

以 MMP 酶切位点为连接臂构建 Vasostatin 和 TRAIL 的融合蛋白及其生物学活性分析

郭爱云, 王梁华, 孙铭娟, 焦豫良, 任娜, 焦炳华*

(第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要 以基质金属蛋白酶(MMP)酶切位点(FLCLWA)为连接臂,采用重组 PCR 技术获得血管形成抑制素(vasostatin, V)和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL, T)的融合蛋白质编码序列,将该融合编码序列插入原核表达载体 pMAL-c2 中,重组质粒转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达,分别得到 MBP-VT 和 MBP-TV 融合蛋白, Amylose Resin 亲和层析柱纯化。初步纯化的融合蛋白 MBP-VT 在体外内皮细胞增殖抑制实验、肿瘤细胞凋亡诱导实验中显示了明显的活性,而 MBP-TV 的作用不明显;体外酶切实验和培养肿瘤细胞上清酶切融合蛋白的免疫印迹分析,证实融合蛋白 MBP-VT 皆能被正确酶切。上述结果表明成功表达了融合蛋白 VT,该融合蛋白具有双重抗肿瘤活性,并可在肿瘤高表达的 MMP 作用下裂解为 V 和 T。

关键词 血管形成抑制素; TRAIL; 融合表达; 基质金属蛋白酶(MMP)酶切位点; 体外酶切

中图分类号 Q78

Expression and Characterization of Vasostatin-TRAIL Fusions with a MMP Restriction Site Linker

GUO Ai-Yun, WANG Liang-Hua, SUN Ming-Juan, JIAO Yu-Liang, REN Na, JIAO Bing-Hua*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The sequences of vasostatin (V) and TRAIL (T) were amplified by recombinant PCR and fused with linker coding for FLCLWA of a restriction site of matrix metalloproteinases (MMPs), then inserted into a pMAL-c2 vector. The partially purified pMAL-VT and pMAL-TV fused proteins were obtained by transfecting the recombinant plasmids into the *E. coli* BL21 with IPTG induction, and amylose resin chromatography. The results indicated that MBP-VT substantially inhibited the proliferation of endothelial cells and exhibited a potent apoptosis-inducing effect in tumor cells, whereas MBP-TV showed none of these effect. As expected, bifunctional MBP-VT fusion proteins could be cleaved into MBP-V and T when treated with the supernatant of cultured tumor cells as demonstrated by Western blotting.

Key words vasostatin; TRAIL; fusion expression; restriction site of MMPs; digestion *in vitro*

细胞凋亡和血管生成与肿瘤的发生、发展、治疗及预后等密切相关,以细胞凋亡和血管生成作为靶点的抗肿瘤研究是多年来抗肿瘤治疗的热点研究领域。上世纪 70 年代, Folkman 等^[1,2]提出了“肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成”的论断,为抗肿瘤

瘤治疗开辟了新的思路。目前,已经发现了 20 多种内源性血管生成抑制因子。其中,血管形成抑制素(vasostatin)是 1998 年 Pike 等^[3]发现的 1 种血管生成抑制因子,为人钙网蛋白(calreticulin)N 端 1~180 位氨基酸的结构片段。Vasostatin 可有效且专一抑制内

收稿日期:2008-03-13;接受日期:2008-05-20

上海市科学技术发展基金项目(No. 024319115)

*联系人 Tel: (021) 65493936; E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

Received: March 13, 2008; Accepted: May 20, 2008

Supported by Science and Technology Development Foundation of Shanghai Municipal Government (No. 024319115)

*Corresponding author Tel: (021) 65493936; E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

皮细胞的增生,使新生血管无法生成,进而抑制肿瘤的生长,并证实 vasostatin 120~180 氨基酸残基有同样的作用. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL), 又称凋亡素 2 配体 (Apo-2L), 是肿瘤坏死因子超家族成员之一, TRAIL 全长由 281 个氨基酸组成, 活性部位为 114~281 位氨基酸组成的片段. TRAIL 可选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常组织却无毒性^[4~6]. 本研究将以基质金属蛋白酶 (MMP) 酶切位点 (HLGLWA) 为连接臂, 将两者的活性片段用重组 PCR 技术连接, 构建可同时发挥抑制肿瘤血管新生和诱导肿瘤细胞凋亡的双功能融合蛋白. MMPs 是 1 组重要的细胞外基质降解酶, 它通过对细胞外基质中不同成份的降解, 在肿瘤侵袭转移中起关键性作用. 明胶酶 (即 型胶原酶) 为其中重要的 1 类. 大量研究表明, 明胶酶 (MMP-2 或 MMP-9) 在多种恶性肿瘤组织、培养的肿瘤细胞及癌基因转化细胞中表达及活性增强, 体内、外侵袭实验均证实肿瘤细胞的高侵袭能力与明胶酶的活性增强有关^[7~9].

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞与质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3), 质粒载体 pMAL-c2、pBV220-TRAIL, 人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞株、人胰腺胆管癌上皮细胞 SW1990 株为本室保存, 人肝脏 cDNA 文库购自 Stratagene 公司.

1.2 试剂

少量质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物技术有限公司; PCR 试剂盒、各种限制酶及连接酶购自 TaKaRa 公司, 亲和层析柱 MBP (麦芽糖结合蛋白) 融合蛋白纯化柱 Amylose Resin Beads、兔 MBP 多克隆抗体购自 New England Biolabs 公司, MMP-2 购自 Calbiochem 公司, 羊抗人 TRAIL 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 羊抗兔和驴抗羊辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 分别购自 GenScript 和 KangChen 公司, RPMI 1640 培养基购自 Gibco GBL 公司, 新生牛血清 (FCS) 购自杭州四季青公司, 低分子量标准蛋白购自 Gibco GBL 公司, DNA Marker 购自天根生化科技有限公司, MBP、MBP-TRAIL 和 MBP-vasostatin_{120~180} (MBP-Vs) 蛋白质由本室构建.

1.3 引物设计

根据 GenBank 中的 vasostatin (GenBank No: AY047586) 和 TRAIL (GenBank No: NM-003811) 的编码序列, 设计 8 条引物, 引物 P1、P5 的 5 端引入 EcoR 酶切位点 (下划线), 引物 P2、P6 的 5 端引入

酶切位点连接臂 (下划线, 加粗), 引物 P3、P7 的 5 端引入与 P2、P6 互补的酶切位点连接臂 (下划线, 加粗), 引物 P4、P8 的 5 端引入 Sal 酶切位点 (下划线).

Vasostatin_{120~180}-TRAIL_{114~281} (VT) 的引物设计:

P1: 5-ACGAATTCACAATGACAGACATGCACGAGAC-3

P2: 5-TGCCCATATAATCCTAATGGGTTGTCTGGCCGCACAATC-3

P3: 5-CCATTAGGATTATGGGGCACTGAGAGAAAGAGGTC-3

P4: 5-ACGTCGACTTAGCCAACTAAAAAGGC-3

TRAIL_{114~281}-Vasostatin_{120~180} (TV) 的引物设计:

P5: 5-ACGAATTCACAATGGTGAAGAAAGAGGTC-3

P6: 5-TGCCCATATAATCCTAATGGGCCAACTAAAAAGGC-3

P7: 5-CCATTAGGATTATGGGGCAACAGACATGCACGAGAC-3

P8: 5-ACGTCGACTTAGTTGTCTGGCCGCACAATC-3

1.4 构建表达载体

以人肝脏 cDNA 文库和 pBV220-TRAIL 质粒为模板, 以 P1~P8 为引物, 采用重组 PCR 技术扩增获得融合蛋白质编码序列 VT 和 TV, 将该编码序列和表达载体 pMAL-c2 分别 EcoR 和 Sal 双酶切, 回收相应片段后, 用 T4 连接酶连接各个片段, 转化大肠杆菌 BL21, 酶切筛选, 重组质粒命名为 pMAL-VT 和 pMAL-TV, 送上海英骏生物技术有限公司测序.

1.5 pMAL-VT 和 pMAL-TV 的诱导表达

将测序正确的阳性克隆接种 LB 固体培养基 (含氨苄青霉素 100 mg/L), 在 37℃ 下培养 16 h, 挑取单个菌落接种 LB 液体培养基 (含氨苄青霉素 100 mg/L), 于 37℃ 振荡培养 12~14 h, 然后按 1:100 比例接种同样培养基, 在 37℃ 下振荡培养 4~6 h. 在培养至 A₆₀₀ 值为 0.5~0.8 后, 以 0.3 mmol/L IPTG 诱导 5 h, 以未诱导菌株作平行对照, SDS-PAGE 鉴定 MBP-VT 及 MBP-TV 表达.

1.6 融合蛋白 MBP-VT 和 MBP-TV 的纯化

将诱导表达的菌体重悬于过柱缓冲液 (0.02 mol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 超声破碎细胞 (300 W, 1~2 min), 12 000 r/min 离心收集上清, 10 倍柱体积过柱缓冲液平衡柱, 以 1 ml/min 将上清上样, 过柱缓冲液洗至基线恢复,

用洗脱液(过柱缓冲液 + 0.01 mol/L 麦芽糖)洗脱,收集洗脱液,SDS-PAGE 分析纯度,即得到初步纯化的融合蛋白 MBP-VT 和 MBP-TV.

1.7 细胞增殖抑制试验(MTT 法)

96 孔培养板每孔加 100 μ l 的 3×10^4 SW1990 细胞(RPMI 1640 + 10 % FCS 培养),置 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 培养箱过夜,24 h 后弃去培养液,每孔加 100 μ l 用培养液进行倍比稀释的纯化 MBP-VT 和 MBP-TV,MBP-TRAIL 为阳性对照,MBP 为阴性对照,每组平行 3 复孔,继续培养 24 h 后,将培养板中的培养液换成 0.5 mg/ml MTT 溶液,继续在 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 环境下培养 4 h 后弃上清,加 100 μ l DMSO 至完全溶解后,在 570 nm 酶标仪上检测. 计算抑制率(%) = $(A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{阳性对照}} \times 100 \%$,以同样的方法观察融合蛋白对 ECV304 细胞的作用.

1.8 MMP 体外酶切实验

将初步纯化的融合蛋白 MBP-VT 与购买的活性酶 MMP-2 按 30 : 1 比例加样于酶切反应缓冲体系(0.2 mol/L Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L CaCl_2 , 0.001 mol/L ZnCl_2),37 $^{\circ}$ C 下酶切 30 min 及 1 h,10 mmol/L EDTA 终止反应^[10],酶切反应产物 SDS-PAGE 鉴定分析.

1.9 肿瘤细胞内 MMP 酶切效应的免疫印迹分析

96 孔培养板每孔加 100 μ l 含 3×10^4 SW1990 细胞的培养液(RPMI 1640 + 10 % FCS),置 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 培养箱培养,48 ~ 72 h 后将培养上清轻轻吸到

另 1 新的 96 孔培养板中,每孔加 100 μ l 初步纯化的融合蛋白 MBP-VT,1 h 和 3 h 后,轻吸培养上清,做 Western 印迹分析,参照分子克隆实验指南^[11]的方法进行,分别加入兔 MBP 和羊抗人 TRAIL 多克隆抗体为一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,IBST 室温洗 3 次,加入羊抗兔和驴抗羊辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 1 h,IBST 室温洗 3 次,ECL 发光显影.

2 结果

2.1 合成编码 VT、TV 融合蛋白质的序列片段

以 P1、P2 为引物,以人肝脏 cDNA 文库为模板,PCR 获得带有酶切位点连接臂的 vasostatin_{120~180} 片段 A(204 bp, Fig. 1A),以 P3、P4 为引物,以 pBV220-TRAIL 为模板,PCR 获得带有互补酶切位点连接臂的 TRAIL_{114~281} 片段 B(525 bp, Fig. 1A),而后以 A、B 为模板,以 P1、P4 为引物,再次 PCR 就可得到带有酶切位点连接臂的 vasostatin_{120~180}-TRAIL_{114~281} 的融合蛋白质编码序列 VT(729 bp, Fig. 1A),用同样的方法获得了融合蛋白质编码序列 TV(729 bp, Fig. 1A).

2.2 重组表达载体的构建及鉴定

将融合蛋白质编码序列 VT、TV 及表达载体 pMAL-c2 分别用 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切后进行连接,产物转化大肠杆菌 BL21 宿主菌,挑取阳性克隆,经 PCR 和酶切鉴定融合编码序列的正确插入(Fig. 1B),测序结果及 DNA 序列自动分析证明读码框正确.

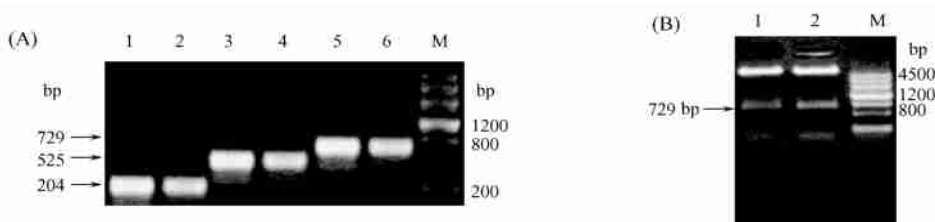


Fig. 1 The electrophoresis analysis of PCR products and restriction digestion of recombinant expression plasmid

(A) The fused encoding sequences VT and TV were amplified by PCR with P1 ~ P8 primers. 1,2: 204 bp were PCR fragments of vasostatin_{120~180}. 3,4: 525 bp were PCR fragments of TRAIL_{114~281}. 5,6: 729 bp were PCR fragments of VT and TV. M was TIANGEN marker. (B) Clones containing VT and TV encoding sequences were identified by restriction digestion. 1,2: Recombinant plasmid were digested with *EcoR* / *Sal*, showing 729 bp objective fragments. M: TIANGEN marker

2.3 重组蛋白的表达和纯化

挑选经测序鉴定正确的阳性克隆接种 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 mg/L),于 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 12 ~ 14 h,然后按 1 : 100 比例接种同样培养基,在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 4 ~ 6 h. 在培养至 A_{600} 值为 0.5 ~ 0.8

后,以 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h,并以未诱导菌株作阴性对照,做 SDS-PAGE 分析. 结果显示,阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21 菌后,约在 Mr 为 67 kD 处出现 1 条新的蛋白条带,经过纯化系统,SDS-PAGE 结果显示,得到基本纯化的融合蛋白(Fig. 2).

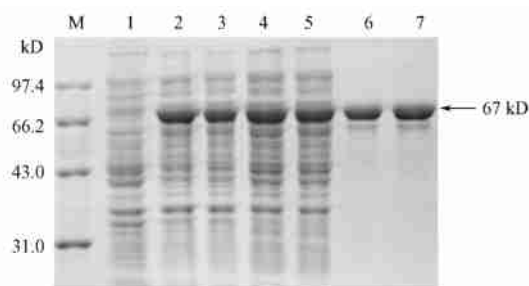


Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of MBP-VT and MBP-TV fusion proteins in *E. coli* BL21

The recombinant plasmid were transformed into *E. coli* BL21 and expressed after IPTG induction. The expressed proteins were purified and subjected to 10 % SDS-PAGE. The lane M shows the molecular mass marker. The lane 1 shows the total crude cell proteins of BL21 strain without plasmid. The lane 2 and 3 show a new 67 kD protein expressed in BL21 transformed with pMAL-VT and pMAL-TV after induction. The lane 4 and 5 show the total crude cell proteins of MBP-VT and MBP-TV expressed clones. The lane 6 and 7 show the 67 kD purified proteins MBP-VT and MBP-TV

2.4 融合蛋白对内皮细胞增殖抑制和诱导肿瘤细胞凋亡作用

融合蛋白作用于 ECV304 细胞 24 h 后,以 MBP-Vs 做阳性对照计算细胞增殖抑制率(见 Fig. 3A). 结果表明,融合蛋白 MBP-VT 和 MBP-TV 对内皮细胞的增殖抑制呈剂量依赖性, IC_{50} 约为 90 ng/ml,阳性对照 400 ng/ml MBP-Vs 的最大抑制率为 50 %;融合蛋白作用于 SW1990 细胞 24 h 后,MBP-TRAIL 为阳性对照,MBP 为阴性对照计算细胞相对活力(见 Fig. 3B). 结果表明,融合蛋白 MBP-VT 诱导肿瘤细胞凋亡呈剂量依赖性, IC_{50} 约为 12.5 ng/ml,而融合蛋白 MBP-TV 和蛋白 MBP 诱导肿瘤细胞凋亡的作用不明显.

2.5 MMP 体外酶切实验

初步纯化的融合蛋白 MBP-VT 与 MMP-2 按 30 : 1 混合加于酶切反应缓冲液中 37 °C 酶切 30 min 及 1 h,酶切反应产物 SDS-PAGE 分析结果见 Fig. 4,酶切融合蛋白后出现 3 条带,表明融合蛋白被部分切割,条带大小分别与 MBP-VT、MBP-Vs、TRAIL₁₁₄₋₂₈₁ 大小相符.

2.6 体外培养的肿瘤细胞上清酶切 MBP-VT 融合蛋白的免疫印迹分析

SW1990 细胞在 37 °C 培养 48 ~ 72 h 后将培养上清吸到另 1 新的 96 孔培养板中,每孔加 100 μ l 初步纯化的融合蛋白 MBP-VT,并在 1 h 和 3 h 后吸取培养

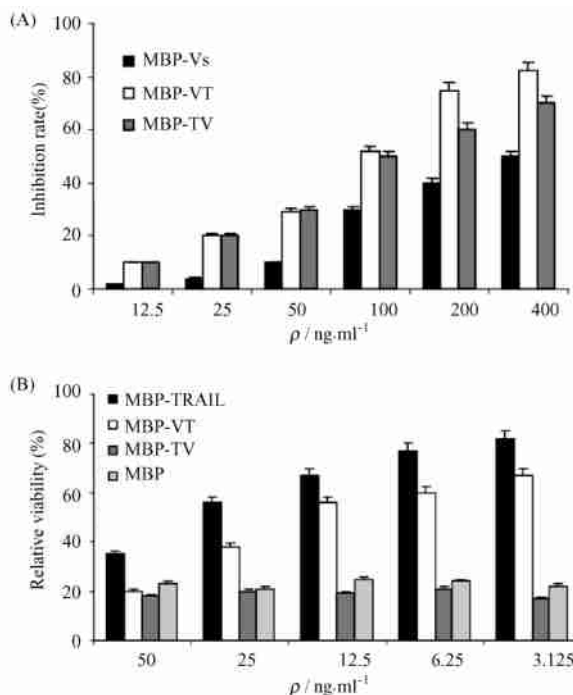


Fig.3 Inhibition efficiency of recombinant fusion proteins on ECV304 cells and SW1990 cells proliferation (A) ECV304 cells and (B) SW1990 cells were cultured for 24 hours with recombinant fusion proteins, inhibition rate and relative viabilities were determined, data represent the mean \pm SD of a single representative triplicated experiment from three separate experiments. IC_{50} of MBP-VT is 90 ng/ml and 12.5 ng/ml, respectively. MBP-VT exhibits an obvious inhibition on the proliferation of endothelial cells as well as a potent apoptotic-inducing effect on tumor cells, whereas MBP-TV shows almost no evident effect

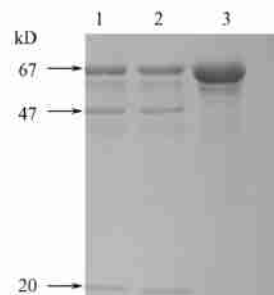


Fig.4 Digestion analysis of the fused protein MBP-VT in vitro MBP-VT fusion proteins were incubated with MMP-2 for 30 min and 1 hour at 37 °C, respectively. Digestion products were subjected to 10 % SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining. The digested MBP-VT in the lane 1 and 2 show three bands with the molecular sizes same to that of MBP-VT, MBP-Vs and TRAIL₁₁₄₋₂₈₁, respectively. The lane 3 shows the MBP-VT protein without digestion. MBP-VT can be digested *in vitro*

液,以免 MBP 和羊抗人 TRAIL 多克隆抗体为一抗,以上述 MMPs 体外酶切反应产物为阳性对照,以不加 MBP-VT 的培养上清为阴性对照进行免疫印迹分析,结果见 Fig. 5,作用 1 h 和 3 h 后显示 3 条带,大小分别为 67 kD, 47 kD, 20 kD, 分别与 MBP-VT、MBP-Vs 及 TRAIL₁₁₄₋₂₈₁ 大小符合,表明融合蛋白 MBP-VT 能被肿瘤细胞内分泌的 MMPs 切割。

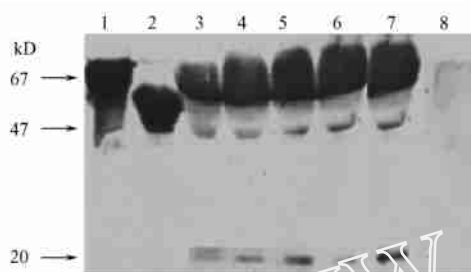


Fig. 5 Western bolt analysis of fused protein MBP-VT digestion in tumor cells

SW1990 cells were cultured for 72 hours at 37 °C, MBP-VT was add to supernatant and further cultured for 1 hour and 3 hours. The supernatant was subjected to Western blotting using anti-MBP and anti-TRAIL antibody. The lane 1 is MBP-VT. The lane 2 is MBP-Vs. The lane 3-6 show three bands which are in accordance with the sizes of MBP-VT, MBP-Vs and TRAIL₁₁₄₋₂₈₁, respectively. The lane 7, MBP-VT was incubated with MMP-2 for 30 min at 37 °C, showing three bands which are in accordance with the sizes of MBP-VT, MBP-Vs and TRAIL₁₁₄₋₂₈₁, respectively. The lane 8, without MBP-VT, shows no band. MBP-VT can be digested in SW1990 cells

3 讨论

实体瘤有两种主要治疗策略:其一是直接杀伤肿瘤细胞,其二是抑制肿瘤组织的血液供应。近年来,以细胞凋亡和血管生成作为靶点的抗肿瘤研究已取得了一些极具价值的成果^[12, 13]。为减少使用多种化疗药物引起的毒副作用,开发新型抗肿瘤生物技术新药,本课题组利用柔性氨基酸作为连接臂,将几种血管生成抑制因子和肿瘤坏死因子家族成员融合表达,得到了一些既能抑制肿瘤血管生成又能诱导肿瘤细胞凋亡的双功能蛋白质^[14],为研究发现高效抗肿瘤新药奠定了基础。但研究中发现两种因子在柔性氨基酸连接臂两端的方向不同,构建的融合蛋白活性不同,可能是两蛋白空间结构的相互作用影响了融合蛋白的生物学活性。

本研究首次以肿瘤组织高表达的基质金属蛋白酶(MMP)特异性酶切位点(FLCLWA)为融合基因连

接臂,构建 vasostatin 和 TRAIL 的双功能蛋白,以期融合蛋白在肿瘤靶部位被高表达分泌的 MMPs 切割为 vasostatin 和 TRAIL,两者从不同环节抑制肿瘤生长,使融合蛋白更好的发挥双功能作用。采用重组 PCR 技术构建 vasostatin 和 TRAIL 的融合蛋白,将经 Amylose Resin 亲和层析柱纯化得到的融合蛋白作用于 ECV304 和 SW1990 细胞。结果显示,MBP-VT 可同时发挥抑制肿瘤血管生成和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而 MBP-TV 的作用不明显,这可能是由于 TRAIL 的 C-末端胞外区是其主要的活性部位,vasostatin 的空间构象影响了 TRAIL 的活性。研究中引入 MMPs 特异性酶切位点(FLCLWA)正是为了改善这一点。由于目前市场上没有抗 vasostatin 抗体,因此,先用融合蛋白 MBP-VT 做 MMPs 体外酶切实验和体外培养肿瘤细胞内酶切效应的免疫印迹分析,将 SW1990 细胞培养 48 ~ 72 h,使其高表达分泌 MMPs,吸出培养上清,加入融合蛋白 MBP-VT,作用 1 h 和 3 h 后取培养上清做免疫印迹分析。结果表明,融合蛋白 MBP-VT 能被体外有活性的和肿瘤细胞内高表达分泌的 MMP 酶正确切割,这些结果为进一步研究融合蛋白的体内酶切效应和抗肿瘤作用奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4-6
- [2] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364
- [3] Pike SE, Yao L, Jones K D, et al. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth [J]. J Exp Med, 1998, 188(12): 2349-2356
- [4] Matysiak M, Jurewicz A, Jaskolski D, et al. TRAIL induces death of human oligodendrocytes isolated from adult brain [J]. Brain, 2002, 125(11): 2469-2480
- [5] Nitsch R, Bechmann I, Deisz R A, et al. Human brain cell death induced by tumour necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. Lancet, 2000, 356(9232): 827-828
- [6] 王梁华,朱玉平,潘卫,等. 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)cDNA 的克隆与表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报(Wang Liang-Hua, Zhu Yu-Ping, Pan Wei, et al. Cloning and expression of human TNF-related apoptosis-inducing ligand in E. coli [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 1999, 15(4): 667-670
- [7] Xiao F, Wei Y, Yang L, et al. A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin [J]. Gene Ther, 2002, 9(18): 1207-1213
- [8] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3): 161-174
- [9] Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix

- metalloproteinases: an overview [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, **253** (1-2): 269-285
- [10] Shin J N, Park S Y, Cha J H, *et al.* Generation of a novel proform of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein that can be reactivated by matrix metalloproteinases [J]. *Exp Cell Res*, 2006, **312**(19): 3892-3898
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Mariatis T 著, 金东雁, 黎孟枫, 等译, 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科技出版社, 1992 (Sambrook J, Fritsch EF, *et al.* *Molecular Cloning Experiments Guide* [M]. Beijing: Science Press)
- [12] Chobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *CA Cancer J Clin*. 2005, **55**(3): 178-194
- [13] Jubb A M, Oates A J, Holden S, *et al.* Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(8): 626-635
- [14] Luo Y Q, Wang L H, Ma X L, *et al.* Construction, expression, and characterization of a new targeted bifunctional fusion protein: tumstatin₄₅₋₁₃₂-TNF [J]. *IUBMB Life*, 2006, **58**(11): 647-653
- [15] Trudel D, Fradet Y, Meyer F, *et al.* Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study [J]. *Cancer Res*, 2003, **63**(23): 8511-8515
- [16] 罗以勤, 王梁华, 球谊, 等. 人肿瘤抑素(Tumstatin)在 *E. coli* 中的克隆、表达及活性分析. 中国生物化学与分子生物学学报 (Luo Yi-Qing, Wang Liang-Hua, Qiu Yi, *et al.* Cloning, expression and bioassay of human tumstatin in *E. coli* [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2005, **21**(3): 304-308

类风湿关节炎药物恩利(Enrel)可治愈儿童银屑病

一项研究发现,有一种类风湿关节炎药物可以治愈大多数儿童的银屑病.该报道很可能是以确保该药物,即恩利(etanercept),得到合乎规章的批准,而作为第一个儿童银屑病的全身治疗药物.银屑病源自失去控制的炎症,它促使皮肤细胞过度生长,在全身出现深红色斑.当前已批准的疗法,诸如皮肤乳膏与紫外线照射,对银屑病患者经常只能提供有限的帮助.恩利是先前批准用于治疗成年人银屑病的一种抗炎药,为了测试其对于儿童的疗效,研究者征募了 211 名从 4~17 岁的儿童,这些儿童所患重病已获得缓解.平均来说,这些儿童身体上有 1/5 部分为银屑病所覆盖.这些患儿接受每周一次注射恩利或安慰剂,共 12 周.按照医生这样的治疗,接受恩利的患儿,53 %皮肤“光洁或几乎光洁”,而接受安慰剂注射的患儿只有 13 %皮肤“光洁或几乎光洁”.更为精确的测量发现用恩利治疗的患儿中,有 3/4 的患儿至少有 50 %皮肤感染有所减退.在 12 个星期以后,该项研究中的所有患儿都用了药.一位在该项研究中负责治疗和监控银屑病患儿的医生说:“其中绝大多数患儿的症状有所缓解”.该项研究结果发表在 2008 年 1 月 17 日的 *New England Journal of Medicine* 上.这是一个重要的步骤,其将一个新疗法引进银屑病患者中.恩利阻断银屑病引起的炎症靠其靶向一种重要的炎性蛋白,成为 TNF- α .在 20 世纪 90 年代对而恩利的研究导致 FDA 批准其为成人与儿童的类风湿关节炎的药物,类风湿关节炎是一种炎症性疾病.加州的一家公司命名将上市的 etanercept 商品为 Enrel,现已申请 FDA 指定该药物为成人与儿童的银屑病用药.今年晚些时候可望决定.批准恩利将为临床医师提供替代其他免疫抑制剂,诸如氨甲喋呤与环孢菌素的药物.医生开这些药给难治性银屑病患者,尽管他们并未获得批准为这些患儿用这些药物.当然,应用如此重度的免疫抑制剂使人处于易感染的状态,而对于抵御耳感染和经常性的呼吸道疾患的儿童来说,这却是基本的关怀.恩利对 TNF- α 的特殊靶向作用使其他的免疫过程得以继续保护身体.一位风湿病专家说:“我们认为这是一件好事情”.

(李潇摘译自 N. Seppa: *Science News*, Jan 19, 2008, Vol. 73, p. 35)