

# 地鳖虫蛋白提取物对小鼠 S180 肉瘤及鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用

郭 桅 韩雅莉<sup>1\*</sup> 陈少鹏 李兴暖

(汕头大学理学院生物系, 汕头 515063; <sup>1</sup> 广东工业大学轻化学院生物工程系, 广州 510090)

**摘要** 用不同浓度的地鳖虫蛋白粗提取物(0.2~0.8 g/ml)作用于 S180 肉瘤荷瘤小鼠, 观察各组的抑瘤效果及重要生理指标的差异; 同时分别用地鳖虫蛋白粗提取物以及经过盐析、离子交换层析、分子筛由地鳖虫蛋白粗提取物分离纯化得到的活性蛋白, 作用于鸡胚尿囊膜, 观察它们对新生血管生成的抑制作用。结果显示, 地鳖虫蛋白粗提取物对 S180 肉瘤荷瘤小鼠有显著的抑瘤作用; 蛋白质粗提取物以及纯化得到的活性蛋白对鸡胚尿囊膜新生血管的生成有明显的抑制作用, 纯化品的抑制活性高于粗品, 且二者对鸡胚生长发育的影响较阳性对照(地塞米松组)小, 差异显著。因此, 地鳖虫蛋白提取物有良好的体内抑瘤作用及血管生成抑制活性。

**关键词** 地鳖虫; 血管生成; 抗肿瘤

血管生成是机体内一种非常重要的过程, 不仅涉及生殖发育、伤口愈合等生理过程, 还参与糖尿病性视网膜病变、风湿性关节炎和肿瘤生长与侵袭等病理过程<sup>[1]</sup>。有关研究表明, 血管生成对恶性肿瘤的生长和转移起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。恶性肿瘤在发展和转移过程中, 往往伴随着血液黏稠度增加和血栓发生概率增加等现象, 血栓导致血流阻断, 造成局部缺氧, 缺氧效应则激起机体的代偿功能, 诱导各种促血管生长因子的高水平表达, 最终形成新生血管, 后者则为肿瘤的生长和转移提供了必要的条件<sup>[3]</sup>。因此, 如何有效地截断肿瘤的血供、抑制新生血管, 已经成为肿瘤治疗及防止肿瘤扩散的重要研究方向。目前, 已发现很多活血化淤类传统中药材, 在恶性肿瘤治疗方面具有显著的抑制肿瘤血管生成的功效<sup>[4]</sup>。

地鳖虫(*Eupolyphaga sinensis* Walker)又名土元, 土鳖, 属节肢动物门昆虫纲蜚蠊目鳖蠊科昆虫, 为《中华人民共和国药典》记载的正品药材, 是传统的活血化淤类动物药<sup>[5]</sup>。本文通过体内实验, 观察了地鳖虫蛋白粗提取物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用, 同时还观察了其蛋白质粗提取物和纯化的活性蛋白对鸡胚尿囊膜新生血管生成的抑制作用, 旨在为深入探讨地鳖虫蛋白对肿瘤血管生成抑制作用的可能途径及具体机制打下基础。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

中华真地鳖(*Eupolyphaga sinensis* Walker)成虫(雌性)购于江苏省丹阳市新星土元养殖场。鸡胚蛋(5日龄)购于广东省汕头市白沙禽畜原种研究所。S180 瘤株购于中国协和医科大学肿瘤研究所。昆明种小鼠购于厦门大学实验动物中心。地塞米松、环磷酸胺购于汕头市鮀安药店。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 地鳖虫蛋白的提取

样品 1(地鳖虫蛋白水提粗品): 将新鲜的地鳖虫剪碎, 加冰冷的生理盐水匀浆, 9 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 滤去上层的脂质漂浮物, 样品用微孔滤膜过滤除菌; 样品 2(由样品 1 分离得到的地鳖虫纤溶活性蛋白纯品): 参照文献<sup>[6]</sup>的方法, 将样品 1 加硫酸铵分段盐析, 取活性最大的沉淀组分, 经 Sephadex G-75 和 DEAE-DE52 纯化, 对各个蛋白质洗脱峰作纤溶活性检测, 将纤溶活性蛋白组分收集、透析、浓缩, 冷冻干燥备用, 使用之前用生理盐水配成一定浓度, 并过滤除菌。按生药量计算, 样品 1 和样品 2 的终浓度分别是 1 g/L 和 5 g/L。样品 1 和样品 2 的蛋白质活性以溶栓活性判别, 并以纤溶平板法鉴定<sup>[7]</sup>。

### 1.3 地鳖虫蛋白提取物对鸡胚尿囊膜(CAM)新生血管生成的影响

收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2007-01-16

广东省自然科学基金(No.04010984)和广东工业大学基金(No.050009)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 020-31740189, E-mail: ylhan57@126.com

参照文献<sup>[8]</sup>。将刚受精的鸡胚置于 38 ℃, 60% 相对湿度的孵化器中培养 5 天, 无菌条件下暴露 CAM。将鸡胚蛋按重量随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别将吸有生理盐水、样品 1(50 mg)、样品 2(250 mg) 和地塞米松(12.5 μg)各 50 μl 的玻璃纤维滤纸(圆形, 直径 5 mm)覆盖于 CAM 上(位于两条主静脉之间血管相对较少的区域), 72 h 后移去滤纸片, 用 10% 甲醛固定 15 min, 取出尿囊膜移至培养皿中, 滴加适量生理盐水将尿囊膜展平, 解剖镜下观察计数加样圈内(直径 5 mm)的血管分支点数, 并用数码相机以相同比例拍照记录, 每个标本均数 3 次, 取均值。并按下述公式计算血管生成抑制率<sup>[9]</sup>。

血管生成抑制率(%)=[(对照组血管分支点数-给药组血管分支点数)/对照组血管分支点数]×100%

将发育中的鸡胚取出, 用滤纸吸干胚胎表面液体, 拍照记录, 称重, 并观察组间差异。

#### 1.4 地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用<sup>[10]</sup>

S180 瘤株在小鼠体内腹水传代 3 次。抽取最后一次荷瘤小鼠的腹水, 置于冰水浴。用冰冷的生理盐水将抽取的 S180 细胞浓度调至  $1.4 \times 10^7$  个/ml。在小鼠[均为雄性, 体重(20±2) g]腋窝皮下注射 0.2 ml 冷却的细胞悬液, 细胞总数为  $2.8 \times 10^6$  个。

按体重将接种肿瘤细胞的小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只, 即模型对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照组。另设空白对照组, 空白对照组不接种肿瘤细胞, 每日给生理盐水(i.g.); 模型对照组, 每日给生理盐水(i.g.); 低、中、高剂量组, 每日分别以 5 g/kg、10 g/kg、20 g/kg 的剂量(按大黄蛰虫丸的人用剂量折算得低剂量<sup>[11]</sup>, 中、高剂量分别为低剂量的 2 倍、4 倍, 所有给药剂量以生药量计算)给地鳖虫蛋白粗提物(i.g.); 阳性对照组, 每 2 日给环磷酰胺(cyclophosphamide)一次(i.p.), 剂量为 20 mg/kg。自接种分组当日起的第 8 天, 全部小鼠摘眼球取血样, 脱颈椎处死, 取瘤块及脾脏、胸腺等器官, 称重并比较组间差异, 计算 4 个药物治疗组的抑瘤率; 取血样和肝脏标本做抗氧化指标分析, 包括血浆超氧化物歧化酶(SOD)活力、肝脏脂质过氧化物(LPO)水平<sup>[12]</sup>, 比较组间差异。

抑瘤率(%)=[(对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重]×100%

器官系数=器官重量/动物体重(g/kg)

#### 1.5 统计方法

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 Excel 软件进行 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 地鳖虫蛋白提取物对 CAM 血管生成的影响

用 CAM 法观察地鳖虫蛋白提取物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, 生理盐水组血管生成良好, 血管密度大, 管径粗, 分支多; 而两个地鳖虫蛋白提取物处理组的血管密度较稀疏, 管径较细, 分支明显减少。其中样品 1 处理组的血管生成受到一定抑制, 小血管显著减少; 样品 2 处理组血管生成受到的抑制更为突出, 两组血管分支点以及血管数量均较生理盐水对照组明显减少, 小血管的减少尤为显著。两个地鳖虫蛋白处理组以生药量计算, 显示了一定程度的量效关系。地塞米松对 CAM 新生血管生成具有强烈的抑制作用, 样品 1 和样品 2 处理组对 CAM 新生血管生成的抑制作用较地塞米松组小。样品 1、样品 2 处理组和地塞米松阳性对照组位于加样圈内的血管分支点数分别为  $24.22 \pm 4.08$ 、 $19.89 \pm 4.01$  和  $12.75 \pm 3.77$ , 明显低于生理盐水对照组  $45.38 \pm 4.34$ ,  $P < 0.01$ 。样品 1 和样品 2 处理组的血管生成抑制率分别是 46.6% 和 56.2%, 明显高于生理盐水对照组 20%。

如图 2 所示, 地鳖虫蛋白提取物对鸡胚尿囊膜上新生血管生成的抑制效果显著, 而对鸡胚发育无明显体征上的影响; 而地塞米松组则对胚胎的影响很大, 从外表体征上可以看出, 该处理组鸡胚的肢体均发育不全, 表皮层很薄, 其质量较其他组胚胎明显偏小, 见表 1。

### 2.2 地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

设空白组和模型组, 主要用于检测肿瘤造模是否成功。模型组与各个给药组均同时接种肿瘤细胞, 8 天后取瘤块称重, 如果模型组小鼠的平均瘤重小于 1 g, 20% 的小鼠瘤重小于 0.4 g, 则表示造模失败, 需要重做实验。本次实验各组的小鼠瘤重如表 2 所示, 模型组的平均瘤重为 1.71 g, 且符合 S180 实体瘤的造模要求<sup>[12]</sup>。实验结果表明, 3 个剂量组的地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠的肿瘤生长有明显抑制作用, 且呈一定的量效关系, 最高抑瘤率达 48.54%。阳性对照组抑瘤率为 63.74%。

对各组动物的脾脏、胸腺等免疫器官称重比

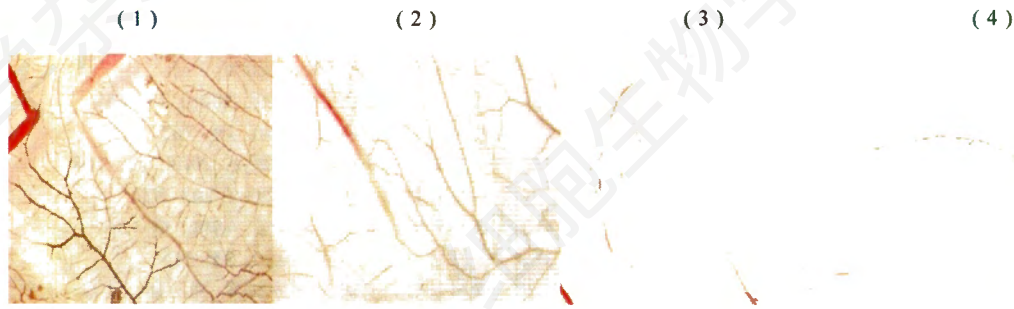


图 1 地鳖虫蛋白提取物和地塞米松对 CAM 血管生成的影响

1: 生理盐水; 2: 样品 1; 3: 样品 2; 4: 地塞米松。



图 2 地鳖虫蛋白提取物和地塞米松对鸡胚发育的影响

1: 盐水; 2: 样品 1; 3: 样品 2; 4: 地塞米松。

表 1 地鳖虫蛋白提取物和地塞米松对鸡胚发育的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

分组	胚胎重量(g)	胚胎发育
生理盐水(对照组)	2.5 ± 0.3*	正常
样品 1 (50 mg)	2.7 ± 0.2*	正常
样品 2 (250 mg)	2.4 ± 0.3*	正常
地塞米松(12.5 μg)	1.7 ± 0.2	异常

与地塞米松组比较, \* $P < 0.01$ 。

较,发现地鳖虫蛋白粗提物对荷瘤小鼠的脾脏和胸腺无明显影响,与各对照组相比器官系数间无明显差异, $P > 0.05$ 。表 3 所示地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠抗氧化指标的影响,从中可以看出地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠的抗氧化作用也无显著影响,但环磷酸胺组的肝脏 LPO 含量则较其他各组明显偏低, $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

血管生成是指毛细血管从已存在的血管周围生成的过程。生理状态下,除女性生殖系统有短暂的新生血管生成过程外,成年人的脉管系统处于极度静止状态其更新时间为 1 000 天或更长,只有在特殊刺激下,血管内皮细胞可 4~5 天更新 1 次<sup>[13]</sup>。血管生成过程受到机体严格的、多层次的控制,正常情况下,宿主能控制血管的生成,而且机体可在短时间内

表 2 地鳖虫蛋白粗提物对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	肿瘤重量(g)	抑制率(%)
模型组	1.71 ± 0.45	0
地鳖虫低剂量(5 g/kg)	1.17 ± 0.45*	31.58
地鳖虫中剂量(10 g/kg)	1.03 ± 0.53*	39.66
地鳖虫高剂量(20 g/kg)	0.88 ± 0.51**	48.54
环磷酸胺	0.62 ± 0.30**	63.74

与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

表 3 地鳖虫粗提物对 S180 荷瘤小鼠抗氧化作用的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	SOD (IU/ml)	LPO(nmol/mg)
空白对照组	619.8 ± 165.2	3.14 ± 0.50
模型组	749.4 ± 151.0	3.39 ± 0.95
低剂量(5 g/kg)	743.8 ± 249.1	3.28 ± 0.74
中剂量(10 g/kg)	795.6 ± 171.1	3.12 ± 0.60
高剂量(20 g/kg)	700.3 ± 42.8	4.14 ± 1.35
环磷酸胺	701.6 ± 102.6	2.38 ± 0.30*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

打开或关闭这些控制系统<sup>[14]</sup>。但肿瘤组织却缺乏控制血管生成的调节机制,肿瘤血管生成是血管生成因子与其抑制因子之间的调节失衡所致,生长因子浓度上升或抑制因子浓度下降均可导致肿瘤血管生成<sup>[15]</sup>。

有关研究已经证明,恶性肿瘤的无限制侵袭性生长及其转移依赖于血管生成<sup>[16]</sup>,因而,抑制血管生成能显著地抑制肿瘤的生长。现已发现一些从生物体提取到的活性物质具有良好的抗血管生成作用,如新近发现的血管抑制素(angiotatin)<sup>[17]</sup>及内皮抑制素(endostatin)<sup>[18]</sup>尤为值得关注。angiotatin 是一个相对分子质量 38 000 的纤维蛋白溶酶原片段,能抑制内皮细胞增殖、血管生成和肿瘤生长。其主要作用机制为阻断裂解纤溶酶原的酶催化位点,并阻止调节血管生成的基质重塑<sup>[17]</sup>。

地鳖虫为传统的活血化瘀类动物药材。本研究

表明,其蛋白质提取物具有明显的抑制新生血管生成和抑制小鼠 S180 肉瘤生长的活性,据此表明它极可能是通过血管生成抑制途径产生体内抑瘤效应的,并且它抑制血管生成的作用与溶栓活性存在一定的相关性。然而它含有的溶栓活性蛋白组分是否有直接杀伤肿瘤细胞的作用,尚待进一步研究;另外,它抑制肿瘤血管增生的具体途径及其机制也还需进一步研究加以证实。

#### 参考文献(References)

- [1] 张志荣等。靶向治疗分子基础与靶向药物设计,北京:科学出版社,2005,251
- [2] 刘超英等。肿瘤防治杂志,2001,8:560
- [3] 李家增。癌症进展杂志,2005,3:110
- [4] 张前等。北京中医药大学学报,2004,27:25
- [5] 国家药典委员会。中华人民共和国药典,2000年版,一部,北京:化学工业出版社,2000,16
- [6] 韩雅莉等。生物工程学报,2006,22:639
- [7] 韩雅莉等。中药材,2006,29:765
- [8] 张维东等。中国药理学通报,2005,21:708
- [9] Ribatti D *et al.* *J Anat*, 2003, 203: 323
- [10] 郁利平等。中国癌症杂志,1996,6:186
- [11] 王维澎。北京中医,2000,23:51
- [12] 徐叔云等。实验药理学方法学,第三版,北京:人民卫生出版社,2005
- [13] Folkman J. *N Engl J Med*, 1971, 285: 1182
- [14] 袁玫。中国肿瘤生物治疗杂志,1999,6:177
- [15] Molema G. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52: 301
- [16] Kerbel RS. *Carcinogenesis*, 2000, 23: 505
- [17] O'Reilly MS *et al.* *Cell*, 1994, 79: 315
- [18] O'Reilly MS *et al.* *Cell*, 1997, 88: 277

## Extraction and Purification Groups from *Eupolyphaga sinensis* Walkers Inhibit Angiogenesis and Tumor Growth of the S180 Inoculated Mice

Wei Guo, Ya-Li Han<sup>1\*</sup>, Shao-Peng Chen, Xing-Nuan Li

(Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China; <sup>1</sup>Bioengineering Department, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China)

**Abstract** This study was designed to evaluate the activities of anti-angiogenesis and anti-tumor with the protein extractions from *Eupolyphaga sinensis*, a kind of Chinese traditional medicine. The mice with S180 sarcoma inoculated were treated (i.g.) with the crude protein extractions at three different doses (0.2 g/ml, 0.4 g/ml, 0.8 g/ml, as crude materials), then the inhibitory rate of tumor growth and some physical indexes of antioxidation of the mice were taken. The tumors peeled off the mice which were treated with the crude protein extractions were suppressed remarkably. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was used to determine the neovascularizative effect *in vivo* with the crude proteins extractions and the groups purified by ammonium sulphate precipitation, DEAE-cellulose and Sephadex G-75 Column chromatography, and the potent activities of anti-angiogenesis were exhibited respectively. All of our data suggest that the proteins extracted from *Eupolyphaga sinensis* with fibrinolytic activity must contain the potency to inhibit tumor growth and angiogenesis *in vivo*.

**Key words** *Eupolyphaga sinensis* Walkers; angiogenesis; anti-tumor

Received: October 31, 2006 Accepted: January 16, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.04010984) and the Foundation of Guangdong University of Technology (No.050009)

\*Corresponding author. Tel: 86-20-31740189, E-mail: ylhan57@126.com