

# 重组七鳃鳗细胞毒素蛋白 rLj-RGD3 表达及对 HeLa 细胞活性的影响

张丕桥, 王继红, 刘欣, 褚丹, 李庆伟

辽宁师范大学 海洋生物功能基因与蛋白质组学研究所, 大连 116029

**摘要:** 为研究重组七鳃鳗细胞毒素蛋白 rLj-RGD3 的抗肿瘤活性, 确定其生物学地位及意义, 本研究提取成体七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 口腔腺组织总 RNA, 经 RT-PCR 获得 cDNA 序列长度为 357 bp 的目的基因片段, 将其克隆于 pET23b 载体, 获得带有组氨酸标签的分子量为 15 kD 的基因重组蛋白 rLj-RGD3 的高效可溶性表达, 通过组氨酸亲和层析纯化蛋白。采用 MTT 法检测不同浓度 rLj-RGD3 对 bFGF 诱导下的 HeLa 细胞增殖的抑制作用, 结果表明 rLj-RGD3 能显著抑制 HeLa 细胞的增殖,  $IC_{50}$  为  $2.6 \mu\text{mol/L}$ 。rLj-RGD3 作用后的 HeLa 细胞经 Hoechst 染色及 DNA ladder 检测结果显示, 细胞均发生凋亡。rLj-RGD3 对 HeLa 细胞黏附玻连蛋白(VN)作用的实验结果为有效抑制。采用 Transwell 细胞培养板对 bFGF 诱导下的 HeLa 细胞迁移实验表明, rLj-RGD3 能够抑制 HeLa 细胞的迁移, 且抑制率达 60%。采用人工基质膜基质 Matrigel 及 Transwell 模拟体内环境研究 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞浸润行为实验显示, 以 bFGF 为趋化剂的 HeLa 细胞穿透 Matrigel 的浸润行为明显受到抑制。以上研究表明, rLj-RGD3 具有典型的 RGD 毒素蛋白的功能, 有望应用于抗肿瘤基因工程药物开发, 具有重要的生物学意义。

**关键词:** 七鳃鳗, RGD 模体, 整合素, 基因重组, 抗肿瘤

## Expression and bioactivity effects to HeLa of recombinant toxin protein rLj-RGD3 from *Lampetra japonica*

Piqiao Zhang, Jihong Wang, Xin Liu, Dan Chu, and Qingwei Li

Institute of Halobios Function Gene and Protein Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

**Abstract:** Lj-RGD3 was a toxin from the saliva gland of *Lampetra japonica*. To study the anti-tumor function of rLj-RGD3 and confirm its biological status and significance, we extracted total RNA from the saliva gland and amplified the cDNA of Lj-RGD3 by RT-PCR. The cDNA of Lj-RGD3 was 357 bp long and encoded a polypeptide composed of 118 amino acids including 2 cysteines, 17 histidines and 3 RGD (Arg-Gly-Asp) motifs. We cloned the cDNA into the plasmid pET23b, and expressed the recombinant protein rLj-RGD3 in *Escherichia coli* BL21. Fusion rLj-RGD3 with the C-terminal his-tag was a 15 kD soluble protein. Using the His-Bind

**Received:** December 2, 2008; **Accepted:** March 2, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA09Z428), Major Scientific and Technological Research Projects of Dalian (No. 2007E11SF051), National Natural Science Foundation of China (No. 30770297), Doctor Starting Foundation of Liaoning Province (No. 20061050), Scientific and Technological Research Projects of Liaoning Education Department (No. L05201), The Excellent Young Technological Talents Foundation of Dalian Technology Bureau (No. 2005J22JH050), Innovation Team Project of Liaoning Education Department (No. 2008T102).

**Corresponding author:** Qingwei Li. Tel: +86-411-85827799; E-mail: liqw@263.net

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA09Z428), 大连市重大科技攻关项目(No. 2007E11SF051), 国家自然科学基金(No. 30770297), 辽宁省博士启动基金(No. 20061050), 辽宁省教育厅科技攻关项目(No. L05201), 大连市科技局优秀青年科技人才基金(No. 2005J22JH050), 辽宁省教育厅创新团队项目(No. 2008T102)资助。

affinity chromatography, we purified rLj-RGD3. Furthermore, we determined the biological activities of rLj-RGD3. To examine the ability of rLj-RGD3 inhibiting HeLa cells proliferation, we used MTT assay. The results showed that, rLj-RGD3 inhibited bFGF induced proliferation of HeLa cells in a dose-dependent manner, the  $IC_{50}$  value was  $2.6 \mu\text{mol/L}$ . Hoechst staining assay revealed that, the nuclei of the cells treated with rLj-RGD3 were stained much brighter than that of untreated cells due to chromatin condensation. Furthermore, the DNA ladder patterns from the cells treated with rLj-RGD3 were also observed. These results demonstrated that rLj-RGD3 could induce apoptosis of HeLa cells. Cell adhesion, migration and invasion are critical processes in tumor metastasis. rLj-RGD3 significantly inhibited adhesion of HeLa cells to vitronectin in a dose-dependent manner. In order to determine the effect of rLj-RGD3 on HeLa cells migration toward bFGF, we used Transwell containing insert filter. rLj-RGD3 showed a significant inhibition on HeLa cells migration, the inhibition rate was 60%. In the invasion assay, the Matrigel and Transwell were used to imitate environment in vivo. The results of invasion assay revealed that, rLj-RGD3 significantly inhibited bFGF induced invasion of HeLa cells. Taken together, these results revealed that rLj-RGD3 had typical functions of RGD toxin protein and will be valuable in developing anti-tumor recombinant medicine.

**Keywords:** *Lampetra japonica*, RGD-motif, integrin, gene recombinant, anti-tumor

RGD(Arg-Gly-Asp)模体是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的短肽序列, 是许多细胞表面某些整合素(Integrin)特异性配体之一。RGD 模体序列在人体内 67 种蛋白质中被发现, 其中包括某些细胞外基质(ECM)蛋白, 如纤维连接蛋白(FN)、玻连蛋白(VN)、层黏连蛋白(LM)、胶原及纤维蛋白原(Fg)等。这些 ECM 蛋白凭借 RGD 序列位点与整合素结合, 从而导致细胞与细胞外基质间的黏附、增殖、迁移、浸润等一系列生理行为<sup>[1-3]</sup>。目前为止, 已经发现一些存在于蛇毒、水蛭及虱类毒腺分泌物的 RGD 模体蛋白, 其可凭借蛋白质一级结构上特有的 RGD 分子序列而成为细胞外基质与细胞整合素间结合的强效竞争性拮抗剂, 进而通过封闭整合素的细胞信号转导通路而起到抑制血小板聚集、抑制血管新生<sup>[4]</sup>、抗肿瘤细胞增殖、黏附、迁移和浸润<sup>[5]</sup>等作用, 并能够诱导肿瘤细胞发生凋亡<sup>[6,7]</sup>。这一类 RGD 毒素蛋白因上述的重要功能已在抗血栓、抗肿瘤药物研发领域备受关注。

七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 属圆口纲 (Cyclostomata)、七鳃鳗目、七鳃鳗科、七鳃鳗属, 是迄今发现的最古老的无颌脊椎动物, 其进化地位比较特殊。为了寻找七鳃鳗口腔腺独有的特化基因及新基因, 研究其功能及其在进化中的地位与作用, 本课题已先期完成了七鳃鳗口腔腺 cDNA 文库的构建工作。随机挑选单克隆单向测序后, 共得到 1281 条有效 EST 序列<sup>[8]</sup>。对其进行生物信息学分析及 cDNA 全长钓取后, 确定了一条能翻译出 3 个 RGD 模体的开放阅读框, 对其重组蛋白命名为 rLj-RGD3。本研究利用分子克隆手段对其进行了基

因克隆及重组蛋白的诱导表达, 并对重组蛋白的抗肿瘤活性进行了研究。七鳃鳗口腔腺重组蛋白 rLj-RGD3 已成为发现于上述 3 大物种之外的第 4 种 RGD 毒素蛋白<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂和工具酶

野生型成体七鳃鳗 (*L. japonica*) 采自于中国黑龙江流域。

总 RNA 提取试剂为 Gibco BRL 的 Trizol 试剂。反转录 PCR 试剂盒、内切酶 *Nde* I 与 *Hind* III 等均购自大连宝生物工程有限公司; 质粒 pET23b、克隆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  及表达菌 *E. coli* BL21 均为本实验室保存; 组氨酸亲和层析柱(His·Bind column)购自 Novagen 公司; 宫颈癌 HeLa 细胞购自上海中国科学院细胞库; 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒购自碧云天公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自 PEPROTECH ECLTD; Matrigel 购自美国 BD 公司; Transwell 细胞培养板购自 Corning Costar 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Amresco 产品; 玻连蛋白(VN)及整合素介导细胞黏附试剂盒(ECM525)均购自 Chemicon; Olympus 荧光显微镜, Olympus 相差显微镜; 计数软件 Dotcounter 软件为大连恒为电子有限公司提供。

### 1.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR

取成体七鳃鳗口腔腺体迅速置于液氮中保存, 称取 0.2 g 毒腺组织, 加 1 mL Trizol 试剂制备毒腺匀浆, 4°C 孵育 5 min; 加 0.2 mL 氯仿, 盖紧盖后用

力振摇 15 s, 然后置于冰上 5 min; 4°C、12 000×g 离心 15 min; 将上层水相移入另一离心管, 加 0.5 mL 异丙醇, 并在冰上孵育 10 min; 4°C、12 000×g 离心 15 min; 弃上清, 在沉淀(含 RNA)中加 1 mL 75%乙醇洗涤, 旋涡混匀; 4°C、10 000×g 离心 5 min, 得到 RNA 沉淀; 空气干燥后, 用适量 TE 或无 RNase 水溶解备用。

利用提取的总 RNA 进行 RT-PCR 反应。首先在 PCR 管中加入以下反应液: 2 μL 10×RNA PCR buffer、4 μL MgCl<sub>2</sub>、8.5 μL RNase free dH<sub>2</sub>O、2 μL dNTP mixture、0.5 μL RNase inhibitor、1 μL reverse transcriptase、1 μL 特异的下游引物(P<sub>2</sub>)、1 μg total RNA, 按 42°C 20 min、99°C 5 min、5°C 5 min 条件进行反转录反应, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 以自行设计的引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增以钓取目的基因。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 2 min 后; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 6 min。

### 1.3 目的基因的获得及测序

以 RT-PCR 获得的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 获取 357 bp 的目的基因。引物序列为: P<sub>1</sub>: 5'-catatgtcaacgttcacgaacc-3', 含 Nde I 酶切位点。P<sub>2</sub>: 5'-aagcttctccccaacacattcactcac-3', 含 Hind III 酶切位点。

引物合成与 DNA 序列测定皆由大连宝生物工程有限公司完成。

### 1.4 目的基因的克隆

将目的基因与载体 pET23b 以 Nde I 和 Hind III 双酶切后 16°C 过夜连接, CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[10]</sup>转化至 *E. coli* DH5α 中, 以 T7 通用引物 PCR 及双酶切法进行阳性克隆的筛选与鉴定。

### 1.5 生物信息学分析

从 cDNA 序列推导出它所编码的氨基酸序列, 应用 NCBI 提供的 Blast 程序在 GenBank 数据库和蛋白质数据库进行同源性比较分析。

### 1.6 rLj-RGD3 毒素蛋白的诱导表达与纯化鉴定

将经鉴定确认的阳性转化子提取重组质粒, CaCl<sub>2</sub> 法转化至表达菌 *E. coli* BL21 中, 对重组菌进行不同时间与温度梯度的 IPTG 诱导表达。分别采用包涵体及可溶性蛋白的提取策略进行诱导蛋白的提取, 以含尿素的 Tricine-SDS-PAGE 小分子量蛋白质电泳法<sup>[11]</sup>进行蛋白质的鉴定以确定 rLj-RGD3 的存

在形式。

具体操作: 首先进行贮液配制和制备胶板, 然后加入上样 buffer: 4% SDS、12% glycerol (W/V)、50 mmol/L Tris、2% mercaptoethanol (V/V)、0.01% Serva Blue G (用 HCl 调至 pH 6.8)。电泳: 起始电压为 30 V, 以使所有样品完全进入堆积胶(Stacking gel), 间隔胶(Spacer gel)、分离胶 (Separating gel) 电压分别为 80 V、150 V。快速固定、染色与脱色: 于 50% 甲醇与 10% 冰醋酸组成的固定液中固定 30~60 min; 染色 1~2 h; 于脱色液(10%冰醋酸)中脱色, 每 30 min 更换 1 次, 直至蛋白条带清晰可见。蛋白质的纯化采用组氨酸亲和层析柱完成。

### 1.7 重组 rLj-RGD3 毒素蛋白的部分生物学活性测定

#### 1.7.1 MTT 法<sup>[12]</sup>检测重组蛋白对碱性成纤维生长因子(bFGF)诱导的 *Hela* 细胞增殖的抑制作用

将 *Hela* 细胞接种于 96 孔板中, 加入终浓度为 30 ng/mL 的 bFGF 诱导细胞增殖 24 h 后, 加入不同浓度的重组蛋白继续培养 24 h, MTT 法测定光吸收值, 测定波长为 490 nm。

#### 1.7.2 *Hela* 细胞凋亡的诱导

将 *Hela* 细胞接种于铺有灭菌盖玻片的 6 孔板中, 待细胞长满盖玻片, 以不同浓度梯度的重组蛋白进行细胞凋亡诱导。作用 24 h 后, 将细胞固定, Hoechst 荧光染料染色, 抗淬灭封片液封片, 荧光显微镜拍照。

#### 1.7.3 DNA ladder 的测定

细胞经重组蛋白 rLj-RGD3 处理后, 采用常规方法分离提纯 DNA 后, 进行琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色。

#### 1.7.4 *Hela* 细胞的黏附实验

将重组蛋白或等量 PBS 温育 0.5 h 的细胞接种于包被有浓度为 5 μg/mL 的玻连蛋白(VN)的 96 孔板上, 37°C 孵育 2 h, PBS 洗去未黏附细胞, 黏附细胞用 4% 的多聚甲醛固定; 然后用 1% 结晶紫染色 10 min。用 PBS 洗去多余染料并干燥后, 加入 1% 的 SDS 溶解细胞, 570 nm 波长处测定光吸收值<sup>[13]</sup>。

#### 1.7.5 *Hela* 细胞的迁移实验

采用 Corning Costar 公司的 Transwell (8.0 μm pore size, polycarbonate filter 多聚碳酸盐膜)细胞培养板观察上室内细胞向下室迁移的趋化性运动<sup>[14]</sup>。

以 Olympus 相差显微镜观察迁移到 Transwell 下表面的细胞并每个样片随机取 4 个视野拍照并计数, 将数据进行数学统计(计数软件为 Dotcounter)。

1.7.6 HeLa 细胞的浸润实验

采用美国 BD 公司生产的人工基质膜基质 Matrigel 及 Transwell 模仿体内环境观察重组蛋白 rLj-RGD3 作用后的 HeLa 细胞的浸润能力<sup>[15]</sup>。以 Olympus 相差显微镜观察浸润到 Transwell 下表面的细胞并每个样片随机取 4 个视野拍照并计数, 将数据进行数学统计(方法同 1.7.5)。

2 结果

2.1 Lj-RGD3 基因 cDNA 序列

根据 RGD 毒素蛋白候选基因序列设计引物 P<sub>1</sub> 与 P<sub>2</sub>, 以 RT-PCR 获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得了预期的目的基因(GenBank Accession No. FJ416333)。其 ORF 序列长度为 357 bp。

2.2 cDNA 序列推导蛋白质序列的同源性分析

序列分析表明, Lj-RGD3 的氨基酸序列含有 2 个半胱氨酸、17 个组氨酸、17 个精氨酸和 20 个苏氨酸。由此可判定其为一碱性多肽。通过 Signal P 及 secretome2.0 P 软件对其进行蛋白分泌类型分析, 结果显示, Lj-RGD3 无信号肽, 但 NN-分数为 0.856, 表明其为一不具信号肽的非典型分泌蛋白。

通过 NCBI 检索, Lj-RGD3 与其他 RGD 家族毒素蛋白进行序列比对, 结果发现 Lj-RGD3 与其他 RGD 家族毒素蛋白除具有 RGD 模体的共性外, 在一级结构上没有同源性(图 1), 分子遗传进化分析结果也证明了这一结论(图 2)。

2.3 阳性克隆菌的 PCR 筛选与双酶切鉴定

将 Lj-RGD3 基因克隆入 pET23b 载体, 经对 T7 通用引物 PCR 筛选获得的阳性菌提取质粒后进行双酶切, 均酶切出 357 bp 的 DNA 片段(图 3)。

Adinbitor	EAGEECDG SP--GNP CCD AATCKL RQ GA QC AE GLCCDQCR FM KKGTVCR IARGD -DM DDYCNG ISAG CPRNPFHA
Saxatilin	EAGEECDG AP--ANP CCD AATCKL RPGA QC AE GLCCDQCR FM KEGT CRM AARGD -DM DDYCNG ISAG CPRNPFHA
Bistatin	EQGEDCDG SPANCQDR CCNAATCKL TPGSQC NY GECCDQCR FKKAGTVCR IARGD -WN DDYCTGK SSDCPW N-H-
Barbourin	EAGEECDG SP--ANP CCD AATCKL RQ GA QC AD GLCCDQCR GM KKGTYCRVARGD -WN DD TCTGQSAD CPRNGLYG
Decorsin	APRL PQCQGGDDQEKCLCNKDECPGQCRFP RGD ADPYCE
Ornatin B	IYVRPTNDELNYCGDFRELGPDKKCRCDGKPC TVGRCKFA RGD NDDKCISA
Variabilin	NTFSDENPGFPCDCTSADAKRACGIQCACWP RGD TPGGGRRIIDGQQ
Lj-RGD3	MSTFINGTQEVDAICHKQNYPMGTETQGDT RGD TRHTTETQAEARTHAETHGDT RGD TRRHTWRHTRRHTDTHGH
Lj-RGD3	TRRHKLREHTQRHT GA RGD ARRHHGNKHLHRMSAAVSECVGE

图 1 不同物种来源的 RGD 毒素蛋白同源性比较

Fig. 1 NCBI blasting results of RGD with other disintegrins. Adinbitor, saxatilin, bistatin and barbourin are disintegrins from snake venom; Decorsin and ornatin B are RGD toxin protein from saliva gland of leech; variabilin are RGD toxin protein from salivary glands of hard tick; Lj-RGD3 are RGD toxin peptide from saliva gland of *L. japonica*.

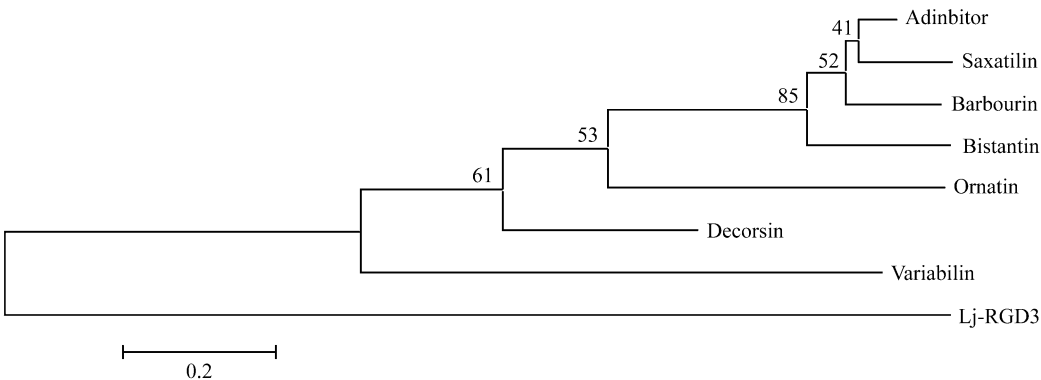


图 2 不同物种来源的 RGD 毒素蛋白系统进化树

Fig. 2 Phyligenetic tree of different RGD peptide. Adinbitor, saxatilin, bistatin and barbourin are disintegrins from snake venom; Decorsin and ornatin B are RGD toxin protein from saliva gland of leech; Variabilin are RGD toxin protein from salivary glands of hard tick; Lj-RGD3 are RGD toxin peptide from saliva gland of *L. japonica*.

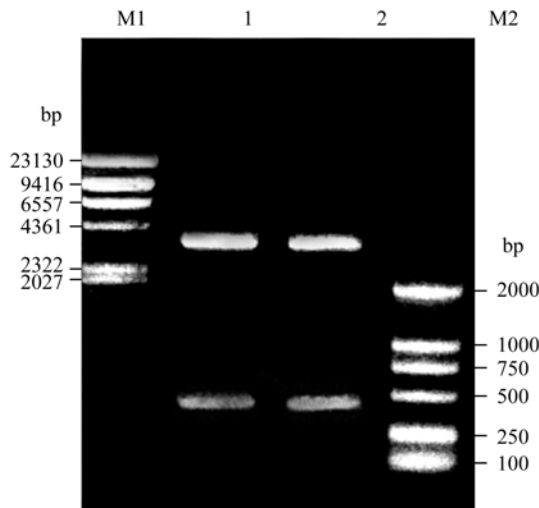


图3 *Nde I-Hind III* 的双酶切鉴定

Fig. 3 *Nde I-Hind III* double digestion of recombinant plasmid. M1:  $\lambda$ -*Hind III* DNA marker; 1, 2: 357 bp insert DNA; M2: DL2000 DNA marker.

## 2.4 重组菌进行时间梯度与温度梯度的 IPTG 诱导表达与纯化

提取阳性克隆菌质粒转化进 BL21 或 Rosetta 表达菌后, 30°C 下进行过夜 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 诱导表达, 经超声破菌及离心后, 提取菌体蛋白以含尿素的分离胶浓度为 16.5% 的 Tricine SDS-PAGE 小分子量蛋白质电泳法进行蛋白质的鉴定以确定 rLj-RGD3 的存在形式。结果表明, 其在各种诱导条件下的表达均为可溶性表达。

重组 rLj-RGD3 为带有组氨酸标签的融合蛋白, 分子量约 15 kD。采用 Novagen 公司的组氨酸亲和层析柱对其进行纯化, 获得了纯化蛋白(图 4)。可溶性纯化蛋白的获得为进一步的生物学活性测定奠定了基础。

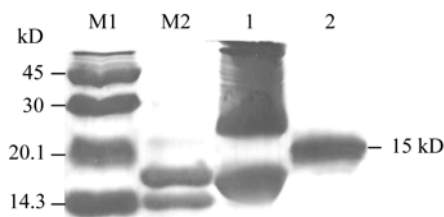


图4 Tricine SDS-PAGE 分析经亲和层析纯化的均质蛋白

Fig. 4 Tricine SDS-PAGE of the homogeneous protein purified by affinity chromatography. M1: Rainbow™ coloured low molecular weight markers; M2: polypeptide marker (16949 D, 14404 D); 1: the small molecular weight composition of natural salivary gland protein; 2: the purified fusion protein of 15 kD.

由电泳结果可以看出, 由于 rLj-RGD3 为碱性蛋白质, 故其电泳行为受所带电荷影响而位置比预期位置滞后。

## 2.5 重组蛋白的部分生物活性

### 2.5.1 对 bFGF 诱导下的 Hela 细胞增殖的抑制作用

如图 5 所示, 重组 rLj-RGD3 对 bFGF 诱导下的 Hela 细胞增殖具有明显的抑制作用, rLj-RGD3 半效应量(Median infective dose,  $IC_{50}$ )为 2.6  $\mu$ mol/L。

### 2.5.2 Hela 细胞凋亡的诱导

细胞发生凋亡时, 染色质会固缩。所以, 凋亡细胞在等渗条件下进行活细胞 Hoechst 染色时, 其吸收 Hoechst 的能力增强, 细胞核会致密浓染, 产生较强的蓝色荧光, 其强度要比坏死细胞和活细胞大得多。本试验以终浓度分别为 10.7  $\mu$ mol/L、16.0  $\mu$ mol/L、21.3  $\mu$ mol/L 的 rLj-RGD3 作用于 Hela 细胞 24 h 诱导细胞发生凋亡, 结果凋亡细胞量随 rLj-RGD3 蛋白浓度成梯度递增。说明 rLj-RGD3 具有诱导 Hela 细胞发生凋亡的功能(图 6)。

### 2.5.3 DNA ladder 的检测

如图 7 所示, 在 3  $\mu$ mol/L 浓度的 rLj-RGD3 作用下, Hela 细胞 DNA 发生了断裂。这充分说明了 rLj-RGD3 具有促进 Hela 细胞凋亡的功能。

### 2.5.4 rLj-RGD3 对 Hela 细胞黏附的影响

rLj-RGD3 对 Hela 细胞黏附于 ECM 中的主要成分玻连蛋白(VN)具有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性方式(图 8)。

### 2.5.5 rLj-RGD3 对 Hela 细胞迁移的影响

以 bFGF 为趋化剂来检测 rLj-RGD3 对 Hela 细胞向 bFGF 迁移的影响。实验结果表明, 以

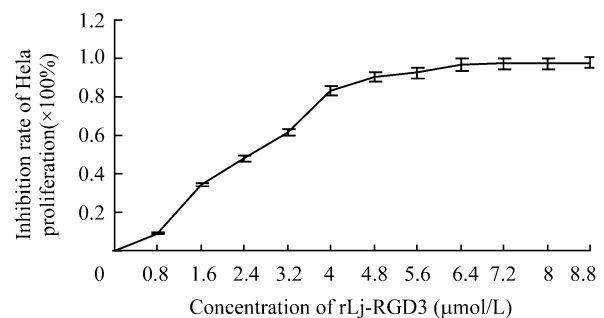


图5 rLj-RGD3 对 Hela 细胞增殖的抑制作用

Fig. 5 Inhibition on Hela cells proliferation by rLj-RGD3.

bFGF 为对照组的 HeLa 细胞的迁移量是 PBS 对照组的 1.6 倍, 而终浓度为  $3.2 \mu\text{mol/L}$  的 rLj-RGD3 能显著抑制 HeLa 细胞趋向于 bFGF 的迁移: 对下室中加有 bFGF 的细胞迁移的抑制率达到 60%, 而对下室中未加 bFGF 的细胞迁移的抑制率为 58%(图 9、图 10)。

### 2.5.6 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞浸润的影响

浸润是肿瘤转移的一个重要步骤。利用人工基质膜 Matrigel 和 Transwell 模仿体内环境可以很好地研究细胞的浸润行为。实验结果显示(图 11), rLj-RGD3 经过 16 h 对 HeLa 细胞的作用, 能明显抑制以 bFGF 为趋化剂的 HeLa 细胞穿透 Matrigel 的浸润行为。

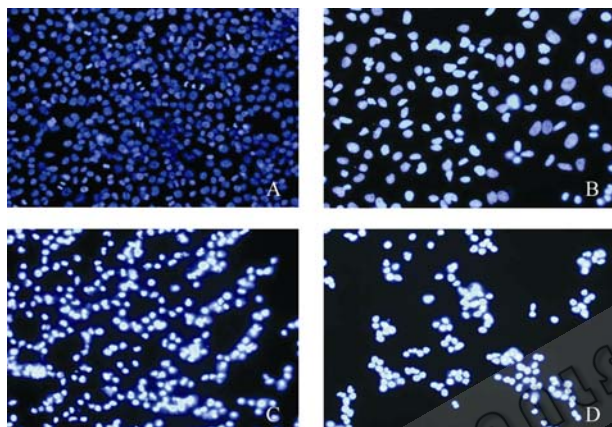


图 6 rLj-RGD3 诱导引起的 HeLa 细胞核的形态变化(显示细胞凋亡)

Fig. 6 rLj-RGD3-induced nuclear morphological changes in HeLa cells (shows apoptosis). HeLa nuclei were stained by DNA binding fluorescence dye Hoechst 33258 and examined by Olympus fluorescence microscopy ( $400\times$ ) in the absence (A) and presence (B-D) of  $10.7 \mu\text{mol/L}$ ,  $16.0 \mu\text{mol/L}$  and  $21.3 \mu\text{mol/L}$  of rLj-RGD3 respectively for 24 h; B-D showed more and more condensed, coalesced, and segmented nuclei induced by rLj-RGD3.

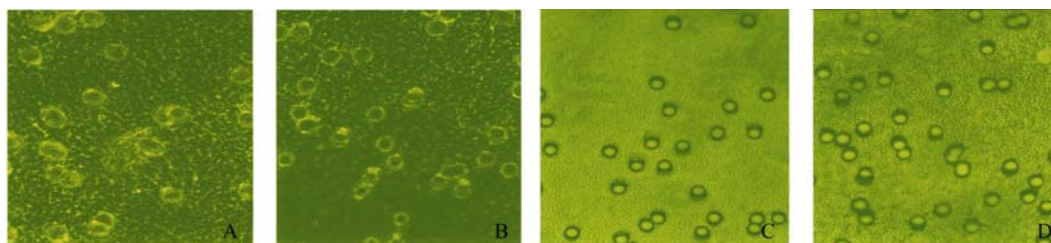


图 10 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞向 bFGF 迁移的影响(Olympus 相差显微镜拍照,  $400\times$ )

Fig. 10 Inhibitory effects of rLj-RGD3 on HeLa cells migration towards bFGF (Olympus phase-contrast light microscope,  $400\times$ ). HeLa ( $1 \times 10^4/\text{mL}$ ) were treated with PBS (A, B) or  $3.2 \mu\text{mol/L}$  rLj-RGD3 (C, D) for 30 min, and then placed in the upper chamber of Transwell containing a gelatin-coated filter membrane. bFGF ( $30 \text{ ng/mL}$ ) was present as a chemoattractant which was added to the lower chamber(B, D). After a 16 h incubation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde. After removal of nonmigrated cells, cells that migrated to the underside of filter membrane were photographed ( $400\times$ ) by Olympus phase-contrast light microscope.

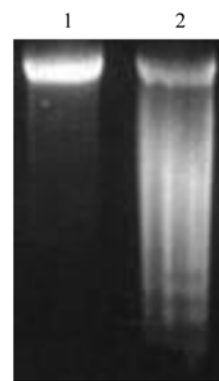


图 7 rLj-RGD3 作用下 HeLa 细胞 DNA 发生了断裂

Fig. 7 DNA ladder of HeLa cells affected by rLj-RGD3. 1: control; 2: cells presented in  $3 \mu\text{mol/L}$  of rLj-RGD3 (showed DNA ladder).

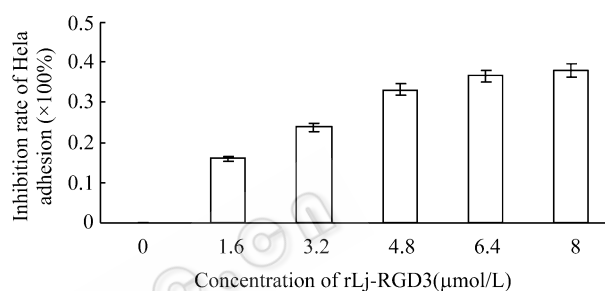


图 8 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞黏附于 VN 的抑制作用

Fig. 8 Inhibition on HeLa cells adhesion to VN by rLj-RGD3.

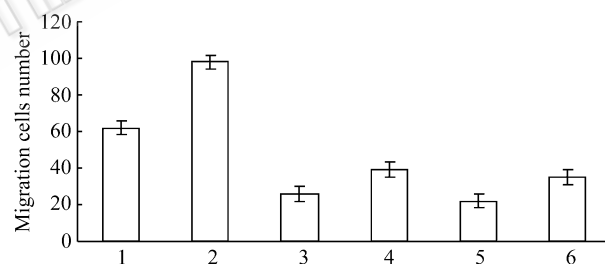


图 9 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞向 bFGF 迁移的抑制作用

Fig. 9 Inhibitory effects of rLj-RGD3 on HeLa cells migration towards bFGF. 1: PBS; 2: bFGF; 3:  $3.2 \mu\text{mol/L}$  rLj-RGD3; 4:  $3.2 \mu\text{mol/L}$  rLj-RGD3 + bFGF; 5:  $6.4 \mu\text{mol/L}$  rLj-RGD3; 6:  $6.4 \mu\text{mol/L}$  rLj-RGD3 + bFGF.



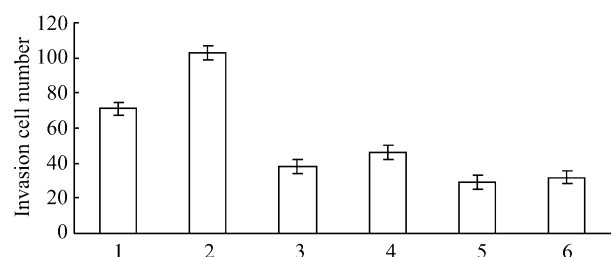


图 11 rLj-RGD3 对 bFGF 诱导的 Hela 细胞浸润的抑制作用

Fig. 11 Inhibitory effects of rLj-RGD3 on Hela cells invasion through Matrigel. 1: PBS; 2: bFGF; 3: 3.2 μmol/L rLj-RGD3; 4: 3.2 μmol/L rLj-RGD3 + bFGF; 5: 6.4 μmol/L rLj-RGD3; 6: 6.4 μmol/L rLj-RGD3 + bFGF.

### 3 讨论

1986 年, Humphries 等<sup>[16]</sup>首次报道了含 RGD 肽的甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (GRGDS)能在体外抑制黑色素瘤(B16-F10)细胞与 FN 的黏附,在体内减少 B16-F10 实验性肺转移的形成,而无 RGD 序列肽和 R、G、D 单个氨基酸则无此作用。由于 RGD 肽无免疫原性、无毒副作用而成为抑制肿瘤转移研究的一个热点。

黏附是癌细胞侵袭的始动步骤,肿瘤细胞通过膜表面受体黏附于基底膜及细胞外基质成分<sup>[17]</sup>。Yamamoto<sup>[18]</sup>曾指出,肿瘤细胞与细胞外基质的多种成分(如层黏连蛋白、纤维黏连蛋白等)的相互黏着,是肿瘤转移过程的重要环节,RGD 类肽限制了肿瘤细胞向细胞外基质的黏附及转移。有文献报道,RGD 肽可以抑制肺癌细胞与 FN 的黏附<sup>[19]</sup>,抑制乳腺癌细胞与 FN、LN、VN 的黏附<sup>[20]</sup>,其作用呈剂量依赖性。本实验以玻连蛋白人为模拟细胞外基质成分,它具有促进肿瘤细胞黏附的作用。实验发现,微量 rLj-RGD3 就表现出了抑制 Hela 细胞黏附的作用,随着 rLj-RGD3 浓度的增加,这种抑制作用就越明显,呈一定的剂量依赖关系,表明 rLj-RGD3 具有一定的抗黏附作用。Kumagai 等<sup>[21]</sup>的研究认为,RGD 环肽与线状 RGD 肽相比,抑制黑色素瘤(B16-F10)细胞与 FN 黏附的作用强 10 倍,对黑色素瘤细胞与 VN 黏附的抑制作用更为明显。环 GRGDSPA 能在体内明显减少黑色素瘤(B16-FE7)肺转移克隆的形成。RGD 环肽作用强,原因可能是 RGD 环肽的构象与 RGD 线状肽不同。

已证实含 RGD 重复序列的多肽,在体外能明显抑制黑色素瘤细胞的侵袭、迁移,而非重复的 RGD 肽作用较弱<sup>[22]</sup>;在体内抑制黑色素瘤的自发性和实验性转移的形成,作用较非重复的 RGD 肽强,且这种增强作用与 RGD 序列的重复次数有关,重复次数越多抗肿瘤转移作用越强<sup>[22,23]</sup>。rLj-RGD3 是具有 3 个重复 RGD 序列的多肽,在对人宫颈癌 Hela 细胞以 bFGF 为趋化剂诱导下的向人工基膜的迁移与浸润具有显著抑制作用,且抑制率可达到 60%。RGD 重复序列肽抗肿瘤转移作用增强的原因可能有以下 2 个方面,一是大分子肽在体内经肾脏排除慢;二是 RGD 重复序列肽有较多的与细胞结合的位点,能更有效地抑制血小板的聚集,抑制肿瘤细胞、血管内皮细胞与 ECM 的结合。

典型的 RGD 毒素蛋白具有抑制肿瘤增殖、凋亡、黏附、转移的作用<sup>[24]</sup>,从蛇毒中分离纯化的含 RGD 毒素蛋白都被证明具有上述作用。已有实验表明,白唇竹叶青素(Albolabrin)能抑制 B16-F10 与 LN、FN 的黏附、抑制血小板的聚集、抑制 B16-F10 的实验性肺转移,应用剂量小,只需 RGD 类肽的 1/1000~1/2000<sup>[25]</sup>。中国白眉蝮蛇去整合素 adinbitor 含有 RGD 肽,其具有抑制 bFGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖、诱导细胞凋亡等作用<sup>[26]</sup>。本研究采用重组 rLj-RGD3 对 bFGF 诱导下的 Hela 细胞作用后发现其增殖受到显著抑制;通过重组 rLj-RGD3 作用于 Hela 细胞后,采用 Hoechst 染色也检测到细胞发生凋亡;在 3 μmol/L 浓度的 rLj-RGD3 作用下, Hela 细胞的 DNA 发生了断裂,也表明了细胞发生了凋亡。这些实验结果均充分证明了七鳃鳗重组蛋白 rLj-RGD3 的典型 RGD 毒素蛋白功能。

迄今为止已发现有 3 个不同物种来源的 RGD 毒素蛋白家族,这 3 个家族分别来源于蛇毒<sup>[27]</sup>、吸血动物水蛭及虱类唾液腺分泌物。对上述物种来源的 RGD 毒素蛋白进行蛋白质一级结构比对发现,来源于物种内的蛇毒的去整合素在一级结构上高度同源,而物种间的 RGD 毒素蛋白在一级结构上除了具有 RGD 模体和多对半胱氨酸的共性外,没有任何同源性。本试验对重组七鳃鳗细胞毒素蛋白 rLj-RGD3 进行了克隆与蛋白表达,NCBI 检索比对后发现,其氨基酸序列与上述 3 大物种来源的 RGD 毒素蛋白在一级结构上除具有 RGD 模体和一对半胱氨酸的

共性外, 没有同源性。结合物种间 RGD 毒素蛋白一级结构无同源性的特点, 同时根据本实验结果, 可以推断重组七鳃鳗细胞毒素蛋白 rLj-RGD3 可能是 RGD 毒素蛋白家族的新成员。

本课题对 rLj-RGD3 的作用机制进行了初步研究。通过对 HeLa 细胞表面表达的整合素类型测定发现, 其细胞表面高表达 $\alpha_v\beta_5$  和 $\beta_1$  两种类型整合素。另据文献报道<sup>[28]</sup>, 玻连蛋白(VN)的主要受体是 $\alpha_v\beta_5$  和 $\alpha_v\beta_3$ , 而 rLj-RGD3 对 HeLa 细胞黏附于细胞基质中主要成分玻连蛋白(VN)具有抑制作用, 由此可以推断 rLj-RGD3 可能是通过竞争性地抑制 HeLa 细胞表面的 $\alpha_v\beta_5$  与细胞外基质的结合来抑制细胞的一系列活性的<sup>[29]</sup>, 具体机制还有待于进一步的实验证实。

本研究首次对重组七鳃鳗细胞毒素蛋白 rLj-RGD3 进行了克隆表达, 研究了其对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡、黏附、迁移、浸润等行为的作用, 结果表明 rLj-RGD3 能显著抑制 HeLa 细胞的增殖、黏附、迁移、浸润行为, 能够诱导 HeLa 细胞发生凋亡, 证明了其为 RGD 毒素蛋白家族的一个新成员, 这也是首次从日本七鳃鳗这一海洋生物物种中发现并确认 RGD 毒素蛋白功能新基因, 将为七鳃鳗的功能基因组学与蛋白质组学研究奠定理论基础, 为利用其进行抗血栓、抗肿瘤基因工程药物开发提供了实验依据, 确定了其重要的生物学意义。

## REFERENCES

- [1] Julie L, David T. Cell response to RGD density in cross-linked artificial extracellular matrix protein films. *Biomacromolecules*, 2008, **10**: 210–241.
- [2] Piershbach MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984, **309**(5963): 30–33.
- [3] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12**: 697–715.
- [4] Oscar HP, Ramos AK, Márcia RC, *et al.* A novel  $\alpha_v\beta_3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, Dis Ba-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin Exp Metastas*, 2008, **25**(1): 53–64.
- [5] Kim DS, Jang YJ, Jeon OJ, *et al.* Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF- $\alpha$ -induced ovarian cancer cell invasion. *J Biochem Mol Biol*, 2007, **40**(2): 290–294.
- [6] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 2003, **24**(24): 4385–4415.
- [7] Kim J, Hong SY, Park Y, *et al.* Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins. *Mol Cell*, 2005, **19**(2): 205–211.
- [8] Gao Q, Feng Y, Wu Y, *et al.* Expressed sequence tags (ESTs) analysis of the oral gland of *Lampetra japonica*. *Acta Gen Sin*, 2005, **32**(10): 1045–1052.  
高琪, 逢越, 吴毓, 等. 日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*) 口腔腺表达序列标签(EST)分析. *遗传学报*, 2005, **32**(10): 1045–1052.
- [9] Wang JH, Ren F, Wu Y, *et al.* Cloning, expression and some biological functions of Adinbitor, a disintegrin from *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20**(6): 745–749.  
王继红, 任凤, 吴毓, 等. 白眉蝮蛇去整合素 Adinbitor 的基因克隆、表达及其部分生物学活性. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**(6): 745–749.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 55–56.
- [11] Schagger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368–379.
- [12] Situ DQ. *Cell Culture*. Beijing: World Publishing Corporation Press, 2004.  
司徒德强. *细胞培养*. 北京: 世界图书出版公司, 2004.
- [13] Chris DM, Gian MSF, Annapaola A, *et al.* uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol*, 2007, **177**(5): 927–939.
- [14] Hideaki O, Nobuhiro I, Kunitoshi O, *et al.* Inhibitory effects of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide on cell attachment and migration in a human lens epithelial cell line. *Ophthalmic Res*, 2005, **37**: 191–196.
- [15] Schmitmeier S, Markland FS, Ritter MR, *et al.* Functional effect of contortrostatin, a snake venom disintegrin, on human glioma cell invasion *in vitro*. *Cell Commun Adhes*, 2003, **10**(1): 1–16.
- [16] Humphries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, 1986, **233**(4762): 467–470.
- [17] Darius S, Lucy L, Carolin D, *et al.* Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **357**(1): 282–288.
- [18] Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Mayumi T. Molecular design of bioconjugated cell adhesion peptide with a water soluble polymeric modifier for enhancement of antimetastatic effect. *Curr Drug Targets*, 2002, **3**(2): 123–130.



- [19] Hirasaw AM, Shijubo N, Uede T. Integrin expression and ability to adhere to extracellular matrix protein and endothelial cells in human lung cancerlines. *Brit J Cancer*, 1994, **70**(3): 466–473.
- [20] Gui GPH, Puddeffoot JR, Vision GP. Altered cell-matrix contact: A prerequisite for breast cancer metastasis. *Brit J Cancer*, 1997, **75**(5): 623–633.
- [21] Kumagai H, Tajima M, Ueno Y. Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **177**(1): 74–82.
- [22] Saiki I, Murata J, Matsuno K. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly (RGD) and its analogues. *Jpn J Cancer Res*, 1990, **81**(6/7): 660–668.
- [23] Saiki I, Yoneda J, Igarashi Y, *et al.* Antimetastatic activity of polymeric RGD peptides conjugated with poly (ethylene glycol). *Jpn J Cancer Res*, 1993, **84**(5): 558–565.
- [24] Isabela BO, Raphael MC, Gabriel GB, *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicon*, 2007, **50**(8): 1053–1063.
- [25] Soszka T, Knudsen KA, Beviglia L. Inhibition of murine melanoma cell matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. *Exp Cell Res*, 1991, **196**(1): 6–10.
- [26] Wang JH, Wu Y, Ren F, Lü L, *et al.* Cloning and characterization of adinbitor, a novel disintegrin from the snake venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36**(6): 425–429.
- [27] Zhao CL, Cui XY, Ren F, *et al.* A novel disintegrin from *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger* inhibits adhesion and proliferation of SMMC-7721 cells. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2008, **7**(7): 390–393.
- [28] Alexandr S, Elisabeth SR, Nelly K. RGD, the Rho'd to cell spreading. *Eur J Cell Biol*, 2006, **85**: 249–254.
- [29] Sun YX, Zeng X, Meng QF, *et al.* The influence of RGD addition on the gene transfer characteristics of disulfide-containing polyethyleneimine/DNA complexes. *Biomaterials*, 2008, **29**: 4356–4365.

## 2009 年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学