

## CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING THE AMINOTERMINAL 93 PEPTIDE OF MONKEY FERTILIN $\beta$ IN *E. coli* \*

WANG Jian SHEN Wei Ying LIU Jun

GAO Er Sheng SHEN Qing Xiang\*\*

(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032)

### ABSTRACT

Fertilin, a heterodimeric sperm surface protein, has been shown to play an important role in sperm-egg interactions. The amino terminal 93 amino acids of the mature fertilin  $\beta$  subunit contains a putative integrin binding disintegrin domain that shares significant sequence homology with the snake venom disintegrins, a family of proteins that are known to bind to integrin on cell surfaces. We report here the cloning and expression of the gene encoding the amino terminal 93 amino acids of the monkey mature fertilin  $\beta$  subunit (mF $\beta$ NTP93) in *E. coli*. The gene was produced by RT-PCR and subcloned into plasmid pT7-7/hCG $\beta$  at EcoRI and BamHI sites. The gene was expressed in *E. coli*(DE3) as a fused protein mF $\beta$ NTP93-hCG $\beta$ . The result of Western blotting showed that the fusion protein had an apparent molecular weight of 33 KDa and had the anti-hCG antibody-binding activity. Therefore, we assume that mF $\beta$ NTP93 should be expressed, because the mF $\beta$ NTP93 gene was fused to hCG gene in correct reading frame.

**Key words:** Fertilin $\beta$  Integrin-binding disintegrin domain Fusion protein Expression

\* This project was supported by a grant from CONRAD/Mellon Foundation(No. MFG-97-23).

\*\* To whom correspondence should be addressed.

## 小檗胺衍生物(EBB)体外抑制肺癌细胞增殖机制的初探

张金红 许乃寒 徐 畅 陈家童 刘惠君

段江燕

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071) (山西师范大学生物系 临汾 041004)

由于  $Ca^{2+}$ -CaM 是细胞内多种信号的调控中心,它与细胞的增殖和癌变有密切关系<sup>[1]</sup>,因此 CaM 拮抗剂具有抗肿瘤的可能性<sup>[2]</sup>。在过去的工作中,我们先后发现经过自行化学修饰后的小檗胺衍生物-EBB,在体外不仅对恶性肿瘤细胞(HeLa, Bowes 细胞等)的增殖有明显的抑制作用,而且还表现出对正常牛胚肾细胞(MDBK)毒性低的特点<sup>[3-4]</sup>。EBB 对牛胚肾细胞毒性低的现象是种属差异还是 EBB 在抑瘤方面的优点,有待进一步证实。除此之外,体内实验所发现的 EBB 在明显地抑制小鼠移植瘤 S180 生长的同时,还具有逆转由于荷瘤引起的小鼠主要器官细胞中不正常的 CaM 水平的能力<sup>[5,6]</sup>;是否影响了 CaM 基因表达系统有

关? 也有必要研究。

肺癌无论是从发病率还是存活率以及化疗效果上都是肿瘤治疗中较难解决的问题。因此本文选择人胚肺细胞(HEL)和人肺巨细胞癌(PG)分别作为检测 EBB 毒性的正常细胞株和抑瘤细胞株,研究了 EBB 这种新型的半天然 CaM 拮抗剂的抑瘤效果和毒性是否与对细胞内 CaM 水平的影响有相关性;以及 EBB 抑制肿瘤细胞增殖的同时对细胞内原癌基因,抑癌基因表达是否有影响。为探讨 EBB 抗肿瘤作用的机制和应用的可行性提供重要的科学依据。

本文2000年3月14日收到,2001年3月19日接受。

致谢:本工作得到天津市自然科学基金资助。

## 材 料 和 方 法

### 1. 材料

小檗胺(Bo):北京东升制药厂;小檗胺衍生物(0-4-ethoxyl-butyl-berbamine, EBB 和 0-dansyl-berbamine, DB):本室合成;丝裂霉素(Mit-C):日本协和发酵株式会社;甲氨蝶呤(MTX):上海华联制药有限公司;CaM:本室从牛脑制备;DMEM培养基:GIBCO;切口平移试剂盒:华美公司;CaM探针:本室从携带CaM的cDNA的质粒中制备;cDNA探针(c-H-ras, c-myc, Rb and p53):北京中山生物技术有限公司;[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP:北京亚辉生物医学工程公司;PVDF(聚偏二氟乙烯)膜:Sigma公司;人肺巨细胞癌细胞(PG细胞):中国人民解放军总医院病理科提供;人胚肺细胞(HEL细胞):北京医科大学病理教研室提供;其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 2. 方法

(1) 细胞培养和药物剂量抑制曲线<sup>[4]</sup> 细胞培养用含10%FBS的DMEM培养液,在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养。抑制曲线采用MTT法,取对数生长期细胞,按3-5×10<sup>4</sup>cell/ml密度接种于96孔细胞培养板中,分对照组和实验组,培养24小时后,加入不同浓度的不同药物;分别于20,44,68小时加10 $\mu$ lMTT(4mg/ml)到每孔中,继续培养4小时后,吸出培养液,加入100 $\mu$ l DMSO,稍加振荡使之溶解,1小时内570nm测定OD值;绘制细胞生长曲线。

(2) CaM基因探针制备和纯化<sup>[7]</sup> 采用酚-氯仿一步抽提法。

(3) 细胞浆RNA快速提取<sup>[8]</sup> 取对数生长期细胞(4×10<sup>4</sup>cell/ml)接种在六孔细胞培养板中,分对照组和实验组,培养24小时后加入不同浓度药物;继续培养48小时后,弃去死细胞,计数并收集贴壁细胞进行细胞浆RNA的提取;按每点1×10<sup>5</sup>cell量点在PVDF膜上。

(4) Northern斑点杂交和放射自显影<sup>[8]</sup> 基因探针经琼脂糖凝胶电泳纯化后,用[ $P^{32}$ ]-dCTP为底物,切口翻译标记cDNA;经预杂交,杂交,放射自显影,mRNA斑点用UV-300岛津双波长扫描仪进行半定量测定。

(5) 细胞总蛋白和CaM含量测定<sup>[6]</sup> 采用Bradford法,以BSA为标准蛋白,测定细胞总蛋白;以PDE二步温育法用于CaM的含量测定;细胞样品制备用低渗反复冻融法。

## 结 果 与 讨 论

### 1. EBB对HEL和PG细胞生长曲线的影响

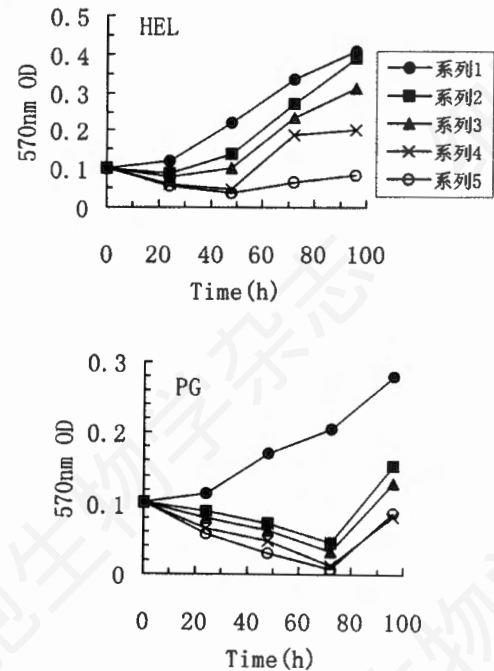


图1 EBB的浓度对HEL和PG细胞增殖的抑制作用(接种细胞量:HEL3×10<sup>4</sup>cell/ml,PG4×10<sup>4</sup> cell/ml) 系列:1. 对照;2. 1.0 $\mu$ mol/L;3. 2.5 $\mu$ mol/L; 4. 5.0 $\mu$ mol/L;5. 7.5 $\mu$ mol/L。

从图1的结果可以看出,对照组无论是HEL细胞还是PG细胞72小时内一直处于旺盛生长期;而用EBB分别处理HEL和PG细胞,细胞增殖情况在72小时内明显不同,EBB浓度达5 $\mu$ mol/L时,HEL细胞的密度虽不及对照组(相当于对照组的67%),但细胞仍在增殖(细胞密度是EBB作用48小时的3倍);PG细胞在1 $\mu$ mol/L的EBB作用下,增殖就受到显著的抑制。说明EBB对正常细胞的毒性的确远远低于对肿瘤细胞的抑制。EBB作用PG细胞96小时后,细胞出现了增殖开始恢复的情况,究其原因,可能是EBB被部分代谢后而引起的活性降低之故,需要进一步研究。

### 2. 小檗胺及衍生物与MTX、Mit-C作用HEL和PG细胞72小时后,对存活率的影响

表 1 几种化合物对 PG 和 HEL 细胞存活率的影响

$\mu\text{mol/L}$	Bo HEL/PG	EBB HEL/PG	BB HEL/PG	DB HEL/PG	Mit-C HEL/PG	MTX HEL/PG
1.0	75.8/48.3	94.3/21.5	100/73.2	91/34.6	50.4/25.8	65.7/43
2.5	57.3/40.0	86.7/15.5	84.3/49.2	77.4/31.7	28.2/25.8	-
5.0	35.1/33.7	67.3/5.9	80.2/45.8	59.7/21.5	21.4/6.3	51.2/29.3
7.5	11.7/-	23.8/-	54.4/-	24.2/-	11.7/-	-

注:1. 细胞接种密度为  $4.5 \times 10^4$  cell/ml, 0.1ml/孔; 2. 表中所列数值均为 MTT 法测定, 以对照组细胞 570nm OD 值为 100% 计算所得。

表 1 显示了 HEL 和 PG 细胞对五种小檗胺类化合物以及两种抗肿瘤药的敏感程度。在表 1 的结果中不难发现, 小檗胺的三种衍生物对 HEL 细胞的毒性不仅比其母体小檗胺低, 也比两种抗肿瘤药小; 其作用 HEL 细胞 72 小时后的  $\text{IC}_{50}$  值分别是: Bo =  $3.5 \mu\text{mol/L}$ , EBB =  $6.5 \mu\text{mol/L}$ , BB =  $8 \mu\text{mol/L}$ , DB =  $6 \mu\text{mol/L}$ , MitC =  $1.2 \mu\text{mol/L}$ , MTX =  $5.5 \mu\text{mol/L}$ 。PG 细胞受这几种化合物的影响比 HEL 细胞敏感。它们中属 EBB 的作用最明显; 这些化合物作用 PG 细胞 72 小时后的  $\text{IC}_{50}$  值分是: Bo <  $1 \mu\text{mol/L}$ , EBB <  $1 \mu\text{mol/L}$ , DB <  $1 \mu\text{mol/L}$ , BB =  $2 \mu\text{mol/L}$ , MitC <  $1 \mu\text{mol/L}$ , MTX <  $1 \mu\text{mol/L}$ 。尽管上述几种化合物在抑制 PG 细胞增殖方面都很明显, 但从对肿瘤患者体内正常组织的毒性来考虑, EBB 是最理想的化疗剂。

### 3. Bo 及其衍生物 EBB 与 Mit-C 作用肺细胞 48 小时内 CaM mRNA 含量的变化

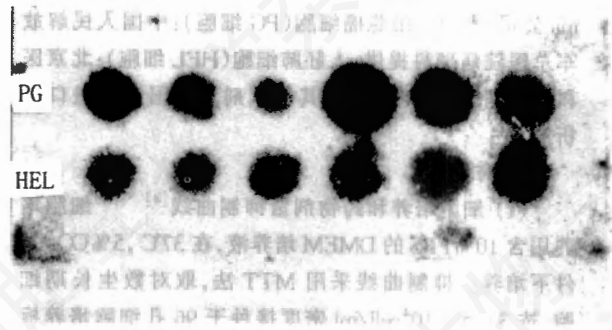


图 2 PG 和 HEL 细胞浆的 CaM mRNA 斑点杂交放射自显影图

注: 1. PG 和 HEL (自左向右各点): 对照, Bo, EBB, Mit-C, Bo + Mit-C, EBB + Mit-C。  
2. 药物所用浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  (包括联合组中的 Bo, EBB 和 Mit-C)。  
3. 每点均为  $1 \times 10^5$  细胞。

表 2 几种化合物对 PG 和 HEL 细胞 CaM mRNA 水平的影响

组别	PG 细胞斑点杂交灰度扫描值	百分比 (%)	HEL 细胞斑点杂交灰度扫描值	百分比 (%)
对照	617478	100	284378	100
Bo	455889	73.8	310841	109.3
EBB	275385	44.6	451211	158.7
Mit-C	1825291	295.6	479486	168.6
Bo/Mit-C	1014846	161.9	503960	177.2
EBB/Mit-C	602017	97.5	941474	330

注: 实验条件见材料和方法。

照片中上下两行斑点和表 2 所显示的旨为  $1 \mu\text{mol/L}$  的三种化合物单独使用和联合使用作用 48 小时后, 对 PG 和 HEL 细胞 CaM 基因转录产物 (CaM mRNA) 的影响。从斑点杂交灰

度扫描的结果, 可以看到, 正常细胞和肿瘤细胞中 CaM 基因转录产物的含量不同, PG 细胞中 CaM mRNA 的量是 HEL 细胞的两倍以上。经过这几种化合物处理后, PG 细胞内 CaM mRNA

NA的含量发生了较明显的变化。小檗胺类化合物能降低其水平,特别是EBB使PG细胞中的CaM基因的转录产物降低了50%以上;而Mit-C使CaM基因的转录产物mRNA的含量增加了近三倍;Bo和EBB与Mit-C联合使用能显著地逆转这种局面,EBB/Mit-C联合组中的CaM mRNA的含量已降至和对照组相似。这三种化合物都能使HEL细胞中的CaM基因的转录产物mRNA的含量增加,单独使用EBB

和Mit-C两组细胞中的CaM mRNA含量分别增加了50%以上;而EBB和Mit-C联合组对HEL细胞CaM基因转录产物的影响具有叠加作用,导致CaM mRNA的水平比对照组增加了三倍之多。经过Mit-C处理后,PG细胞和HEL细胞中的CaM基因转录产物mRNA含量有明显增加的原因需要进一步研究。

#### 4. Bo及其衍生物与Mit-C作用细胞48小时后胞内CaM含量的变化

表3 CaM拮抗剂和抗肿瘤药对HEL和PG细胞内CaM含量的影响

组别	对照	Bo	EBB	Mit-C	Bo/Mit-C	EBB/Mit-C
HEL CaM *	608.6	357.6	554.5	335	218	211
百分率	100	58.7	91.1	55	35.8	34.7
PG CaM *	2888	1468	1310	312	266	334
百分率	100	50.8	45.4	10.8	9.2	11.6

注: 1. \* 指 ng CaM/mg 总蛋白, 2. 药物浓度为  $1\mu\text{mol/L}$ 。

几种化合物对PG和HEL细胞内CaM基因表达的影响如表3。从本实验条件下所测定的结果,首先可以看到对照组PG细胞中的CaM含量是HEL细胞的4.74倍,证明了正常细胞和肿瘤细胞CaM水平的差别。其次显示出几种化合物分别作用这两种细胞48小时后,细胞内CaM水平发生了不同程度的改变;Bo和EBB都能使PG细胞中CaM水平减少50%左右;抗肿瘤药(Mit-C)能使PG细胞中的CaM水平降低89.2%。Mit-C对PG细胞中的CaM水平的影响虽然比小檗胺类化合物明显;但是Mit-C对HEL细胞内的CaM水平的影响(相当于对照组的55%)比EBB大,而EBB组的CaM水平仍能达到对照组的90%以上,Bo对HEL细胞CaM的水平影响与对PG细胞相似。说明EBB基本能维持对HEL细胞的正常生理功能,Bo对正常细胞生长的毒性比其衍生物-EBB大;Mit-C对正常细胞的毒性也从这方面得到证实。这些结果说明EBB具有维持细胞CaM生理水平的能力。

当然Mit-C在CaM基因表达的转录与翻译环节所表现出的相反作用(能使PG和HEL

细胞中的CaM mRNA水平都升高,而翻译产物CaM含量都明显降低),其原因是细胞内低水平的CaM的反馈作用,促使CaM的mRNA保持高转录速度的结果,还是维持了CaM mRNA的稳定性所致,是一个值得注意和深入研究的问题。

#### 5. EBB对PG细胞原癌基因和抑癌基因mRNA表达的影响

据报道,细胞的癌变是由于原癌基因的过表达和抑癌基因的突变失活或丢失所致<sup>[9]</sup>;在恶性肿瘤细胞中,原癌基因c-myc和c-Hras分别处于扩增5倍以上或高表达状态,而抑癌基因的突变率也均在60%以上。小檗胺和它的衍生物EBB作用PG细胞48小时后,原癌基因(c-myc, c-H-ras)和抑癌基因(p53, Rb)表达水平的Northern斑点杂交结果如表4。表4的结果显示出,  $1\mu\text{mol/L}$ 的EBB作用PG细胞后,两种原癌基因的转录水平有较明显的降低;EBB对PG细胞中抑癌基因的转录水平的抑制作用比原癌基因明显,同样是  $1\mu\text{mol/L}$ 浓度的EBB,对Rb和p53 mRNA的抑制率分别为65.1%和84.9%。  $2.5\mu\text{mol/L}$  EBB对PG细胞

表4 EBB作用后PG细胞内四种基因mRNA水平变化

探针	结果*	对照	Bo 1 $\mu$ mol/L	EBB 1 $\mu$ mol/L	EBB 2.5 $\mu$ mol/L
C-myc	灰度扫描值	1402078	674854	1112222	1091559
	百分比(%)	100	48.0	79.3	77.8
c-H-ras	灰度扫描值	351268	326029	299607	206224
	百分比(%)	100	92.8	85.3	58.7
p53	灰度扫描值	161180	82473	24355	37671
	百分比(%)	100	51.2	15.1	23.4
Rb	灰度扫描值	196026	77118	68457	241225
	百分比(%)	100	39.3	34.9	123

注:1. \* 为四种基因 mRNA 斑点杂交放射自显影结果,实验方法同 CaM mRNA。  
2. 每个斑点均为  $1 \times 10^5$  细胞。

内四种基因的影响表现了,既能对原癌基因转录产物的抑制作用加强,也可使抑癌基因的转录产物水平比  $1\mu\text{mol/L}$  EBB 组增加。这种结果的出现,是否因为  $2.5\mu\text{mol/L}$  浓度的 EBB 在显著地抑制突变的抑癌基因 mRNA 的转录水平后,还有一定的促进未突变的 p53 和 Rb 基因转录的能力,为翻译环节的启动做物质准备,以利于阻止肿瘤细胞的恶性增殖,需要进一步的研究证实。

### 摘 要

本文研究并发现了新型半天然钙调素(CaM)拮抗剂——O-4-乙氧基丁基小檗胺(O-4-ethoxy-butyl-berbamine, EBB),具有选择性抑制肺巨细胞癌(PG)的增殖和降低细胞内 CaM 水平的能力,对人胚肺细胞(HEL)的增殖和细胞内 CaM 的水平影响较小。同时观察到 EBB 引起肿瘤细胞内 CaM 水平降低的原因,是对 CaM 基因的转录产物(mRNA)和翻译产物(CaM)两方面作用的结果。此外,EBB 还能部分降低 PG 细胞内原癌基因和突变的抑癌基因

转录产物 mRNA 的水平。EBB 抑制肿瘤细胞增殖的机制,除了对 CaM 基因的表达水平和 CaM 活性调控外,可能还直接或间接地影响了相关的原癌基因和突变的抑癌基因的表达。

关键词: 小檗胺衍生物 抗肿瘤 基因表达

### 参 考 文 献

- [1] Veigl M L, et al., 1983, *Biochem Biophys Acta*, 738: 21-48.
- [2] William N Hait, et al., 1986, *J Clin Onco*, 4: 994-1012.
- [3] 张金红等, 1997, *细胞生物学杂志*, 19: 76-79.
- [4] 张金红等, 1997, *中草药杂志*, 28: 483-486.
- [5] 张金红等, 1998, *中草药杂志*, 29: 243-246.
- [6] 张金红等, 1998, *南开大学学报*, 31: 72-76.
- [7] 魏征宇等, 1993, *微生物学通报*, 20: 375.
- [8] J萨姆布鲁克, 1996, *分子克隆实验指南*, p. 348, 372-373, 科学出版社。
- [9] 沈翊珩等, 1996, *真核基因表达调控*, p. 169-192, 高等教育出版社。

## PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE MECHANISM OF ANTICANCER BY BERBAMINE DERIVATIVE(EBB) IN VITRO

ZHANG Jin Hong XU Nai Han XU Chang CHEN Jia Tong LIU Hui Jun

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin, 300071)

DUAN Jiang Yan

(Department Biology, Shanxi Normal University, Linfen, 041004)

### ABSTRACT

In this paper, the inhibitory mechanism of tumor cell proliferation by a derivative berbamine (o-4-ethoxyl-butyl-berbamine, EBB) has been studied.

Experimental results showed that EBB as a new and strong CaM antagonist, inhibited proliferation of human lung cancer cells (PG) and had no significant toxic effect on normal lung cells (HEL). EBB inhibited the expression of CaM gene on the transcription and translation level. It can also inhibit the expression of oncogene (c-myc and c-H-ras) in PG cells, and reverse proliferation of the malignant lung cancer cells (PG) due to high mutation frequency of p53 and Rb genes.

**Key words:** Derivative berbamine Anticancer Gene expression

## 小鼠皮肤癌变过程中 GST- $\pi$ 免疫组化染色观察

刘音<sup>\*,\*\*\*</sup> 林敬连<sup>\*\*\*\*</sup> 金周永<sup>\*</sup> 成彦起<sup>\*</sup> 欧阳喈<sup>\*\*</sup> 李隆昌<sup>\*</sup>

(\* 韩国岭南大学医科学院解剖学教室 大邱 705-717 \*\* 白求恩医科大学口腔医学院病理科 长春 130042

\*\*\* 大连大学生物工程学院 大连 116622 \*\*\*\* 大连大学学生处 大连 116622)

谷胱甘肽 s-转移酶(GSTs)在 1961 年首次被鉴定<sup>[1]</sup>,是一种多功能的解毒酶,其主要功能是水解有毒物质中谷胱甘肽的亲电子结构,以破坏谷胱甘肽,从而保护细胞不受有毒物质的侵害。这些有毒物质包括致癌因子和具有细胞毒作用抗癌药物<sup>[2]</sup>。在人类,GSTs 根据其碱基和结构不同被分为三类: $\alpha$ 、 $\mu$  和  $\pi$ ,其中  $\alpha$  呈硷性(pH>8.0), $\mu$  为中性(pH=7.0-8.0), $\pi$  为酸性(pH<7.0)。这三类蛋白起源于各自不同的基因,每一种蛋白都为整个机体的存活提供重要作用。研究表明,从鼠类胎盘和从人类胎盘提取的 GST- $\pi$  具有 70% 以上相同的氨基酸顺序<sup>[3]</sup>。GST- $\pi$  在大鼠的肝癌和癌前病变中表达明显增高<sup>[4]</sup>,因此,GST- $\pi$  被认为是肝癌细胞的早期标志之一。在人类肺癌,卵巢癌和胃癌等细胞,经 GST- $\pi$  免疫组化染色呈阳性反应<sup>[5]</sup>。

皮肤癌是最常见肿瘤之一,通过皮肤,环境

中的大量的化学成份,药物和其它物质进入体内,引起局部毒性或致癌作用。皮肤癌变被认为是一种多步骤的过程,即从良性增生,异常增生,原位癌到浸润癌。因此,研究皮肤对致癌因子,药物和化学物质等解毒能力,成为评估皮肤癌发生的重要依据之一。

### 材料与方 法

#### 1. 试剂、试剂盒和实验动物

GST- $\pi$  多克隆抗体(NCL-GST $\pi$ )购自于 Novocastra 公司,DMBA 和 PAP 免疫试剂盒均购自 Sigma 公司。BALB/c 小鼠由本校动物实验室提供。

#### 2. 实验过程

(1) 小鼠皮肤癌模型试验 20 只雄性 BALB/c 小鼠,2-3 周龄,在无菌室温下喂养。动物分为两组:①实验组:在 15 只实验组小鼠皮肤上,每周一次涂含 1%DMBA 的矿物油,直至 10 周。②对照组:在 5 只对

本文2000年7月3日收到,2001年3月19日接受。