

百里醌对内皮祖细胞的抑制作用

木海琦 杨 森 王怡君 陈映鹤

摘 要 **目的** 探讨百里醌对人脐血来源的内皮祖细胞血管生成的抑制作用及其可能机制。**方法** 采用贴壁选择法培养人脐血内皮祖细胞(EPCs),DiI - ac - LDL 吞噬试验及 VEGFR - 2、Ⅷ因子和 CD34 细胞免疫组化证实细胞属性;百里醌作用 EPCs 后,CCK - 8 法检测细胞增殖;Transwell 小室实验测定 EPCs 体外侵袭能力;小管形成实验检测 EPCs 体外小管形成能力;Western blotting 检测 EPCs 中 MMP - 2 和 MMP - 9 蛋白表达。**结果** 体外成功培养出人脐血内皮祖细胞,百里醌可显著抑制体外 EPCs 增殖, $IC_{50} = 51.2 \text{ nmol/L}$;百里醌可抑制体外 EPCs 侵袭和小管形成,呈浓度依赖性;百里醌可显著下调 EPCs 中 MMP - 2 和 MMP - 9 的表达。**结论** 百里醌可能通过抑制 EPCs 中 MMP - 2 和 MMP - 9 的表达从而抑制 EPCs 参与的血管生长,从而有望作为有效的血管生成抑制药物。

关键词 百里醌 血管生成 内皮祖细胞

Inhibitory Effect of Thymoquinone on Endothelial Progenitor Cells. Mu Haiqi, Yang Sen, Wang Yijun, Chen Yinghe. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the anti - angiogenic effect of thymoquinone on the endothelial progenitor cells. **Methods** The endothelial progenitor cells (EPCs) derived from human umbilical cord blood were cultured *in vitro* through adhesion selection and were differentiated into endothelial cells under the induction of special cytokines. The endothelial cell lineage was confirmed by DiI - ac - LDL up - taking and immunocytochemistry of VEGFR - 2, Ⅷ factor and CD34. After EPCs was treated with thymoquinone, the cellular proliferation was detected by cell counting kit - 8 (CCK - 8) assay. The effect of thymoquinone on the invasion of EPCs was examined by using matrigel counting. A tube formation assay was performed after EPCs were cultured with thymoquinone. Western blot was used to detect the protein expression of MMP - 2 and MMP - 9 in EPCs. **Results** The EPCs derived from human umbilical cord blood were cultured *in vitro* successfully. The proliferation of EPCs was inhibited significantly by thymoquinone with IC_{50} being 51.2 nmol/L . Thymoquinone significantly suppressed the invasion of EPCs. Furthermore, incubation of EPCs with thymoquinone decreased EPCs' tube formation capacity in a concentration - dependent manner. Western bolt assay indicated that thymoquinone down - regulates the expression of MMP - 2 and MMP - 9 proteins in EPCs. **Conclusion** Thymoquinone exerts anti - angiogenic activity in EPCs, which may be related to down - regulation of MMP - 2 and MMP - 9 protein, could be developed as an effective anti - angiogenic drug.

Key words Thymoquinone; Angiogenesis; Endothelial progenitor cells

血管生成即在原先存在的血管基础上血管内皮细胞生殖、迁移并重塑形成新的成熟血管^[1]。血管生成在恶性肿瘤生长和转移中扮演着重要的角色,通过抑制肿瘤血管生长可抑制肿瘤生长和转移,从而改善病人预后^[2]。在循环外周血中存在的干细胞 - 内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 具有自我增殖和定向归巢的特性,还可定向分化为血管内皮细胞,从而在新生血管生成中发挥了重要作用。一种从中东国家的黑种草籽油中分离出来的主要有效单

体 - 百里醌,近年来证实其具有强大的抑瘤效应,同时百里醌可抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 介导的血管生长^[3]。但百里醌对 EPCs 增殖及功能的影响却未曾报道。因此,本研究将探讨百里醌对 EPCs 生长及功能的影响,并探讨其可能机制。

材料与方法

1. 主要药品和试剂:百里醌购自美国 Sigma 公司;胎牛血清 (FBS) 和含 EDTA 胰酶购自美国 Gibco 公司;EGM - 2 培养基购自瑞士 LONZA 公司;人工重组基膜 (matrigel) 购自美国 BD 公司;一抗小鼠抗血管内皮生长因子受体 - 2 (VEGFR - 2) 单克隆抗体、兔抗Ⅷ因子多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;人纤连蛋白 (human fibronectin, HFN) 购自加拿大 Chemicon 公司;DiI - ac - LDL 购自美国 Molecular probe 公司;ABC 免疫组化检测试剂盒和 AEC 染色试剂盒购自华美生

基金项目:浙江省卫生厅资助项目 (2008A122);浙江省医学会资助项目 (2008ZYC23)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院

通讯作者:陈映鹤,电子信箱:1007882803@qq.com

物工程公司; MMP-2、MMP-9 和 β -actin 抗体购自美国 Epitomics 公司。百里醌用无水乙醇配制成 10mmol/L, -20℃ 冰箱保存, 用时用不含血清的 EGM-2 培养基稀释成所需浓度。

2. EPCs 的分离和培养: 收集 2010 年 9~12 月弃用的健康新生儿脐带血液 5 例(温州医学院附属第二医院产科), 每次采集脐血量约 30ml。采用密度梯度离心法收集脐血中的单个核细胞接种在包被有 HFN 10cm² 培养皿中。加入 3ml 含 10% 胎牛血清的 EGM-2 培养液, 24h 后更换全部培养液。此后 7 天内每天更换一半培养液, 7 天后每 3 天更换全部培养液, 同时观察细胞生长情况。等待原代细胞生长汇合后传代进行下一步实验。

3. DiI-ac-LDL 吞噬试验: 取第 2 代细胞, 吸去原培养基后经 PBS 洗涤 3 次后, DiI-ac-LDL 以 4mg/L 的终浓度加入培养液, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 4h, 吸去培养基, 用 PBS 再洗涤 3 次, 2% 多聚甲醛固定细胞 20min 后, 在荧光显微镜(OLYMPUS, BX51TF)下观察细胞荧光。吞噬 DiI-ac-LDL 的培养细胞发红色荧光。用不加 DiI-ac-LDL 的同批培养细胞作空白对照组。阴性对照组为胰腺癌细胞株 PANC-1。

4. VEGFR-2、Ⅷ因子及 CD34 免疫组化: 取第 2 代细胞接种至 24 孔板中, 培养至贴壁。经多聚甲醛固定 20min, 0.3% H₂O₂-甲醇液封闭内源性过氧化物酶 10min, PBS 浸洗后分别加 1:100 稀释的 VEGFR-2、Ⅷ因子及 CD34 抗体于 4℃ 下孵育过夜。二抗结合参照 ABC 免疫组化检测试剂盒说明书进行, 之后用 AEC 染色试剂染色, 苏木素复染, 在倒置相差显微镜下(Nikon, TS100)观察染色结果。阴性对照组为胰腺癌细胞株 PANC-1。

5. CCK-8 法检测细胞增殖: 收集处于对数生长期的 EPCs 细胞, 制成单细胞悬液, 以每孔 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板, 过夜待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度百里醌(10、20、40 和 80nmol/L)作用 12h, 同时设置空白调零组(不加细胞加入等量的 PBS), 以及阴性对照组(加入等量的溶媒)。药物作用结束前 1h, 各孔加入 0.01ml CCK-8 溶液, 继续培养 1h, 酶标仪测 A450 值, 实验重复 3 次。细胞存活率 = (实验组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) / (对照组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) × 100%

6. 侵袭实验: 在 24 孔 Transwell 小室(Corning 公司, 美国)滤膜上方涂敷人工基膜(Matrigel)50 μ l, 放置于 37℃ 培养箱孵育 5h, 使其形成凝胶状。计数 2×10^4 个细胞加入 100 μ l 不含血清的 EGM-2 培养基中至入上室, 分别加入不同浓度百里醌(10、20、40 和 80nmol/L), 以溶媒作为对照组。下层培养孔加 500 μ l 含 20% 胎牛血清的 EGM-2 培养基, 每组设 5 个复孔。培养 12h 后取出滤膜, 小心用棉球棒擦掉小室内表面未穿过膜的细胞, 甲醛固定后结晶紫染色, 至倒置显微镜下计数膜背面的细胞数, 随机计数 5 个视野, 计算平均值。每组重复 3 次。

7. 小管形成实验: 4℃ 下于 96 孔板中每孔加入 100 μ l Matrigel, 铺平后置 37℃ 培养箱内固定 5h。以每孔 4×10^4 细胞接种于培养板, 加入不同浓度百里醌(10、20、40 和 80nmol/L), 以溶媒为对照组, 每组设 5 个复孔。37℃ 培养箱培养 12h 后, 倒置显微镜下观察并拍照, 计数不同浓度百里醌作用后 EPCs 小管生成数。

8. Western blotting 检测 EPCs 中 MMP-2 和 MMP-9 的表达: 收集处于对数生长期的 EPCs 细胞, 不同浓度百里醌(10nmol/L, 20nmol/L)作用 EPCs 细胞 12h 后, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取上清液, 测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品(20 微克/孔), 8% SDS-PAGE 电泳, 半干转膜仪转膜, 5% 脱脂奶粉封闭后滴加兔抗人 MMP-2/9 抗体为第一抗体, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, ECL 显色, X 线胶片曝光。

9. 统计学方法: 实验所得计量数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 分析, 以 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

结 果

1. DiI-ac-LDL 摄取特性: 荧光显微镜下观察到约 $(85.6 \pm 4.9)\%$ 的细胞 DiI-ac-LDL 吞噬试验为阳性, 此细胞为正在分化的 EPCs^[4]。胰腺癌细胞吞噬试验阴性, 见图 1。

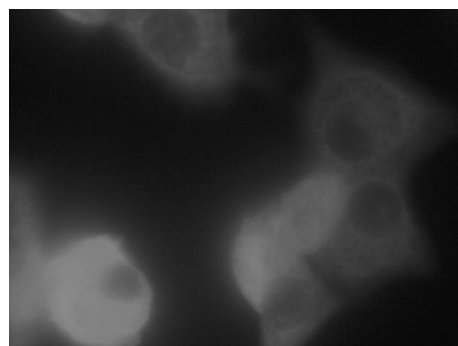


图 1 内皮祖细胞 DiI-ac-LDL 吞噬试验($\times 400$)

2. VEGFR-2、Ⅷ因子和 CD34 免疫组化结果: 用免疫细胞染色法对细胞染色后发现细胞表面相关抗原 VEGFR-2、Ⅷ因子和 CD34 表达均为阳性, 此类细胞被认为是正在分化的 EPCs(图 2)。胰腺癌细胞各抗原表达均为阴性。

3. 百里醌对体外 EPCs 增殖的影响: 百里醌可显著抑制 EPCs 增殖, 呈浓度依赖性。EPCs 经不同浓度百里醌(10、20、40 和 80nmol/L)作用 12h 后, 细胞存活率分别为 93.4%、76.3%、64.5% 和 42.3%(图 3); 百里醌浓度高于 10nmol/L 开始显著抑制 EPCs 增殖, 有统计学差异($P < 0.05$); 百里醌作用 EPCs 细胞 12h 后 IC₅₀ 为 51.2nmol/L。

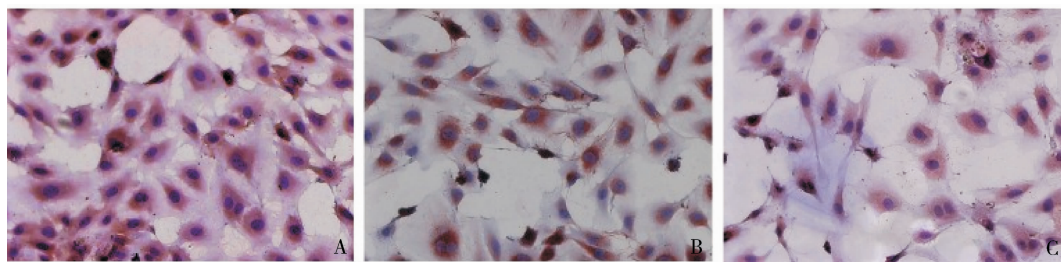


图2 EPCs经VEGFR-2、Ⅷ因子和CD34细胞免疫组化染色后倒置显微镜下观察(×200)

A. VEGFR-2; B. Ⅷ; C. CD34

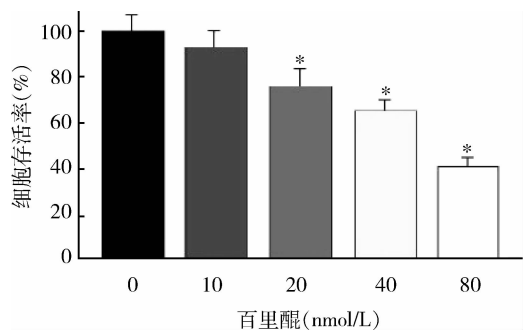


图3 CCK-8法检测不同浓度百里醌对EPCs增殖的影响

与对照组相比较, * $P < 0.05$

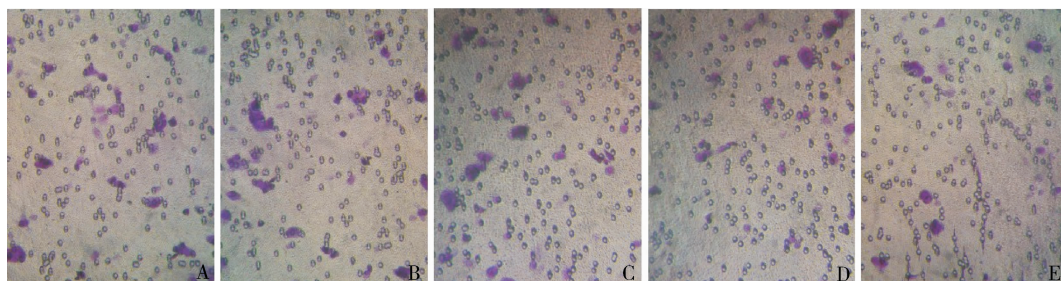


图4 不同浓度百里醌作用EPCs 12h后,EPCs穿过Matrigel后,结晶紫染色,倒置显微镜下观察(×200)

A. 对照组; B. 百里醌(10nmol/L); C. 百里醌(20nmol/L); D. 百里醌(40nmol/L); E. 百里醌(80nmol/L)

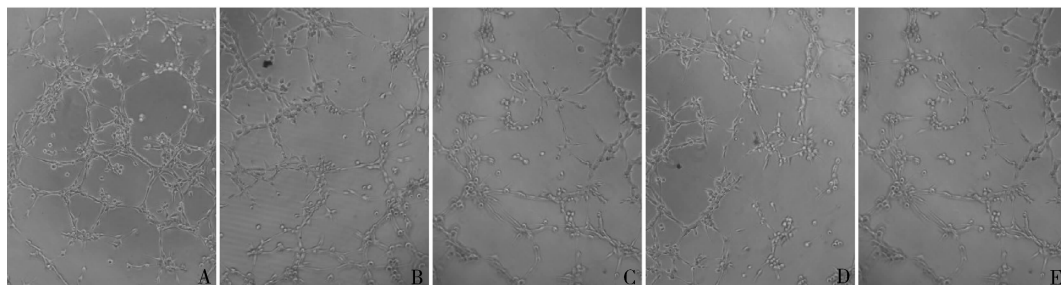


图5 倒置显微镜下观察不同浓度百里醌作用后对EPCs小管形成的影响(×200)

A. 对照组; B. 百里醌(10nmol/L); C. 百里醌(20nmol/L); D. 百里醌(40nmol/L); E. 百里醌(80nmol/L)

完整。不同浓度百里醌(10、20、40和80nmol/L)作用EPCs 12h后,倒置显微镜下观察,每高倍镜(200×)下小管生成数为 37.8 ± 5.8 、 23.4 ± 4.9 、

4. 百里醌对体外EPCs侵袭的抑制作用:百里醌对体外EPCs侵袭有抑制作用,呈浓度依赖性(图4)。百里醌(10、20、40和80nmol/L)处理EPCs 12h后每高倍镜(×200)下侵袭细胞数分别为 31.1 ± 3.8 、 18.1 ± 2.6 和 15.3 ± 2.3 ,与对照组(34.3 ± 5.3)相比较,10nmol/L百里醌不能显著抑制EPCs的侵袭行为($P > 0.05$);而百里醌(20~80nmol/L)可显著抑制EPCs体外侵袭,有统计学意义($P < 0.05$)。

5. 百里醌对EPCs体外血管生成的抑制作用:百里醌作用EPCs后,不仅小管数目减少,而且管腔不

19.1 ± 3.4 和 17.3 ± 3.8 ,与对照组(51.6 ± 7.8)相比较,均有统计学意义($P < 0.05$)。

6. 百里醌对EPCs中MMP-2和MMP-9表达

的影响: Western blotting 结果表明, 低浓度 (10nmol/L) 百里醌对 EPCs 中 MMP-2 蛋白表达无明显影响, 但高浓度 (20nmol/L) 的百里醌开始显著下调 MMP-2 在 EPCs 中的表达; 百里醌 (10 ~ 20nmol/L) 可明显抑制 EPCs 中 MMP-9 的表达, 以 20nmol/L 百里醌抑制作用最明显 (图 6)。

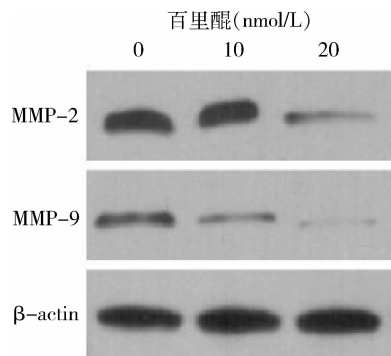


图 6 不同浓度的百里醌作用 EPCs 12h 后, 对 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响, 以 β -actin 为内参

讨 论

新生血管形成是由一系列步骤组成的生物学过程, 包括内皮细胞增殖和迁移、血管管腔的形成与存活^[4,5]。在健康成人中, 内皮细胞一般处于休眠状态, 新生血管形成在伤口愈合、炎症反应和月经等生理过程中被严格限制着。而在肿瘤侵袭和转移中, 新生血管形成扮演着极为重要的角色, 一旦肿瘤拥有诱导血管生长的能力, 肿瘤生长就变得极富有侵犯性, 从而为肿瘤侵袭和转移提供便利和可能。因此, 抑制内皮细胞增殖和功能体现, 可有效抑制肿瘤中血管新生。有研究表明百里醌可有效抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 增殖及其功能, 从而在其抑制前列腺癌生长中发挥了一定的作用, 且没有细胞毒性, 表明百里醌具有一定的抗血管生成的作用^[3,6]。

EPCs 是一群能增殖分化为成熟血管内皮细胞, 并参与内皮损伤修复和出生后血管新生的前体细胞。内皮损伤后的修复过程除了相邻成熟内皮细胞延展修复外, 还有一部分是通过外周血中的 EPCs 分化为成熟内皮细胞完成的^[7]; 同时在肿瘤血管新生过程中, EPCs 从骨髓等组织中被动员至外周血液中, 进而增殖和分化为成熟内皮细胞, 从而在肿瘤生长的早期起到至关重要的作用, 表明 EPCs 在血管形成的发生和发展中扮演了重要角色^[8]。在本研究中, 笔者成功培养出人脐血内皮祖细胞, 并经 DiI-ac-LDL 吞噬试验证实细胞的内皮属性, 而 VEGFR-2、VIII

因子和 CD34 细胞免疫组化也进一步证实了细胞的内皮属性。同时体外实验表明百里醌可显著抑制 EPCs 增殖, 初步表明百里醌有抑制 EPCs 参与的血管生成的作用, 与文献报道相近^[3]。

恶性肿瘤可动员包括 EPCs 在内的内皮细胞至血管新生部位, 这是一个多因素、多步骤的生物学过程。在动员过程中, EPCs 穿过细胞外基质至血管新生灶是动员过程的重要环节。EPCs 侵袭的发生有赖于 EPCs 迁移能力的增强、不同时相细胞的黏附和解黏附、多种蛋白水解酶的表达及活性的增加从而降解细胞外基 (ECM)^[9]。而金属蛋白酶家族 (MMPs) 在促进细胞迁移和细胞外基质降解等生物学行为过程中发挥了关键作用, 其中 MMP-2 在降解细胞外基质蛋白中扮演着重要角色, 从而在细胞侵袭和转移中发挥重要作用^[10]。另外, 在新生血管形成过程中, MMP-2 在调控内皮细胞管腔样结构形成过程中也发挥了一定作用^[11]。因此, 抑制 MMP-2 可显著抑制内皮细胞侵袭和血管形成^[12]。在本研究中, 高浓度百里醌可显著抑制 EPCs 中 MMP-2 的表达, 同时百里醌还能显著抑制 EPCs 体外侵袭和小管形成, 表明 MMP-2 在百里醌抑制 EPCs 功能体现中发挥了一定作用。而 MMPs 家族另一重要成员 MMP-9 可特异性降解被称为细胞外基质脊椎的 IV 型胶原, 从而在促进细胞侵袭和迁移中起到举足轻重的作用; 而抑制 MMP-9 可显著抑制肿瘤侵袭和转移^[13]; 与此同时, MMP-9 在人肝细胞癌中的表达水平还和肿瘤血管密度呈正相关, MMP-9 的抑制剂还可显著抑制内皮细胞增殖和迁移, 而抑制 MMP-9 可显著抑制肿瘤诱导血管生长^[14-16]。本研究中, 笔者也观察到低浓度百里醌即可明显下调 EPCs 中 MMP-9 的表达水平, 与本研究观察到的低浓度百里醌可显著抑制 EPCs 侵袭和小管形成的实验结果相符, 从而表明百里醌可通过下调 EPCs 中 MMP-9 的水平从而抑制 EPCs 的功能体现, 而百里醌有望作为新型的 MMPs, 特别是 MMP-9 的抑制剂应用于临床抗肿瘤治疗。当今, 已有一系列 MMPs 的抑制剂作为抗癌和抗肿瘤的治疗措施应用到临床试验, 并且收到满意的疗效^[17]。因此, 开发新颖低毒而更有效的 MMPs 抑制剂联合传统化疗药物有可能成为治疗恶性肿瘤的新趋势。

综上所述, 本次实验结果表明百里醌可显著抑制体外 EPCs 增殖、侵袭及小管形成, 同时百里醌还能抑制 MMP-2 和 MMP-9 在 EPCs 中的表达, 因此,

笔者推断百里酞可能通过其下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达从而对 EPCs 增殖和功能产生抑制作用。而为百里酞作为一种新型血管生成抑制剂应用于临床提供了一定的实验参考。

参考文献

- Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(7):251-256
- Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21):1182-1186
- Yi T, Cho SG, Yi Z, *et al.* Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7):1789-1796
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res, 2001, 89(1):E1-E7
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(7):251-256
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2009, 69(13):5575-5583
- Suzuki T, Nishida M, Futami S, *et al.* Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim [J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2):487-492
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick A S, *et al.* Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization [J]. Genes Dev, 2007, 21(12):1546-1558
- Bohle A S, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis [J]. Langenbecks Arch Surg, 1999, 384(2):133-140
- Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, *et al.* Matrix metalloproteinases - 2 and - 9 are expressed in human neuroblastoma; contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis [J]. Cancer Res, 1988, 58(10):2209-2216
- Ahmed MM, Mohammed SH. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in situ mRNA expression in colorectal tumors from Iraqi patients [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(1):7-14
- Guo J, Xiao B, Liu Q, *et al.* Suppression of C - myc expression associates with anti - proliferation of aloe - emodin on gastric cancer cells [J]. Cancer Invest, 2008, 26(4):369-374
- Ho LL, Chen WJ, Lin - Shiau SY, *et al.* Penta - O - galloyl - beta - Dglucose inhibits the invasion of mouse melanoma by suppressing metalloproteinase - 9 through down - regulation of activator protein - 1 [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 453(2-3):149-158
- Sun MH, Han XC, Jia MK, *et al.* Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase - 9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(38):5931-5937
- Yao JS, Zhai W, Young WL, *et al.* Interleukin - 6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration; the role for KDR and MMP - 9 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4):1396-1404
- Rao J S, Gondi C, Chetty C, *et al.* Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus - mediated transfer of antisense uPAR and MMP - 9 in non - small cell lung cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(9):1399-1408
- Watanabe K, Yoshida D, Noha M, *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase - 2 and - 9 mediated invasiveness by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, BE16627B [J]. J Neurooncol, 2001, 52(1):1-9

(收稿:2011-03-12)

(修回:2011-03-14)

人源化乙肝表面抗体重链克隆、表达及免疫学特性初步鉴定

王晔恺 周吉航 周世权 曾 芳 黄燕燕 刘晓光

摘 要 目的 建立一种利用单细胞分选技术克隆人源化乙肝表面抗体重链的方法。**方法** 从乙肝疫苗接种志愿者外周血中分选得到单个抗体分泌细胞,单细胞 RT-PCR 筛选 20 个单菌落,挑选其中有 IgG 保守区域的克隆全长,并将 IgG(H)基因全长克隆到 pEGFP-N1 载体,转染 COS-7 细胞,取上清液进行 Western blotting 验证,并采用 Batty 饱和法测定亲和力和常数。**结果** 筛选得到 IgG(H)能与 HBsAg 结合,且 K_a 值达到 2.39×10^9 L/mol。**结论** 利用单细胞分选克隆技术获得的抗体重链亲和

基金项目:浙江省科技厅分析测试资助项目(2009F70067)

作者单位:316004 浙江省舟山医院细胞分子生物学实验室

通讯作者:刘晓光,电子信箱:lxg2004@gmail.com