

福安泰-03对人脐静脉内皮细胞凋亡 和小鼠创伤愈合的影响

苏伟明¹ 黄来珍¹ 马润娣^{1*} 于立坚^{1*} 王 强¹ 张霄瑜^{1,2} 于廷曦^{1,3*}

(¹广东海洋大学海洋药物重点实验室, 湛江 524025; ²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, MD 21228, USA; ³Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, MD 21201, USA)

摘要 研究福安泰-03(Fuantai, FAT-03)对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡和小鼠创伤愈合的影响。MTT法检查FAT-03对HUVECs和人低分化鼻咽癌细胞(CNE-2Z)生长的影响; 聚碳酸酯膜小室趋化运动模型(Transwell model)检测FAT-03对HUVECs运动能力的影响; 荧光显微镜观察FAT-03作用下HUVECs的形态变化; 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)双染检测FAT-03对HUVECs早期凋亡的影响; 流式细胞术分析FAT-03对HUVECs周期及凋亡的影响; Western blot法分析FAT-03对HUVECs的血管内皮细胞生长因子(VEGF)、Bcl-2、Bax表达的影响; 小鼠背部创伤模型检查FAT-03对组织修复的影响; 免疫组化法检查FAT-03对创伤组织微血管密度(microvessel density, MVD)和VEGF表达的影响。结果显示, FAT-03明显抑制HUVECs细胞的增殖和迁移, 其抑制效果与剂量和作用时间相关, 作用HUVECs 24, 48, 72 h的IC₅₀值为0.22, 0.17, 0.09 mg/mL, 但FAT-03对CNE-2Z细胞的生长却无明显的影响; 0.16 mg/mL FAT-03作用HUVECs 24 h对细胞迁移的抑制率为57.9%($P<0.01$); FAT-03处理HUVECs 48 h, 细胞的早期凋亡率增加($P<0.05$); FAT-03阻滞HUVECs于G₀/G₁期, 并呈现典型的凋亡峰; 0.16 mg/mL FAT-03作用48, 72 h, HUVECs的凋亡率分别为14.6%、41.7%; FAT-03下调HUVECs的VEGF和抑凋亡基因Bcl-2的表达, 上调促凋亡基因Bax的表达, 其效果与剂量相关。FAT-03明显延迟小鼠创伤的愈合, 且其作用与剂量相关。FAT-03组小鼠创伤周围组织微血管密度和VEGF阳性表达细胞都明显减少。因此, 可以推测, FAT-03抑制HUVECs增殖并诱导其凋亡; 抑制创伤组织的血管生成, 进而延迟创伤愈合; 它的这些作用可能与其下调VEGF、Bcl-2的表达, 上调Bax的表达相关。

关键词 福安泰-03; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 血管内皮细胞生长因子; 凋亡相关基因; 微血管密度; 创伤愈合; 小鼠

血管生成(angiogenesis)是指从已经存在的微血管床上芽生出新的以毛细血管为主的血管系统的过程。血管生成有别于血管形成(vasculogenesis)^[1]。血管生成受到正向和负向调节信号的严密调控, 在生理与病理过程中都起着重要作用, 是许多生理和病理过程(如肿瘤、缺血性疾病、慢性炎症等)的基本事件之一^[2]。血管生成过度, 可导致血管生成性疾病, 如肿瘤、血管瘤、糖尿病性视网膜病、牛皮癣、关节炎等; 而血管生成不良, 则产生创伤、溃疡愈合及微循环障碍, 直接影响疾病的治疗效果。

福安泰-03是本课题组从赤魮(*Dasyatis akajei*)组

织分离出来的一种相对分子质量大约为43 kDa、N末端氨基酸序列为“PFGNTHNKWKLNYSAEQEFP”的蛋白质^[3]。此前已经证实FAT-03抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成^[4], 本文将研究FAT-03对人脐静脉内皮细胞生长和小鼠创伤愈合的影响并初步探讨其作用机制。

收稿日期: 2011-11-04 接受日期: 2012-02-02

“863”海洋技术领域专题(No.2007AA092422)、国家自然科学基金(No.30271493)、广东省自然科学基金重点项目(No.021386)和广东省海洋与渔业局科技兴海重大项目(No.A200099B01)资助项目

*通讯作者。Tel: 0759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 0759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

RPMI-1640培养基购自美国Hyclone公司; 高级无支原体新生牛血清购自杭州四季青公司; 胰酶、噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、碘化丙啉(propidium iodide, PI)、Hoechst-33342、吖啶橙(acridine orange, AO)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、RNase A和Triton X-100购自美国Sigma公司; Annexin V-FITC试剂盒购自晶美生物工程有限公司; 兔多克隆抗VEGF(浓缩液)抗体, 抗Bax、Bcl-2和 β -actin抗体, 抗CD34抗体, 山羊抗兔IgG第二抗体, 免疫组化超敏S-P试剂盒以及APES防脱片试剂均购自北京中山生物公司; 恩度(15 mg/(3 mL·支))购自山东先声麦得津生物制药有限公司; 硫酸胺、戊巴比妥钠等其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

7周龄、(26 $\pm$ 4) g SPF级昆明种小鼠(KM), 雌雄各半, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(中国长沙)(实验动物合格证号: SCXK(湘)2009-0004)。室温(23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 12 h照明, 12 h黑暗。实验中严格遵守中华人民共和国科学技术部2006年颁发的实验动物福利和使用原则。

1.3 FAT-03的制备

从市场购得鲜活赤虹, 冰浴下去尾和内脏。无菌预冷的生理盐水冲洗。在无菌、0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下剥离皮肤弃去, 分离软组织(肉)并切成小块。以无菌预冷生理盐水离心洗涤, 加入适量无菌预冷生理盐水, 用组织匀浆器破碎匀浆10 min。超声波处理。4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 500 r/min离心, 收集上清。加硫酸胺逐级沉淀。硫酸胺逐级按20%饱和度递增的比例加入上清液。固态硫酸胺缓慢加入, 同时搅拌溶液以使浓度均匀增加。级间插入离心。以抑制血管生成活性作为同步追踪的指标, 采用凝胶过滤、离子交换层析、疏水层析、反向层析等方法分离纯化得到FAT-03^[3]。过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用前以培养基稀释到相应浓度。

1.4 FAT-03的鉴定

定性用双缩脲反应, 蛋白质浓度测定采用Lowry氏法^[5]; 蛋白质电泳采用SDS-PAGE法: 分离胶为10%聚丙烯酰胺凝胶, 上样蛋白质量为90 μg , 考马斯亮

蓝染色。

1.5 细胞培养

HUVECs购自武汉大学典型培养物保藏中心, 人鼻咽癌细胞株CNE-2Z购自广东医学院生化教研室。以含10%灭活新生牛血清、100 U/mL青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的RPMI-1640培养基, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。以0.25%胰酶+0.02% EDTA消化细胞, 2~3天传代一次。对数生长期细胞用于实验。

1.6 MTT法

取细胞接种于96孔细胞培养板, 每孔90 μL 细胞悬液(1.0×10^4 细胞)。待细胞长到约80%融合时, 加入不同浓度的FAT-03 10 μL , 对照组加入相同体积的RPMI-1640培养液, 每一浓度设4个平行孔。充分混匀后, 于 CO_2 培养箱中分别培养24, 48, 72 h。每孔加入MTT 20 μL (5 mg/mL), 继续培养5 h。每孔加入三联液100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 用酶标仪在570 nm波长处测量各孔 D 值。

1.7 细胞迁移实验

采用24孔带有聚碳酸酯膜小室的培养板, 下室加入600 μL 含50 ng/mL VEGF的RPMI-1640培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h备用。将经0.16 mg/mL FAT-03处理24 h的细胞悬液300 μL (2.0×10^4 细胞)加入上室, 对照组为未经FAT-03处理的HUVECs。设3个平行孔。细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 下迁移4 h后, 取出小室。迁移到下表面的细胞以3%福尔马林固定, 用50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PI染色。在200倍荧光显微镜下随机选择5个视野, 计数每个视野穿过膜的细胞数。上述实验在给出的实验条件下重复3次。按下式计算迁移抑制率: 迁移抑制率(%)=(1-实验组迁移细胞数/对照组迁移细胞数) $\times 100\%$ 。

1.8 荧光显微镜观察细胞形态

1.8.1 Hoechst-PI染色 细胞接种于24孔板, 每孔900 μL 细胞悬液(1×10^5 细胞)。实验组加入0.16 mg/mL FAT-03 100 μL , 对照组加入等量培养基, 培养72 h。离心24孔板5 min(1 000 r/min), 弃上清。PBS洗涤1次。加入200 μL PBS, 然后加Hoechst 33342染色液, 使其终浓度为50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 混匀。再加入PI染液, 使其终浓度为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 混匀, 染色15 min, 荧光显微镜观察、拍照。

1.8.2 AO-EB染色 细胞接种于24孔板, 每孔900 μL 细胞悬液(1×10^5 细胞)。实验组加入0.16 mg/mL FAT-03 100 μL , 对照组加等量培养基, 培养72 h。离心24孔板5 min(1 000 r/min), 弃上清。PBS洗涤1次, 加入

200 μL PBS和10 μL 混合荧光染色液(含100 $\mu\text{g/mL}$ AO和100 $\mu\text{g/mL}$ EB),混匀染色,立即置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.9 流式细胞术分析

1.9.1 膜联蛋白V-FITC-PI双染 细胞接种于6孔板,每孔1.8 mL(5×10^5 细胞)。培养24 h,实验组加200 μL 不同浓度的FAT-03,对照组加等量培养基。培养48 h后,胰酶消化,离心5 min(1 500 r/min),收集细胞置于10 mL离心管中。4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗两次。用结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其浓度为 $1 \times 10^9/\text{L}$ 。取100 mL细胞悬液置于5 mL流式管中,加5 μL Annexin V-FITC(150 mg/L)和10 μL PI(120 mg/L),混匀后室温避光孵育15 min。在反应管中加500 μL PBS,进行流式细胞仪分析。

1.9.2 PI染色 细胞接种于6孔板,每孔1.8 mL(5×10^5 细胞)。贴壁生长后,弃培养液,加无血清的RPMI-1640培养液培养18 h,使细胞同步化。再换含10%新生牛血清的RPMI-1640培养液培养6 h。实验组加0.08 mg/mL的FAT-03 200 μL ,对照组加等量培养基。作用一定时间后,胰酶消化,离心5 min(1 500 r/min)。收集细胞置10 mL离心管中。PBS洗涤2次,体积分数为70%的乙醇固定24 h以上。离心弃乙醇,细胞重悬于PBS中,加入PI染液,使其终浓度为50 $\mu\text{g/mL}$,室温下避光染色30 min。400目筛网过滤。采用美国Coulter公司生产的EPICS型流式细胞仪,以氩离子激光器激发光源(激发波长为488 nm)进行流式细胞术分析。数据输入计算机,用Multicycle软件分析。

1.10 Western blot分析

取细胞悬液4.8 mL(1×10^6 细胞),加入不同浓度FAT-03 200 μL ,对照组加等量培养基。培养72 h后,将培养瓶置于冰上,细胞刮刀小心刮脱细胞,转移到50 mL离心管中。离心15 min(3 000 r/min),收集细胞。用预冷PBS洗涤2次,加入600 μL 细胞裂解液,混匀,转移至Eppendorf管中。冰上裂解30 min后,离心15 min(4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min)。收集上清,Lowry氏法测定总蛋白质含量。在12%分离胶、5%浓缩胶上进行电泳(每个泳道150 μg 蛋白质)。Western blot法分析VEGF、Bax、Bcl-2的表达水平。

1.11 小鼠背部创伤模型

剃毛器剃光小鼠背部被毛,再用棉球蘸取脱毛剂约0.5 mL,在选定部位薄涂一层。30 s后用温水

洗去脱落的被毛。腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),数分钟后,小鼠即进入麻醉期。以圆形打孔器蘸墨水在小鼠背部正中印一个直径14 mm的圆形印迹,用无菌剪刀沿印迹剪除划定位置的皮肤及皮下组织,得到一大小、深浅基本相同的圆形伤口。

1.12 分组及实验步骤

70只小鼠,按平均体重一致原则,随机分为5组:对照组、恩度(阳性对照)组、FAT-03(0.02 mg/mL)组、FAT-03(0.10 mg/mL)组、FAT-03(0.50 mg/mL)组,每组14只,雌雄各半,单只分笼饲养。脱毛并麻醉后,逐一制造圆形伤口,当日即记为D1。D1开始给药,伤口滴加不同浓度(0.02, 0.10, 0.50 mg/mL) 100 μL FAT-03液,每日给药1次,一直到D13。恩度组滴加100 μL 恩度液(0.50 mg/mL)。对照组滴加100 μL PBS。每3日用游标卡尺测量伤口长、宽各一次,并观察伤口愈合情况,统计每组愈合动物数^[6]。

1.13 免疫组织化学法检测VEGF表达情况

D14每组颈椎脱位法牺牲4只动物,雌雄各2只。取创伤周围组织置10%中性福尔马林中固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 切片。免疫组化法检测VEGF的表达^[7-9]。表达产物定位于血管内皮细胞的胞浆、胞膜,以细胞膜或细胞浆内出现明确的棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片至少观察5个具有代表性的高倍视野,计数不少于100个细胞。

1.14 免疫组织化学法检测微血管密度

取材及标本处理方法同1.13所述。SP免疫组化法标记CD34^[10],苏木精-伊红(HE)复染。在40倍视野下扫视整个组织切片。采用Weidner^[11]微血管计数法在200倍视野下计数热点区每个象限任选的5个不重复视野中CD34被染成紫蓝色的微血管数,取其平均值作为组织MVD(microvessel density)。血管腔的有无不作为判断血管的标准。

1.15 统计学处理

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示。采用Student's *t*检验分析结果。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 FAT-03的纯度

获得的FAT-03的纯度>95%。FAT-03的层析图谱为单一峰,其SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱为单一一条带,相对分子质量为43 kDa^[3]。

2.2 FAT-03抑制HUVECs的增殖

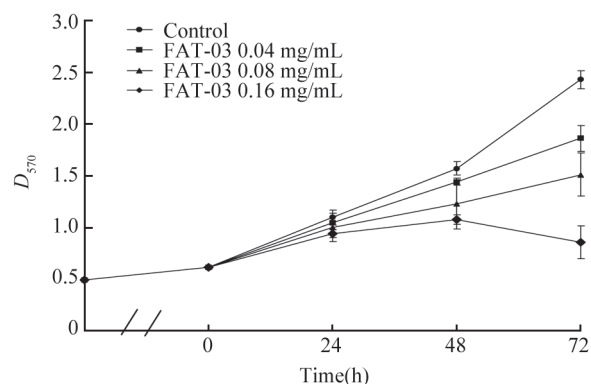
FAT-03明显抑制HUVECs的增殖。FAT-03作用HUVECs 24, 48, 72 h, 其 IC_{50} 值分别为0.22, 0.17, 0.09 mg/mL, 其抑制效果与剂量和作用时间相关(图1)。然而, FAT-03对人鼻咽癌细胞的生长却无明显的影响(资料未显示)。

2.3 FAT-03抑制HUVECs的迁移

Transwell小室趋化运动模型检测结果显示, FAT-03显著抑制HUVECs的迁移, 0.16 mg/mL FAT-03作用24 h, 对细胞的迁移抑制率为57.9%($P<0.01$)(图2)。

2.4 FAT-03诱导的HUVECs凋亡分析

2.4.1 荧光显微镜观察 (1)Hoechst-PI染色: 对照组细胞核大小较均一, 呈圆形或者椭圆形, 染色质分布均匀, 着蓝色。0.16 mg/mL FAT-03处理组细胞

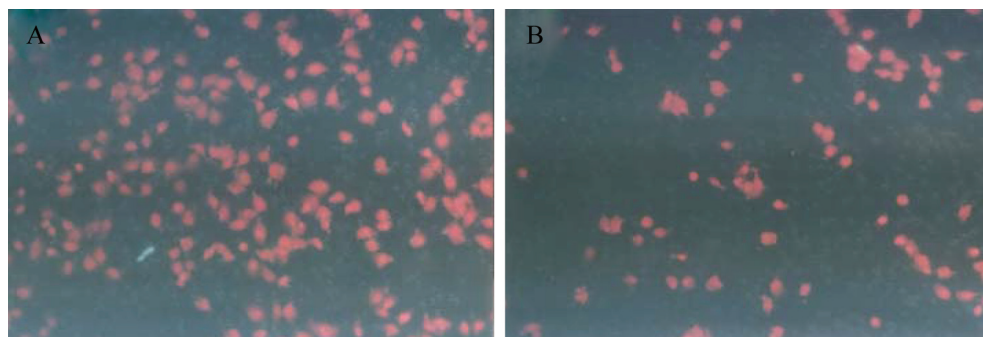


细胞以不同浓度的FAT-03处理不同时间, MTT法检测细胞增殖情况, 来自3次不同实验的数据以平均值±标准误差表示。

Cells were treated with various concentrations of FAT-03 for different time intervals. The cell proliferation was determined by MTT assay. All values are expressed as means±SEM of three independent experiments.

图1 FAT-03对HUVECs生长的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of FAT-03 on the growth of HUVECs



细胞以FAT-03处理, 处理方法如“材料与方法”所述。采用带有聚碳酸酯膜小室的24孔培养板, 下室加入600 μ L含50 ng/mL VEGF的RPMI-1640培养液, 上室加入经0.16 mg/mL FAT-03处理24 h的细胞悬液300 μ L(2.0×10^4 细胞), 对照组为未经FAT-03处理的HUVECs。细胞在37 $^{\circ}$ C下迁移4 h。迁移到下表面的细胞被固定、PI染色。计数穿过膜的细胞数。实验重复3次。A: 对照; B: FAT-03(0.16 mg/mL)。

Cells were treated with FAT-03 as described in “Materials and Methods”. A migration assay was performed using 24-well transwell insert. The lower chamber was filled with 600 μ L of RPMI-1640 containing 50 ng/mL VEGF. The upper chamber was seeded with 2.0×10^4 HUVECs (300 μ L cell suspension) treated by FAT-03 (0.16 mg/mL) for 24 h. Cells were allowed to migrate for 4 h at 37 $^{\circ}$ C, and then fixed and stained in PBS containing 50 μ g/mL PI. The number of the migrated cells on the lower surface was calculated as percent of control values (original magnification, 100 $\times$). The experiment was repeated 3 times under identical conditions. A: control; B: FAT-03 (0.16 mg/mL).

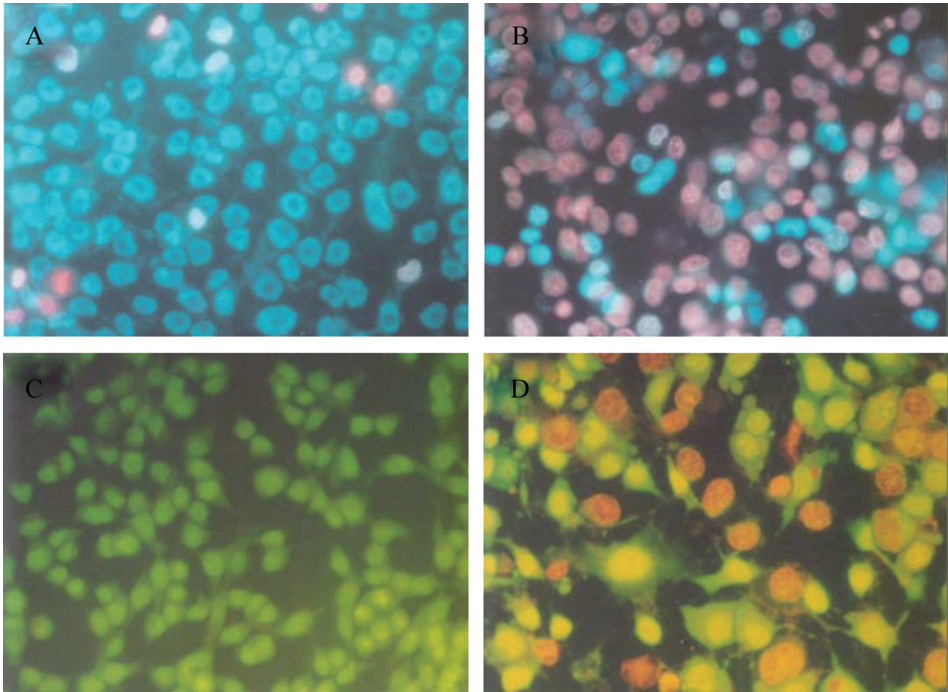
图2 FAT-03对HUVECs运动能力的影响(100 $\times$)

Fig.2 Effect of FAT-03 on the migration of HUVECs(100 $\times$)

皱缩、变形, 染色质浓缩呈红色, 部分核染色体碎裂, 可见部分晚期凋亡细胞, 偶有凋亡小体出现(图3A)。(2)吖啶橙-溴乙锭(AO-EB)染色: 对照组细胞核染色质分布均匀, 着绿色, 呈正常结构。FAT-03处理组细胞肿胀、胞浆浓缩、细胞核黄染、部分胞膜破损、胞核碎裂, 可见部分染成橘红色的晚期凋亡细胞(图3B)。

2.4.2 流式细胞术分析 (1)膜联蛋白V-FITC-PI双染^[12]: 双染检测结果显示, FAT-03处理48 h的细胞早期

凋亡率增加($P<0.05$), 并呈剂量依赖关系。0.04, 0.08, 0.16 mg/mL FAT-03处理48 h, 早期凋亡率分别为 $3.7\% \pm 0.9\%$ 、 $7.0\% \pm 1.7\%$ 和 $13.6\% \pm 1.5\%$ (对照组为 $1.7\% \pm 0.4\%$)(图4A)。(2)PI染色: 流式细胞术分析结果显示, FAT-03阻滞HUVECs于 G_0/G_1 期。0.08 mg/mL FAT-03处理细胞24, 48, 72 h, 处于 G_0/G_1 期的细胞分别从 $63.4\% \pm 0.3\%$ 、 $74.5\% \pm 0.8\%$ 和 $65.0\% \pm 2.6\%$ 增加到 $74.3\% \pm 0.8\%$ 、 $84.0\% \pm 0.8\%$ 和 $83.4\% \pm 0.3\%$, 而处



细胞以0.16 mg/mL FAT-03处理72 h, 染色方法如“材料与方法”所述。Hoechst-PI染色凋亡细胞呈淡红色; AO-EB染色凋亡细胞呈黄色或橘红色。A: Hoechst-PI染色对照; B: Hoechst-PI染色[FAT-03(0.16 mg/mL)]; C: AO-EB染色对照; D: AO-EB染色[FAT-03(0.16 mg/mL)]。Cells were treated with 0.16 mg/mL FAT-03 for 72 h and stained with Hoechst-PI and AO-EB as described in “Materials and Methods”. Hoechst-PI cells in which nuclei were reddish indicate apoptotic cells. AO-EB cells in which nuclei were yellow or yellow-red indicate apoptotic cells. A: Hoechst-PI control; B: Hoechst-PI [FAT-03 (0.16 mg/mL)]; C: AO-EB control; D: AO-EB [FAT-03 (0.16 mg/mL)].

图3 FAT-03诱导的HUVECs凋亡(200×)

Fig.3 FAT-03-induced apoptosis in HUVECs by double staining(200×)

于S期和G₂/M期细胞的百分率则相应降低(图4B)。0.08 mg/mL FAT-03作用细胞48 h, 在G₁期左侧出现1个明显的亚二倍体峰, 即凋亡峰, 细胞的凋亡率与时间相关, FAT-03作用细胞48, 72 h的凋亡率分别为14.6%和41.7%(图4C)。

2.5 FAT-03对VEGF、Bax、Bcl-2表达的影响

Western blot分析结果显示, FAT-03下调VEGF和抑凋亡基因Bcl-2的蛋白质表达, 上调促凋亡基因

Bax的蛋白质表达(图5)。

2.6 FAT-03延迟创伤的愈合

对照组小鼠伤口第12天全部愈合, 恩度对照组第13天全部愈合, FAT-03(0.02 mg/mL)组和FAT-03(0.10 mg/mL)组第14天全部愈合、FAT-03(0.50 mg/mL)组小鼠伤口第18天才全部愈合(图6)。统计分析结果表明, FAT-03对创伤愈合的延迟作用比恩度还强, 且其作用与剂量相关(表1)。

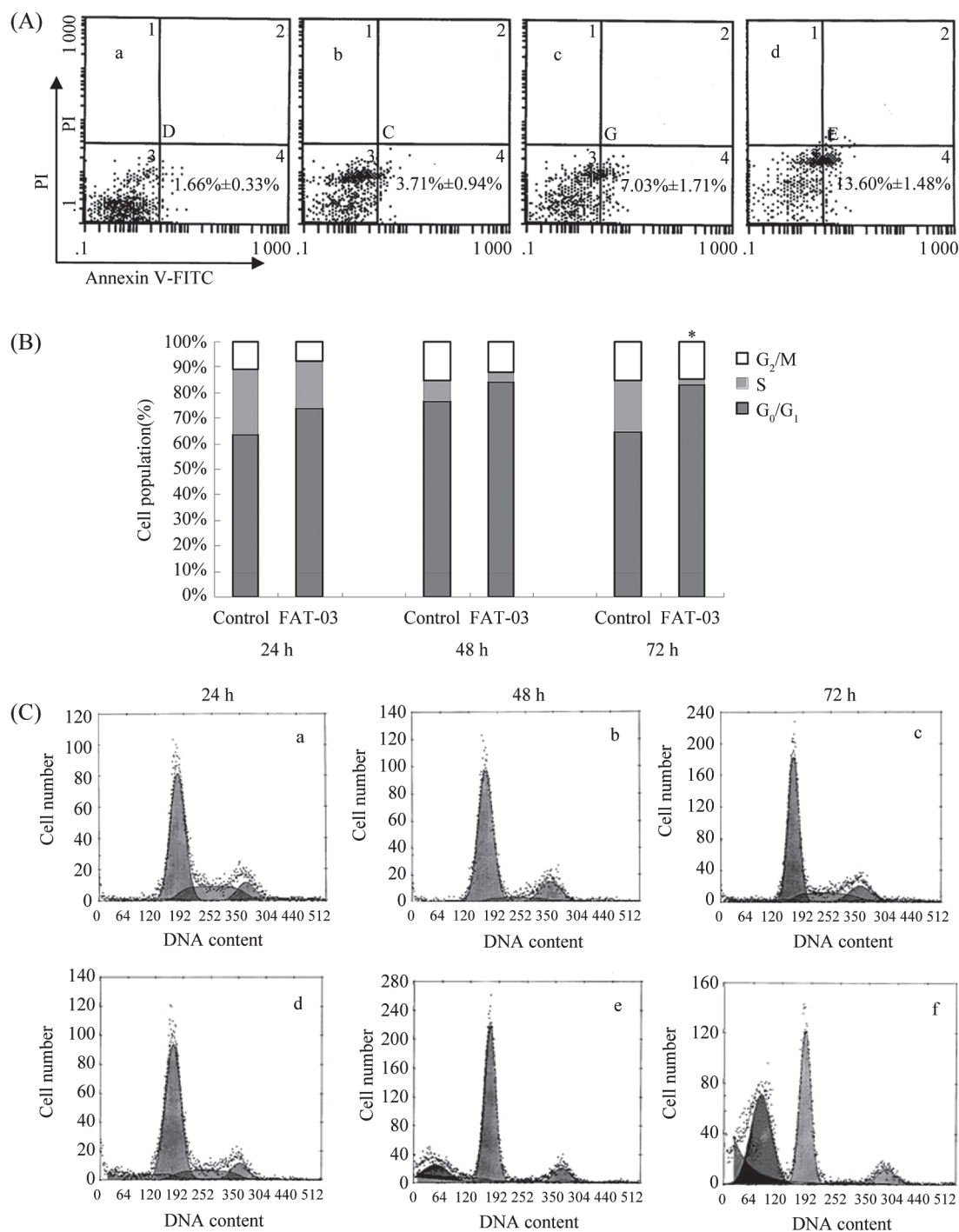
表1 FAT-03延迟小鼠创伤愈合及愈合时间的比较

Table 1 Comparison of wound healing time and delayed healing induced by FAT-03 in mouse wound model

组别 Groups	动物数 Number of animals	创伤愈合动物只数(天) Number of wound healing animals at different days								创伤愈合时间(天, $\bar{x} \pm s$) Wound healing time(day, $\bar{x} \pm s$)	P
		8	9	10	11	12	13	14	18		
Control	10	—	1	1	6	10	—	—	—	11.1±0.99	—
Endostar(0.50 mg/mL)	10	—	—	2	5	9	10	—	—	11.4±0.97	0.50
FAT-03(0.02 mg/mL)	10	—	—	—	2	2	6	10	—	12.7±0.95	0.02*
FAT-03(0.10 mg/mL)	10	—	—	—	1	4	8	10	—	12.7±0.95	0.02*
FAT-03(0.50 mg/mL)	10	—	—	—	2	4	5	9	10	13.3±0.86	0.02*

*P<0.05, 与对照组比较。

*P<0.05 vs control.

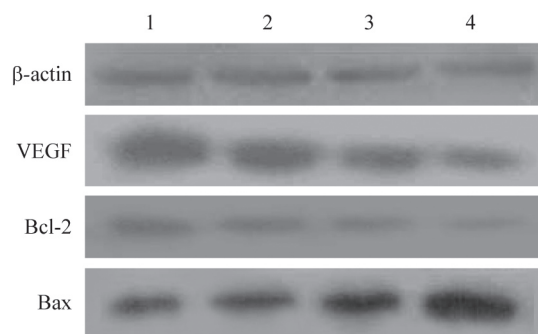


A: 流式细胞术分析FAT-03诱导的HUVECs细胞早期凋亡, 此处显示FAT-03处理HUVECs 24 h后所得流式细胞仪直方图的代表。早期凋亡细胞的特点是带有高膜联蛋白信号和低PI信号。a: 对照; b: FAT-03(0.04 mg/mL); c: FAT-03(0.08 mg/mL); d: FAT-03(0.16 mg/mL); B, C: 流式细胞术分析FAT-03对HUVECs周期和凋亡的影响, 细胞接种于6孔板, 每孔 5×10^5 细胞。收集经FAT-03(0.08 mg/mL)处理过的和对照组的细胞, 乙醇固定24 h。细胞重悬于PBS中, 加PI染色。流式细胞术分析染色细胞的DNA含量; B: 细胞群定量, $*P < 0.05$; C: 流式细胞术分析。a~c: 对照; d~f: FAT-03(0.08 mg/mL)。

A: FAT-03-induced early apoptosis analyzed by flow cytometry representative examples of flow cytometric histograms after 24 h of FAT-03 treatment were shown. The appearance of cells with a high annexin signal and a low PI signal is characteristic of early apoptosis. a: control; b: FAT-03 (0.04 mg/mL); c: FAT-03 (0.08 mg/mL); d: FAT-03 (0.16 mg/mL); B, C: flow cytometric analysis of effects of FAT-03 on the cell cycle and apoptosis of HUVECs. Cells were seeded at a density of 5×10^5 cells in 6-well culture plates. FAT-03 (0.08 mg/mL)-treated and control cells were collected and fixed after the indicated time. After washing with ice-cold PBS, cells were suspended and then PI dye was added. The DNA content of stained nuclei was analyzed by flow cytometry; B: quantitation of cell population, $*P < 0.05$; C: flow cytometric analysis. a~c: control; d~f: FAT-03 (0.08 mg/mL).

图4 流式细胞术分析FAT-03对HUVECs周期和凋亡的影响

Fig.4 Flow cytometric analysis of effects of FAT-03 on the cell cycle and apoptosis of HUVECs



人脐静脉血管内皮细胞裂解液的制备和Western blot分析如“材料与方法”所述。1: 对照; 2: FAT-03(0.04 mg/mL); 3: FAT-03(0.08 mg/mL); 4: FAT-03(0.16 mg/mL)。

Preparation of HUVEC lysates and Western blot analysis were carried out as described in “Materials and Methods”. 1: control; 2: FAT-03 (0.04 mg/mL); 3: FAT-03 (0.08 mg/mL); 4: FAT-03 (0.16 mg/mL).

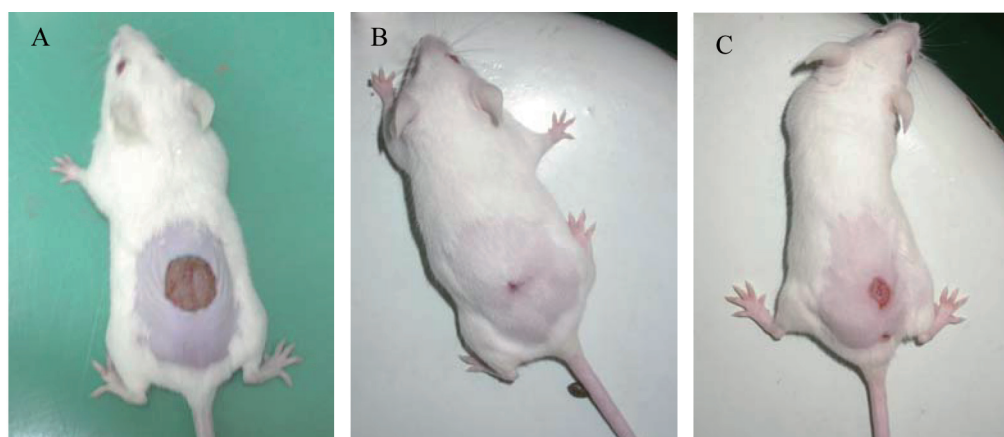
图5 FAT-03对HUVECs的Bcl-2、Bax和VEGF表达的影响
Fig.5 Effects of FAT-03 on the expressions of VEGF, Bcl-2 and Bax in HUVECs

2.7 FAT-03抑制创伤组织的血管生成

CD34阳性颗粒经苏木精-伊红(HE)复染呈蓝紫色, 主要定位于毛细血管、小静脉和小动脉血管内皮细胞膜和胞质。结果显示, 对照组小鼠组织内毛细血管大量增生, 平均微血管数为 21.60 ± 1.08 。FAT-03 (0.02, 0.10, 0.50 mg/mL)各组平均微血管数分别为 7.40 ± 0.68 、 6.20 ± 0.37 和 3.00 ± 0.32 , 其效果与剂量相关。FAT-03组的MVD值显著地低于对照组($P < 0.001$, $n=4$)(图7)。

2.8 FAT-03下调小鼠创伤组织VEGF的表达

Western blot分析结果显示, FAT-03下调VEGF的表达, 其效果与剂量相关(图8A)。免疫组织化学法检测结果显示, VEGF阳性颗粒呈棕黄色, 其阳性表达产物位于血管内皮细胞的胞浆和胞膜。对照组VEGF阳性表达细胞多, FAT-03组VEGF阳性表达细



伤口滴加100 μ L PBS、恩度或FAT-03液, 每日给药1次, 连续12日。A: 对照组; B: 恩度(0.50 mg/mL)组; C: FAT-03(0.50 mg/mL)组。

The surfaces of wound were loaded with 100 μ L of PBS, endostar or FAT-03, daily for 12 days. A: control (PBS); B: endostar (0.50 mg/mL); C: FAT-03 (0.50 mg/mL).

图6 FAT-03延迟小鼠创伤的愈合
Fig.6 Delayed healing induced by FAT-03 in mouse wound model

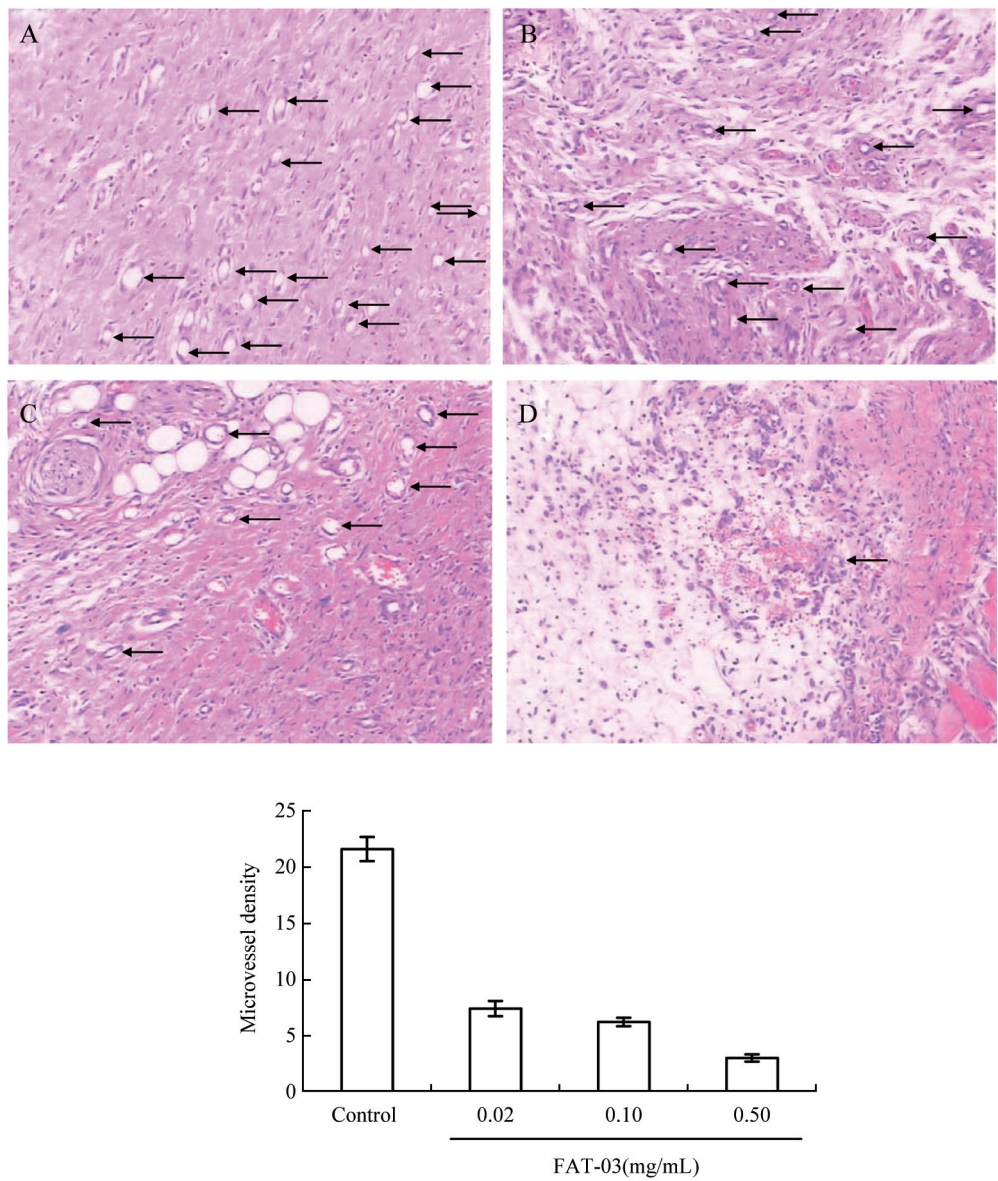
胞明显减少, 且其减少与FAT-03剂量相关(图8B)。

3 讨论

FAT-03是我们首次从赤魃组织中分离到的具有抗血管生成活性的物质^[3]。已经证实, 它既能显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成, 又能明显抑制肿瘤诱导的鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成^[4]。与此同时, FAT-03在体外对肿瘤细胞的生长无明显影响, 但在体内对BALB/c裸鼠移植性肿瘤的生长和转移却有

强抑制效果^[13]。本文的结果表明, FAT-03明显抑制HUVECs细胞的增殖和迁移, 诱导其凋亡; 抑制创伤组织的血管生成, 进而延迟创伤愈合。它的这些作用可能与其下调VEGF、Bcl-2的表达、上调Bax的表达相关。因此, 我们把FAT-03作为一种有希望应用于肿瘤治疗的血管生成抑制剂来研究。

海洋生物物种及其所含物质的多样性和特异性, 使海洋成为天然药物的巨大资源宝库, 具有极大的开发潜力。已报道的海洋来源的肿瘤血管生成抑



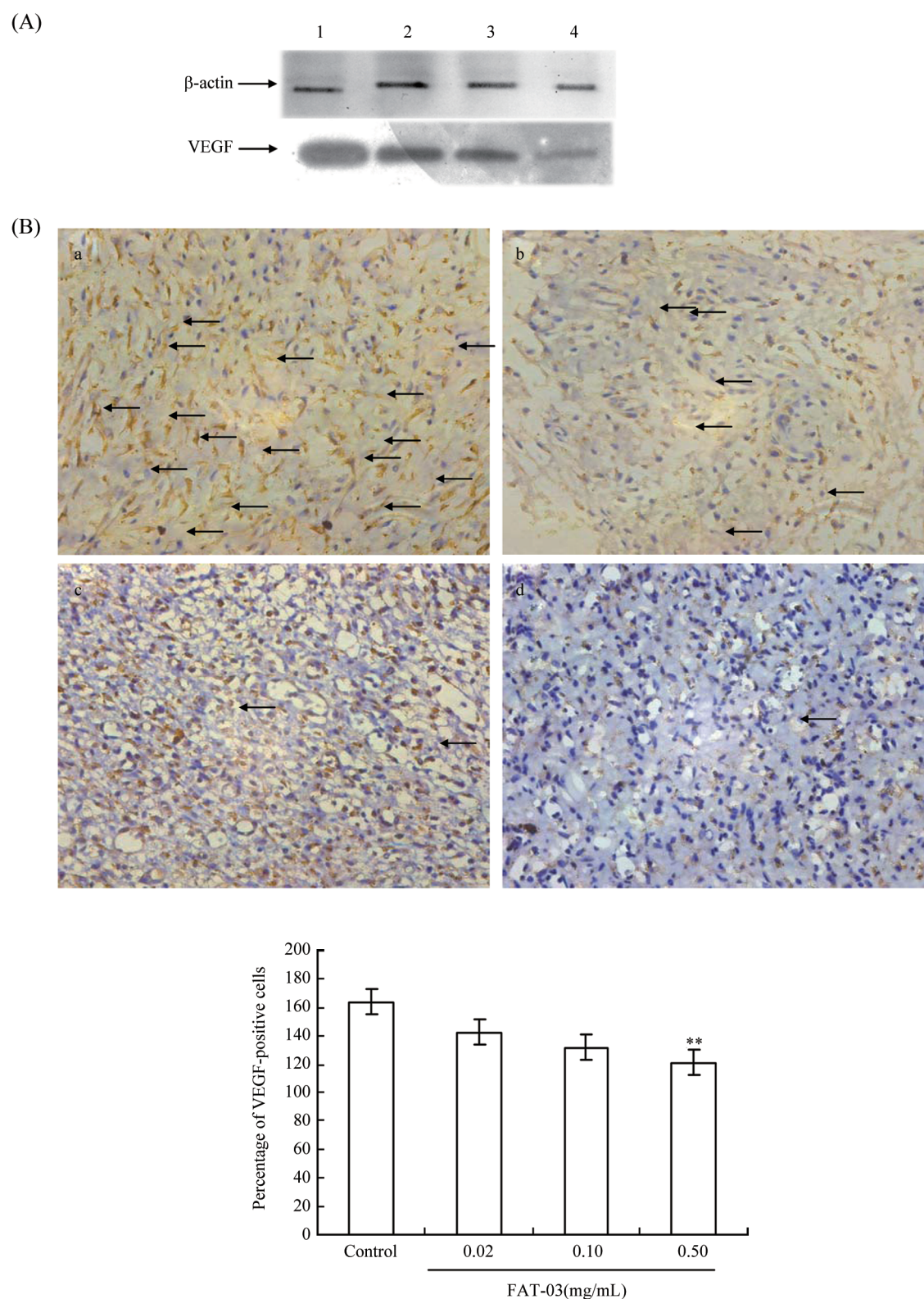
D14每组颈椎脱位法牺牲4只动物, 雌雄各2只。取创伤周围组织置10%中性福尔马林中固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 4 μ m切片, 免疫组化法检测VEGF的表达, 以兔抗CD34抗体为一抗, 生物素化二抗为二抗。A: 对照; B: FAT-03(0.02 mg/mL); C: FAT-03(0.10 mg/mL); D: FAT-03(0.50 mg/mL)。箭头示CD34阳性。

14 days after the treatment of FAT-03, the specimens of wound tissues ($n=4$) from unselected mice in FAT-03-treated and control groups were excised, fixed in 10% formalin and routinely embeded in paraffin. Paraffin sections (4 μ m) were baked, deparaffinized and rehydrated. Sections were probed with rabbit anti-CD34 antibody overnight at 4 $^{\circ}$ C, followed by treatment with a biotinylated secondary antibody. A: control; B: FAT-03 (0.02 mg/mL); C: FAT-03 (0.10 mg/mL); D: FAT-03 (0.50 mg/mL). Arrow: CD34 positive.

图7 FAT-03对创伤组织血管生成的影响(100 $\times$)
Fig.7 Effect of FAT-03 on the angiogenesis of wound tissues(100 $\times$)

制剂有20多种^[14]。赤魮, *Dasyatis akajei*(Müller & Henle), 英文名为Red stingray, 属软骨鱼纲, 下孔总目, 鳐目, 魮科, 魮属。赤魮分布于中国南海和东海, 长江口咸淡水中亦有。赤魮原为海产鱼类, 纯淡水赤魮见于广西左江上游的南宁和龙州。其组织有食用和药用价值, 但尾刺有毒^[15-16]。

FAT-03是我们课题组首次从湛江近海捕获的赤魮组织中分离得到的, 相对分子质量大约为43 kDa, 具有独特的N末端氨基酸序列(PFGNTHNKWKL-NYSAEQEFP)和强抗血管生成活性、强抗肿瘤生长以及转移作用的单一成分^[3], 它与Luo等^[17]报道的从赤魮软骨中提取的具有抗血管生成活性、相对分子



A: Western blot分析。1: 对照; 2: FAT-03(0.02 mg/mL); 3: FAT-03(0.10 mg/mL); 4: FAT-03(0.50 mg/mL); B: 免疫组织化学法检测(100 $\times$)。a: 对照; b: FAT-03(0.02 mg/mL); c: FAT-03(0.10 mg/mL); d: FAT-03(0.50 mg/mL)。箭头示阳性染色的血管内皮细胞。** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: Western blot analysis. 1: control; 2: FAT-03 (0.02 mg/mL); 3: FAT-03 (0.10 mg/mL); 4: FAT-03 (0.50 mg/mL); B: immunohistochemical staining assay (100 $\times$). a: control; b: FAT-03 (0.02 mg/mL); c: FAT-03 (0.10 mg/mL); d: FAT-03 (0.50 mg/mL). Arrow: positive dyed endothelial cells. ** $P < 0.01$ vs control.

图8 FAT-03下调小鼠创伤组织VEGF的表达

Fig.8 FAT-03 down-regulated the expression of VEGF in wound tissues

质量3 kDa~300 kDa的混合物和余新威等^[18]报道的赤魃软骨血管生成抑制因子(相对分子质量62 kDa)显然不同。姑且不论本文所报告的FAT-03所具有的强抗血管生成活性, 即使作为一种新的天然产物加入这个逐渐增长的海洋来源的肿瘤血管生成抑制剂的清单, 这一事实本身就是令人感兴趣的。

正如本文在前言中提到的, 血管生成在生理与病理过程中都起着重要作用。在生理情况下, 血管生成的正向和负向调节处于动态平衡, 血管生成或血管生成抑制都要适应机体生长发育和机体结构功能状态的要求。胚胎期和机体生长发育阶段的血管生成无疑比老年期旺盛。与此相反, 无论是这种平衡失调表现为血管生成过度(如在肿瘤、湿性老年黄斑变性等)或血管生成不良都属于病理状态。本文结果提示, FAT-03有明显的抑制血管生成活性, 因而有潜在的用于治疗血管增生性疾病(如肿瘤、湿性老年黄斑变性、角膜和虹膜新生血管、糖尿病视网膜病变等)的价值。本文结果还提示, FAT-03明显延迟小鼠创伤的愈合, 因而对于孕妇、外伤和手术病人可能有潜在的副作用。

参考文献 (References)

- 1 Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 1989; 251(2): 224-31.
- 2 Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52(2): 237-68.
- 3 苏伟明, 马润娣, 于立坚, 张永平, 廖铭能, 黄来珍, 等. 一种新的源自赤魃的强血管生成抑制剂福安泰-03的分离和鉴定. *中国生物化学与分子生物学报* 2009; 25(9): 849-54.
- 4 于立坚, 马润娣, 廖铭能, 苏伟明, 黄来珍, 于廷曦. 福安泰-03对肿瘤血管生成的抑制作用. *中国药理学通报* 2008; 24(11): 1261-5.
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75.
- 6 郑军, 黄晓元. 表皮生长因子对大鼠深II度烧伤创面愈合的影响. *中华烧伤杂志* 2003; 19(5): 289-92.
- 7 Shidham VB, Chivukula M, Gupta D, Rao RN, Komorowski R. Immunohistochemical comparison of gastrointestinal stromal tumor and solitary fibrous tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(10): 1189-92.
- 8 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, *et al.* Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6): 776-82.
- 9 Shi ZR, Itzkowitz SH, Kim YS. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* 1988; 36(3): 317-22.
- 10 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京: 北京出版社 1994, 3-134.
- 11 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36(2): 169-80.
- 12 Wang F, Yu LJ, Ma RD. Role of mitochondria and mitochondrial cytochrome c in tubimoside 1-mediated apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(3): 389-99.
- 13 黄来珍, 王长秀, 马润娣, 于立坚, 苏伟明, 廖铭能, 等. 福安泰-03对小鼠癌细胞转移相关基因和转移行为的影响. *中国细胞生物学学报* 2010; 32(2): 223-8.
- 14 张玉艳, 牛荣雨, 林秀坤. 海洋抗肿瘤血管生成药物的研究进展. *食品与药品* 2008; 10(1): 49-54.
- 15 黄宗国, 林金美. 海洋生物学辞典. 北京: 海洋出版社 1994, 110-1.
- 16 伍汉霖, 金鑫波, 倪勇. 中国有毒鱼类和药用鱼类. 上海: 上海科技出版社 1978, 122-4, 209-10.
- 17 Luo HY, Xu JJ, Yu XW. Isolation and bioactivity of an angiogenesis inhibitor extracted from the cartilage of *Dasyatis akajei*. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16(Suppl 1): 286-9.
- 18 余新威, 钱晓, 王婕妤, 罗红宇, 吴常文. 赤魃软骨血管生成抑制因子的分离纯化. *海洋学报* 2008; 30(1): 113-8.

Effects of Fuantai-03 Isolated from *Dasyatis akajei* on the Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Mouse Wound Healing

Su Weiming¹, Huang Laizhen¹, Ma Rundi^{1*}, Yu Lijian^{1*}, Wang Qiang¹, Zhang Xiaoyu^{1,2}, Yu Tingxi^{1,3*}

(¹Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; ²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, MD 21228; ³Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, MD 21201, USA)

Abstract The present study was undertaken to investigate the effects of Fuantai-03 (FAT-03) isolated from *Dasyatis akajei* effected on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells and wound healing. MTT assay was performed to measure the effect of FAT-03 on cell growth; migration assay was performed using a Transwell model with polycarbonate membrane; apoptotic induction was determined by fluorescence microscopy and flow cytometry; Western blot analysis was performed for examining expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), Bcl-2 and Bax. Mouse wound model was applied to investigate the effect of FAT-03 on wound healing; immunohistochemical staining assay was adopted to examine the microvessel density (MVD) and expression of VEGF in wound tissues. FAT-03 obviously inhibited proliferation and migration of HUVECs in a dose- and time-dependent manner the values of IC₅₀ for the effect of FAT-03 on HUVECs at 24, 48, 72 h are 0.22 mg/mL, 0.17 mg/mL, 0.09 mg/mL, respectively, but FAT-03 did not show significant effect on the growth of human nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE-2Z). 0.16 mg/mL FAT-03 decreased the percentage of migrating HUVECs at 24 h by 57.9% ($P<0.01$). FAT-03-treated HUVECs showed typical morphologic and cellular evidences of apoptosis. The expressions of VEGF and Bcl-2 in the FAT-03-treated HUVECs were evidently down-regulated, and the expression of Bax was obviously up-regulated. FAT-03 markedly decreased the MVD ($P<0.05$) and down-regulated the expression of VEGF in mouse wound tissues, and inhibited tissue repairing. These findings provide evidences that FAT-03 significantly inhibits the proliferation and migration of HUVECs and induces their apoptosis, and inhibits tissue repairing in mouse wound model. The effects of FAT-03 might result from the down-regulation of expressions of VEGF and Bcl-2 and up-regulation of expression of Bax.

Key words Fuantai-03; human umbilical vein endothelial cells; apoptosis; vascular endothelial growth factor; apoptosis-related genes; microvessel density; wound healing; mice

Received: November 4, 2011 Accepted: February 2, 2012

This work was supported by the "863" Marine Technology Project (No.2007AA09Z422), National Natural Science Foundation of China (No.30271493), Guangdong Natural Science Foundation (No.021386) and Key Projects of Science and Technology of Guangdong Provincial Oceanic and Fishery Bureau (No.A200099B01)

*Corresponding author. Tel: 86-759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 86-759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com