

研究报告

软骨血管生成抑制因子抑制血管生成的研究*

沈先荣 贾福星 于志洁 徐惠 王玲

陈杞

(海军医学研究所, 上海 200433)

(第二军医大学, 上海 200433)

摘要 小牛气管软骨经盐酸胍抽提, 丙酮分级沉淀, 膜超滤, 柱层析等步骤得到软骨血管生成抑制因子(cartilage angiogenesis inhibiting factor, CAIF). SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 CAIF 由单一组分组成, 分子量为 27 700. 通过 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入, 活细胞检测等方法测定 CAIF 对内皮细胞、Hela 细胞、QGY7703 细胞与小鼠骨髓细胞、人皮肤成纤维细胞等的 DNA 合成的影响, 以及细胞毒作用. 采用鸡胚绒毛尿囊膜实验测定 CAIF 对血管生成的抑制效应. 结果显示: CAIF 对内皮细胞产生强的抑制作用, 对 Hela 细胞抑制很弱, 对 QGY7703 细胞、小鼠骨髓细胞、人皮肤成纤维细胞均无抑制作用; 对鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成产生明显的抑制作用. 提示 CAIF 能较特异地抑制血管生成, CAIF 达到电泳纯, 是专一性较强的血管生成抑制因子.

关键词 血管生成抑制因子, 软骨, 肿瘤防治, 血管生成, 内皮细胞

成人血管生成通常只限于伤口愈合与女性的生殖周期过程, 几乎所有其它的血管生成都是病态的, 如实体瘤的生长、糖尿病性视网膜病及各种炎性疾病等^[1]. 肿瘤生长是血管依赖的, 抑制血管生成可抑制实体瘤的生长和转移^[2]. 到目前为止, 人们已发现了许多类型的血管生成抑制因子, 主要有细胞因子、激素、维生素、抗菌素、酶抑制剂等^[3], 其中有些已应用于临床, 并取得一定疗效, 但大部分都由于毒性太大而受到限制.

软骨含有多种抗肿瘤有效成分, 主要可分为两大类: 血管生成抑制因子和肿瘤细胞抑制因子. 软骨血管生成抑制因子在国外已有一些研究, 但报道不完全一致, 似乎软骨含有几种血管生成抑制因子. 本文从小牛气管软骨中分离纯化得到血管生成抑制因子, 并对其生物学效应进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

SephadexG-75, Pharmacia 公司; 考马斯亮蓝 R250, Sigma 公司; 胰蛋白酶, 1:250, Difco 进口分装; RPMI-1640 培养基, Scientific 公司; DMEM 培养基, Serva 公司; PPO、POPOP、Roth 进口分装; 盐酸胍, Sigma 公司; 阳性对照——血管生长素(ANG), 本所二室提供; 其余为一般常用试剂.

小牛血管内皮细胞, 本实验室原代培养; QGY7703 细胞, 复旦大学罗祖玉教授惠赠; Hela 细胞, 人皮肤成纤维细胞(hsFC), 第二军医大学王肖鹏教授惠赠; 昆明种小鼠, 第二军医大学动物房; 马血清, LP3-条件培养基, 第

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1994-07-06, 修回日期: 1994-10-15

二军医大学 369 教研室杨如俊教授惠赠; 小牛气管软骨, 上海市第二牧场提供。

1.2 实验方法

1.2.1 CAIF 的制备 小牛气管软骨 300g 用 2L 1mol/L 的盐酸胍抽提 48h, 45%—65% 丙酮分级沉淀, 1—30 万 Amicon 膜超滤, SephadexG-75 柱层析等步骤得到 CAIF 白色粉末。

1.2.2 CAIF 纯度鉴定及分子量测定 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 参考莽克强^[4], 王宗仁^[5]方法

1.2.3 CAIF 抑制内皮细胞、肿瘤细胞及人皮肤成纤维细胞等 DNA 合成的测定 参考 Takigawa 方法加以改进^[6]。利用 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入法。内皮细胞用含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, Hela 细胞、QGY7703 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 人皮肤成纤维细胞用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液。在 37℃, 5% CO_2 条件下培养。

1.2.4 CAIF 影响小鼠骨髓细胞 DNA 合成的测定 参考王洪斌等方法加以改进^[7]。昆明种小鼠, 在无菌条件下取的股骨, 用 Hank's 液冲出骨髓, 制成细胞悬液。加含 20% 马血清和 LP3-条件培养基的 RPMI-1640 培养液, 40 孔细胞培养板, 每孔加细胞 1×10^5 个, 在 37℃, 5% CO_2 条件培养。4d 后, 加入不同浓度的 CAIF, 处理 24h, 加 $7.4 \times 10^4 \text{Bq}$ 的 $[^3\text{H}]$ -TdR 孵育 6h, 用液体闪烁计数器测定。

1.2.5 CAIF 对内皮细胞、肿瘤细胞及正常成纤维细胞等细胞毒作用的测定 参考杨景山方法^[8]。

1.2.6 CAIF 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的抑制效应的测定 参考付生法等^[9]方法加以改进, 将其孵化第 9 天加样改为第 4 天加样, 以生理盐水为试剂对照, 以 ANG 为阳性对照, 常规照相记录结果。

2 实验结果

2.1 软骨 CAIF 的制备

超滤获得的制剂对 SephadexG-75 进行柱

层析, 得到二个洗脱峰, 如图 1。收集第二峰, 浓缩冻干后得到 CAIF 白色粉末 4.99mg。

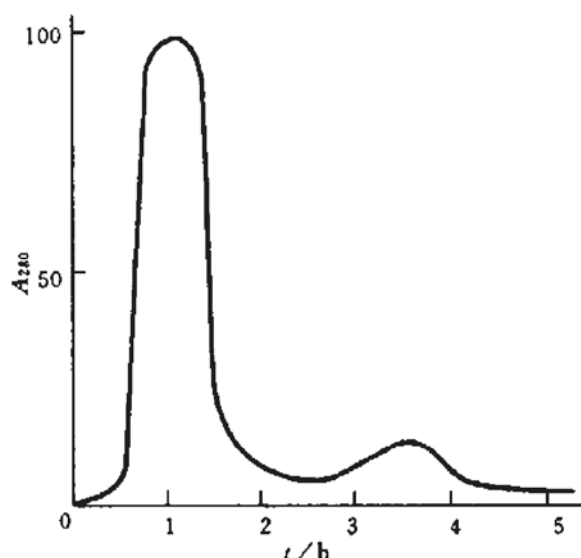


图 1 软骨制剂的 SephadexG-75 柱层析

2.2 CAIF 纯度鉴定及分子量的测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳结果如图 2 所示。CAIF 由单一组分组成, $M_r = 27\ 700$ 。

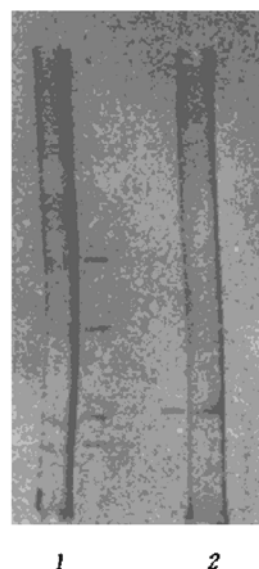


图 2 CAIF 的 SDS-PAGE

1: 分子量标准蛋白; 2: CAIF。

2.3 CAIF 对各种细胞 DNA 合成的抑制效应 以抑制率表示对细胞 DNA 合成的抑制程度, 计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 cpm} - \text{处理组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100$$

CAIF 对内皮细胞 DNA 合成的抑制作用很强, 有明显浓度依赖关系 (F 检验, $P < 0.0001$); 对 Hela 细胞的 DNA 合成有弱抑制作用, 无浓度依赖关系 ($P < 0.01$); 对 QGY7703 细胞则无明显影响 ($P > 0.05$) (图 3), 提示 CAIF 能较特异地对血管内皮细胞的 DNA 合成产生抑制作用。

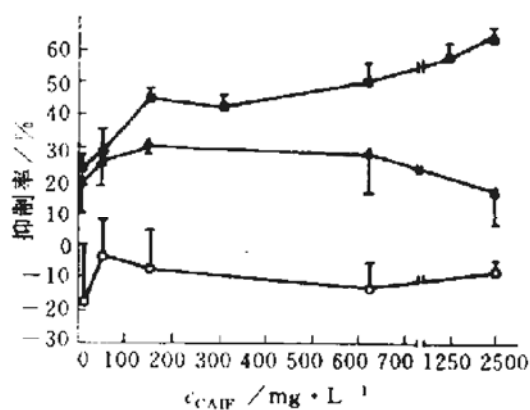


图 3 CAIF 对 3 种细胞 DNA 合成的抑制效应

● ● baEC; ▲ ▲, Hela 细胞;
□ □, QGY7703 细胞。

CAIF 促进人皮肤成纤维细胞的 DNA 合成, 在浓度为 2500mg/L 时, 对人皮肤成纤维细胞 DNA 合成的抑制率为 -45.21 ± 5.17 ($P < 0.0005$)。CAIF 对小鼠骨髓细胞 DNA 合成的抑制如表 1。CAIF 对骨髓细胞 DNA 合成具有促进作用, 提示 CAIF 对正常细胞不产生抑制作用。

表 1 CAIF 对小鼠骨髓细胞 DNA 合成的抑制率

$c/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率(%)	P
625	-26.10 ± 12.49	> 0.05
1250	-63.64 ± 17.31	< 0.01
2500	-15.84 ± 15.66	> 0.05

注: $\bar{x} \pm s$

2.4 CAIF 对各种细胞的细胞毒作用

以死亡率表示细胞毒作用的程度, 计算公

式为:

$$\text{死亡率} = \frac{\text{处理组死细胞百分比}}{\text{生理盐水组死细胞百分比}}$$

CAIF 对各种细胞的细胞毒作用如表 2。CAIF 对 Hela 细胞只在高浓度时有明显致死作用 ($P < 0.05$); 对 QGY7703 细胞及人皮肤成纤维细胞无明显致死作用 ($P > 0.05$), 说明 CAIF 对人肿瘤细胞及正常细胞无明显的细胞毒作用, 与 DNA 合成抑制实验结果一致。

表 2 CAIF 对各种细胞的细胞毒作用

c ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	死亡率 ($\bar{x} \pm s$)		
	Hela 细胞	QGY7703 细胞	人皮肤成纤维细胞
26	0.80 ± 0.28	1.29 ± 0.17	0.61 ± 0.16
101	1.58 ± 0.37	1.22 ± 0.01	0.67 ± 0.19
416	1.78 ± 0.95	0.69 ± 0.17	0.57 ± 0.35
1670	3.50 ± 0.81	1.18 ± 0.37	0.46 ± 0.29

2.5 CAIF 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的抑制效应

结果如图 4 所示, 与生理盐水对照相比, ANG 对血管生成有明显的刺激作用, CAIF 对血管生成有明显的抑制作用, 这进一步说明 CAIF 有抑制血管生成的作用。

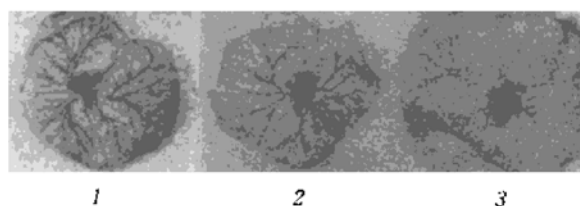


图 4 CAIF 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的抑制效应

1: ANG; 2: 生理盐水; 3: CAIF.

3 讨 论

新血管生成过程包括 3 个主要步骤: 内皮细胞的增殖、迁移和内皮芽的形成。抑制血管生成主要是抑制内皮细胞的增殖和迁移。目前,

已发现了多种能抑制血管生成的物质,有些已应用于临床,但大部分由于其毒性较高而受到限制^[10]. 软骨血管生成抑制因子来源于动物脏器,未发现有明显毒副作用,具有较好的临床应用前景. 1983年 Anne 等^[11]发现软骨中含有肿瘤血管生成的抑制剂,1985年 Takigawa 等^[6]从牛软骨中得到一种粗提物能对血管内皮细胞产生抑制效应,后来他们又发现兔肋软骨细胞^[12]和人软骨肉瘤细胞^[13]的条件培养基有抑制血管生成的作用,但一直未见他们得到纯化均一的血管生成抑制因子的报道. 直到1990年才由 Moses 等^[14]首次从软骨中获得一种电泳纯的因子,它能抑制内皮细胞的增殖和鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成.

本文得到的 CAIF 经 SDS-PAGE 鉴定为一条带,分子量为 27 700,能非常显著抑制小牛主动脉血管内皮细胞的 DNA 合成,而对 Hela 细胞只有较弱的 DNA 合成抑制活性及细胞毒作用,对其它细胞如 QGY7703 细胞,人皮肤成纤维细胞,小鼠骨髓细胞等的 DNA 合成无明显抑制效应,无细胞毒作用. CAIF 对鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成有明显的抑制效应. 说明 CAIF 是特异性较强的血管生成抑制因子. CAIF 与 Moses 等获得的因子具有类似的性质,是否属于同一物质,有待于进一步研究,我们在实验中发现软骨中含有好几种具有抑制血管生成活性的物质,正在进行有关研究.

软骨血管生成抑制因子的作用机理目前还不清楚. 血管生成过程中,内皮芽的生长需要蛋白水解酶清除“路障”,抑制酶活性使内皮芽无法形成,可能是软骨 AIF 的作用机理之一. 本文结果说明软骨 CAIF 能非常显著抑制内皮细胞增殖及 DNA 合成,提示抑制遗传物质的合成,影响染色体复制,使细胞分裂受阻;或者影响细胞代谢,使其不能合成所需的蛋白水解酶,可能是软骨血管生成抑制因子作用的分子机制.

此外,我们发现 CAIF 对小鼠骨髓细胞 DNA 合成产生明显的促进作用,提示 CAIF 可能具有刺激造血系统的作用. 对此进行深入研

究,有可能得出令人兴奋的结果.

软骨血管生成抑制因子直接来源于动物组织,无明显毒副作用,具有较好的临床应用前景. 我们得到的 CAIF 能抑制血管生成,切断肿瘤的营养供应,是肿瘤治疗的潜在新药物. 加强这一领域研究,很有可能为我国肿瘤治疗提供一条有效途径.

参 考 文 献

- 1 Maoiné T E, Sharp R T. *TiPS*, 1990; **11**: 457
- 2 Taylor S, Forkman J. *Nature*, 1982; **297**: 307
- 3 沈先荣,贾福星. 国外医学-药学分册, 1994; **21** (4): 215
- 4 莽克强主编. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975: 43
- 5 王宗仁,贾凤兰,吴鹤龄主编. 动物遗传学实验方法. 北京: 北京大学出版社, 1990: 132
- 6 Takigawa M, Shirai E, Enomoto M *et al.* *Cell Biol Int Rep*, 1985; **9** (7): 619
- 7 王洪斌,郑钦岳. 中华血液学杂志, 1991; **12**: 328
- 8 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990: 118
- 9 付生法,陆应麟,张朝山等. 军事医学科学院院刊, 1993; **17** (4): 294
- 10 Folkman J. *J Nat Canner Inst*, 1990; **82** (1): 4
- 11 Anne L, Langer R. *Science*, 1983; **221**: 1185
- 12 Takigawa M, Shirai E, Enomoto M *et al.* *Biochem Int*, 1987; **14**: 357
- 13 Takigawa M, Pan H-O, Enomoto M *et al.* *Anticancer Research*, 1990; **10**: 311
- 14 Moses M A, Sudhalter J, Langer R. *Science*, 1990; **248**: 1408

Inhibitory Effect of Cartilage Angiogenesis Inhibiting Factor on Angiogenesis. Shen Xian-rong, Jia Fuxing, Yu Zhijie, Xu Hui, Wang Ling (*Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China*); Chen Qi (*Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Cartilage angiogenesis inhibiting factor (CAIF) was purified from cartilage by guanidine hydrochloride extraction, acetone fractional precipitation, ultrafiltration, column chromatography. With SDS-PAGE, it

showed a single band of CAIF with molecular weight of 27 700. By the methods of [^3H] - TdR incorporation and the determination of mortality of cells, the effect of CAIF on the DNA synthesis and cytotoxicity of all cell lines were investigated and the inhibitory effect of CAIF on angiogenesis was measured by the experiment of chorioallantoic membrane of chicken embryos. The results showed that CAIF inhibited the endothelial cell strongly and Hela cell slightly; but not QGY7703 cell,

human skin fibroblast, and mice myeloid cell. It also inhibited the angiogenesis in the chorioallantoic membrane of chicken embryos significantly. All these results suggest that CAIF has the inhibitory effect on angiogenesis. It is a specific angiogenesis inhibiting factor, and may be a useful drug on tumor therapy in some day.

Key words angiogenesis inhibiting factor, cartilage, carcinoma control, angiogenesis, endothelial cell

成熟小麦抗穗发芽能力与超弱发光关系的研究

周 禾

(北京农业大学草地所, 北京 100094)

杨起简*

(北京农学院农学系, 北京 102208)

摘要 生物体的超弱发光表现与其本身的生理活动密切相关. 利用超弱发光为指标, 测定和比较了小麦不同品种在成熟时抗穗发芽的能力. 为其进一步应用, 解决农业实际问题提供方法和依据.

关键词 超弱发光, 小麦, 抗穗发芽, 休眠期

生物体超弱发光现象作为生命活动的一个特征指标, 已在一些领域得以应用^[1-4]. 在植物超弱发光应用研究中, 一般用于农作物抗逆性能力的鉴定. 植物体在生长状态下自发存在的这种发光, 反映了植物生理代谢活动的强弱, 从而可以比较不同遗传背景下品种间的差异, 这为植物抗逆育种提供了新的可靠的鉴定方法^[3,4]. 小麦成熟收割后遇雨而发生带穗发芽的情况, 往往造成大幅度减产, 且品质下降. 本试验利用超弱发光指标的测定, 比较小麦不同品种在成熟时抗穗发芽能力的差异, 为品种鉴定及抗逆育种提供依据, 以解决农业生产中较为迫切的问题.

1 材料和方法

测量仪器为美国 Packard 2250 CA 和

2200 CA 液闪分析仪. 可快速测量 cpm. 单光子计数 (SPC) 过程为全自动电脑操作, 并作直方图, 自动打印. 样品在液闪测量瓶中测量, 测试时间 10s, 每个样品测量 2 次, 取平均数自动计数.

实验材料中小麦品种由中国农业科学院品种资源研究所提供, 其余部分品种由北京农学院提供.

实验是在小麦完熟期和贮藏期分别测定其超弱发光强度, 以确定品种间的差异.

小麦完熟期收获后, 马上施以水分, 在室温 24—28℃ 条件下按常规方法萌发, 同时连续测量超弱发光值. 这时种子因休眠状态不同而

* 通讯联系人.

收稿日期: 1994-06-13, 修回日期: 1994-09-05