

日本七鳃鳗 Arg-Gly-Asp 毒素蛋白 Lj-RGD3 野生型与 RGD 全缺失突变体 Lj-112 的抗血管新生作用

王继红^{1,2*}, 张亚前^{1,2*}, 吕莉³, 刘欣^{1,2}, 李庆伟^{1,2}

1 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

2 辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 大连 116029

3 大连医科大学药学院药理教研室, 大连 116044

摘要: 七鳃鳗 Arg-Gly-Asp (RGD) 毒素肽 Lj-RGD3 与富含组氨酸糖蛋白 HRG 具有序列同源性, 而 RGD 毒素蛋白及 HRG 都具有抑制血管新生的活性, 但作用靶点不同。为研究 Lj-RGD3 结构与功能的关系, 对野生型 Lj-RGD3 及其 RGD 全缺失突变体 Lj-112 进行了抗血管新生功能研究。将 3 个 RGD 模体的全缺失突变体基因 Lj-112 全序列合成后构建于 pET-23b 载体, 对野生型 Lj-RGD3 及突变体 Lj-112 蛋白进行 IPTG 诱导表达, 重组蛋白经组氨酸亲和层析纯化; 采用 MTT 法测定野生型和突变体蛋白对人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞增殖的抑制作用; 采用 Transwell 细胞培养板及人工基质膜 Matrigel 模仿体内环境研究 rLj-RGD3 与 rLj-112 对 ECV304 细胞迁移及浸润的抑制作用; 运用鸡绒毛尿囊膜 (CAM) 模型检测 rLj-RGD3 与 rLj-112 对血管新生的抑制作用; ELISA 法检测两种蛋白对整合素连接激酶 ILK-1 表达的影响。经组氨酸亲和层析获得了分子量约为 15 kDa 的 rLj-RGD3 及 rLj-112 纯化蛋白。MTT 实验表明, rLj-RGD3 与 rLj-112 均以剂量依赖方式抑制 bFGF 诱导的 ECV304 细胞增殖, rLj-RGD3 的 IC_{50} 为 0.889 $\mu\text{mol/L}$, rLj-112 的 IC_{50} 为 0.160 $\mu\text{mol/L}$ 。迁移及浸润结果表明, Lj-RGD3 与 Lj-112 均能抑制 ECV304 细胞的迁移, 抑制率分别为 50% 和 63%; 而以 bFGF 为趋化剂的 ECV304 细胞穿透 Matrigel 的浸润行为均明显受到抑制, 且 Lj-112 的抑制功能强于 Lj-RGD3。CAM 血管新生实验结果表明, rLj-RGD3 与 rLj-112 均能抑制 CAM 的血管新生, 且同等剂量条件下 rLj-112 的作用强于 rLj-RGD3。ILK-1 的 ELISA 实验结果表明, rLj-RGD3 与 rLj-112 均能下调 ECV304 细胞 ILK-1 的表达。野生型 rLj-RGD3 与其 RGD 全缺失突变体蛋白 rLj-112 均具有抑制血管新生功能, 且突变体 Lj-112 的活性高于野生型 Lj-RGD3, 这说明 Lj-112 为 HRG 功能蛋白, 而野生型 Lj-RGD 毒素蛋白与 HRG 序列的同源性并未使其抗血管新生功能得到协同加强, 二者的抗血管新生功能涉及了不同的信号通路。

关键词: 日本七鳃鳗, RGD 毒素蛋白, 富含组氨酸糖蛋白, 突变体, 血管新生

Received: April 12, 2011; **Accepted:** May 23, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA09Z428), National Natural Science Foundation of China (No. 30770297), Innovation Team Project of Liaoning Education Department (No. 2008T102), Major Scientific and Technological Research Projects of Dalian (No. 2010E13SF143), Doctor Starting Foundation of Liaoning Province (No. 20081080), Foundation for Returned Scholars of Dalian (No. 2008J22JH010).

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

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA09Z428), 国家自然科学基金 (No. 30770297), 辽宁省教育厅创新团队项目 (No. 2008T102), 大连市重大科技攻关项目 (No. 2010E13SF143), 辽宁省科学技术厅博士启动基金 (No. 20081080), 大连市科学技术局留学回国人员科研基金 (No. 2008J22JH010) 资助。

Anti-angiogenic activities of Lj-RGD3 toxin protein from *Lampetra japonica* and its mutation protein Lj-112 without RGD motifs

Jihong Wang^{1,2*}, Yaqian Zhang^{1,2*}, Li Lü³, Xin Liu^{1,2}, and Qingwei Li^{1,2}

¹ Department of Biological Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

² Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, Dalian 116029, China

³ Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: Arg-Gly-Asp (RGD)-toxin protein Lj-RGD3 of *Lampetra japonica* shares homologous with a Histidine-rich glycoprotein (HRG), and both RGD-toxin protein and HRG have antiangiogenic activities with different targets. To study the relationship between the function and the structure of Lj-RGD3, we studied the anti-angiogenic characteristics of both Lj-RGD3 and the mutation named Lj-112 of which three RGD motifs of Lj-RGD3 were deleted. We synthesized the gene of Lj-112, constructed it to the plasmid pET23b, and expressed the recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21. Both recombinant proteins with the C-terminal his-tag were 15 kDa soluble proteins. Then we purified rLj-RGD3 and rLj-112 using the His-Bind affinity chromatography. To examine the effect of both proteins on bFGF-induced proliferation of ECV304 cell, we carried out the 3-(4,5)-dimethylthiaziazolo (-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazoliumromide (MTT) assays. For cell migration and invasion assays, we used Transwell containing insert filter and Matrigel to imitate the *in vivo* environment. To examine whether both proteins were capable of interrupting the angiogenesis *in vivo*, we used the chick chicken embryonic chorioallantoic membrane (CAM) as an angiogenesis model. We used Integrin-linked kinase1 (ILK1) ELISA method to study functionary mechanisms of rLj-RGD3 and rLj-112. Both rLj-RGD3 and rLj-112 inhibited bFGF-induced proliferation of ECV304 cells in a dose-dependent manner with IC₅₀ at 0.889 $\mu\text{mol/L}$ and 0.160 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The results of migration and invasion assays revealed that both rLj-RGD3 and rLj-112 showed significant inhibition on bFGF induced migration and invasion of ECV304; and rLj-112 was more active than rLj-RGD3. The result of CAM angiogenesis assay demonstrated that both proteins inhibited the angiogenesis in chick CAM, and rLj-112 was more active than rLj-RGD3. ELISA assay of ILK1 showed that both rLj-RGD3 and rLj-112 down-regulated ILK1 expression of ECV304 cell. The fact of rLj-112 was more active than rLj-RGD3 on anti-angiogenesis indicate that rLj-112 was likely with histidine-rich glycoprotein (HRG), and the factor of sequence homologous between rLj-RGD3 and HRG cannot enhance antiangiogenic activities of rLj-RGD3, the signal pathway of anti-angiogenesis of rLj-RGD3 and rLj-112 are differently.

Keywords: *Lampetra japonica*, RGD-toxin proteins, histidine-rich glycoprotein (HRG), mutation, angiogenesis

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^[1]。其为海洋洄游性鱼类,成体在海洋中用吸盘附在其他鱼体上吸食血肉而营半寄生生活。由于日本七鳃鳗可使被其所吸附的鱼血流不止,所以可以断定七鳃鳗口腔腺分泌物中具有抗凝血成分,其基因为独有的特化基因。鉴于此,本课题组从前期研究工作中发现了一条存在于七鳃鳗口腔腺的含有 3 个 RGD (Arg-Gly-Asp) 模体的毒素蛋白 Lj-RGD3^[2]。

RGD 毒素蛋白为一类含 RGD (Arg-Gly-Asp) 模体的来源于吸血或有毒生物唾液腺的分泌蛋白,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细胞信号转导通路而起到抑制血小板聚集、抑制血管新生和抗肿瘤细胞增殖等作用。迄今为止已发现有 4 个不同物种来源的 RGD 毒素蛋白家族,这 4 大家族分别来源于蛇毒、吸血动物水蛭、蛭类及七鳃鳗唾液腺分泌物^[2-9]。来源于七鳃鳗口腔腺的 Lj-RGD3 蛋白是本

课题组发现的世界上第 4 大类 RGD 毒素蛋白 (GenBank Accession No. ACS71748.1)。前期实验证明, rLj-RGD3 具有抗血管新生、抗肿瘤增殖及抗血小板聚集的功能, 且这些功能皆以细胞表面表达的整合素为靶点, 这说明 Lj-RGD3 是一种典型的 RGD 毒素蛋白^[2,10]。

一级结构的分析与比对结果表明, Lj-RGD3 除具有 RGD 毒素蛋白的 RGD 模体特征外, 其在一级结构上与富含组氨酸糖蛋白 (Histidine-rich glycoprotein, HRG) 有同源性。富含组氨酸糖蛋白为发现于脊椎动物血液中的血浆糖蛋白, 由肝脏合成并释放入血。其具有 4 个结构域: N 端的 N1-结构域、N2-结构域、C 末端-Domain 及富含组氨酸结构域。其中的富含组氨酸结构域能同时与众多配体结合而行使多种功能, 比如: 抗血管新生, 可溶性免疫复合物抑制, 加强巨噬细胞对凋亡细胞的清除, 抗菌等生物学活性^[11]。

鉴于 HRG 也具有抗血管新生活性, 本文对 Lj-RGD3 进行了 3 个 RGD 模体的全缺失突变 (命名为 Lj-112), 对作为 RGD 毒素肽的野生型 Lj-RGD3 与作为类 HRG 的突变体 Lj-112 的抗血管新生活性进行了比较, 以确定 Lj-RGD3 结构与功能的关系。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

野生型成体七鳃鳗 *Lampetra japonica* 采自于中国黑龙江流域。

ECV304 (人脐静脉内皮细胞) 细胞购自武汉大学; pET23b 空质粒及 pET23b-RGD3 重组质粒为本实验室保存; 质粒提取试剂盒、IPTG 购自宝生物大连公司; 组氨酸亲和层析柱 (His-Bind Column) 购自 Novagen 公司; 胎牛血清购自德国 PAA 公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自 PEPROTECH INC; 四甲基偶氮唑 (MTT)、细胞裂解液购自碧云天公司; ELISA

试剂盒和 Matrigel 均购自美国 BD 公司; 96 孔板、Transwell 细胞培养板购自 Corning Costar 公司; 6 日龄鸡胚购自大连韩伟养鸡场。

1.2 生物信息学分析

采用 ExPASy 系统软件对蛋白的氨基酸组成和等电点进行分析, 采用 UniProt blastp 检索程序对蛋白进行序列比对。

1.3 目的基因的合成

野生型 Lj-RGD3 基因含有大量重复序列, 无法进行基因的定点突变, 故采用全基因序列合成方法。Lj-RGD3 3 个 RGD 模体的全缺失突变基因由大连宝生物公司合成, 合成后基因以 *Nde* I 和 *Hind* III 为酶切位点构建至 pET23b 载体。

1.4 重组质粒转化

提取突变体阳性克隆质粒 pET23b-112, CaCl_2 法^[12]转化至表达菌大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 中。

1.5 蛋白的诱导表达及纯化鉴定

对转化后阳性菌进行 30 °C 过夜的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 收集菌体经超声破碎及离心后, 提取上清, 采用 Novagen 公司的组氨酸亲和层析柱对其进行纯化, 以含甘油的 Tricine-SDS-PAGE^[13]电泳法进行蛋白质纯度鉴定。

1.6 rLj-RGD3 野生型与突变体蛋白 rLj-112 之间部分生物学活性的比较

1.6.1 MTT 法检测蛋白对细胞增殖的影响

将 ECV304 细胞接种于 96 孔板中, 加入终浓度为 30 pg/L 的 bFGF 诱导细胞增殖 24 h 后, 加入不同浓度的野生型 Lj-RGD3 与突变体 Lj-112 蛋白继续培养 24 h, MTT 法测定波长为 490 nm 下的光吸收值。

1.6.2 鸡绒毛尿囊膜 (CAM) 实验

采用 6 日龄鸡胚, bFGF 诱导 24 h 后, 以 30 μL 浓度为 0.2 g/L 的野生型 rLj-RGD3、突变体 rLj-112 蛋白作用于鸡胚, 同时以 30 μL 的七鳃鳗 rLj-GRIM19 (0.2 g/L)、PBS、洗脱液为阴性对照,

24 h 后观察血管的生长情况。

1.6.3 细胞迁移实验

采用 Corning Costar 公司的 Transwell (8.0 μm pore size, polycarbonate filter, 多聚碳酸盐膜) 细胞培养板来比较以 bFGF 为趋化剂, 各蛋白及对照组试剂对上室内 ECV304 细胞向下室迁移的影响。对迁移到 Transwell 下表面的细胞以 Olympus 显微镜观察, 每个样片随机选取 4 个视野拍照并计数(计数软件为 Dotcounter), 将数据进行数学统计。

1.6.4 细胞浸润实验

将人工基质膜 Matrigel 铺在 Transwell 的膜上，利用 Matrigel 和 Transwell 模仿体内环境，同样以 bFGF 为趋化剂来检测两种蛋白对 ECV304 细胞浸润的影响。其余操作与细胞迁移实验相同。

1.6.5 酶联免疫分析 (ELISA) 法检测两种蛋白对整合素连接激酶 ILK-1 表达的影响

在 ECV304 细胞中加入终浓度为 30 pg/L 的 bFGF 诱导 24 h 后,加入同等剂量的野生型 rLj-RGD3 及突变体 rLj-112,继续培养 24 h,裂解细胞,10 000×g 离心 3 min,取上清。按照试剂盒说明书采用 ELISA 法检测蛋白对 ILK-1 表达的影响。

1.7 统计方法

应用 SPSS13.0 统计软件采用方差分析对结果进行统计分析。

2 结果

2.1 野生型 Lj-RGD3 的序列比对及突变体 Lj-112 的 cDNA 序列合成

Lj-RGD3 由 118 个氨基酸组成^[10], 其一级结构含有 17 个组氨酸、17 个精氨酸和 20 个苏氨酸, ExPASy 软件预测理论等电点为 10.01, 属碱性蛋白。运用 UniProt blastp 程序对野生型 Lj-RGD3 进行序列比对, 结果表明, Lj-RGD3 与马来丝虫 *Brugia malayi* 的富含组氨酸糖蛋白 HRG 有 40% 序列一致性, 与马来丝虫的 TCR β 具有 45% 的序列一致性 (图 1)。

由于 HRG 蛋白具有抗血管新生作用, 本文对 3 个 RGD 模体全缺失后的 Lj-RGD3 基因进行了序列合成 (由于含有大量重复序列, 无法直接做定点突变), 合成序列克隆至 pET23b 载体 (图 2~3)。突变体命名为 Li-112。

2.2 基因重组蛋白 rLj-RGD3、rLj-112 的 IPTG 诱导表达、纯化及鉴定

Tricine 的 SDS-PAGE 鉴定结果显示,亲和层析后获得了可溶性的 rLj-RGD3 和 rLj-112 纯化蛋白,二者纯度都在 95% 以上,分子量为 15 kDa 左右,这为进一步的生物学活性研究奠定了基础。由于 rLj-RGD3 和 rLj-112 都为碱性蛋白质,故其电泳行为受所带电荷影响而比预期位置滞后(图 4)。

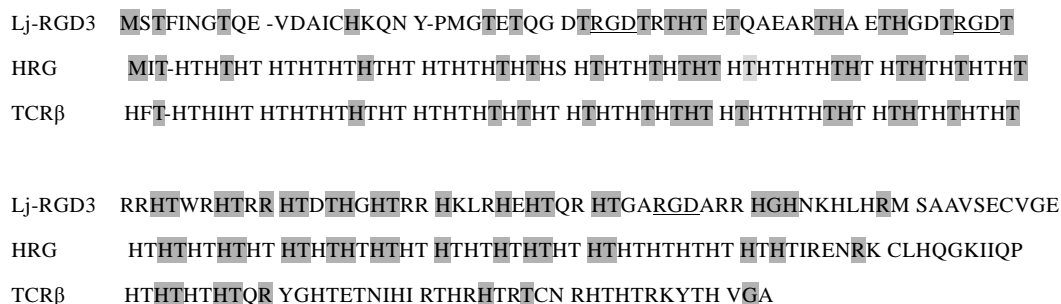


图 1 Lj-RGD3 的 UniProt blastp 序列比对结果

Fig. 1 Results of Lj-RGD3 NCBI blasting. HRGP: Histidine-rich glycoprotein, *Brugia malayi* (nematode worm); TCR β : T-cell receptor beta chain ANA 11, *Brugia malayi* (nematode worm). Identical residues are highlighted in grey.

1 atgtcaacgttcacgaacccagggaagtggatgccatttgt
M S T F I N G T Q E V D A I C
46 cataagcagaattatcccatgggtacggagacacaggagacaca
H K Q N Y P M G T E T Q G D T
91 cgtggagacacacggacacacggagacacaagctgaggcacgg
R G D T R T H T E T Q A E A R
136 acacacgcagagacgcacggagacacacgtggagacacacggaga
T H A E T H G D T R G D T R R
181 cacacgtggagacacacgcggagacacacggacacacacggacac
H T W R H T R R H T D T H G H
226 acacggagacacaagctgaggcacgaacacacgcagagacacacg
T R R H K L R H E H T Q R H T
271 ggggcccgcggagacgcacggagacacggacacaacaacattta
G A R G D A R R H G H N K H L
316 cacagaatgagtgacgcgggtgagtgaatgtgttggggagtga 357
H R M S A A V S E C V G E *

图2 野生型 Lj-RGD3 的 cDNA 及其推导的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequence of Lj-RGD3.

1 tcaacgttcacgaacccagggaagtggatgccatttgt
S T F I N G T Q E V D A I C
46 cataagcagaattatcccatgggtacggagacacaggagacaca
H K Q N Y P M G T E T Q G D T
91 acacggacacacacggagacacaagctgaggcacgg
T R T H T E T Q A E A R
127 acacacgcagagacgcacggagacacacacacggagaga
T H A E T H G D T T R R
163 cacacgtggagacacacgcggagacacacggacacacacggacac
H T W R H T R R H T D T H G H
198 acacggagacacaagctgaggcacgaacacacgcagagacacacg
T R R H K L R H E H T Q R H T
243 ggggcccgcacggagacacggacacaacaacattta
G A A R R H G H N K H L
279 cacagaatgagtgacgcgggtgagtgaatgtgttggggag 318
H R M S A A V S E C V G E

图3 突变体 Lj-112 的 cDNA 及其推导的氨基酸序列
Fig. 3 cDNA and deduced amino acid sequence of Lj-112.

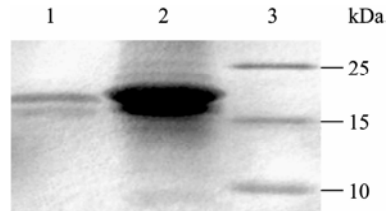


图4 Tricine SDS-PAGE 分析经亲和层析纯化的均质蛋白
Fig. 4 Tricine SDS-PAGE of the homogeneous protein purified by affinity chromatography. 1: mutation protein Lj-112; 2: Lj-RGD3 toxin protein; 3: Spectra™ multicolor low range protein ladder.

2.3 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 抗血管新生活性比较

2.3.1 对 bFGF 诱导的 ECV304 细胞增殖的抑制作用

MTT 结果显示, 野生型 rLj-RGD3 与突变体蛋白 rLj-112 对 bFGF 诱导的 ECV304 的细胞增殖都呈剂量依赖性抑制, rLj-RGD3 的半剂量效应 (Median infective dose, IC₅₀) 为 0.889 μmol/L, 突变体 rLj-112 的 IC₅₀ 为 0.160 μmol/L。结果表明, rLj-112 对血管内皮细胞 ECV304 增殖的抑制强度约为野生型 rLj-RGD3 的 6 倍 (图 5)。

2.3.2 对 bFGF 诱导的鸡绒毛尿囊膜 (CAM) 血管新生的抑制作用

肿瘤的生长和转移与血管生成有密切的关系, 鸡胚对抑制血管生成的药物比较敏感, 是研究血管新生和抗血管形成的最佳体内模型之一。CAM 血管新生实验结果显示, 加入 30 μL 同等体积的 PBS、七鳃鳗 rLj-GRIM19 (6 μg)、蛋白纯化洗脱液的对照组血管新生旺盛, 对血管新生无抑制作用; 而加入 30 μL (6 μg) 同等剂量的 rLj-RGD3 和 rLj-112 组的 CAM 血管新生都遭到破坏, 且突变体蛋白 rLj-112 对 CAM 血管新生的抑制作用强于野生型 rLj-RGD3 (图 6)。

2.3.3 ECV304 细胞的迁移实验

血管新生高度依赖于内皮细胞的的迁移, 以 bFGF 作为趋化剂, 比较野生型 rLj-RGD3 及突变体蛋白 rLj-112 对 ECV304 细胞迁移的影响。结果表

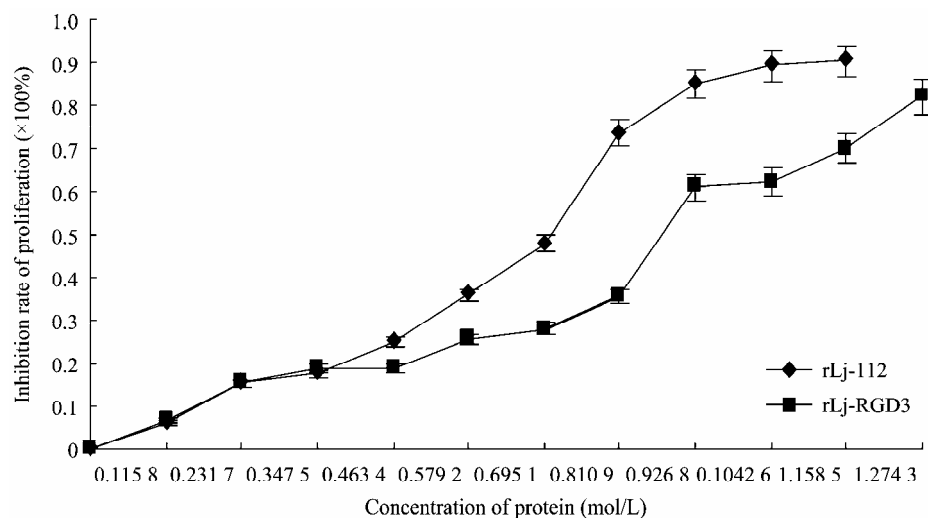


图5 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 对 ECV304 细胞增殖的抑制作用

Fig. 5 Inhibition on ECV304 cells proliferation by rLj-RGD3 and rLj-112.

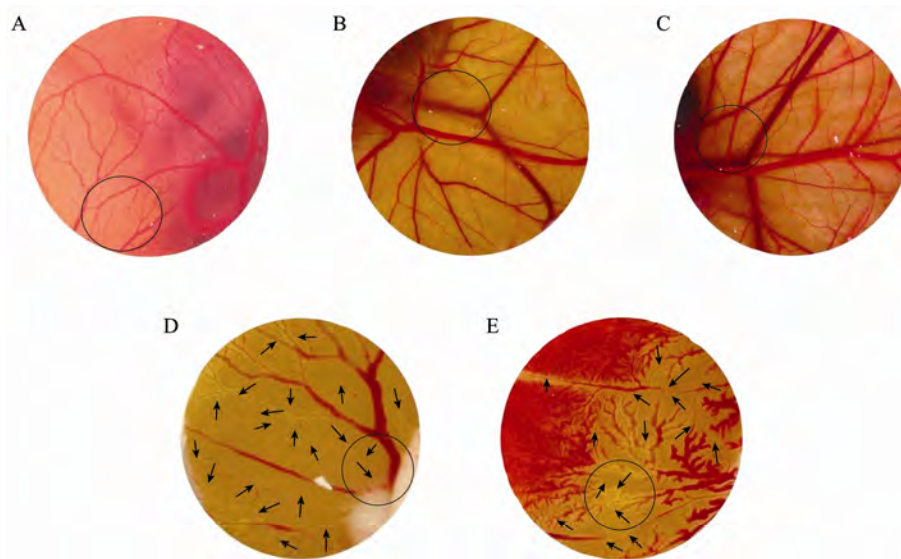


图6 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 对血管新生的抑制作用

Fig. 6 rLj-RGD3 and rLj-112 to inhibit bFGF-induced angiogenesis in chick CAM assays. A window was opened on the egg shell and a methylcellulose disc containing 200 ng bFGF was implanted on CAMs of 6-days-old chick embryos. After 24 h of bFGF induction, 30 μ L of PBS (A), 30 μ L (6 μ g) of rLj-GRIM19 (B), 30 μ L of elution buffer (C), 30 μ L (6 μ g) of rLj-112 (D), 30 μ L (6 μ g) of rLj-RGD3(E) was applied to the embryos. 24 h later, CAM tissues were photographed with digital camera. The circles show the position of methylcellulose disc and the arrows show the discontinuous vessels.

明, 与对照组相比, 同等剂量 (16 μg) 的野生型 rLj-RGD3 和突变体蛋白 rLj-112 均可抑制 ECV304 细胞的迁移, 其迁移抑制率分别为 50% 和 63%, 突变体 rLj-112 对 ECV304 细胞迁移的抑制作用强于野生型 rLj-RGD3。阴性对照组小牛血清白蛋白 BSA 及蛋白纯化洗脱液则对 ECV304 细胞的迁移无影响 (图 7~8)。

2.3.4 ECV304 细胞的浸润实验

浸润同样是血管新生的一个重要步骤, 血管内皮细胞只有在穿透细胞外基质的情况下, 才得以出芽的方式形成新的血管。利用人工基质膜 matrigel 和 Transwell 模仿体内环境, 可以有效地研究细胞的浸润行为。结果显示, PBS、BSA 及洗脱缓冲液对照组对 ECV304 细胞的浸润无抑制作用, 而野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 后均可抑制 ECV304 细胞的浸润, 且 rLj-112 的作用较强 (图 9~10)。

2.3.5 ELISA 法测定两种蛋白对 ILK-1 表达的影响

与只加入 PBS 的对照组相比, rLj-RGD3 野生型与突变体蛋白 rLj-112 均可抑制 bFGF 诱导的 ECV304 ILK-1 的表达, 且效果随抑制剂浓度增高而加强。相比之下, 同剂量的 rLj-112 对 ILK 表达的抑制效果强于 rLj-RGD3。BSA 及蛋白纯化洗脱液则对整合素连接激酶 (ILK-1) 表达无抑制作用 (图 11)。

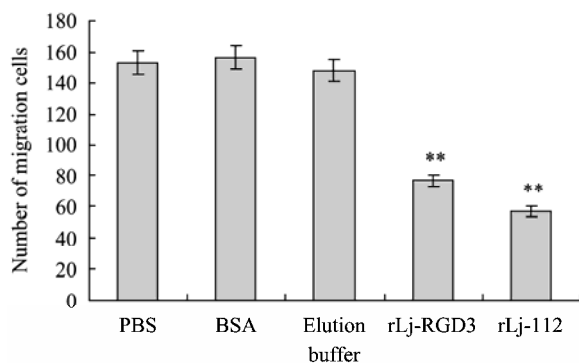


图 7 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 抑制 ECV304 细胞向 bFGF 迁移

Fig. 7 Inhibitory effects of rLj-RGD3 and rLj-112 on ECV304 cells migration towards bFGF. ** $P < 0.01$ versus PBS alone, $n=8$.

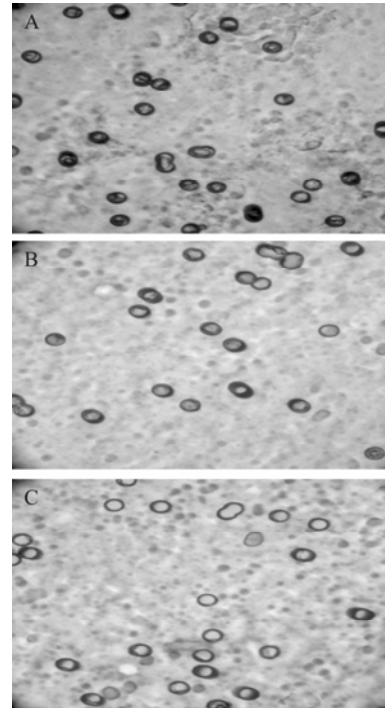


图 8 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 对 ECV304 细胞向 bFGF 迁移的影响 (Olympus 光学显微镜拍照, 400 \times)

Fig. 8 Inhibitory effects of rLj-RGD3 and rLj-112 on ECV304 cells migration towards bFGF (Olympus light microscopy, 400 \times). ECV304 cells were treated with PBS (A), rLj-RGD3 (B) or rLj-112 (C) for 30 min, and then placed in the upper chamber of Transwell. bFGF (30 pg/L) was present as a chemoattractant which was added to the lower chamber. After 16 h incubation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde. After removal of the nonmigrated cells, the cells that migrated to the underside of filter membrane were photographed (400 \times) under Olympus light microscope.

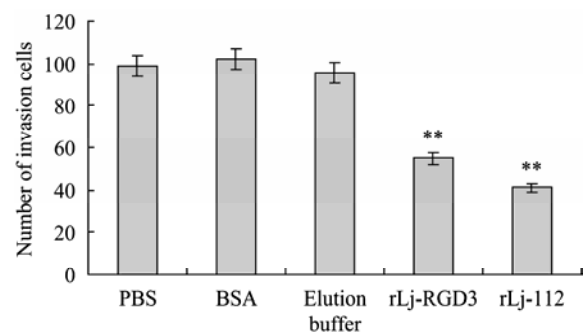


图 9 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 抑制 ECV304 细胞的浸润

Fig. 9 Inhibition of rLj-RGD3 and rLj-112 on ECV304 cells invasion through Matrigel. ** $P < 0.01$ versus PBS alone, $n=8$.

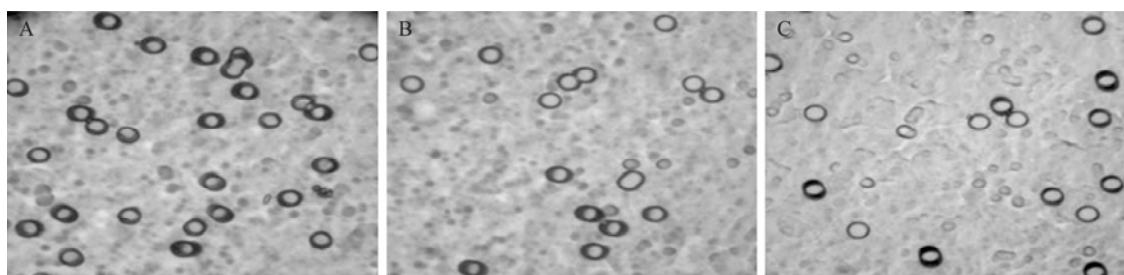


图 10 野生型 rLj-RGD3 与突变体蛋白 rLj-112 对 ECV304 细胞浸润行为的影响 (Olympus 光学显微镜拍照, 400×)

Fig. 10 Inhibitory effects of rLj-RGD3 and rLj-112 on ECV304 cells invasion through Matrigel (Olympus light microscopy, 400×). ECV304 cells were treated with PBS (A), rLj-RGD3 (B) or rLj-112 (C) for 30 min, and then placed in the upper chamber of containing filter membrane which has been coated with Matrigel. bFGF (30 pg/L) was present as a chemoattractant which was added to the lower chamber. After 16 h incubation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde. After removal of the nonmigrated cells, the cells that migrated to the underside of filter membrane were photographed (400×) under Olympus light microscope.

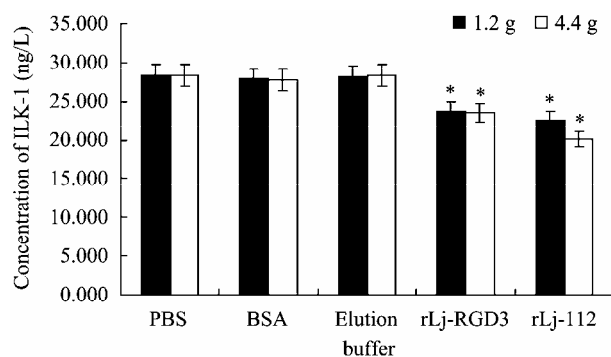


图 11 野生型 rLj-RGD3 与突变体 rLj-112 对 ECV304 中整合素连接激酶 ILK-1 表达的影响

Fig. 11 Effects of ILK-1 expression on ECV304 cells by rLj-RGD3 and rLj-112. The black one is at presence of PBS, 1.2 μg of rLj-RGD3 or rLj-112 with ECV304 cells; the light one is at presence of PBS, 4.4 μg of rLj-RGD3 or rLj-112 with ECV304 cells. * $P < 0.05$ versus PBS alone, $n = 3$.

3 讨论

日本七鳃鳗成体营寄生生活, 为吸血动物。其头部鳃下肌中有一对口腔腺, 能分泌大量蛋白质。本实验室前期工作表明, 七鳃鳗口腔腺天然分泌蛋白混合物及 160 kDa 的 BGSP-1 具有纤维蛋白原水解活性, 具抗凝功能^[13-14]。此外, 口腔腺分泌蛋白提取物还具有抑制神经元细胞兴奋性功能^[14]。对于吸血动物而言, 宿主的凝血和对被吸食痛感的痛感是寄生生活的障碍, 而上述研究结果解释了七鳃鳗营寄

生生活习性的生理基础。随着七鳃鳗口腔腺 cDNA 文库的建立, 本实验室又发现了一条具有抗血小板聚集功能的 Lj-RGD3 蛋白^[2], 这说明七鳃鳗抗凝血功能涉及不只一种蛋白。

日本七鳃鳗野生型 Lj-RGD3 是含有 3 个 RGD 模体的 RGD 毒素蛋白。迄今为止已发现有 4 个不同物种来源的 RGD 毒素蛋白家族, 这 4 大家族分别来源于蛇毒、吸血动物水蛭、蛭类及七鳃鳗唾液腺分泌物^[2]。来源于蛇毒的 RGD 毒素蛋白也叫去整合素, 是被研究得最为透彻也是最大的一族, 依蛇种来源不同种类可达数十种^[9,15-17]; 来源于水蛭唾液腺的 RGD 毒素蛋白到目前为止只发现 2 类: decorsin 及 ornatin^[5-6]; 来源于蛭类的 RGD 毒素蛋白也有 2 种: variabilin 及 savignygrin^[7-8]; 来源于七鳃鳗口腔腺的 Lj-RGD3 蛋白是本课题组发现的第 4 大类 RGD 毒素蛋白^[2]。由 Lj-RGD3 一级结构分析可以看出, 来自于蛇毒这一物种的去整合素之间同源性较高 (60% 以上), 而物种间的 RGD 模体毒素除具有 RGD 模体和多对半胱氨酸的共性外, 在一级结构上没有同源性^[2]。

本实验室前期工作表明, rLj-RGD3 具有抗血管新生、抗肿瘤增殖及抗血小板聚集的功能, 且这些功能皆以细胞表面表达的整合素为靶点, 这说明 Lj-RGD3 是一种典型的 RGD 毒素蛋白^[2,10]。生物信

息学分析表明, Lj-RGD3 在一级结构上除了与其他物种的 RGD 毒素肽一级序列有 RGD 模体的共性外, 同样与之没有同源性。然而, 运用 UniProt blastp 进行序列比对后发现, Lj-RGD3 因富含组氨酸而与马来丝虫 *Brugia malayi* 的富含组氨酸糖蛋白 HRG 有 40% 序列一致性, 与马来丝虫的 TCR β 具有 45% 的序列一致性。由于前期证实 Lj-RGD3 具抗血管新生功能, 故本文侧重于 Lj-RGD3 突变后的类 HRG 功能研究。有关其 TCR β 的功能将另文报道。

富含组氨酸糖蛋白为发现于脊椎动物血液中的血浆糖蛋白, 由肝脏合成并释放入血。其具有 4 个结构域: N 端的 2 个半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cystatin) 结构域、C 末端结构域及中心富含组氨酸结构域。这其中的富含组氨酸结构域可与众多配体结合而行使多种功能, 比如: 抗血管新生、可溶性免疫复合物抑制、加强巨噬细胞对凋亡细胞的清除、抗菌等生物学活性。HRG 配体包括 Zn²⁺、原肌球蛋白、肝素和硫酸肝素、血纤维蛋白溶酶原、血纤维蛋白溶酶、纤维蛋白原、凝血酶感蛋白、IgG、Fc γ R 及补体等。正是由于 HRG 有如此众多配体, 致使 HRG 可以与相当宽范围的细胞结合, 这包括: 内皮细胞、成纤维细胞、T 细胞、巨噬细胞、红血球、血小板、类单核细胞株及坏死细胞^[11]。

富含组氨酸的糖蛋白 (HRG) 可以有效地抑制血管新生, Vanwilddemeersch 等^[18]研究表明, HRG 是通过其蛋白水解后释出来的 His-rich 结构域行使其血管新生抑制剂功能的。而来源于 His-rich 结构域的一个 35 个氨基酸残基的合成肽 HRGP330 和一个 26 个氨基酸残基的合成肽 HRGP335 在体内与体外均具有血管新生抑制活性。HRGP330 和 HRGP335 是通过与血管内皮细胞表面的肝素/硫酸肝素结合而行使抗血管新生功能。Juarez 等报道 HRGP 以 His-rich 结构域依赖方式抑制血管内皮细胞的管形成和增殖, HRGP335 有抗内皮细胞趋化的作用^[19]。

Lj-RGD3 一级结构富含组氨酸残基, 与 HRG 有

同源性。将野生型的 RGD3 的 3 个 RGD 全部突变成形的突变体 Lj-112 可以说是一种类富含组氨酸糖蛋白。本文对 RGD 模体全缺失突变体 Lj-112 的抗血管新生活性进行了研究。正常的 RGD 毒素蛋白进行 RGD 模体缺失后, 应该失去抗血管新生活性, 而本文得到的研究表明, 含组氨酸的 RGD 全缺失突变体 Lj-112 的抗血管新生功能却更加强大, 其抑制 ECV304 细胞增殖、迁移、浸润和 CAM 血管新生的功能均强于野生型 Lj-RGD3, 这表明 Lj-112 是以类 HRG 的形式行使的抗血管新生功能。尽管两种蛋白对整合素连接激酶 ILK-1 的表达均有下调作用, 但可以推测 Lj-RGD3 与 Lj-112 是以不同机制行使功能的。本实验室前期工作表明 Lj-RGD3 是以整合素为作用靶点的; 而由于已有研究证实 HRG 可通过结合肝素/硫酸肝素位点阻止 bFGF 的信号转导从而下调 ILK 的表达^[20-21], 所以可以推测 Lj-112 有可能是以 ECV304 细胞表面的肝素/硫酸肝素为靶点, 这有待于进一步证实。本研究还表明, Lj-RGD3 在 RGD 模体存在的情况下, 是优先与 Integrin 结合的, 其与 HRG 同源的特性在 RGD 模体存在的条件下, 并未使野生型 Lj-RGD3 抗血管新生功能得到协同增强。而七鳃鳗的 Lj-RGD3 则可能会通过 mRNA 剪切或蛋白翻译后剪切去掉 RGD 模体后, 以截然不同的方式行使功能, 七鳃鳗 cDNA 数据库中存在的大量 HRG 序列有可能是这种推测的证据, 这还有待于进一步研究。

血管生成在胚胎血管形成、伤口愈合和器官的再生中都起到关键的作用, 而肿瘤的增长和迁移依赖于血管新生, 内皮细胞的浸润和迁移可以调节肿瘤的增殖^[22]。抑制肿瘤的血管新生是治疗癌症的重要手段。野生型 Lj-RGD3 与突变体蛋白 Lj-112 对血管新生均具有抑制作用, 突变体蛋白 Lj-112 显示了比野生型 Lj-RGD3 更有效的抑制作用, 而且二者的作用靶点并不一致, 这为以 Lj-RGD3 为原型的抗肿瘤药物研发提供了多种可能, 具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Gao Q, Pang Y, Wu Y, et al. Expressed sequence tags (ESTs) analysis of the oral gland of *Lampetra japonica*. J Genet Genomic, 2005, 32(10): 1045–1052.
- [2] Wang JH, Han XX, Yang HS, et al. A novel RGD-toxin protein, Lj-RGD3, from the buccal gland secretion of *Lampetra japonica* impacts diverse biological activities. Biochimie, 2010, 92(10): 1387–1396.
- [3] Kini RM, Chow G. Exogenous inhibitors of platelet aggregation from animal sources, Thromb Haemost, 2001, 85(1): 179–181.
- [4] Kini RM, Evans HJ. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. Toxicon, 1992, 30(3): 265–293.
- [5] Krezel AM, Ulmer JS, Wagner G, et al. Recombinant decorsin: dynamics of the RGD recognition site. Protein Sci, 2000, 9(8): 1428–1438.
- [6] Mazur P, Henzel WJ, Seymour JL, et al. Ornatins: potent glycoprotein IIb-IIIa antagonists and platelet aggregation inhibitors from the leech *Placobdella ornata*. Eur J Biochem, 1991, 202(3): 1073–1082.
- [7] Wang X, Coons LB, Taylor DB, et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. J Biol Chem, 1996, 271(30): 17785–17790.
- [8] Mans BJ, Louw AI, Neitz AW, et al. A platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21371–21378.
- [9] Wang JH, Wu Y, Ren F, 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.
- 王继红, 吴毓, 任凤, 等. 白眉蝮蛇去整合素 Adinbitor 的分子克隆及其部分生物学活性. 生物化学与生物物理学报, 2004, 36(6): 425–429.
- [10] Zhang PQ, Wang JH, Liu X, et al. Expression and bioactivity effects to HeLa of recombinant toxin protein rLj-RGD3 from *Lampetra japonica*. Chin J Biotech, 2009, 25(5): 686–694.
- 张丕桥, 王继红, 刘欣, 等. 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. 生物工程学报, 2009, 25(5): 686–694.
- [11] Blank M, Shoenfeld Y. Histidine-rich glycoprotein modulation of immune/autoimmune, vascular, and coagulation systems. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 34(3): 307–312.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Xiao R, Li QW, Perrett S, et al. Characterisation of the fibrinogenolytic properties of the buccal gland secretion from *Lampetra japonica*. Biochimie, 2007, 89(3): 383–392.
- [14] Chi S, Xiao R, Li QW, et al. Suppression of neuronal excitability by the secretion of the lamprey (*Lampetra japonica*) provides a mechanism for its evolutionary stability. Pflugers Arch, 2009, 458(3): 537–545.
- [15] Yeh CH, Peng HC, Yang RS, et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha(v)\beta(3)$ blockade of endothelial cells. Mol Pharmacol, 2001, 59(5): 1333–1342.
- [16] Kang IC, Lee YD, Kim DS. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res, 1999, 59(15): 3754–3760.
- [17] Fernandez JH, Silva CA, Assakura MT, et al. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from Bothrops jararaca venom. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(2): 457–464.
- [18] Vanwildemeersch M, Olsson AK, Gottfridsson E, et al. The anti-angiogenic His/Pro-rich fragment of histidine-rich glycoprotein binds to endothelial cell heparan sulfate in a Zn^{2+} -dependent manner. J Biol Chem, 2006, 281(15): 10298–10304.
- [19] Juarez JC, Guan X, Shipulina NV, et al. Histidine-proline-rich glycoprotein has potent antiangiogenic activity mediated through the histidine-proline-rich domain. Cancer Res, 2002, 62(18): 5344–5350.
- [20] Lee C, Dixelius J, Thulin A, et al. Signal transduction in endothelial cells by the angiogenesis inhibitor histidine-rich glycoprotein targets focal adhesions. Exp Cell Res, 2006, 312(13): 2547–2556.
- [21] Lee C, Bongcam-Rudloff E, Sollner C, et al. Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. Front Biosci, 2009, 14: 2911–2922.
- [22] Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, et al. Molecular mechanisms of tumor vascularization. Crit Rev Oncol Hematol, 2005, 54(1): 53–61.