

# 重组肽rLj-RGD4对小鼠黑色素瘤B16细胞活性的影响

王一迪 时春风 勾萌 宁淑香 王继红\*

(辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029)

**摘要** 该研究在前期重组日本七鳃鳗RGD3毒素蛋白(recombinant *Lampetra japonica* RGD3, rLj-RGD3)工作基础上, 设计并人工合成分子克隆, 获得去纯化标签的rLj-RGD4。该论文采用小鼠黑色素瘤(B16)为肿瘤细胞模型, 对rLj-RGD4是否抑制B16细胞增殖、迁移、浸润与凋亡进行了研究。研究表明, 采用不同浓度的rLj-RGD4经MTT方法检测发现, rLj-RGD4对B16细胞的增殖有抑制作用,  $IC_{50}$ 为9.6  $\mu\text{mol/L}$ ; 使用Transwell法和细胞划痕实验结果证实, rLj-RGD4对B16细胞的迁移和浸润都具有抑制作用, 且呈剂量依赖方式; B16细胞经鬼笔环肽-FITC染色结果显示, rLj-RGD4肽对B16细胞骨架发生破坏; Hoechst 33258法和TUNEL-FITC法结果显示, rLj-RGD4可诱导B16细胞发生凋亡; 运用Western blot对其诱导B16细胞发生凋亡的作用机制研究结果显示, 随着rLj-RGD4浓度的增加cleaved-caspase-8和cleaved-caspase-3的水平显著增加, B淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma/leukaemia-2, *Bcl-2*)基因水平量显著减少。由此可见, rLj-RGD4具有显著促B16细胞凋亡的作用, 具有抑制增殖与侵袭的功能, 有可能成为一个具有抗肿瘤作用的候选药物。

**关键词** rLj-RGD4; 抗肿瘤; B16

## Effect of Recombinant Peptide rLj-RGD4 on the Activity of Murine Melanoma B16 Cells

Wang Yidi, Shi Chunfeng, Gou Meng, Ning Shuxiang, Wang Jihong\*

(School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

**Abstract** In the present study, we cloned to obtain the rLj-RGD4 peptide, based on the previous work on rLj-RGD3 peptide. We used mouse melanoma as tumor cell model to study whether rLj-RGD4 inhibits B16 cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. The results showed that rLj-RGD4 could inhibit the proliferation of B16 cells by MTT assay with an  $IC_{50}$  of 9.6  $\mu\text{mol/L}$ . The results from Transwell method and cell scratch test confirmed that rLj-RGD4 on B16 cell migration and invasion were inhibited in a dose-dependent manner. B16 cells by phalloidin-FITC staining showed that rLj-RGD4 peptide on B16 cytoskeleton damage. The results of Hoechst 33258 and TUNEL-FITC showed that rLj-RGD4 peptide could induce apoptosis of B16 cells; The results showed that the level of cleaved-caspase-8 and cleaved-caspase-3 were significantly increased and the level of *Bcl-2* was significantly decreased with the increase of rLj-RGD4 peptide concentration. Thus, rLj-RGD4 peptide has a significant role in promoting apoptosis of B16 cells, with its anti-proliferation and invasion function, may become a candidate of drugs anti-tumor.

**Keywords** rLj-RGD4; anti-tumor; B16

收稿日期: 2017-01-03 接受日期: 2017-03-13

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2014AA093502)和国家自然科学基金项目(批准号: 30770297)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-85827097, E-mail: y.y.200@163.com

Received: January 3, 2017 Accepted: March 13, 2017

This work was supported by National High Technology Research and Development "863" Program (Grant No.2014AA093502) and National Nature Science Foundation of China (Grant No.30770297)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-85827097, E-mail: y.y.200@163.com

网络出版时间: 2017-04-18 14:16:14 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170418.1416.008.html>

黑色素瘤是常见的恶性肿瘤,其因侵袭性转移而恶性程度高<sup>[1-2]</sup>。在过去的30年,全球黑色素瘤发病率呈上升趋势,2015年在美国有73 870个新病例被诊断,其中9 940人死于黑色素瘤<sup>[3]</sup>。黑色素瘤患者出现高转移率和高复发率,而大多数早期患者通过手术切除可治疗,一旦转移,5年生存率仅16%。因此,预防转移是治疗黑色素瘤的关键<sup>[4-5]</sup>。近几年研究发现,患黑色素瘤的女性生存率比男性生存率高出38%,主要表现为转移率低和复发期延迟<sup>[6-8]</sup>。引起肿瘤细胞侵袭和转移的关键环节是肿瘤细胞与其细胞外基质的黏附,而作为细胞黏附分子家族重要成员之一的整合蛋白,与细胞外基质蛋白质配体间相互作用的识别位点是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)模体(motif),因此,在肿瘤细胞与细胞外基质以及肿瘤细胞之间的黏附中RGD起了至关重要的作用<sup>[9]</sup>。

RGD广泛存在于生物体内,其中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和血液中的黏附蛋白是人体中最常见的含RGD序列的蛋白质。RGD是一种动物毒素蛋白,通过毒腺或唾液腺分泌的活性物质,具有抗血栓和抗肿瘤两大典型生物活性<sup>[10]</sup>。早期阶段,白娟等<sup>[11]</sup>和张丕桥等<sup>[12]</sup>研究发现, rLj-RGD3肽能抑制体外培养的Hela细胞和人肝癌HepG2细胞增殖,并导致细胞发生凋亡。但由于其分子量稍大,在生物制药应用中可能存在免疫原性的潜在风险。因此,本课题组以rLj-RGD3野生型缺失突变体小肽为对象设计含有4个RGD序列、分子量仅为6.27 kDa的基因重组肽,简称rLj-RGD4。本文研究了rLj-RGD4对B16细胞增殖、迁移、浸润与凋亡的作用,分析这种新的人工合成基因所表达的RGD肽的抗肿瘤能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、设备

B16细胞保存于七鳃鳗研究中心;细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒、TUNEL细胞凋亡试剂盒和四甲基偶氮唑(MTT)均购于碧云天生物技术有限公司;鬼笔环肽购于美国Sigma公司;Transwell细胞培养板、96孔板、24孔板、细胞培养瓶等均购于美国康宁公司;共聚焦荧光显微镜、Carl Zeiss、超净台、细胞培养箱均购于Thermo Scientific公司;Fluor ChemQ成像仪、Protein Sample、倒置显微镜均购于日本Nikon公司。

### 1.2 去纯化标签的Lj-RGD4肽的获取

Lj-RGD4基因设计以Lj-RGD3为原型,在保留

原有3个RGD模体的基础上,通过基因缺失突变和突变后序列连接,形成了第4个RGD的碱基序列。对设计后的基因序列进行全序列基因合成[由宝生物工程(大连)有限公司完成]。在人工合成的Lj-RGD4基因基础上设计引物进行PCR,在序列5'端引入Nde I酶切位点,在序列3'端引入终止密码子和Hind III酶切位点,经过双酶切法将上述PCR产物连接到pET23b载体上。经鉴定筛选出阳性重组子pET23b-RGD4(Tag-)并转化入*E. coli* DH5 $\alpha$ 克隆菌。对重组菌进行37 °C培养,终浓度为1 mmol/L IPTG诱导蛋白质的合成,以可溶性蛋白质的方法提取rLj-RGD4,经组氨酸亲和层析柱纯化。通过Tricine-SDS PAGE鉴定rLj-RGD4的表达情况。

### 1.3 MTT法检测rLj-RGD4对B16细胞增殖的影响

将B16细胞接种于96孔板中,培养24 h,按梯度浓度加入rLj-RGD4作用24 h,加入细胞培养液体积10%的MTT溶液,继续培养4 h,吸出培养液,加入等量的DMSO,至摇床低速震荡10 min,在492 nm测吸光值。抑制率=(空白组均值-处理组均值)/空白组均值 $\times$ 100%。

### 1.4 B16细胞划痕实验

采用划痕实验检测rLj-RGD4对B16细胞迁移的影响。取6孔板,每孔加入约 $5\times 10^5$ 细胞,其数量以过夜铺满为佳,隔日用移液器头垂直于孔中心划出约500  $\mu$ m宽的“伤痕”,用PBS清洗细胞3次,加入无血清培养液稀释不同浓度的rLj-RGD4,每隔一段时间观察两侧细胞向中间迁移的情况并拍照。

### 1.5 B16细胞的迁移和浸润实验

采用Corning Costar公司的Transwell细胞培养板观察上室细胞向下室迁移的趋化性运动,上室中分别加入浓度不等的rLj-RGD4与B16细胞悬液,以PBS为对照, bFGF为趋化剂,在Olympus相差显微镜下观察并拍照,记录迁移细胞个数。

采用美国BD公司生产的人工基底膜基质(Matrigel)及Transwell模仿体内环境观察细胞浸润能力,同样在Olympus相差显微镜下观察并拍照,记录浸润细胞个数。

### 1.6 B16细胞的Hoechst 33258和TUNEL染色检测细胞凋亡, FITC-phalloidin染色检测细胞骨架

B16细胞接种于铺有爬片的细胞培养板中培养,加入不同浓度的rLj-RGD4作用24 h,将细胞固定,染色,封片,在共聚焦荧光显微镜下观察并拍照。

## 1.7 Western blot检测细胞中相关蛋白质水平

将细胞接种6孔板中, 生长24 h后, 加入不同浓度的rLj-RGD4(0、4.8、9.6、14.4  $\mu\text{mol/L}$ )作用24 h, 然后收集细胞, 用含PMSF的RIPA裂解液裂解, 取上清进行蛋白质定量, 然后用12%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDA-PAGE)将样品分离, 电转至PVDF膜, 用TBST配置5%的脱脂奶粉封闭2 h, 加入1:1 000稀释的Bcl-2、胱冬肽酶-3(caspase-3)和胱冬肽酶-8抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 取出PVDF膜, 用PBST室温洗3次, 每次10 min, 加入二抗室温孵育2 h, 洗膜3次, 每次10 min; 在暗室里按1:1的比例混合发光底物A、B液, 取出膜放入多色荧光成像仪; 保存图片并用Quantity One分析软件对图像灰度进行分析。

## 1.8 统计学分析

运用软件SPSS 16.0进行数据统计, 统计结果表

示方法为均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ), 采用*t*检验对组间均数进行比较。  $P<0.05$ 表示组间差异显著;  $P<0.01$ 表示组间差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 rLj-RGD4基因的人工合成

本部分实验由宝生物工程(大连)有限公司完成, 合成序列与提供序列一致, 测序结果如图1所示。

### 2.2 rLj-RGD4的纯化鉴定

如图2所示, 经组氨酸亲和层析纯化, 获得可溶性rLj-RGD4。经SDS-PAGE鉴定, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 、IPTG诱导2 h能获得纯度为95%的rLj-RGD4, rLj-RGD4分子量为6.27 kDa。获得纯化的rLj-RGD4, 为下一步生物活性研究奠定了基础。

```

CCG188-5_T7terminator #1 AGGGTAGCCA GCAGCATCCT GCGATGCAGA TCCGGAACAT AATGGTGACG
#1 AGGGTAGCCA GCAGCATCCT GCGATGCAGA TCCGGAACAT AATGGTGACG
CCG188-5_T7terminator #51 GGCGCTGACT TCCGCGTTTC CAGACTTTAC GAAACACGGA AACCGAAGAC
#51 GGCGCTGACT TCCGCGTTTC CAGACTTTAC GAAACACGGA AACCGAAGAC
CCG188-5_T7terminator #101 CATTCATGTT GTTGCTCAGG TCGCAGACGT TTTGCAGCAG CAGTCGCTTC
#101 CATTCATGTT GTTGCTCAGG TCGCAGACGT TTTGCAGCAG CAGTCGCTTC
CCG188-5_T7terminator #151 ACGTTCGCTC GCGTATCGGT GATTCATTCT GCTAACCACT AAGGCAACCC
#151 ACGTTCGCTC GCGTATCGGT GATTCATTCT GCTAACCACT AAGGCAACCC
CCG188-5_T7terminator #201 CGCCAGCCTA GCCGGTCTCT CAACGACAGG AGCAGCATCA TGCGCACCCG
#201 CGCCAGCCTA GCCGGTCTCT CAACGACAGG AGCAGCATCA TGCGCACCCG
CCG188-5_T7terminator #251 TGGCCAGGAC CCAACGCTGC CCGAGATCTC GATCCCGCGA AATTAATACG
#251 TGGCCAGGAC CCAACGCTGC CCGAGATCTC GATCCCGCGA AATTAATACG
CCG188-5_T7terminator #301 ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT AATTTTGTTC
#301 ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT AATTTTGTTC
CCG188 >#1> GCCA TTTGTCATAA GCAGAATTAT
CCG188-5_T7terminator #351 AACTTTAAGA AGGAGATATA CATATGGCCA TTTGTCATAA GCAGAATTAT
#351 AACTTTAAGA AGGAGATATA CATATGGCCA TTTGTCATAA GCAGAATTAT
CCG188 #25 CCCATGGGTA CGGAGACACA GGGAGACACA CGTGGAGACA CACGGGGAGA
CCG188-5_T7terminator #401 CCCATGGGTA CGGAGACACA GGGAGACACA CGTGGAGACA CACGGGGAGA
#401 CCCATGGGTA CGGAGACACA GGGAGACACA CGTGGAGACA CACGGGGAGA
CCG188 #75 CACACGTGGA GACACACGGG GGGCCCGCGG AGACGCACGG AGACACGGAC
CCG188-5_T7terminator #451 CACACGTGGA GACACACGGG GGGCCCGCGG AGACGCACGG AGACACGGAC
#451 CACACGTGGA GACACACGGG GGGCCCGCGG AGACGCACGG AGACACGGAC
CCG188 #125 ACAACAAACA TTTACACAGA ATGAGTGCAG CGGTGAGTGA ATGTGTT
CCG188-5_T7terminator #501 ACAACAAACA TTTACACAGA ATGAGTGCAG CGGTGAGTGA ATGTGTTAAG
#501 ACAACAAACA TTTACACAGA ATGAGTGCAG CGGTGAGTGA ATGTGTTAAG
CCG188-5_T7terminator #551 CTTGCGGCCG CACTCGAGCA CCA
#551 CTTGCGGCCG CACTCGAGCA CCA

```

图1 Lj-RGD4合成基因测序结果

Fig.1 The DNA sequence of Lj-RGD4 synthetic gene

### 2.3 重组肽rLj-RGD4对B16细胞增殖的抑制作用

MTT法检测显示, 重组肽rLj-RGD4抑制B16细胞增殖。待B16细胞生长并汇合至80%~90%时, 加入不同浓度重组肽rLj-RGD4培养24 h, 抑制细胞增殖的作用随着rLj-RGD4浓度的增加而增强, 呈现浓度依赖性, B16细胞IC<sub>50</sub>为9.6 μmol/L, 抑制率检测结

果如图3所示。

### 2.4 划痕实验检测rLj-RGD4肽对B16细胞迁移的抑制作用

划痕实验结果表明, 共培养0、12、24 h后, 与对照组比较, 不同浓度的rLj-RGD4 3组细胞迁移受到抑制, 抑制作用与时间成正比(图4)。此结果提示,

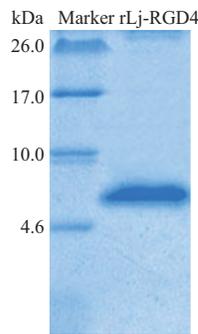


图2 通过SDS-PAGE电泳鉴定rLj-RGD4  
Fig.2 Identify of rLj-RGD4 by SDS-PAGE

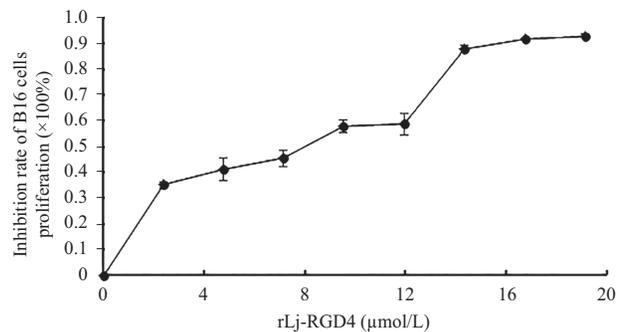
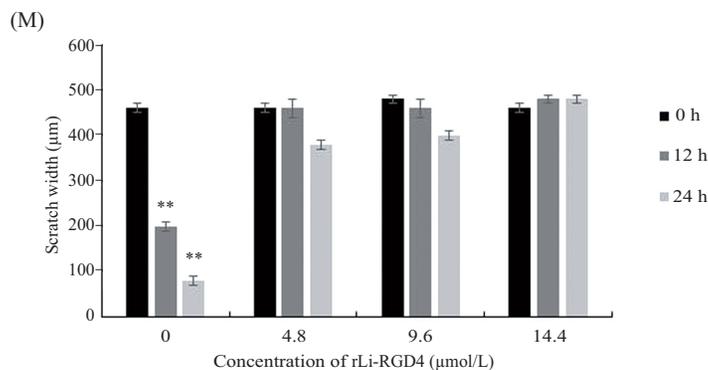
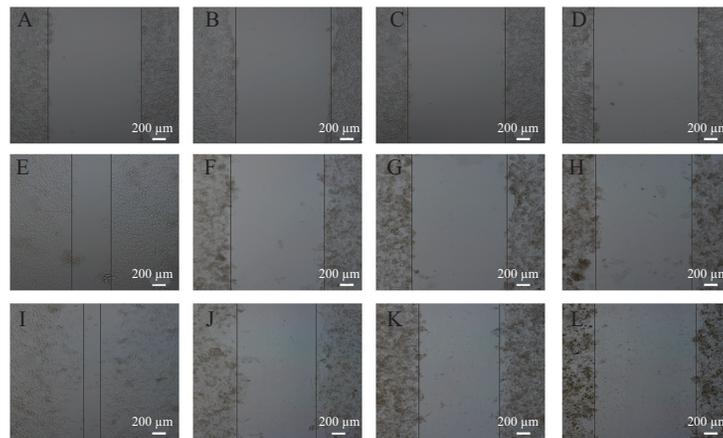


图3 MTT法检测重组肽rLj-RGD4对B16细胞增殖的抑制作用

Fig.3 The inhibitory effect of rLj-RGD4 on the proliferation of B16 cells by MTT



A~D: 0、4.8、9.6、14.4 μmol/L rLj-RGD4作用B16细胞0 h; E~H: 0、4.8、9.6、14.4 μmol/L rLj-RGD4作用B16细胞12 h; I~L: 0、4.8、9.6、14.4 μmol/L rLj-RGD4作用B16细胞24 h; M: 数据统计; \*\*P<0.01, 与0 h、0 μmol/L rLj-RGD4组比较。

A~D: B16 cells were exposed to rLj-RGD4 (0, 4.8, 9.6, 14.4 μmol/L) for 0 h; E~H: B16 cells were exposed to rLj-RGD4 (0, 4.8, 9.6, 14.4 μmol/L) for 12 h; I~L: B16 cells were exposed to rLj-RGD4 (0, 4.8, 9.6, 14.4 μmol/L) for 24 h; M: data statistics; \*\*P<0.01 compared with 0 h, 0 μmol/L rLj-RGD4 group.

图4 细胞划痕实验检测rLj-RGD4对B16细胞迁移的影响

Fig.4 Cell wound scratch assays of rLj-RGD4 effects on B16 cell migration

rLj-RGD4对B16细胞迁移有明显的抑制作用。

## 2.5 重组肽rLj-RGD4抑制B16细胞的迁移和侵袭

Transwell侵袭小室实验,以碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)为趋化剂,观察rLj-RGD4经过24 h对B16细胞的作用,各处理组细胞取6个视野观察细胞迁移情况及数目,随着rLj-RGD4肽浓度的增加,进入微孔膜中的细胞数量明显下降(图5)。结果表明, rLj-RGD4可明显抑制B16细胞的迁移,利用人工基底膜Matrigel和Transwell模仿体内环境研究细胞的浸润行为, rLj-RGD4经过36 h对B16细胞的作用,能明显抑制以bFGF为趋化剂的B16细胞穿透Matrigel的浸润行为(图6),实验结果表明, rLj-RGD4可明显抑制B16细胞浸润。

## 2.6 rLj-RGD4对B16细胞凋亡的诱导

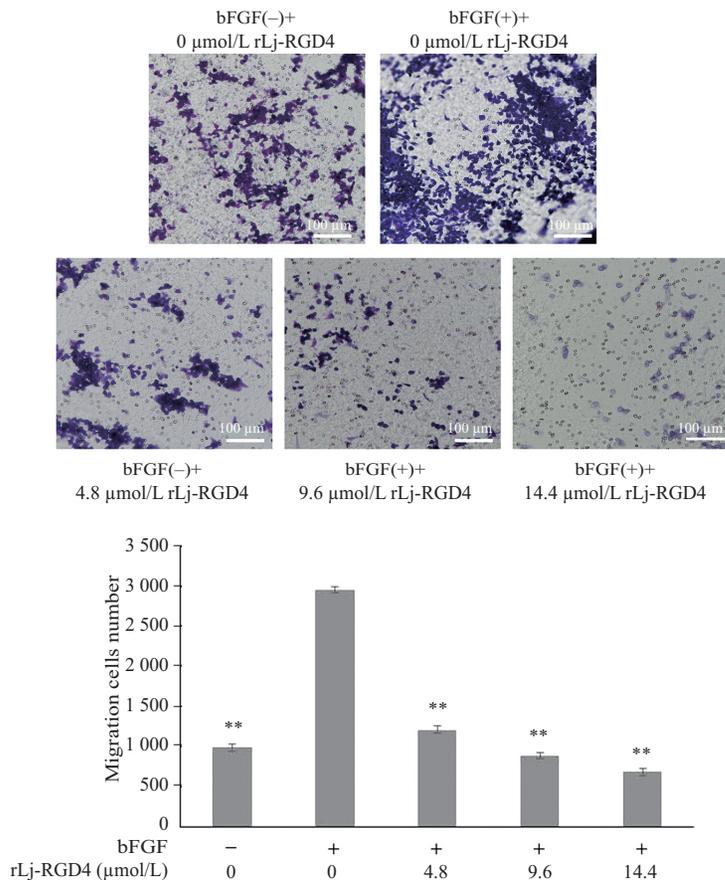
该研究分别采用Hoechst 33258法和TUNEL法检测B16细胞的凋亡。Hoechst 33258为低细胞毒性

蓝色荧光染料,与DNA的A-T键结合。由于凋亡的细胞核或细胞质致密浓缩,所以荧光显微镜下可见浓染的发出亮蓝色的致密颗粒块状荧光。TUNEL法是一种分子生物学与形态学相结合的方法,对完整的某个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征。

Hoechst 33258法实验显示,随rLj-RGD4浓度增加,在荧光共聚焦显微镜下,实验组与对照组相比较,细胞核荧光强度增强,凋亡的细胞数量也随剂量增加而增加,并可见凋亡小体(图7)。采用TUNEL法观察到,对照组仅有少量暗淡的绿色荧光,而加入rLj-RGD4的爬片细胞出现了呈剂量依赖方式的强烈绿色荧光,且荧光强度随剂量增强而增强(图8)。

## 2.7 rLj-RGD4对B16细胞骨架的破坏作用

鬼笔环肽(phalloidin)也称做鬼笔鹅膏素,是一

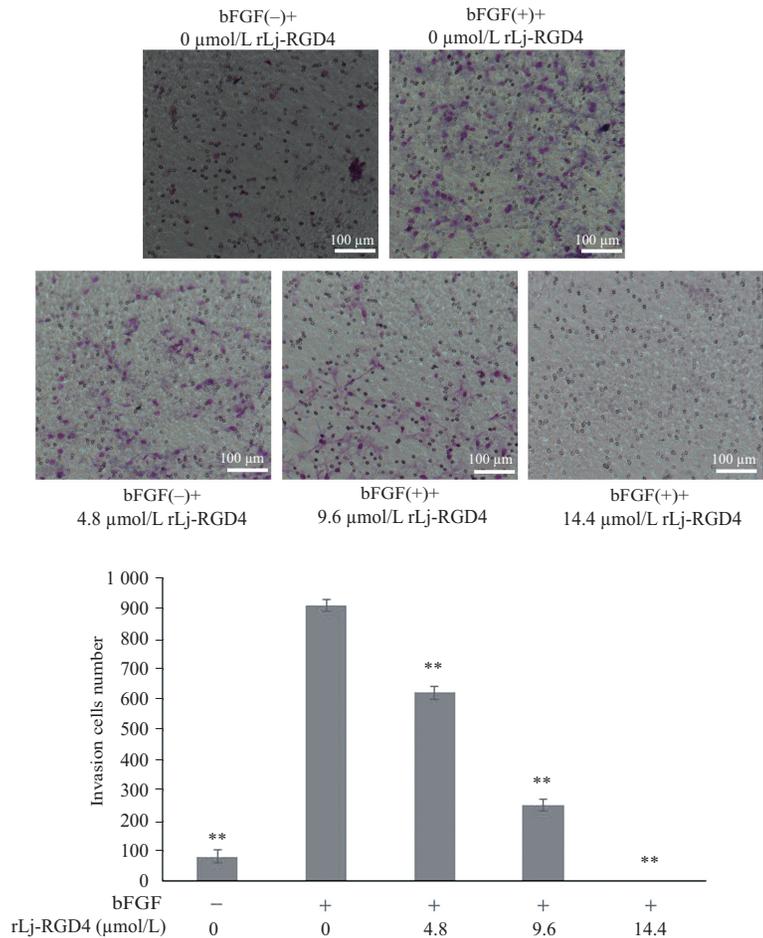


A: 各处理组细胞迁移情况代表性结果; B: 各处理组细胞迁移数统计, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组[bFGF(+)+0 μmol/L rLj-RGD4]比较。

A: the representative results of migrated cells from each experimental group; B: the migration numbers of each experimental group, \*\* $P < 0.01$  vs control [bFGF(+)+0 μmol/L rLj-RGD4] group.

图5 重组肽rLj-RGD4对B16细胞迁移的影响

Fig.5 Effect of the recombinant peptide rLj-RGD4 on the migration of B16 cells

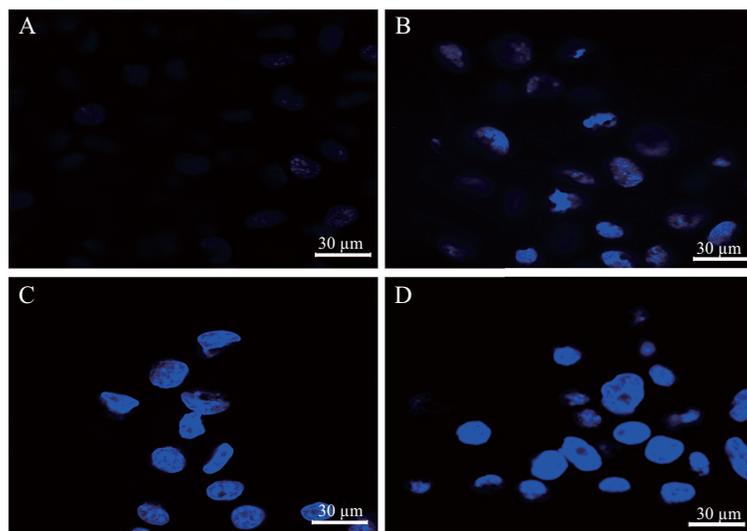


A: 各处理组细胞浸润情况代表性结果; B: 各处理组细胞迁移数统计, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组[bFGF(+)+0 μmol/L rLj-RGD4]比较。

A: the representative results of infiltrating cells from each experimental group; B: the migration numbers of each experimental group, \*\* $P < 0.01$  vs control [bFGF(+)+0 μmol/L rLj-RGD4] group.

图6 重组肽rLj-RGD4对B16细胞浸润的影响

Fig.6 Effect of the recombinant peptide rLj-RGD4 on the invasion of B16 cells



A: 0 μmol/L rLj-RGD4对照组; B: 4.8 μmol/L rLj-RGD4实验组; C: 9.6 μmol/L rLj-RGD4实验组; D: 14.4 μmol/L rLj-RGD4实验组。

A: 0 μmol/L rLj-RGD4 group; B: 4.8 μmol/L rLj-RGD4 group; C: 9.6 μmol/L rLj-RGD4 group; D: 14.4 μmol/L rLj-RGD4 group.

图7 Hoechst 33258法结果检测重组肽rLj-RGD4对B16细胞凋亡的影响

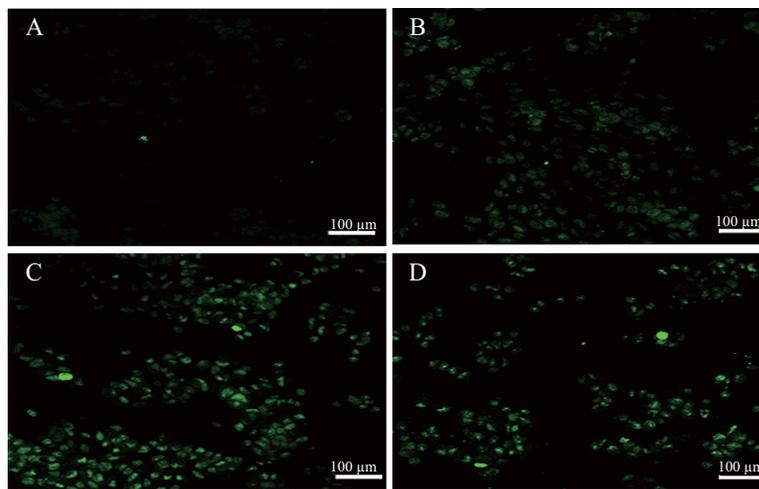
Fig.7 Hoechst 33258 staining shows the effect of the recombinant peptide rLj-RGD4 on the apoptosis of B16 cells

种有剧毒的生物碱,其来源于一种毒性菇类,是环状七肽。Phalloidin只与聚合的微丝(microfilament, MF)-纤维状肌动蛋白(fibros actin, F-actin)结合,而不与肌动蛋白单体分子-球状肌动蛋白(globular actin, G-actin)结合。

本研究利用FITC荧光标记的鬼笔环肽对B16细胞进行染色,在荧光共聚焦显微镜下观察经梯度浓度rLj-RGD4处理的细胞骨架微丝相对于PBS对照组的变化。结果表明,随着rLj-RGD4浓度增加,B16细胞的微丝遭到破坏、细胞变圆、细胞伪足消失(图9)。

## 2.8 rLj-RGD4对B16细胞凋亡通路中胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-8和Bcl-2的影响

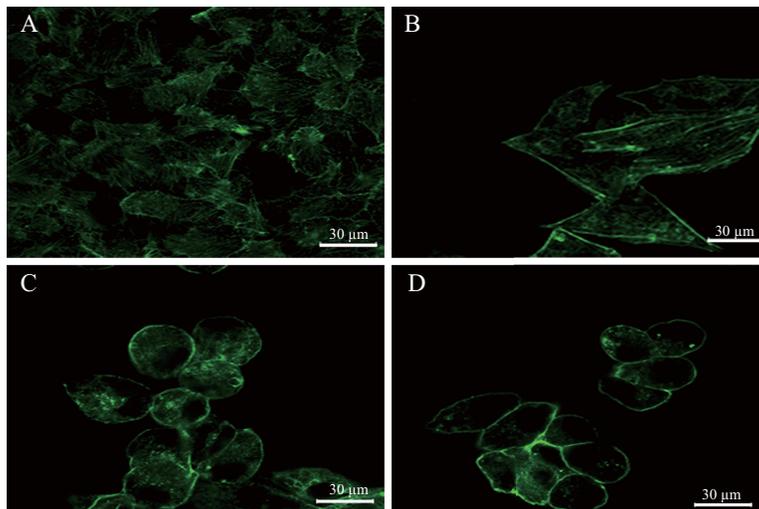
胱冬肽酶是一组存在于细胞质中的结构相似的蛋白酶,其酶活性中心含有Cys残基,具有特异性水解靶蛋白Asp残基形成的肽键的功能,继而可以致使细胞发生凋亡。其中,诱发细胞凋亡的起始者是胱冬肽酶-2、胱冬肽酶-8、胱冬肽酶-9、胱冬肽酶-10、胱冬肽酶-11<sup>[13]</sup>,诱发细胞凋亡的执行者是胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-6和胱冬肽酶-7。胱冬肽酶-8作为凋亡起始者,当细胞发生凋亡时,胱冬肽酶-8酶原在复合物中通过自身切割而被激活,进而切割执行



A: 0  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4对照组; B: 4.8  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组; C: 9.6  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组; D: 14.4  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组。  
A: 0  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; B: 4.8  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; C: 9.6  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; D: 14.4  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group.

图8 TUNEL法检测梯度浓度rLj-RGD4对B16细胞凋亡的影响

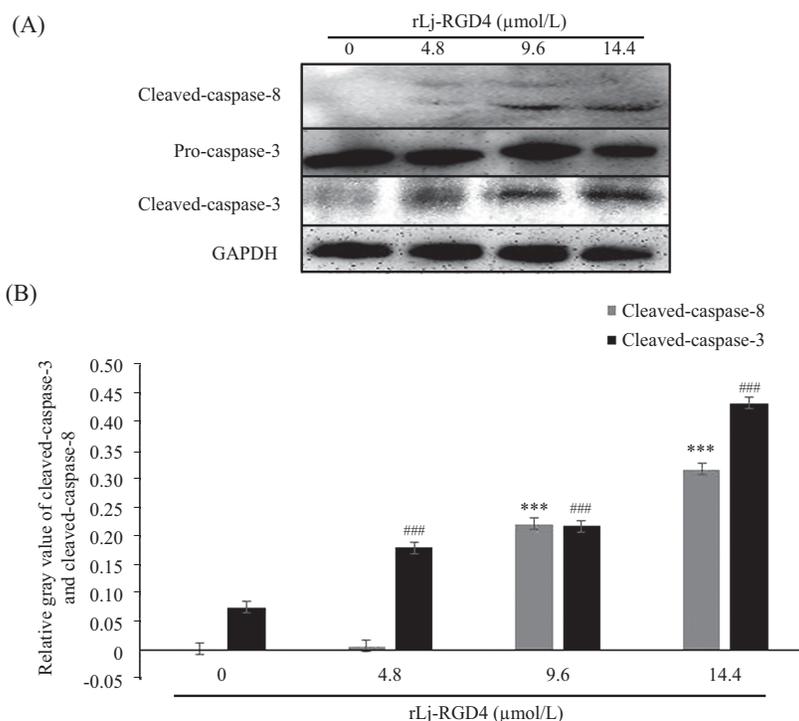
Fig.8 TUNEL staining shows the effect of rLj-RGD4 on the apoptosis of B16 cells



A: 0  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4对照组; B: 4.8  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组; C: 9.6  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组; D: 14.4  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4实验组。  
A: 0  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; B: 4.8  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; C: 9.6  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group; D: 14.4  $\mu\text{mol/L}$  rLj-RGD4 group.

图9 FITC荧光标记的鬼笔环肽染色检测rLj-RGD4对B16细胞骨架的影响

Fig.9 Phalloidin staining shows the effect of rLj-RGD4 on the cytoskeleton of B16 cells



A: Western blot检测胱冬肽酶-3和胱冬肽酶-8蛋白质水平; B: 蛋白质灰度分析。\*\*\* $P < 0.001$ , 与cleaved-caspase-8 0 μmol/L rLj-RGD4组比较; ### $P < 0.001$ , 与cleaved-caspase-3 0 μmol/L rLj-RGD4组比较。

A: the determination of caspase-3 and caspase-8 protein levels by Western blot; B: relative protein levels of caspase-3 and caspase-8 analysed by densitometry. \*\*\* $P < 0.001$  vs cleaved-caspase-8 0 μmol/L rLj-RGD4 group; ### $P < 0.001$  vs cleaved-caspase-3 0 μmol/L rLj-RGD4 group.

图10 rLj-RGD4对B16细胞胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-8水平及激活的影响

Fig.10 rLj-RGD4 influenced the Caspase-3, Caspase-8 levels and their activation in B16 cells

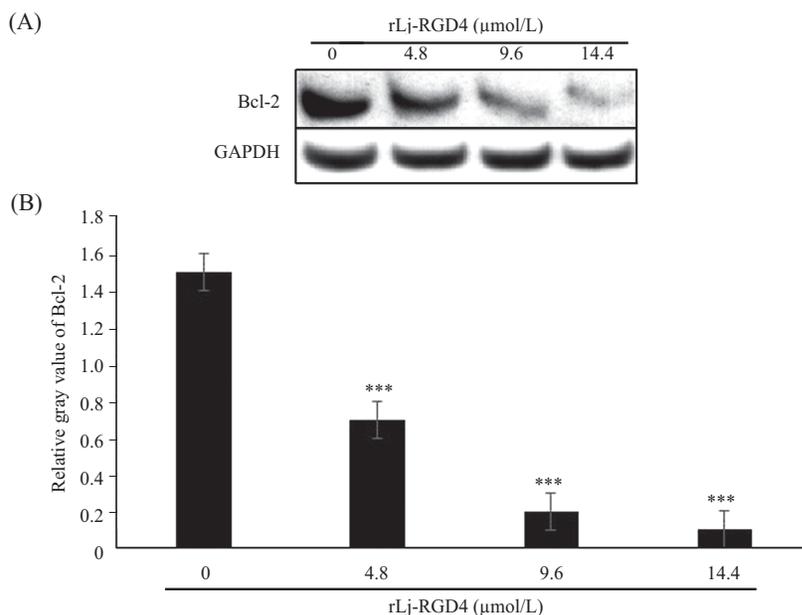
者胱冬肽酶-3酶原,产生有活性的胱冬肽酶-3,继而对相应的胞质胞核底物进行裂解,最终导致细胞发生程序性死亡<sup>[14-16]</sup>。Bcl-2是细胞凋亡机制研究中最被重视的癌基因之一,其具有抑制细胞发生凋亡的功能。胱冬肽酶-8主要位于线粒体,Bcl-2家族位于线粒体外膜,活化的caspase-8还通过切割Bcl-2家族成员(BH3 interacting death agonist, Bid)将凋亡信号传递到线粒体,引发凋亡的内源途径,使凋亡信号进一步扩大。

研究结果显示,梯度浓度的rLj-RGD4肽可激活胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-8酶原,而且随着rLj-RGD4浓度增加,胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-8的蛋白质水平增加(图10),这说明前述rLj-RGD4对B16细胞凋亡的诱导是以胱冬肽酶-3为执行者的。rLj-RGD4能够呈剂量依赖性地抑制B16细胞Bcl-2蛋白质水平,其4.8 μmol/L低浓度抑制率为53.37%,9.6 μmol/L中等浓度抑制率为86.70%,14.4 μmol/L高浓度抑制率为93.30%(图11)。

### 3 讨论

肿瘤是一类严重威胁人类健康的多发病和常

见病,为寻找最安全有效的抗肿瘤药物,科研工作者在不断努力着。1984年,Pierschbacher等<sup>[17]</sup>首次确定了RGD序列为人纤连蛋白(fibronectin, FN)与其受体的结合位点,并且在另外5种蛋白质中也发现了RGD序列。RGD肽在抗血管新生、抗肿瘤治疗中的应用已成为研究热点<sup>[9]</sup>。源自各种蝮蛇蛇毒的RGD/赖氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Lys-Gly-Asp, KGD)去整合蛋白是一类低分子质量含有富含半胱氨酸的蛋白质。Hsu等<sup>[18]</sup>发现了一种新的含RGD的去整合蛋白(a novel RGD-containing disintegrin, TMV-7),正在开发为更安全的抗血栓形成剂,且具有最小的副作用。Trifavin是一种来自竹叶青蛇毒含的有RGD序列的去整合蛋白,Trigramin抑制人黑色素瘤细胞黏附和扩散到纤连蛋白和纤维蛋白原上<sup>[19]</sup>,抑制B16F10黑色素瘤细胞的肺部定植<sup>[20]</sup>。与此同时,Shao等<sup>[21]</sup>通过对裸鼠体内人喉癌Hep-2细胞的治疗,验证了rLj-RGD4的抗肿瘤功能。RGD在癌症诊断成像也具有重要的作用,经常作为用于肿瘤SPECT或PET成像的放射性示踪剂。Eo等<sup>[22]</sup>通过镓(Ga)标记RGD肽衍生物研究血管生成成像,临床诊断发现,乳腺癌、



A: Western blot检测Bcl-2蛋白质水平; B: 蛋白质灰度分析。\*\*\* $P < 0.001$ , 与0 μmol/L rLj-RGD4组比较。

A: the determination of Bcl-2 protein levels by Western blot; B: relative protein levels of Bcl-2 analysed by densitometry. \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 μmol/L rLj-RGD4 group.

图11 rLj-RGD4对B16细胞Bcl-2水平的影响

Fig.11 rLj-RGD4 influenced the Bcl-2 levels in B16 cells

神经胶质瘤、肺癌属于恶性疾病,而心肌梗死、动脉粥样硬化属非恶性。贾莹莹等<sup>[23]</sup>通过采用FITC标记HYNIC-RGD对人胰腺癌、肝癌、肠癌和子宫颈癌细胞结合,检测RGD序列多肽与不同肿瘤细胞结合特性研究。

本文主要采用人工合成重组肽rLj-RGD4对B16细胞进行生物学分析。经MTT法、Transwell法和细胞划痕实验结果表明,不同浓度的rLj-RGD4对B16细胞的生长起到抑制作用,抑制的效果随着作用时间和浓度的增加而增强。并通过Hoechst 33258法、TUNEL-FITC法结果分析发现,B16细胞的细胞膜通透性增加,凋亡的细胞体积缩小,细胞凋亡时DNA发生断裂。经鬼笔环肽-FITC染色结果显示,随着rLj-RGD4剂量的加大,rLj-RGD4对B16细胞的微丝网络和伪足都起到了破坏作用,进而能够抑制肿瘤细胞的增殖、黏附、迁移和浸润。胱冬肽酶-8和胱冬肽酶-3在胱冬肽酶级联反应中分别在起始者和执行者上处于核心地位,是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号传导的共同通路<sup>[24]</sup>。Western blot结果显示,rLj-RGD4诱导B16细胞凋亡是通过激活胱冬肽酶-8来实现的,并且胱冬肽酶-8通过调节Bcl-2基因从而激活细胞凋亡的内源途径,使凋亡信号进一步扩大。本文也曾用流式检测B16细胞的凋亡情

况,但由于B16细胞消化过程中,难以成为单个细胞而是呈细胞团的情况,所以不适合用流式的方法来检测。综合以上实验结果,我们得出,人工合成基因重组肽rLj-RGD4能抑制B16细胞的增值、凋亡、迁移、浸润行为,相信通过进一步研究,有可能成为一个具有抗肿瘤作用的候选药物。

### 参考文献 (References)

- 1 赵勇,张璐,蔡丽萍,徐晨.黄芪多糖对小鼠B16. BL6黑色素瘤肺转移的影响. 实验动物与比较医学(Zhao Yong, Zhang Lu, Cai Liping, Xu Chen. Effects of *Astragalus* polysaccharides on B16-BL6 melanoma lung metastasis in mice. *Boratory Animal and Comparative Medicine*) 2014; 34(3): 232-41.
- 2 Lu H, Liu S, Zhang G, Kwong LN, Zhu Y, Miller JP, *et al.* Oncogenic BRAF-mediated melanoma cell invasion. *Cell Rep* 2016; 15(9): 2012-24.
- 3 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 63(1): 11-30.
- 4 Schmidt K, Joyce CE, Buquicchio F, Brown A, Ritz J, Distel RJ, *et al.* The lncRNA SLNCR1 mediates melanoma invasion through a conserved SRA1-like region. *Cell Rep* 2016; 15(9): 2025-37.
- 5 Ngo M, Han A, Lakatos A, Sahoo D, Hachey SJ, Weiskopf K, *et al.* Antibody therapy targeting CD47 and CD271 effectively suppresses melanoma metastasis in patient-derived xenografts. *Cell Rep* 2016; 16(6): 1701-16.
- 6 Bidoli E, Fratino L, Bruzzone S, Pappagallo M, De Paoli P, Tirelli U, *et al.* Time trends of cancer mortality among elderly in Italy,

- 1970-2008: An observational study. *BMC Cancer* 2012; 12: 443.
- 7 Fisher DE, Geller AC. Disproportionate burden of melanoma mortality in young U.S. men: the possible role of biology and behavior. *JAMA Dermatol* 2013; 149: 903-4.
- 8 Gamba CS, Clarke CA, Keegan TH, Tao L, Swetter SM. Melanoma survival disadvantage in young, non-Hispanic white males compared with females. *JAMA Dermatol* 2013; 149: 912-20.
- 9 肖斌, 朱永红. RGD肽在肿瘤治疗中的研究进展. *中国肿瘤临床*(Xiao Bin, Zhu Yonghong. The research on development of the role of RGD-peptides in tumor therapy. *Chinese Journal of Clinical Oncology*) 2005; 32(19): 1135-7.
- 10 Wang J, Han X, Yang H, Lu L, Wu Y, Liu X, *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): 1387-96.
- 11 白娟, 时春风, 柳云恩, 吕士红, 李庆伟, 王继红. 野生型rLj-RGD3基因重组突变体rLj-112分子克隆及对HeLa细胞活性影响. *中国生物化学与分子生物学报*(Bai Juan, Shi Chunfeng, Liu Yunen, Lü Shihong, Li Qingwei, Wang Jihong. Wild-type RLj-RGD3 genes recombinant mutants-molecular cloning and bioactivity effects to HeLa of RLj-112. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2016; 32(2): 224-30.
- 12 张丕桥, 时春风, 金阳, 王继红, 李庆伟. 七鳃鳗口腔腺重组蛋白rLj-RGD3对人肝癌HepG2细胞活性的影响. *辽宁师范大学学报*(Zhang Peiqiao, Shi Chunfeng, Jing Yang, Wang Jihong, Li Qingwei. Bioactivity effects to HepG2 of recombinant rlj-RGD3 from the saliva gland of lampetra japonica. *Journal of Liaoning Normal University*) 2015; 38(2): 236-41.
- 13 Song JJ, Wang YW, Teng MY, Zhang SQ, Yin MY, Lu JH, *et al.* *Cordyceps militaris* induces tumor cell death via the caspase-dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF-7 cells. *Mol Med Rep* 2016; 13(6): 5132-40.
- 14 Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, Vaz FM, Gottlieb E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ* 2011; 18: 538-48.
- 15 Bao Q, Shi Y. Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007; 14: 56-65.
- 16 Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104.
- 17 陈治宇, 厚今, 王兴发. 含RGD序列肽及类似物的合成. *承德医学院学报*(Chen Ziyu, Hou Jin, Wang Xingfa. Synthesis of peptide containing RGD sequence and its analogues. *Journal of Chengde Medical College*) 2003; 20(3): 246-7.
- 18 Huang TF, Hsu CC, Kuo YJ. Anti-thrombotic agents derived from snake venom proteins. *Thromb J* 2016; 14(1): 146-63.
- 19 Knudsen KA, Tuszynski GP, Huang TF, Niewiarowski S. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells. *Exp Cell Res* 1988; 179: 42-9.
- 20 Sheu JR, Lin CH, Chung JL, Teng CM, Huang TF. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 885-93.
- 21 Shao FY, Lü M, Zheng YY, Jiang JS, Wang Y, Lü L, *et al.* The anti-tumour activity of rLj-RGD4, an RGD toxin protein from *Lampetra japonica*, on human laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells in nude mice. *Biochimie* 2015; 119: 183-91.
- 22 Eo JS, Jeong JM. Angiogenesis imaging using (68) Ga-RGD PET/CT: Therapeutic implications. *Semin Nucl Med* 2016; 46(5): 419-27.
- 23 贾莹莹, 钱海利, 唐萌, 赵周社, 李宏利, 辛军, 等. RGD序列多肽与不同肿瘤细胞结合特性研究. *中国临床医学影像杂志*(Jia Yingying, Qian Haili, Tang Meng, Zhao Zhouzhe, Xin Jun, *et al.* Comparison of combination specification of the different tumor cell with RGD peptide. *J Chin Clin Med Imaging*) 2008; 19(1): 35-7.
- 24 Blanchard H, Donepudi M, Tschopp M, Kodandapani L, Wu JC, Grütter MG. Caspase-8 specificity probed at subsite S(4): Crystal structure of the caspase-8-Z-DEVD-cho complex. *J Mol Biol* 2000; 302: 9-16.