DOI:10.16016/j.1000-5404.201511121

两条肿瘤靶向抑制肽的修饰及作用靶点的初步研究

刘 杰,丁小江,郑 磊,李前伟,黄定德 (400038 重庆,第三军医大学西南医院核医学科)

[摘要] **目的** 探讨两条肿瘤靶向抑制肽(QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS)经化学修饰后(N端乙酰化、C端酰胺化)的稳定性,并初步探讨其作用靶点。**方法** ^{3}H-TdR掺入法、CCK-8法分别探讨多肽修饰前后对A549细胞增殖、活力的影响;高效液相色谱法(HPLC)测定多肽在10%血清条件下,不同时间点(12、24 h)的剩余量,评价其修饰前后在血清中的稳定性;构建GST标签的多肽(GST-多肽)融合蛋白表达载体,在大肠杆菌中诱导表达、纯化;免疫共沉淀法鉴定GST-多肽融合蛋白能否与VEGFR-1、VEGFR-2结合。**结果** 多肽RKRKRKKSRYIVLS经化学修饰后在10%血清环境下对A549细胞增殖的抑制率由(2.63±6.19)%提高至(48.50±7.14)%($P<0.01$),对A549细胞活力的抑制率由(1.30±7.90)%提高至(20.80±5.90)%($P<0.01$),24 h后多肽在血清中的剩余量由(56.04±1.81)%提高至(64.64±0.30)%($P<0.01$);多肽QKRKRKKSRKKH化学修饰前后在10%血清环境下对A549细胞增殖的抑制率分别为(28.38±5.63)%、(34.25±10.90)%($P>0.05$),对A549细胞活力的抑制率分别为(8.09±5.84)%、(15.07±8.09)%($P>0.05$),24 h后多肽在血清中的剩余量由(72.72±2.60)%提高至(77.43%±1.78)%($P<0.05$);免疫共沉淀表明这两条多肽均能与VEGFR-1、VEGFR-2结合。**结论** VEGFR-1、VEGFR-2为这两条肿瘤靶向抑制肽的作用靶点;多肽RKRKRKKSRYIVLS、QKRKRKKSRKKH修饰后在血清环境下稳定性明显提高,修饰后的RKRKRKKSRYIVLS对A549细胞增殖及活力的抑制能力明显增强。

[关键词] 血管内皮生长因子受体;GST融合蛋白;免疫共沉淀;^{3}H-TdR;CCK-8
[中图法分类号] R341;R394-33;R817 [文献标志码] A

Modification and target study of 2 tumor targeted peptides

Liu Jie, Ding Xiaojiang, Zheng Lei, Li Qianwei, Huang Dingde (Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the stabilities of 2 tumor targeted peptides (QKRKRKKSRKKH and RKRKRKKSRYIVLS) after modification (N-terminal acetylation, C-terminal amidation) and study their targets preliminarily. **Methods** The effect of the peptides before and after modification on inhibiting proliferation of A549 cells was tested by ^{3}H-TdR incorporation, and the cell vitality was explored by CCK-8 assay. The remaining peptides were tested by high-performance liquid chromatography (HPLC) in 10% serum at different time points (12 and 24 h), and then the stability of peptides after modification could be evaluated. The expression vectors of GST-tagged peptides were constructed, and GST-peptide fused proteins were over-expressed in *Escherichia coli* and purified. Co-immunoprecipitation assay was used to confirm the interactions between GST-peptide fused proteins and interest receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2). **Results** After modification, the inhibition ratio of RKRKRKKSRYIVLS peptide on A549 cell proliferation was increased to (48.50±7.14)% from (2.63±6.19)% ($P<0.01$), and the cell vitality inhibition ratio was changed to (20.80±5.90)% from (1.30±7.90)% ($P<0.01$) in 10% serum. The remaining peptides were increased to (64.64±0.30)% from (56.04±1.81)% ($P<0.01$) at 24 h after modification. Before and after modification, the inhibitory ratios of QKRKRKKSRKKH peptide on A549 cell proliferation were

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171373)
[通信作者] 黄定德,电话:(023)68765432,E-mail:huangdde@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1434.027.html(2016-02-01)

(28.38 ± 5.63)% and (34.25 ± 10.90)%, respectively ($P > 0.05$), and the cell vitality inhibitory ratio were (8.09 ± 5.84)% and (15.07 ± 8.09)%, respectively, in 10% serum ($P > 0.05$). The remaining peptides were increased to (77.43% ± 1.78)% from (72.72 ± 2.60)% ($P < 0.05$) at 24 h after modification. Co-immunoprecipitation assay confirmed that the 2 peptides could bind to VEGFR-1 and VEGFR-2. **Conclusion** VEGFR-1and VEGFR-2 are the targets of the 2 tumor targeted peptides. In serum, the stability of both RKRKRKKSRYIVLS peptide and QKRKRKKSRKKH peptide is enhanced significantly after modification. The inhibitory effect of RKRKRKKSRYIVLS peptide after modification on the proliferation and vitality of A549 cells is enhanced.

[**Key words**] vascular endothelial growth factor receptor; GST fusion protein; co-immunoprecipitation; ^{3}H-TdR; CCK-8 assay

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171373). Corresponding author: Huang Dingde, Tel: 86-23-68765432, E-mail: huangdde@tmmu.edu.cn

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)为促血管生成最主要的因子,能够促进肿瘤的发生、发展及转移。本课题组此前运用生物信息学对 VEGF 片段 $VEGF_{125-136}$进行改造、筛选得到两条全新多肽 QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS。初步研究发现这两条多肽在无血清环境下能够明显抑制肺腺癌细胞株 A549 的增殖、多肽经放射性核素 ^{99m}Tc或^{188}Re 标记后能够靶向聚集于荷 A549 裸鼠的肿瘤部位,提示这两条多肽有望作为分子探针或靶向药物用于肿瘤的分子显像及靶向治疗[1-3],但其确切作用靶点尚需进一步探讨。本研究旨在对这两条肿瘤靶向抑制肽进行化学修饰,进一步提高其在血清中的稳定性,并对其可能的作用靶点进行初步探讨,即能否与血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合、是与 VEGFR-1 还是 VEGFR-2 结合,为其用于肿瘤的分子显像或靶向治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胎牛血清(HyClone),DMEM 培养基(HyClone)、A549 细胞(中国科学院上海典藏细胞库)、GST 抗体(碧云天)、VEGFR-1 与 VEGFR-2 抗体(Santa Cruz,美国)、Protein A + G Agarose(Santa Cruz,美国)、^{3}H-TdR(中科院上海原子核研究所)、CCK-8(碧云天)、蛋白电泳常规设备由第三军医大学西南医院中心实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 多肽的合成、化学修饰及与 GST 融合 常规固相法合成多肽 QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS,化学修饰法对多肽 N 端乙酰化(Ac)、C 端酰胺化(NH2),分别得到 Ac-QKRKRKKSRKKH-NH2、Ac-RKRKRKKSRYIVLS-NH2。GST-多肽融合蛋白表达及纯化的简要步骤如下:体外人工合成编码多肽的全长基因,并定向插入到 pGEX4T-1 载体中,构建原核表达质粒 pGEX4T-1-多肽,测序正确后转入大肠杆菌诱导表达,超声破碎后 Glutathione Sepharose 4B 进行纯化,蛋白电泳鉴定融合蛋白的表达、纯化效果。以上工作委托上海强耀公司完成。

1.2.2 GST-多肽融合蛋白与 VEGFR-1、VEGFR-2 的免疫共沉淀 A549 细胞接种于 75 cm^2细胞培养瓶,密度约为 1×10^4个/mL,共 15 mL,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)常规培养。24 h 后每个培养瓶中分别加入相应的 GST-多肽融合蛋白 GST-QKRKRKKSRKKH 及 GST-RKRKRKKSRYIVLS,其终浓度分别为 80、185 nmol/L。继续培养 12 h 后弃培养基,PBS 洗涤细胞 1 次,加入含蛋白酶抑制剂的 IP 细胞裂解液,4 ℃,30 min 后离心,收集上清并行蛋白定量。取 600 μg 样品,加入 1 μg GST 抗体或 VEGFR-1 抗体或 VEGFR-2 抗体为实验组,1 μg IgG 为阴性对照,4 ℃摇晃过夜。加入 20 μL Protein A + G Agarose,4 ℃摇晃 3 h,离心弃上清,IP 细胞裂解液洗涤沉淀 5 次,弃上清,用 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液重悬沉淀,煮沸冷却后行 SDS-PAGE 电泳分离,转膜至 PVDF,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,一抗即 VEGFR-1 抗体或 VEGFR-2 抗体或 GST 抗体 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次后 ECL 显影。

1.2.3 ^{3}H-TdR 掺入法比较多肽修饰前后对 A549 细胞增殖的抑制能力 A549 细胞接种于 96 孔板,约 5 000 个/孔,总体积 100μL,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)常规培养 24 h 后弃上清。灭菌 PBS 洗涤细胞 2 次后加入 DMEM 培养基,血清终浓度分别为 0%、

10%,每孔(5 个平行孔)分别加入修饰前后的多肽(终浓度 240 μmol/L),空白对照加入相同体积 PBS,总体积 100 μL/孔,培养 18 h 后加入^{3}H-TdR,37 kBq/孔,培养 6 h。弃培养液,200 μL PBS 洗涤 2 次,40 μL 胰酶充分消化后加入超纯水 200 μL/孔,静置 20 min,多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸,双蒸水洗涤 9 次,次氯酸固定 2 次,80 ℃,40 min 烘干,滤纸置于膜片闪烁液,避光 2 h,液闪仪测量放射性计数率并换算成衰变率(Bq)。抑制率 =(对照组 Bq - 实验组 Bq)/对照组 Bq ×100%。

1.2.4 CCK-8 法比较多肽修饰前后对 A549 细胞活力的影响 A549 细胞接种于 96 孔板,约 3 000 个/孔,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)常规培养 24 h 后弃上清,PBS 洗涤 1 次后加入 DMEM 培养基(血清终浓度分别为 0%、10%),每孔(4 个平行孔)分别加入修饰前后的多肽(终浓度 240μmol/L),空白对照加入相同体积 PBS,总体积 100 μL/孔。培养 20 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,细胞培养箱孵育 2 h。96 孔板置于多功能酶标仪,450 nm 测定光密度值[D(450)]。

抑制率 =[对照组 D(450)值 - 实验组 D(450)值]/对照组 D(450)值 ×100%

1.2.5 HPLC 法测定多肽修饰前后在 10% 血清条件下的稳定性 A549 细胞接种于 96 孔板,约 5 000 个/孔,总体积 100 μL,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)中培养 24 h 后弃上清、灭菌 PBS 洗涤细胞。实验组加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、修饰前后多肽(终浓度 240 μmol/L,总体积 100 μL/孔,5 复孔),继续培养 12、24 h 后分别取 50 μL 样品进行 HPLC 分析,得到实验组多肽浓度(μmol/L)。另设 0 h 组:DMEM 培养基中不含胎牛血清,加入多肽后立即用 HPLC 法测量多肽浓度,其余同实验组。计算多肽剩余百分比 = 实验组多肽浓度(μmol/L)/0 h 组多肽浓度(μmol/L) × 100%。

1.3 统计学分析

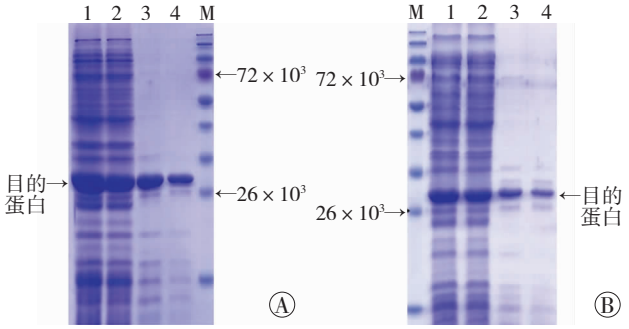
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,两组计量资料采用独立样本 t 检验,多组计量资料数据采取单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 多肽的合成、化学修饰及与 GST 融合

成功合成目标多肽并经化学修饰得到 Ac-QKRKRKKSRKKH-NH2、Ac-RKRKRKKSRYIVLS-NH2,HPLC 纯化,质谱鉴定,纯度达 95% 以上。

GST-QKRKRKKSRKKH、GST-RKRKRKKSRYIVLS 融合蛋白经诱导表达及纯化后的电泳结果见图 1。结果表明 2 个目的蛋白均为可溶性,相对分子质量约为 28×10^3,可用于下一步的免疫共沉淀实验。



A:GST-QKRKRKKSRKKH;B: GST-RKRKRKKSRYIVLS
M:蛋白标准;1:GST-多肽融合蛋白超声上清(即待纯化样品);2:流穿液(待进一步纯化样品);3: 1 mmol/L 谷胱甘肽洗脱纯化后样品;4: 10 mmol/L 谷胱甘肽洗脱纯化后样品

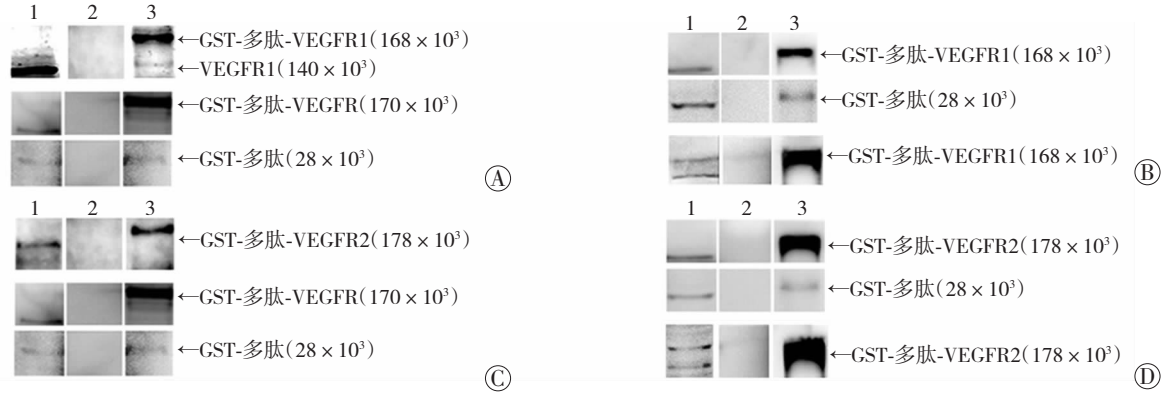
图 1 GST-多肽融合蛋白表达纯化后的电泳结果

2.2 GST-多肽融合蛋白与 VEGFR-1、VEGFR-2 的免疫共沉淀

GST-QKRKRKKSRKKH 与 A549 细胞孵育后,免疫共沉淀法检测其与 VEGFR1 的结合:提取 A549 细胞的总蛋白,首先用抗 GST 抗体免疫沉淀含 GST 多肽的蛋白复合物,分别用 VEGFR1 抗体(图 2A 上)、GST 抗体(图 2A 下)行 Western blot 检测显示,通过免疫沉淀获得的蛋白复合物中含 VEGFR1 蛋白,而 IgG 对照组未检出;然后,利用抗 VEGFR1 抗体进行反向免疫共沉淀含 VEGFR1 的蛋白复合物,分别用 GST 抗体(图 2B 上)、VEGFR1 抗体(图 2B 下)行 Western blot 检测显示,经免疫沉淀获得的蛋白复合物中含有 GST-多肽,而 IgG 对照组未检出。提示 GST-QKRKRKKSRKKH 能够与 A549 细胞中的 VEGFR1 相互结合。同理提示 GST-QKRKRKKSRKKH 与 VEGFR2(图 2C、D),GST-RKRKRKKSRYIVLS 与 VEGFR1(图 3A、B)及 VEGFR2(图 3C、D)能够相互结合。

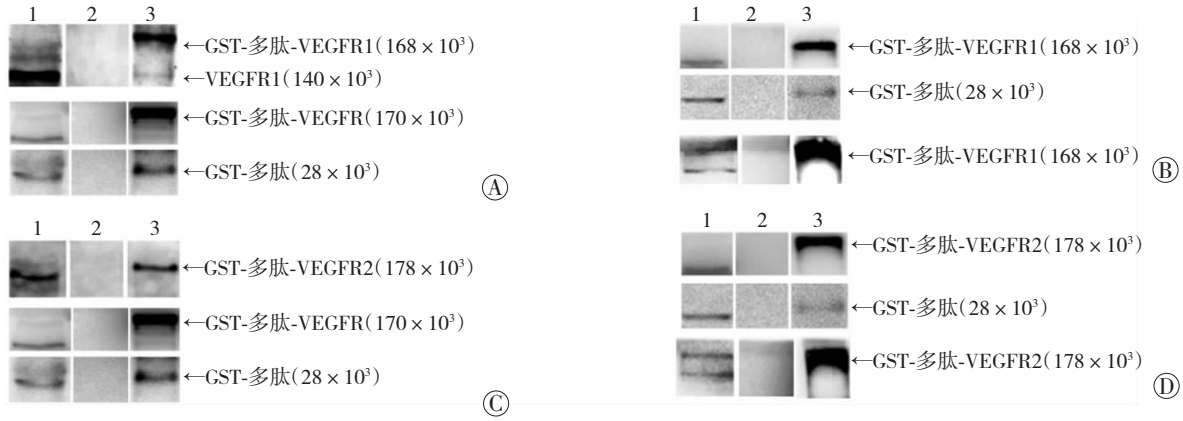
2.3 多肽修饰前后在 10% 血清条件下的稳定性

与 A549 细胞共培养 12、24 h 后,QKRKRKKSRKKH 在 10% 血清条件下的剩余百分比分别为(80.14 ± 1.81)%、(72.72 ± 2.60)%,修饰后分别提高至(82.46 ± 0.84)%(P < 0.05)、(77.43 ± 1.78)%(P < 0.05);RKRKRKKSRYIVLS 在 10% 血清条件下的剩余百分比分别为(70.52 ± 1.55)%、(56.04 ± 1.81)%,修饰后提高至(77.90 ± 1.19)%(P < 0.01)、(64.64 ± 0.30)%(P < 0.01)。这提示多肽 QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS 修饰后在 10% 血清中的稳定性明显提高。



A:GST-多肽与 VEGFR1 的 Co-IP(正向);B:GST-多肽与 VEGFR1 的 Co-IP(反向);C:GST-多肽与 VEGFR2 的 Co-IP(正向);D:GST-多肽与 VEGFR2 的 Co-IP(反向) 1:细胞裂解液总蛋白;2:IgG 免疫沉淀所获蛋白;3:GST 抗体(A、C)或 VEGFR1 抗体(B)或 VEGFR2 抗体(D)免疫沉淀所获蛋白

图 2 GST-QKRKRKKSRKKH 与 VEGFR1 及 VEGFR2 的免疫共沉淀



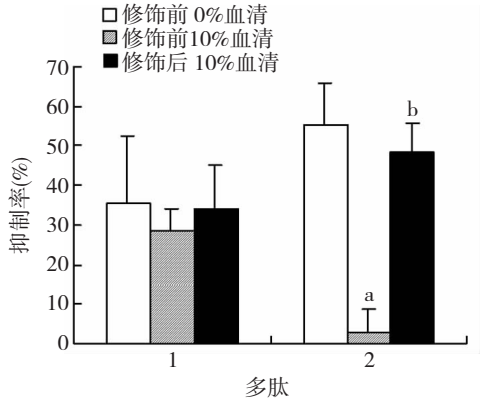
A:GST-多肽与 VEGFR1 的 Co-IP(正向);B:GST-多肽与 VEGFR1 的 Co-IP(反向);C:GST-多肽与 VEGFR2 的 Co-IP(正向);D:GST-多肽与 VEGFR2 的 Co-IP(反向) 1:细胞裂解液总蛋白;2:IgG 免疫沉淀所获蛋白;3:GST 抗体(A、C)或 VEGFR1 抗体(B)或 VEGFR2 抗体(D)免疫沉淀所获蛋白

图 3 GST-RKRKRKKSRYIVLS 与 VEGFR1 及 VEGFR2 的免疫共沉淀

2.4 ^{3}H-TdR 掺入法比较多肽修饰前后对 A549 细胞增殖的抑制能力

培养基中不含血清时,多肽 QKRKRKKSRKKH 对 A549 细胞增殖的抑制率为(35.58±17.00)%,当培养基中血清浓度为 10% 时,QKRKRKKSRKKH 修饰前后对 A549 细胞增殖的抑制率分别为(28.38±5.63)%、(34.25±10.90)%,三者间差异无统计学意义($P>0.05$,图 4),即多肽在 10% 血清环境下对 A549 细胞增殖的抑制能力未见明显降低。

培养基中不含血清时,多肽 RKRKRKKSRYIVLS 对 A549 细胞增殖的抑制率为(55.49±10.31)%,当培养基中血清浓度为 10% 时,RKRKRKKSRYIVLS 对 A549 细胞增殖的抑制率降为(2.63±6.19)%,修饰后提高至(48.50±7.14)%,三者间差异有统计学意义($P<0.01$,图 4),即多肽在 10% 血清环境下抑制 A549 细胞增殖能力显著下降($P<0.01$),经修饰后抑制能力显著提高($P<0.01$),提示 RKRKRKKSRYIVLS 易被血清降解,经修饰后在血清中的稳定性明显提高。



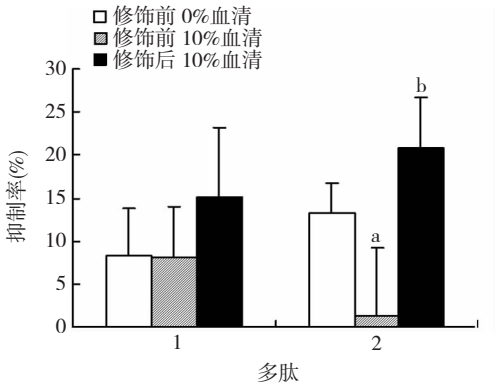
1:QKRKRKKSRKKH 修饰前后;2:RKRKRKKSRYIVLS 修饰前后 a:$P<0.01$ 与修饰前 0% 血清比较,b:$P<0.01$,与修饰前 10% 血清比较

图 4 ^{3}H-TdR 掺入法比较多肽修饰前后对 A549 细胞增殖的抑制率

2.5 CCK-8 法比较多肽修饰前后对 A549 细胞活力的影响

培养基中不含血清时,多肽 QKRKRKKSRKKH 对 A549 细胞活力的抑制率为(8.29±5.50)%,当培养基中血清浓度为 10% 时,QKRKRKKSRKKH 修饰前后对 A549 细胞活力的抑制率分别为(8.09±5.84)%、(15.07±8.09)%,三者间差异无统计学意义($P>0.05$,图 5),即多肽在 10% 血清环境下对 A549 细胞活力的抑制能力未见明显变化。

培养基中不含血清时,多肽 RKRKRKKSRYIVLS 对 A549 细胞活力的抑制率为(13.24±3.59)%,当培养基中血清浓度为 10% 时,RKRKRKKSRYIVLS 对 A549 细胞活力的抑制率降为(1.30±7.90)%,修饰后提高至(20.80±5.90)%,三者间差异有统计学意义($P<0.01$),即多肽在 10% 血清环境下对 A549 细胞活力的抑制能力明显下降($P<0.05$),经修饰后抑制能力明显提高($P<0.01$,图 5),提示 RKRKRKKSRYIVLS 易被血清降解,经修饰后在血清中的稳定性明显提高。



1:QKRKRKKSRKKH 修饰前后;2:RKRKRKKSRYIVLS 修饰前后 a:$P<0.05$,与修饰前 0% 血清比较,b:$P<0.01$,与修饰前 10% 血清比较

图 5 CCK-8 法检测多肽修饰前后对 A549 细胞活力的抑制率变化

3 讨论

肿瘤的发生、发展与血管生成密切相关,VEGF 是促血管生成最主要的因子,其受体 VEGFR 高表达于肿瘤细胞及新生血管内皮细胞,在其他细胞中低表达或不表达,抑制 VEGF/VEGFR 通路能明显抑制肿瘤细胞的生长与转移,提示 VEGF/VEGFR 通路为肿瘤分子显像及靶向治疗的重要靶点[4-7]。本课题组前期运用生物信息学方法对 VEGF 片段 $VEGF_{125-136}$ 改造,并经生物学实验筛选得到两条全新多肽 QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS,这两条多肽不但不会促进肿瘤细胞的增殖,反而在无血清环境下对 A549 细胞增殖的抑制能力分别达到了 35.58%、55.49%,且荷瘤裸鼠 SPECT 显像表明其具有肿瘤靶向性[1-3]。

本研究表明,与无血清环境比较,10% 血清条件下多肽 QKRKRKKSRKKH 对 A549 细胞增殖的抑制作用有降低趋势、RKRKRKKSRYIVLS 的抑制作用明显下降(图 3),提示这两条多肽在血清中稳定性较差,这或许是该多肽在体抑制肿瘤细胞增殖作用较弱的主要原因,故需要对该两条多肽进行修饰,以提高其稳定性。对多肽末端进行封闭是增加多肽稳定性的常见途径[8],N 端乙酰化是蛋白质最常见的修饰方法之一,能增强蛋白质的稳定性[9-10],C 端酰胺化对多肽二级结构的稳定具有重要作用[11]。对多肽而言,N 端乙酰化和(或)C 端酰胺化可以减少多肽的整体电荷,使其与母本蛋白更为接近,提高其对蛋白酶、端解酶及合成酶等外肽酶的抵抗力。故我们对两条多肽进行保护性的化学修饰,即 N 端乙酰化(Ac)、C 端酰胺化(NH2),分别得到 Ac-QKRKRKKSRKKH-NH2、Ac-RKRKRKKSRYIVLS-NH2。10% 血清条件下,Ac-RKRKRKKSRYIVLS-NH2 对 A549 细胞增殖、活力的抑制作用均明显高于修饰前,说明修饰后 RKRKRKKSRYIVLS 在血清环境下的稳定性明显提高(经 HPLC 证实),为下一步的在体研究奠定了基础。HPLC 结果表明修饰后的 QKRKRKKSRKKH 在 10% 血清条件下的稳定性提高,但其抑制 A549 细胞增殖及活力的能力未见明显变化,说明 QKRKRKKSRKKH 无论修饰与否在血清环境下均能明显抑制 A549 细胞增殖,可以直接用于下一步的在体实验。

这两条多肽具有肿瘤靶向性,且能够明显抑制肿瘤细胞的增殖,但其作用靶点尚不十分清楚,而作用靶点的阐明对其用于肿瘤的分子显像及靶向治疗至关重要。课题组前期通过生物信息学方法预测发现,这两条多肽理论上的作用靶点可能包括 VEGFR、EGFR、αvβ3、FLT-3、HGFR、Tie-2、VIPR-2 等。GST 融合蛋白作为工具蛋白被广泛应用于分子生物学研究,有研究报道可用于免疫共沉淀[12],本研究通过对多肽与 GST 进行融合表达,得到可溶性融合蛋白 GST-QKRKRKKSRKKH、GST-RKRKRKKSRYIVLS,然后采用免疫共沉淀法证实这两条多肽均能与 VEGFR-1、VEGFR-2 结合,即 VEGFR-1、VEGFR-2 为这两条多肽的作用靶点,多肽可能通过封闭 VEGFR-1、VEGFR-2 对 A549 细胞增殖起抑制作用。是否还存在 VEGFR-1、VEGFR-2 之外的其他作用靶点是下一步研究的方向。

参考文献:

[1] 冯世斌, 李前伟, 郑磊, 等. 基于 VEGFR 靶点的小分子肿瘤靶向抑制肽的 99Tcm 标记及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(1): 24-28.

[2] 张翔, 郑磊, 谢来平, 等. 源于 VEGF125-136 肿瘤靶向抑

制肽的188Re标记及荷瘤裸鼠的显像研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(1): 15-19.
[3] Feng S, Zou L, Ni Q, *et al*. Modulation, bioinformatic screening, and assessment of small molecular peptides targeting the vascular endothelial growth factor receptor[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(3): 1913-1921. DOI: 10.1007/ s12013-014-0151-x
[4] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 549-560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012
[5] He T, Smith N, Saunders D, *et al*. Molecular MRI assessment of vascular endothelial growth factor receptor-2 in rat C6 gliomas[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(4): 837-849. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01091.x
[6] Stacy M R, Maxfield M W, Sinusas A J. Targeted molecular imaging of angiogenesis in PET and SPECT: a review[J]. Yale J Biol Med, 2012, 85(1): 75-86.
[7] Sallinen H, Anttila M, Narvainen J, *et al*. Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice[J]. Mol Ther, 2009, 17(2): 278-284. DOI: 10.1038/mt.2008.258
[8] Arispe N, Diaz J C, Flora M. Efficiency of histidine-associating compounds for blocking the alzheimer's Abeta channel activity and cytotoxicity[J]. Biophys J, 2008, 95(10): 4879-4889. DOI: 10.1529/biophysj.108.135517
[9] Zattas D, Adle D J, Rubenstein E M, *et al*. N-terminal acetylation of the yeast Derlin Der1 is essential for Hrd1 ubiquitin-ligase activity toward luminal ER substrates[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(7): 890-900. DOI: 10.1091/mbc.E12-11-0838
[10] Urbancikova M, Hitchcock-DeGregori S E. Requirement of amino-terminal modification for striated muscle alpha-tropomyosin function[J]. J Biol Chem, 1994, 269(39): 24310-24315.
[11] da-Silva A V, De-Souza B M, Dos-Santos-Cabrera M P, *et al*. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(10): 2357-2368. DOI:10.1016/j.bbamem.2014.06.012
[12] Khan G A, Girish G V, Lala N, *et al*. Decorin is a novel VEGFR-2-binding antagonist for the human extravillous trophoblast[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(8): 1431-1443. DOI: org/10.1210/me.2010-0426

(**收稿**:2015-11-17;**修回**:2016-01-24)
(编辑 汪勤俭)

DOI:10.16016/j.1000-5404.201510108

暴发性1型糖尿病合并急性肾功能衰竭1例

刘 娇,桂灵升,张 群,胡 蕖 (410220 重庆,重庆市长寿区人民医院内分泌内科)

[**关键词**] 暴发性1型糖尿病;肾功能衰竭
[**中图法分类号**] R587.1 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,29岁,因上腹部不适伴恶心、呕吐、腹泻2 d入院。入院前2 d患者饮酒后出现上腹部不适、恶心、呕吐,伴腹泻、乏力、纳差、口干、多饮,入我院急诊科,急诊以"急性胃肠炎"收入消化内科。查体:体温36.8 ℃,脉搏84/min,呼吸21/min,血压84/44 mmHg,BMI 18 kg/m^2,表情痛苦,意识清楚,双肺呼吸音清,心率84/min,律齐,全腹散在压痛,无反跳痛及肌紧张。入科后予吸氧、抑酸、抗感染等治疗,完善肾功能示尿素19.5 mmol/L、肌酐188.7 μmol/L、尿酸637.8 μmol/L。电解质示二氧化碳结合力5.6 mmol/L、钾6.73 mmol/L、钠106.7 mmol/L、氯71.8 mmol/L、钙1.81 mmol/L。血气分析:pH 7.02、氧分压65 mmHg、红细胞剩余碱-26.6 mmol/L、血气血糖27.8 mmol/L。上腹部CT:双下肺肺炎,双侧胸腔积液,脂肪肝。立即转入肾内科予血液净化、胰岛素降糖、补液、抗感染等治疗后病情好转,入院第2天完善尿常规示酮体(+)、葡萄糖(++)。复查肾功、电解质恢复正常。入院后第4天因血糖控制欠佳转入我科治疗,测定糖化血红蛋白6.1%,糖尿病相关抗体阴性。空腹C肽<0.1 ng/mL,75 g葡萄糖刺激后2 h C肽<0.1 ng/mL。确诊为暴发性1型糖尿病合并急性肾功能衰竭、电解质代谢紊乱。予胰岛素泵降糖治疗后血糖下降。最终降糖方案为3餐前皮下注射诺和锐各7 U、晚上10点注射甘精胰岛素10 U,血糖控制平稳。出院3个月后随访,空腹血糖为5.2 mmol/L,糖化血红蛋白6.3%,空腹C肽仍<0.1 ng/mL。

2 讨论

暴发性1型糖尿病(fulminant type 1 diabetes mellitus F1D)由日本学者Imagawa等[1]于2000年首次报道。符合以下3条即可确诊:(1)高血糖症状出现7 d内发生酮症或酮症酸中毒;(2)血糖≥16.0 mmol/L且

(下转1106页)

[**通信作者**] 胡 蕖,E-mail:270975914@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160108.1511.001.html (2016-01-08)