

重组海葵溶细胞素及平颀海蛇磷脂酶 A₂ 对血管外膜成纤维细胞增殖的影响

欧阳平¹ 袁孝玉² 袁扬文利² 袁文岩¹ 袁徐安龙² 渊第一军医大学南方医院心血管内科袁广东 广州 510515 曰中山大学生命科学学院国家高技术计划海洋生物功能基因组开放实验室袁广东 广州 510275 冤

摘要目的 观察重组海葵溶细胞素 rSrc 及平颀海蛇磷脂酶 A₂ rPLA₂ 对成纤维细胞增殖的影响遥 方法 体外培养成纤维细胞袁应用不同浓度的 rSrc 和 rPLA₂ 分别进行作用并设立对照进行比较袁采用非放射性的 MTS/PES 法确定成纤维细胞的增殖状态遥 结果 各组细胞增殖率分别为院对照组 0.840 依 0.061 尧 rSrc 100 滋/ml 组 0.263 依 0.044 尧 rSrc 10 滋/ml 组 0.418 依 0.054 尧 rSrc 1 滋/ml 组 0.605 依 0.063 尧 rSrc 100 ng/ml 组 0.772 依 0.054 尧 rSrc 10 ng/ml 组 0.906 依 0.072 尧 rPLA₂ 100 滋/ml 组 0.498 依 0.076 尧 rPLA₂ 10 滋/ml 组 0.937 依 0.112 尧 rPLA₂ 1 滋/ml 组 0.978 依 0.145 遥 统计分析显示袁低至 1 滋/ml 的 rSrc 仍能明显抑制大鼠成纤维细胞的增殖渊<0.01 冤袁并呈现剂量依赖性渊<0.05 冤遥 rPLA₂ 100 滋/ml 组与对照组相比细胞增殖率有显著差异渊<0.05 冤曰 rPLA₂ 10 滋/ml 和 rPLA₂ 1 滋/ml 组与对照组相比均无显著差异渊>0.05 冤遥 结论 rSrc 和 rPLA₂ 分别对血管外膜成纤维细胞增殖有一定的抑制作用遥

关键词 成纤维细胞 重组海葵溶细胞素 重组磷脂酶 A₂ 细胞增殖

中图分类号 329.2 文献标识码 B 文章编号 1000-2588(2004)02-0158-03

Effects of recombinant Sagartia rosea cytolysin and Lapemis hardwickii phospholipase A₂ on adventitial fibroblasts proliferation

OUYANG Ping¹, JIANG Xiao-yu², YANG Wen-li², LAI Wen-yan¹, XU An-long²

¹Department of Cardiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²State Open Laboratory for Marine Functional Genomics, School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To observe the effects of recombinant Sagartia rosea cytolysin (rSrc) and Lapemis hardwickii phospholipase A₂(rPLA₂) on adventitial fibroblasts proliferation. Methods NIH-3T3 cells were cultured and treated with rSrc and rPLA₂ at different concentrations for observation of cell proliferation using non-radioactive MTS/PES assay in comparison with the control group. Results The ratio of cell proliferation was 0.840 依 0.061 in the control group, and was 0.263 依 0.044, 0.418 依 0.054, 0.605 依 0.063, 0.772 依 0.054 and 0.906 依 0.072 in rSrc groups corresponding to rSrc concentrations of 100, 10, 1 滋/ml and 100, 10 ng/ml respectively. rSrc was found to significantly inhibit fibroblast proliferation in a dose-dependent manner when the concentration used was above 1 滋/ml (P<0.05), as compared with the control group (P<0.05). The ratio of cell proliferation was 0.498 依 0.076, 0.937 依 0.112 and 0.978 依 0.145 in rPLA₂ groups corresponding to rPLA₂ concentrations of 100, 10, 1 滋/ml respectively, indicating that rPLA₂ also significantly inhibited fibroblast proliferation at the concentration of 100 滋/ml (P<0.05). Conclusion rSrc and rPLA₂ can both significantly inhibit adventitial fibroblast proliferation.

Key words: fibroblast; recombinant Sagartia rosea cytolysin; recombinant phospholipase A₂; cell proliferation

组成动脉血管外膜的主要细胞要要成纤维细胞的激活尧向血管内膜迁移和增殖在血管阻塞性疾病渊动脉粥样硬化尧支架内再狭窄尧移植性血管病和血管搭桥术失败冤的发生发展中起重要作用遥海葵属于腔肠动物门珊瑚纲袁它的触手及身体富含多肽类毒素和蛋白毒素袁在受到机械或化学刺激时袁会释放毒素用于抵御敌害及捕捉食物遥海葵溶细胞素是其

中一类重要的毒素袁具有多种生物学活性袁如溶血性尧细胞毒性尧心脏刺激性尧使膜去极化尧阻断钾离子通道等遥磷脂酶 A₂渊phospholipase A₂袁PLA₂冤广泛存在于各种蛇毒中遥目前袁毒 PLA₂ 正在被开发成抗肿瘤的制剂遥本研究分别观察了重组平颀海蛇磷脂酶 A₂渊recombinant Lapemis hardwickii phospholipase A₂袁rPLA₂冤和重组海葵溶细胞素渊recombinant Sagartia rosea cytolysin袁rSrc冤对离体血管外膜成纤维细胞增殖的影响遥

收稿日期 2003-10-25

基金项目 国家 863 计划项目渊001AA628090冤 广州市科委科技攻关引导项目渊002z3-C7111冤

Supported by National 863 High-tech Development Project (2001AA628090) and the Foundation of Guangzhou Sci-tech Committee (2002z3-C7111)

作者简介 欧阳平渊1966-冤男袁医学博士袁生物化学博士后袁副教授袁电话 20-61647640 袁 e-mail: ypou@fimmu.com

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养基尧胎牛血清渊BS冤 25% 胰酶均购

自 Hyclone 公司袁一次性细胞培养瓶尧6 孔板购自 Corning 公司袁HEPES 为美国 Sigma 公司产品袁其他均为国产分析纯遥

1.2 实验方法

1.2.1 rSrc 的 cDNA 克隆与重组蛋白表达 所获得的 rSrc 来源于南海玫瑰红绿海葵触手毒腺袁南海玫瑰红绿海葵采自广东省湛江南海海域遥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袁序列测定方法为随机挑选文库克隆袁按 OMEGA BIOTEK Plasmid Miniprep Kit 的方法提取质粒遥使用 ABI PRISM 377 DNA Analyzer (Applied Biosystems)袁采用 T7 和 SP6 通用引物为测序引物袁进行正反向序列测定遥对 cDNA 片段超过 1 000 bp 的序列袁根据已测得的序列设计引物袁继续测定 cDNA 遥测序工作由中山大学生命科学学院中心实验室完成遥序列分析采用 Altschul 等^[10]描述方法进行遥获得了 1 个编码 rSrc 的 cDNA 克隆遥在大肠杆菌 BL21(DE3)中对其进行表达尧纯化袁获得 rSrc 蛋白^[11]袁其共有 178 个氨基酸袁相对分子质量为 19 600 袁纯度 >95% 遥实验用的 rSrc 系将 rSrc 冻干粉剂用含 0.5% FBS 的 PBS 溶解后重新配制袁而后用含 5% FBS 的 DMEM 培养液稀释至所需的终浓度遥

1.2.2 rPLA₂ 的 cDNA 克隆与重组蛋白表达 所获得的 rPLA₂ 来源于海蛇科平颏海蛇属的平颏海蛇袁采自广西省北海市遥通过对平颏海蛇毒素 cDNA 文库克隆的大规模序列测定袁获得 1 个编码平颏海蛇 PLA₂ 的 cDNA 克隆遥其具有典型蛇毒 PLA₂ 的一级结构特征袁分子内含有 14 个半胱氨酸袁形成 7 对二硫键^[12]遥在大肠杆菌 BL21(DE3)中对其进行表达尧纯化袁获得 rPLA₂ 蛋白遥实验用的 rPLA₂ 均用含 0.5% FBS 的 PBS 重新配制袁而后用含 5% FBS 的 DMEM 培养液稀释至所需的终浓度遥

1.2.3 细胞培养 NIH-3T3 细胞株购自 ATCC 渊American Type Culture Collection) 细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中袁置于 37 益尧5% CO₂ 孵箱中培养遥当细胞生长达到亚融合状态时收获细胞供实验所用遥

1.2.4 细胞增殖评价 NIH-3T3 细胞用 0.25% 胰酶消化袁计数袁然后在 96 孔板中以 5 000 个细胞 / 孔的密度铺板遥 24 h 后袁换成无血清尧含谷氨酸的 DMEM 培养基袁维持 48 h 以获得同步的细胞生长停止袁换成含 10% FBS 的 DMEM 培养基及相应的实验试剂遥每组实验重复 6 次袁每组每次为 8 个孔遥对照组为含 5% FBS 的 DMEM 培养基袁 1 h 和 24 h 细胞的增殖率通过应用 CellTiter 96 Assay MTS/PES 试剂盒 渊Promega Co.U.S.A) 测定遥具体方法是 MTS/PES 20 滋加入相应的孔中袁6 孔板在 5% CO₂ 尧37 益孵箱中孵育 90 min 袁在 Bio-Rad 550 型 Microplate reader

以 490 nm 波长测量 D 渊OD) 遥每孔重复 3 次袁细胞的增殖率用 D 渊OD) 表示遥

1.3 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件包袁采用 One way ANOVA 和 Games-Howell 检验分析遥

2 结果

NIH-3T3 细胞生长停止后袁以终浓度分别为 100 尧10 尧1 尧0.1 尧0.01 尧0.001 尧0.000 1 尧0 滋/ml 的 rPLA₂ 与 5 000 个细胞 / 孔的成纤维细胞共同孵育 24 h 袁反映各组细胞增殖的 D 渊OD) 结果及统计分析见表 1 遥结果表明袁应用 100 尧10 尧1 尧0.1 尧0.01 尧0.001 尧0.000 1 尧0 滋/ml rPLA₂ 组可以明显抑制成纤维细胞的增殖 渊P < 0.05) 袁而 rPLA₂ 低剂量 渊0.1 和 1 滋/ml) 组对成纤维细胞的增殖则无影响遥 NIH-3T3 细胞生长停止后袁以终浓度分别为 100 尧10 尧1 尧0.1 尧0.01 尧0.001 尧0.000 1 尧0 滋/ml 的 rSrc 与 5 000 个细胞 / 孔的成纤维细胞共同孵育 1 h 袁反映各组细胞增殖的 D 渊OD) 结果及统计分析见表 1 遥结果表明袁应用 100 尧10 尧1 尧0.1 尧0.01 尧0.001 尧0.000 1 尧0 滋/ml 的 rSrc 分别可以明显抑制成纤维细胞的增殖 渊P < 0.05) 袁并呈现剂量依赖性 渊P < 0.05) 袁而 100 尧10 尧1 尧0.1 尧0.01 尧0.001 尧0.000 1 尧0 滋/ml 的 rSrc 对成纤维细胞的增殖则无影响遥 锥虫蓝染色证实细胞处于存活状态遥

表 1 rSrc 及 rPLA₂ 对血管外膜成纤维细胞增殖的影响 渊n=6, \bar{x} 依 s)

Tab.1 Effect of rSrc and rPLA₂ on adventitial fibroblast proliferation (n=6, Mean 依 SD)

Group	Ratio of cell proliferation
Control	0.840 依 0.061
rSrc	
100 滋/ml	0.263 依 0.044*
10 滋/ml	0.418 依 0.054*
1 滋/ml	0.605 依 0.063*
100 ng/ml	0.772 依 0.054
10 ng/ml	0.906 依 0.072
rPLA ₂	
100 滋/ml	0.498 依 0.076*
10 滋/ml	0.937 依 0.112
1 滋/ml	0.978 依 0.145

*P < 0.05 vs control group or between rSrc different dose groups, respectively. rSrc: Recombinant Sagartia rosea cytolysin, rPLA₂: Recombinant Lapemis hardwickii phospholipase A₂

3 讨论

组成动脉血管外膜的主要细胞是成纤维细胞遥在血管损伤后袁位于血管外膜的成纤维细胞由静止尧凋亡状态转为活跃尧增殖状态袁并迁移至内膜下区域和新生内膜中并增殖遥 膜成纤维细胞迁移到新生内膜发生增殖的最高峰为损伤后 3 d 袁随后增殖指数进行性下降袁在第 28 天降至损伤前水平^[13]遥因此袁成纤维细胞的增殖

在血管阻塞性疾病的发生发展中扮演着重要角色。蛇毒 PLA₂ 除了酶活性外表还具有多种生理活性。不同来源的蛇毒 PLA₂ 所具有的生理活性各不相同。每种 PLA₂ 通常只有一种或少数几种生理活性。Menez 等^[9] 从 *Naja nigricollis* 中成功分离纯化出对 MCF7 细胞有抑制作用的天然 PLA₂。最近，响尾蛇毒 PLA₂ 已被开发成抗肿瘤的新药 VRCTC-310-Onco^[10]。我们前期的动物实验证明 PLA₂ 具有明显的抑制肿瘤细胞增殖及小鼠移植性肿瘤的作用。本研究结果表明应用 100 μg/ml 的 rPLA₂ 可以明显抑制成纤维细胞的增殖。而应用低剂量的 rPLA₂ 对成纤维细胞的增殖则无影响。说明 rPLA₂ 在一定的剂量下具有抑制成纤维细胞增殖的作用。

本实验室从玫瑰红绿海葵的触手中提取总 RNA 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。分析发现其与 Anderlueh 等^[11] 报道的海葵毒素 Equinatoxin 域有 75% 的序列同源性。其相对分子质量为 19 600，等电点为 4.8。本研究的初步结果表明应用 100 μg/ml 和 1 μg/ml 的 rSrc 可以明显抑制成纤维细胞的增殖。并呈现剂量依赖性。而应用 100 ng/ml 的 rSrc 对成纤维细胞的增殖则无影响。说明 rSrc 在较低的剂量下仍具有抗大鼠成纤维细胞增殖的作用。目前其抗增殖作用的具体机制尚不清楚。Batista 等^[12] 发现 Eqt 域具有细胞毒性。即使 Eqt 域浓度小于 0.1 nmol/L 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，同时线粒体膨胀，高尔基体囊泡亦增多。Pederzoli 等^[13] 利用 Eqt 域的细胞毒性进行了抗肿瘤细胞研究。他们将 Eqt 域与转铁蛋白相连。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。其作用机制还需进一步研究。Zorec 等^[14] 报告了海葵溶细胞素可引发细胞内 Ca²⁺ 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。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 RGD 结构。但其确切作用还需进一步研究。本研究所用的 rSrc 对成纤维细胞增殖作用的机制也有待进一步研究。

综上所述，本研究结果表明利用基因工程技术获得的 rPLA₂ 在一定剂量下对成纤维细胞增殖有明显的抑制作用。利用基因工程技术获得的 rSrc 在较低剂量下对成纤维细胞增殖有明显的抑制作用。并呈现剂量依赖性。因此可将上述两种物质作为降低血

管损伤后新生内膜增殖的一种活性物质开展进一步的研究。

参考文献

响哲 Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *响哲 Circ Res*, 2001, 89(12): 1111-21.

响哲 Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *响哲 Nat Med*, 2002, 8(11): 1249-56.

响哲 宋杰军, 毛庆武. 海洋生物毒素学. *响哲北京科学技术出版社*, 1996. 445-50.

响哲 Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones. *响哲Actinaria*. *响哲FEMS Microbiol Immunol*, 1992, 5 (1-3): 121-9.

响哲 Costa LA, Miles H, Araujo CE, et al. Tumor regression of advanced carcinomas following intra-and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. *响哲 Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1998, 20(1): 15-25.

响哲 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *响哲 Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-402.

响哲 Jiang XY, Yang WL, Chen HP, et al. Cloning and characterization of an acidic cytolysin cDNA from sea anemone *Sagartia rosea*. *响哲 Toxicon*, 2002, 40(11): 1563-9.

响哲 Yang WL, Peng LS, Zhong XF, et al. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A₂ from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. *响哲 Toxicon*, 2003, 41(6): 713-21.

响哲 Shi Y, Pieniek M, Fard A, et al. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *响哲Circulation*, 1996, 93(2): 340-8.

响哲 Costa LA, Fornari MC, Berardi VE, et al. In vivo effect of snake phospholipase A₂ (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1alpha, TNF-alpha and IL-1ra level in humans. *响哲 Immunol Lett*, 2001, 75(2): 137-41.

响哲 1 杨文利, 钟肖芬, 徐安龙, 等. 平须海蛇碱性磷脂酶 A₂ 的融合表达、纯化及活性特征. *响哲中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(4): 436-41.

响哲 2 Yang WL, Zhong XF, Xu AL, et al. Fusion expression, purification and activity characterization of alkaline phospholipase A₂ from *Lapemis hardwickii* gray. *响哲Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, 17(4): 436-41.

响哲 3 Anderlueh G, Pungercar J, Strukelj B, et al. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin. *响哲 Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220 (2): 437-42.

响哲 4 Batista U, Jezernik K. Morphological changes of V-79 cells after equinatoxin treatment. *响哲Cell Biol*, 1992, 16(2): 115-23.

响哲 5 Pederzoli 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. *响哲 Bioconjug Chem*, 1995, 6(2): 166-73.

响哲 6 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.

响哲 7 Anderlueh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *响哲Toxicon*, 2002, 40 (2): 111-24.