) [Zhu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17786358), et al. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray[J]. [Oncol Rep.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786358) 2007; 18(4): 943-951.

[[40] Suzuki M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Suzuki%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21187490), [Sugimoto K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sugimoto%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21187490) [Tanaka J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tanaka%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21187490), et al. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma[J]. [Anticancer Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187490) 2010; 30(12): 5055-5061.

[[41] Tátrai P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=T%C3%A1trai%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20124094), [Egedi K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Egedi%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20124094) [Somorácz A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Somor%C3%A1cz%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20124094) et al. Quantitative and qualitative alterations of heparin sulfate in fibrogenic liver diseases and hepatocellular cancer[J]. [J Histochem Cytochem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=quantitative%2Band%2Bqualitative%2Balterations%2Bof%2Bheparan%2Bsulfate%2Bin%2Bfibrogenic%2Bliver%2Bdisease) 2010; 58(5): 429-441.

[[42] Filmus J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Filmus%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23305321), [Capurro M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capurro%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23305321). Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. [FEBS J.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=glypican-3%5BTitle%5D%20AND%20marker%5BTitle%5D%20AND%20therapeutic%5BTitle%5D%20AND%20target%5BTitle%5D%20AND%20hepatocellular%5BTitle%5D) 2013; 280(10): 2471-2476.

[[43] Koo CY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Koo%20CY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18991783) [Sen YP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sen%20YP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18991783) [Bay BH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bay%20BH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18991783) [Yip GW.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yip%20GW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18991783) Targeting heparan sulfate proteoglycans in breast cancer treatment[J]. [Recent Pat Anticancer Drug Discov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991783) 2008; 3(3): 151-158.

[[44] Vongchan P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vongchan%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22199263) [Kothan S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kothan%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22199263) [Wutti-In Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wutti-In%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22199263) [Linhardt RJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Linhardt%20RJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22199263). Inhibition of human tumor xenograft growth in nude mice by a novel monoclonal anti-HSPG isolated from humanliver[J]. [Anticancer Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=inhibition%2Bof%2Bhuman%2Btumor%2Bxenograft%2Bgrowth%2Bin%2Bnude%2Bmice%2Bby%2Ba%2Bnovel%2Bmonoclonal%2Banti-HSPG) 2011; 31(12): 4067-4074.

[[45] Rathore D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rathore%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15781464), [Nagarkatti R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nagarkatti%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15781464), [Jani D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jani%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15781464), et al. An immunologically cryptic epitope of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and

Induces protective antibodies that block liver cell invasion[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=An%2Bimmunologically%2Bcryptic%2Bepitope%2Bof%2Bplasmodium%2Bfalciparum%2Bcircumsporozoite%2Bprotein) 2005; 280(21):20524-20529.

[[46] Coppi A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Coppi%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21262960), [Natarajan R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Natarajan%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21262960), [Pradel G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pradel%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21262960), et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host[J]. [J Exp Med.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=the%2Bmalaria%2Bcircumsporozoite%2Bprotein%2Bhas%2Btwo%2Bfunctional%2Bdomains%2C%2Beach%2Bwith%2Bdistinct%2Brole%2Bas%2Bsporozoite) 2011; 208(2): 341-356.

[[47] Plassmeyer ML,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Plassmeyer%20ML%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19633296) [Reiter K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reiter%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19633296) [Shimp RL Jr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shimp%20RL%20Jr%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19633296), et al. Structure of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633296) 2009; 284(39): 26951-26963.

[[48] Ying P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ying%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9030667) [Shakibaei M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shakibaei%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9030667), [Patankar MS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Patankar%20MS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9030667), et al. The malaria circumsporozoite protein: interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate[J]. [Exp Parasitol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030667) 1997; 85(2): 168-182.

[[49] Ancsin JB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ancsin%20JB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15007056) [Kisilevsky R.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kisilevsky%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15007056) A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=a%2Bbinding%2Bbite%2Bfor%2Bhighly%2Bsulfated%2Bheparan%2Bsulfate%2Bis%2Bidentified%2Bin%2Bthe%2BN%2Bterminus%2Bof%2Bthr%2Bcircumsporozoite%2Bprotein) 2004; 279(21): 21824-21832.

[[50] Longmuir KJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Longmuir%20KJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16550476) [Robertson RT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Robertson%20RT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16550476), [Haynes SM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Haynes%20SM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16550476), et al. Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence[J]. [Pharm Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550476) 2006; 23(4): 759-769.

[[51] Longmuir KJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Longmuir%20KJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19664697) [Haynes SM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Haynes%20SM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19664697) [Baratta JL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baratta%20JL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19664697) et al. Liposomal delivery of doxorubicin to hepatocytes in vivo by targeting heparan sulfate[J]. [Int J Pharm.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=liposomal%2Bdelivery%2Bof%2Bdoxorubicin%2Bto%2Bhepatocyte%2Bin%2Bvivo%2Bby%2Btargeting%2Bheparan%2Bsulfate) 2009; 382(1-2): 222-233.

[52] 王晶. Endostatin对肺癌细胞Calu—6小鼠移植瘤生物效应的研究[D]. 天津医科大学硕士学位论文, 2007.

[[53] Zhang PH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20PH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18495614) [Qin J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Qin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18495614) [Li AM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18495614), et al. Inhibitory effects of recombinant human endostatin on the metastatic potential and invasiveness ofhepatocellular carcinoma HCCLM6 cells in vitro[J]. [Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495614) 2008; 28(4): 658-661.

[[54] Ren Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ren%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25229620), [Wang Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25229620) [Jiang W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jiang%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25229620) et al. Anti-tumor effect of a novel soluble recombinant human endostatin: administered as a single agent or in combination with chemotherapy agents in mouse tumor models[J]. [PLoS One.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25229620) 2014; 9(9): e107823.

[[55] Karev VE.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Karev%20VE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24745187) Fas, FasL, and bcl-2 expression on hepatic intralobar lymphocytes in

Different variants of the natural course of chronic HBV and HCV infection and in its outcomes[J]. [Arkh Patol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fas%2C%2BFasl%2C%2Band%2Bbcl-2%2Bexpression%2Bon%2Bhepatic%2Bintralobar%2Blymphocytes%2Bin%2Bdifferent%2Bvariants%2Bof%2Bthe%2Bnatural) 2014; 76(1):16-21.

[[56] Liedtke C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liedtke%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22153863), [Trautwein C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Trautwein%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22153863). The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer[J]. [Eur J Cell Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=caspase%2B8%2Band%2Bhepatocellular%2Bcarcinoma) 2012; 91(6-7): 582-589.

[[57] Koschny R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Koschny%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24209510) [Brost S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Brost%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24209510) [Hinz U,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hinz%20U%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24209510) et al. Cytosolic and nuclear caspase-8 have opposite impact on survival after liver resection for hepatocellular carcinoma[J]. [BMC Cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209510) 2013; 13: 532.

**附录3** 攻读学位期间科研情况及所受奖励

**发表的科研论文**

[1]**鲍冬梅**, 马艳, 金小宝, 朱家勇△.多肽在肝癌靶向治疗中的研究进展[J]. 广东医学, 2014, 35(7): 1115-1118.

[[2] **Bao D**,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bao%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25731590) [Jin X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jin%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25731590), [Ma Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ma%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25731590) [Zhu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=25731590). Comparison of the Structure and Biological Activities of Wild-type and Mutant Liver-targeting Peptide Modified Recombinant Human

Endostatin (rES-CSP) in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. [Protein Pept](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25731590) [Lett.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25731590) 2015 Mar 2. [Epub ahead of print] **(IF: 1.735)**

**[3]** Y Ma, X-B Jin, F-J Chu, **D-Mei Bao**, J-Y Zhu. Expression of liver-targeting peptide modified recombinant human endostatin and preliminary study of its biological activities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(18) **(IF: 3.81)**

**课题参与情况**

国家科技部新药创制重大专项资助项目：CSP I-plus修饰的肝靶向IFN抗HBV的成药性研究（编号: 2013ZX09103-003）

**获得的奖励**

[1]获得2012-2013年度“优秀研究生”二等奖学金

[2]获得2013-2014学年“优秀学生干部”称号

附录Ⅰ：英文缩写语中文对照

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |  |
|  | rEndostatin | Recombinant Human Endostatin | 恩度 |  |
|  | CSP | Circumsprozoite protein | 环子孢子蛋白 |  |
|  | HCC | Hepatocellular carcinoma | 肝细胞性肝癌 |  |
|  | SDS | Sodium Dodecyl Sulfate | 十二烷基硫酸钠 |  |
|  | PAGE | Polyacrylamine gel electrophoresis | 聚丙烯酸胺凝胶电泳 |  |
|  | Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |  |
|  | EDTA | Ethylenediameine teraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |  |
|  | FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |  |
|  | DMSO | Dimethyl pyrocarbonate | 二甲基亚砜 |  |
|  | MTS | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)  -2H-tetrazolium | 噻唑蓝 |  |
|  | RNase | Ribonuclease | 核糖核酸酶 |  |
|  | PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲溶液 |  |
|  | FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |  |
|  | HSPG | Heparan sulfateproteoglycans | 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 |  |
|  | GAG | gly-cosaminoglycan | 糖胺聚糖 |  |
|  | rmp | Revolution per minute | 每分钟转速 |  |
|  | VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |  |
|  | DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | 改良 Eagle 培养基 |  |
|  | DAPI | 4', 6-diamidino-2-phenylindole | 4',6-联脒-2-苯基吲哚二盐酸盐 |  |
|  | bFGF | Basic fibroblast growth factor | 碱性成纤维细胞生长因子 |  |
|  | PI | Propidium iodide | 碘化吡啶 |  |
|  | MMP | Matrix Metalloprotease | 基质金属蛋白酶 |  |

# 文献综述

**多肽在肝癌靶向治疗中的研究进展**

鲍冬梅，马艳，金小宝，朱家勇△

广东药学院基础学院广东省生物活性药物研究重点实验室（广东广州510006）

**【摘要】**肝癌是我国常见恶性肿瘤之一，其发病率逐年增长。近年来，随着分子生物学的深入研究，多肽靶向药物的临床应用为肝癌治疗带来了新突破。肝癌细胞靶向肽和肝癌血管靶向肽是肝癌靶向多肽的两大研究领域，本文主要从这两方面对多肽在肝癌靶向治疗中的研究进展作一综述。

【关键词多肽 ；靶向治疗；肝癌

Research advances on peptides for Hepatocellular carcinoma targeted treatment

BAO Dong-mei, MA Yan, JIN Xiao-bao, Zhu Jia-yong△

Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances in School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University (GuangZhou 510006)

【Abstract】Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of most common malignant tumors in

China, and its incidence continues to increase. With recent years, profound research of molecular biology, targeted treatment has appeared as a breakthrough in the treatment of HCC. Targeting hepatoma cells and tumor vasculatures are two research fields of targeting peptides for HCC treatment. Based on this two aspects, We will presents recent advances on peptides for Hepatocellular carcinoma targeted treatment.

【Key words】peptides; targeting therapy; hepatocellular carcinoma

肝癌是我国最常见恶性肿瘤之一，临床发病率高，早期症状不明显，临床就诊时多数已属晚期。目前治疗主要有手术切除，放射治疗和化学药物治疗。这些疗法对早期肝癌可获得较满意的效果，但对晚期肝癌且伴有局部扩散和远处转移者，疗效往往较差。而放疗和化疗对身体副作用较大，在杀伤肿瘤细胞的同时，对正常组织细胞也有影响。因此，寻找疗效较高而毒副作用较小的新型抗癌药物已成为肝癌创新药物研

究中的重点问题。

靶向制剂是指一类能使药物选择性地浓集定位于病变组织、器官、细胞或细胞内的新型给药制剂，具有疗效高、药物用量小、毒副作用小等优点。靶向多肽是继脂质体、纳米粒、单克隆抗体偶联物等之后一种全新的靶向载体，该多肽载体可将所携带的药物直接定位于细胞膜表面受体发挥其药理作用，亦可通过受体介导的内吞作用进入胞内，在胞浆或胞核发挥作用。随着对多肽应用潜力的逐渐重视，近年来国内外学者通过从动植物提取，噬菌体肽库筛选以及化学合成等方法，得到了一些具有抗肿瘤活性或特异性靶向肿瘤的多肽。

随着对肿瘤分子水平研究的深入，肝癌细胞表面以及肿瘤相关血管具有独特的表面分子，这些分子不仅是相对特异的并且常常是高表达的。借助能与靶分子高度特异性结合的多肽作为载体，以有药物活性的物质（如放射性核素、化疗药物、毒素、酶、生物反应调节剂、基因以及病毒等）作为“弹头”，依靠载体高度特异的亲和性，将“弹头”物质尽量集中于肿瘤部位，发挥其生物学功能。

**1. 肝癌细胞靶向肽**

1.1 **GPC-3** Glypican-3 (磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3，GPC-3)属于膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白（HSPG）超家族成员，其基本结构包括核心蛋白，硫酸乙酰肝素（Heparin sulfate，

HS）和糖基磷脂酰肌醇(GPI)，通过GPI锚定在细胞膜的表面。研究证明GPC-3可以结合多种生长因子并调节其活性，进而在生长发育和癌变进程中起关键作用。GPC3在肝细胞癌组织中高表达，在肝脏良性病变及癌前病变中不表达或低表达[1]，对肝癌的靶向治疗研究具有重要价值。

You La Lee等[2]利用脂质体将融合蛋白FLAG-GPC-3转染进入HepG2细胞，通过蛋白质组学质谱鉴定出L5-2（Thr-Tyr-Phe-Leu-Thr-Arg-Gln）肽能靶向结合表达GPC-3的肝癌细胞。L5-2肽将有望成为诊断和/或治疗表达GPC3肝细胞癌的靶向分子。Sawada Y等[3]已经证实一种GPC-3多肽疫苗能够诱导产生相应的反应性细胞毒T细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL）,却不引起自身免疫反应，移植肝癌细胞小鼠接种此CTL细胞可抑制肿瘤生长，发挥间接靶向治疗肝癌的作用。

1.2 **A54肽**A54（AGKGTPSLETTP）肽是Du B等[4]通过噬菌体展示技术鉴定出的一种肝癌细胞靶向肽。阿霉素（doxorubicin, DOX）是目前临床常用的蒽醌类抗肿瘤药物，研究证实A54肽修饰的阿霉素具有良好的肝脏亲和性，能够被肝肿瘤细胞吸收，

且吸收量明显高于突变型A54 肽修饰的阿霉素。Du YZ 等[5]设计胶束给药系统

（PEG-CS-SA）与A54 共同用于阿霉素抗肝癌治疗，将正常肝细胞与人肝癌细胞

BEL-7402体外共同培养，A54-PEG-CS-SA胶束表现出对肝癌细胞专一的内吞活性。

1.3 **SP94 肽** SP94 肽是Albert Lo 等[6]建立体外多肽竞争抑制实验时发现肽

SFSⅡHTPILPL(SP94)能竞争性地抑制PC94肽与肝癌细胞结合。鉴于此发现，他们设计了SP94 肽与脂质体共修饰的阿霉素聚合物（SP94-Lipo-LD），荷瘤小鼠给药治疗

28*d*后，SP94-Lipo-LD组肿瘤体积明显小于Lipo-LD组和PBS空白对照组。Toita R等[7]运用基因工程技术得到融合蛋白HSPG41C-SP94，研究发现，此融合蛋白能选择性的被肝癌细胞摄取。进一步合成HSPG41C-SP94-DOX共聚物，体内实验显示该共聚物与阿霉素原药对肝癌细胞有同等杀伤作用，但却明显降低了DOX对正常细胞的伤害。因此，SP94肽作为肝癌细胞靶向载体在肝癌临床治疗中具有很大的运用潜力。

1.4**环子孢子蛋白（CSP）**CSP是疟原虫成熟子孢子表面的锚定蛋白，在疟原虫的迁移，靶细胞的入侵和增殖过程中发挥着重要的作用。近代研究显示，CSP与宿主肝脏细胞表面HSPGs分子具有高亲和性，子孢子能在最短时间内靶向识别并黏附于肝细胞膜，主动入侵肝细胞。利用疟原虫CSP对肝实质细胞高效精准的识别特性，将药物靶向浓集于肝脏，从而降低了药物对其他器官的损害，因此在肝靶向给药系统中具有良好的应用前景。

Tu Y等[8]研究设计了肝靶向肽-“自杀”基因复合物，通常“自杀”基因能够表达一种酶类，它能将胞内的非毒性的前体药物转换成细胞毒性成分，通过某种机制诱导凋亡。肝靶向多肽能选择性识别并结合肝癌细胞表面的特异受体，增加该种酶类在肝癌细胞的聚集，发挥靶向治疗作用。Lin-Lee[9]和Macus[10]等对疟原虫CSP保守区基因与细菌胞嘧啶脱氨基酶自杀式基因（bacterial cytosine deaminase, CD）进行重组。体外实验显示，表达的融合蛋白CS-CD以CSP作为配子靶向识别肝实质细胞膜上的受体，而CD作为效应部分能将外源性5-氟胞嘧啶催化为抗代谢药物5-FU，从而对分裂活动活跃的肝癌细胞产生毒性作用，靶向抑制肝癌生长。

**2．肝癌血管靶向肽**

1971年Folkman J[11]首次提出肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管的生成，因此调节肿瘤血管的生长就可能控制肿瘤的生长。目前借助噬菌体展示技术及其他先进手段，靶向肿瘤新生血管的多肽正火热研究中。

**NGR肽**NGR（Asn-Gly-Arg）是通过噬菌体展示技术筛选出来的能够和肿瘤新生血管特异结合的三肽模型。Pasqualini等[12]发现NGR肽能特异性与表达氨肽酶N（CD13）的细胞结合。CD13是一种膜结合的金属肽酶，它参与调节多种激素与细胞因子的表达、细胞提呈、细胞增殖、细胞迁移和血管形成等。研究表明，正常血管内皮细胞上的CD13表达未被激活。但在肿瘤微环境中，血管生成信号可以引起血管内皮细胞上的CD13高表达。因此NGR多肽可以将多种药物分子靶向运输到肿瘤血管组织中。

对于靶向抗癌药物来说，除了专一性的传递药物，提高对靶细胞的细胞毒性作用也至关重要。力达霉素（LDM）是由一个药效基团二炔发色团（AE）和载脂蛋白（LDP）构成的有效抗肿瘤抗生素，抗肿瘤机制研究发现力达霉素通过引起DNA链的损伤进而诱导肿瘤细胞的凋亡，Zheng YB等[13]通过重组DNA技术及其他手段获得具有肝癌靶向潜能的抗癌复合物即融合蛋白NGR-LDP修饰的AE，结果显示NGR-LDP融合蛋白能靶向将AE转运至肝癌血管，提高抗肿瘤活性。以往研究发现，肿瘤坏死因子（TNF）因能够介导肿瘤相关的内皮细胞凋亡而视为有效的抗血管药物。Santoro A等[14]将肿瘤血管靶向肽NGR与TNF融合形成的靶向分子较单独使用TNF的抗癌效果高10倍以上，且无明显的毒性增加。近年来更围绕着NGR-TNF融合蛋白的剂量限制依赖性毒副作用以及低剂量范围等做着持续的探索[15]。

肝动脉化疗栓塞（Transcatheter hepatic artery chemoembolization, TACE）也是目前不能切除肝癌非手术疗法的首选方法之一，研究发现截短的组织因子（tTF）因不能有效地活化凝血因子Ⅹ（FⅩ），视为一种无效的凝血剂。Dreischaluck J等[16]构建并表达了NGR-tTF融合蛋白，研究发现tTF借助靶向载体NGR肽靶向结合于肿瘤血管细胞膜表面，恢复活化FⅩ的功能，从而选择性地诱发肿瘤血管形成血栓，阻断血供，发挥靶向抗肝癌的疗效。

**3. 双重靶向肽**

**RGD肽**RGD肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（Arg-Gly-Asp）序列的短肽，广泛存在于生物体内，是整合素（integrin）与其配体蛋白相互作用的识别位点。整合素作为一类细胞表面黏附和信号转导的重要受体，广泛参与细胞与细胞外基质、细胞与细胞之间的相互作用，其中整合素ανβ3就是血管生成中一个重要分子。研究发现整合素ανβ3在正常组织器官和成熟血管内皮细胞中低表达或不表达，而在多种实体瘤细胞包括肝癌细胞表面和新生血管内皮细胞中高表达。基于RGD三肽序列能与整合素

ανβ3特异结合，近年来合成大量含线性和环形RGD多肽序列的衍生物作为整合素ανβ3配体的拮抗剂，抑制内源性的RGD肽与ανβ3的结合，从而阻断其功能的表达[17]。同时RGD多肽衍生物作为导向分子，将多种抑制血管生成的药物靶向运输到整合素ανβ3高表达的肿瘤细胞和新生血管内皮细胞表面，抑制肿瘤的生长。

**3.1 RGD肽靶向肝癌血管**

长期以来，抗肿瘤药物因在实体瘤的低渗透性而受到严重地限制。同时内皮抑素

（endostatin, ES）作为目前作用最强，实验效果最好的肿瘤血管抑制剂，近年来备受关注。Kazuki N等[18]设计了肿瘤穿透肽iRGD (CRGDK/RGPD/EC)，并详细阐明其肿瘤靶向的作用机制。研究发现iRGD多肽可靶向结合于特征性表达整合素ανβ3的肿瘤血管内皮细胞表面，进而被蛋白酶解切割产生CRGDK/R片段，该片段能进一步结合于神经菌毛素（neuropilin-1）受体，刺激穿透进入肿瘤细胞和组织。Zhang Hai-Tao等[19]将肿瘤穿膜肽iRGD（CRGDKGPDC）序列连接到内皮抑素（Endostatin）的C末端而制成iRGD修饰的ES融合蛋白，考察了该融合蛋白的肝靶向性及抗肿瘤活性。经给移植肝癌细胞裸鼠注射治疗，发现此融合蛋白与原药内皮抑素比较，明显提高了药物的肝靶向性和抗癌疗效，延长了肿瘤移植鼠的存活时间。近期研究发现，截断的

ES（EDSM）序列的N端或C端连接RGD序列，形成两重组序列EDSM-X和EDSM-Y具有良好的抗血管生成和抗肿瘤的活性[20]。这为内皮抑素的肿瘤血管靶向治疗开辟了一条新路。

**3.2 RGD肽靶向肝癌细胞**

Li-Li Cai等[21]以具有整合素受体靶向作用的RGD衍生肽作为配体，以阿霉素为模型药物，制备具有主动靶向和快速内吞效应的胶束聚合物即RGD-PEG-CS-SA修饰的阿霉素。体外细胞内吞试验显示RGD修饰的胶束聚合物在整合素过表达的人肝癌细胞

BEL7402中浓度显著高于整合素低表达的宫颈癌Hela细胞，具有明显的肝癌细胞靶向性。Wu C等[22]设计了RGD修饰的聚乙烯亚胺改性磁性纳米粒作为靶向肝癌细胞

survivin基因的小分子干扰RNA（siRNA）的纳米转运载体，结果显示RGD修饰的载体显著提高siRNA的肝癌细胞转染效率，进而抑制survivin抗凋亡蛋白的表达，诱导肝癌细胞凋亡。

**4．结语与展望**

随着分子生物学，分子药理学，病理学等对肝脏疾病本质及药物作用机理的阐明，

多肽介导的肝靶向载药系统研究在提高药物肝靶向性，提高药物疗效，减少药物剂量，降低药物副作用等方面取得较大进展。为推进新型肝靶向抗癌药物研究的不断发展，新型靶向多肽载体的寻找是个关键问题，这将成为现代药物开发领域的热点之一。

**References:**

[1] Zou ZQ, Ding YP, Long B, et al. Gpc-3 is a notable diagnostic, prognostic and a latent targeted therapy marker in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2010, 57(102-103): 1285-1290.

[2] Lee YL, Ahn BC, Lee Y, et al. Targeting of hepatocellular carcinoma with glypican-3-targeting peptide ligand[J]. J Pept Sci, 2011, 17(11): 763-769.

[3] Sawada Y, Naktsura T, Sakai M, et al. A glypican-3-derived peptide vaccine against hepatocellular carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(8): 1448-1450.

[4] Du B, Han H, Wang Z, et al. Targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(2), 135-144.

[5] Du YZ, Cai LL, Liu P, et al. Tumor cells-specific targeting delivery achieved by A54 peptide functionalized polymeric micelles[J]. Biomaterials, 2012, 33(34): 8858-8867.

[6] Lo A, Lin CT, Wu HC. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3):579-589.

[7] Toita R, Murata M, Abe K, et al. A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells[J]. Chem Commum(Camb), 2013, 49(67): 7442-7444.

[8] Tu Y, Kim JS. Selective Gene Transfer to Hepatocellular Carcinoma Using Homing Peptide-Grafted Cationic Liposomes[J]. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(4): 821-827.

[9] Lin-Lee YC, Nakamura S, Gandhi V, et al. Prologed stability and sustained prodrug cell killing activity using receptor-mediated delivery of malarial circumsporozoite- cytosine deaminase fusion protein into liver cancer cells[J]. 2002, 1(7): 461-467.

[10] Macus TK, Houston TX. Prodrug therapy of liver diseases using receptor-mediated delivery of malarial circumsporozoite protein as a carrier[p]. US, 2004/0067880A1.

[11] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971,

285(21):1182-1186.

[12] Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 722-727.

[13] Zheng YB, Shang BY, LiY, et al. An NGR-integrated and enediyne-energized apoprotein shows CD13-targeting antitumor activity[J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(2): 164-171.

[14] Santoro A, Pressiani T, Citterio T, et al. Activity and safety of NGR-hTNF, a selective vascular-targeting agent, in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer. 2010, 103(6): 837-844.

[15] Gregorc V, Citterio C, Vitali G, et al. Defining the optimal biological dose of NGR-hTNF, a selective vascular targeting agent, in advanced solid tumours[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(1): 198-206.

**[16]** Dreischaluck J, Schwoppe C, Spieker T, et al. Vascular infarction by subcutaneous application of tissue factor targeted to tumor vessels with NGR-peptides: activity and toxicity profile[J]. Int J Oncol, 2010, 37(6): 1389-1397**.**

[17] Haubner R, Bruchertseifer F, Bock M, et al. Synthesis and biological evaluation of a (99m) Tc-labelled cyclic RGD peptide for imaging the alphavbeta 3 expression [J]. Nuklearmedizin, 2004, 43(1): 26-32.

[18] Kazuki N, Sugahara, Tambet Teesalu, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumor[J]. Cancer Cell, 2009, 16(6): 510-520.

[19] Hai-Tao Z, Hui-Cheng L, Zheng-Wu L, et al. A tumor-penetrating peptide modification enhances the antitumor activity of endostatin in vivo[J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(5): 409-415.

[20] Pu CY, Xu HM, Hu JL, et al. RGD-modified endostatin fragments showed an antitumor effect through antiangiogenesis[J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(8): 788-802.

[21] Cai LL, Liu P, Huang X, et al. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin-overexpressed tumor cells. Int J Nanomedicine[J], 2011, 6: 3499-3508.

[22] Wu C, Gong F, Pang P, et al. An RGD-modified MRI-visible polymeric vector for targeted siRNA delivery to hepatocellular carcinoma in nude mice[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e66416.

致 **谢**

光阴似箭，如月如梭，我三年的硕士研究生时光即将画下句点。回首三年的学习和生活，我得到了许多人的帮助和关心，在此聊表数笔以表达我最深切的敬意和谢意。

首先向我的导师朱家勇教授表示崇高的敬意！正是在导师悉心的关怀与指导下，我能顺利地开展学位课题的研究，并顺利完成毕业论文。作为长者，导师在生活上也给予我无微不至的照顾，其谆谆教诲，终生难忘。严谨的科研作风、坚持不懈的精神、积极乐观的态度，都是导师惠赠给我的宝贵精神财富。

感谢金小宝师兄在我学习、实验中给予我的无私帮助、积极的建议和大力的支持，在生活以及为人处世方面给予我不断的关怀和指导。您的教诲与鞭策对我的工作、学习、生活的影响深刻，使我受益匪浅。

特别感谢我们实验室的马艳师姐在我的课题设计与具体实验研究中都给予了极大的关怀与帮助，没有您的帮助我的实验不可能这么顺利的完成，您的提示和建议让我在实验中少走了很多弯路。

感谢我们实验室的卢雪梅、李小波、褚夫江、刘涛、毛建文、尹辉、吴立蓉、梅寒芳、沈娟、刘文彬、汪洁等老师在日常生活和学习上给予的帮助和关心。

感谢广东药学院研究生院全体老师的关心与帮助。

感谢广东药学院基础学院各位领导在生活、学习方面给予我很多的指导和无私帮助。

感谢实验室的师姐许银叶、黄演婷、吴玉萍、蒲俏虹，师兄吴舜彬的关心和指导，感谢师妹冯盼盼、曾文婷、王影娇、王玉娇、曹灵杰，师弟胡文龙、周录泳、吴清清、巫春旭，感谢你们的鼓励和支持！

感谢广东药学院2012级全体研究生同学。三年来，你们在生活、学习上都给予了我许多无私的帮助！

感谢我的爸爸、妈妈、姐姐以及所有关心我的朋友，正是他们给予的支持与鼓励才使我坚持完成了三年的研究生学习，是他们给了我面对困难与挫折的勇气！

鲍冬梅

2015年3月13日于广东药学院