

血管内皮抑制素的新结构

刘 鹏

中国·江苏省苏州市工业园区 215000

【摘要】血管内皮抑制素 (endostatin) 是胶原 XVIII 羧基端的一段分子量大小为 20kDa 的酶切产物。重组血管内皮抑制素可以抑制小鼠体内多种肿瘤的生长、转移, 甚至能完全治愈肿瘤, 而且不产生耐药性, 曾经被认为是一个非常重要的肿瘤治疗药物, 但临床试验的结果却不理想。是 endostatin 本身活性不够还是研究者制备的 endostatin 结构有问题? 与主流观点相反, 我们的研究发现很可能是之前的研究者制备的蛋白结构不正确, endostatin 的高活性状态是生理条件下不可溶的还原状态 (nES)。我们通过聚乙二醇 (PEG) 修饰使这种不可溶的状态变的可溶, 并测定了其细胞活性, 结果重现了 folkman 实验室最初的实验结果。我们的发现为 endostatin 的研究开辟了新的方向, 为 endostatin 开发成药物带来了希望。我们的发现也提供了一种基础研究和药物开发的新思路, 即占体内蛋白很大比例的不可溶蛋白因溶解性差很难被深入研究, 我们可以通过修饰使其可溶, 然后再探索其功能, 同时修饰也提高了这类蛋白的成药性。

【关键词】血管内皮抑制素; endostatin; HMEC; PEG; 细胞活性

介绍:

血管内皮抑制素 (Endostatin) 是胶原 XVIII 羧基端的一段分子量大小为 20kDa 的酶切产物。1997 年美国哈佛大学 Judah Folkman 教授等人在血管内皮瘤细胞的培养物中发现此蛋白, 它具有抑制血管内皮细胞增殖、迁移和体内血管生成的活性^[1]。Judah Folkman 教授等人的研究发现: 重组血管内皮抑制素可以抑制小鼠体内多种肿瘤的生长、转移, 甚至能完全治愈肿瘤, 而且不产生耐药性; 其发挥活性的机理在于它通过抑制血管内皮细胞的生长, 抑制了肿瘤组织附近的新生血管的生成, 使得肿瘤组织得不到生长所必需的大量营养和氧气, 最后停止生长或坏死^[2]。目前唯一获批上市重组人血管内皮抑制素药物商品名为“恩度 (Endostar)”, 其他临床研究大部分以失败告终^[3]。

Folkman 实验室用的是鼠源的 endostatin, 动物实验也是在小鼠上做的, 一般认为, 人源 Endostatin 和鼠源 endostatin 有明显的同源性, 很可能有相同的作用。为避免种属差异造成的偏差, 我们选择用 HMEC (人微血管内皮细胞, Human Microvascular Endothelial Cell line), 测定 endostatin 抑制 HMEC 迁移的活性。在 Folkman 的研究中当 endostatin 浓度达到 100ng/ml 时即可观察到比较明显的抑制作用, 恩度的浓度达到 15 μ g/ml 时才有类似的抑制作用, 两者的活性差距在 100 倍以上。

通过仔细阅读 Folkman 实验室发表的两篇论文^[1,2]我们发现, 两篇论文最重要的证据是动物实验结果, 动物实验所用的 endostatin 是从大肠杆菌表达的包涵体中纯化的还原态 endostatin, 这种 endostatin 在生理状态下是不可溶的, 所以实验是用了 endostatin 沉淀的混悬液皮下注射给药。虽然还原态的 endostatin 表现出了很好的抗肿瘤活性, 文章却认为 endostatin 的天然状态和活性状态是有两对二硫键的氧化状态, 只是因为包涵体蛋白复性率太低作者才不得不选择生理条件下不可溶的还原状态做动物实验。受此文章影响, 本领域研究者通常认为, 天然的且具有活性的血管内皮抑制素是有两对二硫键且生理 pH 值条件下 (例如 pH7.4) 可溶。恩度是有两对二硫键且生理 pH 值条件下可溶于水的重组人血管内皮抑制素结构类似物 (中国专利 00107569.1)。

既然氧化状态的 endostatin 活性测定结果无法重现 Folkman 当年的报道, 还原状态的 endostatin 活性怎样呢?

一方面, 还原状态的重组人血管内皮抑制素在 HMEC 细胞的培养条件下不可溶, 不易直接测定其细胞活性; 另一方面因为种属差异, 也没有合适的动物实验模型。我们的研究发现还原状态的重组人血管内皮抑制素在 pH 小于 5.5 的条件下是可溶的, 于是我们在 pH5.2 的条件下用 20KD mPEG-ALD (甲氧基聚乙二醇丙醛) 对还原态的 endostatin 进行 N 末端特异性单修饰, 得到 PEG 化的还原态 endostatin (以下简称 nES), 将溶液 pH 提高到 pH7.4 时未观察到浑浊或沉淀。我们用 nES 测定 HMEC 迁移活性, 出人意料地发现, 其活性提高了 5-10 倍。

我们进一步用阳离子交换层析纯化 nES, 将获得的多个组分分别测定 HMEC 迁移活性。活性最高的 nES 组分的活性是恩度的 100 倍以上, 且在 100ng/ml 的浓度下即有抑制 HMEC 迁移的活性, 重现了 Folkman 的实验结果。经检测此组分为 N 端单修饰的 PEG 化的还原态 endostatin。

从以上的实验结果得出以下结论, 血管内皮抑制素的高活性结构为还原态人血管内皮抑制素, 且在生理 pH 值条件下是不可溶的。

讨论:

根据报道通过酵母等真核细胞表达的 endostatin 往往是生理条件下可溶的氧化状态, 所以不排除 endostatin 刚产生时是氧化状态。另外, 硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 和二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 在调节血管功能中起的作用, 以及其对整合素 (integrin) 和金属蛋白酶 ADAM17 的加工^[4,5,6], 也预示着 endostatin 的二硫键状态很可能也有类似的加工过程。我们推测, 体内 endostatin 的状态并不是固定的, 它通过二硫键的氧化还原, 改变构象, 进而发挥不同的作用。Endostatin 与心脑血管疾病、肿瘤血管生成和黄斑变性等疾病都有潜在关系。

理论上, 体内的 endostatin 是血管内皮细胞细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的一部分, 且 endostatin 源自胶原 XVIII 的降解, 而不是细胞分泌的细胞因子, 所以其含量是有限的。这种情况下, 游离的 endostatin 更可能以不易溶解的状态保存在局部, 在局部起作用。相反, 如果 endostatin 在生理条件下很容易溶解, 它会随着血液循环被稀释和清除掉, 无法起到在特定部位抑制血管生成的作用。

还原态endostatin对血管内皮细胞迁移和增值的高抑制活性的发现, 不仅为endostatin药物的开发提供了可能, 也为与血管生成相关的生理现象的研究提供了新的视角。本研究为endostatin的进一步开发带来了希望, 下一步我们将通过以下方式进行探索: 1. 通过皮下注射 endostatin 混悬液或脂质体等特殊剂型将还原态 endostatin 开发成药物。2. 通过基因突变改造 endostatin, 特别是用其他氨基酸代替半胱氨酸, 提高其稳定性和可溶性。3. 将高活性状态 endostatin 通过融合蛋白、PEG 修饰等方法提高其溶解性。4. 将高活性 endostatin 与 VEGF、VEGFR 等蛋白的抗体融合制备多功能的融合蛋白。5. 将高活性 endostatin 与血管内皮细胞表面或基底膜特异性表达蛋白的抗体融合实现靶向给药。6. 将氧化型 endostatin 与还原性药物联合用药。7. 开发含有编码 endostatin 基因的 mRNA 或 DNA 药物。

最后, 本发现带来了一种新的药物开发思路, 即占体内蛋白很大比例的不可溶蛋白(如跨膜蛋白、胶原蛋白和纤维粘连蛋白等)在局部发挥着重要的生物学功能, 由于其在生理条件下溶解度差, 很难开发成为用于全身给药的药物。通过修饰物修饰增加这类蛋白生理条件下的溶解度, 可以更方便的探索其结构和功能, 并能提高其成药性。

参考文献:

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-85, 1997.
- [2] Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390: 404-7, 1997.
- [3] B. Kim Lee Sim, Nicholas J. MacDonald and Edward R. Gubish: Angiostatin and Endostatin: Endogenous Inhibitors of Tumor Growth. *Cancer and Metastasis Reviews* 19: 181-190, 2000.
- [4] Tanaka L Y, HA Ara ú jo, Hironaka G K, et al. Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect[J]. *Hypertension*, 2016:613-622.
- [5] Lorenzen I, Eble J A, Hanschmann E M. Thiol switches in membrane proteins - Extracellular redox regulation in cell biology[J].
- [6] Bergerhausen L, J Grosche, J Meiner, et al. Extracellular Redox Regulation of $\alpha 7 \beta$ Integrin-Mediated Cell Migration Is Signaled via a Dominant Thiol-Switch[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(3):227.