

重组人 TACE 的解整合素域对人肺腺癌 A549 体外增殖、粘附和侵袭的抑制作用

Inhibition of Proliferation ,Adhesion and Invasion Ability of Human Lung Carcinoma Cell A549 by Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE)

闫 媛¹ ,李小欧² ,章 杰¹ ,黄 巍¹ ,李凌波¹ ,杨渝珍^{1*}

YAN Yuan¹ ,LI Xiao-Ou² ,ZHANG Jie¹ ,HUANG Wei¹ ,LI Ling-Bo¹ and YANG Yu-Zhen^{1*}

¹ 华中科技大学同济医学院生化与分子生物学系 ,武汉 430030

² 华中科技大学同济医学院附属同济医院小儿内科 ,武汉 430030

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology ,Tongji Medical College ,Huazhong University of Science and Technology ,Wuhan 430030 ,China

² Department of Paediatrics ,Tongji Hospital ,Tongji Medical college ,Huazhong university of Science and Technology ,Wuhan 430030 ,China

摘 要 为了解人 TACE 的解整合素域对肿瘤细胞粘附和侵袭的影响以及其独立于其他结构域发挥作用的能力 ,从单核细胞系 THP1 中提取 RNA ,RT-PCR 扩增出 TACE 全长基因 ,构建了 pMD18T-TACE 载体。对 pMD18T-TACE 质粒进行 PCR ,分别扩增 T300(300bp ,编码解整合素域) ,T800(800bp ,编码酶催化域)及 T1300(1300bp ,编码胞外域)三个片段 ,将其分别亚克隆至表达载体 pET28a(+)。把质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) ,表达产物均以不溶性包涵体形式存在。经过溶解包涵体、BBST NTA 树脂柱亲和层析并透析复性 ,获得高纯度的三种活性蛋白。MTT 法、细胞粘附实验、Transwell 小室侵袭实验分别显示 TACE 解整合素域、胞外域蛋白均能明显抑制 A549 细胞的增殖 ,且以剂量依赖性的方式抑制 A549 细胞与纤维粘连蛋白的粘附 ,并能抑制 Transwell 小室中 A549 细胞对 Matrigel 模拟的天然基底膜的侵袭 ,而酶催化域蛋白则无相应的抑制能力。表明重组 TACE 解整合素域蛋白可独立抑制肿瘤细胞的增殖、粘附和侵袭 ,为深入研究该区域的作用及 TACE 在肿瘤发病中的机制提供了新的认识。

关键词 解整合素 ,TACE ,亚克隆 ,Transwell 小室

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0584-05

Abstract We constructed prokaryotic expression vectors for different domains of TACE gene and expressed the fusion proteins , so as to explore their effects on the proliferation ,adhesion and invasion potential of tumor cells *in vitro* . The total RNA was isolated from THP1 cell. TACE cDNA was amplified by RT-PCR and subcloned into pMD18-T vector to construct pMD-18T-TACE vector. The different cDNA fragment of TACE were amplified from plasmid pMD-18T-TACE and then cloned into pET-28a(+) to construct expression vector pET28a(+)-300 ,pET28a(+)-T800 ,and pET28a(+)-T1300 ,which respectively transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expression of His-tagged fusion proteins were induced with IPTG and purified through BBST NTA resin. The proliferation ability was examined by MTT assay. The adhesive and invasive ability were examined by plated adhesion model and Transwell assay. The protein pET28a(+)-T300 and pET28a(+)-T1300 can reduce the

Received : November 22 2006 ;Accepted : December 31 2006 .

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30471963).

* Corresponding author. Tel : + 86-27-83697511 ,E-mail : yangyz@mails.tjmu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30471963)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

proliferation, adhesion and invasion ability of human lung carcinoma cell A549 *in vitro*, but otherwise the protein pET-28a(+)T800 had not shown the inhibitive function. The fusion protein of disintegrin domain of TACE have the similar biological function to other disintegrins, which can be used for further research on function of TACE in inflammation and tumor.

Key words disintegrin, TACE, sub-cloning, transwell chamber model

ADAM(A Disintegrin and Metalloprotease)是一族跨膜糖蛋白,属于金属蛋白酶(MP)超家族,目前包括至少 30 个成员,在受精、精子移动、成纤维细胞融合、神经发育和细胞外域脱落中起重要作用^[1-4]。这类蛋白分子都包含信号肽区(signal peptide domain)、前肽区(prodomain)、金属蛋白酶区(metalloprotease domain)、解整合素区(disintegrin domain)、半胱氨酸富含区(cysteine-rich domain)、表皮生长因子样区(epidermal growth factor-like domain)、跨膜区(transmembrane domain)和胞内区(cytoplasmic domain),各个区域对蛋白的整体功能都做出自己的特殊贡献,近年来,对于解整合素区域的研究越来越受到重视^[5,6]。作为第一个确定的与包括 TNF- α 在内的几种重要的酶表面蛋白脱落有关的酶——ADAM17,又称肿瘤坏死因子- α 前体转换酶(tumor necrosis factor- α converting enzyme, TACE),广泛介导着炎症等生理病理过程,随着它的 mRNA 剪接变异体的报道,对其各个结构域的功能以及相互联系,尤其是解整合素区成为研究的新课题。本研究将构建 ADAM17 的解整合素域原核表达载体,为观察其是否可单独发挥作用,同时构建酶功能域、胞外结构域(包含酶功能域和解整合素域)的原核表达载体,在体外(*in vitro*)观察 3 种融合蛋白对 A549 细胞生物活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :pET-28a(+)载体,大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)均由本室保存,pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 细胞株系 :肺腺癌 A549 细胞,THP1 单核细胞均由本室保存。

1.1.3 试剂 :Taq DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司,LA Taq DNA 聚合酶,BamH I,EcoR I, RNA LA PCR Kit(AMV)均购于 TaKaRa 公司;Trizol Reagent 购自 Mrcgene 公司;人纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)购自 Chemicon 公司;Matrigel 胶购自美国 BD 公司;Transwell Permeable Support 购自美国 Corning 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒为上海碧云

天公司产品;BBST NTA 树脂、凝胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司;引物合成与序列测定由英俊生物技术有限公司完成,其他试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 TACE 全长克隆的构建 :离心收集对数生长期的 THP1 细胞约 5×10^6 个,采用 Trizol Reagent,按说明书方法提取总 RNA。以 Oligo-dT 为引物,参照 RNA LA PCR Kit(AMV)试剂盒实验手册合成 cDNA 第一链。根据 TACE CDS 序列(NM_003183)设计引物,序列如下:P1:5'-GGGAATTCGCCACCATGAGGCAGTCTCTCTATTCC-3';P2:5'-CGCGGATCCAGCTGAGAACTAAATTAGCAC-3'。以 RT 产物为模板,扩增出 TACE 全长 2475bp 片段,将其克隆入 pMD18-T-Vector,PCR 法筛选出阳性克隆并测序,测序正确的载体命名为 pMD18-T-TACE。

1.2.2 TACE 系列结构亚克隆的构建 根据 GenBank 中人 TACE CDS 序列的各个分区的划分,设计三对上游带 BamH I 酶切位点,下游带 EcoR I 酶切位点的引物,以 pMT18-T-TACE 为模板,PCR 分别扩增出 300bp 的解整合素域(P3,P4 为引物),800bp 的酶域(P5,P6 为引物),1300bp 的胞外域(P7,P8 为引物),引物序列如下:P3:5'-CGCGGATCCAGCAATAAAGTTTGTGGA-3';P4:5'-GCCGAATTCCTTGCCAAGATCCAAGCAAAC-3';P5:5'-CACGGATCCAGAGCTGACCAGATCCCAT-3';P6:5'-GGCGAATTCGCGTTCTTGAAACACTCCT-3';P7:5'-CACGGATCCTTGCTGACCCAATGATCCCATGAAG-3';P8:5'-CTAGAATTCATACATCCTGTACTCGTTTCTCAC-3'。按凝胶试剂盒说明回收目的片段;BamH I 和 EcoR I 双酶切后,在 T4 DNA 连接酶作用下,与用相同双酶切的 pET28a(+)质粒在 4℃连接,过夜后转化于 E.coli DH5 α ,用含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆,将酶切鉴定正确的克隆进行测序分析。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达和鉴定 :将 pET28a(+)T300、pET28a(+)T800、pET28a(+)T1300 质粒分别转入 E.coli BL21(DE3),挑取单个菌落接种于含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃振荡培养过夜,将菌液以 1:20 接种于 LB 培养基中(含

100 μ g/mL卡那霉素),培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。取样进行 12.5% 的 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 重组蛋白的纯化和复性 取经 IPTG 诱导 4h 后的表达菌液 4 $^{\circ}$ C 5000r/min 离心 20min,弃上清,加 10mL 超声缓冲液反复冻融后,冰上超声破菌 15 ~ 20Hz 20s \times 10; 4 $^{\circ}$ C, 10000r/min 离心 15min。取沉淀物与上清,分别进行 SDS-PAGE 电泳,可见目的蛋白均以包涵体形式存在。沉淀物用蛋白溶解液(8 mol/L urea, 50mmol/L Tris (pH8.0), 100mmol/L 2-巯基乙醇)重新溶解沉淀。预先用 10 倍柱体积的 Buffer A (20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L 咪唑, 10% 甘油)平衡 BBST NTA 树脂柱;将蛋白溶液过柱,用 10 倍柱体积的 Buffer A 洗柱;用 5 倍柱体积的 Buffer B (20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 50mmol/L 咪唑, 10% 甘油),收集流出液,1mL/管;用 5 倍柱体积的 Buffer C (20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 200mmol/L 咪唑, 10% 甘油),收集流出液,1mL/管;用 5 倍柱体积的 Buffer D (20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 350mmol/L 咪唑, 10% 甘油),收集流出液,1mL/管;用 12.5% SDS-PAGE 分析,收集含纯化蛋白的各管。收集的蛋白溶液按 1:100 于复性液(10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200mmol/L NaCl, 5mmol/L CaCl₂, 100 μ mol/L ZnCl₂, 100mmol/L Arginine, 1mmol/L GSSG, 1mmol/L GSH)中透析 2d,然后 1:400 对透析缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L NaCl)透析 4 $^{\circ}$ C 过夜,更换一次透析液再过夜。将得到的蛋白溶液用 PEG2000 浓缩。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。

1.2.5 MTT 法检测重组蛋白对 A549 细胞增殖的抑制作用 将 A549 (1×10^4 cell/well)接种于 96 孔板,于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 中培养 24h,加入不同浓度的 T300、T800、T1300 重组蛋白继续培养 24h,选择 490nm 波长,MTT 法测定吸光度。

1.2.6 A549 细胞的粘附实验 将 0.1mg/mL 的人纤粘连蛋白 FN (Fibronectin),以 40 μ L/孔加入 96 孔板中 4 $^{\circ}$ C 过夜,1% BSA 为对照基底。次日用 1% BSA 封闭 1h,将用重组蛋白以不同浓度(0.4 μ mol/L, 0.8 μ mol/L, 1.2 μ mol/L)和等量 PBS 分别温育过的 A549 细胞以 1×10^4 cell/well 接种于 96 孔板,于 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。PBS 洗去未粘附的细胞,用 4% 甲醛固定 10min 后 1% 结晶紫染色,PBS 洗去多余染料并干燥,用 1% SDS 溶解细胞,在 570nm 波长处测其吸光度。

1.2.7 A549 细胞的侵袭实验 将 4mg/mL 的 Matrigel

以 100 μ L/孔包被 Transwell 小室底部 4 $^{\circ}$ C 风干。然后用 1% BSA 封闭 1h。将预热的 RPMI1640 培养基加入 Transwell 下室内,加 bFGF (终浓度为 3ng/mL)。小室内加入用重组蛋白或 PBS 温育过 1h 的 A549 细胞悬液,每个小室的细胞数为 1×10^4 个,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 12h。取出 Transwell 小室,PBS 淋洗,用棉签擦去多聚碳酸盐膜上层的细胞,950mL/L 酒精固定,HE 染色。在倒置显微镜下计算移至膜下层的细胞,每个样本记数 10 个视野。

2 结果

2.1 pET28a-T300、pET28a-T800、pET28a-T1300 重组质粒的构建与鉴定

经 PCR 筛选获得的阳性菌提取的质粒 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切鉴定,分别出现 300bp, 800bp, 1300bp 左右的片段(图 1),质粒测序结果进一步证明构建成功(图 1)。

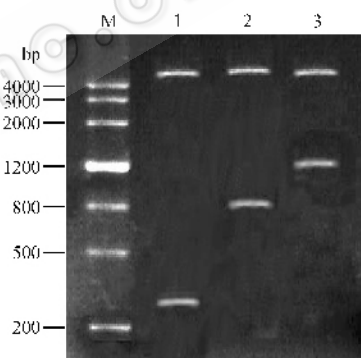


图 1 重组质粒 pET28a-T300 pET28a-T800、pET28a-T1300 的酶切鉴定

Fig. 1 Double digestion of recombinant plasmid

M : DNA marker ; 1 : recombinant plasmid pET28a-T300/*Bam*H I + *Eco*R I ; 2 : recombinant plasmid pET28a-T800/*Bam*H I + *Eco*R I ; 3 : recombinant plasmid pET28a-T1300/*Bam*H I + *Eco*R I .

2.2 T300、T800、T1300 重组蛋白的诱导表达及产物的鉴定

pET28a(+)T300、pET28a(+)T800、pET28a(+)T1300 质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 宿主菌, IPTG 诱导表达产物为带有 His-Tag 标签的融合蛋白,其分子量理论值分别为 18kD、37kD、55kD,菌体蛋白经 SDS-PAGE 电泳,见在分子量约为 18kD、37kD、55kD 处分别表达出一特异蛋白带,和理论值相符(图 2 中的左半部 Line 1、2、3),表达效率为 20% 左右。

2.3 T300、T800、T1300 重组蛋白的纯化

重组蛋白为带有组氨酸标签的融合蛋白,表达

于包涵体中。采用 BBST NTA 树脂柱对其进行纯化,SDS-PAGE 电泳后见单一的蛋白条带(图 2 中的右半部 Line 4、5、6)。T300、T800、T1300 重组蛋白的浓度分别 1mg/mL、1mg/mL、1.2mg/mL。

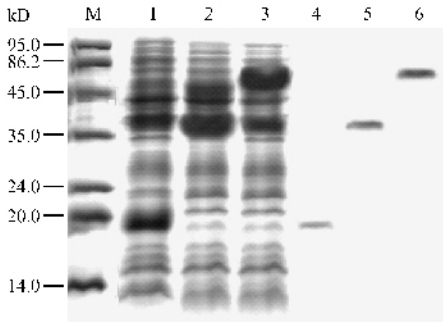


图 2 T300、T800、T1300 融合蛋白的表达(左)及纯化(右)的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.2 Analysis of recombinant proteins

M : protein molecular weight marker ;1 : induced expression of BL21/pET28a-T300 for 4h ;2 : induced expression of BL21/pET28a-T800 for 4h ;3 : induced expression of BL21/pET28a-T1300 for 4h ;4 : the purified fusion protein T300 ;5 : the purified fusion protein T800 ;6 : the purified fusion protein T1300 .

2.4 T300、T800、T1300 重组蛋白的生物活性

2.4.1 重组蛋白对 A549 细胞增殖的抑制作用 :重组蛋白 T300、T1300 对 A549 细胞增殖具有明显的抑制作用($P < 0.01$),如图 3 所示。T300 半效应量为 0.8 μ mol/L ,T1300 的半效应量为 0.65 μ mol/L。

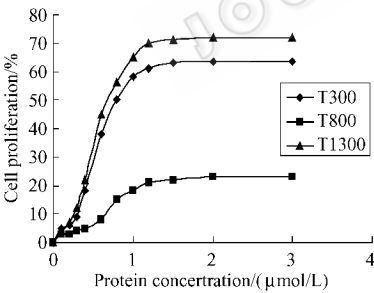


图 3 T300、T800、T1300 对 A549 细胞增殖能力的抑制作用

Fig.3 Inhibition on A549 cells proliferation by T300 ,T800 and T1300

2.4.2 重组蛋白对 A549 细胞粘附功能的抑制作用 重组蛋白 T300、T1300 呈剂量依赖性方式抑制 A549 细胞对纤粘连蛋白 FN 的粘附作用($P < 0.05$),但是 T800 没有表现出抑制作用(图 4)。

2.4.3 重组蛋白对 A549 细胞侵袭功能的抑制作用 Matrigel 胶是从小鼠 EHS 肉瘤中提取的基质成分,含有 LN、IV 型胶原等。将 Matrigel 铺在 Transwell 侵袭小室的多孔滤膜上,能形成与天然基底膜极为

相似的模型。1.5 μ mol/L 的重组蛋白作用于 A549 细胞后,结果表明 T300、T1300 都能明显抑制 bFGF 趋化下的 A549 细胞穿透 Matrigel 胶的侵袭能力($P < 0.05$),而 T800 作用后的细胞未见侵袭功能的明显改变(图 5)。

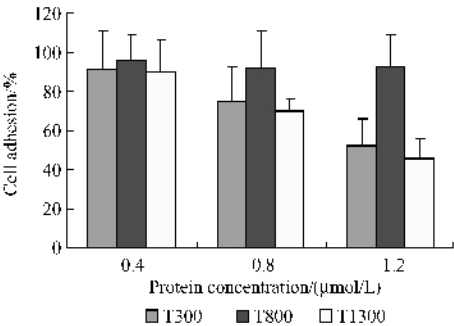


图 4 T300、T800、T1300 对 A549 细胞粘附于 FN 的抑制作用

Fig.4 Inhibition on A549 cells adhesion to FN by T300 ,T800 and T1300

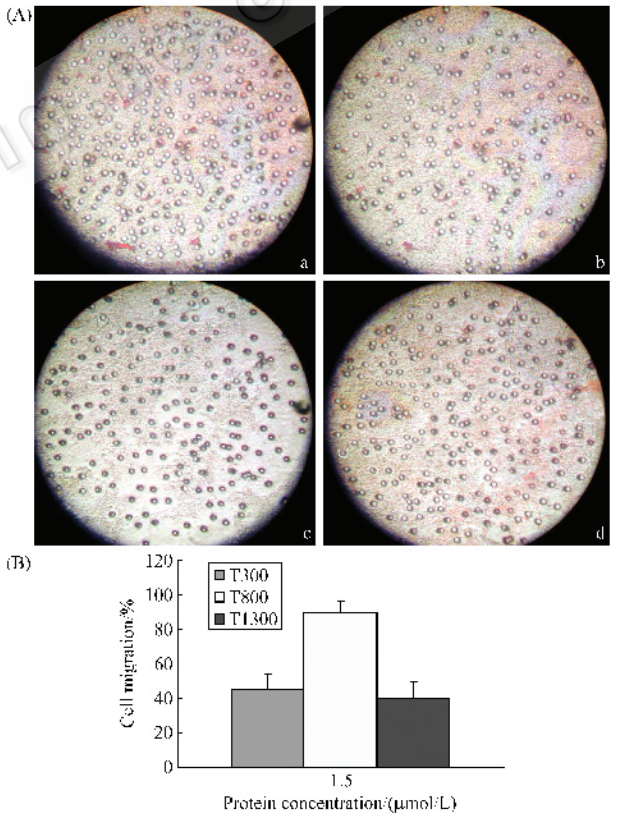


图 5 T300、T800、T1300 对 A549 细胞侵袭能力的抑制作用

Fig.5 Inhibition on A549 cells migration by T300 ,T800 and T1300 (A) A549 (1×10^4 /Well) were treated with PBS (a) ,1.5 μ mol/L T300 (b) ,1.5 μ mol/L T1300 (c) ,or 1.5 μ mol/L T800 (d) for 1h ,and then were seeded into the upper chamber of Transwell containing the Matrigel-coated filter membrane , bFGF (30ng/mL) was present as a chemoattractant which was added to the low chamber . After 12h ,cells that migrated to the underside of the filter were stained with HE ($\times 200$).

(B) Cell migration through the filter membrane were quantified.

3 讨论

整合素是所知的粘附分子中很重要的一类,整合素家族成员包括血小板纤维蛋白原受体 (glycoprotein II b/III a)和纤连蛋白受体与玻连蛋白受体等,配体主要为细胞基质成分和细胞表面黏附分子。整合素与配体相互作用,形成“配体-整合素-细胞骨架跨膜系统”,从而影响细胞的增殖、分化、凋亡、运动、细胞周期和淋巴细胞的归巢多种活动;在肿瘤的发展转移的各个环节中,直接或间接影响肿瘤的侵袭和转移^[7]。去整合素最初是在1987年由Huang TF等人在蛇毒中发现并作为血小板聚集抑制剂来报道的,随着研究的深入,发现它可以和很多细胞表面的整合素结合抑制细胞粘附从而影响肿瘤转移、血管生成、骨吸收及血小板凝集等体内过程^[8]。ADAM家族的解整合素区因与蛇毒解整合素家族中的很多成员同源而得名,ADAM2、3、9、12、15、23都已证明其通过解整合素区与整合素结合^[5,6],从而发挥一系列的生物活性。TACE的解整合素区含有99个氨基酸,对其详细的功能,目前尚未见报道,但对这一区域的同源性分析表明,TACE与ADAM29、15、30、22、21、11、2、33、12、20、19、7、8、18等解整合素有同源性,同时TACE可选择性地表达于某些肿瘤组织中,由此我们可以推测TACE的解整合素区也能参与结合整合素,在肿瘤细胞的粘附和侵袭过程中发挥干扰作用。

鉴于以上,我们参考GenBank上的TACE基因序列设计引物,从THP1细胞中获取RNA,RT-PCR出TACE的全长片段,并构建出克隆载体pMD18-T-TACE Full length,并以此为模板成功地获得解整合素区、酶功能区、胞外结构区,分别将其构建入表达载体pET-28a(+)且分别诱导表达,成功获得并纯化出三种融合蛋白,通过复性透析获得天然活性的蛋白。大量文献都报道,解整合素能够抑制肿瘤细胞的增殖、粘附和侵袭能力,因而我们的实验也从这几个方面着手研究,选择了整合素高表达的肺癌细胞系A549细胞^[9]。实验结果证明,重组蛋白T300能够较明显抑制A549细胞的增殖,抑制细胞对纤粘连蛋白的粘附以及Transwell小室模拟的侵袭行为,T1300的抑制作用和T300相近,而T800没有表现出明显的抑制作用。从而初步证明(1)TACE的解整

合素区具有抑制肿瘤细胞的增殖、粘附和侵袭能力的特性(2)TACE解整合素区是与整合素作用的主要部位,可以不需要酶区的协同。虽然根据现有的研究,不能确切地证明作用的具体位点和氨基酸序列,但对解整合素区域的氨基酸组成和序列分析表明,其第9~11位氨基酸分别是R(Arg) V(Val) D(Asp),与文献报道的多数解整合素与整合素作用的RGD(Arg-Gly-Asp)序列比较^[10],仅相差中间一个氨基酸残基,很有可能RVD就是TACE解整合素区与整合素作用的位点。TACE虽然已被确认为炎症控制和治疗的靶标,本研究进一步揭示TACE除了参与在炎症过程外,在肿瘤的发生发展中也起到了作用,从而为研究TACE在肿瘤治疗中的机制奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Seals DF, Courneidge SA. The ADAM gene family of metalloprotease multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003, **17**: 7-3.

[2] Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000, **16**: 83-87.

[3] Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992, **356**: 248-52.

[4] Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol* 1990, **111**: 69-78.

[5] White JM. ADAM: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**: 598-606.

[6] Eto K, Huet C, Tanui T, Kupriyanor S, Liu HZ, et al. Function classification of ADAM based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9 beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *J Biol Chem* 2003, **277**: 17804-17810.

[7] Kuphal S, Baucer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005, **24**: 195-222.

[8] Goula RJ, Polojoff MA, Friedman PA, et al. Disintegrin: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990, **195**: 168-171.

[9] Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, et al. Stimulation of β 1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cell through focal adhesion kinase. *Cancer Res* 2001, **61**: 2022-2030.

[10] Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and Hemostasis. *J Thromb Haemost* 2005, **3**: 1791-1799.