

# Tumstatin 转基因巨核细胞 在 NOD/SCID 鼠体内产生抗新生血管作用血小板

任荟蓉<sup>1</sup>, 罗以勤<sup>1</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 周明<sup>2</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 姚丽娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 了解 tumstatin 转基因巨核细胞在非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)鼠体内生成血小板情况及其抗新生血管作用。方法 制备的 tumstatin 转基因巨核细胞注入 NOD/SCID 鼠体内,定期取血,通过流式细胞仪分析转基因血小板产生情况;激光共聚焦法检测血小板的 tumstatin 表达;内皮细胞管状结构形成试验检测血小板的抗血管生成作用;血小板聚集试验检测转基因血小板的聚集功能。结果 tumstatin 转基因巨核细胞输注 NOD/SCID 鼠后的第 3 天,外周血可检测到人血小板;血小板表达 tumstatin;这种转基因血小板可显著抑制内皮细胞管状结构形成并保持正常的聚集功能。结论 tumstatin 转基因巨核细胞可在 NOD/SCID 鼠体内产生有抑制血管形成且保持正常聚集功能的小血小板,为进一步抗肿瘤研究奠定基础。

**关键词** tumstatin;巨核细胞;血小板;NOD/SCID 鼠

**中图分类号** R 7336;R 331.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0511-05

肿瘤放化疗引起患者血小板减少症,在临床上常预防性或治疗性地输注血小板以提高血小板水

平,然而,近些年的研究<sup>[1-2]</sup>表明血小板有促进肿瘤新生血管形成作用,进而促进肿瘤的生长和转移,影响患者预后。tumstatin 是近些年发现的一种内源性血管生成抑制因子,其通过功能性受体特异性地诱导血管内皮细胞凋亡、抑制血管内皮细胞增殖,从而抑制肿瘤的生长<sup>[3]</sup>。携带 tumstatin 基因的慢病毒转导 CD34<sup>+</sup> 细胞经体外扩增培养后生成有抗血管生成作用的巨核细胞/血小板<sup>[4]</sup>,该实验采用这种转基因巨核细胞输注非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetic/server combined immune-deficiency, NOD/SCID)小鼠,观察其在体内生成血小板的状况及其相关功能,设想这种血小板有可能改变放化疗过程中输注常规血小板而引起的促进肿瘤血管生长的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** NOD/SCID 鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司;NK 细胞抑制剂 anti-asialo GM1 购自日本和光纯药株式会社;小鼠抗人 CD41-FITC 购自美国 eBioscience 公司;兔抗人 tumstatin 蛋白抗体和羊抗人 VWF 蛋白抗体购自美国 Gibco 公司;FITC 标记的抗兔二抗和 PE 标记的抗羊二抗购自英国 Abcam 公司;人静脉内皮细胞购自上海吉凯公司;tumstatin 转基因巨核细胞由安徽医科大学附属省立医院临床检验中心制备。

2016-01-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M209);安徽省教育厅自然科学基金项目(编号:KJ2011A163)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 检验科、<sup>2</sup> 输血科,合肥 230001

作者简介:任荟蓉,女,硕士研究生;

罗以勤,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: luoyiqin2003@163.com

Lipofectamine 2000 Reagent. The efficacy of gene silencing was confirmed by Western blot analysis, and apoptotic rates before and after transfection was measured by flow cytometry using Annexin V/PI staining. **Results** UMI-77 was effective in induction of apoptosis in gastric cancer MGC-803 cells, apoptotic rates were increased in a dose-dependent manner. Mitochondrial membrane potential was collapsed after UMI-77 treatment. Activation of Caspase-9, Caspase-3 and cleavage of PARP occurred at 24 h ( $P < 0.05$ ). The expression level of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> were not altered after exposure to UMI-77, while Mcl-1 was down-regulated after 12 h ( $P < 0.05$ ). Transfection with Mcl-1 siRNA successfully decreased the expression level of Mcl-1 in MGC-803 cells ( $P < 0.05$ ) and blocked apoptosis induced by UMI-77 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** UMI-77 induces apoptosis through activation of the intrinsic pathway in gastric cancer MGC-803 cells, and knocking down Mcl-1 expression abrogates apoptosis by UMI-77.

**Key words** gastric cancer; UMI-77; Mcl-1; small molecule inhibitor; apoptosis

## 1.2 方法

**1.2.1 tumstatin 转基因巨核细胞输注到 NOD/SCID 鼠体内** 6~7 周龄 NOD/SCID 雌性小鼠, 21.0~22.5 g, 无菌环境下饲养, 开始实验前均至少让小鼠在动物中心常规喂养适应 1 周。输注前 4~24 h, 小鼠全身接受 300~350 cGy 亚致死剂量的辐射源照射。将小鼠随机分为转基因组、非转基因组和对照组, 分别为 12、10、8 只, 4~24 h 后, 转基因组进行 tumstatin 转基因巨核细胞输注(约  $1 \times 10^5$  个), 非转基因组进行非转基因巨核细胞输注(约  $1 \times 10^5$  个), 对照组注射同体积生理盐水。3 组均用 27G 针头, 1 ml 的注射器通过尾静脉进行输注, 每组细胞输注同时输注 20  $\mu$ l asialo GM1 抗血清(自然杀伤细胞抑制剂)。

**1.2.2 流式细胞仪分析转基因血小板在小鼠体内的产生情况** 转基因组、非转基因组和对照组小鼠分别在第 3、5、7 天各取 2 只, 通过眼窝后取血, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝后, 500 r/min 离心 5 min 获得血小板, 加入小鼠抗人 CD41-FITC, 室温孵育 30 min 后, PBS 洗涤 3 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 重悬于适量生理盐水, 流式细胞仪定量检测小鼠和人类的血小板, 小鼠取血后处死。

**1.2.3 激光共聚焦法检测血小板的 tumstatin 表达** 转基因组、非转基因组和对照组小鼠分别在第 3 天各取 2 只, 通过眼窝后取血, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝, 500 r/min 离心 5 min 获得血小板, 甩片机涂片, 待涂片干燥后, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.5% Triton-X-100 通透 15 min, 接着用含 1% BSA 的 pH 7.2 BSA-PBS 洗 3 遍后风干, 5% 小牛白蛋白 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜; 第 2 天, 用稀释好的兔抗人 tumstatin 蛋白抗体和羊抗人 VWF 蛋白抗体覆盖细胞, 于湿盒中 4  $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBS 洗涤后滴加 FITC 标记的抗兔二抗和 PE 标记的抗羊二抗, 室温避光孵育 2 h, PBS 洗涤 3 遍; 最后于细胞表面滴一滴抗荧光猝灭封片液, 指甲油封片。荧光共聚焦显微镜用适合波段激发, 观察 tumstatin 和 VWF 蛋白的表达和定位, 照相保存实验结果。

**1.2.4 内皮细胞管状结构形成试验检测血小板的抗血管生成作用** 转基因组和非转基因组小鼠分别在第 3 天各取 2 只, 通过眼窝后取血, 以正常人外周血作为对照组, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝, 离心获得血小板约  $1 \times 10^8$ /ml, 液氮反复冻融 3 次裂解血小板以释放蛋白; 将 50  $\mu$ l 稀释的 ECMatrix™ 加入 96 孔培养板, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 待 ECMatrix™ 凝固后, 将 150  $\mu$ l 不含抗

生素的人脐静脉内皮细胞接种到上述包被 ECMatrix™ 的培养板中, 每孔约含细胞数量  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  个; 分别加入血小板裂解液, 试验重复 3 次; 细胞在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养, 在 1、2、4、8、12 h 时间点观察不同处理组之间内皮细胞管状排列情况、单位面积内管状结构数量和完整程度的差异。

**1.2.5 血小板聚集试验检测转基因血小板的聚集功能** 转基因组小鼠在第 3 天取 2 只, 通过眼窝后取血, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝, 离心获得血小板, 收集至 15 ml 离心管中; PBS 洗涤 2 遍; 以正常人血小板作为对照组; 用血小板计数仪调整血小板浓度为  $1 \times 10^8$ /ml; 将两组血小板各取 20  $\mu$ l 滴入玻片上, 显微镜下观察血小板聚集前情况并拍照; 分别加入凝血酶 1 U/ml, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 显微镜下观察血小板聚集情况并拍照。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。

## 2 结果

**2.1 tumstatin 转基因巨核细胞输注到 NOD/SCID 鼠体内** 瑞氏染色进行形态学分析显示 tumstatin 转基因细胞呈现出典型的巨核细胞形态, 胞质内充满大小不等的紫红色颗粒或血小板, 细胞周围可见有血小板堆集; 表明转基因表达并不影响 CD34<sup>+</sup> 细胞诱导分化为巨核细胞和血小板, 见图 1。

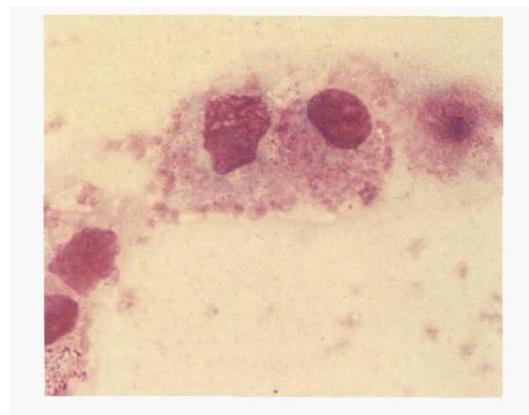


图 1 CD34<sup>+</sup> 诱导分化的 tumstatin 转基因巨核细胞及血小板 油镜  $\times 1\ 000$

**2.2 流式细胞仪分析 tumstatin 转基因血小板在小鼠体内的产生情况** 流式细胞术检测 tumstatin 转基因巨核细胞输注后第 3、5、7 天小鼠全血样本, 可在第 3 天检测到大量血小板, 且在第 5 天减少, 第 7 天基本检测不到, 这与预计的基因修饰的巨核细胞

产生的血小板会在小鼠体内活跃 5~7 d 是相符的。非转基因组血小板的产生情况与转基因组大致一致,对照组检测不到 CD41-FITC 标记阳性的细胞,见图 2。

### 2.3 激光共聚焦法检测血小板的 tumstatin 表达

在适当波长的激发光照射下,用荧光共聚焦显微镜可以观察到,在小鼠外周血里,存在部分血小板(tumstatin 转基因血小板)既表达自身 VWF 蛋白又显示出 tumstatin 蛋白的表达,而非转基因组仅表达自身 VWF 蛋白。对照组则检测不到人血小板。研究结果表明通过慢病毒介导,tumstatin 基因修饰的巨核细胞成功在小鼠体内存活并产生表达 tumstatin

蛋白的血小板,见图 3。

### 2.4 内皮细胞管状结构形成试验检测血小板的抗血管生成作用

当人脐静脉内皮细胞在基质上培养时,其迅速排列形成中空管状结构。研究结果显示非转基因的血小板血管分支数约为( $101.3 \pm 10.9$ )个;tumstatin 转基因血小板血管分支数约为( $42.7 \pm 7.4$ )个;而正常人分离血小板血管分支数约为( $129.8 \pm 10.1$ )个( $F = 128.687, P < 0.05$ )。由此可见 tumstatin 转基因血小板与正常血小板和未转染血小板不同,能够显著抑制内皮细胞管状结构的形成,进而推测在体内有可能抑制肿瘤新生血管形成,见图 4。

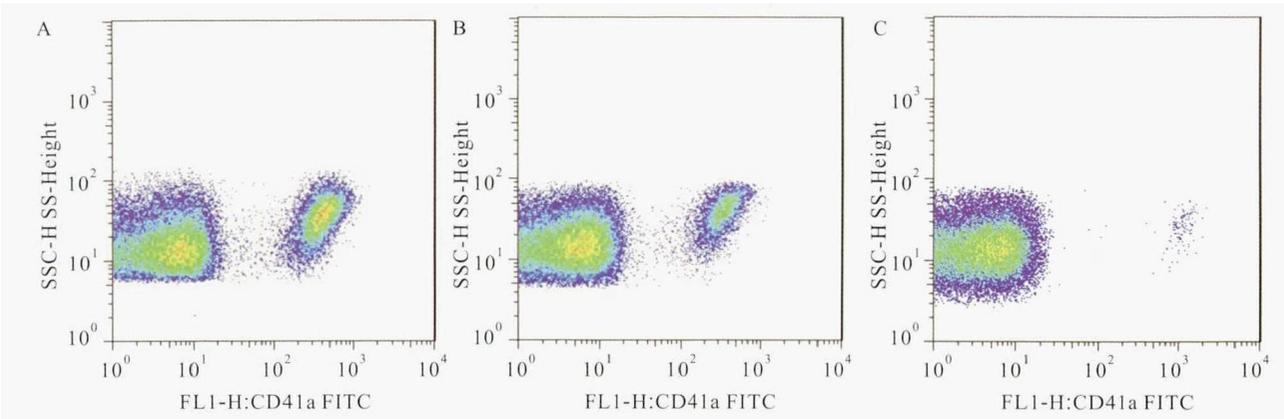


图 2 流式细胞术检测小鼠体内血小板

A: 输注后第 3 天; B: 输注后第 5 天; C: 输注后第 7 天

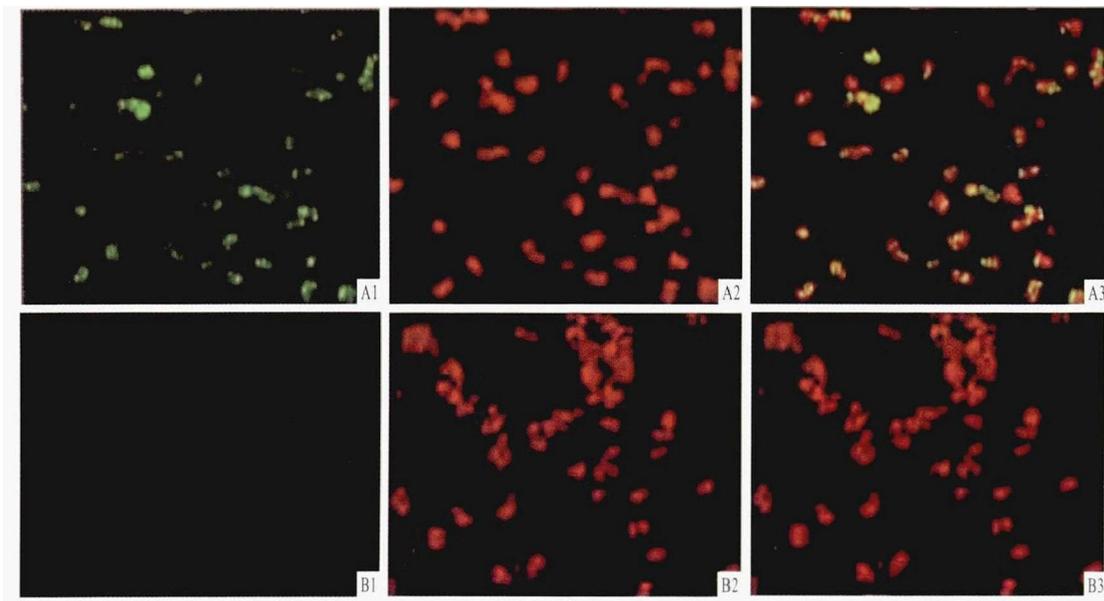


图 3 血小板免疫荧光染色  $\times 1000$

A: 转基因血小板荧光染色; B: 非转基因血小板荧光染色; 1: tumstatin 蛋白抗体染色; 2: VWF 蛋白抗体染色; 3: 1 和 2 的合成图

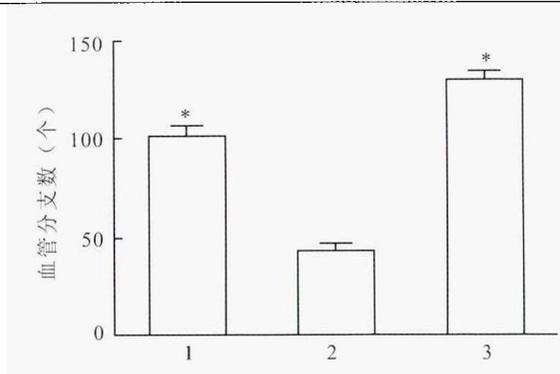
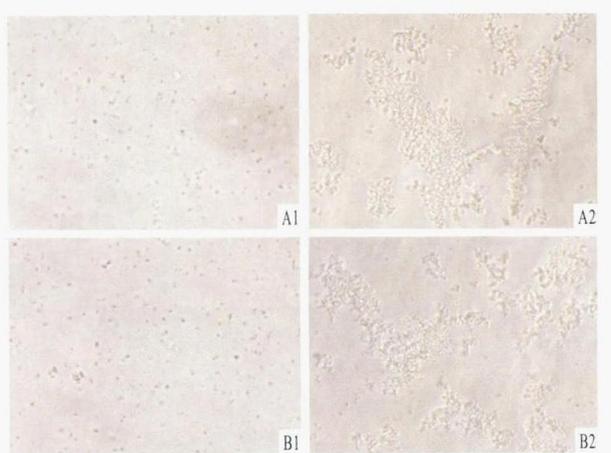


图4 各组血管分支数比较

1: 非转基因血小板组; 2: tumstatin 转基因血小板组; 3: 正常人分离血小板组; 与 tumstatin 转基因血小板组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.5 血小板聚集试验检测转基因血小板的聚集功能

小鼠外周血小板和正常人血小板在加入凝血酶之前均呈现相似的分散状态,待加入凝血酶后均发生了聚集反应(图5)。结果表明 tumstatin 转基因巨核细胞产生的血小板同正常血小板一样均能对凝血酶产生聚集反应,具有血小板聚集功能。

图5 血小板聚集实验结果  $\times 400$ 

A: 正常人富血小板血浆中获得的血小板的聚集实验; B: 培养液的上清富集的血小板样颗粒物质聚集实验; 1: 加入凝血酶前; 2: 加入凝血酶后

## 3 讨论

化疗是临床治疗恶性肿瘤的重要手段,但大剂量的化疗容易导致血小板减少症,严重影响了肿瘤的治疗效果和进程<sup>[5-6]</sup>。目前,临床主要采取直接血小板输注,以及利用体外扩增的造血干细胞和诱导分化产生的巨核细胞输入体内促进血小板生成,但近些年研究<sup>[7-8]</sup>显示,恶性肿瘤的发生和发展往往伴随着血小板数量的增多和(或)活性的明显升高,二者呈正相关性。

肿瘤细胞通过产生血小板活化因子,如组织因子、凝血酶和二磷酸腺苷等激活血小板并释放到血液循环中,使其聚集在肿瘤血管处发生脱颗粒反应,随后激活邻近的血小板,现已证实多种肿瘤血管处存在活化的血小板。血小板在血管受损处或细胞高度增殖处受激活释放目的蛋白,可使局部达到较高的有效浓度。正常情况下,表达蛋白在血小板内部不与外界接触,不仅避免了抗体的产生,也避免了血液中蛋白酶的作用而导致降解。血小板的天然贮存、运输和释放功能,有理由认为血小板是潜在的肿瘤靶向治疗载体。

tumstatin 是近年发现的来源基底膜Ⅳ型胶原 $\alpha 3$ 链C末端非胶原区的内源性新生血管生成抑制因子,其通过特异性抑制内皮细胞蛋白的合成来抑制肿瘤新生血管的形成,从而抑制肿瘤的生长和转移。体内外实验<sup>[9-10]</sup>证明 tumstatin 是通过特异性结合肿瘤血管内皮细胞表面上调的 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体(主要是 $\beta 3$ )抑制内皮细胞蛋白质合成,其抗血管生成能力至少是 endostatin 的10倍。血小板膜糖蛋白 gp II b/III a(整合素 $\alpha II b\beta 3$ )和 $\alpha v\beta 3$ 属于整合素家族 $\beta 3$ 组(血小板糖蛋白组),在介导“癌细胞-血小板-内皮细胞”的黏附中作用十分关键,阻断 gp II b/III a 和使用抗 $\alpha v\beta 3$ 抗体都能抑制癌细胞与血管内皮细胞的黏附<sup>[11]</sup>。因此,tumstatin 除了特异性作用肿瘤新生血管内皮细胞外还有可能通过 $\beta 3$ 功能性受体阻断血小板介导癌细胞与血管内皮细胞的黏附。

国外有研究<sup>[12]</sup>已证实经血小板生成素诱导生成的巨核细胞在体外14~21d时大部分都已经凋亡,因此在体外扩增巨核细胞进行体内回输时培养天数不宜超过14d,以避免输注无效的巨核细胞。作为本实验的动物模型,NOD/SCID鼠是在SCID小鼠与NOD/Lt小鼠杂交的双突变小鼠,既有T和B淋巴细胞缺乏,又具有表达NK细胞活性相对低的特性,各种肿瘤细胞可以植入,且较少发生排斥反应及移植物抗宿主病,利于进行人巨核细胞输注和动物模型的构建。

通过慢病毒介导在血小板中过表达血管生成抑制因子 tumstatin,有针对性地目的蛋白输送到靶点,证明其在小鼠体内能够产生具有抗血管生成作用的血小板,为 tumstatin 转基因血小板抑制肿瘤的生长和转移提供了可靠依据。该方法不仅有可能解决化疗药物引起的血小板减少症和输注常规血小板引起的促进肿瘤新血管生长的弊端,更具有基因治

疗的优势,如治疗肿瘤针对性强、具有很高的靶向性、具有非细胞毒性等,这将成为一个有效的生物相容性的基因传递系统。另外,基因修饰的巨核细胞体内不能永久生存,输注巨核细胞不会引起人体基因突变,这有可能使基因治疗联合化疗发挥更大的抗肿瘤效果。值得注意的是,对癌细胞具有目标特异性的血小板,在来源的选择上具有灵活性,比如可以使用患者自身的血小板作为目的蛋白表达的输送载体,这不仅保证了安全性,也避免了机体免疫反应的影响。本研究在肿瘤治疗中具有一定潜力,有待于进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] Apelseth T O, Hervig T, Wentzel-Larsen T, et al. A prospective observational study of the effect of platelet transfusions on levels of platelet-derived cytokines, chemokines and interleukins in acute leukaemia patients with severe chemotherapy-induced cytopenia [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(1): 52-62.
- [2] Bottsford-Miller J, Choi H J, Dalton H J, et al. Differential platelet levels affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(3): 602-10.
- [3] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively J C, et al. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis [J]. *Science*, 2002, 295(5552): 140-3.
- [4] 李娟,罗以勤,丁邦胜,等. Tumstatin 基因修饰的 CD34<sup>+</sup>造血干细胞生成抗血管生成活性的血小板的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 576-81.
- [5] Hitron A, Steinke D, Sutphin S, et al. Incidence and risk factors of clinically significant chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with solid tumors [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2011, 17(4): 312-9.
- [6] Wu Y, Aravind S, Ranganathan G, et al. Anemia and thrombocytopenia in patients undergoing chemotherapy for solid tumors: a descriptive study of a large outpatient oncology practice database [J]. *Clin Ther*, 2009, 31 Pt 2: 2416-32.
- [7] Cho M S, Bottsford-Miller J, Vasquez H G, et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells [J]. *Blood*, 2012, 120(24): 4869-72.
- [8] Demers M, Ho-Tin-Noé B, Schatzberg D, et al. Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1540-9.
- [9] Xie L, Duncan M B, Pahler J, et al. Counterbalancing angiogenic regulatory factors control the rate of cancer progression and survival in a stage-specific manner [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(24): 9939-44.
- [10] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15240-8.
- [11] Zhang W, Dang S, Hong T, et al. A humanized single-chain antibody against beta 3 integrin inhibits pulmonary metastasis by preferentially fragmenting activated platelets in the tumor microenvironment [J]. *Blood*, 2012, 120(14): 2889-98.
- [12] Clarke M C, Savill J, Jones D B, et al. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(4): 577-87.

## Tumstatin transgenic megakaryocyte produce anti-angiogenesis platelet in NOD/SCID mice

Ren Huirong<sup>1</sup>, Luo Yiqin<sup>1</sup>, Li Juan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Clinical Laboratory, <sup>2</sup>Dept of Blood Transfusion,

The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate tumstatin transgenic megakaryocyte producing platelets in NOD/SCID mice and its anti-angiogenesis function. **Methods** Tumstatin transgenic megakaryocyte was injected into NOD/SCID mice, and mice peripheral blood was regularly taken. Flow cytometry was used to test transgenic platelets production; immunofluorescence was used to test the expression of tumstatin; endothelial cells tubular structure formation test was used to test anti-angiogenesis function; platelet aggregation test was used to test aggregation function. **Results** After 3 d of transgenic megakaryocyte infusion, human platelets could be detected in peripheral blood of NOD/SCID mice, and the tumstatin expression was observed in platelets, which could obviously inhibit the endothelial cells tubular structure formation and kept normal aggregation function. **Conclusion** Tumstatin transgenic megakaryocyte can produce anti-angiogenesis platelets having normal aggregation function in NOD/SCID mice, which lays the foundation for further anti-tumor research.

**Key words** tumstatin; megakaryocyte; platelets; NOD/SCID mice