



## 重组海葵溶细胞素对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和表型改变是动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄的主要病理基础[1]。海葵属于腔肠动物门珊瑚纲,它的触手及身体富含多肽类毒素和蛋白毒素,在受到机械或化学刺激时,会释放毒素以抵御敌害及捕捉食物[2]。海葵溶细胞素(sea anemone cytolyisin, SAC)是其中一类重要的毒素,具有多种生物学活性,如溶血性、细胞毒性、心脏刺激活性、使膜去极化、阻断钾离子通道等[3]。本研究观察了重组海葵溶细胞素(Sagartia rosea cytolyisin, Src)对离体大鼠VCMC增殖的影响,旨在为治疗以VCMC增殖为主的心血管疾病筛选新的药物先导物。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶均购自美国Hyclone公司。一次性细胞培养瓶、96孔板购自美国Corning公司。所获得的重组海葵溶细胞素来源于南海玫瑰红绿海葵(Sagartia rosea)触手毒腺,南海玫瑰红绿海葵采自广东省湛江南海海域。通过对南海玫瑰红绿海葵毒素cDNA文库克隆的大规模序列测定,序列测定方法为随机挑选文库克隆,按OMEGA BIOTEK Plasmid Miniprep盒的方法提取质粒。使用ABI PRISM 377 DNA分析仪(Applied Biosystems),采用T7和SP6通用引物为测序引物,进行正反向序列测定,对cDNA片段超过1 000 bp的序列,根据已测得的序列设计引物,继续测通cDNA。测序工作由中山大学生命科学学院中心实验室完成。序列分析采用Altschul等[4]描述的方法进行。获得了一个编码Src的cDNA克隆。在大肠杆菌BL21(DE3)中对其进行表达、纯化,获得重组Src蛋白,共有178个氨基酸,相对分子质量为196 000,纯度>95%。实验用的重组Src系将Src冻干粉剂用含0.5% FBS的PBS溶解后重新配制,而后用含5% FBS的DMEM培养液稀释至所需的终浓度。

#### 1.2 VCMC的原代培养

参考王道生[5]贴块法进行。选用6周龄雄性SD大鼠(第一军医大学实验动物中心提供)断头处死,取胸主动脉中膜以贴块法培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养,1周后可见细胞从组织块边缘爬出,2~3周出现致密细胞层,细胞呈典型的“峰与谷”样生长,此时即可传代,细胞经抗 $\alpha$ -肌动蛋白抗体鉴定为VCMC。实验所用的VCMC均为第3~6代传代细胞。

#### 1.3 细胞增殖评价

SD大鼠VCMC用0.25%胰酶消化,然后在96孔板中以5 000个细胞/孔的密度铺板。24 h后,换成无血清、含谷氨酸的DMEM培养基,维持48 h以获得同步的细胞生长停止,而后,换成无血清的DMEM培养基及相应的实验试剂,每组实验重复6次,每1组每次为8个孔,对照组为含5% FBS的DMEM培养基,1 h后细胞的增殖率通过应用Cell Titer 96 Assay MTS/PES试剂盒(Promega Co. USA, Cat G5421)确定。具体方法是MTS/PES 20  $\mu$ l加入相应的孔中,96孔板在5% CO<sub>2</sub>、37℃孵箱中孵育90 min,在Bio-Rad 550型Microplate reader以490 nm波长测量吸光度,每孔重复3次,细胞的增殖率用吸光度来表达。

## 2 结果

VCMC生长停止后,以终浓度分别100  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\text{ng/ml}$ 、10  $\text{ng/ml}$ 和1  $\text{ng/ml}$ 的Src与5 000个细胞/孔的VSMC共同孵育1 h,结果发现,100  $\text{ng/ml}$ 及以上浓度的Src均可显著抑制大鼠VSMC的增殖( $P<0.05$ ),并呈现剂量依赖性( $P<0.05$ )。而10  $\text{ng/ml}$ 和1  $\text{ng/ml}$ 的Src对VSMC的增殖则无影响(表1)

表1 海葵溶细胞素对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Effects of recombinant sea anemone cytotoxin on rat vascular smooth muscle cell proliferation ( $n=6, \text{Mean}\pm\text{SD}$ )

Group	Cell proliferation ratio ( $D_{490}$ )
Control	0.802 $\pm$ 0.055
rSAC 100 $\mu\text{g/ml}$	0.115 $\pm$ 0.014*
10 $\mu\text{g/ml}$	0.213 $\pm$ 0.016*
1 $\mu\text{g/ml}$	0.335 $\pm$ 0.097*
100 $\text{ng/ml}$	0.663 $\pm$ 0.060*
10 $\text{ng/ml}$	0.678 $\pm$ 0.129
1 $\text{ng/ml}$	0.738 $\pm$ 0.072

\* $P<0.05$  vs control group

## 3 讨论

目前,已经在多种海葵中发现了海葵溶细胞素,Kem建议将这类毒素命名为Actinoporins[6],该类毒素具有以下特点:(1)序列同源性高,没有半胱氨酸,能插入细胞膜并以三聚体或四聚体形成离子选择性膜孔;生理活性相近,在溶液中以可溶性单体存在;(2)相对分子质量在20 000左右,等电点多在9.0以上。本研究从玫瑰红绿海葵(*Sagartia rosea*)的触手中提取总RNA并建立cDNA文库,发现了一种新的海葵溶细胞素基因,编码一种酸性海葵溶细胞素,经Blast分析发现其与Anderluh[1]等报道的海葵毒素Equinatixin II (Eq<sub>t</sub> II)有75%的序列同源性,相对分子质量为196 000,等电点为4.8。

本研究的初步结果表明,应用100  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 和100  $\text{ng/ml}$ 的重组Src分别可以明显抑制大鼠VSMC的增殖( $P<0.05$ ),并呈现剂量依赖性( $P<0.05$ ),而应用10  $\text{ng/ml}$ 和1  $\text{ng/ml}$ 的Src对VSMC的增殖则无影响,说明重组Src在较低的剂量下仍具有抗大鼠VSMC增殖的作用。目前,其抗增殖作用的具体机制尚不清楚。

Batista[8]等发现Eq<sub>t</sub> II具有细胞毒性,即使Eq<sub>t</sub> II浓度小于0.1 nmol也可以引起中国苍鼠肺纤维瘤细胞V-79-379A超微结构的改变:细胞变得扁平,失去微绒毛,表面囊泡化,线粒体膨胀,高尔基体囊泡亦增多。Pederzolli[9]利用Eq<sub>t</sub> II的细胞毒性进行了抗肿瘤细胞研究,他们将Eq<sub>t</sub> II与转铁蛋白相连,研究这

种结合体对携有转铁蛋白受体的细胞的作用, 结果表明这种结合体可以有效地杀伤肿瘤细胞。

目前尚不清楚海葵溶细胞素只是与细胞膜上的磷脂结合呢? 还是需要通过受体或是通过其他作用机制来完成。Zorec [10] 等报告了海葵溶细胞素可引发细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加, 导致细胞发生多种变化, 但毒素的使用剂量不同, 引起的细胞反应也不同, 可影响到细胞的增殖、引起细胞坏死或细胞凋亡。毒素在低剂量时表现出的药理活性可能与细胞膜上的特定受体有关, 与受体的作用影响到相应的信号传导途径, 目前已发现海葵溶细胞素都具有保守的精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸结构[11], 但其确切作用还需进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, 利用基因工程获得的重组海葵溶细胞素Src 在较低的剂量下对离体大鼠胸主动脉VSMC增殖有明显的抑制作用, 因此, 可将其作为降低血管损伤后新生内膜增殖的一种药物先导物进行深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-41.
- [2] 宋杰军, 毛庆武. 海洋生物毒素学[M]. 北京科学技术出版社, 1996. 445-50.
- [3] Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones(Actiniaria)[J]. FEMS Microbiol Immunol, 1992, 5(1-3): 121-9.
- [4] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA. Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-402.
- [5] 王道生. 动脉平滑肌细胞培养方法[A]. 见: 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 353-8.
- [6] Kem W R. Sea anemone toxins: structure and action[A]. In: Hessinger DA, Lenhoff HM. The biology of nematocysts[M]. San Diego: Academic Press, 1988. 375-405.
- [7] Anderluh G, Pungercar J, Strukelj B, et al. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 220(2): 437-42.
- [8] Batista U, Jezernik K. Morphological changes of V-79 cells after equinatoxin II treatment[J]. Cell Biol Int Rep, 1992, 16(2): 115-23.
- [9] Pederzolli C, Belmonte G, Dalla-Serra M, et al. Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin II, a cytolytic toxin from a sea anemone[J]. Bioconjug Chem, 1995, 6 (2): 166 -73.
- [10] Zorec R, Tester M, Macek P, et al. Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone Actinia equina involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity[J]. J Membr Biol, 1990, 118 (3): 243-9.
- [11] Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)[J]. Toxicon, 2002, 40 (2): 111-24.

#### 参考文献:

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-41.
- [2] 宋杰军, 毛庆武. 海洋生物毒素学[M]. 北京科学技术出版社, 1996. 445-50.
- [3] Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones(Actiniaria)[J]. FEMS Microbiol Immunol, 1992, 5(1-3): 121-9.
- [4] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA. Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-402.
- [5] 王道生. 动脉平滑肌细胞培养方法[A]. 见: 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 353-8.

- [6] Kem W R. Sea anemone toxins: structure and action[A]. In: Hessinger DA, Lenhoff HM. The biology of nematocysts[M]. San Diego: Academic Press, 1988. 375-405.
- Anderluh G, Pungercar J, Strukelj B, et al. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 220(2): 437-42.
- [8] Batista U, Jezernik K. Morphological changes of V-79 cells after equinatoxin II treatment[J]. Cell Biol Int Rep, 1992, 16(2): 115-23.
- [9] Pederzolli C, Belmonte G, Dalla-Serra M, et al. Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin II, a cytolysin from a sea anemone[J]. Bioconjug Chem, 1995, 6 (2): 166 -73.
- [10] Zorec R, Tester M, Macek P, et al. Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity[J]. J Membr Biol, 1990, 118 (3): 243-9.
- [11] Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)[J]. Toxicon, 2002, 40 (2): 111-24.
- 

[回结果列表](#)