

## Citrostatin 的构建与活性分析

马丽, 杨生生, 杨志峰, 陈欢, 蔡在龙\*

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的:本研究拟通过人工化学合成技术将 2 个不同机制发挥抗癌作用的小肽结合起来,产生一个融合肽 Citrostatin,并研究其生物学活性,以期获得具有双重抗肿瘤功能的抗肿瘤肽。方法:化学合成 Citrostatin 并经 HPLC 分离纯化,通过内皮细胞杀伤实验、细胞毒活性分析、体外管状结构生成抑制实验,以及鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制实验分析 Citrostatin 的生物学活性。结果:Citrostatin 可明显抑制内皮细胞 ECV304 的增殖( $ED_{50}$  为  $6.2 \mu\text{g/ml}$ ),有效杀伤肿瘤细胞 1990 及 NCF H640 细胞( $ED_{50}$  分别为  $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $16 \mu\text{g/ml}$ ),并明显抑制体外管状结构生成及鸡胚绒毛尿囊膜血管的生成。结论:本研究成功构建并合成了抗肿瘤融合 48 肽 Citrostatin,研究表明该融合肽同时具有抑制肿瘤组织新生血管形成和直接杀伤肿瘤的双重活性。

**[关键词]** Citrostatin; 融合肽; 抗肿瘤药; 血管生成抑制

**[中图分类号]** R 979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1249-05

### Construction of Citrostatin and its activity analysis

MA Li, YANG Sheng-sheng, YANG Zhi-feng, CHEN Huan, CAI Zai-long\* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct a new recombinant anti-tumor peptide Citrostatin, which consists of 2 anti-tumor domains (by different mechanism), and to study its biological activity, in an effort to search for a peptide with double anti-tumor efficiency. **Methods:** Citrostatin, a 48-amino acid peptide, was artificially synthesized. After purified by HPLC, Citrostatin were subjected to the following tests separately: inhibition of endothelial cell proliferation, MTT test of cytotoxicity, inhibition of endothelial cell tube formation on ECMatrix™, and anti-angiogenesis test in chick chorioallantoic membrane. **Results:** Citrostatin significantly inhibited the proliferation of human endothelial cell ECV304 ( $ED_{50} = 6.2 \mu\text{g/ml}$ ,  $P < 0.05$ ). It also significantly inhibited the proliferation of human tumor cells 1990 and NCF H640 ( $ED_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$ ,  $16 \mu\text{g/ml}$ , both  $P < 0.05$ ), and the inhibitory effect became more marked ( $P < 0.01$ ) with the increase of Citrostatin concentration. The inhibitory effects of Citrostatin on endothelial cell tube formation and angiogenesis in chick chorioallantoic membrane were also confirmed. **Conclusion:** An anti-tumor 48-amino acid peptide, Citrostatin, has been successfully synthesized and purified, which shows an anti-angiogenesis effect and a direct cytotoxic effect toward tumor cells.

**[KEY WORDS]** Citrostatin; fused peptide; antineoplastic drugs; antiangiogenesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1249-1253]

原发肿瘤的生长取决于肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞的数量,两者相互依存,任何一种细胞群的增减都会导致另一细胞群的相应增减,通过抑制肿瘤组织新生血管的形成(angiogenesis)可以有效控制肿瘤生长和转移<sup>[1]</sup>。T8(Tumstatin69-95)来源于组织中的胶原蛋白,是基底膜型胶原<sub>3</sub>链 C 末端的 27 肽衍生物<sup>[2]</sup>,通过选择性地与内皮细胞膜上的  $\alpha_3\beta_3$  受体结合,抑制内皮细胞的蛋白质合成,诱导细胞凋亡,抑制新生血管的形成,进而抑制肿瘤生长。

Citropin1.18 来源于蓝岭树蛙的皮腺分泌物,是 16 个氨基酸残基组成的活性小分子肽,可通过其 C 末端 -螺旋作用于肿瘤细胞,造成膜内分子位移、

质膜穿孔,从而杀伤肿瘤细胞。体外实验表明<sup>[3,4]</sup>:Citropin1.1 及其衍生物对约 60 种人类肿瘤细胞具有显著的抗肿瘤活性( $IC_{50}$  为  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  mol/L)。

T8 通过抑制肿瘤组织新生血管的形成,抑制肿瘤的生长,Citropin1.1 则具有广谱抗肿瘤作用,可以选择性杀伤肿瘤细胞。我们根据柔性肽可保持各

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研计划(04DZ19207)。Supported by the Shanghai Foundation for Development of Science and Technology (04DZ19207)。

**[作者简介]** 马丽,硕士生,助理研究员。

E-mail: marycn@gmail.com

\*Corresponding author. E-mail: czl8003@hotmail.com

片段结构功能域的相对独立性的原理,利用 Tumstatin 和 Citropin 1.18 不同的抗肿瘤机制,设计合成了融合肽 Citrostatin,并通过 HPLC 纯化后进行体外实验,观察 Citrostatin 的生物活性及作用机制。结果表明,融合肽具有杀伤肿瘤细胞和抑制新生血管的双重功能。

## 1 材料和方法

1.1 材料和试剂 *In Vitro* Angiogenesis Assay Kit 购自 Chemicon 公司;MTT 试剂、小牛血清白蛋白(BSA)购自华舜生物工程公司;BCA-100 protein quantitation kit 购自申能博彩生物科技有限公司;人脐静脉血管内皮细胞系 ECV-304、小鼠成纤维细胞 L-929、人胰腺癌细胞 1990 及人肺癌细胞 NCF-H640 均由本教研室保存;鸡胚购于上海农业科学研究院,其他化学试剂为 AR 级产品。

1.2 仪器 Waters 600 HPLC 仪(Waters 公司);Symmetrypreo™ C18(19 mm ×150 mm,7 μm)层析柱(Waters 公司);Thrombolyzer Racd Rator(德国 Benhk Elektronik 公司);低温离心机(SORVALL RC 5C Plus 杜邦公司);LG-5 真空冷冻干燥机(上海市离心机械研究所);CECIL CE 2021 分光光度仪。

1.3 Citrostatin 肽合成 该多功能肽结构模式如下:Tumstatin (T8) 序列-多聚甘氨酸的桥连-Citropin 1.18 序列,即(N)-Lys Gln Arg Phe Thr Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Phe Ala Val Ile Lys Lys Val Ala Lys Val Ile Lys Lys Leu-(C)。由吉尔生化有限公司合成 48 肽粗品。

1.4 Citrostatin 的分离纯化 Citrostatin 肽粗品溶于 10 ml 无菌蒸馏水,分为 2 ml 进样依次 HPLC 纯化:采用 Waters 600 泵,996PDA 检测器及 HSV4.0 色谱数据工作站处理数据。采用 Symmetrypreo™ 的 C18 柱,流动相 A(10% 浓度乙腈,含 0.1% TFA),B(100% 乙腈,含 0.1% TFA)。用 A 溶液充分平衡后,以 30 min 10%~100% 乙腈(含 0.1% TFA)线性梯度(洗脱流速为 10 ml/min)洗脱,收集活性峰成分,将各活性峰收集液混匀,每管 2 ml 分装,冷冻干燥后即得 Citrostatin 纯品。取其中一管纯品嵌合肽冻干粉溶于 500 μl 的生理盐水,

取 5 μl 进行浓度测定。用小牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,在 562 nm 处测标准品液的光密度,绘标准 BCA 曲线,计算嵌合肽样品的含量。

### 1.5 Citrostatin 的活性测定

1.5.1 内皮细胞杀伤实验 ECV304 内皮细胞接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μl,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,加入不同浓度的药物培养液 100 μl,Citrostatin 浓度分别为 1.5、3.1、6.2、12.5、25、50、100 μg/ml,以 PBS 为空白对照,共同孵育 48 h 后,经 MTT 显色测定波长 570 nm 处的光密度值(D)。根据所得到的 D 值计算 Citrostatin 对内皮细胞 ECV304 的抑制率。抑制率(%) = (D<sub>空白对照组</sub> - D<sub>实验组</sub>) / D<sub>空白对照组</sub> × 100%。

1.5.2 细胞毒活性分析 取对数生长期的成纤维细胞 L-929、肿瘤细胞 1990、NCF-H640 制成细胞悬液,细胞密度为 (2~2.5) × 10<sup>5</sup>/ml,100 μl/孔接种 96 孔细胞培养板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,观察到孔中细胞长至占各孔表面积的 70%~80% 时,在上述 RPMI 1640 完全培养基中加入放线菌素 D,使终浓度为 1.5 μg/ml,配成样品稀释液,浓度分别为 3.12、6.25、12.5、25、50、100 μg/ml,以 PBS 为空白对照,将加好样品的 96 孔板置 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 22 h,弃除培养板中的培养基,每孔加入 100 μl 染色液(1.5 mmol/L 结晶紫)染色 20 min。洗去染色液,充分干燥后,每孔加入 100 μl 33% 浓度的冰醋酸,充分振荡,于 595 nm 处测定各孔 D 值。

1.5.3 体外管状结构生成抑制实验 收集内皮细胞 ECV304 加在 ECMatrix™ 固态培养基的表面(内皮细胞在 ECMatrix™ 上培养时,可迅速排列并形成中空的管状结构<sup>[5]</sup>),每孔接种细胞 5 000~10 000 个,同时每孔加完全培养基 100 μl。用完全培养基稀释样品,按 0.2、1、5、10 μg/ml 的浓度每孔 50 μl 加入细胞悬液中,PBS 作为对照。经 4~6 h 的培养后,在光学显微镜下拍照。按照 ECMatrix™ 试剂盒使用说明的标准,对每孔 3 个随机视野的网状结构进行评价。

1.5.4 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制实验 将受精 5 d 的鸡蛋表面消毒后,用照卵灯选择发育良好的鸡胚,在胚头右下方约 10 cm 处用小砂轮磨切开窗,暴露出绒毛尿囊膜。将载有样品的甲基纤维素小碟放在绒毛尿囊膜血管较少的部位。继续孵化

3 d后将鸡胚绒毛尿囊膜取下制作标本,照像记录结果。以给药点为中心,计数半径间隔 5 mm 区域的血管数,计算 3 个区域。

1.6 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组间用非配对 *t* 检验比较均数差异的显著性。

## 2 结果

2.1 融合肽的分离纯化 合成的融合肽经质谱分析  $M_w = 5\ 270.03$ ,与理论相对分子质量  $5\ 269.25$  基本吻合,但纯度(40%)较低。通过 HSV4.0 色谱数据工作站提供的实时检测曲线,观察样品色谱峰保留时间为 17.123 min,收集洗出液,并于峰下降结束时停止收集(图 1)。经与 BSA 标准曲线比对,Citrostatin 纯度达到 95%。

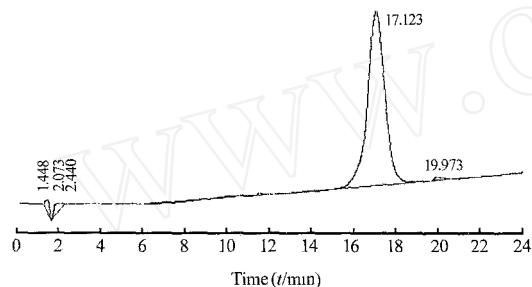


图 1 Citrostatin 经 HPLC 纯化后的图谱

Fig 1 Purification of Citrostatin by HPLC

Symmetrypreo™ C18 column: 19 mm × 150 mm; Flow rate: 10 ml/min; Equilibration buffer: 0.1% TFA in ddH<sub>2</sub>O; Elution buffer: 0.1% TFA in acetonitrile

### 2.2 融合肽的活性测定

2.2.1 内皮细胞杀伤实验 Citrostatin 对内皮细胞增殖的抑制呈剂量依赖性,根据抑制率公式计算,其半效抑制浓度为  $6.2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。与 PBS 对照组相比, $1.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  的 Citrostatin 即可明显抑制内皮细胞 ECV304 的生长( $P < 0.05$ )。随着 Citrostatin 的浓度的升高,对内皮细胞 ECV304 增殖的抑制逐渐增强,呈显著性差异( $P < 0.01$ )。

2.2.2 细胞毒活性 根据酶联检测仪上所得  $D_{595}$  的值,分别绘制了不同浓度的 Citrostatin 对正常成纤维细胞 L-929、肿瘤细胞 1990、NCF H640 的细胞毒性曲线。都呈现出一定的剂量依赖性,随着剂量的增加,细胞毒作用的表现越明显,具有明显差异( $P < 0.05$ )。通过线性回归分析,对 L-929 细胞、1990 细胞和 NCI-H640 细胞,Citrostatin 的  $ED_{50}$  分

别为 614、50 和  $16\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。可见,Citrostatin 对肿瘤细胞 1990、NCF H640  $ED_{50}$  所需的浓度比正常成纤维细胞 L-929  $ED_{50}$  所需的浓度要低很多(图 2)。

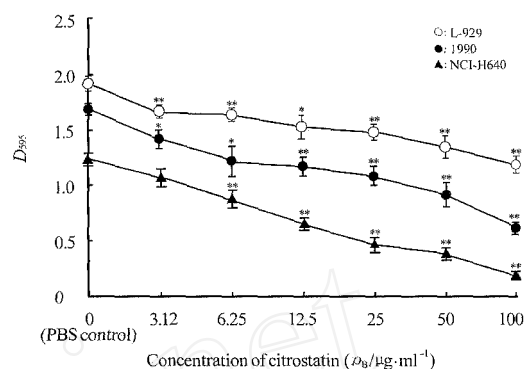


图 2 Citrostatin 对细胞的毒性作用

Fig 2 Cytotoxicity test of Citrostatin

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs PBS control group;  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2.3 内皮细胞管状结构生成抑制实验 在接种有 ECV304 细胞的 ECMatrix™ 培养孔中分别加入 0.2、1、5、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Citrostatin,培养 4 ~ 6 h。BSA 对照组(图 3A)形成复杂的管状网络结构,管状结构形成百分率为  $(98.3 \pm 4.2)\%$ 。Citrostatin 实验组可观察到管状结构数目减少或断裂等现象(图 3B、3C、3D),0.2、1、5、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Citrostatin 实验组管状结构形成百分率分别为  $(78.0 \pm 2.0)\%$ 、 $(49.0 \pm 3.0)\%$ 、 $(24.0 \pm 4.0)\%$ 、 $(9.7 \pm 1.5)\%$ ,与对照组相比有显著性差异( $P < 0.01$ ),并呈剂量依赖性。结果表明 Citrostatin 对 ECV304 管状结构形成有明显抑制作用。

2.2.4 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制实验 结果如图 4、表 1 所示:阴性对照组血管生长良好,血管分支适中;药物组在 3 个区域范围内的血管数目均显著减少,抑制效应具有明显的剂量依赖关系,结果表明 Citrostatin 能显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜新生血管生成。

## 3 讨论

本研究旨在通过人工化学合成技术将 2 个不同机制发挥抗癌作用的小肽结合起来,产生一个具有双功能的融合肽 Citrostatin,以期获得更好的抗肿瘤疗效。

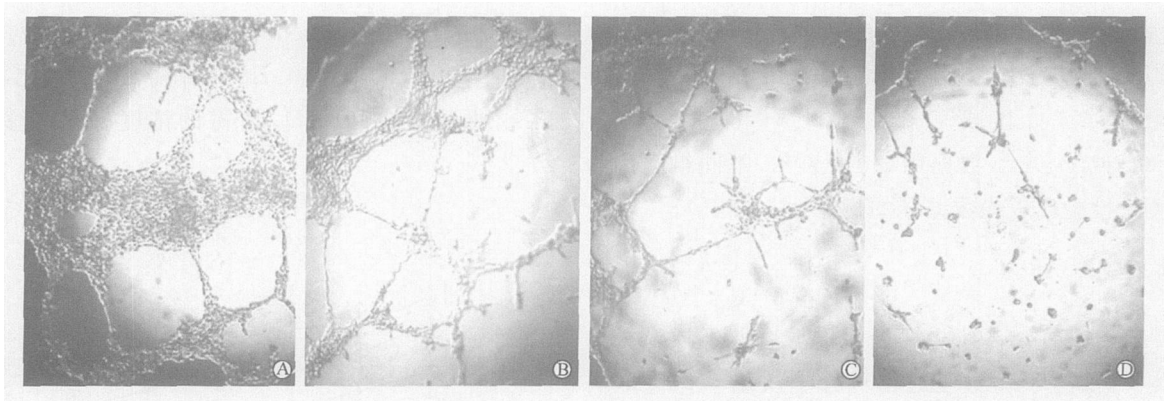


图3 Citrostatin 对内皮细胞 ECV304 管状结构形成的影响

Fig 3 Inhibition of ECV304 tube formation on ECMatrix™ by Citrostatin( ×25)

A: Negative control; B: 0.2 µg/ml Citrostatin; C: 1 µg/ml Citrostatin; D:10 µg/ml Citrostatin

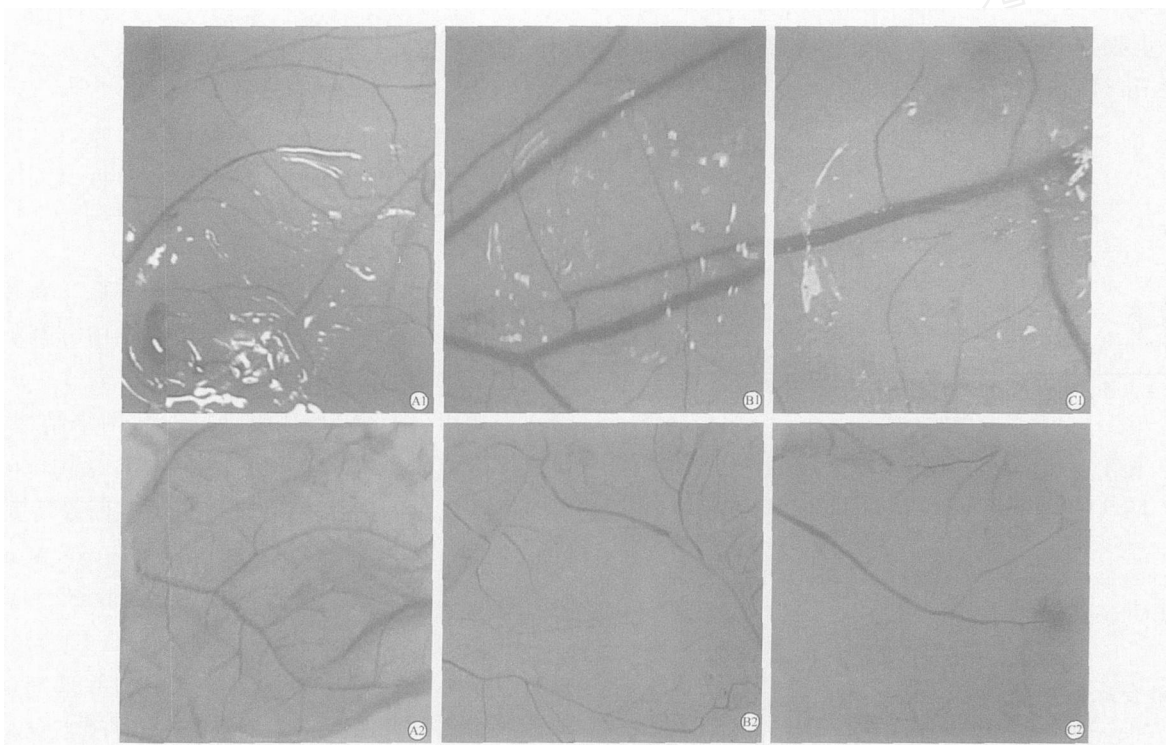


图4 Citrostatin 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

Fig 4 Effect of Citrostatin on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane

A1 ,A2 :Negative control; B1 ,B2 :1 µg/ml Citrostatin; C1 ,C2 :10 µg/ml Citrostatin; A1 ,B1 ,C1 :Chick embryo CAMs *in vivo*; A2 , B2 , C2 : Chick embryo CAMs treated by 10 % methanol

表1 Citrostatin 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成计数的影响

Tab 1 Quantitative assessment of inhibitory effect of Citrostatin on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane

(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Quantity of blood vessels <sup>a</sup>		
	0-5 mm	5-10 mm	10-15 mm
Control	12.3 ±2.1	20.3 ±1.5	31.0 ±3.0
Citrostatin ( B/µg ·ml <sup>-1</sup> )			
1	7.3 ±1.5 *	13.0 ±2.0 *	20.0 ±4.0 *
5	5.0 ±1.0 **	10.3 ±2.5 **	19.7 ±3.5 **
10	4.7 ±1.5 **	7.0 ±1.0 **	11.7 ±1.5 **

<sup>a</sup>: The blood vessels were counted in 3 circle areas with different diameters; \* P<0.05, \*\* P<0.01 vs control group

位于 Citrostatin N 端的 T8(Tumstatin 69-95) 序列,是具有抗血管生成作用的 27 肽衍生物,将 Tumstatin 序列的 69 位的 Leu 突变成 Lys,与其他 Tumstatin 衍生物相比较,具有更好的易溶性,最近的研究表明 Tumstatin 45-132 及其衍生物可结合内皮细胞和肿瘤细胞上  $\alpha_3$  整合素<sup>[6]</sup>,从而靶向作用于肿瘤组织的血管内皮细胞,切断肿瘤血液供应。本研究结果表明 Citrostatin 可以明显抑制内皮细胞的增殖、促进内皮细胞的凋亡并抑制体外内皮细胞管状结构形成,从细胞水平和血管水平上反映了

Citrostatin 对肿瘤血管生成的抑制作用。柔性连接 Gly Gly Gly Gly Ser 由于其侧链较小,具有良好的伸展性,使连接于两端的多肽片段在空间结构上不易相互干扰,保持各结构域的正确折叠,最大限度地保持了其功能的实现。Citropin1.18 结合在融合肽的 C 末端,是因其 C 末端富含正电荷,可以靶向作用于富含负电荷的肿瘤细胞膜表面,直接杀伤肿瘤细胞。而细胞毒性实验结果也显示了 Citrostatin 保持了其广谱抗肿瘤的活性,尤其值得注意的是,其对成纤维细胞 L-929 的  $ED_{50}$  所需的浓度要远大于肿瘤细胞 1990、NCF H640  $ED_{50}$  所需的浓度,这就意味着 Citrostatin 对肿瘤细胞有一定的选择性杀伤作用,也实现了我们设计融合肽时,将 Citropin1.8 序列安排在融合肽的 C 末端,对肿瘤细胞有相对选择性的初衷。

综上所述,本实验设计并合成了同时具有抑制肿瘤组织新生血管形成和直接杀伤肿瘤的双功能的融合肽,通过细胞水平和半整体水平反映了 Citrostatin 的抗肿瘤活性。尽管 Citrostatin 融合肽在上述实验中是具有双功能的,但真正的挑战是确定此融合肽在体内的功能。下一步的工作是通过基因工程的方法大量制备融合肽,从体内、体外的不同方面更全面地检测其活性,运用肿瘤模型来证实

Citrostatin 是否有望成为治疗实体肿瘤的潜在药物。

#### [参考文献]

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*, 1997, 88:277-285.
- [2] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, et al. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis[J]. *Science*, 2002, 295: 140-143.
- [3] Doyle J, Brinkworth CS, Wegener KL, et al. nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270:1141-1153.
- [4] Wegener KL, Wabnitz PA, Carver JA, et al. Host defence peptides from the skin glands of the Australian blue mountains tree-frog *Litoria citropa*. Solution structure of the antibacterial peptide citropin 1.1[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 265:627-637.
- [5] Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, et al. Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell alignment in matrigel *in vitro* and angiogenesis *in vivo* [J]. *Lab Invest*, 1994, 71: 575-582.
- [6] Shahan TA, Ziaie Z, Pasco S, et al. Identification of CD47/integrin-associated protein and alpha(v)beta3 as two receptors for the alpha3( ) chain of type collagen on tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59:4584-4590.

[收稿日期] 2006-07-19

[修回日期] 2006-09-26

[本文编辑] 尹 茶

## 《临床基本技能操作常规手册》已出版

本书由王昌明、曾锦荣主编,根据卫生部制定的《高等医药院校五年制医学专业学生基本技能训练项目》和国家教育部《关于全国普通高等学校临床医学专业(五年制)主要课程基本要求》(试行)的有关规定编写而成,内容包括临床各科主要实验实习和临床诊断、治疗、预防及各种基本操作技术,有病史采集、医疗文书的书写、体格检查、化验检查、影像检查、特殊检查、常用诊疗操作常规、传染病处理等,是临床实习医师进行正确操作和准确诊断的一部范本。供临床实习医生、住院医生阅读、参考。

由第二军医大学出版社出版、发行,ISBN 7-81060-617-4,定价:26.00 元。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮编:200433