

不同分子质量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响

侯林^{1*},周芹芹²,崔清华¹,田景振^{1#}(1.山东中医药大学药学院,济南 250355;2.山东省医学科学院药物研究所/济南大学医学与生命科学学院,济南 250000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3490-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.12

摘要 目的:研究不同分子质量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响。方法:建立转基因斑马鱼模型。先后以超滤法、离子交换层析法对全蝎蛋白进行分离,获得不同分子质量段的全蝎蛋白(3~10 ku、>10~50 ku、>50 ku)。以10、100、500 μg/ml的上述全蝎蛋白培养转基因斑马鱼胚胎,荧光显微镜下对转基因斑马鱼节间血管进行计数,优选全蝎蛋白最适分子质量段;以>50 ku全蝎蛋白1、2成分再次进行上述培养与血管计数,优选最适成分。结果:质量浓度为500 μg/ml的>50 ku全蝎蛋白1成分抑制斑马鱼血管生成活性最强,抑制率为92.59%。结论:全蝎蛋白及其相关成分具有抑制血管生成的活性,可能为全蝎抗肿瘤机制之一。

关键词 全蝎;超滤;离子交换层析;斑马鱼;血管生成;

The Effects of Scorpion's Proteins with Different Molecular Weights on Angiogenesis of the Transgenic Zebrafish

HOU Lin¹, ZHOU Qin-qin², CUI Qing-hua¹, TIAN Jing-zhen¹(1.School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences/School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Jinan 250000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of scorpion's proteins with different molecular weights on angiogenesis of the transgenic zebrafish. METHODS: The vascular fluorescence transgenic zebrafish models were established. Scorpion's proteins were separated by ultrafiltration and ion exchange chromatography to obtain the scorpion protein fractions with different molecular weights (3-10 ku, >10-50 ku and >50 ku). The embryos of transgenic zebrafishes were cultured in the above 10, 100 and 500 μg/ml scorpion's proteins. Intersegmental vessels of the transgenic zebrafishes were counted under the fluorescence microscope to optimize the most suitable scorpion's protein molecular weight. The vessels were counted again with >50 ku scorpion protein component 1 and 2, so as to select suitable component. RESULTS: The >50 ku scorpion's protein fraction component 1 with the mass concentration of 500 μg/ml had the highest inhibitory activity for the angiogenesis of the transgenic zebrafish, with inhibitory rate of 92.59%. CONCLUSIONS: Scorpion's protein and its fractions have the activity of angiogenesis inhibition, which may be one of anti-cancer mechanisms of scorpion.

KEYWORDS Scorpion; Ultrafiltration; Chromatography; Zebrafish; Angiogenesis

肿瘤的发生、生长和转移与肿瘤新生血管的形成密切相关。早在1971年 Folkman J^[1]就提出肿瘤的生长和转移具有血

管依赖性的观点,认为肿瘤的生长分为无血管期和血管期,在无血管期,肿瘤细胞主要依靠周围组织的弥散来获取氧和营

2010,16(9):89.

- [6] 刘瑞娟,孙长岗,唐世锋,等.逆转胶囊含药血清对人乳腺癌耐药药株 MCF-7/ADR 细胞 P-gp 蛋白表达的影响[J].实用癌症杂志,2010,25(10):20.
- [7] 张兆颖,储婷,马伟从,等.丹参酮 II_A 脂质体的制备及对 HepG2/ADR 细胞增殖的抑制作用[J].华西药理学杂志,2014,29(1):33.
- [8] 官玲花. HPLC 法同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的含量[J].中国药房,2013,24(32):3 056.
- [9] Rocha G, Oliveira RR, Kaplan MA, *et al.* 3β-acetyl tormentic acid reverts MRP1/ABCC1 mediated cancer resistance through modulation of intracellular levels of GSH and inhibition of GST activity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741(9):140.
- [10] 李春娣,张薇,徐亚东.丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对小鼠 Lewis 肺癌生长及 PCNA 表达的影响[J].牡丹江医学院学报,2010,31(3):24.
- [11] Jiao JW, Wen F. Tanshinone II_A acts via p38 MAPK to induce apoptosis and the down-regulation of ERCC1 and lung-resistance protein in cisplatin-resistant ovarian cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1):781.

(收稿日期:2015-05-12 修回日期:2015-06-15)
(编辑:张静)

营养物质;而随着肿瘤的生长到了血管期,肿瘤病灶内出现新生血管,肿瘤细胞可经新生血管获取营养物质从而迅速生长,并且获得进入血液循环引起转移的可能。随后他进一步提出抑制肿瘤血管生成从而阻止肿瘤生长和转移的观点,奠定了抗肿瘤血管生成疗法的理论基础。抗肿瘤血管生成疗法较化疗、放疗具有高效、广谱、不易产生耐药、毒副作用少等优点^[2]。斑马鱼是一种热带鱼,具有养殖容易、胚胎发育迅速的特点,1994年被确定为模式生物^[3]。因其具有高通量、操作简单、胚胎透明和易观察等特点,斑马鱼逐渐被用于筛选抗血管生成药物^[4-5]。特别是Cross LM等^[6]运用基因片段G-RCFP标记插入血管内皮生长因子2(VEGF2)基因的启动子序列中表达,得到了具有荧光血管的转基因斑马鱼,使血管的生成更容易被观察。

中药在治疗肿瘤方面积累了丰富的临床资料,从传统中药中寻找安全有效的血管生成抑制组分或成分已经成为新药研发领域的全新方向。全蝎是传统的抗肿瘤中药,始载于《开宝本草》,2010年版《中国药典》收录的品种为蝎蝎科动物东亚蝎蝎*Buthus martensii* Karsch的干燥体,具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛的功能,临床用于小儿惊风、抽搐痉挛、半身不遂、破伤风、风湿顽痹、偏正头痛、疮疡、瘰疬等症^[7]。目前对全蝎的抗肿瘤活性研究主要体现在对肿瘤细胞的直接杀伤^[8]和免疫方面^[9]。本研究选用冻干全蝎^[10],采用匀浆法提取全蝎蛋白^[11],硫酸铵盐脱脂,先后以超滤法、离子交换层析法对全蝎蛋白进行分离,获得不同分子量段的全蝎蛋白成分;同时复制转基因斑马鱼模型,考察全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响。

1 材料

1.1 仪器

UV-3010型紫外-可见分光光度计(日本Hitachi公司);LD4-2A型低速离心机(北京医用离心机厂);BS110型分析天平(北京赛多利斯天平公司);超滤装置、中空纤维膜(北京旭邦膜设备有限公司);BSZ-100型自动部分收集器、HD-3000型电脑核酸蛋白检测仪(上海嘉鹏科技有限公司);DP2-BSW型荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药材

全蝎购自山东蒙阴县药材公司,经山东中医药大学药系王厚伟副教授鉴定为真品。

1.3 试剂

阴离子交换琼脂糖凝胶DEAE-Sepharose CL-6B(美国GE Healthcare公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris,上海生工生物工程公司);其余试剂均为分析纯。

1.4 动物

斑马鱼为TG系转基因斑马鱼(山东省科学院生物所提供)。

2 方法

2.1 斑马鱼的培养

喂养时以照明14 h/黑暗10 h交替进行,♀♂斑马鱼分开喂养,定时喂以人工颗粒状饲料和刚孵出的卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)。采卵时,取健康性成熟的斑马鱼,按♀♂1:1或1:2的比例放入交配缸内,交配次日6~8 h获得受精卵。

2.2 不同分子量段全蝎蛋白的制备

参考文献[10-11]制备全蝎提取液。取2 500 ml全蝎提取液,0.45 μm微孔滤膜滤过后在蠕动泵的压力下依次通过50、10、3 ku的中空纤维柱。通过每根柱子后,蒸馏水洗清,以5% BaCl₂作为检测试剂,尽量减少低于截留分子质量的物质残留在浓缩液中。当浓缩液中加入5% BaCl₂后无白色沉淀产生时,收集透过液进行下一步超滤,浓缩液自浓缩口放出,用蒸馏水清洗2遍,冷冻干燥,分别制得分子质量为3~10 ku、10~50 ku、>50 ku的全蝎蛋白。

2.3 蛋白冻干粉离子交换层析

制备50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH调至8.0)为起始缓冲液;称取>50 ku的全蝎蛋白冻干粉112 mg溶于1.5 ml起始缓冲液中,0.45 μm微孔滤膜滤过后沿壁慢慢加入到凝胶的床面上。首先以起始缓冲液洗脱两个柱体,冲去不吸附的杂质,其中未见有穿透峰出现;然后缓冲液中NaCl浓度由0上升至1.5 mol/L,洗脱体积为1 000 ml。以3 ml/min流速,在核酸蛋白检测仪280 nm波长处,分析蛋白冻干粉离子交换层,分别将1、2号峰收集,透析脱盐后冷冻干燥备用,作为1、2成分。

2.4 转基因斑马鱼血管生成测定

在受精卵发育24 h时,荧光显微镜下挑选发育正常的斑马鱼胚胎,移入于光照培养箱(28 ℃)内96孔板中,每孔1枚。分别以0(空白对照)、10、100、500 μg/ml质量浓度的3~10 ku、>10~50 ku、>50 ku全蝎蛋白培养受精卵24 h;在受精卵发育48 h时,于荧光显微镜下观察96孔板样孔中胚胎的存活情况。此时,存活的胚胎已孵出仔鱼,用麻醉剂对仔鱼进行麻醉,荧光显微镜下对节间血管进行计数,以筛选全蝎蛋白最适分子量段。以0(空白对照)、10、100、500 μg/ml质量浓度的>50 ku全蝎蛋白1、2成分培养受精卵24 h,同上述方法处理,荧光显微镜下对节间血管进行计数。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据。各组数据均为计数资料,采用秩和检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同分子量段全蝎蛋白作用下斑马鱼血管生成测定结果

与空白对照比较,10 μg/ml>10~50 ku全蝎蛋白,10、100 μg/ml的>50 ku全蝎蛋白培养24 h后,转基因斑马鱼节间血管减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同分子量段全蝎蛋白作用下斑马鱼血管生成测定结果见表1。

表1 不同分子量段全蝎蛋白作用下斑马鱼血管生成测定结果($n = 10$)

Tab 1 Determination results of the intersegmental angiogenesis in zebrafishes cultured by scorpion's protein with different molecular weights($n = 10$)

质量浓度, μg/ml	3~10 ku全蝎蛋白		>10~50 ku全蝎蛋白		>50 ku全蝎蛋白	
	节间血管数	抑制率,%	节间血管数	抑制率,%	节间血管数	抑制率,%
0(空白对照)	27.00	0	27.00	0	27.00	0
10	25.20	6.67	23.00*	14.81	21.67*	19.74
100	25.33	6.19	26.33	2.48	22.00*	18.52
500	-	-	25.33	6.19	25.00	7.41

注:“-”系斑马鱼中毒死亡;与空白对照比较,* $P < 0.05$

Note:“-” means the zebrafish dies of poisoning; vs. blank control, * $P < 0.05$

3.2 >50 ku全蝎蛋白1、2成分作用下斑马鱼血管生成测定结果

与空白对照比较,10、100 μg/ml的>50 ku全蝎蛋白1、2成分培养受精卵24 h后,转基因斑马鱼节间血管减少不明显;1成分在500 μg/ml时,血管抑制率达到92.59%,可以确定为全蝎抑制血管生成的活性成分。>50 ku全蝎蛋白1、2成分下斑马鱼血管生成测定结果见表2;1成分对斑马鱼节间血管的影响见图1。

表2 >50 ku全蝎蛋白1、2成分作用下斑马鱼血管生成测定结果(n=10)

Tab 2 Determination results of the intersegmental angiogenesis in zebrafishes cultured by component 1 and 2 of >50 ku scorpion's proteins(n=10)

质量浓度, μg/ml	1成分		2成分	
	节间血管数	抑制率, %	节间血管数	抑制率, %
0(空白对照)	27.00	0	27.00	0
10	26.63	1.37	23.67	12.33
100	26.43	2.11	24.40	9.63
500	2.00*	92.59	-	-

注:“-”系斑马鱼中毒死亡;与空白对照比较,*P<0.05

Note:“-” means the zebrafish dies of poisoning; vs. blank control, *P<0.05

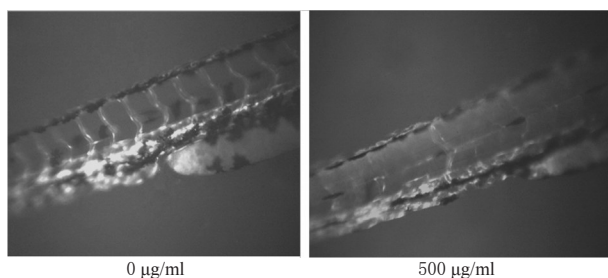


图1 1成分对斑马鱼节间血管的影响

Fig 1 The effect of component 1 on the intersegmental vessels in the zebrafish

4 讨论

超滤是一种加压膜分离技术,操作简便,成本低廉,不需增加任何化学试剂,尤其是其实验条件温和,不引起温度、pH的变化,因而可以防止生物大分子的变性、失活和自溶。其已成为一种重要的生化实验技术,广泛用于各种生物大分子(如蛋白质、酶、核酸等)的浓缩、分离和纯化。本研究采用超滤的方法将全蝎蛋白根据分子质量分段,采用转基因斑马鱼模型研究其对血管生成的影响。结果显示,全蝎蛋白具有抑制血

管生成的活性,其中>50 ku全蝎蛋白对斑马鱼血管生成的抑制率最高,与空白对照比较有统计学意义(P<0.05),说明抑制肿瘤血管生成是全蝎抗肿瘤的一种新的作用机制。在不同分子质量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响研究的基础上,本研究对筛选的>50 ku全蝎蛋白使用离子交换层析进一步分离得2个成分,其中1成分在500 μg/ml时抑制血管生成活性最强,效果显著(P<0.05),可以确定为全蝎抑制血管生成的活性成分。通过以上研究,明确了全蝎蛋白具有抑制斑马鱼血管生成活性的活性,并进行了活性追踪,为全蝎抗血管活性成分的分离纯化奠定了基础。

参考文献

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1 182.
- [2] Nanda A, Croix BS. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(1): 44.
- [3] Concordet JP, Ingham P. Developmental biology. Catch of the decade[J]. *Nature*, 1994, 369(6 475): 19.
- [4] Terriente J, Pujades C. Use of zebrafish embryos for small molecule screening related to cancer[J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(2): 97.
- [5] 陈怡君,蒲韵竹,颜慧,等.冰片对斑马鱼胚胎发育的安全性评价[J]. *中国药房*, 2014, 25(19): 1 377.
- [6] Cross LM, Cook MA, Lin S, et al. Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2003, 23(5): 911.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010: 106.
- [8] 庄海峰,姚芳,王伟涛,等.全蝎对人白血病HL-60细胞作用的研究[J]. *天津中医药*, 2005, 22(1): 65.
- [9] 苗明三.全蝎粉对小鼠免疫功能的影响[J]. *安徽中医学院学报*, 1997, 16(4): 56.
- [10] 侯林,姬涛,田景振,等.不同炮制方法对全蝎有效成分和活性的影响[J]. *中草药*, 2011, 42(5): 897.
- [11] 侯林,田景振,姬涛.全蝎匀浆提取工艺研究[J]. *中成药*, 2011, 33(10): 1 813.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-05-14)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅