

兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体对牛视网膜血管内皮细胞粘附、移行的影响

罗静 姜德咏 唐罗生 朱小华

【摘要】 目的 探讨蛇毒制剂兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体 23C6 对血管内皮细胞粘附移行的影响。方法 以玻璃粘连蛋白 (Vn)、胶原包被培养皿,牛视网膜血管内皮细胞中加入不同浓度的兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体,孵育 60 min 后进行细胞粘附分析和移行分析。应用透射电子显微镜,对兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体干预后的牛视网膜血管内皮细胞进行凋亡检测。结果 兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体均呈剂量依赖性抑制牛视网膜血管内皮细胞对 Vn、胶原的粘附和移行。兆科降纤酶半数抑制浓度 (IC₅₀) 小于 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 而抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体的 IC₅₀ 高于 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的兆科降纤酶即可抑制 81.8% 的内皮细胞对 Vn 的粘附, 10 $\mu\text{mol/L}$ 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体则可抑制 76.3%。经两者干预后的牛视网膜血管内皮细胞内均可见典型的凋亡小体。结论 兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体能显著抑制牛视网膜血管内皮细胞对细胞外基质的粘附和移行, 其机理可能在于诱导牛视网膜血管内皮细胞凋亡。

【关键词】 血管内皮, 眼; 细胞, 培养的; 抗体; 粘附; 移行

中图分类号: R446-39 R770.43

Effects of Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb on the adhesion and immigration of bovine retinal vascular endothelial cells LUO Jing, JIANG De-yong, TANG Luo-sheng, et al. Xiangya Second Hospital, Center-South University, Changsha 410011, China

Corresponding author: LUO Jing, Email: luojing21@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb (23C6) on the adhesion and immigration of bovine retinal vascular endothelial cells. Methods The culture dishes coated with vitronectin (Vn) and collagen, assays of adhesion and immigration were performed 60 minutes after different concentration of Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb was added to the bovine retinal vascular endothelial cells. The apoptosis of bovine retinal vascular endothelial cells induced by Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb was detected by electron microscopy. Results Both Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb inhibited the adhesion and immigration of bovine retinal vascular endothelial cells in a dose-dependent manner. The inhibited concentration (IC₅₀) of Zhaoke defibrase was less than 0.05 $\mu\text{mol/L}$, while IC₅₀ of anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb was more than 2.5 $\mu\text{mol/L}$. 81.8% endothelial cells adhering to Vn were inhibited by 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Zhaoke defibrase, while 76.3% by endothelial cells adhering to Vn were inhibited by 10 $\mu\text{mol/L}$ anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb. Typical apoptosis cells were found in bovine retinal vascular endothelial cells after affected by Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb. Conclusion Both Zhaoke defibrase and anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb can significantly inhibit the adhesion and immigration of bovine retinal vascular endothelial cells to extracellular matrix, and the mechanism may lie in inducing the apoptosis of endothelial cells.

【Key words】 Vascular endothelial cell, eye; Cell culture; Antibody; Adhesion; Immigration

在四类粘附分子中,整合素(尤其是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素)的研究较为深入^[1],以它们为靶点的抗血管生成疗法^[2]为肿瘤及许多疾病的治疗提供了新方法。为了研究通过阻断 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的表达而抑制内皮细胞的粘附、移行是否能为眼内新生血管的治疗提供新的思路,我们采用富含环精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)序列的蛇毒制剂——兆科降纤酶进行研究,并将其与抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体进行了比较。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

兆科降纤酶(安徽兆峰科药业有限公司),抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体 (CD51/CD61, 23C6mAb, 美国 Pharmingen 公司),玻璃粘连蛋白(Vn, 北京晶美生物工程公司),胎牛血清(FCS)、Dulbecco 最低必需培养液(DMEM)(美国 Gibco 公司),胶原酶(美国 Amersco 公司),胰蛋白酶(美国 Merck 公司),血管内皮细胞生长因子(ECGS)、明胶(美国 Sigma 公司),甲

基噻唑基四唑(MTT, 中国华舜公司), 二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德公司), 透射电子显微镜(日本日立 H-600 型)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 培养的牛视网膜内皮细胞(BREC)采用链霉素和素-生物素化-过氧化酶法(SP)鉴定^[3-5], 1 抗采用Ⅷ因子相关抗体。采用第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 粘附分析 以 10 μg/ml Vn、胶原包被 96 孔板, 过夜风干, 紫外线照射 2 h 消毒。取培养的第 3 代 BREC, 在生长刚融合时用胰蛋白酶消化, 悬浮细胞密度为 5×10^5 个/ml, 分装入试管。根据预实验结果, 分组如下: 兆科酶降纤组(I、II、III 组)分别加入浓度为 0.01 μmol/L、0.05 μmol/L、0.1 μmol/L 的兆科酶; 抗 α_vβ₃ 整合素抗体组(I、II、III 组)分别加入浓度为 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L 的抗 α_vβ₃ 整合素抗体; 空白对照组则加入等体积的 DMEM。将试管置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中 30 min 后, 振荡各试管, 将各试管中细胞悬液接种于涂有 Vn、胶原的 96 孔板中, 每组 4 孔(0.2 ml/孔)。将 96 孔板置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育 60 min, 吸弃上清液, 用 DMEM 轻洗各孔 2 次以去除未贴壁细胞, 每孔加入含 10% 胎牛血清的 DMEM, 每孔随机选 4 个视野, 在相差显微镜下计数每个视野的细胞平均数; 抑制率(%) = (加入细胞数 - 最终细胞数) / 加入细胞数 × 100%。计数完毕, 用 MTT 法测定各孔吸光度[A, 旧称光密度(OD)]值。以上实验重复 4 次。

1.2.3 移行分析 将培养的第 3 代 BREC 接种于 12 瓶底部包被了 Vn(10 μg/ml)的培养瓶中, 待细胞生长融合后, 用细玻璃棒紧贴培养瓶底壁划线, 换液 2 次后去除漂浮的细胞, 在相差显微镜下, 可见一条无细胞的裸露区。将 12 瓶培养瓶随机分为 3 组: 兆科降纤酶组加入 0.1 μmol/L 兆科酶, 抗 α_vβ₃ 整合素抗体组加入

10 μmol/L 抗 α_vβ₃ 整合素抗体, 对照组加入等体积 DMEM, 每组 4 瓶。用含 0.1% 明胶的 DMEM 置入培养箱中继续培养 4、12、24 h, 以甲醇固定, 在光学显微镜下计数从损伤边缘迁移出的细胞数。以上实验重复 4 次。

1.2.4 透射电子显微镜检测 按 7×10^5 个/ml 细胞密度接种 6 ml 细胞悬液于预先包埋了 Vn(10 μg/ml)的培养瓶中, 兆科酶降纤组(I、II、III 组)分别加入兆科降纤酶(0.01、0.05、0.1 μmol/L), 抗 α_vβ₃ 整合素抗体组(I、II、III 组)分别加入抗 α_vβ₃ 整合素抗体(1、5、10 μmol/L), 并置于 37℃ 的培养箱中培养, 对照组则加入 DMEM 培养液。72 h 后将细胞从壁上轻推入培养液中, 以离心半径 2.5 cm, 500 r/min 离心 5 min, 以离心半径 2.5 cm, 1 000 r/min 离心 5 min。吸去上清液后沿壁轻缓注入 2.5% 戊二醛固定液固定 24 h; 挑取细胞团以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次, 以 1% 锇酸固定 1 h; 按 50%、70%、90%、100% 梯度丙酮脱水; 以环氧树脂: 丙酮-1: 1 浸泡 24 h; 纯环氧树脂包埋、修块、定位、切片, 铅铀染色; 电子显微镜下观察、照相。

1.3 统计学方法

组间和组内比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK 检验(即 *q* 检验)。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果

原代培养的 BREC 2 h 后即贴壁呈扁平梭形, 21~48 h 有细胞贴附并有细胞从微血管碎片长出、游离。早期视网膜血管内皮细胞聚集在微血管碎片周围(图 1), 到 7~10 d 时细胞融合生长(图 2)。BREC 对Ⅷ因子相关抗体染色阳性(图 3)。

2.2 兆科降纤酶和抗 α_vβ₃ 整合素抗体对培养的 BREC 粘附于 Vn 的影响



图 1 BREC 移行分析的相差显微镜像。在融合生长的 BREC 中以玻璃棒划线形成无细胞的裸露区 ×100 图 2 融合期 BREC 相差显微镜像。细胞融合 ×200 图 3 BREC 免疫组织化学染色像。对Ⅷ因子相关抗体染色阳性 DAB ×100

Fig. 1 Photograph of phase-contrast microscope of BREC migration assay. A bare area without cells in the confluent BREC which were wounded with glass stick ×100 Fig. 2 Photograph of phase-contrast microscope of confluent BREC. Confluent BREC ×200

Fig. 3 Photograph of immunohistochemical staining of BREC. Positive staining of Ⅷ relative factor DAB ×100

对照组粘附于 Vn 的细胞数目为 (60.08 ± 14.56) 个, 平均 A 值为 1.404 ± 0.382 。随着浓度的增加, 兆科降纤酶组粘附于 Vn 的细胞数目逐渐减少, I、II、III 组粘附的细胞数目分别为 (36.27 ± 12.67) 、 (24.13 ± 8.47) 、 (10.76 ± 3.43) 个, 平均 A 值分别为 1.086 ± 0.264 、 0.676 ± 0.063 、 0.201 ± 0.049 。随着浓度的增加, 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素组粘附于 Vn 的细胞数目逐渐减少, I、II、III 组粘附的细胞数目分别为 (40.01 ± 11.23) 、 (21.64 ± 9.06) 、 (14.39 ± 5.94) 个, 平均 A 值分别为 1.013 ± 0.312 、 0.801 ± 0.096 、 0.535 ± 0.064 。

3 组细胞数目总体比较, 差异有统计学意义 ($F=4.56, P<0.01$); 兆科降纤酶组内 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F=8.73, P<0.01$); 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素组内 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F=7.12, P<0.01$); 兆科降纤酶 I、II、III 组分别与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($q=15.65, 10.71, 8.44; P<0.01$); 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素 I、II、III 组分别与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($q=13.28, 9.85, 6.89; P<0.01$)。MTT 法与细胞记数法结果基本一致。

2.3 兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体对 BRECs 粘附于 Vn 及胶原的抑制率

随着浓度增高, 兆科降纤酶组对 BRECs 粘附于 Vn 的抑制率增加, I、II、III 组分别为 40.2%、60.4%、81.8%。抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素组的抑制率亦随浓度的增高而增加, I、II、III 组分别为 35.0%、64.1%、76.3%。

兆科降纤酶 I、II、III 组粘附于胶原的抑制率分别为 22.5%、29.6%、37.2%。抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素 I、II、III 组分别为 20.7%、21.3%、23.4%。

兆科降纤酶半数抑制浓度 (IC_{50}) $< 0.05 \mu\text{mol/L}$, 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素组 $IC_{50} > 2 \mu\text{mol/L}$ 。

2.4 兆科降纤酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体对培养的牛视

网膜血管内皮细胞移行的影响

在甲醇固定后 2、6、10、14 h, 对照组移行细胞数目分别为 (47.34 ± 10.12) 、 (98.56 ± 21.09) 、 (201.67 ± 31.84) 、 (214.12 ± 23.58) 个; $10 \mu\text{mol/L}$ 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体组为 (27.12 ± 6.97) 、 (56.61 ± 6.78) 、 (98.25 ± 9.68) 、 (106.63 ± 14.01) 个; $0.1 \mu\text{mol/L}$ 兆科降纤酶组为 (18.67 ± 6.34) 、 (46.32 ± 7.43) 、 (81.46 ± 9.10) 、 (78.45 ± 9.05) 个。

在甲醇固定后 2、6、10、14 h, 3 组移行细胞数目总体比较, 差异有统计学意义 ($F=7.23, 7.01, 16.78, 17.14; P<0.01$), $10 \mu\text{mol/L}$ 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体组移行细胞数目与对照组相比, 差异有统计学意义 ($q=9.56, 8.77, 18.56, 19.24; P<0.01$), $0.1 \mu\text{mol/L}$ 兆科降纤酶组移行细胞数目与对照组相比, 差异有统计学意义 ($q=8.42, 8.57, 17.19, 17.86; P<0.01$)。抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体组与兆科降纤酶组在 10 h 和 14 h 移行的细胞数目相比, 差异无统计学意义 ($q=3.76, 4.02; P>0.05$)。

2.5 透射电子显微镜检查结果

加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 兆科降纤酶和 $10 \mu\text{mol/L}$ 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体 72 h 后, 均可见内皮细胞细胞质浓缩, 细胞核染色体浓缩聚集、断裂、部分细胞出现核膜崩解, 凋亡后期的细胞出现细胞膜内陷弯曲、包裹碎裂的染色体形成凋亡小体 (图 4, 5), 对照组未见明显的凋亡细胞 (图 6)。

3 讨论

细胞粘附、移行及增生的机制为血管生成研究中的中心问题。多种整合素与其特异性配体 (包括 RGD 序列) 结合, 参与内皮细胞的迁移和体外形成毛细血管管腔, 体内则参与血管生成和血管发生^[5-9]。

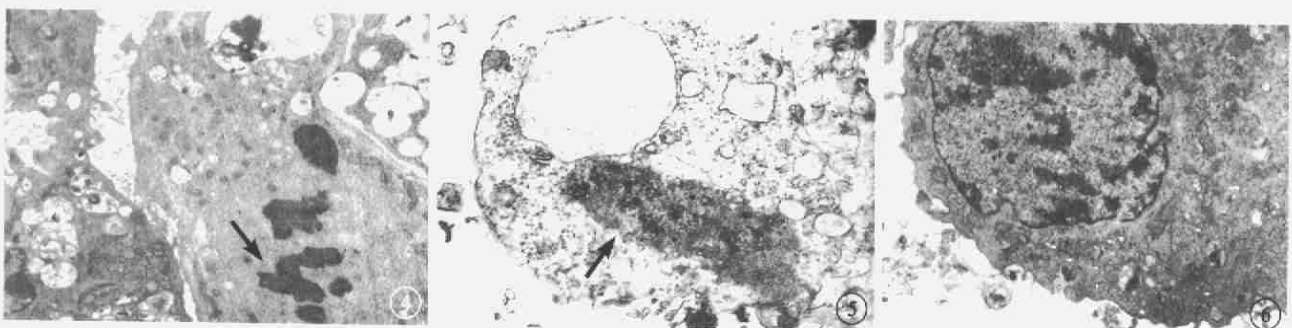


图 4 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体组 BRECs 电子显微镜像。细胞核染色体浓缩、断裂 (黑箭) $\times 8000$ 图 5 兆科降纤酶组 BRECs 电子显微镜像。染色质浓缩 (黑箭) $\times 8000$ 图 6 对照组 BRECs 电子显微镜像。未见明显的凋亡细胞 $\times 8000$
Fig. 4 Photograph of electron microscope of BRECs in anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb group. Condensed and fragmented nuclei (black arrow) $\times 8000$
Fig. 5 Photograph of electron microscope of BRECs in Zhaoko debribose group. Condensed nuclei (black arrow) $\times 8000$ Fig. 6 Photograph of electron microscope of BRECs in control group. No obvious cellular apoptosis $\times 8000$

$\alpha_v\beta_3$ 整合素 (CD51/CD61) 又称 V_n 受体, 是血管内皮细胞表达的主要的粘附分子, 它与细胞外基质配体的结合在内皮细胞生长和存活中有重要意义^[7-9]。它于生长中(而非静止中)的血管中检出^[10]。皮下注射 $\alpha_v\beta_3$ 整合素和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素的拮抗剂环 RGD 多肽能阻止新生小鼠视网膜新生血管的形成, 且对已存的血管没有影响^[11]。

兆科酶是从中国白眉腹蛇毒或尖吻腹蛇毒中提取的高纯度蛋白水解酶制剂, 组分单一, 富含 RGD 多肽。我们比较了抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体和兆科酶抑制牛视网膜血管内皮细胞对细胞外基质 (V_n 、胶原) 的粘附和移行能力。1 $\mu\text{mol/L}$ 的抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体对牛视网膜血管内皮细胞的抑制率为 35%, 0.01 U 的兆科酶的抑制率为 40%。10 $\mu\text{mol/L}$ 的抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体抑制了 76% 的内皮细胞对 V_n 的粘附, 而 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的兆科酶则达到了 82%。这些说明兆科酶可抑制牛视网膜血管内皮细胞粘附识别 $\alpha_v\beta_3$ 整合素配体如 V_n 、胶原的活性, 而且因其 $\text{IC}_{50} < 0.05 \mu\text{mol/L}$, 而后者的 $\text{IC}_{50} > 2 \mu\text{mol/L}$, 其活性似乎较抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体更强。此外, 抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体和兆科酶在内皮细胞对胶原的粘附和移行的抑制率仅为 22% 和 37%, 说明内皮细胞上可能有其它整合素的表达以识别胶原。

实验中我们发现兆科酶和抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素抗体干预后的牛视网膜血管内皮细胞中出现了典型的凋亡小体。 $\alpha_v\beta_3$ 与其配体的适当结合对维持传向内皮细胞的血管生成信号是重要的, 若缺乏这些信号, P53 的活性和细胞周期抑制物 P21waf1/cipl 的表达被诱导, 增生中的内皮细胞便会凋亡^[12]。兆科酶富含 RGD 多肽, 可与血管内皮细胞竞争与玻连蛋白的结合, 从而抑制

内皮细胞的粘附和移行、导致其凋亡。

总之, 用药物拮抗 $\alpha_v\beta_3$ 整合素代表了一类新的治疗新生血管的方法, 它们的优点在于对活动性增生的内皮细胞高度敏感而对成熟的血管组织没有明显的作用。凋亡的激发信号通过整合素的信号传递途径传入细胞, 但对于下游机制仍在进一步探索中。

4 参考文献

- 1 Chia HY, Peng HC, Huang TF. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist and inducing apoptosis. *Blood*, 1998, 92: 3268-3276.
- 2 Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 1995, 333: 1757-1763.
- 3 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified Methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmology*, 1990, 31: 1740-1744.
- 4 Schor AM, Schor SL. The isolation and culture of endothelia cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature: a comparative study with large vessel vascular cells. *Microvasc Res*, 1986; 32: 21-38.
- 5 Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, 36: 1749-1800.
- 6 Stromblad S, Cheresh DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol*, 1996, 3: 881-885.
- 7 Lusinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J*, 1994, 8: 929-938.
- 8 Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science*, 1995, 270: 1500-1502.
- 9 Shattil SJ. Function and regulation of β_3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost*, 1995, 74: 149-155.
- 10 Friedlander M, Theesfeld CL. Involvement of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in ocular neovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9764-9769.
- 11 Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, 79: 1157-1164.
- 12 Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, et al. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med*, 1996, 2: 529-533.

(收稿日期: 2003-11-13)

(本文编辑: 朱敏)

· 消息 ·

2005 年国际中西医结合眼科学术会议征文通知

为加强中西医结合的学术交流, 促进眼科学的发展和人类光明事业, 世界中医药学会联合会眼科专业委员会、中国中西医结合学会眼科专业委员会、中华中医药学会眼科分会定于 2005 年 9 月下旬在北京联合召开国际中西医结合眼科学术会议。会议期间将举行论文宣读、专题新技术及新进展讲座等学术活动, 并将邀请国内外中西医结合眼科界知名专家作专题演讲, 届时将举行眼科药品和设备展览会。现将论文及有关事项通知如下:

一、征文内容: 1. 中医、西医眼科基础及临床研究; 2. 中医、西医临床新诊疗技术在眼科的应用; 3. 眼科名老中医经验总结及师承经验交流; 4. 介绍眼科专科经验及建设成果、特色病种综合治疗方案及疗效评价标准; 5. 中医、西医眼科发展战略的探讨。

二、有关事项: 1. 凡未在全国性杂志或全国学术会议交流的论文均可投寄; 2. 论文不超过 3 000 字/篇, 文前附 400 字以内中英文摘要(包括目的、方法、结果、结论); 3. 要求字迹清楚、文责自负。请自留底稿, 恕不退稿; 4. 来稿注明作者姓名、职称、单位、邮编、通讯地址和电子邮箱, 信封左下方注明“会议征文”字样; 5. 论文经评选后另发会议通知(开会前 30 天), 未入选者不予退稿, 也不另发通知; 6. 参加会议交流者发给论文证书, 届时也欢迎未提交论文者参加本次学术大会, 参加会议者可获得国家级继续教育学分。

三、截稿日期: 2005 年 8 月 15 日。来稿请寄: 北京市石景山区鲁谷路 9 号中国中医研究院眼科医院胡悦收, 邮政编码: 100040, 联系电话: 010-68656185; 010-68688877-6615、6625。请各学会委员积极组织稿件, 以确保会议的论文质量和学术水平。

世界中医药学会联合会眼科专业委员会
中国中西医结合学会眼科专业委员会
中华中医药学会眼科学分会