

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)凝溶胶蛋白基因的原核表达产物抗肿瘤活性的研究*

李 晔¹ 陈 蕾¹ 李 振¹ 苏秀榕¹ 周 君¹
李太武² 江锦坡²

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 凝溶胶蛋白(Gelsolin)作为一种重要的肌动蛋白调节蛋白,在机体的多种生理和病理活动中发挥重要作用。本文采用细胞 MTT 染色法, Hoechst33342/PI 荧光染色和流式细胞仪技术,对浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)的 gelsolin 基因的原核表达产物(r-gelsolin)进行了体外抗肿瘤活性的研究。结果表明, 30 μ g/ml 的 r-gelsolin 作用于胃低分化粘液腺癌 MGC803 细胞 24h 后,细胞的增殖抑制率达到最高,约为 34.53%。荧光染色显示, r-gelsolin 使 MGC803 细胞的正常形态发生改变,细胞核出现核固缩,破裂,产生凋亡小体等现象。进一步通过流式细胞仪证实, r-gelsolin 可以阻滞 MGC803 细胞于 S、G₂ 期,影响细胞分裂的进程,并促使细胞发生凋亡。

关键词 浙江枝吻纽虫,凝溶胶蛋白,胃癌细胞,细胞凋亡

中图分类号 Q18

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*),属于纽形动物门(Nematinea)、异纽目(Heteronemertea)、纵沟虫科(Lineidae)、枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*),最早在浙江省东部奉化市沿海的虾塘中发现,因其独特的分支状的吻而得名(吕慈仙等, 2007; 王孟前等, 2010)。纽虫在进化系统中,处于扁形动物和环节动物之间,具有完全的消化系统、初级的闭管式循环系统以及纵贯全身的发达的肌肉壁。另外,纽虫具有受到刺激后吐出可再生的捕食器以及身体易断裂、再生等特点(Sundberg *et al*, 2007)。目前国内外关于纽虫的研究大多集中在新种的分类、形态解剖学、生理生化。然而,在分子水平上对其生理现象、运动及再生的研究较少。

Gelsolin 是在 1979 年由 Yin 和 Stossel 在兔肺巨噬细胞中发现的一种分泌型蛋白(Yin *et al*, 1979),是一种重要的肌动蛋白结合蛋白、细胞骨架的调控蛋白。在脊椎动物中存在胞浆型和血浆型 gelsolin。它

们是由不同转录起始位点转录形成的两种蛋白。通常,血浆型分子量比胞浆型大 3kDa。Gelsolin 可以对肌动蛋白丝产生聚合、解聚和剪切等作用,进一步参与到细胞运动、控制细胞程序性死亡等生命活动中(Yin *et al*, 1979)。肌动蛋白以游离球状肌动蛋白(G-actin)或纤维状肌动蛋白(F-actin)形式存在, Ca²⁺可以活化 gelsolin,使其构象发生改变,使得结合 actin 的位点暴露出来,进一步破坏肌动蛋白之间的非共价键连接,从而将肌动蛋白微丝切断,阻止细胞分裂(Chellaiah *et al*, 2000; McGough *et al*, 2003)。有研究表明,高等动物在严重创伤后血浆中 gelsolin 水平呈现显著而持续降低。这是因为机体在受到严重创伤后,大量肌动蛋白从破损细胞中释放入血,阻滞微循环、诱导促炎介质释放进而损伤器官系统功能,而血浆 gelsolin 通过对 actin 的聚合、解聚和剪切等调控作用,有力地缓冲其对机体潜在的伤害,起到积极的保护作用(Rothenbach *et al*, 2004; Lee *et al*, 2006)。此外,

* 国家自然科学基金项目, 31272637 号; 浙江省自然科学基金资助项目, Y3100480 号; 浙江省教育厅(理), Y200907951 号。

李 晔, E-mail: liye@nbu.edu.cn

通讯作者: 李太武, 教授, 博士生导师, E-mail: litaiwu@nbu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-21, 收修改稿日期: 2012-03-19

gelsolin 在肿瘤的发生过程中也起着重要的调节作用(孟宪敏等, 2004)。研究证明, gelsolin 具有明显的肿瘤抑制作用, 能够参与调节细胞周期(Chellaiah *et al.*, 2000)。癌细胞通过基因转染方法过表达 gelsolin 后, 可以抑制 CDK1/cyclin B1 复合体的形成, 使细胞周期停滞在 G2 期(Tanaka *et al.*, 1995)。另外, caspase-3 可以将 gelsolin 在 Asp352 和 Gly353 处切断, 断裂产生的 N 末端在没有 Ca^{2+} 的情况下就可以活化, 断裂 actin 微丝, 进一步导致细胞形态发生改变, 促进细胞凋亡(Kothakota *et al.*, 1997)。但 gelsolin 的抗肿瘤作用机制, 有待于进一步研究。在先前的研究中, 课题组克隆到了 1947bp 的 gelsolin 的 cDNA 序列, 它包含了一个 1107bp 的 ORF, 编码 369 个氨基酸, 分子量约为 42.714kDa, 含有三个典型的相似的凝溶胶蛋白功能域, 每个结构域分别包含了 Ca^{2+} 、actin、polyphosphoinositide 4, 5-bisphosphate, PIP2 结合位点(陈蕾等, 2011)。为了进一步揭示 gelsolin 的功能, 本文研究了该 gelsolin 基因原核表达产物的抗肿瘤的作用, 可以为与此相关的重大疾病的治疗与新药开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

凝溶胶蛋白基因的原核表达产物为实验室自制, 人胃癌细胞株 MGC803 购自中国典型培养物保藏中心(武汉)。MTT 均购自 Sigama 公司。Ni-NTA 购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 购自 Gibico 公司, Hoechst33342/PI 双染试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、DNA 含量检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.2 方法

根据本课题组已获得的浙江枝吻纽虫 gelsolin 的全长 cDNA 序列, 通过重组、表达、Ni-NTA Agarose 纯化后, Western blot 检测该蛋白即为 gelsolin(以下简称 r-gelsolin), 本实验就其抗肿瘤活性进行了研究。

1.2.1 MTT 检测细胞增殖 将人胃癌细胞株 MGC803 在含 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液(100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)、5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 恒温培养。r-gelsolin 用 RPMI1640 培养基稀释至终浓度分别为 0.3 μ g/ml、3 μ g/ml、30 μ g/ml, 用 0.22 μ m 无菌微孔过滤除菌, 4 $^{\circ}C$ 保存备用。采用对数生长期细胞接种于 96 孔板, 每孔加入含有 5×10^4 个/ml 细胞的 RPMI1640 细胞悬液 200 μ l, 12h 后待细胞贴壁后, 弃

去原培养液, 加入不同浓度的 r-gelsolin, 对照组为不含 r-gelsolin 的新鲜培养液, 每一组设置 6 个复孔, 继续平行培养 4h、8h、12h、24h、48h、72h, 倒掉含蛋白的培养基, 加入含 5mg/ml 的 MTT 的无血清培养基 20 μ l 继续孵育 4h, 弃上清, 加入 150 μ l DMSO 溶解结晶, 在 492nm 检测吸光值(Thermo MK3 酶标仪, USA), 计算并制作细胞的增殖抑制率曲线[增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光值} / \text{对照组吸光值}) \times 100\%$], 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.2 荧光染色观察细胞形态 取对数生长期细胞接种于 24 孔板, 每孔加入含有 5×10^4 个/ml 细胞的 RPMI1640 细胞悬液 450 μ l, 细胞贴壁后, 根据 1.2.1 的实验结果, 选取含最适浓度的 r-gelsolin 的培养液处理细胞, 对照组用不含重组蛋白的新鲜培养液处理细胞, 继续平行培养 12h, 细胞消化收集后, 将 $10^5 - 10^6$ 个细胞悬浮于 1ml 培养基中, 加入 10 μ l Hoechst 33342 染液, 混匀, 37 $^{\circ}C$ 孵育 15min, 4 $^{\circ}C$ 、1000r/min 离心 5min 弃去上清, 加入 1ml Buffer A 悬浮细胞, 加入 5 μ l PI 染液, 室温避光放置 15min 后混匀, 荧光倒置显微镜下检测细胞形态学变化, 对照组与实验组各随机观察 5 个视野进行比较。

1.2.3 FCM 检测细胞凋亡及细胞周期 将 MGC803 细胞以 5×10^4 个/ml 接种于 6 孔板内, 每孔 1.5ml, 细胞贴壁后, 根据 1.2.1 的实验结果, 选取含最适浓度的 r-gelsolin 的培养液处理细胞, 对照组用不含重组蛋白的新鲜培养液处理细胞, 继续平行培养 12h、24h 后消化收集细胞, PBS 洗涤细胞两次(2000r/min 离心 5min)收集 5×10^5 个/ml 细胞 2 份, 各 3 管。一份每管加入 500 μ l Binding Buffer 悬浮细胞后加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 室温、避光染色 15min, 流式细胞仪检测凋亡率; 一份每管加入 100 μ l RNase A 37 $^{\circ}C$ 水浴 30min, 再加入 400 μ l PI 染色混匀, 4 $^{\circ}C$ 避光 30min, 上机检测细胞周期。

2 结果

2.1 细胞增殖的抑制率

研究结果显示: 与对照组比较, r-gelsolin 对 MGC803 细胞的增殖有明显的抑制作用, 减缓了细胞的生长速度, 且随着重组蛋白浓度的增加和作用时间的延长, 其对细胞增殖的抑制作用明显增强。重组蛋白作用 24h、浓度为 0.3 μ g/ml 时对 MGC803 细胞的抑制率为 16.37%, 重组蛋白浓度为 3 μ g/ml 时, 对

MGC803 细胞的抑制率为 22.04%，重组蛋白浓度为 30 μ g/ml 对 MGC803 细胞的抑制率为 34.53%(图 1)。选取 r-gelsolin(30 μ g/ml)作用 12h、24h 后的 MGC803 细胞为进一步的研究对象。

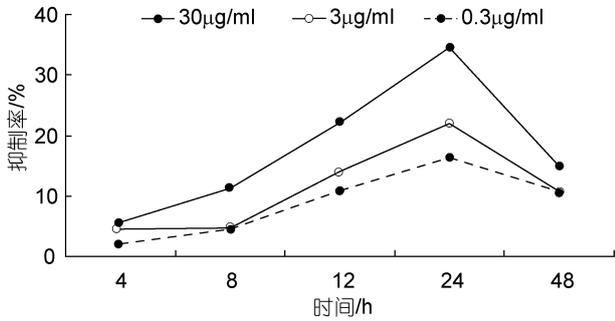


图 1 R-gelsolin 作用下的 MGC803 细胞生长抑制曲线
Fig.1 The growth inhibition curve of MGC803 cells treated by r-gelsolin

2.2 细胞形态学改变

在荧光倒置显微镜下观察发现，阴性对照组的细胞大小均一，成弥散均匀的淡蓝色弱荧光(图 2-1, 图 2-2, 图 2-3)。经 r-gelsolin(30 μ g/ml)作用 12h 后的 MGC803 细胞，细胞核出现核固缩、破裂，并可见强蓝色荧光，产生凋亡小体，细胞开始脱离生长面，并出现少量死亡细胞(图 2-4, 图 2-5, 图 2-6)。R-gelsolin 在一定程度上可减缓肿瘤细胞的生长速度，降低肿瘤细胞的集落形成能力。Hoechst33342/PI 荧光染色后的

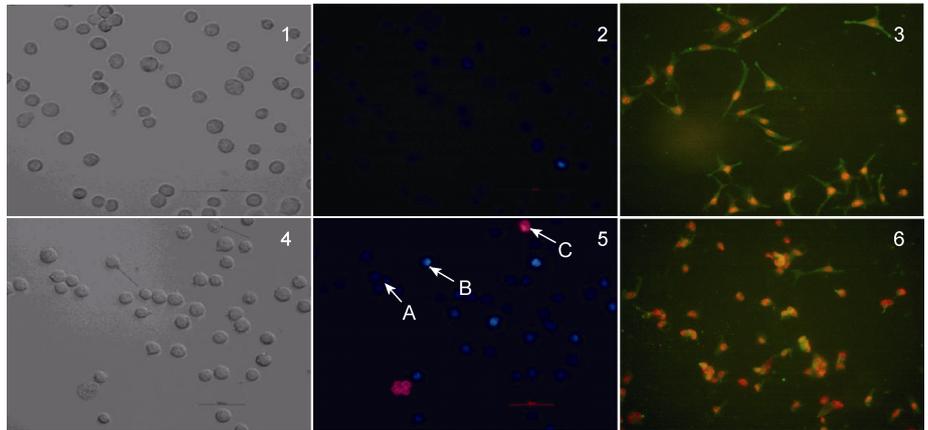


图 2 Hoechst33342/PI 荧光染色显示 r-gelsolin 对 MGC803 细胞形态的影响
Fig.2 Effects of r-gelsolin on the morphology of MGC803 cells stained by Hoechst33342/PI
注: 1: 对照组 MGC803 细胞(DIC), 2, 3: 对照组 MGC803 细胞(荧光), 4: 30 μ g/ml r-gelsolin 处理后的 MGC803 细胞(DIC), 5, 6: 30 μ g/ml r-gelsolin 处理后的 MGC803 细胞(荧光)。A. 浅蓝色为正常的细胞, B. 亮蓝色为早期凋亡的细胞, C. 红色为死亡的细胞

细胞，浅蓝色为正常的细胞(图 2-A)，亮蓝色为早期凋亡的细胞(图 2-B)、红色为死亡的细胞(图 2-C)。

2.3 R-gelsolin 对 MGC803 细胞凋亡、细胞周期的影响

R-gelsolin (30 μ g/ml)作用 MGC803 细胞 12h、24h 后, Annexin V-FITC/PI 双染后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 并通过 DNA 含量检测细胞周期变化。其中流式细胞仪检测细胞凋亡情况见图 3, 分析表明, 12h 后, 对照组的细胞凋亡率为 1.31%, 实验组的细胞凋亡率为 11.6%。24h 后, 对照组的细胞凋亡率为 2.19%, 实验组的细胞凋亡率为 6.66%。实验组与对照组相比细胞凋亡率显著增多, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1), 说明 r-gelsolin 可诱导 MGC803 细胞发生早期凋亡。

R-gelsolin (30 μ g/ml)对细胞周期分布的影响见

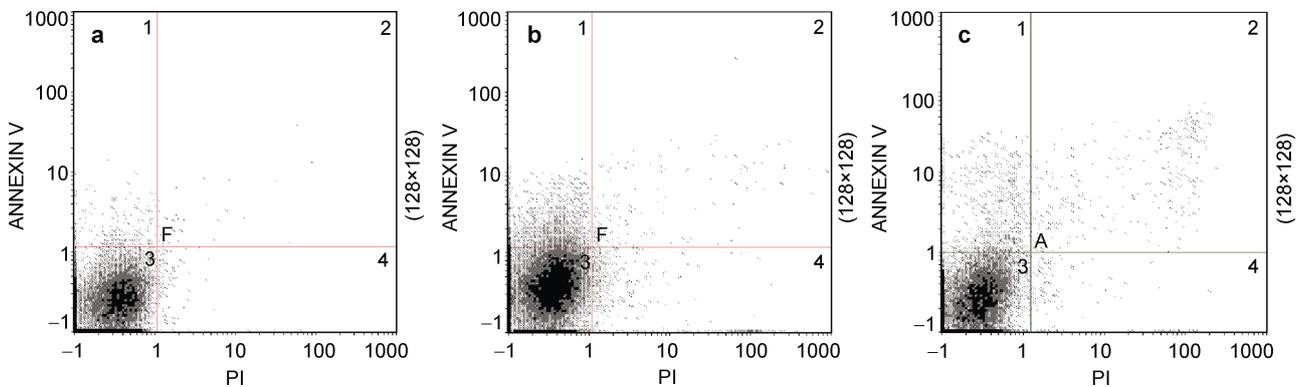


图 3 R-gelsolin 作用于 MGC803 细胞后的细胞凋亡情况
Fig.3 Effect of r-gelsolin on apoptosis of MGC803 cells
注: a: 对照组; b: R-gelsolin 处理 12h 后; c: R-gelsolin 处理 24h 后

表 1 R-gelsolin (30 μ g/ml)对 MGC803 细胞凋亡率的影响
Tab.1 The effects of r-gelsolin (30 μ g/ml) on apoptotic rates of MGC803 cells

组别	不同作用时间下的凋亡率(%)	
	12h	24h
对照组	1.31	2.19
R-gelsolin (30 μ g/ml)实验组	11.6**	6.66**

注: **表示差异极显著($P<0.01$)

表 2。重组蛋白作用 12h 后, DNA 含量检测 G1 期细胞比例减少, 与未受重组蛋白作用的对照组相比有显著差异($P<0.05$), S 期细胞则呈显著增加($P<0.05$), 而 G2 期细胞的比例与对照组比较没有显著变化($P>0.05$)。作用 24h 后, 重组蛋白对 MGC803 细胞周分布的影响与上述相似, 即 G1 期细胞比例减少, S 期细胞比例增加, 而 G2 期细胞比例没有显著变化。结果表明 r-gelsolin 可以阻滞 MGC803 细胞于 S、G2 期, 从而对 MGC803 细胞的细胞周期分布产生了影响。

3 讨论

纽虫因其独特的身体自发断裂现象及再生能力, 一直颇受研究者关注, 近些年利用分子生物学手段研究纽虫的相关特性的报道也越来越多(Rogers *et al.*, 1995; Struek *et al.*, 2008)。gelsolin 是一种肌动蛋白结合蛋白, 广泛分布于低等真核生物到高等哺乳动物中, 其活性受到 Ca^{2+} 浓度、细胞内 pH、磷酸磷脂酰肌醇和酪氨酸磷酸化等因素的影响(陈琦等, 2010)。 Ca^{2+} 可以使 gelsolin 活化, 使其与肌动蛋白(actin)相互作用, 调节其解聚、聚合、剪切肌动蛋白丝等, 从而使其与细胞的运动性、形状、生长以及凋亡等特性联系起来, 在多种生理和病理环境中发挥重要的作用(韩晓曦等, 2007; Lee *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2008)。细胞骨架 actin 微丝结构的破坏是肿瘤细胞的 1 个重要特征之一, gelsolin 可以在 Ca^{2+} 作用下诱导肌动蛋白细胞的骨架降解, 并参与调节肿瘤的发生过

程(Chellaiah *et al.*, 2000)。研究表明 gelsolin 在多种肿瘤中表达明显降低, 包括乳腺癌细胞、肺癌细胞、肠癌细胞、膀胱癌细胞以及前列腺癌细胞等, 并证实 gelsolin 表达减弱与肿瘤的恶性分化相关(Silacci *et al.*, 2004; Noske *et al.*, 2005)。也有研究认为, gelsolin 的高表达使癌细胞的转移率和浸润能力提高, 加速肿瘤转移。本实验选择了胃低分化粘液腺癌 MGC803 细胞, 是一种低分化的腺癌, 恶性程度较高, 早期即可浸润和转移。研究将有活性的 r-gelsolin 导入到 MGC803 细胞中, 通过 Hoechst33342/PI 荧光染色法观察 r-gelsolin 对 MGC803 细胞形态变化的影响。结果显示, MGC803 细胞的骨架发生降解, 细胞核出现核固缩, 破裂, 产生凋亡小体, 证明了 r-gelsolin 可以在一定程度上促进 MGC803 细胞的早期凋亡。MTT 染色表明 30 μ g/ml 的 r-gelsolin 作用于 MGC803 细胞 24h 后的细胞的增殖抑制率达到最高约为 34.53%, 同时, 通过流式细胞仪技术, 也观察到 r-gelsolin 可诱导 MGC803 细胞发生早期凋亡。其中该重组蛋白作用 12h 后, G1 期细胞比例减少, S、G2 期细胞增加, 推测其通过与 actin 相互作用影响细胞骨架的构建从而阻碍了细胞正常有丝分裂的进程, 抑制了肿瘤细胞的快速增殖。对于 gelsolin 促进细胞凋亡的作用机制也存在争议, 有些学者认为 gelsolin 是 caspase-3 的底物, caspase-3 可以将 gelsolin 在 Asp352 和 Gly353 处切断, 断裂产生的 N 末端在没有 Ca^{2+} 的情况就可以活化, 起到断裂 actin 微丝的作用, 导致细胞形态发生改变, 促进细胞凋亡(Kothakota *et al.*, 1997)。也有研究表明, 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)在细胞凋亡过程中可导致 DNA 水解, 胞质肌动蛋白与 DNase I 结合后, 能抑制其活性 gelsolin N 端片段能够破坏肌动蛋白和 DNase I 的相互作用, 使 DNase I 活化, 从而有可能促进细胞凋亡的发生(Chhabra *et al.*, 2005), 这些都有待进一步研究。本文对 gelsolin 抗肿瘤功能的研究将有助于进一步研究其作用机制, 为寻找到相关疾病治

表 2 R-gelsolin (30 μ g/ml)对 MGC803 细胞周期分布的影响
Tab.2 The effects of r-gelsolin (30 μ g/ml) on cell cycles of MGC803 cells

组别	不同作用时间	G0/G1 期(%)	S 期(%)	G2/M 期(%)
对照组	12h	52.1	36.9	11.1
R-gelsolin (30 μ g/ml)实验组		40.3*	45.7*	14.0
对照组	24h	66.6	26.7	6.7
R-gelsolin (30 μ g/ml)实验组		56.9*	33.6*	9.5

注: * 表示差异显著($P<0.05$)

疗的作用靶点, 以及与此相关的重大疾病的治疗与新药开发提供理论依据。

参 考 文 献

- 王孟前, 李太武, 江锦坡等, 2010. 浙江沿海一新纽虫的 18S rDNA 序列研究. 科技通报, 26(1): 67—71
- 吕慈仙, 李太武, 江锦坡, 2008. 浙江沿海最新发现一种枝吻类纽虫. 水产科学, 27(12): 652—654
- 陈琦, 姚咏明, 2010. 凝溶胶蛋白结构和功能研究新进展. 中国病理生理杂志, 26(7): 1433—1439
- 陈蕾, 李晔, 苏秀榕等, 2011. 浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)凝溶胶蛋白和肌动蛋白基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 42(2): 1—8
- 孟宪敏, 曹慧青, 王震等, 2004. Nelin 的肌动蛋白结合特性及其相互作用蛋白质的筛选. 科学通报, 49(21): 2173—2177
- 韩晓曦, 王继红, 李庆伟, 2007. 凝溶胶蛋白的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 23(5): 331—337
- Chauhan Ved, Ji Lina, Chauhan Abha, 2008. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role gelsolin in Alzheimer's disease. Biogerontology, 9(6): 381—389
- Chellaiah M, Kizer N, Silva M, 2000. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. Journal of Cell Biology, 148(4): 665—678
- Chhabra D, Nosworthy N J, Remedios C G, 2005. The Nterminal fragment of gelsolin inhibits the interaction of DNase with isolated actin, but not with the cofilin actin complex. Proteomics, 5(12): 3131—3136
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, 1997. Caspase-3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science, 278(5336): 294—298
- Lee P S, Drager L R R N, Stossel T P, 2006. Relationship of Plasma Gelsolin Levels to Outcomes in Critically Surgical Patients. Annals of Surgery, 243: 399—403
- McGough A M, Staiger C J, Min J K, 2003. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. FEBS Letters, 552(223): 75—81
- Noske A, Denkert C, Schober H, 2005. Loss of gelsolin expression in human ovarian carcinomas. European Journal of Cancer, 41(3): 461—469
- Rogers A D, Thorpe J P, Gibson R, 1995. Genetic evidence for the occurrence of acryptic species with the littoral nemerteans *Lineus ruber* and *L. viridis* (Nemertea: Anopla). Mar Biol, 122: 305—316
- Rothenbach P A, Da M B, Schwartz J J, 2004. Recombinant plasma gelsolin infusion attenuates buminduced pulmonary microvascular dysfunction. European Journal of Applied Physiology, 96(1): 25—31
- Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. Cellular and Molecular Life Sciences, 61: 2614—2623
- Struek T H, Fisse F, 2008. Phylogenetic Position of Nemertea derived from phylogenomic data. Mol Biol Evol, 25: 728—736
- Sundberg P, Strand M, 2007. Annuloneurtes (phylum Nemertea): when segments do not count. Biology Letters, 3: 570—573
- Tanaka M, Mullauer L, Ogiso Y, 1995. Gelsolin: a candidate for suppressor of human bladder cancer. Cancer Research, 55(15): 3228
- Yin H L, Stossel T P, 1979. Control of cytoplasmic actin gelsolin transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein. Nature, 281(5732): 583—586

THE ANTI-TUMOR ACTIVITIES OF PROKARYOTIC RECOMBINANT EXPRESSION PRODUCT OF GELSOLIN GENE FROM *DENDRORHYNCHUS ZHEJIANGENSIS*

LI Ye¹, CHEN Lei¹, LI Zhen¹, SU Xiu-Rong¹, ZHOU Jun¹,
LI Tai-Wu², JIANG Jin-Po²

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City Collage of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract Gelsolin is an important actin binding protein and involved in many cellular processes. In this work, anti-tumor activities of the prokaryotic recombinant expression product of gelsolin gene from *Dendrorhynchus zhejiangensis* were assessed employing the MTT assay, Hoechst33342/PI staining and a flow cytometric analysis. The results showed that the growth inhibition rate of MGC803 cells was reached to 34.53% when the cells were treated by 30 μ g/ml r-gelsolin for 24h. Effects of r-gelsolin on the morphology of MGC803 cells were observed by Hoechst33342/PI staining. The cell nuclei showed pyknosis, rupture, and apoptotic bodies appeared. Furthermore, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometer, compared with the control group, the results showed that r-gelsolin could arrest the cells in S/G2 phase, inhibit the proliferation of cells, and induce their apoptosis.

Key words *Dendrorhynchus zhejiangensis*, Gelsolin, Gastric cancer cells, Cell apoptosis