

重组人干扰素内皮抑制肽融合蛋白抗肿瘤药效的研究

刘贺煜¹ 王莹² 刘锦辉¹ 姜媛媛² 黄炎² 李会成¹

(1. 哈药集团生物工程有限公司, 哈尔滨 150020) (2. 哈药集团技术中心, 哈尔滨 150020)

摘要:目的 考察融合蛋白 I30 肽抗肿瘤的效果, 为 I30 肽后续开发提供实验支持。方法 使用 NIH 小鼠, 取 4 只小鼠腹腔注射 H₂₂ 瘤株, 1 周时处死所有小鼠, 取腹水。另取 40 只小鼠, 每只腋下注射腹水 0.2 mL, 细胞浓度为 1×10^6 个/mL。接种后 4 h 开始给药。将腋下注射小鼠随机分为 4 组: IFN 组, 皮下注射干扰素 9×10^5 IU/只; I30 高剂量组, 皮下注射 I30 80 μ g/只; I30 低剂量组, 皮下注射 I30 30 μ g/只; 阴性对照组, 皮下注射等体积生理盐水。连续给药 16 d。停药后 2 h, 处死所有动物, 再解剖皮下瘤块称重。结果 I30 给药组具有明显的治疗效果, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 I30 肽具有抗肿瘤的作用。

关键词: 干扰素; 内皮抑素; 融合蛋白; 抗肿瘤

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0052-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.011

肿瘤新生血管可为不断浸润生长的原发肿瘤提供营养, 它们在肿瘤的发展转移过程中起到重要的促进作用。IFN 具有抗肿瘤血管生成、抑制肿瘤转移的作用^[1]。

内皮抑素是由胶原蛋白 XIII 羧基末端的 184 个氨基酸组成的一种内源性血管生成抑素, 于 1997 年由 O'Reilly 等发现。它能特异性地抑制内皮细胞的增殖和血管的生成, 从而达到抑制肿瘤生长和转移的作用^[2]。本实验所使用的 30 肽, 是一种具有 30 个氨基酸的内皮抑素。已有研究证实, 内皮抑素活性区主要在 N 端的 1~27 个氨基酸上^[3]。而 30 肽是一种人工合成的人内皮抑素, 它保留内皮抑素的活性, 而分子量大大减少。

重组人干扰素内皮抑制肽融合蛋白(以下简称 I30), 是由干扰素(Interferon, IFN)和重组人内皮抑素(以下简称 30 肽)组成的一种融合蛋白。干扰素和 30 肽在抗肿瘤方面有着相近似的作用机理, 将它们制成融合蛋白, 有着协调作用, 增强抗肿瘤的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养环境

实验动物: NIH 小鼠体质量 18~22 g, 雌性, 购

于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2015-0001]。实验场所为本公司(哈药集团生物工程有限公司)实验室[SYXK(黑)2015-008]。⁶⁰Co 灭菌全价颗粒饲料, 购于北京科澳协力饲料有限公司[SCXK(京)2014-0010], 饮用水为灭菌水, 自由采食和饮水。

1.2 试剂与材料

肿瘤瘤株: H₂₂ 瘤株由本公司(哈药集团生物工程有限公司)实验室提供。

1.3 实验药品

干扰素 IFN(哈药集团生物工程有限公司生产), 干扰素 30 肽融合蛋白(I30)(哈药集团技术中心基因工程实验室制备), 30 肽(哈药集团技术中心基因工程实验室制备)。

1.3 实验方法

1.3.1 荷瘤小鼠模型制作: 取 4 只小鼠腹腔注射 H₂₂ 瘤株, 1 周后处死所有小鼠, 取腹水。

另取 40 只小鼠, 腋下注射腹水 0.2 mL/只, 细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

1.3.2 实验动物分组与给药: 参考《细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则》等^[4-10]的实验方法设计实验方案, 接种后 4 h 开始给药。将腋下

收稿日期: 2018-05-24

作者简介: 刘贺煜(1981—), 男, 本科, 中级工程师, 研究方向: 新药研发药效实验。E-mail: hayaoshengwu@hotmail.com

通信作者: 李会成(1967—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向: 生物制药。E-mail: huichengli@hotmail.com

注射小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:IFN 组,皮下注射干扰素 9×10^5 IU/只;I30 高剂量组,皮下注射 I30 $80\text{ }\mu\text{g}$ /只;I30 低剂量组,皮下注射 I30 $30\text{ }\mu\text{g}$ /只;阴性对照组,皮下注射等体积生理盐水。连续给药 16 d。

1.3.3 小鼠肿瘤质量测定:停药后 2 h,处死所有动物,取下瘤块称重。

1.4 抑瘤率(%)计算

参考《细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则》^[4]设计计算公式。抑瘤率公式:抑瘤率=(1-T/C)×100%。(T:治疗组;C:阴性对照组)。

1.5 统计方法

表 1 各组小鼠肿瘤质量
Table 1 Tumor weight of mice in each group

组别 Group	动物数 <i>n</i>	平均瘤重/g Average tumor weight	抑瘤率/% Tumor suppressor rate
阴性对照组 control group	10	1.605±0.415	
IFN 组 * IFN group *	10	0.702±0.545	56.98
IFN-30 (30 μg) 组 * IFN-30 (30 μg) group *	10	0.397±0.469	76.09
IFN-30 (80 μg) 组 * IFN-30 (80 μg) group *	10	0.368±0.408	77.09

注: * 表示与对照组比较, * $P<0.05$
Note: * indicate compared with the control group, * $P<0.05$

3 讨论

肿瘤一直是医学治疗的难题。目前已有多个通过抑制血管生成的抗肿瘤药物上市,如世界上首个上市的恩度,在临床上获得了不错的疗效。肿瘤的产生同时伴着新生血管的生成,肿瘤需要肿瘤血管为其提供营养成分和运输代谢物。肿瘤的扩散转移同样需要肿瘤血管。抑制了肿瘤血管的生成,将会抑制肿瘤的生长与扩散。目前关于内皮抑素的作用机制尚未完全定论。根据已有的研究表明,内皮抑素与整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的结合在其活性机制中有着重要作用。内皮抑素通过其 N 末端与整合素 $\alpha_5\beta_1$ 结合,抑制 bFGF 诱导的 FAK/c-Raf/NAK1/2/p38/ERK1 丝裂活化蛋白激酶途径,从而发挥其活性作用^[2]。将内皮抑素 N-端的 27 个氨基酸核心序列,引入串联的 RGD 短肽,构成的新的肽链,命名为人血管内皮抑制肽。该肽在保持内皮抑素原有的抑制血管生成活性同时,由 RGD 序列赋予其抑制肿瘤细

胞生长与转移的活性,可增强其抗肿瘤效果,而且氨基酸序列较内皮抑素更为简单^[13]。而在成年人的身体中,几乎不会有新生血管生成,抑制血管生成的药物因此不会对人体产生副作用,其安全性远远高于细胞毒类抗肿瘤药物。抑制血管生成的药物药效好,副作用小,是未来抗肿瘤药物研发的一个重要的课题。

2 结果

应用 SPSS18.0 对实验数据进行统计分析,结果均使用均数±标准差($\bar{x}\pm s$),组间差异比较使用秩和检验法,选取 $\alpha=0.05$ 。

对照组小鼠平均瘤重为 1.605 g,大于 1 g,表明本次实验肿瘤生长良好^[11]。试验结果表明 I30 高剂量组和低剂量组抑瘤率均高于 40%^[4],且其效果优于干扰素。在试验结束时,所有小鼠虽体型消瘦,但精神状态良好,饮食饮水正常。提示该融合蛋白具有抗肿瘤作用,见表 1。

干扰素 α 虽然被广泛用于抗病毒,但美国 FDA 最早批准干扰素 α 的适应症却是毛细胞白血病(毛细胞白血病是一种淋巴系统的恶性肿瘤,由于此种白血病细胞在显微镜下,尤其在电子显微镜下其胞浆有明显的毛状突起,故称为毛细胞,因而命名为毛细胞白血病。广义上仍为一种特殊类型的慢性淋巴细胞白血病。毛细胞白血病主要见于老年男性,男女比例为 4:1)。研究表明,干扰素抗肿瘤作用机理中抑制肿瘤血管生成和 30 肽抗肿瘤的作用机理接近。IFN 可抑制 VEGF、b-FGF、MMP(基质金属蛋白酶)的表达,是其抗血管生成的重要机制之一。IFN 能够降低 VEGF、b-FGF 等血管形成因子的产生,减

少肿瘤新生血管形成^[14]。

细胞因子可以介导机体多种免疫反应,如肿瘤免疫、感染免疫、移植免疫、自身免疫及造血系统等过程中发挥着重要的作用。细胞因子的作用具有多相性、网络性的特点,它们不仅可以单独地发挥生物学活性,而且不同的细胞因子之间还有相互协调和相互制约的作用,利用细胞因子的这一特点,人们可以根据自己的设想,通过基因融合等技术创造出自然界原本不存在的活性更佳的细胞因子融合蛋白^[16]。目前 FDA 已经批准了不少融合蛋白类药物上市。如 Enbrel(依那西普/etanercept),在治疗类风湿性关节炎已取得了很不错的临床效果。随着基因工程技术的成熟与应用,两个甚至多个不同基因之间很容易做到相互串联或彼此镶嵌,形成嵌合基因,一旦表达成产物则获得融合蛋白^[15]。

本次试验结束时,给药组和阴性对照组小鼠,均是体型消瘦,但状态良好,提示了 I30 的毒性较小。I30 的作用为抑制血管生成。在成年人的身体中,几乎不会有新生血管生成,抑制血管生成的药物因此不会对人体产生副作用。

本次实验没有采用裸鼠接种人源瘤株的方法。是因为本课题还处于前期研究的阶段,并没有进入到通过动物实验来筛选抗肿瘤谱的阶段。在后续研究中,采用通过把患者的肿瘤转移到免疫缺陷小鼠获得人源性肿瘤异种移植(PDX)的小鼠模型^[12]来进行筛选。

在接种瘤株后,并没有采用等小鼠肿瘤生长到一定程度后再给药的方式。因为小鼠肝癌 H₂₂ 细胞是一种鼠源的恶性肿瘤,在小鼠体内生长极快。和接种人源瘤株不同,H₂₂ 几乎均能成功生长。本次试验阴性对照组平均瘤重(1.605±0.415) g,也表明肿瘤生长良好。即便是细胞毒类药物也无法抑制肿瘤最后阶段的生长,此时已无法对供试品进行评价。所以需在肿瘤长至无法抑制之前,终止试验。鼠源瘤株大多会选择阴性对照组瘤重为 1 g 时做为试验终至时间^[11]。而 H₂₂ 在 5~8 d 即可长到 1 g。如果采用肿瘤体积达到 100~300 mm³ 后再给药,会导致给药时间短,有些药物可能会因为给药时间短而药效不理想。另一方面也打算将 I30 用于肿瘤的早期治疗,故采用了接种后马上给药的方式。

选择已上市药物作为阳性对照药,可以比对在研药物和已上市药物的药效的差异。为在研药物市场定位提供数据支持,也同时为将来的学术推广提

供试验数据。故本次试验选择了已上市的干扰素作为阳性对照药。IFN 抑制肿瘤血管生成和 30 肽抗肿瘤的作用机理接近,融合蛋白可以形成协同作用。I30 是利用基因工程的方法将干扰素和 30 肽通过接头序列(linker)连接起来的一种细胞因子重组融合蛋白,不仅可以提高两者的治疗效果。而且降低 IFN 的使用量,降低使用 IFN 带来的副作用。

参考文献

- [1] 阚奇伟,刘伦旭.干扰素抗肿瘤作用的研究[J].海南医学院学报 2010,16(9):1241-1244
- [2] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth [J]. Cell, 1997, 88(2):277-285.
- [3] 郭红艳,刘秀财,李淑艳.内皮抑素 30 肽对 HepG2 细胞黏附、侵袭能力影响的机制研究[J].中国现代医学杂志,2016,26(4):11-17.
- [4] 细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则[S], 2006 年.
- [5] 王洪坤,杨燕萍,贾友冀,等.胫骨内注射肿瘤细胞法构建骨肉瘤动物模型的研究进展[J].中国癌症防治杂志,2013,5(2):173-176.
- [6] 吴志平,石家齐,由慧娟,等.N-甲基亚硝基脲诱导大鼠膀胱肿瘤动物模型的实验研究[J].贵州医药,2012,36(3):205-208.
- [7] 朱建宁,吴开杰,贺大林,等.膀胱肿瘤动物模型的比较及合理选[J].中华实验外科杂志,2013,30(6):1323-1324.
- [8] 刘俊勇,彭芳.多药耐药性肿瘤动物模型的评价[J].医学综述,2015(21):3905-3908.
- [9] 吕文岚,于美丽,薛钧尘,等.长效植入剂对膀胱肿瘤动物模型的抑制作用[J].医学信息旬刊,2013,26(15):478.
- [10] 韩成龙.基于肿瘤动物模型的临床前研究新模式初探[D].南京:南京大学,2012.
- [11] 徐叔云.药理实验方法学(第三版)[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [12] 邱业峰,赵志兵,法云智.人源性肿瘤异种移植的小鼠模型在肿瘤精准医学中的应用[J].实验动物科学,2016,33(4):78-83.
- [13] 李郑武,贾娜,张海涛,等.人血管内皮抑制肽抑制小鼠及裸鼠移植瘤术后残瘤生长的药效学研究[J].中国药理学杂志,2011,46(22):1715-1718.
- [14] 曾洁萍,余勤,梁茂植,等.干扰素抗肿瘤作用研究进展[J].现代预防医学,2008,35(18):3650-3652.
- [15] 闫璐颖,陈建华,张新国.融合蛋白连接肽的研究进展[J].生物技术,2008,18(3):92-94.
- [16] 刘岩,于涟.基因融合技术及其应用[J].农业生物技术学报,2006,14(2):273-278.

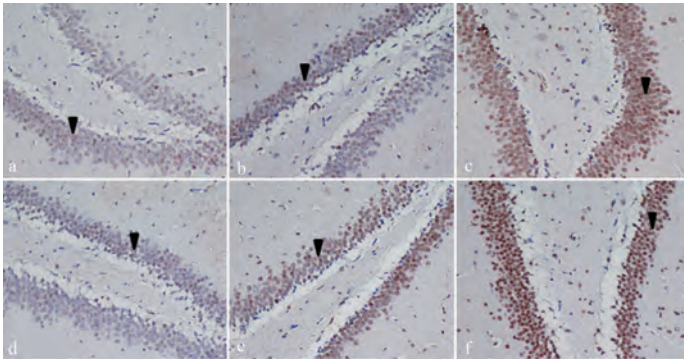


图 3 海马区 DRA2 表达情况 (深棕色, ×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.3 Expression of DRA2 in hippocampus
(dark brown, ×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group

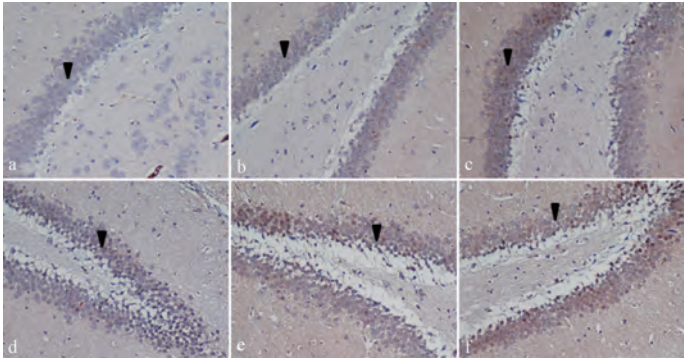


图 4 海马区 CHRM1 表达情况 (×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.4 Expression of CHRM1 in hippocampus (×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group

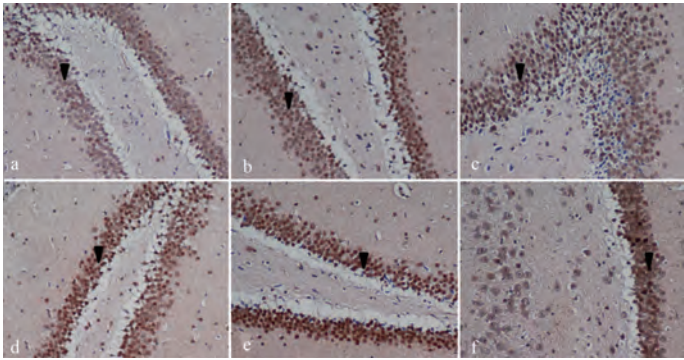


图 5 海马区 ADRA2α 表达情况 (×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.5 Expression of ADRA2α in hippocampus
(dark brown, ×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group