

## 研究论文

# 重组蛋白rLj-112对人非小细胞肺癌A549细胞增殖、迁移和凋亡的影响及其机制研究

郑媛媛 王继红\* 李庆伟\*

(辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029)

**摘要** 该文研究了重组蛋白rLj-112对人非小细胞肺癌A549细胞增殖、迁移和凋亡的影响及其作用机制。采用MTT(四甲基偶氮唑蓝)法检测rLj-112对人非小细胞肺癌A549细胞增殖的影响, 采用Transwell方法检测rLj-112对A549细胞迁移和侵袭的影响, Hoechst和吉姆萨染色的方法检测rLj-112对A549细胞凋亡的影响; 采用Western blot法检测rLj-112对A549细胞信号通路相关蛋白质水平的影响。结果表明, rLj-112能够抑制A549细胞的增殖, 半抑制浓度 $IC_{50}$ 值为 $1.64 \mu\text{mol/L}$ ; rLj-112能抑制A549细胞的迁移和侵袭并呈剂量依赖性; rLj-112能诱导A549细胞的凋亡; rLj-112处理过的细胞cleaved-caspase3蛋白质和cleaved-PARP蛋白质水平升高, 证明rLj-112通过caspase3/PARP途径执行对A549细胞的凋亡的诱导, p-AKT、p-PI3K和p-Erk1/2的水平下降, 提示rLj-112的作用方式与PI3K/AKT相关信号通路有关。

**关键词** 非小细胞肺癌; 增殖; 细胞迁移和侵袭; 细胞凋亡

## The Effects and Mechanism Studies of Recombinant Protein rLj-112 on Proliferation, Migration and Apoptosis of Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

Zheng Yuanyuan, Wang Jihong\*, Li Qingwei\*

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

**Abstract** We studied the ability of rLj-112 protein from the Lamprey Japonica on anti-tumor of A549 cells and its regulatory mechanism in this study. We used MTT assay to detect cell proliferation. Giemsa staining assay and Hoechst 33258 staining were employed to examine cell apoptosis of A549 cells after Lj-112 treated. Western blot was used to examine cell apoptosis related signal proteins. It was found that after treated with rLj-112, the proliferation of A549 cells was inhibited and  $IC_{50}$  value was  $1.64 \mu\text{mol/L}$ . The inhibition effect is in a dose-dependent manner. The migration assay showed that after treated with different concentrations of rLj-112 proteins the inhibition effect was in a dose-dependent manner. The same situation occurred in the invasion test. The Hoechst 33258 staining experiment showed rLj-112 could induce the apoptosis of A549 cell. The Western blot analysis

收稿日期: 2017-09-01 接受日期: 2017-11-02

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: SS2014AA091602)和国家自然科学基金(批准号: 30770297)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-85827097, E-mail: jihongwang999@hotmail.com; liqw@263.net

Received: September 1, 2017 Accepted: November 2, 2017

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.SS2014AA091602) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30770297)

\*Corresponding authors. Tel: +86-10-85827097, E-mail: jihongwang999@hotmail.com; liqw@263.net

网络出版时间: 2017-12-04 11:59:39 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1159.002.html>

showed that cleaved-caspase3 protein and cleaved-PARP protein were improved in A549 cells treated with rLj-112 and demonstrated that rLj-112 induced apoptosis of A549 cells through caspase3/PARP pathway. The levels of p-AKT, p-PI3K and p-Erk1/2 were decreased in the rLj-112 treated A549 cells, demonstrated that rLj-112 reduced AKT/PI3K pathway in A549 cells.

**Keywords** non-small cell lung cancer; proliferation; cell migration and invasion; cell apoptosis

国内每年约有60万人被诊断为肺癌患者,而肺癌的易转移、手术切除困难和愈后差等特征使其成为最具有致死性的癌症之一,占癌症死亡人数的15%左右,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者占有所有肺癌患者的80%<sup>[1]</sup>。常规的化疗仍然是肺癌治疗的方式之一,但癌细胞耐药性的快速发展及其副作用,使开发新治疗手段成为解决这一致命疾病的迫切需求。过去十年中,基于蛋白质类的抗癌治疗剂在医药市场中表现出巨大的潜力<sup>[2]</sup>。

RGD(Arg-Gly-Asp)是由特定的三个氨基酸组成的模体,是细胞表面整合素识别并结合重要位点。部分RGD肽通过靶向结合肿瘤细胞表面的高表达的整合素,成为了一类潜在的抗肿瘤、抗血管新生、抗血栓的治疗药物<sup>[3]</sup>。富组氨酸糖蛋白(histidine rich glycoprotein, HRG)是一种发现于脊椎动物血浆中的糖蛋白,具有多结构域的特点,包含一个N-端结构域、两个半胱氨酸蛋白酶抑制剂样(cystatin C like)结构域、一个富组氨酸(histidine-rich region, HRR)结构域、两个富脯氨酸(proline-rich region, PRR)结构域和一个C-端结构域<sup>[4]</sup>。由于其结构域的多样性,HRG能够结合多种配体包括血红素、Zn<sup>2+</sup>、原肌球蛋白、纤溶酶原、纤溶酶、纤维蛋白原、血小板反应蛋白、IgG、FcγR、C1q、肝素和硫酸乙酰肝素(heparan sulphate, HS)等<sup>[5]</sup>。作为衔接蛋白,HRG涉及多种功能的调剂,如血管生成、凝血、纤维蛋白溶解、细胞趋化性、免疫应答、细胞凋亡、细胞黏附、细胞迁移、细胞生长和细胞增殖<sup>[6]</sup>。有研究报道,从血浆中纯化的兔HRG的HRR/PRR结构域能够抑制内皮细胞增殖和基质胶塞的血管形成<sup>[7]</sup>。

rLj-RGD3是从七鳃鳗口腔腺cDNA文库基因中克隆并进行基因构建表达得到一种重组RGD毒素蛋白。经过序列比对分析,rLj-RGD3不仅含有RGD特征模体,还含有高比例的组氨酸,与HRG具有40%左右的同源性。基于rLj-RGD3设计的重组蛋白rLj-112是将RGD模体全部去掉的突变型,经序列

比对发现,其与鳕鱼的富组氨酸糖蛋白的相似性高达60%<sup>[8]</sup>。之前的研究发现,rLj-112与HRG相似,具有抑制血管新生和Hela细胞的生物学活性及抑制白色念珠菌的功能<sup>[9-10]</sup>。因此推断,rLj-112能够与生长因子结合,并影响其相关信号通路,对肿瘤细胞产生影响。本文通过首次研究rLj-112对人非小细胞肺癌A549细胞的增殖、迁移和侵袭、凋亡的影响以及对caspase凋亡执行信号通路以及磷脂酰肌醇-3激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, Akt)信号通路相关蛋白质水平的影响,为深入研究rLj-112的抗肺癌作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人非小细胞肺癌细胞株A549购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

组氨酸亲和层析柱(His-Bind Column)购自Novagen公司;RPMI-1640培养基、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素、0.02% EDTA+0.25%胰蛋白酶购自Gibco公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自PEPROTECH ECLTD公司;细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;Transwell细胞培养板购自Corning公司;caspase3、cleaved-caspase3、cleaved-PARP购自Cell Signaling Technology公司;HRP标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 rLj-112蛋白质的获得与鉴定

实验室保有质粒pET23b-Lj-112,通过CaCl<sub>2</sub>法转化至表达菌*E.coli* BL21内,对转化菌进行IPTG低温诱导表达后,经过离心、破碎、收集上清和组氨酸亲和层析得到纯化重组蛋白rLj-112。用Tricine-SDS PAGE<sup>[11]</sup>鉴定rLj-112蛋白质的表达情况。

### 1.3 细胞培养

人非小细胞肺癌细胞A549培养于含100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素和10%胎牛血清的RPMI-

1640培养液中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中常规培养。

#### 1.4 对人非小细胞肺癌细胞A549增殖的影响

对数生长期的A549细胞以 $2 \times 10^5$ /孔的浓度接种于96孔板中, 每组4个复孔, 细胞贴壁后加入不同梯度浓度的rLj-112或PBS, 24 h后加入MTT(0.5 mg/mL), 继续培养4 h, 吸出上清, 向每孔中加入二甲亚砜(DMSO)(150  $\mu$ L/孔), 震荡10 min, 至蓝紫色结晶完全溶解。用酶标仪测定592 nm波长下各孔吸光度(*D*)值。细胞增殖抑制率=(对照孔*D*值-加药孔*D*值)/对照孔*D*值 $\times 100\%$ 。

#### 1.5 对人非小细胞肺癌细胞A549迁移和侵袭的影响

迁移实验: A549细胞经饥饿处理后与不同浓度rLj-112(1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L)蛋白或PBS孵育后加入Transwell上室, 下室加入已添加bFGF的完全培养基。培养6 h后, 擦去上层未迁移细胞, 加入4%多聚甲醛固定, 染色, 制片, 显微镜下拍照。侵袭实验: Transwell上室加入Matrigel基质胶包被, 后续步骤与迁移实验相同<sup>[12]</sup>。

#### 1.6 对人非小细胞肺癌细胞A549凋亡的诱导

将对数期的A549细胞接种于6孔板中的细胞爬片上, 对照组中加入PBS, 实验组中加入终浓度1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L的rLj-112处理, 12 h后吸去培养液, PBS洗2次, 加入4%多聚甲醛固定, PBS洗2次, 瑞氏-吉姆萨染色法(Wright-Giemsa stain)染色, 显微镜下观察细胞形态并拍照<sup>[13]</sup>。另一组相同条件固定处理后的A549细胞用Hoechst 33258对核进行染色, 封片后在荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.7 Western blot检测相关蛋白质水平

将对数生长期的A549细胞以 $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板中。每组分别加入不同浓度的rLj-112, 刺激24 h后裂解细胞并提取总蛋白, 通过BCA法测定蛋白质浓度。将蛋白质样品进行SDS电泳后转移至硝酸纤维素膜, 用5%脱脂牛奶于37 °C封闭1 h后, 分别放入不同一抗孵育液中, 4 °C孵育过夜。第2 d用PBST洗涤后, 再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h, ECL显色发光, 对实验结果进行定量分析。

#### 1.8 统计学分析

对实验数据采用SPSS 22.0软件, 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功获得目的蛋白rLj-112

通过组氨酸亲和层析得到纯度大于95%的重组蛋白rLj-112(图1), 相对分子量为12.5 kDa左右, 通过BCA法测定蛋白质浓度为1 mg/mL。

### 2.2 rLj-112对A549细胞增殖的影响

与对照组相比, rLj-112对A549细胞的增殖有明显的抑制作用, 抑制率随浓度的增加而增大, 呈剂量依赖性的特点, 其半抑制浓度IC<sub>50</sub>为1.64  $\mu$ mol/L(图2)。

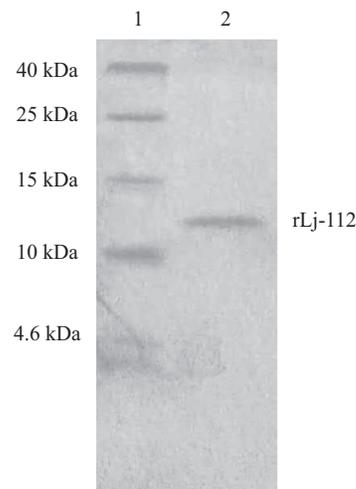
### 2.3 rLj-112对A549细胞迁移与侵袭的影响

Transwell小室检测rLj-112对A549细胞迁移和侵袭的影响。实验结果显示, 与对照组相比, rLj-112处理组的细胞迁移数目明显减少, 抑制效果随浓度增加而增大, 右侧为抑制率统计结果, 加入rLj-112浓度为1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L时对A549细胞迁移的抑制率分别为 $26.8\% \pm 2.5\%$ 、 $44.4\% \pm 3.6\%$ 、 $73.2\% \pm 3.0\%$ (图3E)。

与对照组相比, rLj-112处理组的细胞侵袭数目明显减少, 抑制效果随浓度增加而增大, 右侧为抑制率统计结果, 抑制率随浓度增大而增大, 加入rLj-112浓度为1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L时对A549细胞侵袭的抑制率分别为 $32.2\% \pm 2.2\%$ 、 $62.3\% \pm 3.0\%$ 、 $71.3\% \pm 3.5\%$ (图4E)。

### 2.4 rLj-112对A549细胞的凋亡作用

经Giemsa染色后光学显微镜下观察, 与对照组相比, rLj-112(1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L)处理后的A549细胞呈现出典型的凋亡形态: 细胞数量变少, 细胞

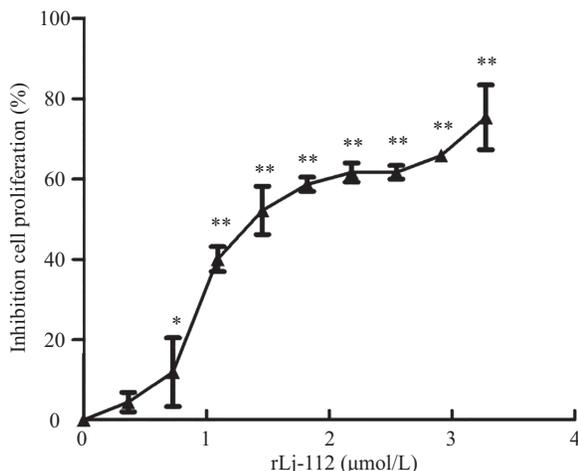


1: marker; 2: 纯化蛋白质rLj-112。

1: marker; 2: purified protein rLj-112.

图1 纯化蛋白质rLj-112的Tricine-SDS-PAGE电泳鉴定

Fig.1 Identification of purified protein rLj-112 by Tricine-SDS-PAGE

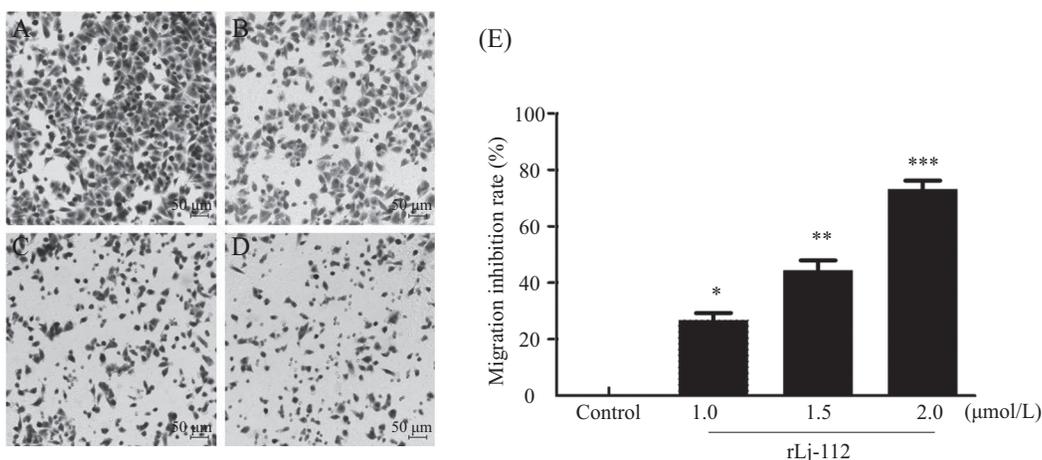


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 rLj-112对A549细胞增殖的抑制作用

Fig.2 Inhibition of A549 cell proliferation by rLj-112 protein



A: 对照组; B~D: 1.0、1.5、2.0 μmol/L rLj-112作用于A549细胞迁移; E: rLj-112对A549细胞迁移的抑制率。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组相比较。

A: control group; B-D: effects of 1.0, 1.5, 2.0 μmol/L rLj-112 on migration of A549 cells; E: migration inhibition rate of rLj-112 on A549 cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group.

图3 rLj-112对A549细胞迁移的抑制作用

Fig.3 Inhibition of A549 cell migration by rLj-112 protein

体积变小, 细胞核表现出固缩和颜色加深, 内容物外泄; 并且随浓度增加, 现象更为明显(图5)。

细胞发生凋亡后, 染色质固缩, Hoechst 33258染色后, 凋亡的细胞吸收Hoechst的能力增强, 与对照组相比, 处理组的细胞荧光强度高(图6)。此结果说明, rLj-112诱导了A549细胞的凋亡。

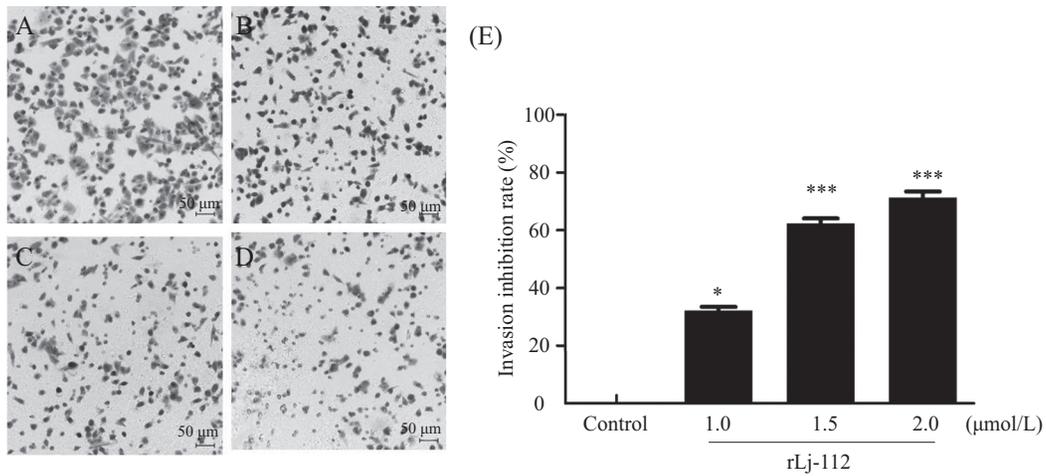
### 2.5 rLj-112对A549细胞caspase3/PARP蛋白质水平的影响

Caspase3是重要的凋亡执行蛋白, caspase3的活化引发下游凋亡PARP进而引发细胞凋亡, 不同

浓度rLj-112蛋白处理后的A549细胞中的cleaved-caspase3和cleaved-PARP的表达量上调, 并且浓度越大, 上调程度越大(图7)。相对地, 生长因子信号通路下游的p-AKT、p-PI3K和p-Erk1/2表达量下降, 随rLj-112的作用浓度增大, 下调程度越大(图8)。

### 3 讨论

蛋白质类抗癌药物作为新的癌症治疗手段表现出巨大的发展潜力, 是由于它们具有高特异性、低内毒性等特点。蛋白质类抗癌药物包括抗体类



A: 对照组; B~D: 1.0、1.5、2.0 μmol/L rLj-112作用于A549细胞侵袭; E: rLj-112对A549细胞侵袭的抑制率。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组相比较。  
 A: control group; B-D: effects of 1.0, 1.5, 2.0 μmol/L rLj-112 on invasion of A549 cells; E: invasion inhibition rate of rLj-112 on A549 cells.  
 \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group.

图4 rLj-112对A549细胞侵袭的抑制作用  
 Fig.4 Inhibition of A549 cell invasion by rLj-112 protein

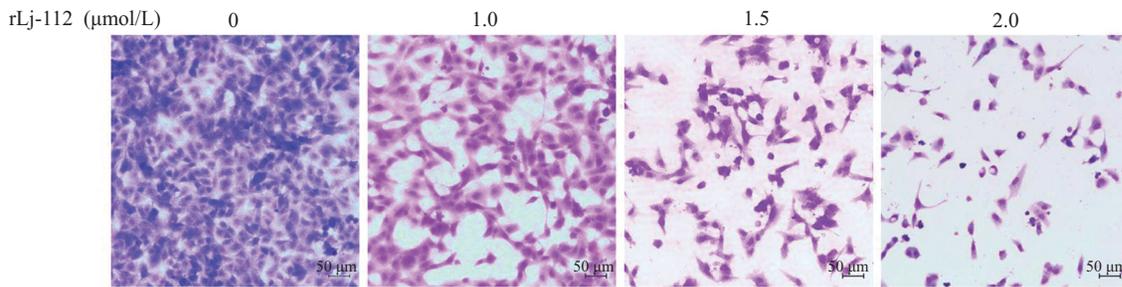


图5 rLj-112处理的A549细胞的瑞氏-吉姆萨染色  
 Fig.5 Wright-Giemsa staining of A549 cell treated with rLj-112

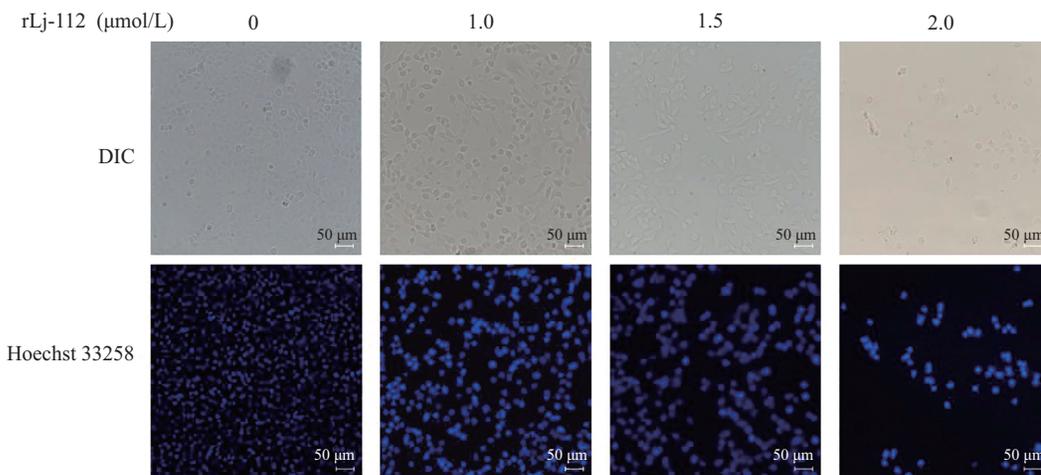
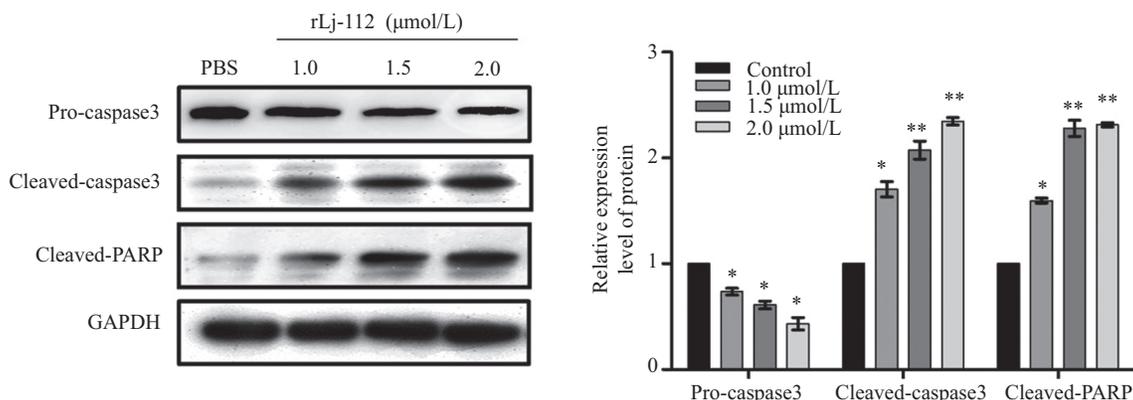


图6 rLj-112处理的A549细胞后的Hoechst 33258染色  
 Fig.6 Hoechst 33258 staining of A549 cell treated with rLj-112

癌症治疗药物, 通过特异性结合受体、阻断相关信号通路抑制肿瘤细胞增殖达到治疗癌症的目的, 如

曲妥珠单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗。除此之外, 还包括一类小分子肽类, 通过阻断或抑

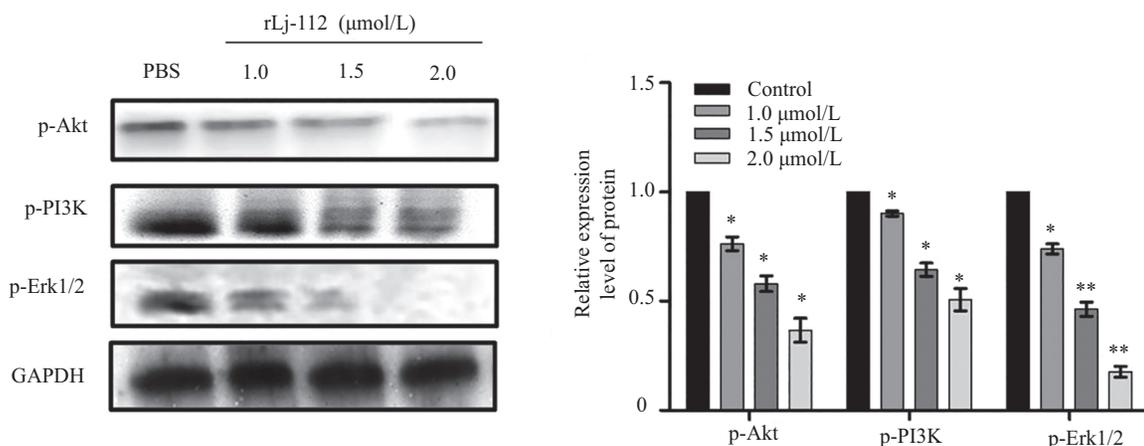


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照(PBS)组相比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control (PBS) group.

图7 Western blot 检测rLj-112处理后A549细胞中caspase3、cleaved-caspase3、cleaved-PARP蛋白质水平

Fig.7 The levels of caspase3, cleaved-caspase3 and cleaved-PARP protein in A549 cell treated with rLj-112 detected by Western blot



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照(PBS)组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control (PBS) group.

图8 Western blot检测rLj-112处理后的A549细胞中p-AKT、p-PI3K、p-Erk1/2蛋白质水平

Fig.8 The levels of p-AKT, p-PI3K, p-Erk1/2 proteins in A549 cells treated with rLj-112 detected by Western blot

制细胞内相关信号通路或者抑制血管新生等方式抑制肿瘤, 包括天然源抗癌短肽和生物合成的抗癌短肽<sup>[14]</sup>。

抑制肿瘤细胞增殖和促进其凋亡是治疗肿瘤的手段之一。远端转移是恶性肿瘤的显著特征, 在肿瘤疾病的发展和恶化中起着尤为关键的作用。肿瘤转移涉及癌细胞的迁移、侵袭、基质降解和黏附等一系列相关的病理活动<sup>[15]</sup>。体内环境中, 肿瘤细胞穿过细胞外基质后才进一步进入其他组织或循环系统, 进而向身体其他位置转移。而体外试验中, 把肿瘤细胞对基底膜的侵袭能力作为影响肿瘤侵袭的判断标准。本研究结果显示, rLj-112能够在体外抑制肺癌细胞A549的增殖迁移和凋亡。

HRG是一种含量丰富的血浆蛋白, 同时也是

一种通过与多种配体结合调节多种受体与配体间相互作用的衔接蛋白, 在包括免疫调节、细胞黏附、血管生成和血栓形成多种过程中都有重要的作用。Zhang等<sup>[16]</sup>的实验发现, HRG过表达能够抑制肝癌细胞系的增殖、集落形成和肿瘤生长。HRG外源性给药也能够抑制体内肿瘤血管的生成和诱导血管内皮细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。HRG通过与多种配体的相互作用, 具有影响凝血、抑制血管生成、调节细胞与外基质黏附等作用。此外, HRG能够通过靶向抑制VEGF信号通路抑制肿瘤的生长。HRGP330的作用机制涉及抑制整合素连接酶(integrin linked kinase, ILK)与黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的磷酸化, 从而抑制细胞的黏附功能; 通过抑制内皮细胞因子诱导的FAK的酪氨酸磷酸化, 抑制细胞的运动;

对黏着斑介导的黏附功能的抑制涉及到 $\alpha_v\beta_3$ 整合素相关功能<sup>[17]</sup>。近年来,在多种肿瘤治疗药物研究方面有大量关于PI3K/AKT和MAPK信号通路的研究,酪氨酸激酶活化PI3K进而活化AKT,活化的AKT可以通过磷酸化多种底物影响多种细胞进程,如细胞周期、生长、分化、细胞凋亡、血管生成和迁移<sup>[18]</sup>。研究表明,HRG结构中的富组氨酸结构域作为重要的功能执行区域,通过结合包括VEGF、EGF、FGF等生长因子在内的多种配体,从而影响肿瘤细胞相关的细胞信号通路,抑制肿瘤细胞增殖<sup>[19]</sup>。HRG与配体结合的机制十分复杂,包括对多种细胞表面生长因子受体参与的信号途径的影响。因此推测,与HRG的富组氨酸结构域具有相似性的rLj-112可能通过结合细胞表面生长因子VEGF、EGF、FGF多种配体,从而抑制肿瘤细胞增殖、迁移,可能涉及多种信号通路的影响。EGFR和VEGFR在多种肿瘤中的激活导致MAPK和AKT信号通路的激活,所以PI3K/AKT信号通路是多种生长因子受体信号通路重要的下游通路<sup>[20]</sup>。通过检测其磷酸化水平变化,说明rLj-112可能通过影响细胞表面生长因子受体磷酸化水平影响肿瘤细胞增殖和迁移。此外,caspase家族作为重要的凋亡执行蛋白,对其活化程度检测证明了rLj-112在体外促进肺癌细胞A549的凋亡。

综上,rLj-112对人肺癌细胞A549的增殖、迁移和侵袭有较强的抑制作用并能促进其发生凋亡,促进凋亡执行蛋白caspase3/PARP的剪切,抑制PI3K/AKT信号通路的磷酸化,但其作用靶点和更为详尽的机制还需进一步研究。本研究结果为rLj-112成为一种候选肿瘤治疗的候选药物提供了理论基础。

### 参考文献 (References)

- Selek U, Bolukbasi Y, Welsh JW, and Topkan E. Intensity-modulated radiotherapy versus 3-dimensional conformal radiotherapy strategies for locally advanced Non-Small-Cell lung cancer. *Balkan Med J* 2014; 31(4): 286-94.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* 2010; 15(1/2): 40-56.
- Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2006; 8(2): 96-103.
- Koide T, Foster D, Yoshitake S, Davie EW. Amino acid sequence of human histidine-rich glycoprotein derived from the nucleotide sequence of its cDNA. *Biochemistry* 1986; 25(8): 2220-5.
- Jones AL, Hulett MD and Parish CR. Histidine-rich glycoprotein binds to cell-surface heparan sulfate via its N-terminal domain following Zn<sup>2+</sup> chelation. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30114-22.
- Vanwildemeersch M, Olsson AK, Gottfridsson E, Claesson-Welsh L, Lindahl U, Spillmann D. The anti-angiogenic His/Pro-rich fragment of histidine-rich glycoprotein binds to endothelial cell heparan sulfate in a Zn<sup>2+</sup>-dependent manner. *J Biol Chem* 2006; 281(15): 10298-304.
- Juarez JC, Guan X, Shipulina NV, Plunkett ML, Parry GC, Shaw DE, *et al.* Histidine-proline-rich glycoprotein has potent antiangiogenic activity mediated through the histidine-proline-rich domain. *Cancer Res* 2002; 62(18): 5344-50.
- 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*(Bai Juan, Shi Chunfeng, Liu Yunen, Lü Shihong, Li Qingwei, Wang Jihong. Wild-type rLj-RGD3 genes recombinant mutant—molecular cloning and bioactivity effects to HeLa of rLj-112. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2016; 32(2): 224-30.
- 王继红, 张亚前, 吕莉, 刘欣, 李庆伟. 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. *生物工程学报*(Wang Jihong, Zhang Yaqian, Lü Li, Liu Xin, Li Qingwei. Anti-angiogenic activities of Lj-RGD3 toxin protein from lampetra japonica and its mutation protein Lj-112 without RGD motifs. *Chin J Biotech*) 2011; 27(10): 1428-37.
- 白娟, 吕莉, 勾萌, 肖蓉, 刘欣, 李庆伟, 等. rLj-RGD3全RGD缺失基因重组突变体——rLj-112分子克隆及其广谱抑真菌活性. *中国生物化学与分子生物学报*(Bai Juan, Lü Li, Gou Meng, Xiao Rong, Liu Xin, Li Qingwei, *et al.* Molecular cloning and antimicrobial activity of recombinant rLj-112, a full RGD deletion mutant of Lj-RGD3 protein. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2015; 31(2): 191-8.
- 王继红, 任凤, 吴毓, 田晓光, 吴妍宁, 赵宝昌. 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*(Wang Jihong, Ren Feng, Wu Yu, Tian Xiaoguang, Wu Yanning, Zhao Baozhang. 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.
- 张子雯, 傅小一. miR-27a对两种结肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响. *中国生化药物杂志*(Zhang Ziwen, Fu Xiaoyi. Effect of miR-27a on the proliferation and invasion of two colorectal cancer cells. *Chin J of Biochem Pharm*) 2015; 35(2): 24-7.
- 薄其青, 葛鑫, 崔佳乐, 姜雪, 刘剑凯, 洪敏. 酸性丝氨酸蛋白酶ASP NJ对K562白血病细胞的抑制与损伤作用研究. *中国生化药物杂志*(Bo Qiqing, Ge Xin, Cui Jiale, Jiang Xue, Liu Jiankai, Hong Min. Effect of acidic serine protease ASP NJ on inhibition and injury of leukemia cell K562. *Chin J of Biochem Pharm*) 2012; 33(6): 736-9.
- 嵇江宁. 天然源抗肿瘤药物的研究现状. *科技资讯*(Ji Jiangning. Research status of natural source antitumor drugs. *Sci Tech Info*) 2010; 12: 228.
- Polacheck WJ, Zervantonakis IK, Kamm RD. Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(8): 1335-56.
- Zhang Q, Jiang K, Li Y, Gao D, Sun L, Zhang S, *et al.* Histidine-rich glycoprotein function in hepatocellular carcinoma depends

- on its N-glycosylation status, and it regulates cell proliferation by inhibiting Erk1/2 phosphorylation. *Oncotarget* 2015; 6(30): 30222-31.
- 17 Dixelius J, Olsson AK, Thulin A, Lee C, Johansson I, Claesson-Welsh L. Minimal active domain and mechanism of action of the angiogenesis inhibitor histidine-rich glycoprotein. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2089-97.
- 18 Ye B, Jiang LL, Xu HT, Ye B, Zhou DW, Li ZS. Expression of PI3K/AKT pathway in gastric cancer and its blockade suppresses tumor growth and metastasis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25(3): 627-36.
- 19 Guan X, Juarez JC, Qi X, Shipulina NV, Shaw DE, Morgan WT, *et al.* Histidine-proline rich glycoprotein (HPRG) binds and transduces anti-angiogenic signals through cell surface tropomyosin on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2004; 92(2): 403-12.
- 20 Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal* 2006; 18(12): 2262-71.