

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.04.003

文章编号: 1005-8982(2016)04-0011-07

论著

内皮抑素 30 肽对 HepG2 细胞黏附、侵袭能力影响的机制研究*

郭红艳, 刘秀财, 李淑艳

(齐齐哈尔医学院 生物化学教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 探讨 RGD 修饰的人内皮抑素 30 肽对 HepG2 细胞黏附、侵袭的影响及作用机制。**方法** 人工合成人内皮抑素 1~30 位氨基酸(30 肽, 序列 25~31 由 RGIRGAD 改为 RGDRGD)所对应的核苷酸序列, 连接到质粒 pTYB2 中, 再转化至大肠埃希菌 BL21(DE3)中表达, 同法合成人内皮抑素 1~27 位氨基酸构成的 27 肽作为对照。细胞黏附实验及 Transwell 实验分别检测 30 肽和 27 肽对 HepG2 细胞黏附能力和侵袭能力的影响, 同时筛选与侵袭作用相关的整合素; 免疫荧光检测 30 肽和 27 肽对 $\alpha v \beta 3$ 整合素的聚集作用, 流式细胞仪检测 30 肽和 27 肽对 HepG2 细胞表面相应整合素表达的影响; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western blot 检测 30 肽和 27 肽对 HepG2 细胞 TIMP1 和 TIMP2 mRNA 和蛋白质表达量的影响。**结果** 30 肽能明显抑制 HepG2 细胞黏附、侵袭, 对侵袭作用的影响与整合素 $\alpha v \beta 3$ 相关, 同时, 30 肽能上调 HepG2 细胞中 TIMP1 和 TIMP2 mRNA 及蛋白质的表达, 30 肽加 $\alpha v \beta 3$ 抗体后, 上述作用明显增强。**结论** 30 肽可能是通过整合素 $\alpha v \beta 3$ 发挥其抗肿瘤侵袭转移作用, 可以成为临床上肝癌的辅助化疗药物发挥作用。

关键词: 内皮抑素; RGD 序列; 侵袭; TIMP

中图分类号: R735

文献标识码: A

Endostatin 30 peptide inhibit the cell adhesion and invasion of HepG2 cells*

Hong-yan Guo, Xiu-cai Liu, Shu-yan Li

(Department of Biochemistry, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Objective To study the influence of human endostatin 30 peptide modified RGD on the cell adhesion and invasion of HepG2 cells and the mechanism. **Methods** The nucleotide sequence encoding amino acids 1-30 of endostatin (peptide 30, with amino acids 25-31 mutated from RGIRGAD to RGDRGD) was artificially synthesized and cloned into the plasmid pTYB2 and expressed in E. coli (DE3). Similarly, peptide 27, corresponding to amino acids 1-27 of endostatin, was produced as a control. The cell adhesion assay and transwell was used to inspect the influence of cell adhesion and invasion activity of HepG2 caused by 30 peptide and 27 peptide, respectively. Meanwhile, integrin associate with invasion was screened out; The aggregation of integrin $\alpha v \beta 3$ was detected using by immunofluorescence. The expression of integrin on the HepG2 cell surface was measured by flow cytometry in order to test the effect of 30 peptide and 27 peptide. The expression of mRNA and protein was tested by RT-PCR and Western blot, including TIMP1 and TIMP2. **Results** The cell adhesion and invasion of HepG2 was inhibited obviously by 30 peptide, and its influence of invasive effect on HepG2 associate with integrin $\alpha v \beta 3$. At the same time, the mRNA and protein expression of TIMP1 and TIMP2 were down-regulated by 30 peptide. Above function enhanced obviously after $\alpha v \beta 3$ antibody joined to 30 peptide. **Conclusions** 30 peptide can give full play to its anti-transference for tumor through integrin $\alpha v \beta 3$, 30 peptide may help chemotherapeutics to play their function of anti-hepatoma in the clinical treatment.

Keywords: Endostatin; RGD sequence; invasion; TIMP

收稿日期: 2015-10-11

* 基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目(No: 12511619); 齐齐哈尔医学院博士专项科研基金项目

[通信作者] 李淑艳, E-mail: lsy6910553@163.com, Tel: 0452-2663151

内皮抑素是 O'Reilly 等^[1]发现的一种内源性血管生成抑制剂,由胶原蛋白 XVIII 羧基端的 184 个氨基酸残基组成,研究发现其具有抑制肿瘤生长、改善肺纤维化等作用,且与其他多种疾病相关^[2-3],因此,内皮抑素日益受到研究者的关注和重视。

已有研究证实,内皮抑素活性区主要在 N 端的 1~27 个 Aa 上^[4],因此,本课题组构建并表达了人内皮抑素 1~30 位氨基酸(30 肽,序列 25~31 由 RGIRGAD 改为 RGDGRD)所对应的核苷酸序列,前期研究证明,30 肽具有更强的抑制肿瘤细胞增殖和转移的能力^[5],本文拟在前期工作的基础上,进一步研究 30 肽抑制肿瘤侵袭与转移的作用机制。本文以人 HepG2 细胞为实验材料,探讨经过 RGD 修饰的 30 肽通过与何种整合素特异性结合调节肿瘤转移相关基因的表达,进而影响肿瘤细胞的转移,为 30 肽用于临床治疗肿瘤提供理论指导和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI1640 细胞培养基(Gibco)、新生牛血清(PAA)、胰酶(DIFCO)购买于美国 Invitrogen 公司,人工基底膜 Matrigel(E1270)购买于美国 sigma 公司,antibody(anti- $\alpha 5$ 、anti- $\beta 1$ 、anti- $\beta 3$ 、anti- $\alpha v \beta 3$ 、anti-TIMP1、anti-TIMP2、anti β -actin)以及二抗购自美国 Santa Cruz 公司,Transwell 小室购自美国 Corning Costar 公司,RNA 提取试剂盒购于美国 Promega 公司,DRR019A 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;研究所用 30 肽和 27 肽是课题组分别从构建的 30 肽和 27 肽基因工程菌中提取纯化,并通过葡聚糖凝胶 G15 层析去除 DTT、Tricine-SDS-PAGE 鉴定。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2(本室保存)用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,5% 二氧化碳 CO₂ 的 37℃ 环境培养,细胞在 60%~70% 融合时进行相关实验。

1.3 实验方法

1.3.1 30 肽对 HepG2 细胞黏附能力的影响实验 实验参考文献^[6]的方法,设立对照组、27 肽组和 30 肽组。在 96 孔培养板孔中预先铺 2 μ g 人工基底膜(matrigel),加 2% BSA 20 μ l/孔,置于 22℃ 1h, PBS 冲洗。HepG2 细胞用 0、20、40、60、80 和 100 μ g/ml

的 27 肽和 30 肽预孵育 24 h, 5×10^4 个细胞/孔,置于 37℃ 90 min。用 PBS 冲洗掉未黏附的细胞,加入 MTT 20 μ l/孔,37℃ 孵育 4 h, 弃去 MTT, 加入 100 μ l/孔 DMSO, 用酶标仪在 570 nm 测定吸光度值,计算各组的相对黏附率,每组设 3 个平行对照,实验在不同时间进行 3 次。

1.3.2 30 肽对 HepG2 细胞侵袭能力的影响及相关整合素筛选实验 实验参考 Liu 等^[7]人的方法。在 Transwell 小室的内表面涂 5 μ g Matrigel,置于 37℃ 干燥后形成一个基质屏障层。设立对照组、27 肽处理和 30 肽处理组,其中对照组细胞未经肽处理,27 肽组和 30 肽组细胞分别经 45 μ g/ml 的 27 肽和 30 肽处理 24 h。用胰酶消化细胞后,将细胞悬液加到 Transwell 小室中,每小室 100 μ l,细胞数均为 1×10^5 个。在 24 孔培养板内加入含 20% FBS 的 RPMI1640 培养液,每孔 500 μ l。将小室浸于 24 孔板的条件培养基中,37℃,5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱内孵育 24 h。吸弃上室中的溶液,用棉签轻轻擦去小室内侧壁未转膜的细胞,用 0.1% 结晶紫染小室膜 20 min,晾干,在 100 倍显微镜下计数侵袭细胞数,拍照保存。每膜计数上下左右中 5 个不同视野的穿膜细胞数,计算平均值。同时,以单加 30 肽为对照,同时向 4 个小室中对应加入抗 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\alpha v \beta 3$ 整合素抗体(终浓度为 50 μ g/ml)。检测 30 肽分别加入 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\alpha v \beta 3$ 整合素抗体后对 HepG2 细胞侵袭能力的影响。每组设 3 个平行孔,不同时间进行 3 次。

1.3.3 流式细胞术分析 30 肽对细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素表达水平的影响 参考 Chen 等^[8]人的方法。设立对照组、27 肽组和 30 肽组。其中对照组细胞未经肽处理,27 肽组和 30 肽组细胞分别经 45 μ g/ml 的 27 肽和 30 肽处理 24 h, HepG2 细胞生长到融合状态后用 0.25% 胰酶消化,用 PBS 洗涤后制成单细胞悬液,与荧光标记的抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体一抗 37℃ 孵育 30 min,用 PBS 冲洗后,按 1×10^5 个细胞/管分装,与 FITC 标记的二抗在 37℃ 避光孵育 30 min,用 PBS 冲洗, FACSCalibur 流式细胞仪检测,实验在不同时间进行 3 次。

1.3.4 免疫荧光检测 30 肽对细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素聚集作用的影响 设立对照组、27 肽组和 30 肽组。取对数生长期 HepG2 细胞, 5×10^5 个细胞/孔接种 24 孔培养板,孵育 24 h, 给药组分别加入终浓

度为 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 27 肽和 30 肽,对照组加入相同体积 PBS,继续培养 24 h,PBS 冲洗 2 次,4%多聚甲醛固定 20 min,5%BSA 封闭 30 min,每孔加入 $\alpha\text{v}\beta 3$ 一抗,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内过夜,PBS 振荡 3 次,每孔加入 FITC 标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,PBS 冲洗 3 次,置于荧光显微镜下观察并拍照,实验在不同时间进行 3 次。

1.3.5 RT-PCR 检测 30 肽对 TIMP1 和 TIMP2 mRNA 表达的影响 用 RT-PCR 方法检测金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) 家族 TIMP1 和 TIMP2 mRNA 在 30 肽及 27 肽作用下的变化,终浓度为 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30

肽和 27 肽分别作用 HepG2 细胞 0、12、24 及 48 h 后,提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,PCR 引物序列见附表,PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,循环次数为 35 循环(β -actin 为 30 循环);扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外线下凝胶置于成像系统下进行拍照,记录。

另外分别用 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30 肽、45 $\mu\text{g/ml}$ 的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体和 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30 肽 +45 $\mu\text{g/ml}$ 的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体作用于 HepG2 细胞 24 h,后续处理同上,分别检测细胞中 TIMP1 和 TIMP2 mRNA,以上实验重复 3 次。

附表 引物序列、产物长度和退火温度

基因名称	引物序列	长度 /bp	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$
TIMP1	F:5'-CTTCCACAGGTCCCACAACC-3'; R:5'-CAGCCCTGGCTCCCGAGGC-3'	304	58
TIMP2	F:5'-GAGCACCACCCAGAAGAAGAG-3'; R:5'-CCAGGAAGGGATGTCAGAGC-3'	339	58
β -actin	F:5'-TCATGCCATCCTGCGTCTG-3'; R:5'-GCATCGGAACCGCTCAT-3'	256	50

1.3.6 Western blot 检测 30 肽对 TIMP1 和 TIMP2 表达的影响 用 Western blot 方法检测 TIMP1 和 TIMP2 蛋白在 30 肽及 27 肽作用下表达的变化。终浓度为 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30 肽和 27 肽分别作用 HepG2 细胞 0、12、24 及 48 h 后,分别收集细胞(800 rpm,5 min)提取蛋白,检测细胞总蛋白浓度。取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭液中室温封闭 2 h,加入相应稀释倍数的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后,加入 1:5 000 的 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,采用化学发光法(ECL)曝光胶片,冲洗显色检测相应的蛋白条带,GPS8000 型凝胶成像分析系统扫描分析蛋白条带。

另外设立 30 肽组、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体组和 30 肽 + $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体组,各组中分别用 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30 肽、45 $\mu\text{g/ml}$ 的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体和 45 $\mu\text{g/ml}$ 的 30 肽 +45 $\mu\text{g/ml}$ 的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体作用于 HepG2 细胞 24 h,后续处理同上,分别检测细胞中 TIMP1 和 TIMP2 蛋白,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据采用单因素方差分析,t 检验进行组间比较,实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

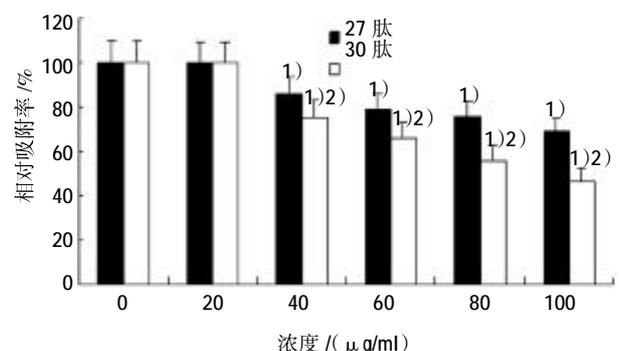
2 结果

2.1 30 肽对 HepG2 细胞黏附能力的抑制作用

与对照组及 27 肽组相比,30 肽组浓度在 40~100 $\mu\text{g/ml}$ 时,能显著抑制 HepG2 细胞的黏附($P < 0.05$)(见图 1)。

2.2 30 肽对 HepG2 细胞侵袭能力的抑制作用

体外侵袭实验检测 30 肽对细胞侵袭能力的影响,从图 2A、B 可见,3 组细胞的穿膜细胞数分别是(205.6 \pm 20.13)、(132.9 \pm 13.55)和(71.25 \pm 9.45),肽处理组的穿膜细胞数均低于对照组,30 肽组穿膜细胞数显著低于 27 肽组;30 肽加入 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 及 $\alpha\text{v}\beta 3$ 整合素抗体后,穿膜细胞数分别为(80 \pm



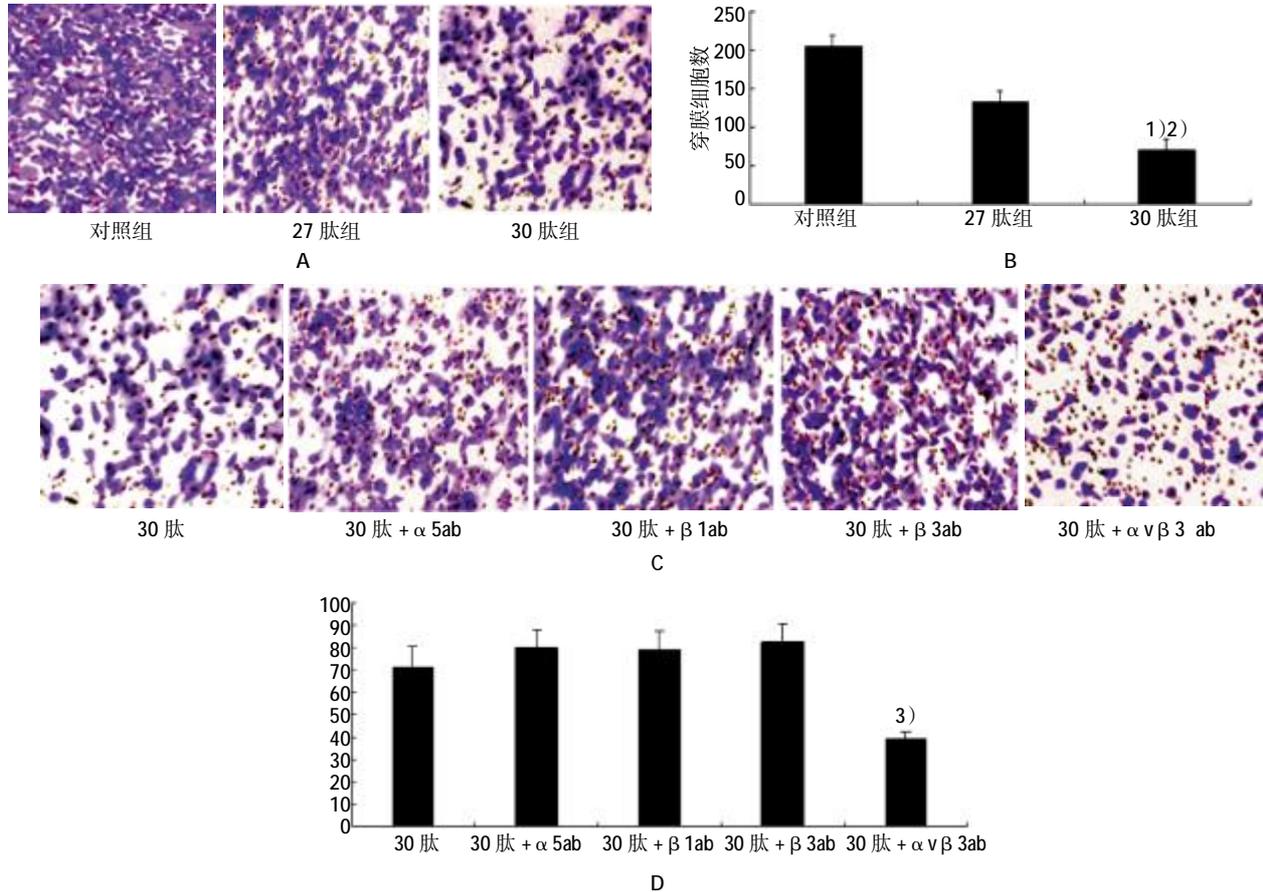
1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 27 肽组比较, $P < 0.05$

图 1 30 肽对 HepG2 细胞黏附能力的影响

8.02)、 (79.17 ± 8.12) 、 (82.5 ± 8.19) 和 (39.99 ± 4.35) 。可见只有加入 $\alpha v \beta 3$ 抗体后,30 肽对 HepG2 细胞的侵袭能力得到进一步抑制,其余抗体对 HepG2 细胞的侵袭能力无明显影响(见图 2C、D)。

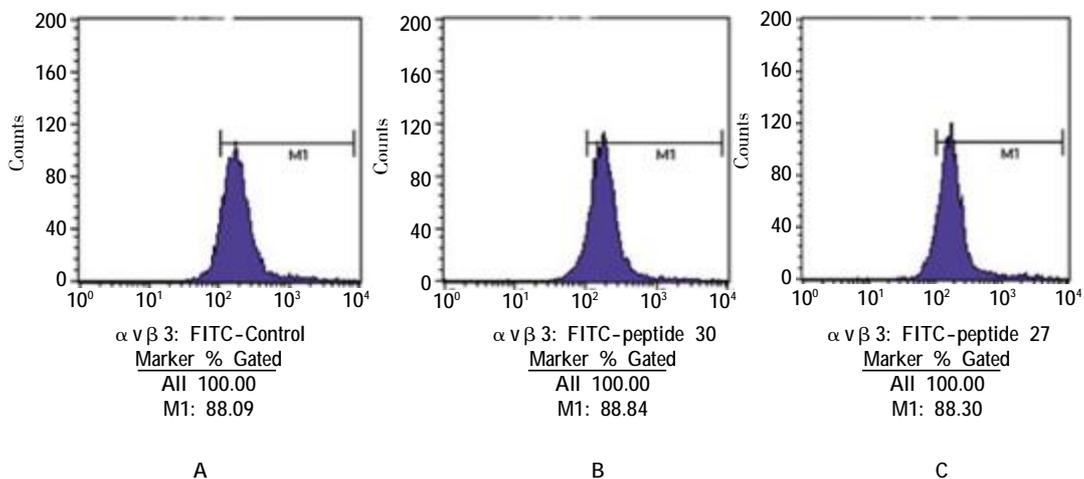
2.3 30 肽对细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素表达的影响

流式细胞仪检测结果显示:对照组、27 肽组和 30 肽组细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 表达量变化无统计学意义(见图 3)。



1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与 27 肽组比较, $P < 0.05$; 3)与 30 肽组比较, $P < 0.05$; A: 肽处理 HepG2 细胞 transwell 实验($\times 100$); B: 30 肽对 HepG2 细胞侵袭能力的影响; C: 30 肽 + 整合素处理 HepG2 细胞 transwell 实验($\times 100$); D: 30 肽 + 整合素对 HepG2 细胞侵袭能力的影响

图 2 30 肽对 HepG2 细胞侵袭能力的抑制作用

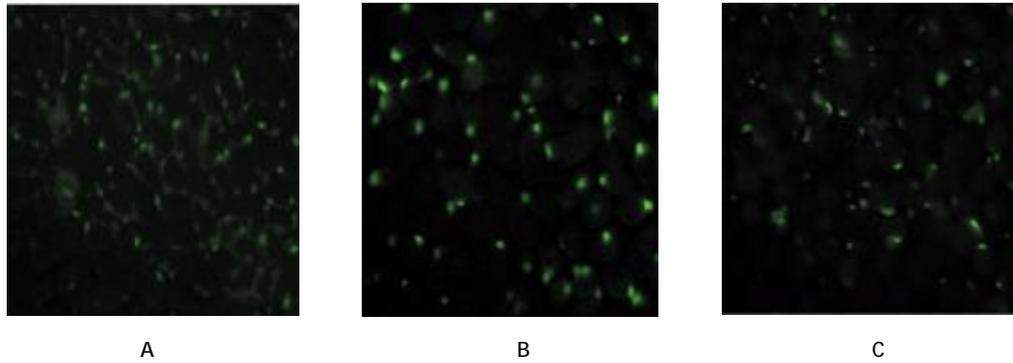


A: 对照组; B: 30 肽组; C: 27 肽组

图 3 流式细胞仪检测 30 肽对 HepG2 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素表达水平的影响

2.4 30 肽对 $\alpha v \beta 3$ 整合素的聚集作用

免疫荧光结果显示:与对照组及 27 肽组比较,30 肽处理组 HepG2 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 明显聚集成簇(见图 4)。

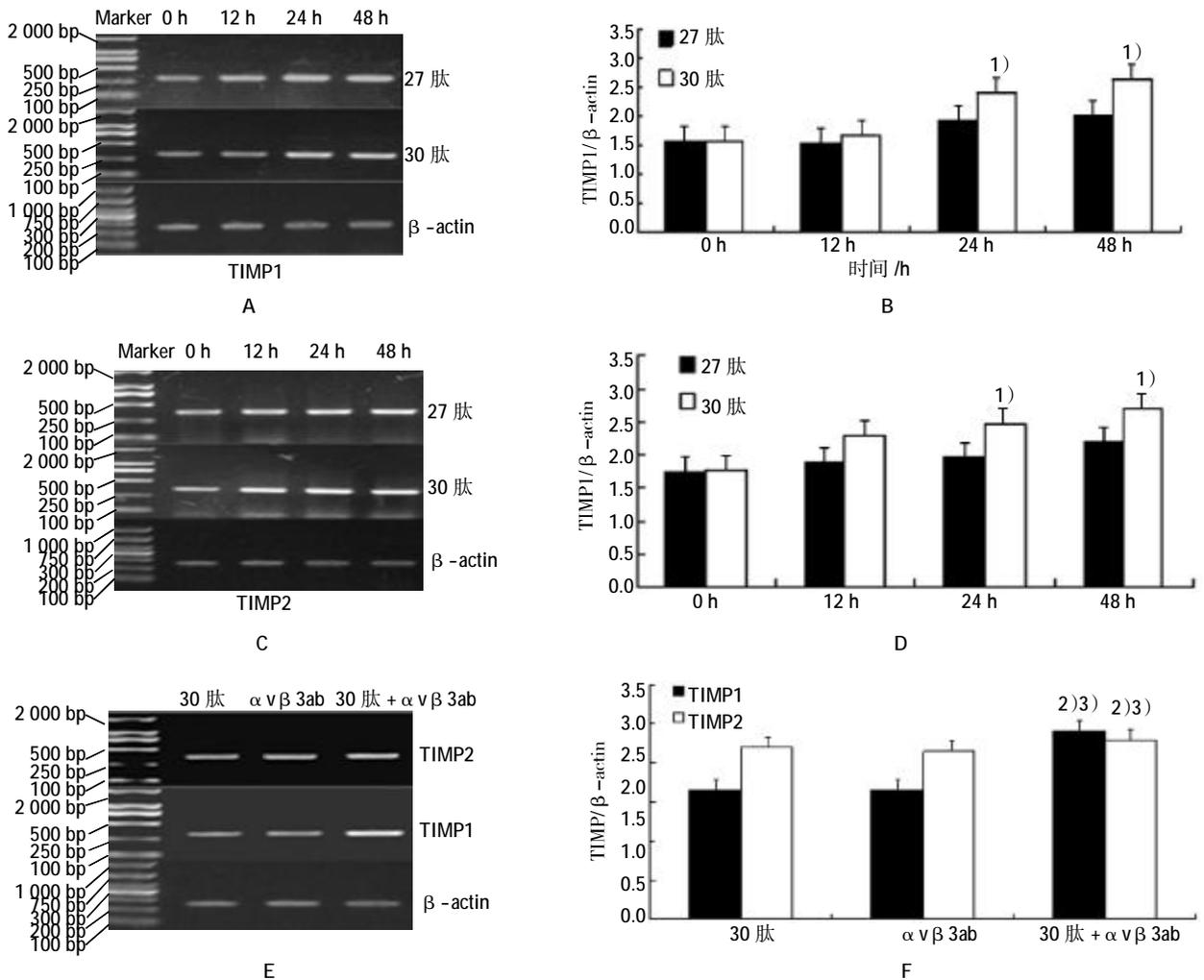


A:对照组;B:30 肽组;C:27 肽组

图 4 30 肽对 HepG2 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素的聚集作用($\times 400$)

2.5 RT-PCR 检测 *TIMP1* 和 *TIMP2* 基因的表达

如图 5A-D, *TIMP1* 和 *TIMP2* 的 mRNA 表达量随着 27 肽和 30 肽作用时间的延长而上调,30 肽处理组在 24 h 开始上调 *TIMP1* 和 *TIMP2* mRNA 的表



1)与 27 肽组比较, $P < 0.05$; 2)与 30 肽组比较, $P < 0.05$; 3)与 $\alpha v \beta 3$ 组比较, $P < 0.05$; A: RT-PCR 检测肽处理 HepG2 细胞 *TIMP1* mRNA; B: 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP1* mRNA 表达影响; C: RT-PCR 检测肽处理 HepG2 细胞 *TIMP2* mRNA; D: 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP2* mRNA 表达影响; E: RT-PCR 检测肽及整合素处理 HepG2 细胞; F: 30 肽 + 整合素对 HepG2 细胞 *TIMP2* mRNA 表达影响

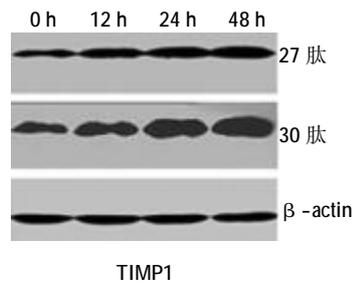
图 5 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP1* 和 *TIMP2* mRNA 表达的影响及整合素的作用

达 ($P < 0.05$); 图 5E-F 中, 与 30 肽组和 $\alpha v \beta 3$ 抗体组比较, 30 肽 + $\alpha v \beta 3$ 抗体组明显上调 *TIMP1* 和 *TIMP2* mRNA 表达量。

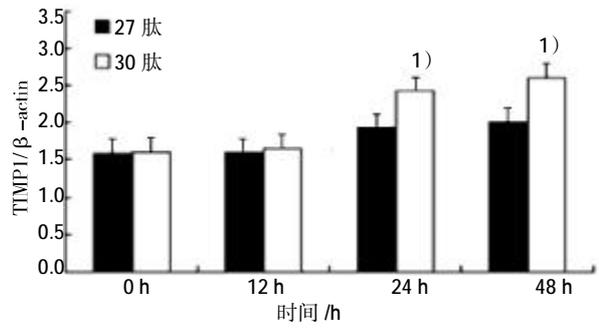
2.6 Western blot 检测 *TIMP1* 和 *TIMP2* 的表达

图 6A-D 中, 反向 *TIMP1* 和 *TIMP2* 的表达量随

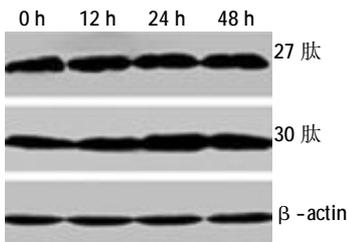
着 27 肽和 30 肽作用时间的延长而上调, 与 27 肽处理组比较, 30 肽处理组在 24 h 开始上调 *TIMP1* 和 *TIMP2* 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。图 6E-F 中, 与 30 肽组和 $\alpha v \beta 3$ 抗体组相比, 30 肽 + $\alpha v \beta 3$ 抗体组明显上调 *TIMP1* 和 *TIMP2* 蛋白的表达量。



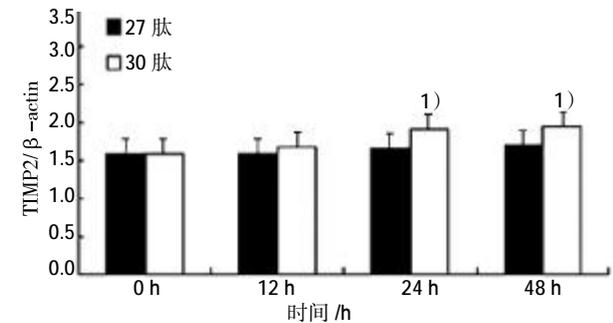
A



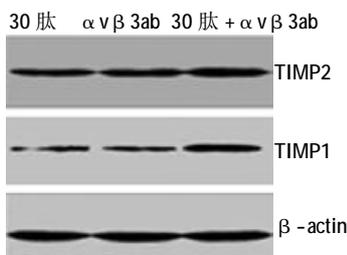
B



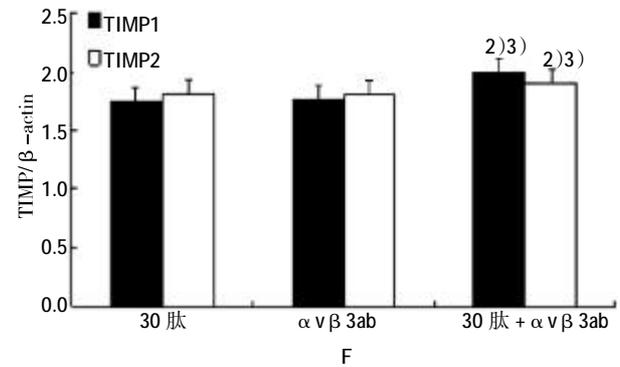
C



D



E



F

1) 与 27 肽组比较, $P < 0.05$; 2) 与 30 肽组比较; $P < 0.05$; 3) 与 $\alpha v \beta 3$ 组比较, $P < 0.05$; A: 肽处理 HepG2 细胞 *TIMP1* 蛋白质表达; B: 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP1* 蛋白质表达的影响; C: 肽处理 HepG2 细胞 *TIMP2* 蛋白质表达; D: 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP2* 蛋白质表达的影响; E: 肽及整合素处理 HepG2 细胞; F: 30 肽 + 整合素对 HepG2 细胞 *TIMP1*、*TIMP2* 蛋白表达影响

图 6 30 肽对 HepG2 细胞 *TIMP1* 和 *TIMP2* 蛋白表达的影响及整合素的作用

3 讨论

肿瘤转移是一个复杂的过程, 黏附是肿瘤细胞侵袭的起始步骤, 高侵袭的肿瘤细胞与基底膜成分的异质性黏附能力通常增高, 而肿瘤细胞间的同质性黏附能力则会下降⁹, 上述特征有利于肿瘤细胞与肿瘤母体分离, 并侵犯基底膜等正常组织。通过黏附实验检测 30 肽对肿瘤细胞与基底膜成分黏附能力

的影响, 结果表明, 与 27 肽相比, 30 肽从 $40 \mu\text{g/ml}$ 开始, 明显抑制 HepG2 细胞与 matrigel 的黏附, 并呈剂量依赖性。

基底膜侵袭实验能较好地反映肿瘤细胞的侵袭能力, 使用 matrigel 等基质成分模拟体内基底膜进行体外侵袭实验结果证明: 与 27 肽组比较, 30 肽具有明显降低 HepG2 细胞侵袭能力的作用。30 肽只

比 27 肽多出一个 RGD 序列,30 肽抑制肿瘤细胞黏附、侵袭能力强于 27 肽,必定与其中的 RGD 序列相关。RGD 序列是指包含 Arg-Gly-Asp 3 肽的序列,细胞外基质中的蛋白质借助其中的 RGD 序列识别并结合不同亚型的整合素,将细胞外信息传入细胞内,引发一系列病理生理变化,调节肿瘤细胞黏附,影响肿瘤细胞的增殖、转移及凋亡。

整合素在体内大多数细胞表面广泛表达,在多种生命活动中发挥关键作用^[10],与肿瘤等疾病密切相关^[11],具有 RGD 序列的小分子多肽会和细胞外基质蛋白质竞争与整合素的结合,产生去整合素效应。在侵袭实验中,分别加入 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 及 $\alpha v \beta 3$ 整合素抗体,筛选 30 肽识别并结合的整合素亚型,结果加入 $\alpha v \beta 3$ 抗体能进一步抑制细胞的侵袭能力,而其他抗体都对 30 肽的活性无明显影响。

在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞侵袭基底膜是重要环节,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)被认为是该过程中主要的蛋白水解酶,是反映肿瘤侵袭能力的重要指标,其与多种疾病密切相关,本课题前期工作证明了 30 肽能下调肿瘤细胞 MMP2 和 MMP9 基因的表达及 MMP2 和 MMP9 的活性^[9]。TIMP 与 MMP 作用拮抗,是反映肿瘤侵袭能力的重要指标,近年来有关 MMP 和 TIMP 的研究越发引起重视^[12-13],本研究中 30 肽引起 MMP 的特异性抑制剂 TIMP1 和 TIMP2 的表达上调,且在实验中加入 $\alpha v \beta 3$ 整合素抗体明显增强 30 肽对 TIMP1 和 TIMP2 基因表达的调控作用。

流式细胞术检测,30 肽没有改变细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素的表达;免疫荧光实验的结果中观察到了肿瘤细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素聚集成簇现象,因此考虑 30 肽不是通过改变整合素的表达量,而是引起细胞表面整合素 $\alpha v \beta 3$ 聚集成簇,使 30 肽借助其 RGD 序列提高了对整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体的结合率和选择性,产生了去整合素效应,削减了整合素介导的对肿瘤转移的影响。

综上所述,RGD 序列修饰的内皮抑素 30 肽不仅能显著抑制肿瘤组织新生血管的生成,抑制肿瘤细胞的生长与增殖,还能有效地抑制 HepG2 的侵袭与转移。30 肽抑制肿瘤细胞侵袭、转移的能力明显大于内皮抑素 27 肽,其机制可能是 30 肽通过 RGD 序列与 $\alpha v \beta 3$ 整合素结合,上调 TIMP1、TIMP2 的表达,进而降低肿瘤细胞降解细胞外基质

的能力,抑制肿瘤细胞的体外黏附、侵袭和迁移能力。这些结果为以后 30 肽辅助化疗药物应用于肿瘤的治疗提供了理论依据。

参 考 文 献:

- [1] O'reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.
- [2] Danielle BR, Roger C, Natália VM, et al. Anti-tumor therapy with macro encapsulated endostatin producer cells[J]. BMC Biotechnol, 2010; 10(5): 1-9.
- [3] Jonathan G, Paula C, Graeme J, et al. Serum Endostatin concentrations Are Higher in Men with Symptoms of Intermittent Claudication[J]. Dis Markers, 2014; 2014(1): 105-109.
- [4] Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, et al. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2 terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its anti tumor activity1[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3656-3663.
- [5] 刘哲丞、郭红艳、姚淑娟、张春晶、刘秀财、李淑艳.内皮抑素 30 肽对 SGC-7901 细胞增殖及转移能力的影响[J].肿瘤防治研究,2012, 39(12): 1416-1419.
- [6] Wickstrom SA, Kari A, Jorma KO. An Endostatin-derived Peptide Interacts with Integrins and Regulates Actin Cytoskeleton and Migration of Endothelial Cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 20178-20185.
- [7] Liu HK, Wang Q, Li Y, et al. Inhibitory effects of γ -tocotrienol on invasion and metastasis of human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2010, 21 (9): 206-213.
- [8] Chen Q, Meng LH, Zhu CH, et al. ADAM15 suppresses cell motility by driving integrin $\alpha 5 \beta 1$ cell surface expression via Erk inactivation[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008, 40(10): 2164-2173.
- [9] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 453-458.
- [10] Furie N, Shteynberg D, Elkhatib R, et al. Fibulin-5 regulates keloid-derived fibroblast-like cells through integrin beta-1[J]. Int J Cosmet Sci, 2015, Jun 11. doi: 10.1111/ics.12245.
- [11] Boudjadi S, Carrier JC, Groulx JF, et al. Integrin $\alpha 1 \beta 1$ expression is controlled by c-MYC in colorectal cancer cells[J]. Oncogene, 2015, 6, doi: 10.1038/onc.
- [12] Prideaux M, Staines KA, Jones ER, et al. MMP and TIMP temporal gene expression during osteocytogenesis [J]. Gene Expr Patterns, 2015, 18(1-2): 29-36.
- [13] Falcao AS, Kataoka MS, Ribeiro NA, et al. A novel cell line derived from pleomorphic adenoma expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and shows numeric chromosomal anomalies[J]. PLoS One, 2014, 9(8): 105231.