

鲨鱼软骨制剂抑制血管生成的研究*

沈先荣 贾福星 王 玲 雷呈祥

(海军医学研究所, 上海 200433)

摘要 以鲨鱼软骨为原料, 经盐酸胍抽提, 丙酮分级沉淀, 超滤等步骤得到鲨鱼软骨制剂 (shark cartilage preparation, SCP). 利用整装细胞扫描电镜方法测定 SCP 对血管内皮细胞骨架系统的影响, 体外细胞迁移实验测定它对内皮细胞迁移的抑制效应, 及鸡胚绒毛尿囊膜实验测定对血管生成的抑制效应. 结果表明 SCP 能显著抑制内皮细胞的骨架形成; 显著抑制内皮细胞的迁移, 并有明显的浓度依赖关系; 显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成. 细胞骨架是细胞分裂增殖及运动迁移的基础, 血管内皮细胞的运动迁移又是血管生成的基础, 因此 SCP 的作用机理可能是通过抑制细胞骨架的形成, 抑制内皮细胞的运动迁移, 从而抑制血管生成.

关键词 鲨鱼, 软骨, 血管生成, 鸡胚绒毛尿囊膜, 细胞骨架, 内皮细胞

血管生成即新血管的发生与生长过程, 涉及许多威胁人类健康的疾病的发生与发展过程. 抑制血管生成已经成为血管增生性疾病的重要疗法. 目前, 已发现了一些不同类型的血管生成抑制因子, 有些已应用于临床, 但大部分都由于毒性太大而受到限制. 软骨中含有血管生成抑制因子. 我们从鲨鱼软骨中制备获得鲨鱼软骨制剂 (shark cartilage preparation, SCP), 对其抗血管生成效应及其作用机制进行了研究, 显示了良好的应用前景.

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

盐酸胍, 2-N-吗啡啉乙磺酸 (MES), 胶原酶, Sigma 公司产品; 胰蛋白酶, 1: 250, Difco 进口分装; RPMI-1640 培养基, Scientific 产品; Triton X-100, Rohm-Haas 进口分装; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 华美生物工程公司; EGTA, AR, 湖州生物化学厂; 1, 4-哌嗪-N, N'-双(乙磺酸) (PIPES), 上海生化所东风生化试剂公司; 小牛血清, 上海市第二牧场; 其余为一般常用试剂. 小牛主动脉血管内皮细胞, 本实验室原代培养; 鲨鱼软骨, 购自上海海洋渔业公司.

1.2 实验方法

1.2.1 鲨鱼软骨制剂的制备: 300 g 鲨鱼软

骨经 2L 1 mol/L 的盐酸胍抽提 48 h, 45% ~ 65% 丙酮分级沉淀, 1 万 ~ 30 万 Amicon 膜超滤, 获得鲨鱼软骨血管生成抑制剂 (SCP) 1.35 g.

1.2.2 SCP 抑制血管内皮细胞细胞骨架的测定: 参考 Ladyman 等^[1] 的方法加以改进. 将血管内皮细胞培养在玻片上, 用 0.5% 的 TritonX-100 抽提细胞, 2.5% 的戊二醛固定 30 min, 1% OsO₄ 后固定, 乙醇逐级脱水, 乙腈干燥, 喷金后在扫描电镜下观察. 以 5 mg/L 的 SCP 处理细胞, 以生理盐水作对照.

1.2.3 SCP 抑制血管内皮细胞迁移的测定: 参考 Burk 的方法加以改进^[2]. 将血管内皮细胞培养于 Φ 6 cm 的塑料培养皿中, 待细胞长满一层, 用单向刀片在培养皿中划一道沟, 轻轻括去一侧的细胞, 用 Hank's 液洗 2 次, 加入含有 SCP 的 RPMI-1640 培养基继续培养, 48 h 后取出培养物, 用甲醇固定, 瑞氏色素染色, 显微摄影记录结果, 并计数不同迁移距离的迁移细胞数, 按下列公式计算迁移抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组细胞数} - \text{实验组细胞数}}{\text{对照组细胞数}} \times 100$$

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-08-15

1.2.4 SCP对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制的测定: 参考付生法等^[3]的方法加以改进. 将孵化第9天加样改为孵化第4天加样, 以生理盐水为试剂对照, ANG为阳性对照, SCP的处理浓度为0.5 mg/L, 加样量为10 μ L. 照相记录结果, 并以给药点为中心, 以半径分别为6 mm、12 mm、18 mm, 将鸡胚绒毛尿囊膜分为3个区域, 分别计数3个区域的主血管数, 比较各药组与对照组之间的差异.

2 实验结果

2.1 SCP对内皮细胞细胞骨架的抑制效应

结果如图1所示. 生理盐水对照组细胞骨架完整, 伸展良好. SCP处理组细胞骨架发生凝聚, 结构不完整, 说明SCP能抑制内皮细胞骨架的形成, 提示SCP可能通过抑制细胞骨架从而抑制内皮细胞的分裂增殖及其运动迁移.

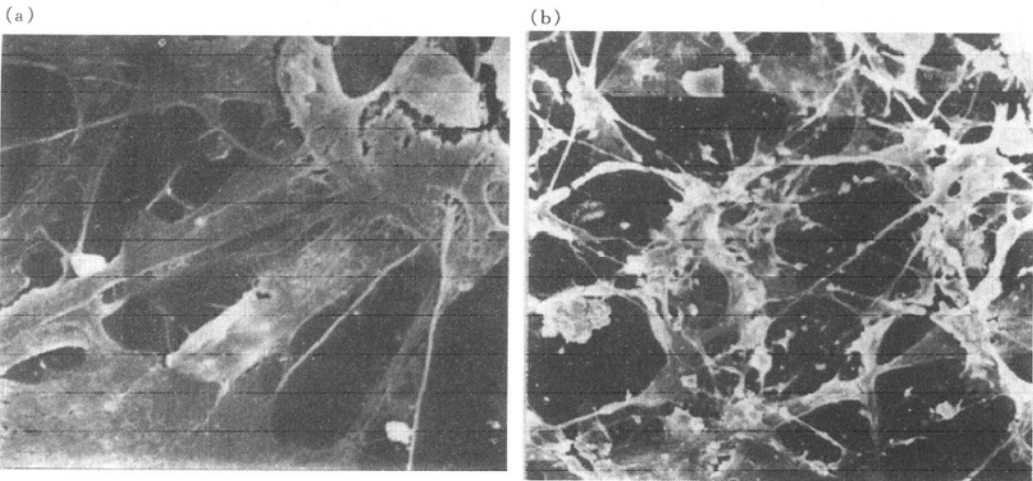


图1 SCP对内皮细胞细胞骨架的抑制效应
(a) 生理盐水组; (b) SCP处理组. 放大倍数: $\times 5000$.

2.2 SCP对血管内皮细胞迁移的抑制效应

结果如图2所示. SCP对内皮细胞的迁移具有明显的抑制作用, 抑制效应有明显的浓度依赖关系, 随着SCP浓度的增加, 迁移到各个距离的细胞数明显减少. 将迁移距离按0.25 mm划分为3个等分区域, 计算各区域的迁移抑制率, 结果如表1所示. 不同剂量组间

比较, 在各个迁移区域内, 迁移抑制率都随着SCP浓度的增加而明显升高; 不同迁移区域间比较, 各剂量组都随着迁移距离的增大, 迁移抑制率有不同程度的升高. 上述结果说明SCP能显著抑制内皮细胞的迁移运动能力, 抑制程度有明显的浓度依赖关系. 提示SCP可能通过抑制内皮细胞的运动迁移从而抑制血管生成.

表1 SCP对血管内皮细胞的迁移抑制率

$c/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	各区域的迁移抑制率/%		
	0~ 0.25 mm	0.25~ 0.50 mm	0.50~ 0.75 mm
1	36.32 $\pm$ 5.81	52.86 $\pm$ 3.19	58.49 $\pm$ 8.44
5	57.69 $\pm$ 3.89	70.72 $\pm$ 6.19	90.57 $\pm$ 12.37
50	73.51 $\pm$ 1.91	81.43 $\pm$ 3.19	98.11 $\pm$ 3.27

注: $\bar{x} \pm s$.

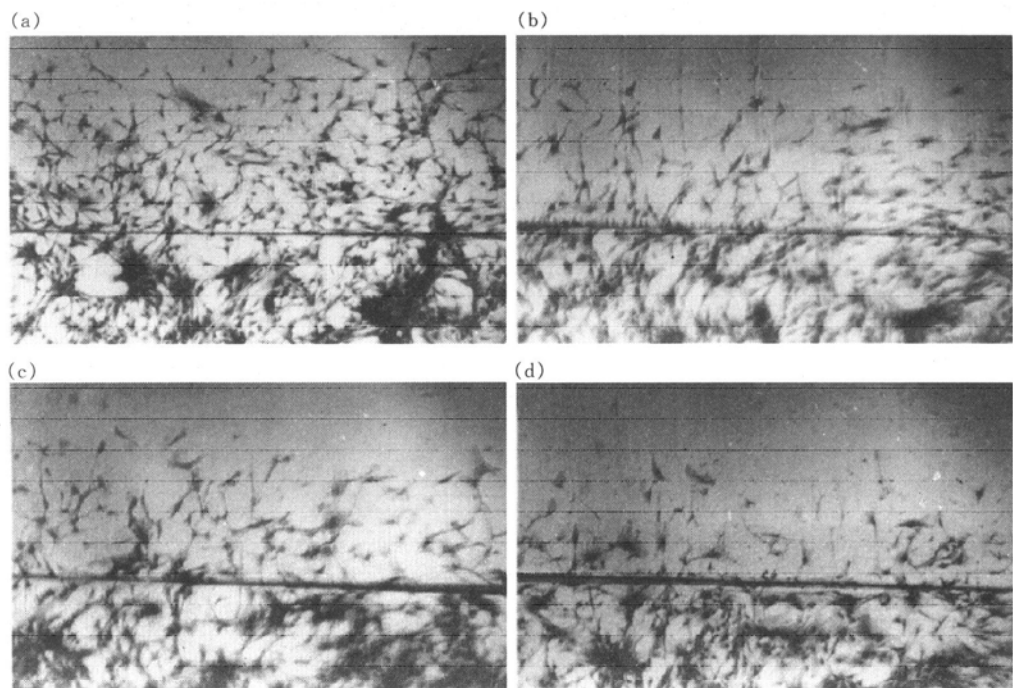


图 2 SCP 对内皮细胞迁移的抑制效应

(a) 生理盐水组; (b) SCP1 组 (1 mg/L); (c) SCP2 组 (5 mg/L); (d) SCP3 组 (50 mg/L).

2.3 SCP 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的抑制效应

结果如图 3 所示. SCP 对鸡胚绒毛尿囊膜的生长具有明显的抑制作用. 生理盐水组血管生长良好, 血管分支适中; 阳性对照 ANG 组血管生长旺盛, 血管分支明显增多; SCP 处理组血管生长明显受到抑制, 血管分支显著减少. 分区计数主血管数, 结果如表 2 所示. 在

3 个不同的区域内, 与生理盐水对照组比较, ANG 组的主血管数都有显著或非常显著的增加, 而 SCP 组的主血管数都有显著或非常显著的下降. 我们已经报道了小牛软骨血管生成抑制因子 CAIF 具有明显的抑制血管生成的效应^[4]. 从表 2 看出, SCP 能显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成, 是一种有效的血管生成抑制剂, 但其作用强度不如 CAIF.

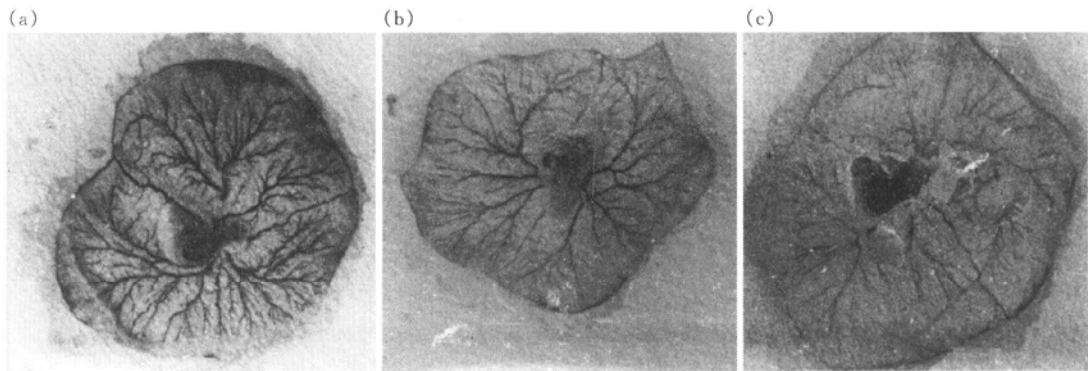


图 3 SCP 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的抑制效应

(a) ANG 组; (b) 生理盐水组; (c) SCP 组.

表 2 SCP 对鸡胚绒毛尿囊膜不同区域的主血管数的影响

分区	主血管数			
	生理盐水	ANG	SCP	CAIF
0~ 6 mm	5. 75 ±0. 43	9. 25 ±1. 92	1. 75 ±0. 83	2. 75 ±1. 07
6~ 12 mm	16. 75 ±1. 30	30. 00 ±3. 08	6. 00 ±1. 00	5. 25 ±1. 09
12~ 18 mm	31. 25 ±2. 17	51. 50 ±4. 33	14. 50 ±3. 50	6. 75 ±1. 09

注: $\bar{x} \pm s$.

3 讨 论

血管生成与许多威胁人类生命的疾病有关^[5]。例如实体瘤的生长需要血管生成来输送营养和氧, 肿瘤组织会释放一种血管生成刺激因子, 诱导血管向肿瘤组织生长^[6]。此外, 血管生成与动脉粥样硬化、关节炎、视网膜增生及内皮细胞恶变 (如血管瘤) 等密切相关^[7]。目前, 已有一些血管生成抑制药物如某些激素和氨甲喋呤 (methotrexate) 等^[8], 但大部分都由于毒性较大不能应用于临床。寻找新的高效低毒的血管生成抑制药物已引起人们极大的兴趣。

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。而微管、微丝是细胞分裂增殖和运动迁移的基础。我们已经报道鲨鱼软骨制剂具有抑制血管内皮细胞 DNA 合成的效应^[9]。本文结果说明 SCP 能显著抑制内皮细胞的骨架系统, 显著抑制内皮细胞的运动迁移, 并对鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成具有明显的抑制效应。提示 SCP 抑制血管生成的作用机理可能是通过抑制细胞骨架的形成, 从而抑制内皮细胞的运动迁移, 并因此抑制新生血管生成。

我们报道的 CAIF 为纯化均一的血管生成抑制因子, 具有非常明显的抑制血管生成作用。SCP 仍是粗制物, 其抑制血管生成效应不如 CAIF, 但其中还含有能直接抑制肿瘤细胞生长的肿瘤细胞抑制因子, 具有较好的抗肿瘤作用 (另文发表)。鲨鱼属于软骨鱼类, 是软骨的重要来源, SCP 直接来源于鲨鱼软骨, 无明显毒副作用。加快进行临床应用研究, 有可能为肿瘤治疗提供一种新药物。

参 考 文 献

1 Ladyman S J, Townsend K M S, Edwards C. The effects of X irradiation on the cytoskeleton of rat alveolar macrophage *in vitro*. Radiat Res, 1984, **99**: 25~ 35

2 Burk R R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, **70** (2): 369~ 372

3 付生法, 陆应麟, 张朝山等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术. 军事医学科学院院刊, 1993, **17** (4): 294~ 297

4 沈先荣, 贾福星, 于志洁等. 软骨血管生成抑制因子抑制血管生成的研究. 生物化学与生物物理进展, 1995, **22** (3): 237~ 241

5 Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem, 1992, **267** (16): 10931~ 10934

6 Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. J Clin Onco, 1994, **12** (3): 441~ 443

7 Maione T E, Sharpe R J. Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications. TIPS, 1990, **11**: 457~ 461

8 沈先荣, 贾福星. 血管生成抑制因子在肿瘤防治中的研究进展. 国外医学药学分册, 1994, **1** (4): 215~ 220

9 沈先荣, 贾福星, 王 玲等. 鲨鱼软骨制剂抗肿瘤作用的研究. 中国生化药物杂志, 1995, **16** (4): 157~ 160

The Inhibitory Effect of Shark Cartilage Preparation on Angiogenesis. SHEN Xianrong, JIA Fuxing, WANG Ling, LEI Chengxiang (*Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China*).

Abstract Shark cartilage preparation (SCP) was extracted from shark cartilage by the method of guanidine hydrochloride extraction, acetone fractional precipitation, and ultrafiltration. The effect of SCP on the cytoskeleton of endothelial cell was investigated by the whole cell scanning electron microscopy.

The effects of SCP on endothelial cell migration and angiogenesis were measured by the cell migration experiment and the chicken embryo chorioallantoic membrane experiment, respectively. The results showed that the cytoskeleton of endothelial cell was wrinkled, and SCP inhibited the migration of endothelial cell, the inhibitory rate was concentration dependent. SCP also inhibited the angiogenesis in the

chorioallantoic membrane of chicken embryos significantly. These results suggest that SCP has the inhibitory effect on angiogenesis, and the mechanism may be that SCP inhibits the cytoskeleton of endothelial cell, so inhibits the cell's migration, and so inhibits angiogenesis.

Key words shark, cartilage, angiogenesis, cytoskeleton, chicken embryo chorioallantoic membrane, endothelial cell

抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的超微结构研究*

张双全 贾红武 戴祝英
(南京师范大学生物系, 南京 210097)

摘要 报道了家蚕抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的体外实验研究. 结果表明: 纯化后的家蚕抗菌肽 CM4 对培养的 K562 (人髓样白血病细胞) 有很强的杀伤作用. 用扫描和透射电镜观察超微结构以及用激光共聚焦显微断层图像分析, 表明微量纯化的抗菌肽 CM4 能使 K562 癌细胞产生一系列的病理变化, 可造成细胞高度肿胀, 膜与胞质分离, 细胞器和膜结构排列紊乱, 细胞表面微绒毛消失, 出现不规则的孔洞, 细胞骨架严重破坏, 膜局部结构破裂, 缺损, 胞浆内容物大量外泄, 最终细胞解体, 崩解成碎片.

关键词 抗菌肽, 癌细胞, 超微结构

自 Boman 教授^[1]发现并首先测定了惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropin*) 抗菌肽一级结构和抗菌谱以来, 不少学者进而研究了其抗癌活性. 日本东京大学的名取俊二教授^[2]从棕尾别麻蝇幼虫中分离到两种抗菌肽, 能促进小鼠巨噬细胞及异型核白细胞对癌细胞的攻击作用, 又能使细胞产生干扰素, 并使肿瘤坏死因子活化. 1988 年美国路易斯安娜大学的 Jaynes 等^[3]从天蚕蛾中分离到一种全能性肽 (an all-purpose peptide), 对多种细菌、病毒、原虫及癌细胞均有很强的杀伤作用. 戴祝英等^[4]观察到家蚕抗菌肽及免疫血淋巴对 B4 转化细胞有明显的杀伤作用, 使之不能贴壁和正常生长. 黄自然等^[5]观察到柞蚕免疫血淋巴对鼻咽癌细胞株的细胞膜有破坏作用. 韩献萍

等发现柞蚕抗菌肽 D 对宫颈癌细胞有明显的杀伤作用. 郭玉梅等^[6]用透射电镜观察到家蚕抗菌肽对 K562 (人髓样白血病) 细胞有明显的杀伤作用. 我们从不同的蚕免疫血淋巴中分离纯化了一系列的抗菌肽^[7], 并测定了抗菌肽的 CM4 组分的一级结构^[8]. 用纯化的抗菌肽 CM4 组分^[9]研究了对体外培养的 K562 癌细胞的杀伤作用. 结果表明抗菌肽 CM4 对培养的 K562 (人髓样白血病) 细胞具有明显的杀伤作用. 用透射和扫描电子显微镜及激光共聚焦显微断层图像分析, 观察到抗菌肽首先作用于癌细胞的细胞膜, 使之肿胀, 细胞表面

* 国家自然科学基金资助项目, 国家教育委员会留学回国人员资助费支持项目.
收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-07-29