

• 实验研究 •

血管抑素对视网膜微血管内皮细胞的细胞外信号调节激酶水平的影响

孙旭芳 曾水清 张虹 杨红 程阳 李小青

【摘要】 目的 观察血管抑素对体外培养的鼠视网膜微血管内皮细胞的细胞外信号调节激酶(ERK-1)活性的影响。方法 利用 l-lysine 耦联的 sepharose 4B 亲和层析柱从血浆中分离和纯化血管抑素。原代培养鼠视网膜微血管内皮细胞分为 4 组:对照组,血管内皮因子(VEGF)10 ng/ml 组,血管抑素 130 μ g/ml 组,VEGF(10 ng/ml)+血管抑素(130 μ g/ml)组,Western-blotting 检测血管抑素对血管内皮因子刺激后 1、2、5、10、15、30 min 的视网膜微血管内皮细胞 ERK-1 水平的影响。结果 与对照组相比,经血管抑素处理后 1 min,ERK-1 水平开始下降,10 min 时下降最为显著,30 min 后对照组与血管抑素组 ERK 水平没有显著区别。VEGF 刺激后,鼠视网膜微血管内皮细胞中 ERK-1 被迅速激活,5 min 后达到高峰,VEGF 组 ERK 水平较对照组提高了 210% ($P < 0.05$);30 min 后,VEGF 组 ERK 水平与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而血管抑素能使 ERK-1 的表达量降低 11.9% (1 min)、17.9% (2 min)、38.7% (5 min)、49.3% (10 min) ($P < 0.05$)、27.9% (15 min)、1.12% (30 min)。结论 血管抑素在体外能有效的阻断 VEGF 由细胞外向细胞核传导的信号通路。

【关键词】 视网膜新生血管化/病理生理学; 血管生成抑制剂/药理学; 血管抑素; 有丝分裂激活蛋白激酶类

中图分类号:R774.1 R446-39

Effects of angiostatin on the activities of extra-cellular signal-regulated protein kinase in microvascular endothelial cells of rat's retina SUN Xu-fang*, ZENG Shui-qing, ZHANG Hong, et al. *Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Huazhong Scientific University, Wuhan 430030, China
Corresponding author: SUN Xu-fang, Email: applesxf@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of angiostatin on the activity of extra-cellular signal-regulated protein kinase (ERK) of retinal microvascular endothelial cells of mice. **Methods** Angiostatin was separated and purified by l-lysine sepharose 4B from human plasma. The primary retinal microvascular endothelial cells were divided into 4 groups: the control group, vascular endothelial growth factor (VEGF) 10 ng/ml group, angiostatin 130 μ g/ml group, and VEGF (10 ng/ml) + angiostatin (130 μ g/ml) group. The expression of ERK-1 was assayed by Western-blotting method 1, 2, 5, 10, 15, and 30 minutes after the treatment of angiostatin. **Results** Compared with the control group, the expression of ERK-1 reduced 1 minute after treatment, reduced markedly after 10 minutes. After 30 minutes, no differences of the expression of ERK were seen between the control group and angiostatin group. The activation of ERK-1 of retinal microvascular endothelial cells occurred after stimulated by VEGF, and at the pitch at the peak after 5 minutes. The level of ERK in VEGF group increased 210% than that in the control ($P < 0.05$). After 30 minutes, no significant difference of the level of ERK between VEGF and the control group. And because of angiostatin, the expression of ERK-1 decreased 11.9% (1 minute)、17.9% (2 minutes)、38.7% (5 minutes)、49.3% (10 minutes) ($P < 0.05$)、27.9% (15 minutes)、1.12% (30 minutes) respectively. **Conclusions** Angiostatin can effectively block the signal path through which VEGF transmits from outside of the cell to cellular nuclei.

【Key words】 Retinal neovascularization/physiopathology; Angiogenesis inhibitors/pharmacology; Angiostatin; Mitogen-activated protein kinases

血管抑素是近年来发现的一种抗肿瘤血管生成的内源性蛋白,已有大量体内、外实验证明它能特异抑制

肿瘤性或非肿瘤性血管内皮细胞生长,但其机制暂不清楚^[1]。血管内皮因子(VEGF)是众多的促血管生成物质中最重要的一种,在体外能促进培养的内皮细胞增生^[2],细胞外信号调节激酶(ERK)通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号级联反应通路的原型,包括

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科(孙旭芳、张虹、杨红),附属协和医院眼科(曾水清、程阳、李小青)
通讯作者:孙旭芳,Email:applesxf@yahoo.com.cn

VEGF、表皮生长因子(EGF)在内的生长因子必须经此途径才能转化为细胞内效应^[3],是目前研究最多的 MAPK 途径之一。我们检测了血管抑素对培养的血管内皮细胞 ERK 活性的影响,试图从细胞信号传导角度阐明血管抑素抗血管生成的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠 6 只,雌雄不限,平均体重 0.1 kg(由同济医学院实验动物中心提供)。胎牛血清(美国 Hyclone 公司),M199 培养基(美国 GIBCO 公司)。兔抗鼠 VII 因子抗体(武汉博士得公司),其余试剂为市售分析纯。血管抑素蛋白(自制);兔抗鼠 ERK-1 单克隆抗体及碱性磷酸酶标记的二抗、Western-blotting 试剂(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 血管抑素的制备 参照文献^[1]的方法,置备 l-lysine 耦联的 sepharose 4B 柱,将 200 ml 血浆用 Watman 滤纸过滤,蒸馏水稀释至 2 倍体积,过 sepharose 4B 柱,流速 30 ml/h,以 8 倍柱床体积的 0.3 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4),洗涤至 280 nm 的吸光度 $[A, \text{旧称光密度}(OD)]$ 值 <0.005 ,再以 5 倍柱床体积的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)洗涤,将胶悬起,移入烧杯,加入 0.5 mg 弹性蛋白酶,充分混匀,静置过夜,以 0.3 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4),洗涤至 $A_{280} < 0.005$,以 0.2 mol/L 6-氨基己酸洗脱,收集洗脱液,取 2 μ l 进行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,鉴定层析效果,剩余样品采用紫外光吸收法定量。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

1.2.2 鼠视网膜微血管内皮细胞培养 参照文献^[4, 5]的方法,无菌条件下取鼠眼 6 只,70%酒精浸泡 1 min,沿角巩缘剪开,去除角膜、晶状体、玻璃体,完整的取出视网膜神经层,放入磷酸平衡液(PBS)中,漂洗 3 次,剪碎,匀浆后,用 0.25%的胰蛋白酶消化 30 s,加入等量 PBS 终止消化,先后用 110 μ m 孔径和 55 μ m 孔径的尼龙筛网过滤,用 PBS 洗涤。收集滞留于 55 μ m 筛网上的微血管片段,离心收集液,以离心半径 15 cm、4 000 r/min 离心 5 min,弃除上清液,用 M199 培养基[含 20%胎牛血清,20 U/ml 肝素钠,10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液,pH 值 7.3]悬起细胞,接种于培养瓶内,置于 37°C 于 5% CO₂ 培养箱,次日换液,以后每 3 天换液 1 次。

1.2.3 Western-blotting 检测血管抑素对 VEGF 预

处理的鼠视网膜微血管内皮细胞 ERK-1 水平的影响

取对数期生长细胞,加入无血清培养基,于 37°C 5% CO₂ 培养箱,培育 3 d,用无血清培养基悬起。悬起细胞分为 4 组:对照组,VEGF(10 ng/ml),血管抑素(130 μ g/ml)组,EGF(10 ng/ml) + 血管抑素(130 μ g/ml)组。每组 30 孔,每孔细胞数 1×10^6 个。于 VEGF 刺激后 1、2、5、10、15、30 min 加入细胞裂解液(20 mmol/L HEPES),150 mmol/L NaCl,1.5 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)缓冲液,15 Triton X-100,1 mmol/L 苯甲基磺酰氟,1 μ g/ml 亮氨酸,1 μ g/ml 抑肽酶,10%甘油,冰浴条件下收集细胞,以离心半径 15 cm、10 000 r/min 4°C 离心 30 min,取上清液。按常规方法进行 Western-blotting 检测,最后对结果进行光密度扫描分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS10.0 版软件包进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 血管抑素的分离纯化

血浆经 sepharose 4B 亲和层析柱分离和纯化后,6-氨基己酸洗脱获得单一锐利的洗脱峰,取 2 μ l 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果显示可获得 43KU 和 35KU 2 个片段(图 1)。

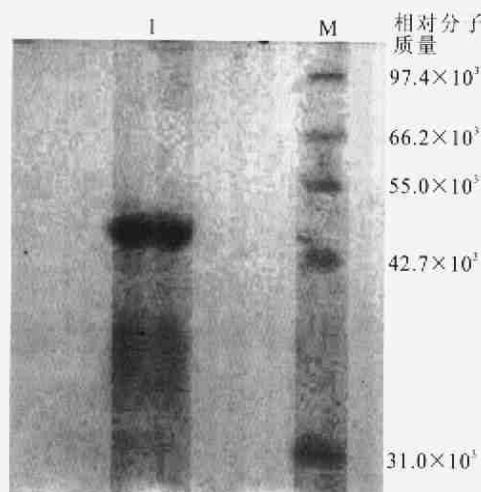


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分析纯化的血管抑素蛋白。M:标准分子量;I:血管抑素的 43KU 和 35KU 片段

Fig. 1 SDS-PAGE of angiostatin purified from human plasma. M: mark of protein molecular weight. I: purified angiostatin

2.2 血管抑素对内皮细胞 ERK-1 活性的影响

与对照组相比,经血管抑素处理后 1 min,ERK-1 水平开始下降($F=35.2, P < 0.01$),10 min 时下降最为显著($F=65.47, P < 0.01$),30 min 后对照组与血

管抑素组 ERK 水平无显著区别 ($F=1.5, P>0.05$) (表 1, 图 2)。

2.3 血管抑素对 VEGF 处理的视网膜微血管内皮细胞 ERK-1 活性的影响

VEGF 刺激后, 鼠视网膜微血管内皮细胞中 ERK-1 被迅速激活, 5 min 后达到高峰, VEGF 刺激组 ERK 水平较对照组提高了 210% ($F=19.7, P<0.05$), 30 min 后, VEGF 刺激组 ERK 水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($F=3.2, P>0.05$), 而血管抑素能使 ERK-1 的表达量降低 11.9% (1 min) ($F=33.3, P<0.05$)、17.9% (2 min) ($F=40.2, P<0.05$)、38.7% (5 min) ($F=45.2, P<0.05$)、49.3% (10 min) ($F=53.2, P<0.05$)、27.9% (15 min) ($F=49.9, P<0.05$)、1.12% (30 min) ($F=35.2, P<0.05$) (表 2, 图 2)。

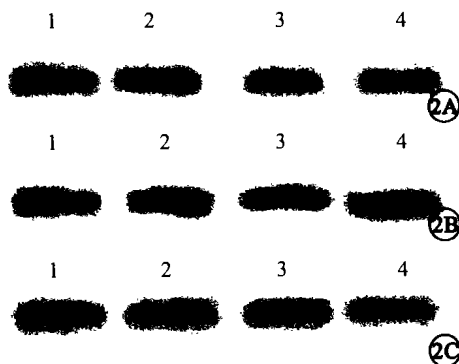


图 2 VEGF 处理后 1、10、30 min 各组 ERK-1 表达水平。2A. VEGF 处理后 1 min。2B. VEGF 处理后 10 min。2C. VEGF 处理后 30 min。1: 对照组; 2: VEGF 组; 3: 血管抑素组; 4: VEGF+血管抑素组

Fig. 2 The expression of ERK-1 in different groups after treated by VEGF. 2A. 1 minute after treated by VEGF. 2B. 10 minutes after treated by VEGF. 2C. 30 minutes after treated by VEGF. Lane 1: control group; Lane 2: VEGF treated group; Lane 3: angiostatin treated group; Lane 4: VEGF and angiostatin treated group

3 讨论

血管抑素是一种内源性蛋白, 1994 年 O'Reilly 等^[6]从患 Lewis 原发肺癌的荷瘤鼠的血清和尿液中分离、纯化得到, 分子量约为 $38 \times 10^3 \sim 41 \times 10^3$ 和 $51 \times$

$10^3 \sim 53 \times 10^3$, 产生于肝脏, 是血浆中纤溶酶原的水解产物, 由纤溶酶原 N 端的 4 个环状的赖氨酸结构域 Kringle1-4 (K1-4) 组成, 体内外实验证明, 血管抑素可直接抑制内皮细胞的增生、迁移, 但其机制目前还不清楚。而 VEGF 已被证实对血管内皮细胞有强大的促分裂作用^[2]。几种动物实验模型也显示 VEGF 的表达与眼内新生血管化存在时空对应关系^[7-9]。VEGF 必须和细胞膜上的受体结合后才能发挥作用, 研究表明, VEGF 受体是酪氨酸激酶受体 (RTKs), 即受体本身具有特异的酪氨酸蛋白激酶活性, 能引发细胞内信号传递级联反应。

丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 通路为细胞外信号转导至核内的重要途径之一。目前, 真核细胞中已确定的 MAPK 通路有细胞外信号调节激酶 ERK 通路, C-jun 氨基末端激酶通路和蛋白激酶 P38 通路, 其中 ERK 通路的发现阐明了包括 VEGF 在内的生长因子如何通过受体转化为细胞效应, 在细胞的生长、发育、增生中起重要作用^[10], 生长因子受体和胞外配体结合后, 发生自身磷酸化而被激活, 成为活化的酪氨酸蛋白激酶, 该激酶通过一系列的级联反应激活 ERK1/2, 激活的 ERK1/2 可以从胞质进入核, 启动细胞的增生。

我们的结果显示: 与对照组相比, 经血管抑素处理后 1 min ERK-1 水平开始下降, 10 min 时下降最为显著, 30 min 后对照组与血管抑素组 ERK 水平没有显著区别。Aiello 等^[11]报道体外培养的视网膜血管内皮细胞能合成 VEGF, 因此, 体外培养的视网膜内皮细胞可能存在一定水平的 ERK-1 表达, 本实验证实了这一点。VEGF 刺激后, 兔视网膜微血管内皮细胞中 ERK-1 被迅速激活, 5 min 后达到高峰, VEGF 刺激组 ERK 水平较对照组提高了 210%, 30 min 后, VEGF 刺激组 ERK 水平较对照组无显著性差异, 而血管抑素能使 ERK-1 的表达量降低 11.9% (1 min 组)、17.9% (2 min 组)、38.7% (5 min 组)、49.3% (10 min 组)、27.9% (15 min 组)、1.12% (30 min 组)。综上所述, 血

表 1 Western-blotting 检测血管抑素对视网膜微血管内皮细胞 ERK-1 活性的影响 (A 值)

| 组别 | ERK-1 活性 | | | | | |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 min | 2 min | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min |
| 对照组 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 |
| 血管抑素组 | 36 840.0 ± 73.9 | 34 356.0 ± 47.0 | 25 158.0 ± 16.7 | 20 118.0 ± 29.0 | 30 996.0 ± 63.7 | 41 668.0 ± 69.4 |

表 2 Western-blotting 检测血管抑素对 VEGF 处理的视网膜微血管内皮细胞 ERK-1 活性的影响 (A 值)

| 组别 | ERK-1 活性 | | | | | |
|------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 min | 2 min | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min |
| 对照组 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 | 42 000.0 ± 0.0 |
| VEGF 组 | 69 872.4 ± 29.8 | 97 342.0 ± 144.1 | 130 200.0 ± 12.2 | 63 218.0 ± 50.8 | 49 370.0 ± 28.7 | 41 072.0 ± 21.9 |
| VEGF+血管抑素组 | 61 557.0 ± 87.7 | 79 917.0 ± 84.8 | 79 812.6 ± 35.0 | 32 051.0 ± 43.6 | 35 595.0 ± 33.2 | 40 748.0 ± 18.2 |

管抑素在体外能降低 ERK-1 的表达从而阻断 VEGF 促内皮细胞增生效应,由此推断:血管抑素抑制内皮细胞增生特性可能与 ERK-1 途径有关。

4 参考文献

- 1 Cao Y, Ji RW, Davidson D, et al. Kringle of domains human angiostatin characterization of the antiproliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, 271:29461-29467.
- 2 Pepper MS, Ferrara N, Orci L, et al. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 824-835.
- 3 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995, 9:726-735.
- 4 Bowman PD, Betz AL, Goldstein GW. Primary culture of microvascular endothelial cells from bovine retina; selective growth using fibronectin coated substrate and plasma derived serum. *In Vitro*, 1982, 18: 626-632.
- 5 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified method for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and

- pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990, 31:1738-1745.
- 6 O'Reilly MS, Holgren L, Shing Y, et al. Angiostatin; a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79: 315-328.
- 7 Pierce EA, Avery R, Foje E, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad USA*, 1995, 92: 905-909.
- 8 Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*, 1994, 145: 574-584.
- 9 Shima DT, Gougos A, Miller JW, et al. Cloning and mRNA expression of vascular, *Vis Sci*, 1996, 37:1334-1340.
- 10 Klemke RL, Cai S, Giannini AL, et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1997, 137:481-492.
- 11 Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*, 1995, 113: 1538-1544.

(收稿日期:2004-03-22)

(本文编辑:朱敏)

· 消息 ·

“全国眼科主任临床适宜技术规范应用高研班”将举办

中华医院管理学会主办的“全国眼科主任临床适宜技术规范应用高研班”于 2005 年 6 月中旬在北京举办,共 7 天,学习期满授予学员 I 类继续教育学分。

内容:颅内压增高与视乳头水肿;眼前节疾病超声生物显微镜诊断;眼眶病的治疗;眼内病变的超声诊断;超声乳化的基本手术技术;视网膜玻璃体病手术治疗;青光眼的药物治疗;黄斑疾病的手术治疗;儿童弱视;特殊类型的斜视;结膜病、感染性角膜疾病;角膜病的诊断与治疗、眼内肿瘤的治疗、眼外伤的一期、二期处理、准分子激光治疗屈光不正、感染性眼内炎、急性视网膜坏死综合征、白塞病、糖尿病性视网膜病变等。

教师:孙旭光、黎晓新、任泽钦、胡天圣、张风、陈有信、戴虹、何守志等。

报名办法:请将姓名、单位、职务、职称、地址、邮编、电话写清后寄到:北京东四西大街 46 号 5406 室中华医院管理学会科技开发部 张君收,邮编:100711。信封上请注明“眼科高研班”。电话:010-85416788/65238282,传真:010-65238282,

Email:chapx@sina.com。

中华医院管理学会

蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司招聘启事

卡尔·蔡司是一家专门从事高科技产品制造的德国公司。蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司是德国蔡司在中国的全资子公司。为了适应公司业务不断发展的需要,急需招聘眼科产品专员 1 名加盟我公司的医疗仪器部。

工作地点:广州。

工作职责:(1)协助业务经理开展各项眼科产品的推广和应用工作;(2)负责眼科产品市场开拓调查工作,了解在当前销售策略下的市场状况;(3)负责对产品市场销售潜力的调查和分析;(4)负责对同业、客户在产品方面的调研工作,综合分析后向业务经理提出产品营销的策略,包括产品功能、性能、用户、市场、定价、渠道等;(5)负责对产品在广告宣传效果的调研分析;(6)负责调查新增营销点的环境、人口、布局等事项,并撰写可行性分析报告;(7)协助做好营销广告策划工作。

职位要求:(1)大学本科以上,且必须有两年以上眼科临床工作经验(广州市户口及/或未婚优先);(2)精通英文,听说读写俱佳,熟练掌握 Microsoft 办公软件;(3)良好的人际沟通能力,具有团队合作精神,能够承受较大的工作压力,可以经常出差。我们将提供有竞争力的待遇、专业的培训及良好的职业发展机会。有意者请在 6 月 25 日以前将中英文简历、相关的学历证书和身份证复印件寄至:广州市环市东路 371-375 号,广州世界贸易中心大厦南塔 1510-11 室蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司广州办事处医疗仪器部,邮编:510095。Email:weiyi@zeiss.com.cn(注:信封上请注明“应聘”字样,勿以附件形式发送电子邮件)。

蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司