

# 玻璃海鞘多肽的分离纯化及其抗血管生成活性

董平原<sup>1,2</sup>, 王 征<sup>1,2</sup>, 魏 宁<sup>1</sup>, 牛荣丽<sup>1</sup>, 林秀坤<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 利用丙酮沉淀, Sephadex G25 柱层析, Superdex75 快速蛋白纯化系统(FPLC)等分离手段, 采用活性追踪的方法, 从玻璃海鞘(*Coina intestinalis*)中分离纯化出抗血管生成多肽 PCI, 据保留时间计算其分子质量为 1.8 ku。PCI 在 50~90℃ 范围内有良好的热稳定性, 多肽水解酶处理可引起活性丧失。四甲基偶氮唑盐比色(MTT)检测表明其对入脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)具有强烈的抑制作用, IC<sub>50</sub> 为 7.5 mg/L。在斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎体内实验中进一步表明, PCI 在 40 mg/L 的浓度下作用 12 h, 斑马鱼胚胎新生血管生成受到显著抑制, 肠下静脉血管长度为正常组的 30%, 斑马鱼胚胎血管生成率为正常组的 45%。

**关键词:** 玻璃海鞘(*Coina intestinalis*); 多肽; 抗血管生成; 斑马鱼血管生成模型

中图分类号: TQ02

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)08-0048-05

恶性肿瘤是危害人类健康的主要疾病, 目前临床上常用的抗肿瘤药物仍以细胞毒类药物为主, 包括常见的 5-氟尿嘧啶、卡铂、阿霉素、紫杉醇等<sup>[1]</sup>。这类药物对肿瘤虽然具有一定的疗效, 但存在选择性差、毒副作用大等缺点。新生血管生成是肿瘤生长、发展的必经之路, 且与实体瘤的发生、转移有着密切的关系, 许多肿瘤仅在新的血管生成之后才出现临床症状, 抑制肿瘤新生血管生成具有特异性高、疗效好、不易产生耐药性以及毒副作用低等特点, 因此抑制血管生成可望成为治疗癌症的一个突破点。近年来国际上已报道约 500 个新生血管生成抑制剂, 目前已有 30~40 个新生血管生成抑制剂正在进行临床前或临床试验阶段, 近 10 种已进入 II/III 期临床研究并取得了令人鼓舞的实验结果。其中, 蛋白多肽类药物 Avastin 和 Endostatin 已于 2004 年、2006 年分别在外国和国内上市<sup>[2]</sup>。

海洋生物中含有高达数万种活性多肽, 海洋生物多肽的潜在应用价值使得各国科学家积极进行相关研究, 近年来以发现了大量的具有抗癌活性的多肽, 包括海绵多肽、海葵多肽、海兔多肽、芋螺多肽<sup>[3, 4]</sup>。海鞘属于脊索动物门(Chordates), 尾索动物亚门(Urochordata), 海鞘纲(Ascidiacea)。自从 1980 年 Ireland 等从 *Lissoclinum patella* 中发现一个具有抗肿瘤活性的环肽 Ulithiacyclamide 以来, 相继从海鞘中发现了具有新颖结构和生物学功能的化合物<sup>[5]</sup>, 由膜海鞘(*Trididemnum solidum*)中分离的 Didemnins B 是第一种进入临床试验的海洋天然产物。ET-743 是从 *Ecteinascidia turbinata* 中分离提取的, 是一种 DNA 小沟特异性结合的抗癌药物, 现已进入 II 期临床试验<sup>[6]</sup>, 并取得了良好的抗肿瘤效果。

玻璃海鞘(*Coina intestinalis*)属于内性海鞘目

(Enterogona)、玻璃海鞘科(Cionidae), 因其进化上的独特地位常作为研究神经发育、免疫系统进化的材料, 并于 2002 年破译其基因组<sup>[6]</sup>。但关于其抗血管生成活性多肽的分离和活性研究未见报道。本文利用多种分离纯化手段采用活性追踪的方法首次从玻璃海鞘中分离得到具有抗新生血管生成作用的多肽, 并对其抗血管生成活性做了初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

玻璃海鞘由烟台水产研究所提供; 噻唑蓝(MTT, Sigma); 硝基酚磷酸氢二钠、diethanolamine (Pierce); 细胞培养瓶、96 孔细胞培养板(Costar); Sephadex G25、Superdex75、AKTA-FPLC system (GE); 酶标仪(Bio Rad); 立体显微镜(Zeiss, Jena); 冷冻干燥仪(FDU-1200, Eyela); 二氧化碳培养箱(Tabal Espec); 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞培养及斑马鱼养殖

人脐静脉内皮细胞(HUVEC, CRL-2480)购于 ATCC, 该细胞培养于含有 20% 胎牛血清(Invitrogen)的 DMEM/F12(Invitrogen)培养基中, 并添加 2 mmol/L 的谷胺酰胺(Sigma), 100 IU/mL 青霉素(Sigma), 100 IU/mL 链霉素(Sigma), 10 USP/mL 肝素钠(Sigma), 30 mg/L 内皮细胞生长因子(Roche), 于

收稿日期: 2007-04-13; 修回日期: 2007-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472043)

作者简介: 董平原(1980), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向: 生化制药与分子药理学, E-mail: pydong@163.com; 林秀坤, 通讯作者, 研究员, 博士, E-mail: linxiukun@yahoo.com

二氧化碳培养箱(37℃、5% CO<sub>2</sub>)培养。

斑马鱼(*Danio rerio*)饲养于本实验室,培养条件参照斑马鱼培养手册<sup>[7]</sup>,采集自然性成熟并配对的斑马鱼所产胚胎,培养于27℃过滤纯水中,并根据形态学来鉴定其发育阶段。

### 1.3 玻璃海鞘抗血管生成多肽的分离纯化

#### 1.3.1 玻璃海鞘抗血管生成多肽的提取

除特别说明外,整个操作在4℃进行。将新鲜玻璃海鞘洗净,粉碎,匀浆,70℃加热20 min,12 000 r/min离心30 min,上清液加入3倍体积的预冷丙酮静置过夜,离心,上清液在29℃旋转蒸发去除丙酮,冷冻干燥,用磷酸盐缓冲液(PBS,0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.15 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,pH7.2)复溶,得玻璃海鞘多肽提取液。

#### 1.3.2 玻璃海鞘抗血管生成多肽的纯化

玻璃海鞘多肽提取液经Sephadex G 25(16 mm × 800 mm)柱层析,纯水洗脱(流速为0.4 mL/min),紫外检测器280 nm波长下检测,收集各蛋白洗脱峰,冷冻干燥后进行体外HUVECs增殖活性检测。将所得活性组分经FPLC快速蛋白纯化系统进一步纯化,选用填料为Superdex 75,纯水洗脱(流速为1 mL/min),紫外检测器280 nm波长下检测,收集蛋白洗脱峰。冷冻干燥后进行体外HUVECs增殖活性检测,得到活性蛋白PCI。

### 1.4 人脐静脉内皮细胞增殖抑制实验

取对数生长期的HUVECs配成细胞悬液(1 × 10<sup>4</sup>),接种于96孔培养板,每孔180 μL,置于37℃5%的二氧化碳培养箱中培养。培养24 h后加入20 μL不同浓度的PCI继续培养48 h,每孔加50 μL 5%的MTT溶液,37℃孵育4 h,吸出培养液加入150 μL二甲基亚砜(DMSO),轻轻震荡30 min后于570 nm下测定吸光值。按下列公式计算抑制率:抑制率 = (1 - A<sub>给药组</sub>/A<sub>对照组</sub>) × 100%。A<sub>给药组</sub>、A<sub>对照组</sub>分别表示给药组和对照组的光密度值。

### 1.5 热稳定性实验

将PCI溶于不完全培养基,取部分分别于50,70,90,100℃水浴加热20 min,冷却至室温后,过滤除菌,检测对HUVECs的增殖抑制活性,方法同1.4。以未经热处理的PCI为对照,其抑制活性定为100%,按各处理组抑制率大小,换算成活性百分比。

### 1.6 斑马鱼胚胎血管染色

采集健康的斑马鱼胚胎,于24孔培养板中分组(20个/孔),置胎水中(过滤纯水)中于27℃培养箱培养,在斑马鱼的胚胎发育的第20小时,用1 g/L的胰蛋白酶室温作用5 min消化去除卵膜,在胚胎发育的第24小时加入不同浓度的PCI多肽溶液(浓度分别为0,20,40,60 g/L),继续作用12 h后,更换

新的胎水。染色方法参考文献[8],并作简单的改进,具体方案如下。发育到72 hpf的胚胎用4%的多聚甲醛固2 h,用PBS(NaCl 8 g,KCl 0.2 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 1.44 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g,加蒸馏水到1 000 mL,pH7.0)洗两遍,依次浸于甲醇和PBT缓冲液(0.1% Triton X-100,0.05% BSA的PBS溶液)的混合液中渗透脱水(甲醇质量分数梯度为25%,50%,75%,100%),再按相反的梯度浸润,每次15 min,接着将胚胎置于NTMT缓冲液中,使胚胎平衡后染色,每毫升NTMT中加入375 μg NBT和200 μg X-phosphate,开始染色,在立体显微镜下观察确定最佳染色状态,即使所有斑马鱼胚胎血管都被作上了标记,加入PBST,终止染色反应,将胚胎浸入含5%甲醛胺和10%双氧水的PBS溶液中30 min,以除去色素细胞的内源黑色素并使已染色的血管可见,并在立体显微镜下观察胚胎血管中血细胞流动情况,采集图像并计算肠下静脉(SIV)的长度。

### 1.7 碱性磷酸酶染色分析

胚胎用预冷的70%的酒精处理10 min,再用100%的酒精脱水30 min,然后用diethanolamine(Pierce)缓冲液洗3次,每次10 min,后常温下浸于1 000 μL含0.5 g/L硝基酚磷酸氢二钠溶液中处理30 min,最后加入500 μL的2 mol/L NaOH终止反应,并在405 nm波长下测量吸光值,血管生长抑制率(R)按照下面的公式计算

$$R = 1 - (A_{\text{给药组}} - A_{\text{正常组1}}) / (A_{\text{正常组3}} - A_{\text{1d}}) \times 100\%^{[9]}$$

## 2 结果

### 2.1 玻璃海鞘抗血管生成多肽的分离纯化

玻璃海鞘多肽提取液Sephadex G 25柱层析图谱如图1所示。共得到7个组分,HUVECs增殖实验表明抗血管生成活性组分主要集中在峰3部分,对HUVECs的IC<sub>50</sub>结果是52 mg/L,并且呈剂量依赖性。

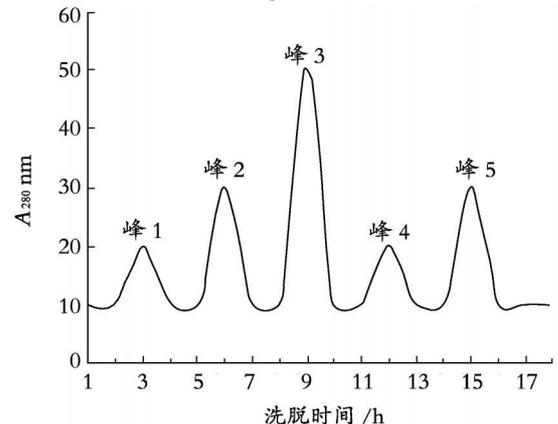


图1 玻璃海鞘多肽提取液Sephadex G 25层析图谱  
Fig. 1 Elution pattern of extraction of *Coina intestinalis* through Sephadex G 25

活性组分再经 Superdex 75 快速蛋白液相柱层析, 分离效果见图 2, 共获得 3 个组分, 细胞增殖实验表明组分 2 对 HUVECs 有明显抑制作用, 根据保留时间确定其分子质量约为 1.8 ku (peptide from *Coina intestinalis*, PCI), 对 HUVEC 细胞有较强的增殖抑制作用, IC<sub>50</sub> 为 8 mg/L。并且随着作用浓度的增加抑制作用增强, 呈剂量依赖关系, 见图 3。

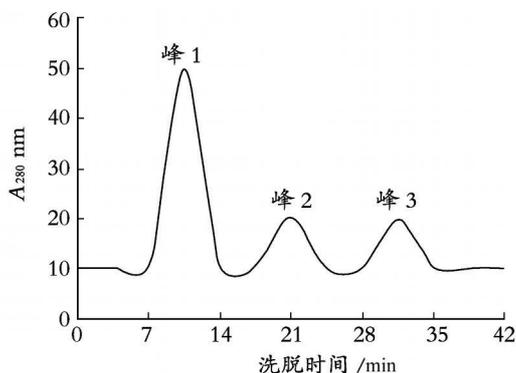


图 2 活性组分的 Superdex 75 快速蛋白液相柱层析

Fig. 2 Purification of PCI by Superdex 75 FPLC chromatography

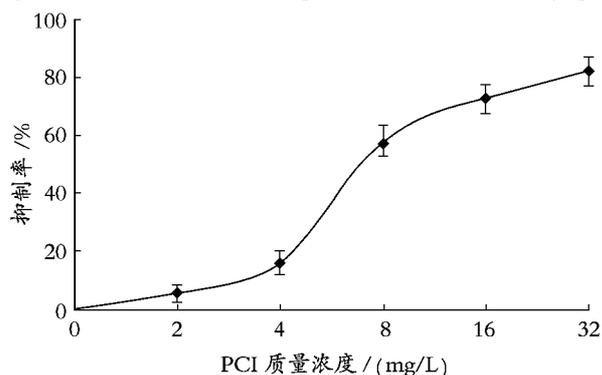


图 3 人脐静脉内皮细胞增殖抑制实验

Fig. 3 Inhibiting effects of PCI on HUVECs proliferation assay

## 2.2 PCI 的性质研究

PCI 的热稳定性试验结果见图 4。由图可以看

出, 在 50, 70, 90 °C 热处理 20 min, 可保持近 100%, 95%, 86% 的活性, 在 100 °C 处理 20 min, 活性为原有活性的 46%, 这一结果表明获得的 PCI 具有较强的热稳定性。此外作者以氨肽酶处理 PCI, 发现其抗血管生成活性全部丧失, 这说明 PCI 为小分子多肽类。

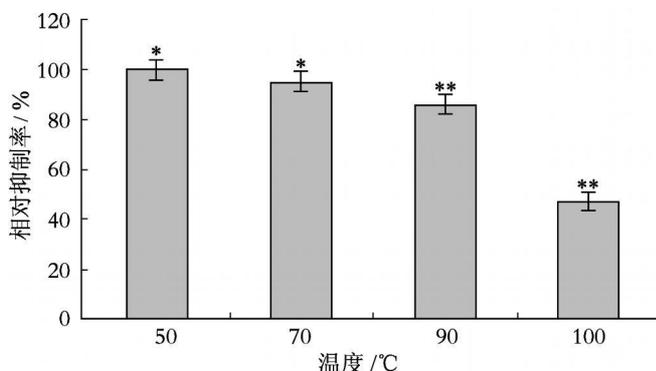


图 4 温度对 PCI 的 HUVECs 增殖抑制活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the inhibitory activity of PCI  
\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

## 2.3 斑马鱼血管生成染色试验

体外内皮细胞增殖实验表明 PCI 对血管内皮细胞增殖有较强的抑制效果。作者采用斑马鱼血管生成模型进一步研究其在整体水平上的抗血管生成作用。由图 3 可看出, 不同浓度的 PCI 作用斑马鱼胚胎 12 h, 可以抑制斑马鱼胚胎血管的生成, 并呈明显的剂量依赖性。随着 PCI 浓度的增大, 血管受到的抑制作用增强, 20 mg/L 作用下, 镜下能见到血液流动速度变慢 (图 5A II), 此时肠下静脉长度为正常对照组 (图 5A I) 血管长度的 50% (图 5B)。质量浓度为 40 mg/L 时 (图 5A III), 血液流动速度几近停止, 肠下静脉血管长度为正常组的 30% (图 5B)。质量浓度为 60 mg/L 时, 肠下静脉的生长受到全部抑制 (图 5A IV), 而镜下测量计算此时肠下静脉长度为正常组的 12% (图 5B)。

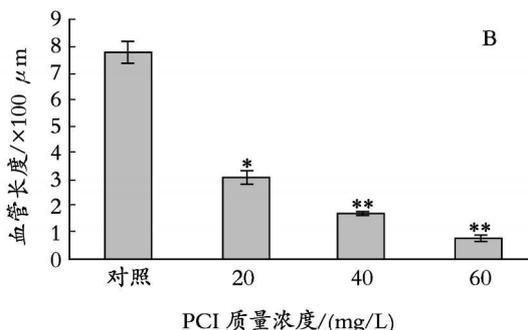
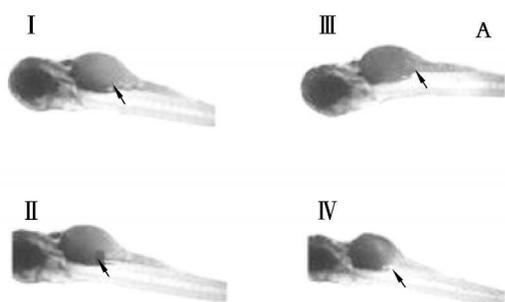


图 5 PCI 对斑马鱼血管胚胎的抗血管生成作用

Fig. 5 Antiangiogenesis activity of PCI using zebrafish embryo model

A. 斑马鱼染色后的镜下观察; B. 斑马鱼染色后肠下静脉长度测量

A. Lateral view of alkaline phosphatase stained embryos; B. Quantification of SIVs length

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

## 2.4 斑马鱼胚胎的碱性磷酸酶染色分析

利用碱性磷酸酶染色来分析 PCI 对胚胎包括心、肝、肾等各组织内的血管生成情况,发现 PCI 对各组织内的血管生成均有抑制作用,PCI 质量浓度为 20 mg/L 时血管生成率为正常组的 82%,40 mg/L 时血管生成率为正常组的 45%,60 mg/L 时血管生成率为正常组的 23%,呈剂量依赖关系,与镜下观察分析斑马鱼胚胎肠下静脉长度的结果基本是一致的,结果见图 6。

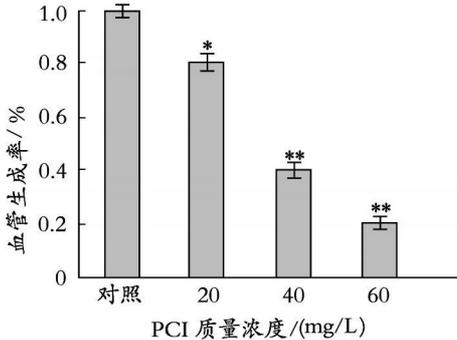


图 6 PCI 对斑马鱼胚胎血管生成的碱性磷酸酶染色分析

Fig. 6 EAP assay of PCI antiangiogenesis activity to zebra fish embryos

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

海鞘中已发现多种有抗肿瘤作用的多肽包括环肽和线性肽<sup>[3,4]</sup>,显示出强烈的抗肿瘤活性,但多以细胞毒作用为主,如 ET743 是结合 DNA 的小沟部位引起 DNA 的断裂来起到抗肿瘤作用的,但有关玻璃海鞘中的活性成分的研究尚未见报道。本实验利用丙酮沉淀后结合 Sephadex G25, Superdex 75 过滤层析等多种分离手段获得一种新型的多肽 PCI,据保留时间计算其分子量为 1.8 ku,理化性质研究表明该多肽具有较好的热稳定性,对多肽水解酶敏感。体外脐静脉内皮细胞增殖实验,斑马鱼胚胎体内血管生成活性分析均表明其有显著的抗血管生成活性,并呈剂量依赖关系。肿瘤的生长及转移依赖肿瘤血管的生成,抑制肿瘤新生血管的生成是一种有效的肿瘤治疗方法<sup>[10]</sup>。而肿瘤新生血管生成过程常依赖于血管内皮细胞的增殖、移行、黏附和侵入细胞

外基质等几个阶段,在这一过程中各种生长因子如 FGF, VEGF, flk1 等起调节作用。作者的研究表明 PCI 能显著抑制内皮细胞的增殖,并呈剂量依赖关系,提示 PCI 的抗血管生成机制可能是抑制内皮细胞的增殖从而影响肿瘤新生血管的生成。其对血管生成过程中相关细胞因子的作用需要进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 孙燕. 肿瘤药物治疗百年回顾与展望 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(11): 701-703.
- [2] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy: endostatin and its mechanisms of action [J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(5): 594-607.
- [3] 赵锐, 顾谦群, 管华诗. 海洋活性肽的研究进展 [J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 14-17.
- [4] Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures [J]. *Journal of Chromatography*, 2004, 803(1): 41-53.
- [5] Minuzzo M, Ceribelli M. Selective effects of the anti-cancer drug Yondelis (ET-743) on cell cycle promoters [J]. *Molecular Pharmacology*, 2005, 68(5): 1496-1503.
- [6] Paramvir D, Yutaka S, Robert K, et al. Campbell the draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2157-2167.
- [7] Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000.
- [8] Serbedzija G N, Flynn E, Willett C E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening [J]. *Angiogenesis*, 1999, 3(4): 353-359.
- [9] Parg C, Seng W L, Semino C, et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening [J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2002, 1(1): 41-48.
- [10] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.

# Identification of a novel peptide from *Coina intestinalis* with potent antiangiogenetic activity

DONG Ping-yuan<sup>1,2</sup>, WANG Zheng<sup>1,2</sup>, WEI Ning<sup>1</sup>, NIU Rong-li<sup>1</sup>, LIN Xi-kun<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Apr., 13, 2007

**Key words:** *Coina intestinalis*; polypeptides; antiangiogenesis; zebrafish angiogenesis model

**Abstract:** An antiangiogenesis peptide (PCI) was isolated from the tunicate, *Coina intestinalis*. The tunicate tissue was homogenized and extracted with 70% acetone solution following by gel chromatography of Sephadex G25. After FPLC purification on Superdex 75, a peptide with molecular weight 1.8 ku was obtained. Physiological study confirmed that the peptide is thermo-stable in the range of 50~90°C. In contrast, the activity of PCI could be destroyed by treatment with amino peptidase. Cell proliferation assay, using MTT method, showed that the concentrations of PCI required for 50% growth inhibition of HUVECs was 7.5 mg/L. In vivo experiment revealed that PCI inhibited the growth of SIV of zebrafish embryos significantly in a dose-dependent manner and almost complete inhibition was observed when treated embryos with 40 mg/L PCI for 12 h.

( 本文编辑: 张培新)