

• 药理与临床 •

蝎毒多肽提取物对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及血管内皮生长因子和凝血酶敏感蛋白表达的影响

张 妍, 张维东*, 张月英, 王兆朋, 贾 青, 王朝霞, 王晓慧

山东省医学科学院基础医学研究所 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 山东 济南 250062

摘要: 目的 观察蝎毒多肽提取物(简称蝎毒多肽)对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及血管内皮生长因子(VEGF)、凝血酶敏感蛋白(TSP-1)表达的影响,进一步探讨蝎毒多肽的抗肿瘤作用机制。方法 MTT 法检测蝎毒多肽对 SKOV3 细胞增殖的影响;免疫细胞化学法及 Western blotting 测定蝎毒多肽对 SKOV3 细胞 VEGF、TSP-1 蛋白表达的影响。结果 蝎毒多肽 12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 SKOV3 细胞增殖有抑制作用,且呈明显的质量浓度相关性,质量浓度大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞增殖抑制作用显著 ($P < 0.01$)。随着蝎毒多肽质量浓度的增加,SKOV3 细胞 TSP-1 蛋白表达增加,VEGF 蛋白表达下降 ($P < 0.01$)。结论 蝎毒多肽能显著抑制 VEGF 的表达,促进 TSP-1 的表达,其抗肿瘤作用机制可能是通过抑制肿瘤细胞增殖、影响肿瘤细胞血管生成过程中关键因子的表达来实现的。

关键词: 蝎毒多肽;人卵巢癌 SKOV3 细胞;细胞增殖;血管内皮生长因子(VEGF);凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0515-05

Effects of polypeptide extract from scorpion venom on cell proliferation and protein expression of VEGF and TSP-1 in human ovarian cancer cell line SKOV3

ZHANG Yan, ZHANG Wei-dong, ZHANG Yue-ying, WANG Zhao-peng, JIA Qing, WANG Zhao-xia, WANG Xiao-hui

Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

Abstract: Objective To observe the effects of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on the cell proliferation and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and thrombospondin-1 (TSP-1) in human ovarian cancer cell line SKOV3 and to investigate the possible mechanism of its antitumor effect. **Methods** Ovarian cancer cell line SKOV3 was cultured by the routine method, after being treated with PESV at different concentrations, the inhibition of cell proliferation was tested by MTT assay; Immunocytochemistry and Western blotting were applied to detecting the effects of PESV on protein expression of VEGF and TSP-1. **Results** In a dose-dependent manner, PESV remarkably inhibited the proliferation of SKOV3 at the range of 12.5—200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. PESV ($> 50 \mu\text{g}/\text{mL}$) had a significant inhibitory effect on cell proliferation ($P < 0.01$). Western blotting and immunocytochemistry results showed that with the increasing of PESV concentration, the expression levels of VEGF decreased while TSP-1 increased gradually ($P < 0.01$). **Conclusion** PESV could significantly inhibit the expression of VEGF, but improve the expression of TSP-1. Antitumor effects of PESV may be carried out by inhibiting the tumor cell proliferation and impacting the expression of key factors in the process of tumor angiogenesis.

Key words: polypeptide extract from scorpion venom; human ovarian cancer cell line SKOV3; cell proliferation; vascular endothelial growth factor (VEGF); thrombospondin-1 (TSP-1)

收稿日期: 2011-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073102; 30873408); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HQ003, 2009ZRC03044); 济南市科学技术发展计划(201004012)

作者简介: 张 妍(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为实验肿瘤病理学。Tel: (0531)82919939 E-mail: lala.99@163.com

*通讯作者 张维东 Tel: (0531)82919939 E-mail: zhangweidongkui@163.com

卵巢癌是常见的女性生殖器官恶性肿瘤之一, 发病率仅次于子宫颈癌和子宫体癌, 严重威胁女性的生命和健康。卵巢癌的治疗常以手术为主, 并辅助放疗、化疗、中药等综合治疗。研究表明, 肿瘤的生长、转移与血管生成关系密切, 因此近年来抗血管生成已成为肿瘤治疗中的重要策略。本课题组前期实验表明, 蝎毒多肽提取物(简称蝎毒多肽)可抑制人静脉内皮细胞(HUVEC)增殖及鸡胚尿囊膜(CAM)新生血管生成, 并且在体内实验中也发现其对肝癌、膀胱癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤有良好的抗癌效果^[1-4]。本实验通过观察蝎毒多肽作用人卵巢癌 SKOV3 细胞后, 对 SKOV3 细胞增殖及血管内皮生长因子(VEGF)以及凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)表达的影响, 进一步探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人卵巢癌 SKOV3 细胞株, 山东省医学科学院基础医学研究所冻存, 常规复苏, 放入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养, 每 2 天换液 1 次, 光镜下观察细胞形态。用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代, 取第 3~4 代对数生长期的细胞用于实验。

1.2 试剂与仪器

MTT、DMSO, Sigma 公司; RPMI 1640, Hyclone 公司; 新生小牛血清和胰酶, Gibco 公司; TSP-1 多克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司; VEGF 多克隆抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; β -actin 多克隆抗体、山羊抗兔、抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗和 DAB 二氨基联苯胺显色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司。

美国 Spectramax 酶标仪, 德国 Leica 倒置显微镜, 德国 Leica DM4000B 光学显微镜。

1.3 蝎毒多肽的提取

蝎毒冻干粉(粗提物)提取自野生东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch, 由山东邹平县蝎蚁科技有限公司提供。取蝎毒冻干粉, 按 25 mg/mL 溶解于 PBS 缓冲液(pH 7.4), 低温下 5 000 r/min 离心 30 min, 0.45、0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 将超滤物冻干。

取处理过得蝎毒冻干粉 400 mg 加磷酸缓冲液上样, 经葡萄糖凝胶, 收集蝎毒 III~IV 蛋白峰, 再进行阳离子交换色谱, 紫外分光光度仪(吸收波长 280 nm)检测, 收集蝎毒多肽蛋白峰。蝎毒多肽经 HPLC 分析显示 4 个峰, 主峰占总面积的 41.4%。

蝎毒多肽为含有 50~60 氨基酸的多肽混合物, 质量分数 89.1%, 相对分子质量 6 000~7 000, pH 稳定。实验时用 RPMI 1640 完全培养基溶解稀释蝎毒多肽, 母液质量浓度为 2 mg/mL。

1.4 MTT 法检测 SKOV3 细胞增殖

实验分为对照组、蝎毒多肽给药组。取对数生长期 SKOV3 细胞, 消化, 吹打均匀, 调整细胞浓度至 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔板中, 每孔加细胞 1×10^4 个。细胞接种 24 h 后, 给药组加入不同质量浓度(12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ g/mL)的蝎毒多肽, 对照组加入相同体积的培养液, 置培养箱培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 20 μ L (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后弃上清, 加入 150 μ L DMSO 溶解液振荡 5 min, 待结晶物质充分溶解后, 酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A)值, 空白孔调零, 各组每个质量浓度设 6 个复孔, 实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值

1.5 免疫细胞化学法检测 SKOV3 细胞 VEGF 和 TSP-1 蛋白表达

12 孔板中每孔置入 10 mm \times 10 mm 盖玻片, 每孔接种 2×10^4 细胞, 24 h 细胞贴壁后分别用蝎毒多肽 50.0、100.0、150.0 μ g/mL 作用于 SKOV3 细胞, 并设对照组, 每组 3 个复孔。细胞培养 48 h 后取出各盖玻片, PBS 液冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 滴加 3% 甲醇-过氧化氢溶液及血清封闭液和稀释度为 1:200 的一抗工作液, 4 °C 过夜后滴加辣根酶标记的二抗, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封片、阅片, 高倍镜($\times 200$)下随机观察每张切片 4 个视野。结果判定: TSP-1 及 VEGF 阳性 SKOV3 细胞为胞浆呈现棕黄色染色, 偶有胞核染色; 染色强度分为未着色、弱、中、强(积分分别为 0、1、2、3 分), 阳性细胞百分数分为 0、1%~25%、26%~50%、大于 50%(积分分别为 0、1、2、3 分), 两项分数之和为 0 分者计为表达阴性(-), 1~2 分者为弱阳性(+), 3~4 分者为阳性(++), 5~6 分者为强阳性(+++)。

1.6 Western blotting 法检测 SKOV3 细胞 VEGF 和 TSP-1 蛋白表达

细胞培养 48 h 后收集细胞, 提取总蛋白, 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白浓度。取 60 μ g 总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后, 电转

移至 PVDF 膜上,再以 5%脱脂奶封闭,加入封闭液稀释的 VEGF 多克隆抗体 (1:500) 和 TSP-1 多克隆抗体 (1:500),4 °C 培养过夜,洗膜后与羊抗兔 HRP-IgG (1:1 000) 结合,DAB 显影,图像分析软件测定 VEGF、TSP-1 和内参 β -actin 条带平均 A 值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析。

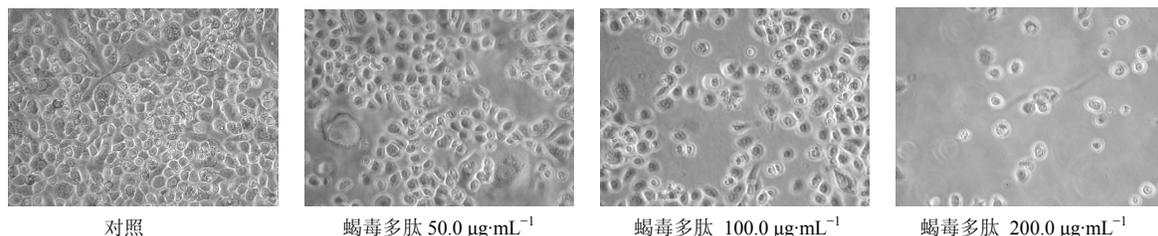


图 1 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞形态的影响
Fig. 1 Effect of PESV on morphology of SKOV3 cells

2.2 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞增殖的影响

各质量浓度蝎毒多肽对 SKOV3 细胞生长均有抑制作用,但在 12.5、25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 SKOV3 细胞生长的抑制率仅分别为 8.32%、20.39%,作用不显著,而质量浓度为 50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率分别为 38.78%、53.30%、79.22%,作用显著且呈质量浓度相关性,各剂量组间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of PESV on proliferation of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率 / %
对照	—	1.161 ± 0.025	—
蝎毒多肽	12.5	$1.063 \pm 0.029^{**}$	8.32
	25.0	$0.923 \pm 0.035^{**}$	20.39
	50.0	$0.710 \pm 0.037^{**}$	38.78
	100.0	$0.541 \pm 0.051^{**}$	53.30
	200.0	$0.241 \pm 0.048^{**}$	79.22

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$
 $^{**}P < 0.01$ vs control group

2.3 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞 VEGF 和 TSP-1 蛋白表达的影响

2.3.1 免疫细胞化学法 与对照组相比,蝎毒多肽作用 SKOV3 细胞 48 h 后,VEGF 表达下调,尤以 100.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 VEGF 表达下调明显 ($P < 0.01$),且

2 结果

2.1 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞形态学的影响

光镜下可见,对照组 SKOV3 细胞形态呈短梭形、多边形,细胞大小均匀一致,胞浆丰富透亮,胞浆颗粒较少,细胞贴壁良好,生长旺盛。蝎毒多肽与 SKOV3 细胞共同培养 48 h 后,细胞密度减少,细胞变小且胞内颗粒感增强,细胞脱落呈漂浮状,贴壁差,且随着药物质量浓度增加,上述现象更加明显。结果见图 1。

两剂量组间差异显著 ($P < 0.01$); TSP-1 蛋白表达随蝎毒多肽质量浓度的增加而增加,150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 TSP-1 表达呈强阳性 ($P < 0.01$),100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 TSP-1 表达呈阳性 ($P < 0.05$),50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组间 TSP-1 表达差异不显著,因此 TSP-1 表达与蝎毒多肽质量浓度呈一定的相关性。结果见图 2~4。

2.3.2 Western blotting 法 与对照组相比,蝎毒多肽组 VEGF 表达水平平均下降,且随着蝎毒多肽质量浓度的升高,VEGF 表达下调愈加明显,其中 100.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的作用尤为显著 ($P < 0.01$); TSP-1 蛋白表达随蝎毒多肽质量浓度升高而增加,150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 TSP-1 蛋白表达水平明显增强 ($P < 0.01$),而 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组的差异无统计学意义。结果见图 5 和 6。

3 讨论

肿瘤的生长具有明显的血管生成依赖性,肿瘤血管生成的始动因素是肿瘤微环境内促血管生成因子和血管生成抑制因子失衡所致,这两种因子的失衡导致肿瘤血管扭曲、扩张、紊乱、微血管通透性增加等结构与功能的改变^[5]。此外由于血管异常,肿瘤微环境也发生缺氧、酸中毒、组织间隙液压力 (interstitial fluid pressure) 升高等变化^[6],在这种情况下肿瘤对药物的敏感性降低、免疫细胞功能受损^[7],肿瘤的生长和转移加快。在肿瘤细胞分泌的众多血

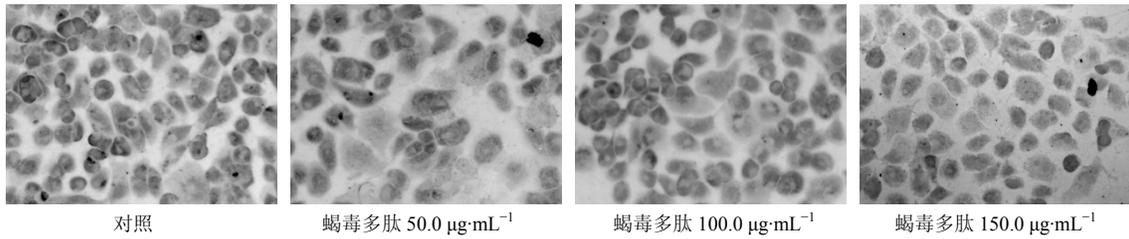


图 2 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞 VEGF 蛋白表达的影响 (免疫细胞化学法)

Fig. 2 Effect of PESV on protein expression of VEGF in SKOV3 cells (immunocytochemistry)

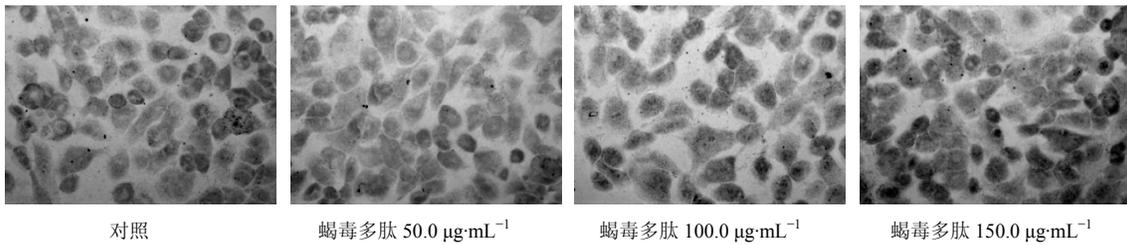
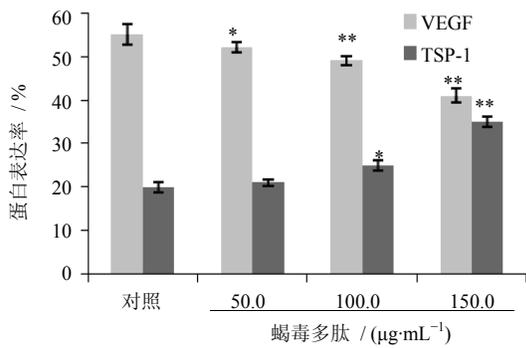


图 3 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞 TSP-1 蛋白表达的影响 (免疫细胞化学法)

Fig. 3 Effect of PESV on protein expression of TSP-1 in SKOV3 cells (immunocytochemistry)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; same as below

图 4 蝎毒多肽对 SKOV3 细胞 VEGF 和 TSP-1 蛋白表达率的影响 (免疫细胞化学法)

Fig. 4 Effect of PESV on protein expression rates of VEGF and TSP-1 in SKOV3 cells (immunocytochemistry)

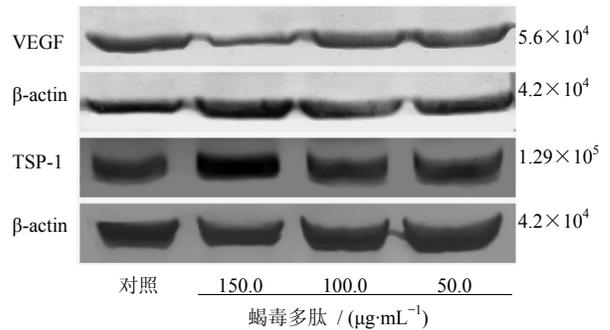


图 5 蝎毒多肽作用后 SKOV3 细胞 VEGF 和 TSP-1 蛋白表达的电泳图

Fig. 5 Electrophoresis on protein expression of VEGF and TSP-1 in SKOV3 cells after PESV treatment

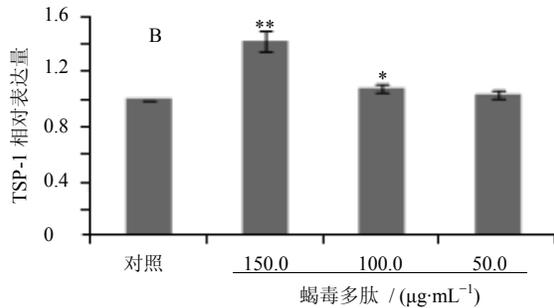
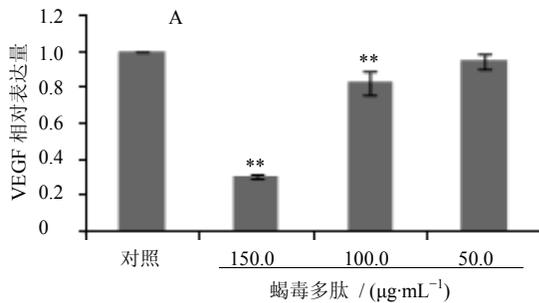


图 6 蝎毒多肽作用后 SKOV3 细胞 VEGF (A) 和 TSP-1 (B) 的蛋白表达

Fig. 6 Protein expression of VEGF (A) and TSP-1 (B) in SKOV3 cells after PESV treatment

管生成因子中, VEGF 最为关键, 其通过作用于特异性受体 Flt-1 和 KDR, 刺激有丝分裂, 促进新生血管生长, 增加血管通透性, 为肿瘤的侵袭和转移创造条件^[8]。TSP-1 是重要的内源性血管新生抑制物, 其抑制作用表现出多效性的特点, 几乎对血管生成的每一个环节都有直接或间接影响, 即一方面可直接抑制内皮细胞增殖, 诱导内皮细胞凋亡, 调节内皮细胞蛋白酶活性, 另一方面还可以基质屏障的形式对血管生成过程发挥抑制作用; 不仅如此, TSP-1 还能够抑制 VEGF 的启动并与活性基质金属蛋白酶 (MMPs) 结合, 阻断 VEGF 与 KDR 的相互作用, 间接抑制肿瘤血管生成^[9]。TSP-1 的抗血管生成活性已被许多实验所证实, 并且发现在多种肿瘤组织中 VEGF 与 TSP-1 表达强度呈显著负相关关系, 因此 VEGF 与 TSP-1 表达的不平衡是促进肿瘤发展及血管生成的分子基础^[10-11]。

东亚钳蝎蝎毒作为一种传统中药已应用于多种疾病的治疗, 其抗肿瘤作用也越来越受到重视。蝎毒多肽是蝎毒中提取的一种含 50~60 个氨基酸的多肽组分, 本实验结果显示, 蝎毒多肽质量浓度 > 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对人卵巢癌 SKOV3 细胞杀伤效果明显, 并且随着质量浓度的升高对细胞增殖的抑制作用增强, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率可达 79.22%; 免疫细胞化学法检测显示, 蝎毒多肽还质量浓度相关地使 SKOV3 细胞 TSP-1 蛋白表达上调, 尤其是高剂量 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 TSP-1 蛋白呈强阳性表达, 而 VEGF 表达则随蝎毒多肽质量浓度增加而减少, Western blotting 法检测结果与免疫细胞化学法基本一致。因此可以确定蝎毒多肽在上调 TSP-1 蛋白表达的同时对 VEGF 表达产生抑制作用, 从而能够改善肿瘤细胞中促血管生成因子与血管生成抑制因子的不平衡, 促进肿瘤血管及微环境正常化, 进而影响肿瘤血管生成过程, 发挥抗肿瘤作用。

综上所述, 蝎毒多肽对人卵巢癌细胞 SKOV3 增殖有抑制作用, 并可影响血管生成过程关键因子 VEGF 与 TSP-1 蛋白表达, 为蝎毒多肽抗肿瘤作用机制提供了新依据。蝎毒多肽在体内对卵巢癌的抗肿瘤作用及抗血管生成机制将进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张维东, 崔亚洲, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2): 152-155.
- [2] 王兆朋, 张维东, 武利存, 等. 蝎毒提取物抑制 Lewis 肺癌化疗期间再增殖实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 103-107.
- [3] 徐林, 张维东, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 Lewis 肺癌生长转移的抑制作用 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(1): 82-84.
- [4] 张维东, 崔亚洲, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 343-346.
- [5] Rolny C, Mazzone M, Tugues S, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through down-regulation of PlGF [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(1): 31-44.
- [6] Andre F, Berrada N, Desmedt C. Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients [J]. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(6): 547-551.
- [7] Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 410-414.
- [8] Roskoski R J. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3): 287-291.
- [9] Garside S A, Harlow C R, Hillier S G, et al. Thrombospondin-1 inhibits angiogenesis and promotes follicular atresia in a novel *in vitro* angiogenesis assay [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(3): 1280-1289.
- [10] Kwak C, Jin R J, Lee C, et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J]. *BJU Int*, 2002, 89(3): 303-309.
- [11] Donmez G, Sullu Y, Baris S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas [J]. *Pathol Res Pract*, 2009, 205(12): 854-857.