

## 以葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 为靶向的胰蛋白酶抑制剂抗肠癌效应研究

赵超<sup>▲</sup> 李宗伟<sup>▲</sup> 付荣 赵亚蕊 史通麟 李卓玉<sup>△</sup>

(山西大学生物技术研究所-化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

**【摘要】** 目的 构建以肿瘤细胞表面葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 为靶向的重组绿豆胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor, TI) 活性片段 GBP-TI, 并探讨其抗肠癌的分子靶向效应。方法 用带有 GRP78 结合肽 (GRP78 binding peptide, GBP) 表达序列的引物 PCR 扩增胰蛋白酶抑制剂活性片段, 构建 GBP-TI 的原核表达载体; 采用 GST 亲和层析柱纯化获得 GBP-TI 蛋白; 激光共聚焦方法检测 GBP-TI 与 GRP78 的相互作用; MTT 和 DAPI 细胞核染色方法分别检测 GBP-TI 对大肠癌细胞存活和凋亡的影响。结果 GBP-TI 能够与大肠癌细胞表面的 GRP78 相互作用; 与 GST-TI 相比, GBP-TI 能够剂量依赖性地诱导大肠癌细胞死亡, 而对正常细胞生长无明显影响。结论 GBP-TI 可以通过结合肿瘤细胞表面 GRP78 蛋白特异性杀伤肿瘤细胞。本研究为肿瘤靶向治疗提供了一种新的策略。

**【关键词】** 胰蛋白酶抑制剂 (TI); 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78); 大肠癌; 靶向药物

**【中图分类号】** R 735.3 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2013.02.004

## Anti-cancer effects of trypsin inhibitor targeting glucose-regulated protein 78 (GRP78) in colorectal cancer cells

ZHAO Chao<sup>▲</sup>, LI Zong-wei<sup>▲</sup>, FU Rong, ZHAO Ya-rui, SHI Tong-lin, LI Zhuo-yu<sup>△</sup>

(Key Laboratory of Biochemical and Molecular Engineering, Ministry of Education-Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China)

**【Abstract】 Objective** To construct the active fragment of recombinant trypsin inhibitor GBP-TI, which targets glucose-regulated protein 78 (GRP78) existed in tumor cell surface, and to investigate its molecular targeting effects on colorectal cancer cells. **Methods** To construct the GBP-TI expressing vector, the primer containing the expressed sequence of GRP78 binding peptide (GBP) was used to amplify the trypsin inhibitor active fragment (TI); GBP-TI protein was purified by GST-affinity chromatography. The interaction of GBP-TI with GRP78 on cell surface was confirmed by confocal immunofluorescence analysis. The effects of GBP-TI on cell survival and apoptosis were detected by MTT and DAPI staining, respectively. **Results** GBP-TI was able to interact with GRP78 existed in colorectal cancer cell surface. In contrast to GST-TI, GBP-TI could induce apoptosis in colorectal cancer cells in a dose-dependent manner, but had a negligible effect on the growth of normal cells.

**Conclusions** GBP-TI can kill tumor cells through specifically binding to cell surface GRP78. This study provides a new strategy for targeted cancer therapy.

国家自然科学基金项目 (31201072, 31271516, 81150026); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2010 - 2012); 山西省青年科学基金项目 (2012021028 - 4); 山西省国际科技合作项目 (2011081058)

<sup>▲</sup>Co-first authors; <sup>△</sup>Corresponding author E-mail: lzy@sxu.edu.cn

**【Key words】** trypsin inhibitor (TI); glucose-regulated protein 78 (GRP78); colon cancer; targeted drugs

\* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201072, 31271516, 81150026), Shanxi Scholarship Council of China (2010-2012), Shanxi Province Science Foundation for Youths (2012021028-4) and International Cooperation Project of Shanxi Province (2011081058).

肿瘤是严重危害人类生命的重大疾病之一。传统的治疗手段非选择性地杀伤肿瘤细胞,产生了较大的毒性作用和不良反应,因此寻找新的分子靶点、开发高效低毒的分子靶向抗癌药物已成为抗肿瘤研究的重要课题。

葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)是位于细胞内质网中的重要分子伴侣蛋白。GRP78在肿瘤细胞中通常发生过表达,促进多个肿瘤恶性特征的形成。值得关注的是,肿瘤细胞中的GRP78可以转移到细胞膜表面发挥信号分子受体的功能。因此,肿瘤细胞表面GRP78蛋白可以作为肿瘤靶向治疗的重要靶点<sup>[1]</sup>。目前,已发现多个多肽序列可以与GRP78蛋白结合并发生细胞内化过程,如WIFPWIQL<sup>[2]</sup>、WDLAWMFRLPVG<sup>[2]</sup>和GIRLRG<sup>[3]</sup>。

胰蛋白酶抑制剂能够抑制肿瘤细胞的增殖、迁移,并促进肿瘤细胞的凋亡,其在抗肿瘤方面的效应受到研究者的广泛关注<sup>[4-6]</sup>。绿豆胰蛋白酶抑制剂全长72个氨基酸,含有赖氨酸和精氨酸两个活性中心<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现绿豆胰蛋白酶抑制剂赖氨酸活性中心(命名为TI),具有较高的胰蛋白酶抑制剂活性,能够抑制大肠癌细胞SW480细胞迁移,但对细胞存活无显著影响<sup>[8]</sup>。

本研究旨在通过基因工程手段构建GRP78结合肽段WIFPWIQ与TI的融合蛋白GBP-TI表达载体,通过GST亲和层析柱纯化获得GBP-TI蛋白,探讨GBP-TI能够通过细胞表面GRP78实现靶向抗肠癌效应,从而为肿瘤靶向药物的开发提供一种新的策略。

## 材料和方法

**菌株与质粒** *E. coli* DH5a、*E. coli* BL21和载体pGEX-4T-1由本室保存。重组质粒pGEX-4T-1-LysGP33由中科院上海生化所戚正武教授馈赠。

**细胞系** 人结肠癌细胞系SW620、DLD1、人正常肝细胞HL7702和人胚胎肾细胞HEK293由本室保存。

**试剂** DMEM培养基(美国Thermo公司), Glutathione Sepharose 4 Fast Flow(美国GE Healthcare公司); BApNA(苯甲酰-dl-Arg-P-硝基酰替苯胺盐酸盐,上海三杰生物技术有限公司);胰

蛋白酶(北京北方同正生物技术发展公司); MTT(北京索莱宝科技有限公司), GRP78和GST抗体(江苏碧云天生物技术研究所)。其他化学试剂均为进口分装或国产分析纯试剂。

### GBP-TI表达载体的构建及蛋白表达和纯化

设计GBP-TI表达序列扩增引物(图1),以pGEX-4T-1-LysGP33质粒中TI表达序列为模板,PCR扩增GBP-TI表达序列,扩增片段与pGEX-4T-1质粒双酶切,连接产物转化大肠埃希菌*E. coli* DH5 $\alpha$ ,获得GBP-TI原核表达质粒pGEX-4T-1-GBP-TI。质粒转化大肠埃希菌BL21,构建大肠埃希菌工程菌pGEX-4T-1-GBP-TI/BL21。将该工程菌接种在含氨苄青霉素的LB培养基中,37℃摇床培养至 $D_{600}$ 约为0.5,加IPTG至终浓度为0.5 mmol/L进行诱导表达。37℃培养3 h后,8 000 r/min离心10 min收集菌体,悬浮于PBS缓冲液中,冰上放置。用超声波破菌体,13 000 r/min离心10 min沉淀细胞碎片。取上清过GST亲和层析柱,PBS缓冲液洗去杂蛋白,10 mmol/L还原谷胱甘肽竞争洗脱目的蛋白,10% SDS-PAGE检测目的蛋白纯化效果。

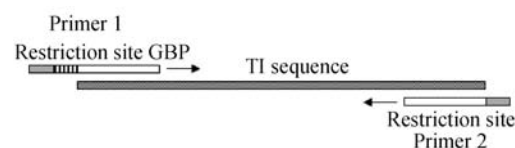


图1 GBP-TI表达序列扩增示意图

Fig 1 Amplification schemes of GBP-TI expressed sequence

**GBP-TI胰蛋白酶抑制剂活性测定** 以BApNA(苯甲酰-dl-Arg-P-硝基酰替苯胺盐酸盐)为底物,在3 mL缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)中加入40  $\mu$ g胰蛋白酶和一定量的GBP-TI,37℃保温5 min,加入底物BApNA(150 mmol/L,溶于DMSO)17  $\mu$ L。继续保温10 min,加入33%的乙酸溶液250  $\mu$ L,终止反应,在410 nm波长处测定吸光度值(D)。由于胰蛋白酶可催化底物水解BApNA,引起410 nm波长处吸光度增加,加入重组胰蛋白酶抑制剂后可使410 nm波长处吸光度减少,根据减少程度可知抑制剂的抑制活性。

**细胞培养** 人结肠癌细胞系SW620、DLD1、人正常肝细胞HL7702和人胚胎肾细胞HEK293。细

胞用含10%灭活新生牛血清的DMEM培养基,在5% CO<sub>2</sub>,37℃恒温培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

**激光共聚焦检测 GBP-TI 与细胞表面 GRP78 相互作用** 将生长状态良好的DLD1细胞接种到6孔培养板中的盖玻片上,细胞生长至50%融合时用GBP-TI处理24 h。然后PBS洗涤、免疫染色固定液固定30 min。5% BSA(PBS配制)封闭30 min。加入兔抗GRP78的多克隆抗体(1:200)和鼠抗GST的单克隆抗体(抗体浓度为1:100),4℃孵育过夜,用PBS清洗细胞3次,加入FITC标记的羊抗兔和TRITC标记羊抗鼠二抗,室温避光孵育1 h,PBS洗涤3次,用Olympus Fluoview FV1000激光共聚焦显微镜观察标记结果并拍摄图像,分析荧光分子的共定位情况。

**MTT法 GBP-TI 对细胞存活的影响** 选取对数生长期的SW620、DLD1、HL7702和HEK293细胞,经胰酶消化后,以7 000/100 μL的细胞浓度接种到96孔培养板。37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。待细胞贴壁后取出培养板,以浓度为0、5、10、20 μmol/L的GBP-TI处理细胞48 h后,每孔加入20 μL MTT(5.0 mg/mL),继续培养4 h,吸弃板中的培养液,每孔加入150 μL的DMSO,震荡均匀,于570 nm处测定各孔D值。

**细胞核 DAPI 染色观察 GBP-TI 诱导细胞凋亡** 人结肠癌DLD1细胞以4 × 10<sup>5</sup>/mL细胞密度接种于6孔板。待细胞贴壁后,加入GBP-TI处理细胞,倒置显微镜下拍摄细胞状态变化。培养24 h后,弃去培养液,免疫染色固定液固定20 min,0.3% Triton X-100孵育10 min,DAPI染色10 min,荧光显微镜下观察细胞核形态变化。

**统计学处理** 结果中的数据表达为 $\bar{x} \pm s$ ,数据图中用误差棒(Error Bar)表示标准差,单因素分析采用Student's *t* 检验,数据经SPSS 11.0统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

**GBP-TI 蛋白表达、纯化及酶活力测定** 将重组质粒pGEX-4T-1-GBP-TI经BamH I与Xho I双酶切鉴定,获得了与预期大小一致的片段(图2A),将酶切阳性菌液送至公司测序,测序结果与目的基因片段一致,表明质粒构建成功。将pGEX-4T-1-GBP-TI质粒转化到*E. coli* BL21进行诱导表达、纯化,得到纯度较高的GBP-TI融合蛋白,其相对分子

质量( $M_r$ )约为30 000,与预期大小相符(图2B)。采用紫外吸收法测定GBP-TI的胰蛋白酶抑制剂活性,GBP-TI与GST-TI具有相当的胰蛋白酶抑制剂活力,GBP-TI与胰蛋白酶摩尔比在1:4时,抑制率可达到90%以上(图2C),表明加入GRP78结合肽的不影响TI的胰蛋白酶抑制剂活性。

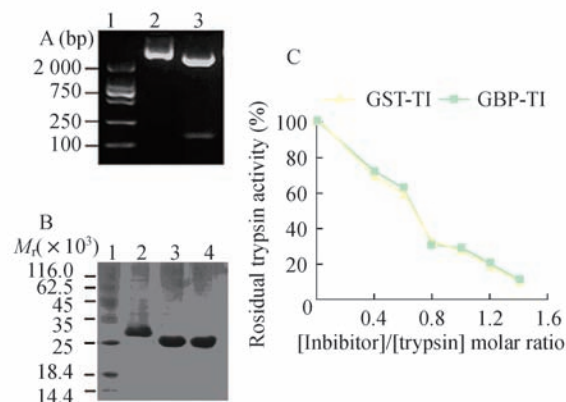


图2 GBP-TI克隆、表达及酶活力测定

Fig 2 Cloning, expression and activity determination of GBP-TI protein

A: Identification of recombinant pGEX-4T-1-GBP-TI by restriction enzyme. Lane 1: DL2000 DNA marker; Lane 2: pGEX-4T-1-GBP-TI; Lane 3: Xho I/BamH I double digestion of pGEX-4T-1-GBP-TI. B: SDS-PAGE detection of GBP-TI expression products; Lane 1: Standard protein marker; Lane 2: Purified GBP-TI protein; Lane 3: Purified GST-TI protein; Lane 4: Purified GST protein. C: Trypsin inhibitor activity detection of GBP-TI.

**激光共聚焦检测 GBP-TI 与细胞表面 GRP78 相互作用** 为验证GBP-TI能否与肠癌细胞表面的GRP78蛋白结合,我们采用免疫细胞化学染色方法检测了GBP-TI与DLD1细胞表面GRP78的定位关系。细胞表面GRP78蛋白(绿色)和GBP-TI(红色)复染结果表明,GBP-TI和GRP78在DLD1细胞有明显的共定位(黄色),表明GBP-TI能够与肠癌细胞表面的GRP78蛋白结合(图3)。

**GBP-TI 对肠癌细胞存活的影响** 为了确定GBP-TI对肿瘤细胞生长的影响,用不同浓度的GBP-TI处理人结肠癌细胞系SW620、DLD1、人正常肝脏细胞HL7702和人胚肾细胞HEK293。与GST、GST-TI蛋白相比,GBP-TI能够剂量依赖性诱导肠癌DLD1和SW620细胞死亡,半数致死剂量约为5 μmol/L。在相同浓度下,GBP-TI对人正常组织细胞系HEK293和HL-7702细胞存活影响不

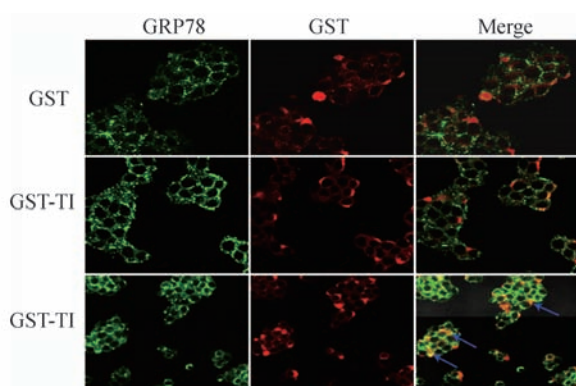


图3 免疫化学染色检测 GBP-TI 与细胞表面 GRP78 相互作用 ( $\times 200$ )

Fig 3 Detection of the interaction between GRP78 and GBP-TI by confocal immunofluorescence analysis ( $\times 200$ )

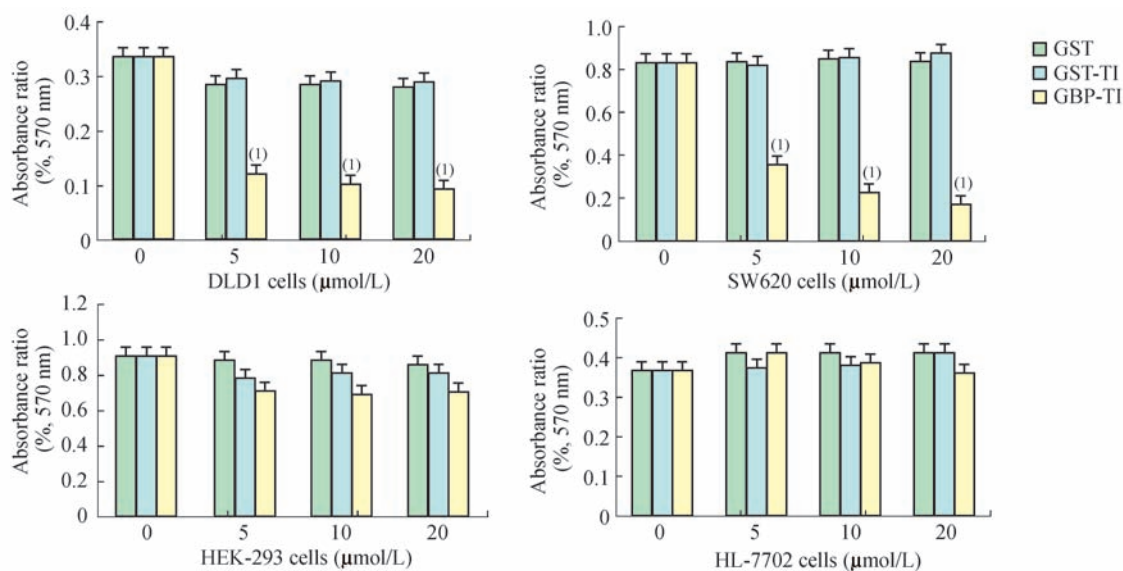


图4 MTT 检测 GBP-TI 对肠癌细胞生长的影响

Fig 4 The effect of GBP-TI on the growth of DLD1, SW620, HEK-293 and HL-7702 cells

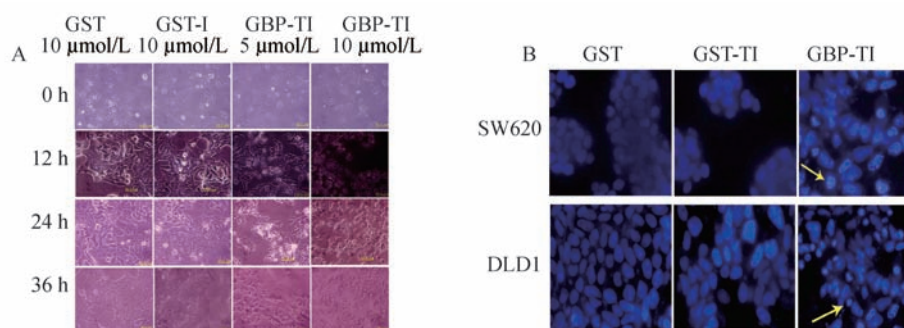


图5 DAPI 染色检测 GBP-TI 诱导细胞凋亡 ( $\times 400$ )

Fig 5 Detection of GBP-TI-induced apoptosis by DAPI staining ( $\times 400$ )

A; DLD1 cells were treated with various concentrations of GBP-TI for the indicated times. Cell morphology was observed by inverted microscope. B; DLD1 cells were treated with GBP-TI and the nucleus was stained with DAPI. Representative images were obtained by confocal microscopy.

显著(图4)。以上结果表明,GBP-TI能够特异性靶向抑制肠癌细胞生长,表现出对肿瘤细胞的特异靶向性。

**GBP-TI 诱导肠癌细胞凋亡检测** 为了进一步确定 GBP-TI 抑制肿瘤细胞生长的分子机制,我们用  $10 \mu\text{mol/L}$  的 GBP-TI 处理肠癌 DLD1、SW620 细胞,倒置显微镜下观察其形态变化。与 GST、GST-TI 蛋白相比, $10 \mu\text{mol/L}$  的 GBP-TI 处理后,细胞发生明显皱缩、变圆,部分细胞发生漂浮,处理 36 h 后细胞完全死亡(图 5A)。DAPI 细胞核染色后可见细胞核发生浓缩变亮,并出现典型的凋亡小体(图 5B)。以上结果表明,GBP-TI 是通过诱导肠癌细胞凋亡从而抑制肠癌细胞存活的。

## 讨 论

肿瘤的分子靶向治疗是一种非常有前景的治疗方式,寻找合适的分子靶点是实现肿瘤靶向治疗的关键。GRP78 蛋白是存在于所有细胞内质网中的分子伴侣蛋白,帮助内质网中新生肽链折叠与装配,并参与内质网应激反应的调控<sup>[9]</sup>。值得关注的是,肿瘤细胞中的 GRP78 蛋白可以转移到细胞膜表面发挥信号分子受体的功能<sup>[10]</sup>。已发现多个多肽序列可以与 GRP78 蛋白结合并发生细胞内化过程,这为以 GRP78 为分子靶点的肿瘤治疗奠定了基础。本课题组发现大肠癌细胞表面也存在 GRP78 蛋白分子,因此构建了 GRP78 结合多肽 WIFPWIQL 与绿豆胰蛋白酶抑制剂赖氨酸活性片段的融合蛋白 GBP-TI,实现了靶向诱导肠癌细胞凋亡,为肿瘤的靶向治疗提供了一种有效、可行的策略。

本课题组前期研究了绿豆胰蛋白酶抑制剂赖氨酸活性片段 GST-TI 对大肠癌细胞生物特性的影响,发现 GST-TI 能够抑制大肠癌细胞 SW480 细胞迁移,但对细胞存活无显著影响<sup>[8]</sup>。添加了 GRP78 结合多肽 WIFPWIQL 后的 GBP-TI 蛋白不但保留了 GST-TI 的胰蛋白酶抑制剂活性,而且表现出对人肠癌细胞特异靶向性杀伤,而对人正常组织细胞系生长的影响不明显。我们认为,GST-TI 分子中的 WIFPWIQL 可通过与肠癌细胞表面的 GRP78 蛋白结合,来介导 GST-TI 分子的细胞内化过程。进入细胞中 GST-TI 则通过干扰细胞中细胞器或功能分子的正常功能,导致细胞凋亡。

细胞内多个细胞器都具有胰蛋白酶活性,如泛素-蛋白酶体降解系统中的蛋白酶体(proteasome)的 20 S 催化颗粒具有类糜蛋白酶、类胰蛋白酶和肽-谷氨酰胺肽水解酶活性,并且其活性状态对于细胞正常功能的维持至关重要。蛋白酶体抑制剂能通过抑制蛋白酶体活性进而干扰和影响细胞原有的功能,尤其是对肿瘤生长有明显的抑制作用<sup>[11]</sup>。因此,进入肿瘤细胞的 GBP-TI 可能通过抑制蛋白酶体的胰蛋白酶活性干扰细胞内泛素-蛋白酶体降解系统正常功能,从而诱导肿瘤细胞的凋亡。GBP-TI 是否通过细胞表面 GRP78 蛋白进入肿瘤细胞内部,进而以泛素-蛋白酶体系统为靶点诱导肿瘤细胞凋亡还有待于进一步实验证实(图 6)。此外,GBP-TI

靶向抗肿瘤效应还需要在体整体动物实验进一步验证。

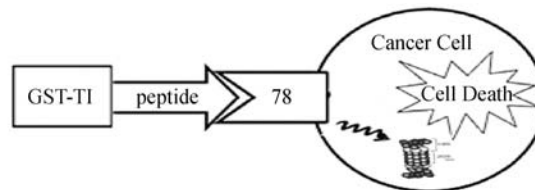


图 6 GBP-TI 结合癌细胞表面 GRP78 进入细胞抑制蛋白酶体活性引起癌细胞死亡

Fig 6 The pathway of GBP-TI enters into cancer cells and inhibits activity of proteasomes, which further induces apoptosis by the association of GBP-TI and cell surface GRP78

综上所述,本研究采用基因工程的方法构建了基于绿豆胰蛋白酶抑制剂、以细胞表面 GRP78 蛋白为靶点的重组靶向抗肿瘤活性分子 GBP-TI。GBP-TI 能够特异、高效地诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常组织细胞生长影响不明显,表现出抗肿瘤靶向性。本研究为多肽类肿瘤靶向药物的开发提供了一种新的实现策略,具有重要的理论意义和应用价值。

**致谢** 本研究得到了戚正武院士及其课题组的指导和大力支持。

## 参 考 文 献

- [1] Li Z. Glucose regulated protein 78: A critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 13 - 22.
- [2] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 275 - 284.
- [3] Passarella RJ, Spratt DE, van der Ende AE, et al. Targeted nanoparticles that deliver a sustained, specific release of Paclitaxel to irradiated tumors[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4550 - 4559.
- [4] Li YY, Zhang Z, Wang ZH, et al. rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 189(2): 166 - 175.
- [5] Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(2): 159 - 166.
- [6] Oka N, Okumura Y, Kanayama HO, et al. Amiloride and urinary trypsin inhibitor inhibit urothelial cancer invasion [J]. *Eur Urol*, 2003, 44(6): 737 - 741.

(下转第 158 页)