

基因重组去整合素 rAdinbitor 对 C6 神经胶质瘤细胞 FAK-Ras/MAPK 通路的影响 *

赵 霆 李金萍 胡燕荣 洪 艳 赵宝昌 **

(大连医科大学生物化学与分子生物学教研室, 大连 116044)

摘要 rAdinbitor 为大连医科大学生物化学与分子生物学教研室从旅顺产白眉蝮蛇毒腺中采用克隆技术得到的去整合素。之前研究已证明 rAdinbitor 具有抑制 C6 神经胶质瘤细胞增殖、促进 C6 神经胶质瘤细胞凋亡的作用。rAdinbitor 对 C6 细胞作用的分子机制需要进一步研究。在此研究中, 用 *E. coli* BL21/pET23b-adinbitor 表达 rAdinbitor, 通过 Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析柱对 rAdinbitor 进行纯化, 纯化蛋白经 Western blotting 鉴定。用纤连蛋白(fibronectin, FN)诱导 C6 细胞。通过免疫沉淀和免疫印迹检测不同浓度的 rAdinbitor 对 FN 诱导的 C6 细胞中黏着斑激酶(FAK)、MEK1/2、Caspase-3 的表达以及对 FAK、ERK1/2 活性的影响。研究表明: 各实验组不同浓度的 rAdinbitor 均能明显降低 FAK、MEK1/2 的表达, 对 Caspase-3 的表达起促进作用, 并对 ERK1/2 的磷酸化有明显的抑制作用; 除 10 mg/L rAdinbitor 对 FAK 磷酸化无明显抑制作用外, 其余浓度的 rAdinbitor 对 FAK 的磷酸化起了明显抑制作用。这说明 rAdinbitor 对 FAK 及其下游 Ras-MAPK 传导通路的抑制在其抑制 C6 增殖过程中起了重要作用, Caspase-3 表达升高提示, rAdinbitor 可能通过抑制 ILK 及其下游的 PI-3K/Akt 途径起到了促进细胞凋亡的作用。

关键词 白眉蝮蛇, 去整合素, rAdinbitor, C6 神经胶质瘤细胞, 纤连蛋白(FN)

学科分类号 Q71, R739.41

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00669

神经胶质瘤是神经系统中最常见的恶性肿瘤, 它起源于神经组织中的神经胶质细胞, 约占成人神经肿瘤的 35%~60%。目前, 手术、放疗、化疗等常规治疗方法对神经胶质瘤的治疗均不理想。手术局部治疗后恶性胶质瘤容易复发, 而放疗化疗难以消灭残余瘤灶^[1, 2]。因此人们积极开拓新的治疗神经胶质瘤的途径。

整合素为细胞表面受体的异源二聚体家族, 是一组跨膜糖蛋白。迄今为止已知有 18 种不同的 α 亚基和 8 种不同的 β 亚基组成至少 24 种的异源二聚体^[3, 4]。整合素主要介导细胞之间及细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间的黏附, 并介导细胞与 ECM 之间的双向信号传导, 对细胞的黏附、增殖、分化、转移、凋亡起到重要的调控作用, 在肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用^[5]。因为大部分整合素都识别 Arg-Gly-Asp (RGD)氨基酸序列, 而大多数 ECM 蛋白都含有 RGD 序列, 所以 RGD 序列已被认为是 ECM 成分与细胞整合素结合的位点^[5]。当整合素与 ECM 配体, 如纤连蛋白(fibronectin), 纤维蛋白原(fibrinogen), von Willebrand

因子, 玻连蛋白(vitronectin)等结合后, 可促使黏着斑(focal adhesion plaques, FAP)形成。在 FAP 处除了多种细胞骨架蛋白如桩蛋白(paxillin)、纽蛋白(vinculin)等^[6]外, 还存在很多重要的信号转导分子^[7, 8]。其中, 黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是非受体酪氨酸蛋白激酶, 被认为是整合素依赖性信号转导通路的基础分子, 在整合素介导的信号转导途径中起着关键作用^[9, 10]。活化的 FAK 通过下游与信号转导分子, 激活多条信号转导通路, 例如 Ras-MAPK 通路^[11], PI-3K 通路^[12]和 STAT1 通路^[13]。

去整合素(disintegrin)为一组源自于出血性蛇毒的抗黏附多肽或蛋白质的总称, 因其可强力拮抗整合素(integrin)而得名。其特征为富含半胱氨酸, 并多为含有 Arg-Gly-Asp (RGD)亲水性氨基酸序列的单链多肽或蛋白质分子。rAdinbitor 是本实验室通

* 国家自然科学基金资助项目(30572141)。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-86110309, E-mail: zhaobaochang2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-09-27, 接受日期: 2008-11-25

过克隆技术从旅顺产白眉蝮蛇毒腺中得到的去整合素。分子质量约为 9 ku, 由 73 个氨基酸残基组成, 含有 RGD 模体以及 12 个半胱氨酸。以前的实验已证实 rAdinbitor 能以剂量依赖性方式抑制 C6 细胞增殖, 并可促进 C6 细胞凋亡^[4]。为了研究 rAdinbitor 对 C6 细胞作用的分子机制, 本实验用纤连蛋白(FN)诱导 C6 细胞, 通过免疫沉淀及免疫印迹方法研究了不同浓度的 rAdinbitor 对 FAK、Ras-MAPK 通路以及 Caspase-3 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

重组表达菌 BL21/pET23b-adinbitor 为本实验室构建; 神经胶质瘤 C6 细胞购于中国科学院上海细胞库; Ni Sepharose 6 Fast Flow 购于 GE Healthcare 公司; 抗 FAK 多克隆抗体(FAK Ab-1)购自 Neomarkers 公司; 酪氨酸磷酸化鼠单克隆抗体 p-Tyr(PY99)、蛋白 A 琼脂糖珠(Protein A agarose)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; MEK1/2 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; ERK1/2 磷酸化单克隆抗体购自 CHEMICON 公司; Caspase-3 多克隆抗体购自武汉博士德生物制品公司; Pro-Light HRP 化学发光检测试剂购于北京天根生化科技公司; 纤连蛋白(FN)购自 Roche 公司; DMEM 培养基购自 GIBCO BRL 公司; 新生小牛血清(FBS)购自中国医学科学院血液研究所; HRP-羊抗兔 IgG 购自华美生物公司; IPTG 购自宝生物大连公司; Rabbit Anti- β -Actin 购自 BIOS 公司。

1.2 方法

1.2.1 rAdinbitor 的表达、纯化及鉴定。将重组表达菌 BL21/pET23b-adinbitor 接种于含氨苄青霉素 (100 mg/L) LB 培养基中, 37℃ 震荡培养, 以终浓度 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h; 离心弃上清, 细胞重悬于结合缓冲液 (5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH7.9) 中; 将细胞超声破壁后, 14 000 g 4℃ 离心 20 min, 取上清。用组氨酸亲和层析柱(Ni Sepharose 6 Fast Flow)纯化上清液中带 His 标签的 rAdinbitor, 通过增加洗脱液中的咪唑浓度纯化 rAdinbitor。将纯化的 rAdinbitor 经 Tricine-SDS PAGE 后, 电转移于 PVDF 膜上; 封闭液 (3% BSA 于 TBS) 室温封闭 2 h 后, 依次加入一抗 (鼠源 His. Tag 单克隆抗体 1:1 000) 和二抗。**1.2.2 Tricine-SDS PAGE。**以含尿素 16.5% 分离胶浓度的 Tricine-SDS PAGE 小分子质量蛋白质电泳

检测 rAdinbitor 纯化结果。分别以 40 V、80 V、120 V 跑完浓缩胶、间隙胶、分离胶。电泳完毕后用小分子质量蛋白固定液固定 30 min, 考马斯亮蓝染色 2 h, 过夜脱色^[15]。

1.2.3 细胞样品的制备。用 FN 包被细胞培养瓶, 37℃ 静置 2 h; 倾去包被液, 将 C6 细胞悬液 ($1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ /ml) 接种于培养瓶, 然后将不同浓度的 rAdinbitor 加入包被 FN 的培养瓶中, 设置未加 rAdinbitor 的阴性对照, DMEM 培养 C6 细胞。37℃, 5% CO₂ 孵箱中作用 16 h 后收集样品, 去除细胞培养液, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 吸干 PBS; 每个 24 cm² 培养瓶加入 0.4 ml (0.1 ml/10⁶ 个) 预冷的改良 RIPA 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.5% 脱氧胆酸钠, 2 mg/L Leupeptin, 1 mmol/L PMSF) 收集裂解物; 4℃, 14 000 g 离心 10 min, 取上清, Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.2.4 Western blotting。样品行 SDS-PAGE, 电转移于 PVDF 膜上; 封闭液 (3% BSA 于 TBS) 室温封闭 2 h; 依次加入一抗 [抗 FAK 多克隆抗体 (1:100 稀释), MEK1/2 抗体 (1:1 000 稀释), ERK1/2 磷酸化抗体 (1:1 000 稀释), Caspase-3 抗体 (1:100 稀释)] 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温作用 1 h 后显影。肌动蛋白作为蛋白质上样量的标定。

1.2.5 免疫沉淀法测定 FAK 酪氨酸磷酸化。取细胞样品各 100 μ g, 加入用 PBS 稀释 10 倍的 PY99 抗体 10 μ l, 室温下缓慢摇动 2 h, 加入 50 μ l Protein A 琼脂糖珠进行沉淀, 4℃ 过夜, 14 000 r/min 瞬时离心, 去上清, 收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 将琼脂糖珠-抗原抗体复合物用预冷 RIPA 缓冲液洗 3 次 (800 μ l/次), 用上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起, 沸水浴 5 min 后行 SDS-PAGE。Western blotting 分析同 1.2.4。

2 结 果

2.1 rAdinbitor 纯化结果及其鉴定

对诱导表达后的 rAdinbitor 进行组氨酸亲和层析后, 将所得的纯化蛋白行 Tricine-SDS PAGE。结果显示, 纯化蛋白成单条带迁移, 分子质量约为 9 ku (图 1)。rAdinbitor 是去整合素基因与带有 His. Tag 的 pET-23b 部分质粒序列共同表达的融合蛋白, 因此采用 His. Tag 单克隆抗体对电泳结果进行 Western blotting 鉴定。结果证实 9 ku 处蛋白质为 rAdinbitor (图 2)。

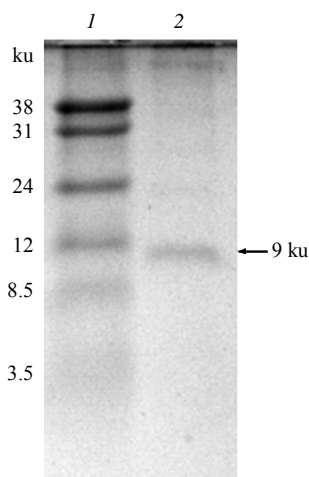


Fig. 1 Tricine-SDS PAGE of the protein purified with Ni Sepharose 6 Fast Flow

1: Rainbow colored protein low molecular mass markers; 2: The purified fusion protein.

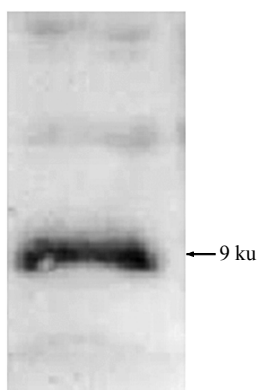


Fig. 2 Characterization of protein containing a His.Tag by Western blotting

2.2 rAdinbitor 作用下 FAK 的表达

图 3, 图 4 所示: 未接种于 FN 的 C6 细胞自身有一定的 FAK 表达, 而接种于 FN 的 C6 细胞, FAK 表达明显增加(* $P < 0.05$), 并且随着 FN 浓度升高 FAK 的表达呈增高趋势。图 5, 6 所示, 不同浓度的 rAdinbitor 均可明显抑制 FAK 表达(* $P < 0.05$), 且随着 rAdinbitor 浓度升高, 其对 FAK 表达的抑制呈增强趋势。

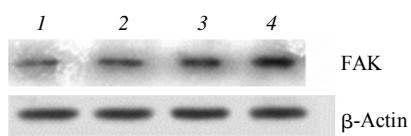


Fig. 3 FAK expression in C6 glioma cells seeded onto different concentrations of FN

1: C6 cells seeded on PBS; 2~4: Cells seeded onto 30 mg/L, 60 mg/L, 120 mg/L of FN respectively.

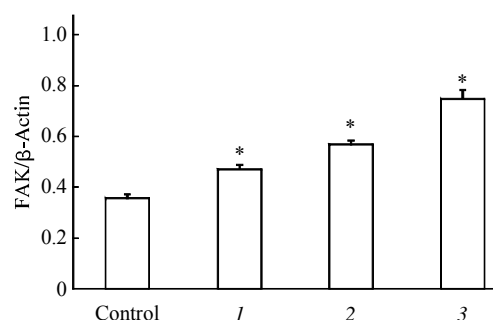


Fig. 4 Statistic analysis of FAK expression in C6 glioma cells seeded onto different concentrations of FN

Control: C6 cells seeded on PBS; 1~3: C6 cells seeded onto 30 mg/L, 60 mg/L, 120 mg/L of FN respectively; * $P < 0.05$ as compared with control.

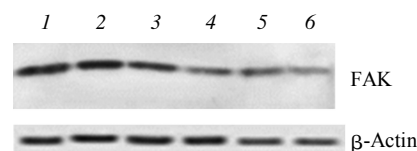


Fig. 5 Effects of rAdinbitor with different concentrations on FAK expression in C6 glioma cells

1: FAK expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 2~6: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAdinbitor on FAK expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN.

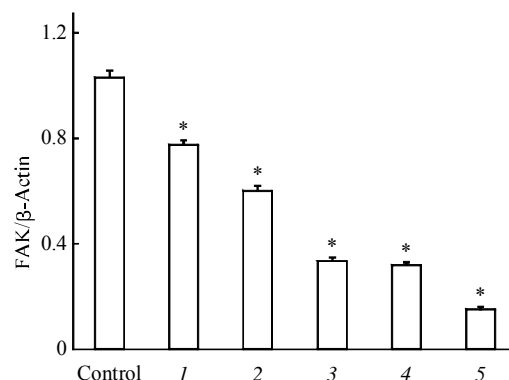


Fig. 6 Statistic analysis of effects of rAdinbitor with different concentrations on FAK expression in C6 glioma cells seeded onto 60 mg/L FN

Control: FAK expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 1~5: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAdinbitor on C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; * $P < 0.05$ as compared with control.

2.3 rAdinbitor 对 FAK 磷酸化的影响

如图 7, 8 所示, 除 10 mg/L rAdinbitor 对 FAK 磷酸化无明显抑制作用外(* $P > 0.05$), 其余受 rAdinbitor 作用的各组, FAK 磷酸化均受到明显抑制(* $P < 0.05$), 且随 rAdinbitor 浓度加大 FAK 的磷

酸化水平呈减弱趋势。

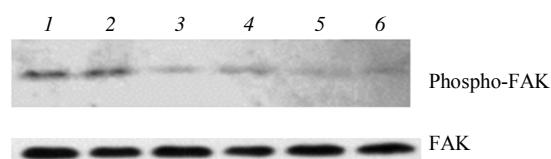


Fig. 7 Effects of rAidinbitor with different concentrations on FAK phosphorylation in C6 glioma cells seeded onto 60 mg/L FN

1: Phospho-FAK in C6 cells seeded onto 60 mg/L of FN; 2~6: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on Phospho-FAK in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN.

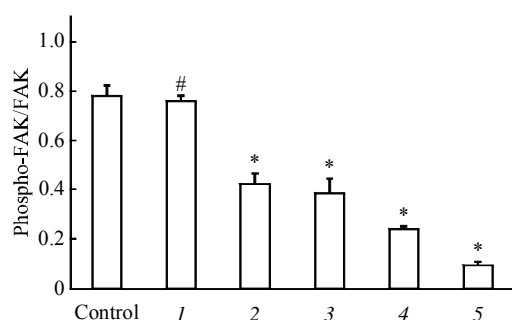


Fig. 8 Statistic analysis of the effects of rAidinbitor with different concentrations on FAK phosphorylation in C6 glioma cells seeded onto 60 mg/L FN

Control: Phospho-FAK in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 1~5: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; # $P > 0.05$, * $P < 0.05$ as compared with control.

2.4 rAidinbitor 对 MEK1/2 表达的影响

如图 9, 10 所示, 加入 rAidinbitor 的各实验组, MEK1/2 的表达明显降低 (* $P < 0.05$). 且随着 rAidinbitor 浓度增加, 其对 MEK1/2 表达的抑制呈增强的趋势。

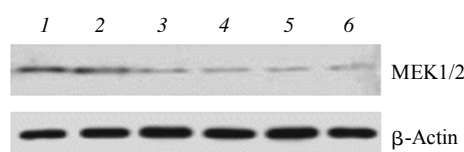


Fig. 9 The effects of rAidinbitor with different concentrations on MEK1/2 expression in C6 glioma cells

1: MEK1/2 expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 2~6: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on MEK1/2 expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN.

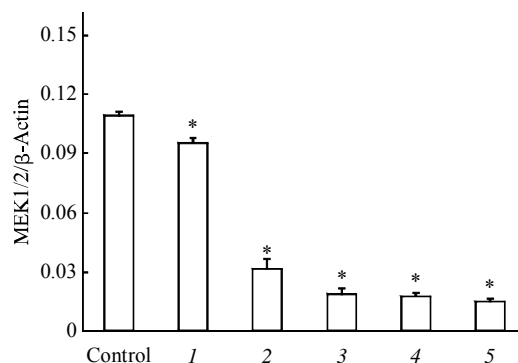


Fig. 10 Statistic analysis of the effects of rAidinbitor with different concentrations on MEK1/2 expression in C6 glioma cells seeded on 60 mg/L FN

Control: MEK1/2 expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 1~5: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; * $P < 0.05$ as compared with control.

2.5 rAidinbitor 对 Phospho-ERK1/2 表达的影响

如图 11, 12 所示, 不同浓度 rAidinbitor 对 ERK1/2 的磷酸化均有明显抑制作用 (* $P < 0.05$), 且随着 rAidinbitor 浓度增大, 抑制作用呈增强趋势。

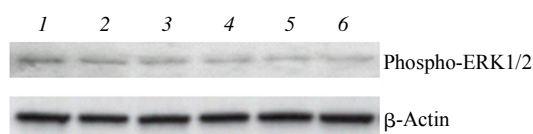


Fig. 11 The effects of rAidinbitor with different concentrations on ERK1/2 phosphorylation in C6 glioma cells

1: Phospho-ERK1/2 in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 2~6: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on Phospho-ERK1/2 in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN.

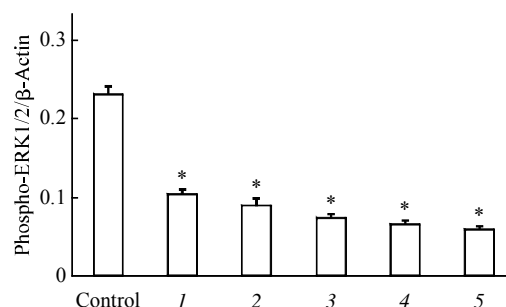


Fig. 12 Statistic analysis of the effects of rAidinbitor with different concentrations on Phospho-ERK1/2 in C6 glioma cells seeded on 60 mg/L FN

Control: Phospho-ERK1/2 in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 1~5: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAidinbitor on C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; * $P < 0.05$ as compared with control.

2.6 rAdinbitor 对 C6 细胞 Caspase-3 表达量的影响

如图 13, 14 所示, 不同浓度的 rAdinbitor 均能显著增高 Caspase-3 表达 (* $P < 0.05$), 且随 rAdinbitor 浓度的增加, 其对 Caspase-3 表达的促进呈增强趋势。

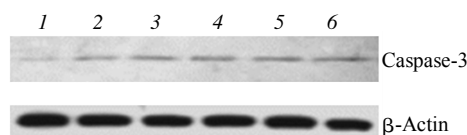


Fig. 13 The effects of rAdinbitor with different concentrations on Caspase-3 expression in C6 glioma cells
1: Expression of Caspase-3 in C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; 2~6: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAdinbitor on Caspase-3 expression in C6 cells seeded on 60 mg/L FN.

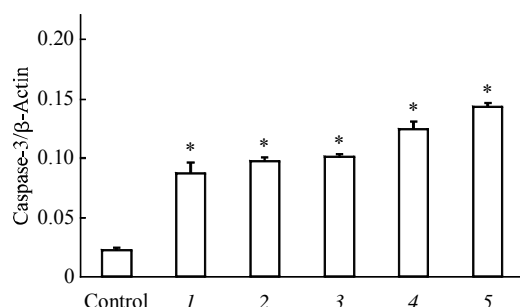


Fig. 14 Statistic analysis of the effects of rAdinbitor with different concentrations on Caspase-3 expression in C6 glioma cells seeded onto 60 mg/L of FN
Control: Caspase-3 expression in C6 cells seeded onto 60 mg/L of FN; 1~5: Effects of 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L rAdinbitor on C6 cells seeded onto 60 mg/L FN; * $P < 0.05$ as compared with control.

3 讨 论

整合素是细胞表面受体的异源二聚体家族, 是一组重要的跨膜糖蛋白, 它主要介导细胞与 ECM 及细胞与细胞间的黏附。整合素作为介导信号传递的膜分子, 参与细胞多种生理功能和病理变化, 如细胞的分化、增殖、迁移, 以及肿瘤细胞的侵袭和转移等。当整合素与 ECM 结合, 胞内区则与细胞骨架相接, 形成黏着斑, 同时, FAK、Src 等酪氨酸激酶以及其他信号分子也募集于此, 并引发一系列胞内信号转导事件的发生, 如 FAK、Src、Ras、PI3 激酶等的激活。因此 ECM-整合素-细胞骨架蛋白所构成的黏着斑是整合素信号转导的结构基

础。由整合素激活 FAK 介导的信号转导引起了越来越多的重视。FAK 在很多肿瘤中过表达, 包括乳腺癌^[16, 18]、甲状腺癌^[16]、卵巢癌^[19]、结肠癌^[17, 19, 20]等。研究表明, FAK 对肿瘤的增殖、抗凋亡、侵袭、转移和血管形成等行为起着重要的调控作用。活化的 FAK 可激活下游多条信号转导通路, 而 Ras-MAPK 通路是其中重要的一条, 也是研究较多的一条。Ras 蛋白是细胞增殖和分化的关键调节分子之一。研究表明, 活化的 Ras 蛋白在人类癌症中起着重要作用, 人类所有癌症中约有 30% 发现 ras 基因突变, 如胰腺癌、肺癌、膀胱癌等, 突变 ras 癌基因与多种人类肿瘤有关^[21, 22]。活化后的 Ras 激活 Raf-1, 进入 MAPK 通路。因此本实验选取 FAK-Ras/MAPK 通路作为研究对象。去整合素是一类含有 RGD 或 KGD 模序的小分子蛋白质, 通过竞争性抑制阻断了整合素与 ECM 的结合, 进而干扰了由整合素介导的信号转导通路。现已分离纯化的多种去整合素都检测出一定的抗肿瘤活性^[23, 24], 如 contortrostatin 可以抑制黑色素瘤细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞的增生^[25, 26], contortrostatin2 可抑制肺癌细胞在小鼠体内的生长^[27], eristostatin 可抑制黑色素细胞瘤生长并阻断其转移^[28]。我们研究室以前的研究^[14]证实, rAdinbitor 具有促进 C6 细胞的凋亡、抑制其增殖的作用。为了研究其分子机制, 本实验用不同浓度的 rAdinbitor 作用于 FN 诱导的 C6 细胞。选取 FAK, 其下游的 Ras-MAPK 信号转导通路中的 MEK1/2、ERK1/2, 以及 Caspase-3 作为研究对象。通过免疫沉淀和免疫印迹检测这些信号转导通路中关键分子的表达量和磷酸化改变。实验结果表明, rAdinbitor 对 FAK 表达量、磷酸化程度均呈剂量依赖性抑制作用。FAK 被激活表现为磷酸化。已知在整合素介导的胞内信号转导通路中, 活化的 FAK 作为连接物蛋白与 Src 家族直接作用, 并可以与连接物蛋白 Grb2 结合, 进而激活 Ras-MAPK 通路。因此通过 rAdinbitor 对 FAK 表达量及活性的抑制可以预测到它对 Ras-MAPK 通路的抑制。这也被 rAdinbitor 对 MEK1/2 的表达量、ERK1/2 磷酸化程度呈剂量依赖性抑制的结果所证实。Ras-MAPK 通路在细胞的生长、增殖、分化等过程中起了重要的调节作用, 因此 rAdinbitor 对 Ras-MAPK 通路的抑制在其抑制 C6 细胞增殖过程中起了重要作用。而 Caspase-3 的表达量增高提示, rAdinbitor 可能抑制了 ILK 的活性, 进而抑制了 PI-3K/Akt 通路, 并最终激活下游的 Caspase-3^[19, 29]。

理论上, 干预 MAPK 级联中任一种激酶都能代表一种阻止肿瘤生长的可行手段. 目前已有关于 Raf-1、MEK1 和 MEK2 的抑制剂的报道^[30], 而 rAdinbitor 则为治疗神经胶质瘤的研究提供了新的方向.

参 考 文 献

- Wygoda Z, Kula D, Bierzynska-Macyszyn G, *et al.* Use of monoclonal anti-EGFR antibody in the radioimmunotherapy of malignant gliomas in the context of EGFR expression in grade III and IV tumors. *Hybridoma (Larchmt)*, 2006, **25**(3): 125~132
- De Tribolet N. Immunological markers of brain gliomas. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*, 1981~1982: 113~121
- Parise L V, Lee J, Juliano R L. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2000, **10**(6): 407~414
- Zhao J H, Guan J L. Role of focal adhesion kinase in signaling by the extracellular matrix. *Prog Mol Subcell Biol*, 2000, **25**: 37~55
- Coppolino M G, Dedhar S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(2): 171~188
- Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, **285** (5430): 1028~1032
- Cary L A, Han D C, Guan J L. Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol*, 1999, **14**(3): 1001~1009
- Calderwood D A, Shattil S J, Ginsberg M H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 2000, **275**(30): 22607~22610
- Ramsay A, Marshall J F, Hart I R. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *J Cancer Metastasis Rev*, 2007, **26**(3~4): 567~578
- Hsia D A, Mitra S K, Hauck C R, *et al.* Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*, 2003, **160**(5): 753~767
- Yee K L, Weaver V M, Hammer D A. Integrin-mediated signaling through the MAP-kinase pathway. *J IET Syst Biol*, 2008, **2**(1): 8~15
- Matter M L, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem*, 2001, **276**(30): 27757~27763
- Xie B, Zhao J, itagawa M, *et al.* Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem*, 2001, **276**(22): 19512~19523
- Wang J H, Wu Y, Zhao B C. Cloning and characterization of Adinbitor, a novel disintegrin from the snake venom of Agkistrodon halys brevicaudus stejneger. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36** (6): 425~429
- Schagger H, Jagow G V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *J Anal Biochem*, 1987, **166**(2): 368~379
- Owens L V, Xu L, Craven R J, *et al.* Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, 1995, **55**(13): 2752~2755
- Owens L V, Xu L, Dent G A, *et al.* Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*, 1996, **3**(1): 100~105
- Cance W G, Harris J E, Iacocca M V, *et al.* Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(6): 2417~2423
- Judson P L, He X, Cance W G, *et al.* Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer*, 1999, **86**(8): 1551~1556
- Han N M, Fleming R Y, Curley S A, *et al.* Overexpression of focal adhesion kinase (p125FAK) in human colorectal carcinoma liver metastases: independence from c-src or c-yes activation. *Ann Surg Oncol*, 1997, **4**(3): 264~268
- Crul M, de Klerk G J, Beijnen J H, *et al.* Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. *Anticancer Drugs*, 2001, **12**(3): 163~184
- Reuter C W, Morgan M A, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational mechanism based treatment for hematologic malignancies?. *Blood*, 2000, **96**(5): 1655
- McLane M A, Sanchez E E, Perez J C. Disintegrins. *J Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2004, **4**(4): 327~355
- McLane M A, Joerger T, Mahmoud A. Disintegrins in health and disease. *Front Biosci*, 2008, **13**: 6617~6637
- Zhou Q, Sherwin R P, Parrish C, *et al.* Contortrostatin, a dimeric disintegrin from Agkistrodon contortrix, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, **61**(3): 249~260
- Francis S. Snake venom protein paralyzes cancer cells. *J Natl Cancer Ins*, 2001, **93**(4): 261~262
- Jacob A Galan, Elda E Sanchez, John C Perez. Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of Crotalus atrox. *Toxicon*, 2008, **51**(7): 1186~1196
- Danen E H, Marcinkiewicz C, Cornelissen L M, *et al.* The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp Cell Res*, 1998, **238**(1): 188~196
- Hecker T P, Gladson C L. Focal adhesion Kinase in cancer. *Front Biosci*, 2003, **8**: s705~714
- Sebolt-Leopold J S. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene*, 2000, **19**(56): 6594~6599

Effects of Recombinant Disintegrin rAdinbitor on FAK-Ras/MAPK Pathway in C6 Glioma Cells*

ZHAO Ting, LI Jin-Ping, HU Yan-Rong, HONG Yan, ZHAO Bao-Chang**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract rAdinbitor was cloned from *Gloydius blomhoffi brevicaudus* in the laboratory. Previous researches had proved that rAdinbitor could inhibit proliferation of C6 glioma cells as well as promote their apoptosis. The molecular mechanism of rAdinbitor's effects on C6 cells need to be further studied. rAdinbitor was expressed in *E. coli* BL21/pET23b-adinbitor and purified with Ni Sepharose 6 Fast Flow. The purified protein was confirmed by Western blotting. C6 cells were induced with fibronectin (FN). The effects of rAdinbitor with different concentrations on the expression of FAK, MEK1/2 and Caspase-3 as well as on activity of FAK and ERK1/2 in FN-induced C6 cells were studied by immunoblotting and immunoprecipitation. Results showed that rAdinbitor with different concentrations could obviously reduce the expression of FAK and MEK1/2, increase the expression of Caspase-3, as well as decrease ERK1/2 phosphorylation; besides 10 mg/L rAdinbitor, other concentrations' rAdinbitor could inhibit FAK phosphorylation obviously. All those effects were dose-dependent. Results indicate that the effects of rAdinbitor on decreasing expression and activity of FAK and inhibiting Ras-MAPK signaling pathway play an important role in suppressing the proliferation of C6. Furthermore, the increase in Caspase-3 expression implies that the increase in apoptosis of C6 cells might be due to the suppression of rAdinbitor on the activity of ILK and PI-3K/Akt pathway.

Key words *Gloydius blomhoffi brevicaudus*, disintegrin, rAdinbitor, C6 glioma cell, FN

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00669

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30572141).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-86110309, E-mail: zhaobaochang2003@yahoo.com.cn

Received: September 27, 2008 Accepted: November 25, 2008