

内皮抑素-力达霉素辅基蛋白融合蛋白对乳腺癌、胰腺癌和食管癌的靶向性研究

姜文国¹, 李 毅², 张胜华², 甄永苏^{2*}

1. 滨州医学院 医药研究中心, 山东 烟台 264003

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究内皮抑素-力达霉素辅基蛋白融合蛋白(ES-LDP)对人乳腺癌、胰腺癌和食管癌组织的靶向性。**方法** 分别采用人体乳腺癌、胰腺癌和食管癌组织芯片,利用免疫组化的方法,研究ES-LDP与癌细胞的亲和力;并采用Image-Pro Plus 6.0软件计算吸光度值,进行统计分析。**结果** 与辅基蛋白比较,ES-LDP对乳腺癌、胰腺癌和食管癌亲和力显著增高($P < 0.001$)。在胰腺癌组织,这种亲和力也显著高于对正常组织的亲和力($P < 0.05$)。**结论** ES-LDP对不同组织器官,亲和力有所不同;在进行体内抗肿瘤活性评价时要注意选择合适的模型。

关键词: 内皮抑素; 力达霉素; 内皮抑素-力达霉素辅基蛋白融合蛋白; 组织芯片

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)08-0917-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.08.003

Targeting activity on breast cancer, pancreatic cancer, and esophageal cancer of endostatin-lidamycin fusion protein

JIANG Wen-guo¹, LI Yi², ZHANG Sheng-hua², ZHEN Yong-su²

1. Medicine and Pharmacy Center, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To study the targeting activity on human breast cancer, pancreatic cancer, and esophageal cancer of endostatin-lidamycin fusion protein (ES-LDP). **Methods** Multiple tissue microarrays of breast cancer, pancreatic cancer, and esophageal cancer were used. ES-LDP and its affinity was studied by immunohistochemical way. Additionally, the cases were analyzed by Image-Pro Plus 6.0 software. The absorbance was log transformed and mainly performed statistical analysis. **Results** ES-LDP had higher affinity than LDP to breast cancer, pancreatic cancer, and esophageal cancer ($P < 0.001$). Additionally, the affinity of ES-LDP to pancreatic tumor was higher than that of normal pancreatic tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** The binding activity of ES-LDP is different to kinds of tissues. The suitable models are necessary to investigate its antitumor activity *in vivo*.

Key words: endostatin; lidamycin; endostatin-lidamycin fusion protein; tissue microarray

内皮抑素选择性靶向新生血管内皮细胞,从而抑制肿瘤生长,是一种已经在实验和临床患者中应用的血管生成抑制剂。通常情况下,内皮抑素需要与细胞毒化疗药物联合使用^[1]。力达霉素是一种高效的抗肿瘤抗生素,它由辅基蛋白和发色团构成^[2]。为了同时发挥内皮抑素和力达霉素靶向肿瘤新生血

管和肿瘤细胞的作用,以及内皮抑素的抗血管生成活性和力达霉素的高细胞毒活性,本实验室设计了重组内皮抑素-力达霉素辅基蛋白融合蛋白(ES-LDP),并组装获得了与发色团结合的强化融合蛋白,初步研究了其抗肿瘤活性^[3]。为了进一步在多种肿瘤组织和模型继续研究其抗肿瘤作用,有针

收稿日期: 2015-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81450049); 山东省医药卫生科技发展计划资助项目(2014WS0486)

作者简介: 姜文国(1979—),男,副教授,从事肿瘤药理与生物技术药物研究。Tel: (0535) 6913395 E-mail: jiangwg@foxmail.com

*通信作者 甄永苏(1931—),男,中国工程院院士,从事肿瘤药理学、分子靶向治疗研究。Tel: (010) 83158065 E-mail: zhenysm@126.com

对性的开展临床前、临床应用研究, 本实验采用组织芯片技术, 在乳腺癌、胰腺癌和食管癌多种人体肿瘤组织开展实验, 研究 ES-LDP 与不同组织的亲和力及靶向性。

1 实验材料

1.1 组织芯片

组织芯片来自西安艾丽娜生物科技有限公司代理的 US Biomax 的产品。乳腺癌组织芯片包含 60 例浸润性导管癌, 9 例髓样癌和 3 例边缘组织 (产品编号 BC08013a)。胰腺癌及正常组织芯片包含 78 例腺癌, 腺泡-神经内分泌混合癌、肉瘤样癌、鳞状细胞癌、神经内分泌癌及腺泡细胞癌各 1 例, 腺鳞癌及类癌各 3 例, 实性假乳头状癌 2 例和 5 例正常胰腺组织 (产品编号 PA961a)。食管癌及正常组织芯片含 64 例鳞癌, 腺鳞癌 3 例, 腺癌 2 例, 黏膜表皮样癌 1 例和 10 例正常组织 (产品编号 ES807)。所有芯片均 1 例 1 点, 附基本临床资料、TNM 临床分期和病理分级。正常组织来源于同种组织, 但不是相同的患者。所有的组织在采集的时候都遵循最高的道德标准, 将全部的信息都告知捐献者, 并征得他们的同意, 保证遵循医疗标准保护捐献者隐私。

1.2 抗体与试剂

辅基蛋白和抗辅基蛋白抗体由本实验室制备, 内皮抑素 (质量浓度 2 mg/mL, 批号 20101223)、ES-LDP (质量浓度 4 mg/mL, 批号 20110601) 均由清华大学罗永章教授实验室制备并惠赠。西妥昔单抗 (批号 7661101) 购自德国 Merck 公司。抗 His-Tag 的抗体 (2A8) 购自 Abmart 公司。通用型超敏型二步法免疫组化检测试剂盒 (PV9000)、浓缩型 DAB 显色试剂盒 (ZLI-9018) 均为北京中杉金桥公司产品。

2 实验方法

2.1 免疫组化方法

将组织芯片在 60 °C 烤箱中烘烤 2 h。脱蜡, 水化; 3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min; 抗原热修复; 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭; 冲洗后加入内皮抑素、辅基蛋白、ES-LDP 孵育过夜, 浓度均为 0.05 mmol/L; 冲洗后分别加入抗 His-Tag 抗体和抗辅基蛋白抗体; 然后采用中杉金桥公司两步法免疫组化试剂盒进行检测, 接着采用 DAB 显色试剂盒显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在光镜下, 阳性细胞显示出棕褐色,

Leica 显微镜低倍镜下照相保存结果^[4]。

2.2 结果判断

相同光照条件、相同放大倍数下, 每个组织均单独保留 1 张全组织的照相结果。免疫组化照片采用 Image-Pro Plus 6.0 软件中的 Pathology 批处理程序进行计算棕褐色的累积吸光度 (*A*) 值^[5], 结合镜下照片确立阳性和阴性标准, 对阳性率和 *A* 值分别进行统计分析。

阳性率 = A 大于 500 万的病例数/总例数

2.3 统计方法

应用 SPSS 17.0 软件进行数据的统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较应用 *t* 检验, 多组均数比较应用方差分析, 均数之间比较采用 Sidak 法。等级资料的统计使用 χ^2 检验或者 Fisher's 精确检验。

3 实验结果

3.1 ES-LDP 与芯片结合的代表性免疫组化染色

采用西妥昔单抗作为标准品对照^[3], 并参考之前肺癌组织芯片阳性判断标准, 发现 ES-LDP 对不同肿瘤组织和正常组织的亲和力不同。选取 1 组代表性组织芯片免疫组化染色图片供比较, 见图 1。对胰腺癌来说, ES-LDP 对正常组织的亲和力低于对肿瘤组织的亲和力。

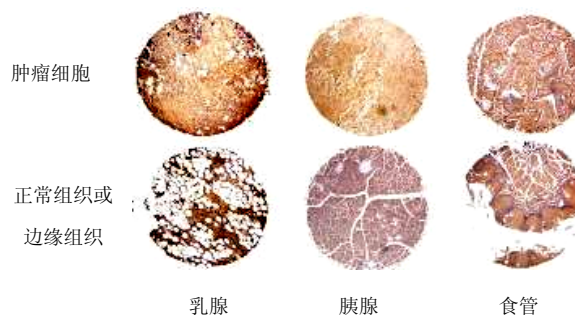


图1 ES-LDP 与乳腺、胰腺、食管正常组织、肿瘤组织的亲和力

Fig. 1 Binding affinity of ES-LDP with breast, pancreatic and esophageal normal tissue and carcinoma

3.2 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 与乳腺癌组织芯片的亲和力

实验过程中有 3 例组织脱落, 共统计 66 例乳腺癌组织和 3 例边缘组织 (表 1)。 χ^2 检验结果表明, 内皮抑素和辅基蛋白与乳腺癌组织的亲和力无显著差别; 但是 ES-LDP 对乳腺癌组织的亲和力显著高于内皮抑素和辅基蛋白 ($P < 0.001$)。采用 *A* 值进行

统计也获得了一致的结论。边缘组织只有 3 例,也观察到 ES-LDP 对其亲和力的增加,增加样本需进一步研究。

3.3 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 与胰腺癌组织芯片的亲和力

去掉 2 例脱落组织,共统计 89 例胰腺癌组织和 5 例正常组织(表 2)。 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验结果表明,内皮抑素和 ES-LDP 与胰腺癌组织的亲和力显著高于辅基蛋白($P<0.001$);并且也高于对正常组织的亲和力。采用 A 值进行方差分析统计也获得了相似的结论,比较 A 值发现,内皮抑素和 ES-LDP 对胰腺癌的亲和力显著高于正常组织。

3.4 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 与食管癌组织芯片的亲和力

去掉 1 例脱落组织,共统计 69 例食管癌组织和 10 例正常组织(表 3)。 χ^2 检验结果表明,内皮抑素和胰腺癌组织的亲和力显著高于辅基蛋白($P<0.05$);ES-LDP 阳性率高于辅基蛋白,但无统计学意义,正常组织各组间的差别也无显著统计学差别。而采用 A 值进行方差分析统计可以看到内皮抑素、ES-LDP 对食管癌组织的亲和力显著升高($P<0.001$);同时也看到内皮抑素、ES-LDP 对正常组织而言亲和力也显著升高;但正常组织与胰腺癌组织的亲和力相比无显著差别。

表 1 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 融合蛋白与乳腺癌组织芯片亲和力比较

Table 1 Comparison of proteins binding capability of endostatin, LDP, and ES-LDP in breast cancer tissue microarray

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	乳腺癌 ($n=66$)		边缘组织 ($n=3$)	
		阳性率	lgA	阳性率	lgA
内皮抑素	0.05	54.5	6.86±0.42	0	6.32±0.31
辅基蛋白	0.05	65.2	6.90±0.49	0	6.05±0.18
ES-LDP	0.05	96.7 ^{###}	7.32±0.22 ^{***}	100	7.36±0.19

与内皮抑素或辅基蛋白组比较:*** $P<0.001$ (方差分析);^{###} $P<0.001$ (χ^2 检验)

^{***} $P<0.001$ (analysis of variance) and ^{###} $P<0.001$ (χ^2 test) vs endostatin or LDP group

表 2 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 融合蛋白与胰腺癌组织芯片亲和力比较

Table 2 Comparison of proteins binding capability of endostatin, LDP, and ES-LDP in pancreatic carcinoma tissue microarray

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	胰腺癌 ($n=89$)		正常组织 ($n=5$)	
		阳性率	lgA	阳性率	lgA
内皮抑素	0.05	84.3 ^{###}	7.42±0.70 ^{***}	40 [^]	6.36±0.40 [▲]
辅基蛋白	0.05	49.4	6.52±0.50	0	5.70±0.90
ES-LDP	0.05	78.7 ^{###}	7.30±0.42 ^{***}	20 [^]	6.15±0.12 ^{▲▲}

与辅基蛋白组比较:*** $P<0.001$;与胰腺癌组比较:▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ (方差分析)。与辅基蛋白组比较:^{###} $P<0.001$ (χ^2 检验)。与胰腺癌组比较:[^] $P<0.05$ (Fisher's精确检验)

^{***} $P<0.001$ vs LDP group; ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ vs pancreatic cancer group (analysis of variance). ^{###} $P<0.001$ vs LDP group (χ^2 test). [^] $P<0.05$ vs pancreatic cancer group (Fisher's test)

表 3 内皮抑素、辅基蛋白和 ES-LDP 融合蛋白与食管癌组织芯片亲和力比较

Table 3 Comparison of proteins binding capability of endostatin, LDP, and ES-LDP in esophageal carcinoma tissue microarray

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	胰腺癌 ($n=69$)		正常组织 ($n=10$)	
		阳性率	lgA	阳性率	lgA
内皮抑素	0.05	88.4 [#]	7.89±0.08 ^{***}	90	7.65±0.13 ^{***}
辅基蛋白	0.05	73.9	7.26±0.32	60	6.87±0.35
ES-LDP	0.05	85.5	7.88±0.09 ^{***}	100	7.75±0.10 ^{***}

与辅基蛋白组比较:*** $P<0.001$ (方差分析);[#] $P<0.05$ (χ^2 检验)

^{***} $P<0.001$ (analysis of variance) and [#] $P<0.05$ (χ^2 test) vs LDP group

4 讨论

ES-LDP 是本课题组采用基因工程方法获得的兼具靶向性和肿瘤杀伤活性的融合蛋白。之前的研究中发现, ES-LDP 及其强化融合蛋白能够在体内外抑制肿瘤的生长和转移。尤其是 ES-LDP 能够在体内肺癌部位聚集, 并且对人肺癌组织具有更高的亲和力, 可以在一定程度上克服内皮抑素治疗肿瘤必须与化疗药物合用的缺陷^[3]。内皮抑素临床上主要用于治疗肺癌^[6-7], 但是也可以和多种化疗方案合用治疗胰腺癌、食管癌、乳腺癌、头颈部鳞癌及大肠癌等多种肿瘤^[8]。

于是采用组织芯片研究了 ES-LDP 与其他不同肿瘤组织的亲和能力。研究同时采用肉眼观察和计算机辅助图像分析手段对组织芯片进行数据资料的采集和统计。采用计算机辅助图像分析能够获得更客观, 更精确的数据资料, 便于进行统计^[5, 9]。

在乳腺癌组织芯片, 可以看到 ES-LDP 对乳腺癌亲和力显著增高, 与内皮抑素和辅基蛋白显著不同。因为内皮抑素和辅基蛋白均具有不同程度的靶向性, 所以 ES-LDP 的这种高靶向性是两种蛋白综合作用的结果, 但同时也可看到 ES-LDP 对肿瘤边缘组织的亲和力也同时升高了。这还需要进一步实验以明确 ES-LDP 对正常乳腺组织的亲和力。

在胰腺癌和食管癌组织芯片, 可以看出 ES-LDP 对其亲和力的升高主要是由于内皮抑素本身对于胰腺癌和食管癌组织亲和力较高, 从而使得融合蛋白亲和力升高。并且在胰腺癌组织, 这种亲和力也高于对正常组织的亲和力, 这说明 ES-LDP 在作为靶向药物时, 可以减少对正常组织的损害^[10]。在食管癌组织芯片中对正常组织的亲和力也是升高的, 通过 *A* 值的比较, 可以得出较为明确的结论, 这可能与食管的组织类型有关, 在选择食管癌模型进行治疗性实验的时候, 要注意其副作用。

总之, 对不同器官, ES-LDP 亲和力不同, 具有一定的选择性。不同组织表面靶点不同, 影响了融合蛋白的结合。这都增加了对内皮抑素和 ES-LDP 的认识, 为今后选择合适的模型进行体内

外实验提供了重要的指导。

参考文献

- [1] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 594-607.
- [2] Shao R G. Pharmacology and therapeutic applications of enediyne antitumor antibiotics [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2008, 1(1): 50-60.
- [3] Jiang W G, Lu X A, Shang B Y, *et al.* Genetically engineered endostatin-lidamycin fusion proteins effectively inhibit tumor growth and metastasis [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 479.
- [4] Cai L, Chen H, Miao Q, *et al.* Binding capability of the enediyne-associated apoprotein to human tumors and constitution of a ligand oligopeptide-integrated protein [J]. *J Biotechnol*, 2009, 144(2): 142-150.
- [5] Wang C J, Zhou Z G, Holmqvist A, *et al.* Survivin expression quantified by Image Pro-Plus compared with visual assessment [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2009, 17(6): 530-535.
- [6] Lu S, Li L, Luo Y, *et al.* A multicenter, open-label, randomized phase II controlled study of rh-endostatin (Endostar) in combination with chemotherapy in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(1): 206-211.
- [7] 陈 鹏, 李 凯, 梁 彦. 聚乙二醇重组人血管内皮抑制素注射液联合 TC 方案治疗晚期非小细胞肺癌的单中心、开放性 I 期临床安全性研究 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(4): 553-557.
- [8] 胡广原, 邹燕梅, 赵 荆, 等. 重组人血管内皮抑制素联合化疗治疗多种晚期恶性肿瘤 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(3): 256-258.
- [9] Lejeune M, Jaén J, Pons L, *et al.* Quantification of diverse subcellular immunohistochemical markers with clinicobiological relevancies: validation of a new computer-assisted image analysis procedure [J]. *J Anat*, 2008, 212(6): 868-878.
- [10] Chen C T, Yamaguchi H, Lee H J, *et al.* Dual targeting of tumor angiogenesis and chemotherapy by endostatin-cytosine deaminase-uracil phosphoribosyltransferase [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(8): 1327-1336.