

# 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用

张维东\* 崔亚洲<sup>1</sup> 武利存 贾青 宋守芹 王朝霞 董强(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062; <sup>1</sup>山东省医药生物技术研究中心, 济南 250062)

**摘要** 用不同浓度的东亚钳蝎毒的多肽提取物 PESV(4~20  $\mu\text{g/ml}$ )作用于人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 观察 HUVEC 增殖活性和凋亡变化, 增殖活性检测采用 BrdU 掺入的 ELISA 法, 凋亡水平和凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的检测采用流式细胞术检测; 用鸡胚尿囊膜(CAM)显示 PESV 对血管生成的抑制作用。结果显示, PESV 抑制 HUVEC 的增殖, 而对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖无明显影响; PESV 作用 72 h 后, HUVEC 凋亡相关基因 Bcl-2 表达降低, Bax 表达增加, 凋亡细胞比例增至 10.5%, 明显高于对照组; 0.5 mg PESV 能明显抑制 CAM 新生血管的形成。因此, PESV 具有良好的体外抗肿瘤血管生成活性, PESV 作为一种肿瘤血管抑制剂的天然药物来源, 其有效成分和药理作用有待进一步研究。

**关键词** 蝎毒; 血管生成; 内皮细胞; 鸡胚尿囊膜; 血管生成抑制剂

血管生成是肿瘤浸润生长和转移的必要条件之一, 1972 年 Folkman<sup>[1]</sup>提出可以通过抑制血管生成来治疗恶性肿瘤。目前抗血管生成治疗已成为临床肿瘤治疗的重要策略之一<sup>[2]</sup>。现在已发现了多种血管生成抑制剂可以抑制实验性肿瘤的生长, 这些血管生成抑制剂可来源于内源性物质(如 angiostatin<sup>[3]</sup>), 也可从天然药物中提取, 如 curcumin<sup>[4]</sup>、epicatechin gallate<sup>[5]</sup>、genistein<sup>[6]</sup>和 resveratrol<sup>[7]</sup>等。

我们在东亚钳蝎毒中提取了一种多肽提取物 PESV(peptide extract from scorpion venom), 由含有 50~60 个氨基酸的多肽组成。体内研究显示 PESV 能抑制裸鼠肝癌和胃癌接种肿瘤的生长, 但体内研究显示 PESV 并不能直接抑制肿瘤细胞的生长和增殖。据此, 我们推测 PESV 可能具有抗肿瘤血管生成活性。本研究在体外水平观察了 PESV 对血管生成的抑制作用, 以期深入研究其有效成分和药理作用提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养和试剂

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM (Gibco BRL) 培养液中, 培养条件 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 。Bcl-2、Bax 抗体为北京中山生物试剂公司产品。BrdU ELISA 检测试剂盒为 Amersham Pharmacia 产品。

### 1.2 PESV 的药物提取

将东亚钳蝎毒粗提物溶解, 经 0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 将超滤物冻干, 再溶于蒸馏水, 经葡聚糖凝胶和阳离子交换层析获得多肽提取物 PESV, 溶于生理盐水保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.3 PESV 对 HUVEC 和 MDA-MB-231 细胞增殖活性的影响

$1 \times 10^5$  个 HUVEC 或 MDA-MB-231 细胞加入 96 孔板中, 培养 24 h, 更换为不含血清的培养液, 处理组加入不同浓度的 PESV(4~20  $\mu\text{g/ml}$ ), 对照组加入等量生理盐水。作用 8 h 后中止作用, 继续培养 24 h, 用 BrdU 掺入的 ELISA 法检测细胞的增殖活性, 操作按试剂盒说明书进行, 即细胞固定、变性及抗 BrdU 酶标抗体作用后底物显色, 读取  $A_{450}$  值。

### 1.4 PESV 对 HUVEC 凋亡的影响

$1 \times 10^5$  个 HUVEC 细胞加入 96 孔板中培养 24 h 后, 处理组加入 10  $\mu\text{g/ml}$  PESV, 对照组加入等量生理盐水。作用 24 h 和 48 h 两个时相, HUVEC 经 PBS 清洗, 胰蛋白酶/EDTA 消化, 离心, 用流式细胞术检测凋亡细胞比例。HUVEC 与 0.1  $\mu\text{g}$  膜联蛋白 V 和 0.5  $\mu\text{g}$  碘化丙啶常温下温育 15 min 后, 用流式细胞仪检测膜联蛋白 V 和碘化丙啶的表达。

### 1.5 流式细胞仪检测 PESV 对 HUVEC 凋亡相关

收稿日期: 2004-10-08 接受日期: 2004-12-17

国家自然科学基金(No.30371841)和山东省自然科学基金(No.2003C02)资助项目

\* 通讯作者: Tel: 0531-2919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

## 基因 Bax 和 Bcl 表达的影响

单细胞悬液 PBS 清洗 3 次, 分别加入相应 Bax 或 Bcl 抗体(一抗), 以鼠抗人 IgG 为免疫阴性对照, 反应 20 min, 再加入 20  $\mu$ l 通用型 IgG-FITC 工作液, 避光反应 20 min, 待测。上机前以标准荧光微球调整仪器的变异系数并稳定在 2% 以内, 上机收集 2 万个细胞, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存软盘, 测试完后用 CellQuest Plot 软件(BD 公司提供)分析数据。以阳性细胞的百分率表示含量水平。

### 1.6 PESV 对鸡胚尿囊膜(CAM)新生血管生成的影响

将鸡胚温育于 37.5  $^{\circ}$ C, 60% 相对湿度下 5 天, 无菌条件下暴露 CAM, 分别将吸附有 5  $\mu$ l 生理盐水, 0.5 mg PESV 和 0.3 mg 地塞米松的玻璃纤维滤纸覆盖在 CAM 上, 作用 72 h 后去除纤维玻璃滤纸, 取出尿囊膜, 用 10% 甲醛固定, 移至玻片上, 在解剖显微镜下观察新生血管生成情况。

## 2 结果

### 2.1 PESV 对 HUVEC 增殖活性的影响

如表 1 所示, PESV 在 8~20  $\mu$ g/ml 范围明显抑制 HUVEC 的增殖活性, 而且这种抑制作用表现为细胞类型的特异性, 因为各试验浓度的 PESV 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖活性无明显影响。

### 2.2 PESV 对 HUVEC 凋亡的影响

流式细胞仪检测到的膜联蛋白 V 标记阳性/碘化丙啶标记阴性的细胞为凋亡细胞。10  $\mu$ g/ml PESV 作用 HUVEC 24 h 后, 凋亡细胞的比例增加 1 倍, 作用 HUVEC 48 h 后, 凋亡细胞的比例增至 10.5%, 与对照组比较差异显著,  $P < 0.01$ (表 2); PESV 作用 48 h 后, 凋亡相关基因也随之发生改变, 凋亡诱导基因 Bax 表达增加, 凋亡抑制基因 Bcl-2 表达降低(表 3)。

表 1 PESV 对 HUVEC 增殖活性的影响( $A_{450}$ )( $n=6$ )

	HUVEC	MDA-MB-231
空白对照组	2.251 $\pm$ 0.573	2.393 $\pm$ 0.557
生理盐水	2.363 $\pm$ 0.486	2.173 $\pm$ 0.413
4 $\mu$ g/ml PESV	1.813 $\pm$ 0.327	2.092 $\pm$ 0.498
8 $\mu$ g/ml PESV	1.425 $\pm$ 0.129*	1.808 $\pm$ 0.414
12 $\mu$ g/ml PESV	1.332 $\pm$ 0.098*	1.859 $\pm$ 0.432
16 $\mu$ g/ml PESV	1.236 $\pm$ 0.183*	1.788 $\pm$ 0.412
20 $\mu$ g/ml PESV	1.242 $\pm$ 0.227*	1.733 $\pm$ 0.654

与对照组比较, \* $P < 0.01$ 。

表 2 PESV 对 HUVEC 凋亡比例的影响( $n=6$ )

	凋亡率(%)
生理盐水	0.53 $\pm$ 0.05
PESV 6 h	0.65 $\pm$ 0.13
PESV 12 h	1.67 $\pm$ 0.22*
PESV 24 h	2.33 $\pm$ 0.69*
PESV 48 h	10.5 $\pm$ 1.09*

与对照组比较, \* $P < 0.01$ 。

表 3 PESV 对 HUVEC Bax 和 Bcl 表达量的影响

	<i>n</i>	Bax	Bcl
生理盐水	6	3.48 $\pm$ 0.31	4.61 $\pm$ 0.47
PESV	6	5.33 $\pm$ 0.58*	3.05 $\pm$ 0.29*

与对照组比较, \* $P < 0.01$ 。

### 2.3 PESV 对 CAM 新生血管生成的影响

我们用 CAM 的方法来观察 PESV 在器官水平的抗血管生成活性, 以生理盐水为阴性对照, 以地塞米松为阳性对照。如图 1 所示, 0.5 mg PESV 作用于 CAM 72 h 后, 血管数量较对照组降低, 小血管生成的减少尤为明显, PESV 对 CAM 血管生成的抑制作用与地塞米松相当。

## 3 讨论

减少肿瘤的血管数量可抑制肿瘤的生长和转移, 因此抗血管生成现已成为肿瘤治疗的新靶点。许多研究试图从天然药物中提取有效的血管生成抑制剂。现已发现, 一些从天然药物中提取的小分子在体内和体外具有抗肿瘤血管生成的作用, 其机制

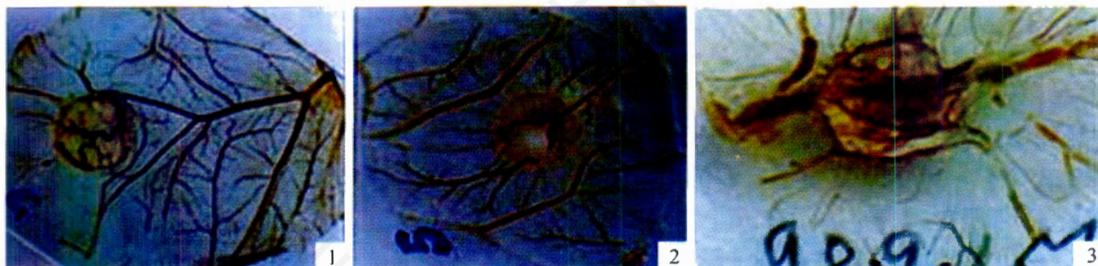


图 1 PESV 和地塞米松对 CAM 血管生成的影响  
(1)生理盐水; (2)PESV; (3)地塞米松。

包括: 抑制血管内皮细胞的增殖<sup>[8]</sup>, 阻断血管生长因子受体的磷酸化<sup>[9]</sup>, 降低血管生长因子的表达<sup>[10]</sup>, 影响黏附分子的表达和作用<sup>[11]</sup>, 诱导血管内皮细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。

蝎毒作为一种传统中药被应用于多种疾病的治疗。蝎毒主要活性成分由多种含有 20~80 个氨基酸, 分子量在 3000~10 000 的多肽组成。蝎毒组分具有多种生物活性如止痛、抗癫痫、抗肿瘤、纤溶等。研究发现一些蝎毒的多肽提取物在体外可抑制肿瘤细胞的生长, 诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[13]</sup>。

我们从东亚钳蝎蝎毒中提取了一种含 50~60 个氨基酸的多肽组分 PESV。初步研究显示这种多肽组分具有抑制小鼠胃癌和肝癌生长的作用, 但体外试验显示即使在较高的作用浓度, PESV 对肿瘤细胞(MDA-MB-231)的增殖和凋亡并无明显影响。这些试验结果提示 PESV 可能具有抑制肿瘤血管生成的作用。

血管生成抑制剂的筛选一般首先经体外实验观察对血管内皮细胞增殖能力的影响, 再经器官组织水平的筛选和研究确证, 然后应用肿瘤模型进行最终和全面的评价。肿瘤模型水平的评价是必需的, 因为许多药物虽然在体外实验中具有良好的抗血管生成能力, 但体内实验时对肿瘤的血管依赖性生长则无明显影响, 可能与这些药物在体内不能达到抑制血管生成所需的浓度有关<sup>[14]</sup>。

本研究首先观察了 PESV 对血管内皮细胞增殖活性的影响, 结果显示 PESV 能够明显抑制内皮细胞的增殖, 而对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖活性的影响则不明显, 这表明 PESV 是特异性的内皮细胞增殖抑制剂。我们还在体外实验中观察了 PESV 对内皮细胞凋亡的作用, PESV 具有诱导内皮细胞

凋亡的作用, 凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达也相应发生改变, 这说明 PESV 可通过抑制增殖和诱导凋亡的机制直接发挥其抗血管生成作用。

我们在 CAM 同样观察到了 PESV 的抗血管生成活性。地塞米松具有良好的抗血管生成活性, 能有效的抑制大鼠结肠癌细胞诱导的血管生成和肝转移<sup>[15]</sup>, 因此本研究以地塞米松作为 PESV 的阳性对照。结果发现 PESV 可以明显抑制 CAM 新生血管的生成, 与地塞米松的抑制效果相当。

血管生成是实体肿瘤生长和转移的必要条件, 因为体外内皮细胞抑制试验和血管生成试验都显示 PESV 具有良好的抗血管生成活性, 我们推测 PESV 可能通过降低肿瘤血管的生成水平, 抑制肿瘤的生长。我们将进一步观察了 PESV 对血管依赖性的小鼠肿瘤模型的抑制作用和其对肿瘤血管生成刺激因子表达的影响。

#### 参考文献(References)

- [1] Folkman J. *Ann Surg*, 1972, **175**: 409
- [2] Dredge K et al. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, **4**: 667
- [3] Dell'Eva R et al. *Endothelium*, 2002, **9**: 3
- [4] Arbiser JL et al. *Mol Med*, 1998, **4**: 376
- [5] Cao Y et al. *Nature*, 1999, **398**: 381
- [6] Huang M et al. *Cancer Res*, 1991, **51**: 813
- [7] Huang MT et al. *Cancer Res*, 1994, **54**: 5841
- [8] Dhanabal M et al. *Cancer Res*, 2002, **62**: 3834
- [9] Mendel DB et al. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**: 4848
- [10] Aviezer D et al. *J Biomol Screen*, 2001, **6**: 171
- [11] Liao F et al. *Cancer Res*. 2000, **60**: 6805
- [12] Zhang L et al. *Cancer Res*, 2002, **62**: 2034
- [13] Gururaj AE et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**: 934
- [14] 魏玲等. *肿瘤防治杂志*, 2002, **9**: 147
- [15] Arisawa Y et al. *Ann Surg Oncol*, 1995, **2**: 114

## The Effect of Polypeptide Extract from Scorpion Venom on Angiogenesis *in Vitro*

Wei-Dong Zhang\*, Ya-Zhou Cui<sup>1</sup>, Li-Cun Wu, Qing Jia, Shou-Qin Song, Zhao-Xia Wang, Qiang Dong

(Department of Pathology, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China;

<sup>1</sup>Shandong Medical Biotechnological Center, Jinan 250062, China)

**Abstract** The study was designed to evaluate the anti-angiogenic activity *in vitro* of PESV, a peptide extract from scorpion venom. Human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) was used to test the anti-angiogenic effect of PESV *in vitro*. HUVEC proliferation was detected by the BrdU cell incorporation ELISA. Apoptosis level and expression of Bcl-2 and Bax protein of HUVEC was determined by flow cytometry. Chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was used to determine the effect of PESV on neovascularization. PESV exhibited potent anti-proliferative and apoptosis-induced activity against HUVEC *in vitro*. In addition, PESV demonstrated preferential inhibition of endothelial cells. PESV also demonstrated suppression of neovascularization in the CAM assay. Our data suggest that PESV is of potent anti-angiogenic activity *in vivo*. PESV could be regarded as a candidate for tumor angiogenesis inhibitor (TAI) and a potent chemotherapeutic agent of malignant tumors, and its component should be further analyzed.

**Key words** scorpion venom; angiogenesis; endothelial cell; chicken embryo chorioallantoic membrane; angiogenesis inhibitor

Received: October 8, 2004 Accepted: December 17, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371841) and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No.2003C02)

\*Corresponding author. Tel: 86-531-2919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com