

# 新型抗肿瘤转移多肽-三聚 $\beta$ 肽 ( $\beta 3$ ) 在大肠杆菌中的表达及其抗粘附作用 Molecular Cloning and Expression of Anti-tumor Adhesion Peptide ( $\beta 3$ )

王松梅<sup>1,3</sup>, 朱 珺<sup>2</sup>, 李 岩<sup>3</sup>, 潘銮凤<sup>1</sup>, 查锡良<sup>4\*</sup>, 刘银坤<sup>3\*</sup>

WANG Song-Mei<sup>1</sup>, ZHU Jun<sup>2</sup>, LI Yan<sup>3</sup>, PAN Luan-Feng<sup>1</sup>, ZHA Xi-Liang<sup>4\*</sup> and LIU Yin-Kun<sup>3\*</sup>

1. 复旦大学上海医学院分子生物学实验室, 上海 200032

2. 上海市第六人民医院药剂科, 上海 200032

3. 复旦大学中山医院肝癌研究所, 上海 200032

4. 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032

1. Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

3. Liver Cancer Institute, Fudan University, Shanghai 200032, China

4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

**摘 要** 自行设计了抗肿瘤转移多肽-三聚  $\beta$  肽 ( $\beta 3$ ), 人工合成了  $\beta 3$  的基因片段, 构建了  $\beta 3$  的表达质粒 pET-His- $\beta 3$ , 在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中表达。在用 IPTG 诱导 1.5h 后可见明显的 His- $\beta 3$  融合蛋白的表达。表达产物约占细胞总蛋白的 4%, 占细胞总不溶性蛋白的 10%。每升 pET-His- $\beta 3$ /BL21(DE3)pLysS 细菌培养液用金属螯合琼脂糖凝胶 6B FF 分离后可回收纯度为 92.2% 的  $\beta 3$  产物约 20mg。所表达出的  $\beta 3$  肽对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞及人肝癌高转移细胞株 HCCLM6 细胞与纤连蛋白 (fibronectin, FN) 粘附具有特异的抑制作用, 呈现剂量效应相关关系和时间效应相关关系, 抑制作用强于  $\beta 1$  肽 (3 倍浓度的  $\beta 1$  (3  $\times$   $\beta 1$ ) 和 GRGDS。研究结果表明 pET-His- $\beta 3$ /BL21(DE3)pLysS 是  $\beta 3$  适合的表达系统, 表达的  $\beta 3$  肽具有特异的抗肿瘤细胞粘附作用。

**关键词** 基因工程, 抗粘附, 多肽, 表达, 肝癌

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0558-05

**Abstract** To block tumor cell adhesion, inhibit tumor metastasis and recurrence, the anti-adhesion peptide-trimeric  $\beta$  peptide (DLYYLMDLSYSMKGGDLYYLMDLSYSMKGGDLYYLMDLSYSMK,  $\beta 3$ ) was designed. The DNA fragment of  $\beta 3$  was cloned into expression vector pET-His and the fusion protein His- $\beta 3$  was expressed in *E. coli*. BL21(DE3)pLysS. After 1.5 hours' induction with IPTG, His- $\beta 3$  peptide was expressed significantly amounting to 10% of the insoluble proteins and 4% of the total proteins. 20mg of  $\beta 3$  peptide was obtained from one litter culture medium after purification by using metal-chelating sepharose 6B FF. The purity of  $\beta 3$  is 92.2% according to Gel-Pro analysis. The anti-adhesion effects of  $\beta 3$  peptide,  $\beta 1$  peptide (DLYYLMDLSYSMK)

Received: December 12, 2004; Accepted: April 20, 2005.

This work was supported by the grants from National High-Tech Program of China (No. 2001AA215411 and No. 2004AA215201) and Shanghai Science and Technology Developing Program (No. 024319212).

\* Corresponding author. ZHA Xi-Liang: Tel: 86-21-54237696; E-mail: xlzha@shmu.edu.cn; LIU Yin-Kun: Tel: 86-21-64041990-2501; E-mail: ykliu@zshospital.com

国家高技术研究发展计划 (863 项目) (No. 2001AA215411; No. 2004AA215201) 和上海市重点科技项目 (No. 024319212)。

and GRGDS on the hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and the high metastasis hepatocellular carcinoma cell line HCCLM6 were studied. The result showed the  $\beta 3$  blocked the adhesion of HCCLM6 cells and SMMC-7721 cells to fibronectin (FN) specifically. The inhibition effect was dose-dependent and time-dependent and the inhibition rate of  $\beta 3$  was higher than three times concentration of  $\beta 1$  and GRGDS. This suggested that pET-His- $\beta 3$ /BL21(DE3)pLysS was a suitable expression system for  $\beta 3$ , and the expressed  $\beta 3$  specially inhibited the adhesion of cancer cells.

**Key words** molecular engineering, anti-adhesion, peptide, express, hepatocellular carcinoma

肿瘤细胞及血管内皮细胞表面的粘附分子均与转移复发密切相关<sup>[1]</sup>。许多抑制粘附的方法是直接作用于细胞粘附分子或它们的配体。近年来,对于抑制肿瘤粘附的合成多肽的研究很多,大多涉及从主要的基质蛋白如纤连蛋白、胶原蛋白和纤维蛋白原的共有保守序列来的 RGD 三肽,源自基底膜层粘蛋白的 YIGSR 五肽,来自纤连蛋白核心序列的抗粘附肽 EILDV 等<sup>[2]</sup>。这些短肽的半衰期短,易于酶解,发挥抗复发转移作用剂量大,因而应用受到了限制。为了延长多肽的半衰期,人们进而设计了合成肽的多聚体和衍生物。其中,合成肽的重复序列对肿瘤细胞侵袭和转移的抑制作用比非重复肽强,而且重复的次数越多,抗肿瘤转移作用越强<sup>[2-4]</sup>。

整合蛋白是各种细胞与细胞外基质相互作用的重要媒介,其表达情况与细胞的迁移能力关系密切。整合蛋白是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基在细胞表面以非共价键连接的异二聚体,其与配体的识别需要  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的共同参与。刘银坤等<sup>[5-6]</sup>根据整合蛋白  $\beta$  亚基及部分  $\alpha$  亚基 N 端的保守序列设计了抗粘附  $\beta$  肽 (DLYYLMDSL SYSMK  $\beta 1$ ),并且用化学合成的方法合成了  $\beta 1$ ,发现其能阻断肿瘤细胞与基质、肿瘤细胞间、肿瘤细胞与内皮细胞、肿瘤细胞与淋巴细胞间的相互作用及对高转移的人肝癌裸鼠模型 LCID20 肝癌切除术后肝内转移和肺转移也具有强大的抑制作用<sup>[7-10]</sup>。本研究在此基础上,为了增加抗酶解性,延长半衰期,增加抗转移活性,设计了 3 个  $\beta$  肽的重复序列 (DLYYLMDSL SYSMKGGDLYYLMDSL SYSMKGGDLYYLMDSL SYSMK  $\beta 3$ ),尝试在大肠杆菌表达系统中表达,并观察了表达产物的抗肿瘤细胞与基质粘附的作用,以期抗肿瘤转移药物的生产探索新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

$\beta 3$  的基因片段由生工生物工程公司合成,其序列为 5'-GGA TCC GAT CTG TAT TAT CTG ATG GAT CTG AGC TAT AGC ATG AAA GGC GGC GAC CTG TAC TAC TTA ATG GAC CTG TCT TAT TCT ATG AAG

GGT GGT GAT TTA TAC TAT TTG ATG GAT TTG TCC TAC TCC ATG AAA CTC GAG-3',两端分别是限制酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点,克隆在 pUCm-T 质粒中。pET-His 表达载体及大肠杆菌 TOP10F' 和 BL21(DE3)pLysS 均购自深圳市源动力生物技术开发公司。PCR 引物:由生工生物工程公司合成,分别包含 *Bam*H I 和 *Nhe* I 酶切位点(引物 1:5'-GACGGATCCGATCTGTATTATCTGATG-3';引物 2:5'-GACCA GCTAGCTTTCATGGAGTAGGACAAATCC-3')。DNA 序列测定:由博亚生物公司完成。金属螯合琼脂糖凝胶 6B FF 为北京本元正阳基因技术股份有限公司产品。质谱分析由复旦大学蛋白质组学研究中心完成。 $\beta 1$ (DLYYLMDSL SYSMK)、GRGDS 和无关肽(MKGGDLYYLMDSL):由上海生工生物工程公司合成。人肝癌细胞株 SMMC-7721 及人肝癌高转移细胞株 HCCLM6 由复旦大学肝癌研究所保存。高粘附 96 孔板:costar 产品,商品 ID:3590。FN,MTT 均为 Sigma 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 pET-His- $\beta 3$  重组质粒的构建:**以 pUCm-T- $\beta 3$  为模板,PCR 扩增  $\beta 3$  基因片段,PCR 产物及 pET-His 质粒载体分别用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 酶切,用 Qiagen 凝胶回收试剂盒回收。T4DNA 连接酶连接构建 pET-His- $\beta 3$  重组质粒,转化大肠杆菌 TOP10F'。PCR 筛选阳性菌落,进行序列测定。

**1.2.2 pET-His- $\beta 3$  重组质粒的表达:**将 pET-His 质粒和 pET-His- $\beta 3$  重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS,接种于表达培养板,37℃ 过夜。分别挑取 pET-His/BL21(DE3)pLysS 和 pET-His- $\beta 3$ /BL21(DE3)pLysS 单菌落,接种于 20mL LBA(含 0.2% 葡萄糖,氨苄青霉素 120  $\mu$ g/mL)中,30℃,80r/min 培养 11h,*OD*<sub>600</sub> 为 0.5 左右。加入 IPTG 至 100 $\mu$ g/mL,160r/min 37℃ 诱导 1.5h。取 1mL 菌液离心收集菌体。其余菌液离心收集菌体,重悬于冷 1 × PBS 中,超声破菌 4℃,12000r/min 离心,分别将菌体及上清和沉淀用 Tris-Tricine 系统电泳观察表达情况。

**1.2.3 pET-His- $\beta 3$  表达产物的分离纯化及鉴定:**挑取

pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS 单菌落接种进 20mL LB (+ glucose 0.2% + Amp 120 $\mu$ g/mL) 中 80r/min 30 $^{\circ}$ C 培养至  $OD_{600}$  约为 0.5, 取 20mL 入 800mL LB (+ glucose 0.2% + Amp 120 $\mu$ g/mL) 中 35 $^{\circ}$ C, 180r/min 2~3h 至  $OD_{600}$  = 0.6 时加 IPTG 100 $\mu$ g/mL, 30 $^{\circ}$ C 诱导 2h。离心收集菌体, 重悬于 10mL 洗涤缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 0.5mol/L NaCl, 10% Glycerol, 6mol/L Guanidium HCl) 中, 再加入 PMSF 至 1mmol/L。冰上超声破碎细菌。4 $^{\circ}$ C, 15000 r/min 离心 15min, 将上清加入金属螯合琼脂糖凝胶 6B FF 层析柱中, 用 5 倍柱床体积的洗脱液 (20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 0.5mol/L NaCl, 10% Glycerol, 6mol/L Guanidium HCl, 60 mmol/L imidazole) 洗柱, 收集洗脱液。经透析后离心收集沉淀, 15% Tricine SDS-PAGE 分析回收的 His- $\beta$ 3 的量及纯度。并进一步将 His- $\beta$ 3 作质谱分析其正确性。

**1.2.4**  $\beta$ 3 对肝癌细胞株与细胞外基质蛋白粘附能力的影响: 用 FN 包被细胞培养板, 取 100 $\mu$ L 细胞 ( $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  /mL) 加入包被好的 96 孔板中。将 4 种多肽 ( $\beta$ 3、 $\beta$ 1、GRGDS 和无关肽) 分别稀释成 20 $\mu$ mol/L, 40 $\mu$ mol/L, 100 $\mu$ mol/L 和 200 $\mu$ mol/L, 每孔加入 100 $\mu$ L, 终浓度分别为 10 $\mu$ mol/L, 20 $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L 和 100 $\mu$ mol/L。另外, 将  $\beta$ 1 肽稀释成 60 $\mu$ mol/L, 120 $\mu$ mol/L, 300 $\mu$ mol/L 和 600 $\mu$ mol/L, 作为 3 倍浓度  $\beta$ 1 对照 ( $3 \times \beta$ 1) 加入细胞中的终浓度分别为 30 $\mu$ mol/L, 60 $\mu$ mol/L, 150 $\mu$ mol/L 和 300 $\mu$ mol/L。同时设空白组 (200 $\mu$ L 细胞培养液) 及对照组 (加入 100 $\mu$ L 细胞及 100 $\mu$ L 培养液) 每组设 5 复孔。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 3h 后洗去未粘附细胞, MTT 法检测 96 孔板上细胞浓度。观察多肽对细胞与基质粘附影响的剂量关系。

将此 4 种多肽分别稀释成 200 $\mu$ mol/L, 与细胞同时加入到 96 孔高粘附板中, 每孔加入 100 $\mu$ L, 终浓度为 100 $\mu$ mol/L。另外将  $\beta$ 1 肽稀释成 600 $\mu$ mol/L, 加入细胞后终浓度为 300 $\mu$ mol/L, 作为 3 倍浓度的  $\beta$ 1 对照 ( $3 \times \beta$ 1)。同时设空白组及对照组, 每组设 5 复孔。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 分别培养 0.5、1、1.5、2 和 3h 后洗去未粘附细胞, MTT 法检测 96 孔板上细胞浓度, 观察多肽对细胞与基质粘附影响的时间关系。

**1.2.5 结果的统计分析:** 诱导表达后, 将细菌的上清和沉淀做 15% Tricine SDS-PAGE, 用 Gel-pro 分析  $\beta$ 3 的表达情况。 $\beta$ 3 分离纯化后经 15% Tricine SDS-PAGE, 用 Gel-pro 分析回收的 His- $\beta$ 3 的量及纯度。

$\beta$ 3 与细胞作用后, 对细胞与 FN 粘附抑制率的

计算:

细胞粘附抑制率 = (对照组 OD 平均值 - 多肽组 OD 平均值) / (对照组 OD 平均值 - 空白组 OD 平均值)  $\times$  100%

$\beta$ 3 在不同作用浓度或作用时间下对细胞的抑制作用, 采用线性相关 (liner correlation) 分析, 并计算相关系数 (coefficient of correlation)。显著性水平为 0.05。统计软件为 SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

## 2 结果

### 2.1 pET-His- $\beta$ 3 重组质粒的表达及表达产物的分离纯化和鉴定

pET-His- $\beta$ 3 的表达产物为 7.2kD 的 His- $\beta$ 3 融合蛋白, 其序列为: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSDLYYLM DLSYSMKGGDLYYLM DLSYSMKGGDLYYLM DLSYSMKAS。从 15% Tris-Tricine 系统电泳结果来看 (图 1), pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS 在诱导 1.5h 后可见明显的 His- $\beta$ 3 融合蛋白的表达, 表达产物是以包涵体形式存在的。表达量约占细胞总蛋白的 4%, 占细胞总不溶性蛋白的 10%。表达产物用金属螯合琼脂糖凝胶 6B FF 层析柱回收, 经透析后离心收集沉淀, 做 15% Tricine SDS-PAGE 分析。可见纯化后的 7.2kD 的 His- $\beta$ 3 条带, 用 Gel-pro 分析纯度为 92.2% (图 2)。将此 His- $\beta$ 3 表达产物进一步做质谱分析证明表达产物序列正确。每升 pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS 细菌培养液可得  $\beta$ 3 表达产物约 20mg。

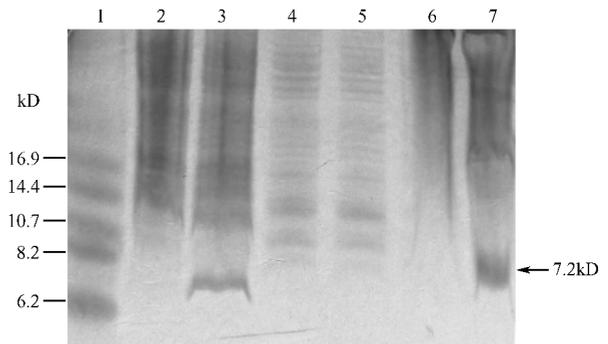


图 1 His- $\beta$ 3 表达情况的 Tris-Tricine SDS-PAGE 分析

Fig.1 Tris-Tricine SDS-PAGE analysis of the expression of His- $\beta$ 3 fusion protein

1: peptide molecular weights markers; 2: the total cell proteins of pET-His/BL21(DE3)plysS; 3: the total cell proteins of pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS; 4: the soluble proteins of pET-His/BL21(DE3)plysS; 5: the soluble proteins of pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS; 6: the insoluble proteins of pET-His/BL21(DE3)plysS; 7: the insoluble proteins of pET-His- $\beta$ 3/BL21(DE3)plysS

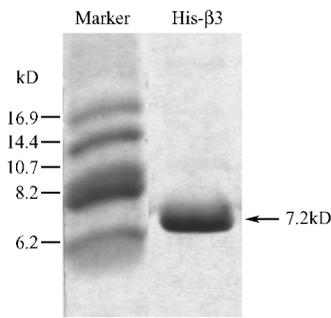


图2 分离纯化后的β3-His 表达产物的 Tris-tricine SDS-PAGE 分析

Fig.2 Tris-tricine SDS-PAGE of the β3-His fusion protein purified by the metal-chelating sepharose 6B FF

### 2.2 不同浓度的多肽对人肝癌高转移细胞株 HCCLM6 细胞和人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附的抑制作用

多肽与细胞共培养 3h 后,不同浓度的各种多肽对 HCCLM6 细胞和 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附的抑制率如表 1 和表 2。从表中结果可以看出,除无关肽外,其余各种多肽对细胞的粘附抑制率随着浓度的升高而逐步增高,呈现出剂量效应的线性趋势。经线性相关分析,β3 组、3 × β1 组和 GRGDS 组的 p 值均小于 0.05,具有统计学意义;β1 对 HCCLM6 细胞的粘附抑制作用与剂量之间接近显著性水平(p 值为 0.054)。另外还可以看出,β3 肽对 HCCLM6 细胞和 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附的抑制作用大于 β1 肽、GRGDS 及三倍浓度的 β1。

表 2 不同浓度的多肽对 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附作用的影响

Table 2 The effect of peptides on SMMC-7721 cells adhesion to FN at different concentrations

Peptides	Adhesion inhibition rate (%)				r	p
	10	20	50	100μmol/L		
β3	12.1	28.4	44.3	47.9	0.88	0.049
β1	4.1	1.21	13	17.5	0.95	0.015
3 × β1	7.9	12.7	21.3	28.6	0.95	0.01
GRGDS	5.1	12.2	17.6	23.6	0.94	0.019
Negative Control	3.48	0	0.111	0.182	-0.31	0.61

9.87%、3.56%、3.34%和 0.182%(图 3)。

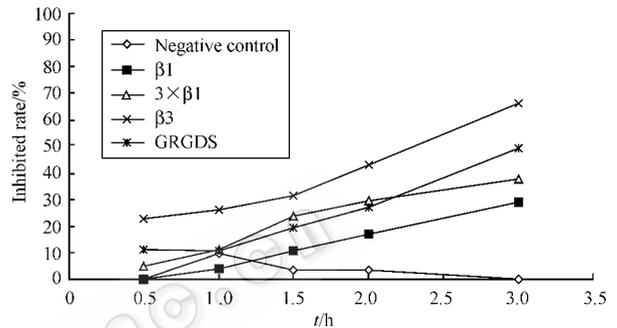


图 3 各种多肽作用后不同时间对 HCCLM6 细胞与 FN 粘附的影响

Fig.3 The effect of peptides on HCCLM6 cells adhesion to FN at different time

与 SMMC-7721 细胞作用后 0.5h、1h、1.5h、2h 和 3h,各种多肽对细胞与 FN 粘附的抑制率分别为:β3: 15.63%、16.7%、23.08%、34.36% 和 47.9%;β1: 0%、7.78%、8.59%、11.99%、和 17.5%;3 × β1: 3.33%、9.6%、14.9%、22.2% 和 28.6%;GRGDS: 6.44%、11.18%、19.18%、22.94% 和 23.6%;无关肽: 1.91%、0%、0%、0.112% 和 0.174%(图 4)。

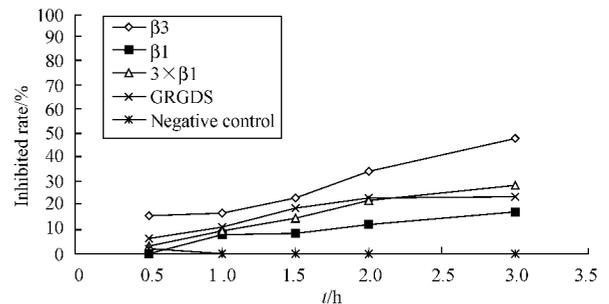


图 4 各种多肽作用不同时间后对 SMMC7721 细胞与 FN 粘附作用的影响

Fig.4 The effect of peptides on SMMC-7721 cells adhesion to FN at different time

表 1 不同浓度的多肽对 HCCLM6 细胞与 FN 粘附作用的影响

Table 1 The effect of peptides on HCCLM6 cells adhesion to FN at different concentrations

Peptides	Adhesion inhibition rate (%)				r	p
	10	20	50	100μmol/L		
β3	11.8	21.7	37.5	66.4	0.99	0.001
β1	11	4.5	15.6	20	0.87	0.054
3 × β1	9.8	16.4	27.8	37.7	0.96	0.01
GRGDS	11.1	18.2	23.3	49.2	0.98	0.004
Negative Control	0	0.25	1.11	0.182	0.31	0.61

### 2.3 各种多肽作用后不同时间对 HCCLM6 细胞和 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附的抑制作用

与 HCCLM6 细胞作用后 0.5h、1h、1.5h、2h 和 3h,各种多肽对细胞与 FN 粘附的抑制率分别为:β3: 22.8%、26.32%、31.5%、43.13% 和 66.4%;β1: 0%、3.94%、10.85%、17.14% 和 29%;3 × β1: 4.6%、11.11%、23.6%、29.3% 和 37.7%;GRGDS: 11.18%、10.51%、19.34%、26.95% 和 49.2%;无关肽: 0%、

FN 的粘附都表现出了抑制作用,且随着作用时间的延长,对细胞的粘附抑制作用越明显,呈现时间-效应相关关系( $p < 0.05$ )。粘附抑制作用的强度依次为  $\beta 3$  肽  $> 3 \times \beta 1$  肽  $> \text{GRGDS} > \beta 1$  肽。无关肽对细胞与 FN 的粘附无影响( $p > 0.05$ )。各种多肽对 HCCLM6 细胞与 FN 粘附的抑制作用强于对 SMMC-7721 细胞与 FN 粘附的抑制作用。

### 3 讨论

肿瘤细胞的高转移特性与肿瘤细胞的高粘附特性有关。阻断肿瘤细胞的粘附可能是预防肿瘤转移和复发的最佳途径。许多的研究表明,人工合成的一些能被细胞粘附分子特异识别、结合的短肽及其衍生物如重复序列能抑制多种肿瘤细胞的粘附和转移<sup>[11,12]</sup>。刘银坤等<sup>[5,6]</sup>根据整合蛋白  $\beta$  亚基及部分  $\alpha$  亚基 N 端的保守序列设计了抗粘附  $\beta$  肽,发现其能阻断肿瘤细胞的粘附,并具有对高转移的人肝癌裸鼠模型 LCID20 肝癌切除术后肝内转移和肺转移有强大抑制作用<sup>[7-10]</sup>。在此基础上,为了延长多肽的半衰期,增加抗转移效果,我们设计了  $\beta$  肽的 3 个重复序列- $\beta 3$ ,并构建  $\beta 3$  表达质粒,采用大肠杆菌表达系统表达。表达产物为 His- $\beta 3$  融合蛋白包涵体。 $\beta 3$  多肽的结构简单,没有复杂的高级结构,因此对于复性的要求就比较低。包涵体变性后用金属螯合琼脂糖层析纯化,利用  $\beta 3$  的疏水性,透析掉变性剂就可以得到很纯的  $\beta 3$  多肽,得率也比较高。每升培养液中可以得到约 20mg 纯度为 92.2% 的  $\beta 3$  产物。因此 pET-His 表达系统是高效表达  $\beta 3$  的合适的表达系统。

用 FN 作为细胞外基质成分,研究  $\beta 3$  对肿瘤细胞与 FN 粘附的影响。结果发现,所表达出的  $\beta 3$  对肿瘤细胞与 FN 粘附具有特异的抑制作用,呈现剂量效应相关关系和时间效应相关关系。其抑制细胞粘附作用的强度大于  $\beta 1$  肽、3 倍浓度的  $\beta 1$  肽和 GRGDS。

$\beta$  肽可能通过两种途径抑制了肿瘤细胞与 FN 的粘附:一是  $\beta$  肽与含有 RGD 序列的所有的基质蛋白结合,竞争性地占据了整合蛋白的结合位点;另外,由于  $\beta$  肽来源于整合蛋白所有  $\beta$  亚基和部分  $\alpha$  亚基的保守序列,所以  $\beta$  肽也能和整合蛋白结合,从而抑制整合蛋白的粘附活性。 $\beta 3$  的粘附抑制作用强于  $\beta 1$ ,可能是由于重复序列肽有较多的与细胞结合位点,能更有效地与配体结合。

基因工程药物是新药开发的重要发展方向,目

前我国的基因工程制药已初具规模,但是绝大多数药物均为仿制,因此发展具有自主知识产权的基因工程新药尤为迫切和重要。用 pET-His 表达载体高效表达出了  $\beta 3$ ,分离纯化容易。这一载体是适合  $\beta 3$  的表达的。表达出的  $\beta 3$  具有抑制肿瘤细胞与基质粘附的作用,可能成为抗肿瘤转移的新的手段。为抗肿瘤转移药物的研制提供了新的思路。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Okegawa Takatsugu LY, Pong Reychen *et al.* Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *Investigative Urology*, 2002, **167** (4): 1836 - 1843
- [2] Li FH(李凤和). The inhibitory effect of bioactive peptides on neoplasm metastasis. *Chinese Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*(口腔颌面外科杂志), 1999, **9**(3): 231 - 234
- [3] Zhao TH(赵铁华), Yang HS(杨鹤松), Gao W(高巍) *et al.* Activities of RGD and YIGSR derivative on anti-tumor invasion and metastasis. *Tumor*(上海肿瘤), 2001, **21**(3): 176 - 179
- [4] Cao K(曹凯), Zhao TH(赵铁华), Chen ZY(陈治宇) *et al.* The invasive capacity of human lung great cellular xancerous PG cells on reformed basement membrane and inhibition of synthetic peptides. *Cancer Research on Prevention and Treatment*(肿瘤防治研究), 2002, **29**(1): 20 - 22
- [5] Yin-Kun Liu, Atsuko Nemoto, Yan Feng *et al.* The binding ability to matrix proteins and the inhibitory effect on cell adhesion of synthetic peptides derived from a conserved sequence of integrins. *Journal of Biochemistry*, 1997, **121**(5): 67 - 74
- [6] Uemura TA, Nemoto, YK Liu. Synthetic peptide derived from a conserved sequence of integrin  $\beta$  subunit. *Research Advance in Bioscience & Bioengineering*, 2000 (1): 65 - 83
- [7] Sun JX(孙婧璟), Zhou XD(周信达), Liu YK(刘银坤) *et al.* Study on the inhibitory effect of liver cancer metastasis and recurrence after early stage hepatectomy by anti-adhesion preparations. *Chinese Journal of General Surgery*(中华普通外科杂志), 1999, **14**(4): 282 - 284
- [8] Sun JJ, Zhou XD, Liu YK *et al.* Inhibitory effects of synthetic  $\beta$  peptide on invasion and metastasis of liver cancer. *Cancer Research and Clinical Oncology*, 2000, **126**: 595 - 600
- [9] Sun JX(孙婧璟), Zhou XD(周信达), He JY(贺建宇) *et al.* Inhibition of the nude mice liver cancer metastasis and recurrence by beta peptides. *Chinese Journal of Experimental Surgery*(中华实验外科杂志), 2000, **17**(5): 418 - 420
- [10] Sun JX(孙婧璟), Zhou XD(周信达), Liu YK(刘银坤) *et al.* Experimental study of anti-adhesion drugs on the nude mice liver cancer metastasis and recurrence. *Chinese Journal of Digestion*(中华消化杂志), 2000, **20**(1): 53 - 54
- [11] Fujisawa N, Sakao Y, Hayashi S *et al.* Alpha-chemokine growth factor for adenocarcinomas, a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. *J. Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126**(1): 245 - 253
- [12] Chene P, Fuchs J, Bohn J *et al.* A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumor cell lines. *J Mol Biol*, 2000, **299**(1): 245 - 253