

的大量增殖,都可能导致胶原总量的增加。因此博莱霉素致肺纤维化病理过程分两个阶段:早期为肺泡炎,晚期为肺纤维化。肺泡炎阶段,博莱霉素刺激大量炎性细胞产生氧自由基,细胞因子和酶参与了肺损伤,随后氧自由基刺激成纤维细胞分泌胶原蛋白形成肺纤维化^[7]。Hyp 是机体胶原蛋白的主要成分之一,约占其氨基酸总量的 13%,其他除弹性蛋白含有少量 Hyp (约1%)外,均不含 Hyp。因此组织中 Hyp 水平可作为其胶原组织代谢的重要指标^[8]。

本实验应用博莱霉素复制小鼠肺纤维化模型,观察发现模型组第7天肺泡炎明显,第14、28天形成纤维化,且第14、28天 Hyp 水平显著高于对照组($P < 0.05, 0.01$),主要病变与指标都与文献报道一致^[9],说明动物模型复制成功。

在肺纤维化的治疗上,目前公认疗效确切的糖皮质激素,早期应用效果好,中晚期则疗效不佳,且长期应用有不良反应,严重影响机体免疫功能,增加继发感染和呼吸衰竭的可能性。临床资料显示仅少于 30% 的患者激素治疗有效^[10]。现代实验研究及临床应用均表明,丹参在抗肺纤维化中作用确切,效果显著^[11],其防治肺纤维化的作用机制与氧自由基清除有关^[12]。作为丹参的有效成分丹参总酚酸,同样具有很强的抗氧化活性^[1],是否也具有抗肺纤维化的作用尚不清楚。本研究用丹参总酚酸治疗小鼠肺纤维化,观察发现与模型组相比肺指数明显降低;病理形态学上早期肺泡炎减轻,晚期纤维化程度减轻;肺组织 Hyp 水平显著低于模型组。表明丹参总酚酸对博莱霉素所致小鼠肺纤维化的发生发展有一定的抑制作用,其作用机制可能与其抗氧化活性及

抑制成纤维细胞分泌胶原蛋白有关。提示丹参总酚酸对小鼠肺泡炎及肺纤维化有一定的抑制作用,为丹参总酚酸预防和治疗肺纤维化提供了实验依据。

参考文献

- [1] 李玉娟, 杜冠华. 总丹酚酸和银杏叶提取物对血管平滑肌细胞保护作用的比较 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(11): 844-847.
- [2] 董 静, 苗维纳, 罗桂林, 等. 丹参对实验性肺纤维化小鼠病理变化和核因子- $\kappa\beta$ 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1428-1431.
- [3] Szapitel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120: 893-899.
- [4] Thrall R S. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary in the rat [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1982, 126: 488-492.
- [5] Russell P B, Mike N, Karrie W, et al. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282: 719-726.
- [6] Murrell G A C, Francis M J O, Bromley L, et al. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals [J]. *Biochem J*, 1990, 265: 659-661.
- [7] Hagiwara S I, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 225-231.
- [8] Russell P B, James D C. Oxidative stress in airways: Is there a role for extracellular superoxide dismutase [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(12): 38-43.
- [9] Chandler D B. Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis [J]. *Clin Chest Med*, 1990, 11(1): 21-23.
- [10] Marinelli M A. Idiopathic pulmonary fibrosis progress and challenge [J]. *Chest*, 1995, 108: 297-298.
- [11] 阴 健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [12] 王昌明, 何庆忠, 张瑞祥. 丹参酮对鼠肺纤维化过程中组织变化的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(5): 308-310.

羟基红花黄色素A 促内皮细胞增殖的机制研究

张 岭¹, 宋 艳², 李长龄², 朱美才³, 王 卉⁴, 刘 珂⁵, 朱海波^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 2. 北京大学药学院 分子与细胞药理系, 北京 100083; 3. 中国人民解放军空军总医院 分子生物学中心, 北京 100036; 4. 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071; 5. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘 要: 目的 探讨羟基红花黄色素A (HSYA) 对低氧条件下犬血管内皮细胞 (VEC) 血管内皮生长因子 (VEGF) 相关信号传导通路的影响。方法 在低氧条件下以 ELISA 法观察 VEGF 抗体及其两种酪氨酸受体 (Flt-1 和 KDR) 的抗体对 HSYA 促 VEC 增殖作用及分泌 VEGF 水平的影响; 生物分子相互作用分析法检测 HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 的相互作用; 硝酸还原酶法测定 VEC 培养液中 NO、NOS 的量。结果 10 $\mu\text{g/mL}$ VEGF、

* 收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370720); 国家“863”计划 (2004AA2Z3815)

* 通讯作者 朱海波 Tel: (010) 63188106 Fax: (010) 63017757 E-mail: zhuhaibo@mm.ac.cn

Flt-1 和 KDR 的抗体均能明显抑制 HSYA 的促 VEC 分泌 VEGF 作用;生物分子相互作用分析结果证实, HSYA 与 VEGF、Flt-1 及 KDR 均无明显结合; HSYA 在 1 mmol/L 浓度下能够明显促进低氧条件下 VEC 培养液中的 NO 水平,而对 NOS 水平没有明显影响。结论 在低氧条件下, HSYA 促 VEC 增殖的作用与 VEGF 及其相关信号传导通路有关,但 HSYA 与 VEGF 及其受体无明显结合,提示可能存在与 VEGF 及其相关信号传导通路相关的 HSYA 作用靶点。

关键词: 羟基红花黄色素 A (HSYA); 血管新生; 血管内皮生长因子 (VEGF)

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)03-0403-06

Mechanism of hydroxysafflor yellow A induced endothelial cell proliferation

ZHANG Ling¹, SONG Yan², LIU Chang-ling², ZHU Mei-cai³, WANG Hui⁴, LIU Ke⁵, ZHU Hai-bo¹

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2. Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

3. Molecular Biology Center, General Hospital of Air Force, PLA, Beijing 100036, China; 4. Institute of Microbiology Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

5. School of Pharmaceutical Sciences, Yantai University, Yantai 264003, China)

Abstract Objective To study the effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in hypoxic canine aortic endothelial cell (VEC). **Methods** Using several antibodies, the involvement of VEGF, fam-like tyrosine receptor (Flt-1) and kinase insert domain containing receptor (KDR) in HSYA-induced VEC growth was determined by MTT assay and ELISA for VEGF secretion under hypoxic condition. Furthermore, the interactions of HSYA with VEGF, Flt-1 or KDR were studied by Biomolecular Interaction Analysis (BIA). The nitric oxide (NO) concentration and endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) activity were determined by nitrate reductase assay. **Results** Antibodies of Flt-1, KDR or VEGF significantly blocked the proliferative effect of HSYA. Also, antibodies of Flt-1 and VEGF attenuated the promotion of HSYA on VEGF secretion. BIA Results revealed that HSYA had no interactions with VEGF, Flt-1, and KDR. The treatment of HSYA 1 mmol/L in hypoxic culture resulted in elevated NO level and intact NOS level in the endothelial cell culture media. **Conclusion**

The proliferative effect of HSYA on VEC is probably mediated by VEGF pathway. However, there is no direct interaction between HSYA and VEGF or VEGF receptors, which indicates other HSYA targets in VEGF pathway.

Key words: hydroxysafflor yellow A (HSYA); angiogenesis; vascular endothelial growth factor (VEGF)

红花、当归、桃红及灯盏花等中药均有促进组织内新血管生成作用^[1,2]。由于我国传统中药具有历史悠久,疗效确切,成本低廉等优势,使从中药中寻找具有市场前景的血管生成促进剂的几率大大增加,以传统的活血化瘀类中药为切入点,寻找天然血管生成促进剂,将为动脉缺血性疾病的治疗提供了广阔的前景。

羟基红花黄色素A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 是从传统的活血化瘀类名药红花中分离出来的,具有抗心脑血管缺血性损伤作用的有效单体成分。前期实验证实^[5]: HSYA 可使局灶性脑缺血大鼠脑组织内新生血管数目明显增加,血管内皮生长因子 (VEGF) 表达显著增强,提示 HSYA 有较强的促新血管生成作用,其机制可能与激活 VEGF 及其受体信号传导途径从而促进血管内皮细胞 (VEC) 增殖作用相关。本实验室最新研究表明, HSYA 在低氧

条件下明显促进培养的犬 VEC 增殖^[3],但该作用的机制尚不清楚。鉴于机体血管形成的过程多依赖于内皮细胞的有丝分裂,而 VEGF 是目前已知的最强的特异性内皮细胞分裂原,VEGF 的活性主要受控于与其相互作用的 KDR (kinase insert domain-containing receptor) 和 Flt-1 (fam-like tyrosine receptor) 两个酪氨酸激酶受体。它们的激活引起内皮细胞的分裂、增殖和迁移,诱导血管新生^[4]。HSYA 的促新血管生成作用与 VEGF 的表达呈正相关^[5],故本研究以 HSYA 对促 VEC 增殖相关的 VEGF 及其受体信号传导通路的影响为切入点,初步探讨 HSYA 促 VEC 增殖作用与 VEGF 信号传导途径的关系。

1 材料

1.1 药品与试剂: HSYA (质量分数 99.7%) 由山东省天然药物工程技术研究中心提供,批号

20000525; 胰蛋白酶 (1:250), Sigma 产品; 优级胎牛血清 (FBS), 杭州四季青公司产品, 批号 031208; rhVEGF (阳性对照药), PEPRO-TECH 公司产品, 批号 030210; rhFlt-1、rhKDR、VEGF 抗体, Flt-1 抗体, KDR 抗体和 VEGF ELISA 试剂盒, 均为美国 R&D 公司产品; CM5 蛋白结合芯片, 瑞典 Biacore AB 公司, 批号 1122369; 第Ⅷ因子鉴定试剂, Kirkegaard & Perry 实验室提供; MTT, Amresco 产品, 批号 0793; NO 与一氧化氮合酶 (NOS) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品。

1.2 动物: 健康雄性杂种犬, 15~20 kg, 由北京方元缘实验动物养殖场提供。

1.3 仪器: CO₂培养箱及三气培养箱, 美国 Forma 公司; SPECTRA MAX 190 型酶标仪, Molecular Devices 公司; Biacore 3000 生物分子相互作用分析仪, 瑞典 Amersham Bioscience 公司。

2 方法

2.1 不同质量浓度的 VEGF 抗体或 VEGF 受体的抗体对 VEC 增殖的影响: 采用 MTT 比色法检测在低氧低糖条件下孵育 48 h 后, 不同质量浓度抗体对犬胸主动脉 VEC 增殖的影响。参照文献方法培养犬胸主动脉 VEC^[6,7], 取第 3~5 代细胞消化后, 用 DMEM 培养液制备单细胞悬液 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔板内, 每孔接种 100 μ L, 置于 37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养。24 h 后更换为含不同质量浓度抗体的 DMEM 培养液 (包括空白对照组; Flt-1 抗体 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ g/mL 组; KDR 抗体 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ g/mL 组; VEGF 抗体 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ g/mL 组), 每组 8 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂、10% O₂的三气培养箱中继续培养 48 h 后, 以 MTT 比色法检测细胞增殖。

2.2 10 μ g/mL VEGF 抗体及其两种酪氨酸受体 Flt-1 和 KDR 的抗体对 HSYA 促 VEC 增殖及分泌 VEGF 的影响: 参考 2.1 项实验结果, 选择 10 μ g/mL 作为观察抗体抑制 HSYA 促 VEC 增殖的试验质量浓度。前期工作证实, 1 mmol/L HSYA 具有明确的促内皮细胞增殖作用^[5]。取第 3~5 代培养犬胸主动脉 VEC 消化, 细胞接种培养方法同 2.1。24 h 后更换为含不同药物的 DMEM 培养液 (包括空白对照组; HSYA 1 mmol/L 组; HSYA 1 mmol/L + Flt-1 抗体 10 μ g/mL 组; HSYA 1 mmol/L + KDR 抗体 10 μ g/mL 组; HSYA 1 mmol/L + VEGF 抗体 10 μ g/mL 组), 每组 8 个复孔, 置于 37 °C、5%

CO₂、10% O₂的三气培养箱中继续培养 48 h 后, 以 MTT 比色法检测细胞增殖, 同时采用 ELISA 法测定 VEC 上清液中 VEGF 浓度。

2.3 HSYA 与 VEGF、Flt-1 及 KDR 之间的相互作用: 生物分子相互作用分析法^[8] (Biomolecular Interaction Analysis, BIA) 系统由微射流卡盘、传感器芯片和 SPR 光学检测系统 3 个核心部分组成, 其工作原理是基于表面等离子共振传感 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术来实时追踪生物分子间的相互作用。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面, 再通过微射流卡盘将待分析互相作用的分子溶液传送至传感器芯片表面, SPR 光学检测系统则跟踪检测溶液与芯片表面的分子结合和解离的全过程, 数据分析软件 BIA evaluation 处理实验过程中获取的各种特异性信号, 并将其整合成最终的实验结果。本实验将 VEGF、Flt-1、KDR 和对照蛋白 BSA 耦合在传感器芯片上, 通过流动相将 HSYA 样品传至芯片表面, 检测其与耦联蛋白是否具有相互作用, 以及对蛋白结合活性的影响。

以氨基耦联方式将 rhVEGR1 (Flt-1)、rhVEGR2 (KDR)、rhVEGF (20~50 μ g/mL) 和对照蛋白 BSA (30 μ g/mL) 耦联于 CM5 芯片 4 个通道表面。再以 50 μ g/mL 的 rhVEGR1、rhVEGR2、rhVEGF 和 His-HRP IgG 进行芯片表面的结合活性验证, 以确认耦联蛋白的活性。检测 HSYA 结合作用, 将 10 μ L 的 3 mg/mL 和 10 mg/mL 的 HSYA 以体积流量 5 μ L/min 液流方式注入 FCI-4, 与芯片上的蛋白反应。在样品的检测过程中, 芯片以 20 mmol/L NaOH 10 μ L 再生。每 10 次样品注射后需再次验证芯片表面结合活性, 以保持检测的稳定性。

数据处理: 信号图 Y 是共振单位 RU, 以样品注射后 60 s 时 RU 值减去注射样品前 5 s 记录的 RU 值, 获得实际结合量。

2.4 低氧条件下 VEC 上清中 NO、NOS 水平的影响: 取第 3~5 代培养犬胸主动脉 VEC 消化后, 细胞接种方法同 2.1, 置于 37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养。24 h 后更换为含不同药物的 10% FBS DMEM 培养液 (包括空白对照组, VEGF 0.26 μ mol/L 组, HSYA 1、0.1、0.01 mmol/L 组), 每组 6 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂、10% O₂培养箱中静置培养 48 h 后, 取上清液, 用硝酸还原酶法测定 NO 和 NOS 水平。

2.5 统计学处理: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差

分析方法 (ANOVA) 进行组间比较。

3 结果

3.1 VEGF 抗体 Flt-1 和 KDR 的抗体对 HSYA 促 VEC 增殖及分泌 VEGF 的影响: 由表 1 可见, 与对照组比较, HSYA 1 mmol/L 可明显促进 VEC 增殖 ($P < 0.01$) 及 VEGF 分泌 ($P < 0.05$)。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 VEGF、Flt-1、KDR 的抗体均能抑制 1 mmol/L HSYA 的促 VEC 增殖作用 ($P < 0.01$)。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Flt-1 和 KDR 的抗体均能抑制 1 mmol/L HSYA 的促 VEC 分泌 VEGF 作用, 其中 Flt-1 抗体作用显著 ($P < 0.05$)。说明 HSYA 的促 VEC 增殖作用可能与 VEGF 或 VEGF 受体有关。

表1 VEGF、Flt-1、KDR 抗体对 HSYA 促 VEC 增殖及 VEGF 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of antibody of VEGF, Flt-1, and KDR on HSYA promotion of VEC proliferation and VEGF secretion ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药浓度		A 值/ ($n=8$)	VEGF/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=5$)
	HSYA/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抗体/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
对照	-	-	0.946 $\pm$ 0.034	1 861 $\pm$ 122
HSYA	1	-	1.135 $\pm$ 0.059 ^{**}	2 088 $\pm$ 49 [*]
HSYA + Flt-1 抗体	1	10	0.948 $\pm$ 0.079 [#]	1 806 $\pm$ 104 [#]
HSYA + KDR 抗体	1	10	0.899 $\pm$ 0.082 [#]	1 928 $\pm$ 152
HSYA + VEGF 抗体	1	10	0.948 $\pm$ 0.089 [#]	75 $\pm$ 13 ^{**#}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 HSYA 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs HSYA group

3.2 HSYA 与 VEGF、Flt-1 及 KDR 之间的相互作用: 配体蛋白的耦联: 蛋白目标耦联量为 10 000 RU, 4 种蛋白实际氨基耦联量分别为 rhV EGFR 1: 14 265RU; rhV EGFR 2: 12 656RU; rhV EGF: 8 721RU; BSA: 14 321RU, BIA CORE 以共振单位 (RU) 来衡量, 1 000 RU 相当于每平方毫米 1 ng 的质量^[8]。进一步观察 VEGF、Flt-1 和 KDR 与芯片各通道的结合能力, 结果见表 2, VEGF 与 Flt-1 和 KDR 均发生了明显的结合, RU 值分别为 431.0 和 424.3; Flt-1 结合试验发现, 其与白蛋白结合最高, 说明该受体蛋白存在非特异性结合, 与其他 3 个通道的结合结果表明, 相对的 VEGF 结合量最大, 说明其除与 VEGF 有特异性结合外, 另外其与 Flt-1 和 KDR 也有一定的结合, 将其稀释 30 倍后重复试验, 排除蛋白浓度过大造成的影响, 得到类似结果; KDR 结合试验结果证实, 其与 VEGF 存在特异性结合, 与 Flt-1 和 KDR 结合量很低, 说明 KDR 对 VEGF 有很高的选择性。

HSYA 与蛋白相互作用实验中, 3、10 mg/mL HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 的结合量与白蛋白相类似。由于 Flt-1 和 KDR 为基因重组产品, 在序列中含有多聚组氨酸, 其可以与 His-HRP IgG 发生特异性结合, 针对这一点, 将经过 HSYA 处理过的芯片与 His-HRP IgG 作用, 以考察 HSYA 是否通过改变某些蛋白的理化特性而发挥作用, 结果证实 His-HRP IgG 仍和 VEGF 受体发生特异性结合, 表明未见 HSYA 与 VEGF、Flt-1 及 KDR 发生直接或间接的相互作用。

3.3 低氧条件下 HSYA 对 VEC 上清中 NO、NOS 水平的影响: 由表 3 结果可见, 低氧条件下加药孵育 48 h 时, VEGF 0.26 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组细胞培养液中的 NO 水平比对照组显著增高 ($P < 0.01$); HSYA 仅 1 mmol/L 剂量组的 NO 水平比对照组显著增高 ($P < 0.01$), 但仍远远低于 VEGF 2.6 $\times 10^{-4}$ mmol/L 组; 而 HSYA 0.1、0.01 mmol/L 组的 NO 水平与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。各组细胞培养液中的 NOS 水平无明显差异, 这可能由于 VEC 培养液中的 NOS 水平较低缘故。

表2 HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 的分子间相互作用 (单位: RU)

Table 2 Interaction between HSYA and VEGF, Flt-1, KDR (Unit RU)

流动相	固定相			
	白蛋白	VEGF	Flt-1	KDR
VEGF	48.6	51.4	474.4	481.6
Flt-1	3 652.7	3 526.8	2 569.1	1 666.4
Flt-1 (1:30)	536.2	739.9	777.5	280.6
KDR	98.3	2 170.6	381.0	- 127.8
HSYA (3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	- 44.8	- 138.9	85.3	- 37.6
HSYA (10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	13.6	- 14.0	- 37.9	- 2.8
His-HRP IgG (1:50)	6.2	62.8	357.9	295.0

表3 低氧条件下 HSYA 对 VEC 培养液中 NO 和 NOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of HSYA on NO and NOS levels in VEC culture media under hypoxia ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NOS/(U $\cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	-	47.46 $\pm$ 3.28	3.84 $\pm$ 0.21
VEGF	2.6 $\times 10^{-4}$	240.65 $\pm$ 10.63 ^{**}	3.58 $\pm$ 0.31
HSYA	1	70.12 $\pm$ 5.82 [*]	3.59 $\pm$ 0.54
	0.1	50.75 $\pm$ 4.46	3.60 $\pm$ 0.17
	0.01	49.44 $\pm$ 4.06	3.52 $\pm$ 0.32

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本实验室最新研究表明, HSYA 可在低氧条件

下直接作用于培养的 VEC 并显著促进其增殖,但对于其作用机制尚不清楚。前期体内研究结果曾提示,HSYA 在抗脑缺血的治疗浓度下可使 VEGF 的表达明显高于缺血对照组,且 VEGF 强阳性的缺血组织新生血管数目(MVD)明显高于 VEGF 阴性或弱阳性的缺血组织,提示 VEGF 促新生血管形成与其使缺血组织中 VEGF 受体表达上调有关^[5]。

大量研究证实,VEGF 促进 VEC 增殖是其促血管新生作用的基础和关键。其生物作用是通过与 VEC 表面的特异性受体酪氨酸激酶—VEGF 受体结合所实现的。这是本实验进一步探讨在低氧条件下 HSYA 促 VEC 增殖作用与 VEGF 信号传导途径之间关系的重要原因。据文献报道^[9],在缺血性疾病中,低氧可刺激 VEGF mRNA 表达上调,促进 VEC 释放 VEGF 导致新生血管形成最终改善组织血供。因此在体外低氧状态下,研究 HSYA 促进 VEC 增殖过程中 VEGF 信号传导通路的作用,将有助于阐明 HSYA 在体内缺血情况下促新生血管生长的分子基础。本实验结果发现,HSYA 在促进体外培养的 VEC 增殖的浓度下,可显著增加 VEC 的 VEGF 释放量,这与前期研究体内免疫组化结果:HSYA 促进 VEGF 蛋白水平的表达相一致;而在本实验中,VEGF 抗体在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下即能明显拮抗 HSYA 促 VEC 增殖作用,同时伴有 VEGF 的分泌量显著下降,且二者呈正相关。此结果更有力地证明了 HSYA 促进 VEGF 在 VEC 中的释放是其促 VEC 增殖作用的重要机制之一。

本实验结果还发现,两个发挥主要功能的 VEGF 受体—Flt-1 和 KDR 的抗体均能明显抑制 1 mmol/L HSYA 的促 VEC 增殖作用,且作用强度基本相当,表明 VEGF 及其受体可能是 HSYA 的促 VEC 增殖作用信号传导通路中的重要环节,但三者所起的作用有所不同。VEGF、Flt-1 和 KDR 三者的抗体在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下均能明显抑制 HSYA 所致的 VEC 增殖作用,同时 VEGF 和 Flt-1 受体的抗体能够显著抑制 HSYA 促 VEC 分泌 VEGF 的作用,以 VEGF 抗体作用最强,Flt-1 受体抗体作用次之。分析此现象可能是前者由 VEC 中分泌的 VEGF 被其抗体中和后形成复合物很难被检出,故其促 VEC 增殖作用亦被明显削弱;而后者由于 VEGF 作用受体被其抗体封闭,使得 VEGF 促 VEC 增殖作用无法得到充分发挥从而使细胞数量减少,最终导致 VEGF 分泌量下降。但对于 KDR

抗体组在与前两者拮抗 HSYA 促 VEC 增殖作用强度相当的情况下,与单纯 HSYA 组相比其细胞释放 VEGF 量无显著差异,是否可能与其检测标准差偏大有关,尚有待于今后进一步探讨。值得肯定的是,HSYA 的促 VEC 增殖作用与 VEGF 及其受体的信号传导密切相关。

那么,HSYA 是否是通过与 VEGF、Flt-1 或 KDR 的直接结合而发挥其促 VEC 增殖作用的呢?为此本研究采用了 BIA 方法进一步检测了 HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 的相互作用。在实验中,针对 HSYA 相对分子量较小(约 611)这一点,首先将芯片的蛋白耦联量增大(10 000 RU),以扩大可能的结合位点,如果能够结合,其信号即能够检出;另外,HSYA 的样品注射质量浓度最大设定为 10 mg/mL,在此质量浓度下,加之很大的蛋白耦联量,若未能检出结合信号则可认为二者之间不存在相互作用。实验结果首先说明,氨基耦联方法可有效地使 VEGF、Flt-1 和 KDR 与芯片相连,其后的验证实验还说明该耦联方法结合后蛋白仍保持良好的生物学功能,证明了芯片的有效性。从验证实验中还可看出,Flt-1 存在非特异性结合的特点,而 KDR 与配体的结合存在很高的选择性,此与文献报道的相吻合^[10]。采用 3、10 mg/mL HSYA 与芯片相作用,从结果中可以看出 HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 没有特异性和非特异性结合。经 HSYA 作用后的芯片与 His-HRP IgG 相作用,发现 His-HRP IgG 仍能有效的与 Flt-1 和 KDR 相结合,这也说明 HSYA 对 VEGF 受体蛋白的理化性质也没有影响,即不会影响受体与其特异性配体的亲和力。故本实验从多方面证实,HSYA 没有与 VEGF、Flt-1 及 KDR 发生直接或间接的相互作用。由于 HSYA 在促进 VEC 增殖的同时增加 VEC 促 VEGF 分泌,该作用可被 VEGF 和其受体 Flt-1 和 KDR 的抗体所减弱,而 HSYA 又不与 VEGF 或其受体相互作用,故而推测 HSYA 可能是通过激活 VEGF 信号传导通路的上游靶分子而起效的。

本研究首次发现,HSYA 促犬胸主动脉 VEC 增殖作用与 VEGF 信号传导通路介导有关,推测该作用可能是 HSYA 促新血管生成的作用机制之一。

参考文献

- [1] 李 前,谈立明,熊 辉.活血化癥中药干预微血管新生的研究概况[J].中医药导报,2007,13(4):94-97.
- [2] 岳运霞,李应东.不同浓度当归补血汤膜提取物对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响[J].甘肃中医,2006,19(5):37-

- 38.
- [3] 张 岭, 宋 艳, 李长龄, 等. 羟基红花黄色素A 对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2008, 39 (1): 90-93.
- [4] Motohiro N, Sho-ichi Y. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes [J]. *J Biochem*, 1995, 47(270): 28316-28324.
- [5] Zhu H B, Wang Z H, Ma C J, *et al* Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 429-433.
- [6] Gargett C E, Bucak K, Roger P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15 (2): 293-301.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] 陈莉莉, 陈 静, 杜 毅, 等. 基于生物传感器Biacore S51技术的新药发现与开发 [J]. 生命的化学, 2004, 24 (6): 507-509.
- [9] Sun Y, Jin K, Xie L, *et al* VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1843-1851.
- [10] Masabumi S. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis [J]. *Cell Struct Func*, 2001, 26: 25-35.

苦瓜蛋白抗肿瘤作用及其分子机制

熊术道¹, 尹丽慧¹, 李景荣², 叶爱芳¹, 章圣辉¹, 温博贵^{3*}

(1. 温州医学院附属第一医院医学科学研究所, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院附属第一医院 急诊科, 浙江 温州 325000; 3. 汕头大学医学院 分子生物学研究室, 广东 汕头 510031)

摘 要: 目的 探讨苦瓜蛋白对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响和荷瘤小鼠血清基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的活性及变化以及细胞因子白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响。方法 将清洁级 ICR 雄性小鼠按体重随机分成5组, 建立肝癌 H₂₂ 皮下移植瘤模型, 分为模型组、苦瓜蛋白高、中、低剂量 (100、50、25 mg/kg) 组及环磷酰胺组 (CTX, 40 mg/kg), 各组均 ip 给药, 观察苦瓜蛋白对肿瘤生长的影响; 分离血清, 明胶酶谱法检测荷瘤小鼠血清基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的活性及其变化, ELISA 检测细胞因子 IL-6 及 TNF- α 表达。结果 苦瓜蛋白组与模型组相比, 肿瘤质量明显减轻 ($P < 0.01$), 小鼠体重也较模型组小鼠轻 ($P < 0.01$); 苦瓜蛋白 (100、50、25 mg/kg) 组及 CTX 组抑瘤率分别为 85.81%、66.89%、52.05%、65.10%; 各苦瓜蛋白组与模型组相比, MMP-2、MMP-9 的活性降低, 酶原表达下调 ($P < 0.01$); 细胞因子 IL-6 及 TNF- α 表达明显下调 ($P < 0.01$), 上述作用与苦瓜蛋白剂量相关。结论 苦瓜蛋白具有较强的体内抗肿瘤活性; 其抗肿瘤作用可能与苦瓜蛋白抑制 MMPs 的活性及表达, 以及调节 IL-6 及 TNF- α 等细胞因子的表达水平有关。

关键词: 苦瓜蛋白; 移植性肿瘤; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R 286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0408-04

苦瓜蛋白 (momorcharin glycoproteins) 是从苦瓜籽中分出的一种相对分子质量约为 30 000 的碱性糖蛋白质, 属于 I 型核糖体失活蛋白 (ribosome inhibiting protein, RIP)。RIP 具有明显的抗肿瘤、抗病毒作用, 具有极高的药用价值^[1,2]。前期研究表明苦瓜蛋白可以明显诱导 K562 细胞产生细胞凋亡^[3]。为进一步研究苦瓜蛋白对动物移植性肿瘤的作用及分子机制, 笔者研究了不同剂量苦瓜蛋白对移植性肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及其对荷瘤小鼠基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) MMP-2、MMP-9 的活性与变化以及细胞

因子白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响。

1 材料

1.1 仪器及试剂: Image master 凝胶成像系统 (GE health)、ELx800 酶标仪、IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒购自 Biosource 公司。

1.2 实验动物与细胞株: 清洁级 ICR 雄性小鼠, 体重 18~22 g, 温州医学院实验动物中心提供。ICR 小鼠 H₂₂ 腹水瘤细胞由浙江中医药大学生命科学系惠赠。

2 方法

* 收稿日期: 2007-07-07

基金项目: 浙江省中医药管理局资助课题 (2002C080); 广东省教育厅自然科学基金项目 (Z02041); 浙江省教育厅研究项目 (2006-1779)

作者简介: 熊术道 (1970—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为肿瘤分子生物学及抗肿瘤药理学。

Tel: (0577) 86550296 E-mail: xshdao@163.com

* 通讯作者 温博贵 Tel: (0754) 8900437