

(RGD)₃-tTF融合蛋白选择性结合 结肠癌裸鼠模型肿瘤血管的实验研究

黄正接¹ 罗琪¹ 颜江华² 王生育²

1. 厦门大学附属中山医院普外科, 福建 厦门 361004 ;
2. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005

【摘要】 背景与目的: 肿瘤血管作为肿瘤分子靶向治疗的靶点受到广泛的关注, 近年来有报道称利用抗体(Ab)作为组织因子(TF)胞外区截短组织因子(truncated tissue factor, tTF)的载体, 表达的抗体——截短组织因子(Ab-tTF)融合蛋白能够选择性结合肿瘤血管, 诱发实体肿瘤组织血管栓塞, 导致肿瘤衰退, 但是该方法存在一些弊端。本实验旨在研究以精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(GRGDSP, RGD)多肽作为tTF载体所表达的(RGD)₃-tTF融合蛋白选择性结合结肠癌裸鼠模型肿瘤血管的能力。方法: 用3个串联的RGD多肽与tTF合成融合基因(RGD)₃-tTF, 表达于大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE₃), 用镍柱纯化融合蛋白。用RGD-tTF融合蛋白作对照, 通过凝血实验和凝血因子X(FX)活化实验检测(RGD)₃-tTF融合蛋白的凝血活性, 运用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)方法分析其特异性结合肿瘤血管标志物整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的能力。结肠癌裸鼠模型分为3组(每组1只), 肿瘤组织分别用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白、tTF进行荧光染色, 免疫荧光实验分析融合蛋白在结肠癌裸鼠模型组织的定位。结果: (RGD)₃-tTF融合蛋白保留了组织因子的凝血活性, 在Ca²⁺存在时随着融合蛋白浓度的增加, 凝血时间相应缩短, 浓度为6 $\mu\text{mol/L}$ 时, 凝血时间为(9.96 \pm 0.56)min(与对照组比较, $P<0.01$)。(RGD)₃-tTF融合蛋白的浓度在1 $\mu\text{mol/L}$ 以上时能有效活化FX, 其活化能力与RGD-tTF相似($F=0.147$, $P>0.05$)。同浓度(RGD)₃-tTF融合蛋白与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力强于RGD-tTF($F=164.81$, $P<0.01$), 当融合蛋白浓度为0.24 $\mu\text{mol/L}$ 时, (RGD)₃-tTF融合蛋白和RGD-tTF融合蛋白的 $A_{405\text{nm}}$ 分别为1.25和0.95。免疫荧光实验显示, (RGD)₃-tTF融合蛋白富集于结肠癌裸鼠模型的肿瘤血管。结论: (RGD)₃-tTF融合蛋白在保留组织因子凝血活性的同时通过高效、特异地结合肿瘤血管标志物整合素 $\alpha_v\beta_3$, 选择性地定位在结肠癌裸鼠模型的肿瘤血管上, 为发展tTF作为效应因子的结肠癌分子靶向治疗奠定了基础。

【关键词】 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽; 截短组织因子; 融合蛋白; 结肠癌; 肿瘤血管
中图分类号: R73-35⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1007-3639(2009)10-0735-07

Experimental study of (RGD)₃-tTF fusion proteins binding specifically to tumor vasculature in the colonic carcinoma nude mice model HUANG Zheng-jie, LUO Qi, YAN Jiang-hua, WANG Sheng-yu (Department of Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen Fujian 361004, China)

Correspondence to: LUO Qi E-mail: luoqixmzsh@126.com

【Abstract】 Background and purpose: Tumor vasculature is increasingly recognized as a target for cancer therapy. In recent years, a fusion protein consisting of the extra cellular domain of tissue factor (truncated tissue factor, tTF) was fused to the antibody selectively binding to tumor vasculature. Antibody-truncated tissue factor(Ab-tTF) fusion protein specifically induced thrombotic occlusion of tumor vessels resulting in tumor growth retardation or regression in some types of solid tumors. However, there were still some disadvantages in the above approach. We constructed and expressed that the (RGD)₃-tTF fusion protein with peptides arginine-glycine-aspartic acid (GRGDSP, abbr. RGD) as the carrier of tTF to explore whether it had the capability of targeting to tumor vasculature in the colonic carcinoma model. **Methods:** The (RGD)₃-tTF fusion gene consisting of the tTF was fused to three series-wound

peptides RGD. The (RGD)₃-tTF construct was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE₃). The fusion protein was purified through Nickel affinity chromatography column. The activity of inducing blood coagulation was detected by clotting assay and coagulation factor (F) activation assay. The specific binding to integrins $\alpha_v\beta_3$ was analyzed by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). All these were compared with the fusion protein RGD-tTF. Colonic nude mice models were randomly divided into 3 groups (1 nude mice per group). Tumors were stained by the (RGD)₃-tTF, RGD-tTF fusion protein and tTF which were labeled with Fluorescein Isothiocyanate(FITC). The location of the (RGD)₃-tTF fusion protein in the colonic carcinoma bearing nude mice tissue was analyzed by immunofluorescence assay. **Results:** The (RGD)₃-tTF fusion protein retained tissue factor thrombogenic activities. With increasing concentration, the clotting time was shortened correspondingly. Under the conditions of Ca²⁺, the clotting time was 9.96 ± 0.56 min when the concentration was 6 μmol/L ($P < 0.01$). The (RGD)₃-tTF fusion protein could activate F above 6 μmol/L concentration, which was similar to RGD-tTF fusion ($F = 0.147$, $P > 0.05$). The ability of the (RGD)₃-tTF fusion protein binding specifically to integrins $\alpha_v\beta_3$ was stronger than that of the RGD-tTF fusion protein in the same concentration ($F = 164.81$, $P < 0.01$), which was apparently indicated by the A_{405nm} 1.25 and 0.95 when the concentration was 0.24 μmol/L. Immunofluorescence assay showed that the (RGD)₃-tTF fusion protein was assembling in the tumor vasculature of the colonic carcinoma bearing nude mice. **Conclusion:** The (RGD)₃-tTF fusion protein which retained tissue factor thrombogenic activities could bind specifically and efficiently to tumor vasculature in the colonic carcinoma bearing mice through binding to the tumor marker integrins $\alpha_v\beta_3$. It might be a promising foundation for further studies on the colon cancer molecular targeted therapy with tTF as an effective factor.

[Key words] peptides arginine-glycine-aspartic acid(RGD); truncated tissue factor (tTF); fusion protein; colonic carcinoma; tumor vasculature

恶性肿瘤的发生和发展都离不开血管, 血液供应为肿瘤细胞的生长提供充足的营养物质并带走其代谢产物^[1]。组织因子(tissue factor, TF)是一种跨膜糖蛋白, 是凝血级联反应的始发因子, 仅含有组织因子胞外区的截短组织因子(tTF)其激活凝血因子(F)的活性仅为完整的跨膜组织因子的十万分之一, tTF与凝血因子(F)的结合并不能有效激活F。但是若把能与肿瘤血管标志物特异性结合的分子作为tTF的载体, 表达载体-tTF融合蛋白, 融合蛋白结合于细胞膜后, 则tTF激活F的功能将完全恢复, 从而诱导肿瘤组织血管形成血栓, 导致肿瘤缺血坏死^[2-3]。 $\alpha_v\beta_3$ 是整合素家族成员之一, 在结肠癌肿瘤血管内皮细胞中高度表达, 可以作为肿瘤血管内皮细胞膜的标志物。GRGDSP(缩写RGD)是具有生物活性的短肽序列之一, 即精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp), 是一种能特异性结合 $\alpha_v\beta_3$ 的多肽^[4], 含RGD序列的小分子多肽CDCRGDCFC(RGD-4C)是Pasqualini等^[5]用噬菌体表面展示肽库技术成功筛选出的对 $\alpha_v\beta_3$ 有亲和力的配体, 已作为化学药物的载体成功用于肿瘤血管的靶向治疗^[6], 其中RGD是与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的结合部位。本课题利用3个串联的含RGD序列的RGD-4C作为tTF的载体, 表达

融合蛋白(RGD)₃-tTF, 在体外检测其凝血活性和特异性结合 $\alpha_v\beta_3$ 的能力; 免疫荧光实验分析融合蛋白在结肠癌SW480荷瘤裸鼠体内的组织定位, 旨在研究以RGD多肽作为tTF载体表达具有凝血功能的(RGD)₃-tTF融合蛋白与结肠癌裸鼠模型肿瘤血管选择性结合的能力, 探索结肠癌治疗的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠埃希菌(*E. coli*) BL21(DE₃)、人结肠癌细胞系SW480由厦门大学医学院抗癌研究中心提供、质粒pET22b(+)购自Novagen公司、tTF/pSK(+)质粒由美国南加州大学Epstein教授惠赠。

1.1.2 工具酶及试剂 工具酶购自NEB公司, 脱氧核糖核酸(DNA)纯化试剂盒为OMEGA公司产品, DNA序列分析由上海博亚公司完成。鼠抗6个组氨酸标签的单克隆抗体(6×His mAb)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)和异硫氰酸荧光素(FITC)购自上海生工公司, 多肽对硝基苯胺复合物(S2222)为上海申生生化科技公司生产, 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、F和F购自Sigma公司。RGD-tTF融合蛋白由厦门大学医学院抗癌研究

中心提供。

1.1.3 引物 由上海生工合成。根据tTF互补DNA (cDNA) 序列设计扩增tTF的引物, P₁ (上游引物): 5'-TCTGGCACTACAAATACT-GTGGC-3'和P₂ (下游引物): 5'-TTCTCT-GAATCCCCTTTCTCC-3'。根据文献[5]设计含有3个RGD-4C (CDCRGDCFCGGGGS)的寡核苷酸P₃: 5'-CATACCATGGGC(TGCGATTGT CGCGGAGATTGCTTCTGCGGTGGAGCGGGTCT)₃TCTGGCACTACAAATAC-3'(其中划直线部分为含RGD-4C序列,波浪线部分为tTF 5'端序列)。引物P₄: 5'-CATACCATGGGCTGCGATT-GTC-3'和引物P₅: 5'-CTACCTCGAGTTCTCT-GAATCCCCTTTCTCC-3'。

1.1.4 动物 BALB/C 4周龄雄性裸鼠,重量(25±4)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,分笼饲养于屏障系统的洁净层流架内,室温控制在(25±1),相对湿度40%~50%。

1.2 方法

1.2.1 (RGD)₃-tTF融合蛋白的表达及纯化 利用聚合酶链式反应(PCR)技术重组融合基因(RGD)₃-tTF,扩增,在融合基因两端分别引入内切酶位点Nco和Xho,1%琼脂糖凝胶鉴定、DNA胶纯化试剂盒回收纯化目的片段。PCR产物克隆于载体pET22b(+),经氨苄青霉素抗性初筛,PCR筛选阳性克隆测序(上海博亚公司)。融合基因(RGD)₃-tTF表达于E.coli BL21(DE₃),镍柱纯化目的蛋白,纯化蛋白用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,依次加鼠抗6个组氨酸标签的单克隆抗体(6×His mAb)、HRP标记的羊抗鼠IgG孵育。纯化蛋白用0.01 mol/L磷酸缓冲液(PBS)透析复性。

1.2.2 (RGD)₃-tTF融合蛋白tTF组分的活性鉴定

1.2.2.1 凝血实验 参照Haubitz等^[7]凝血实验方法,用3.8%的柠檬酸钠处理新鲜小鼠血液离心,留血浆。凝血板每孔加血浆30 μL,分别加系列浓度的(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白和终浓度为12.5 mmol/L的氯化钙(CaCl₂),并设(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白和氯化钙的对照组,室温下记录从加入氯化钙至血浆开始出现不流动的时间。

1.2.2.2 F₁₂₅活化实验-比色法^[8] 在三羟甲

基氨基甲烷(Tris)缓冲液中加系列浓度的(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白或小牛血清蛋白(BSA),加100 nmol/L F₁₂₅,37℃温育10 min,加F₁₂₅至终浓度5 nmol/L,于室温下温育10 min,加入100 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)终止反应,加2 nmol/L 生色底物多肽对硝基苯胺复合物(S2222),在3 min之内用酶标仪测A_{405nm}值。

1.2.3 (RGD)₃-tTF融合蛋白与v₃特异性结合实验 参照Kessler等^[9]方法用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)分析(RGD)₃-tTF融合蛋白特异性结合v₃的能力。96孔板包被v₃4过夜,1%小牛血清蛋白(BSA)封闭,分别加入倍比稀释的(RGD)₃-tTF融合蛋白(0.015~0.48 μmol/L),相应浓度的RGD-tTF融合蛋白、tTF-His做对照,于4℃过夜。依次加入鼠抗6个组氨酸标签的单克隆抗体(6×His mAb)、HRP标记的羊抗鼠IgG温育,四甲基联苯胺(TMB)显色10 min后终止反应,测定A_{405nm}值。

1.2.4 免疫荧光实验分析(RGD)₃-tTF融合蛋白在荷瘤裸鼠组织的定位

1.2.4.1 结肠癌SW480动物模型的建立 复苏后结肠癌SW480细胞用10%灭活小牛血清RPMI1640培养传代。用1 mL一次性注射器将SW480细胞移植至4~6周龄雄性裸鼠背部皮下3只,每只对称两点,每点约2×10⁶个细胞。

1.2.4.2 融合蛋白的异硫氰酸荧光素(FITC)标记 将(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白、tTF放在pH值9~9.5的碳酸盐缓冲液中透析过夜。取适量FITC,加入二甲亚砜(DMSO),将FITC溶液逐滴加入到蛋白溶液中,搅拌均匀,置4℃冰箱中反应过夜,反应液在PBS(pH7.4)中透析,每4~6 h更换透析液,以除去游离荧光素。测定F/P比值。

1.2.4.3 病理组织的荧光显微镜观察 待裸鼠肿瘤长至约125 mm³时(肿瘤体积=长×宽×宽×0.52)后处死小鼠,取每只小鼠皮下肿瘤组织及正常组织肝脏,迅速用液氮冷冻;组织切片;经乙醇脱水后,用冰冷的PBS(pH7.4)洗涤;分别加入100 μg FITC标记的(RGD)₃-tTF、RGD-tTF融合蛋白、tTF对肿瘤组织进行荧光染色,正常组织肝脏用100 μg FITC标记的(RGD)₃-tTF融合蛋白进行荧光染色,4℃过夜;PBS(pH7.4)洗涤;缓冲甘油封片,荧光显

显微镜检, 分析融合蛋白在荷瘤裸鼠组织的定位。

1.3 统计处理 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据用SPSS11.5统计软件包进行处理, 组间比较采用重复测量设计方差分析, 取P值小于0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 (RGD)₃-tTF的PCR组装 以质粒tTF/pSK(+) 为模板PCR扩增获得大小为657 bp的tTF, 再与含(RGD-4C)₃的引物P₃退火融合后, 得到(RGD)₃-tTF模板, 经PCR扩增获得(RGD)₃-tTF产物, 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 约在780 bp处见单一特异性亮带(图1), 其大小与理论计算值(784 bp)相一致, 且比RGD-tTF多约50 bp。

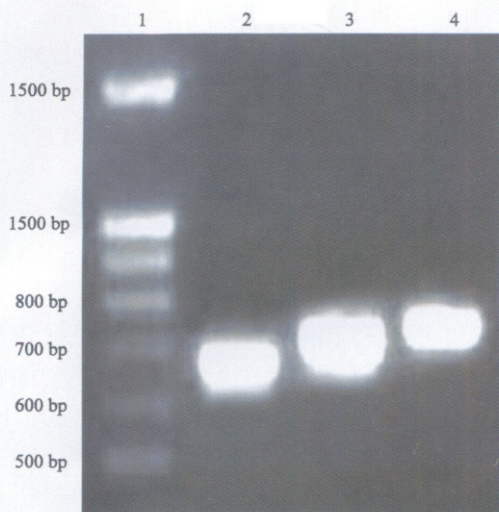


图1 (RGD)₃-tTF PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR product of (RGD)₃-tTF by agarose gel electrophoresis

1: DNA marker; 2: PCR product of tTF; 3: PCR product of RGD-tTF; 4: PCR product of (RGD)₃-tTF.

2.2 重组质粒的鉴定 经氨苄青霉素抗性初筛, PCR筛选阳性克隆送上海博亚公司测序, 经核苷酸序列和蛋白编码分析获得一正确重组质粒克隆。

2.3 融合基因(RGD)₃-tTF在*E.coli* BL21(DE₃)中的表达 含有融合基因(RGD)₃-tTF的DE₃重组子经系列浓度异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 发现IPTG终浓度达0.1 mmol/L时, 目的蛋白表达量已达最大。以0.2 mmol/L IPTG探测, 发现于37℃诱导6 h为

最佳诱导时间。目的蛋白主要以包涵体形式表达, 经镍柱纯化, 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 可见单一蛋白纯化条带约位于38 × 10³处(图2), 用抗6个组氨酸标签的单克隆抗体(6 × His mAb)证实该纯化蛋白带为(RGD)₃-tTF融合蛋白。

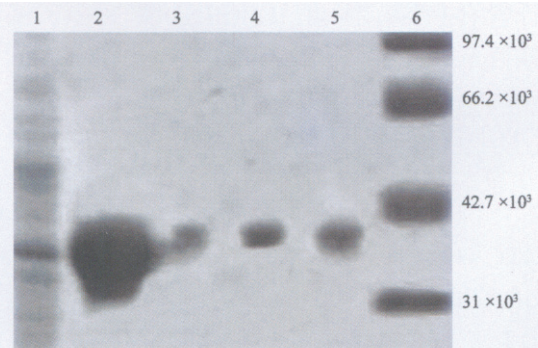


图2 重组(RGD)₃-tTF的镍柱纯化产物 SDS-PAGE分析

Fig. 2 Analysis of the product of purification through Nickel-affinity chromatography column by SDS-PAGE

1: Total soluble protein; 2: Total insoluble protein; 3,4,5: Sample washed from the column with Elute buffer; 6: Protein marker.

2.4 凝血实验结果 柠檬酸钠抗凝血浆在单独加12.5 mmol/L Ca²⁺或6 μmol/L tTF融合蛋白时, 抗凝血浆30 min内不凝;在Ca²⁺存在时, tTF融合蛋白能有效促进血浆凝固(表1)。随着(RGD)₃-tTF融合蛋白浓度的增加, 凝血时间相应缩短, 其凝血活性与RGD-tTF相似。

表1 tTF融合蛋白的凝血作用

Tab. 1 Clotting of tTF fusion proteins

tTF fusion protein /μmol·L ⁻¹	Concentration CaCl ₂ /mmol·L ⁻¹	t/min	
		(RGD) ₃ -tTF ^A	RGD-tTF ^B
0	0	> 30	> 30
0	12.5	> 30 ^a	> 30 ^b
0.75	12.5	> 30	> 30
1.5	12.5	14.56±0.72*	14.97±0.57*
3	12.5	12.78±0.70*	13.09±0.47*
6	12.5	9.96±0.56*	10.04±0.39*
6	0	> 30	> 30

Compared with the group A and B, F=2.90, P> 0.05; Compared with the control group a or b, *:P<0.01.

2.5 FX活化实验结果 分别测浓度为0.01、0.1、1、10 μmol/L的tTF融合蛋白和小牛血清蛋白(BSA)在FX活化反应后的A_{405nm}。结果显示(RGD)₃-tTF融合蛋白在1 μmol/L以上时能有效活化FX, 并增强405 nm处吸收峰, 其量效关系与RGD-tTF相似(F=0.147, P>0.05);而同浓度的BSA则没有反应(图3)。

2.6 特异性结合实验结果 ELISA法检测 (RGD)₃-tTF融合蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 相结合的特异性。结果表明(RGD)₃-tTF和RGD-tTF融合蛋白均可与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,其结合程度与剂量相关并呈饱和现象,同摩尔浓度(RGD)₃-tTF融合蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力强于RGD-tTF ($F=164.81, P<0.01$,图4)。当tTF融合蛋白浓度为0.24 $\mu\text{mol/L}$ 时, (RGD)₃-tTF和RGD-tTF融合蛋白的 $A_{405\text{nm}}$ 分别为1.25和0.95。而单纯的tTF-His与 $\alpha_v\beta_3$ 不反应。

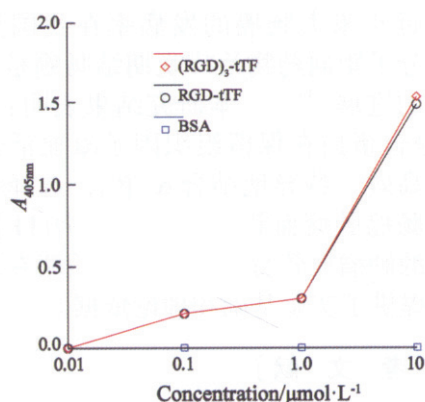


图3 tTF融合蛋白的FX活化实验

Fig. 3 FX activation assay of tTF fusion proteins

2.7 免疫荧光实验结果 用FITC荧光标记融合蛋白(RGD)₃-tTF、RGD-tTF和tTF,分析融合蛋白在荷瘤裸鼠组织的定位。病理组织标本在荧光显微镜下观察,结果在SW480肿瘤组织血管腔,富集着荧光标记的(RGD)₃-tTF(图5A)和RGD-tTF(图5B), (RGD)₃-tTF组的荧光密度大于RGD-tTF组,而tTF组的肿瘤组织和(RGD)₃-tTF组的肝脏组织则没有荧光。这说明融合蛋白RGD-tTF和(RGD)₃-tTF选择性定位于肿瘤血管, (RGD)₃-tTF融合蛋白选择性结合结肠癌肿瘤血管的能力高于RGD-tTF。

3 讨论

1997年Huang等^[2]首先将抗肿瘤血管标志物的抗体作为TF的胞外区tTF的载体,重组载体-tTF融合基因,表达载体-tTF融合蛋白,将抗体的特异性传递和tTF潜在的凝血功能相结合,作用在肿瘤血管的特定靶点而选择性诱发肿瘤组织血管栓塞,导致肿瘤衰退,建立了以tTF作为效应因子的肿瘤血管靶向治疗方法。

这种以阻断肿瘤血管血流供应为目的的肿瘤分子靶向治疗已经引起相当关注,但国内少见用该方法治疗结肠癌的相关报道。结肠癌肿瘤血管内皮细胞高度表达 $\alpha_v\beta_3$,可以作为肿瘤血管分子靶向治疗的靶点。

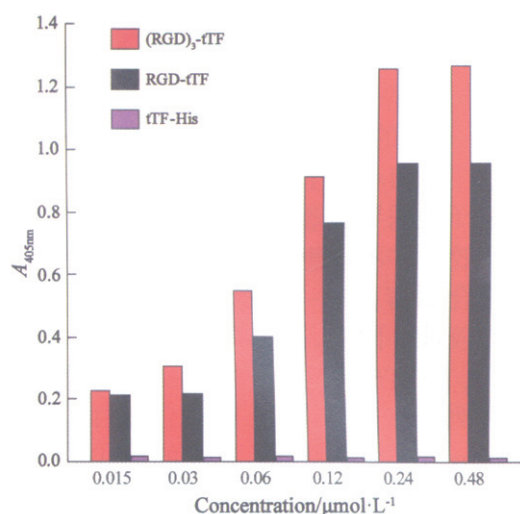


图4 (RGD)₃-tTF融合蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合分析

Fig. 4 The analysis of (RGD)₃-tTF fusion proteins specific binding to $\alpha_v\beta_3$

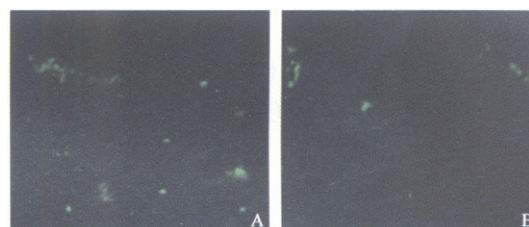


图5 免疫荧光实验分析融合蛋白在裸鼠组织的定位

Fig.5 Analysis of location of fusion proteins in the mice tissue by fluorescence staining

A: Staining of (RGD)₃-tTF in tumor SW480; B: Staining of RGD-tTF in tumor SW480 (FITC fluorescence staining of tumors SW480 and magnification, $\times 400$).

载体-tTF融合蛋白诱发的特异性肿瘤血管栓塞效果取决于载体的特异性及其抗原或受体的表达和分布情况。研究表明,利用抗肿瘤血管标志物抗体作为tTF特异性载体存在一些弊端^[9],如已见报道的抗血管内皮细胞黏附因子1 (VCAM-1) 抗体^[10]、抗血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体^[11],主要体现在以下两个方面:(1) 由于抗体的分子相对较大,容易造成空间位阻而影响tTF与F和F的结合能力,进而降低了诱发肿瘤血管栓塞的效率。(2) 抗体-tTF融合蛋白理论上可被肝、脾等网状内皮系统吸附,存在引起这些器官血栓形成的潜在风

险。

为了避免抗体作为tTF特异性载体的弊端, 本实验以含RGD序列的RGD-4C作为tTF的载体, RGD-4C小肽是一种能特异性结合整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的配体, 而 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤血管内皮细胞高度表达, 与抗体比较, RGD-4C分子较小, 克服了抗体的分子较大引起空间位阻的弊端。但是, Hu等^[12]用单一的RGD-4C配体作为效应因子tTF的特异性载体, 制备RGD-tTF融合蛋白在荷瘤小鼠上进行体内实验, 结果发现仅能选择性诱导肿瘤组织的小血管形成血栓, 抗肿瘤效果并不理想。原因可能在相对抗原-抗体结合而言, 单一RGD配体与受体 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力较低。因此, 本实验进一步利用基因工程技术, 在tTF 5'端分别引入3个重复的RGD-4C序列, 表达(RGD)₃-tTF融合蛋白, 以提高与受体 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力。重复的RGD-4C序列相对于抗体和其他多肽而言有其独特优点: 基于tTF-F复合物的晶体结构, (RGD)₃-tTF融合蛋白可以跟完整组织因子一样结合于磷脂膜表面, 不会产生空间位阻影响tTF与F和F的结合; 带有2个二硫键的双重环化的RGD-4C对 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力比单二硫键的RGD要高出20%~40%, 比线性的RGD高200%; 重复的RGD序列相对于单一的RGD序列对整合素具有更高的亲合力^[13]。

本实验成功表达了(RGD)₃-tTF融合蛋白, 将其活性与仅有单一RGD配体的RGD-tTF融合蛋白进行比较。凝血实验和F活化实验结果表明(RGD)₃-tTF融合蛋白保持了组分tTF的凝血活性, 其凝血功能与RGD-tTF融合蛋白相仿($P>0.05$), 增加RGD配体数量不会影响融合蛋白的凝血功能。但是, (RGD)₃-tTF融合蛋白特异性结合 $\alpha_v\beta_3$ 的能力显著提高($P<0.01$), 是RGD-tTF的1.3倍多(1.25/0.95)。尽管受体 $\alpha_v\beta_3$ 与配体RGD的亲合力较低, 在引入3个重复的RGD-4C序列后, (RGD)₃-tTF融合蛋白不仅带有2个二硫键, 而且具有3个配体RGD, 增加了配体数量, 提高了与受体 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力, 从而增强了与肿瘤血管选择性结合的能力。免疫荧光实验进一步证实了这一结果, (RGD)₃-tTF融合蛋白组的肿瘤组织荧光密度(图5A)远大于RGD-tTF融合蛋白组(图5B)。同时, 正常组织肝脏和tTF组均没有荧光。这说明了(RGD)₃-tTF融合蛋白通过配体RGD特异性结合

$\alpha_v\beta_3$ 的途径选择性地结合到结肠癌裸鼠模型肿瘤血管, 不会被肝脏等正常组织吸附, 而且(RGD)₃-tTF融合蛋白选择性结合结肠癌肿瘤血管的能力高于RGD-tTF融合蛋白。本实验将裸鼠的肿瘤、肝脏组织切片, 再用荧光标记的融合蛋白处理, 结果显示(RGD)₃-tTF融合蛋白能选择性结合结肠癌肿瘤血管。先将荧光标记的融合蛋白静脉注射到裸鼠, (RGD)₃-tTF融合蛋白在体内能否选择性结合结肠癌肿瘤血管, 有待进一步实验证实。

近年来大肠癌的发病率在我国呈上升趋势, 分子靶向药物治疗晚期结肠癌是一个引人注目的进展^[14]。本研究结果表明: (RGD)₃-tTF融合蛋白在保留组织因子凝血活性的同时能够高效、特异地结合 $\alpha_v\beta_3$, 选择性地结合到结肠癌肿瘤血管。这一结果为tTF作为效应因子的肿瘤血管分子靶向治疗策略在结肠癌的运用提供了实验基础和理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Bieker R, Padro T, Kramer J, et al. Overexpression of basic fibroblast growth factor and autocrine stimulation in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7241-7246.
- [2] Huang X, Molema G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. *Science*, 1997, 275 (5299): 547-550.
- [3] Huang X, Ding WQ, Vaught JL, et al. A soluble tissue factor-annexin V chimeric protein has both procoagulant and anticoagulant properties [J]. *Blood*, 2006, 107(3): 980-986.
- [4] Kessler T, Schwöppe C, Liersch R, et al. Generation of fusion proteins for selective occlusion of tumor vessels [J]. *J Curr Drug Discov Technol*, 2008, 5(1): 1-8.
- [5] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries [J]. *Nature*, 1996, 380 (6572): 364-366.
- [6] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 377-380.
- [7] Haubitz M, Brunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34 (4): 1124-1126.
- [8] Hische EA, Tutuarima JA, van der Helm HJ. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid [J]. *Clin Chem*, 1981, 27 (8): 1427-1430.
- [9] Kessler T, Bieker R, Padro T, et al. Inhibition of tumor growth by RGD peptide-directed delivery of truncated tissue factor to the tumor vasculature [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (17): 6317-6324.
- [10] Dienst A, Grunow A, Unruh M, et al. Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1 targeted

- recombinant fusion proteins [J] . J Nat Cancer Inst, 2005, 97(10):733-747.
- [11] Huang FY, Li YN, Wang H, et al . A fusion protein containing murine vascular endothelial growth factor and tissue factor induces thrombogenesis and suppression of tumor growth in a colon carcinoma model [J] . J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(8): 602-609.
- [12] Hu P, Yan J, Sharifi J, et al. Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis [J] . Cancer Res, 2003, 63 (16): 5046-5053.
- [13] Koivunen E,Wang B,Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes:ligand specificities of the RGD-directed integrins [J] .Biotechnology(NY),1995,13(3):265-270.
- [14] 周建凤, 陈书长, 白春梅,等. 影响晚期大肠癌预后的多因素分析 [J] . 中国癌症杂志, 2007, 17(8): 633-636.

(收稿日期 : 2009-07-07 修回日期 : 2009-09-08)