力达霉素通过下调 VEGF 表达抑制斑马鱼胚胎血管生成

丁丽丽^{1,2}, 刘 明¹, 张胜华³, 赵向忠^{1,2}, 吴 宁^{1,2}, 陈 雷^{1,2}, 王广建¹, 林秀坤^{1*}

(1. 中国科学院海洋研究所,山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049;3. 中国医学科学院医药生物技术研究所,北京 100050)

摘要:本研究采用斑马鱼胚胎模型研究力达霉素在整体动物水平对血管生成的影响。力达霉素处理胚胎后, 利用形态学观察、血管染色法、转基因斑马鱼检测其对胚胎血管生成影响,以荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法 检测 VEGF 基因的表达情况。结果显示:力达霉素处理后,胚胎出现心包水肿、血流速度减缓等症状;血管生长 率降低,肠下静脉生成受到抑制。荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹检测表明,力达霉素对胚胎的 VEGF mRNA 表 达水平没有影响,但 VEGF 蛋白的表达受到显著抑制。研究结果表明,力达霉素可以下调 VEGF 蛋白表达,从而 抑制斑马鱼胚胎血管生成。

关键词:力达霉素;斑马鱼;血管生成;血管内皮生长因子
中图分类号: R963
文献标识码: A
文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0456-06

Lidamycin inhibits angiogenesis of zebrafish embryo via down-regulation of VEGF

DING Li-li^{1, 2}, LIU Ming¹, ZHANG Sheng-hua³, ZHAO Xiang-zhong^{1, 2}, WU Ning^{1, 2}, CHEN Lei^{1, 2}, WANG Guang-jian¹, LIN Xiu-kun^{1*}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: Lidamycin (LDM) is a potent antitumor antibiotic. Previous studies have shown that LDM could inhibit proliferation and migration in endothelial cells. In the present report, the effect of LDM on angiogenesis of zebrafish embryo was studied. The results showed that treatment of zebrafish embryos with LDM resulted in significant inhibition of angiogenesis. Morphological observation, quantitative endogenous alkaline phosphatase (EAP) assay, alkaline phosphatase staining, and transgenic zebrafish assay were performed to evaluate vascular development defects in zebrafish. The results indicated that after the zebrafish embryos were exposed to LDM, angiogenesis defects of zebrafish embryos were observed, including pericardial edema, reduced numbers of circulating red blood cells, suppression of zebrafish vessel growth, and absences of SIV (subintestinal vein). The expression of VEGF was detected by RT-PCR assay, quantitative reverse transcriptase real-time PCR (qRT-PCR) assay and Western blotting analysis. The results revealed that LDM could inhibit the expression of were of mRNA was not significantly affected. The study suggests that LDM could inhibit the zebrafish embryo angiogenesis by down-regulation of VEGF expression.

Key words: lidamycin; zebrafish; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

血管生成是肿瘤生长、发展的必经之路,与实体瘤的发生、转移有着密切的关系。这一多步骤的复杂过程受多种因素影响,其中,VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGF) 作为主要的血管生成因子在血管生成中发挥着重要作用。多种以血管

收稿日期: 2009-11-23.

基金项目: 中国科学院创新基地项目 (KSCX2-YW-104, KZCX2-YW-209); 山东省科技发展计划项目 (2007GG10005002). *通讯作者 Tel / Fax: 86-532-82898916,

E-mail: linxiukun@yahoo.com.cn

生成为靶点的抗肿瘤药物如 Endostatin、Avastin 等已 进入临床应用,并获得了良好的疗效^[1]。

斑马鱼作为一种重要的模式生物,具有胚胎透 明、操作简单、生长同步和繁殖速度快等特点, 被广 泛用于胚胎的分子发育机制、疾病模型的构建以及药 物筛选等研究中。斑马鱼作为疾病分析和新药研发 方面细胞分析和啮齿动物分析的中间模型^[2],与小鼠 等动物模型相比具有简便、快速的特点。抗血管生成 药物的研究方法包括人脐静脉内皮细胞的体外研究 技术、鸡胚尿囊膜技术以及微血管密度实验等。斑马 鱼作为抗血管生成药物的研究模型具有快速、准确并 可以进行定量分析的优点。将绿色荧光蛋白基因插入 flk1 基因启动子序列构建转基因斑马鱼,利用荧光显 微镜可方便观察斑马鱼血管生成的变化^[3]。近年来采 用斑马鱼模型研究抗血管生成药物已有大量报道, 作者前期亦研究了斑马鱼 VEGF 的调控机制^[4]。此外 作者采用斑马鱼模型由海洋生物中获得了多种具有 抗血管生成作用的抗肿瘤成分,并采用人脐静脉内 皮细胞实验证实这些前体药物具有显著的抗血管生 成作用[5,6]。

力达霉素 (lidamycin, LDM) 是从我国湖北省潜 江县土壤中分离得到的一株链霉菌产生的烯二炔类 抗肿瘤抗生素^[7],由一个辅基蛋白和一个发色团构成, 其中发色团是其主要的活性部位。研究表明 LDM 除 具有很强的细胞毒活性^[8],可以抑制内皮细胞和肿瘤 细胞增殖并诱导其凋亡外,还具有抗血管生成作用, 并且抑制 VEGF 蛋白的表达^[9,10]。然而,关于 LDM 在 整体动物模型斑马鱼中是否具有抗血管生成作用的 研究, 尚未见相应的报道。本研究以斑马鱼胚胎为模 型,研究抗肿瘤药物 LDM 在整体动物水平的作用情 况,进一步阐明LDM作用机制,同时为斑马鱼作为抗 肿瘤药物筛选模型的可行性提供有力证据。

材料与方法

试剂和仪器 力达霉素由中国医学科学院甄永 苏教授惠赠。氮蓝四唑 (nitro-blue tetrazolium chloride, NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐 (5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate, BCIP) (Sigma 公司); Trizol (Invitrogen 公司); AMV Reverse Transcriptase 和 RQ1 DNase (Promega 公司); 实时定量 PCR SYBR Premix Ex Taq[™]II (TaKaRa 公司); Phosphatase Substrate Kit、 BCA[™] Protein Assay Kit 和化学荧光试剂 (Pierce 公 司); RIPA 组织/细胞裂解液 (Solarbio 公司); Antizebrafish VEGF Antibody (R&D 公司); 羊抗鼠二抗 (天根公司); 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 其他试剂为国产分析纯试剂。实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); 蛋白质电泳仪 (北京六一 仪器厂); 转膜仪 (Idea Scientific 公司)。

实验动物 野生型斑马鱼 (Danio rerio) 为本实 验室饲养, flk1-GFP 转基因斑马鱼为中国海洋大学分 子医学实验室提供。斑马鱼储养在自动循环水装置 中, 水温控制在 28 ℃, 14 h/10 h 光暗周期的条件下, 每日饲养两次。受精卵由清晨雌雄鱼交配获得, 然后 将受精卵放于胚胎培养液 (4% CaCl₂, 10% NaCl, 0.3% KCl, 1.63% MgSO₄), 28 ℃孵化。

药物处理及形态学观察 采集新孵化的斑马鱼 胚胎放入 24 孔板中, 每孔 20 枚。根据不同实验设计, 在受精后 1~2 hpf (hours post fertilization) 或 24 hpf 加入LDM, 浓度设置为 0.25、0.5、1.0 和 2.0 µmol·L⁻¹。 每个浓度设置3个平行孔,同时设空白对照。处理结 束后,将胚胎放入 28 ℃培养箱培养,于不同时间在 倒置显微镜下观察胚胎发育情况。

血管生成检测 以24 hpf 和72 hpf 为时间点,进 行定量碱性磷酸酶 (endogenous alkaline phosphatase, EAP) 染色 (Parng 等^[11]), 测定新生血管生成情况。 在受精后 72 h, 参照 Habeck 等^[12]的方法, 进行血管 染色分析,所用染色液为 NBT 和 BCIP,染色完成后 在立体显微镜下观察胚胎,采集图像并拍照。Flk1-GFP转基因斑马鱼胚胎在24 hpf经药物处理后,28 ℃ 培养至 72 hpf, 直接在荧光显微镜下观察血管发育情 况。利用图像分析软件 Image J 测定肠下静脉长度, 分析药物对血管生成的影响。

RT-PCR 检测 按 Trizol 试剂说明书操作提取斑 马鱼胚胎总 RNA, DNase 消化后用 AMV 反转录酶 将总 RNA 反转录为 cDNA。设计一对特异性引物 VF和 VR (表 1) 扩增 122 bp的 VEGF 基因片段;选 择 β -actin 作为内参基因, 引物 AF 和 AR 用来扩增 218 bp 的 β-actin 片段。扩增条件为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 60 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 15 s, 30 个循环, 最后 72 ℃温育 7 min。扩增产物以 1.5%

Table 1	Oligonucle	otide primers	used in the	e experiments
---------	------------	---------------	-------------	---------------

Table 1 Origonacieotide primers used in the experiments				
Sequence				
5'-tctttgggtatgtgggcagc-3'				
5'-tctttgggtatgtgggcagc-3'				
5'-caccaccacagccgaaagag-3'				
5'-caccaccaccagccgaaagag-3'				

琼脂糖凝胶电泳进行检测,凝胶成像系统捕获图像。

实时荧光定量 PCR 技术 实时荧光定量 PCR 体系: SYBR Premix Ex Taq 10/3 µL, ROX 2/15 µL, 正向引物 2/15 µL, 反向引物 2/15 µL, cDNA 2 µL, H₂O 补足 10 µL 体系。扩增条件为: 50 ℃孵育 2 min, 95 ℃ 10 min; 94 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 进行 40 个循环。反应结束后进行溶解曲线分析。进行 3 次重复实验,所得数据采用 SPSS 软件进行 *t*-test 统计分析。

蛋白免疫印迹检测 将各组不同处理条件的斑 马鱼胚胎用预冷的 PBS 清洗 2 遍,加入 RIPA 组织/ 细胞裂解液,冰上匀浆破碎组织,冰浴 30 min。于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心 20 min,收集上清液于新的 Eppendorf 管中,用 BCATM Protein Assay Kit 测定蛋 白含量。以β-actin 作为内参照。采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,然后转移印迹蛋白到 NC 膜上。

转完的膜浸于含 5% (w/v) 脱脂奶粉的 PBST 溶 液中,室温振摇封闭过夜, PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 室温清洗 5 min。装入杂交袋,用上述封闭 液稀释一抗,室温孵育 2.5 h, PBST 室温清洗 4 次,每 次 15 min。装入新的杂交袋,二抗室温孵育 1.5 h, PBST 室温清洗 4 次,每次 15 min。用化学荧光试剂处理膜 5~8 min,在暗室中使用 X 光片曝光显影,光片扫描 成像,并用 Image J 软件进行灰度分析。

数据统计分析 肠下静脉长度以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件分析,差异显著性分析采用 t 检验。

结果

1 LDM 对斑马鱼胚胎形态发育的影响

采用不同浓度的 LDM 处理斑马鱼胚胎,将胚胎 置于 28 ℃培养,在倒置显微镜下观察胚胎的发育情况。结果表明:1.0 μmol·L⁻¹ LDM 处理后 60 h,胚胎 出现明显的心包水肿、心跳无力、血流速度减慢等症



Figure 1 Morphological effects of Lidamycin (LDM) on zebrafish. Zebrafish embryos were cultured in the absence (A) or presence of 1.0 μ mol·L⁻¹ LDM for 60 h (B) and visualized using a light-microscope. n = 180

状,而空白对照组发育正常 (图 1)。由上述结果初步 判断,LDM 具有抑制斑马鱼胚胎血管生成的作用。

2 LDM 对斑马鱼血管发育的影响

2.1 定量碱性磷酸酶检测 斑马鱼胚胎发育 24 hpf, 斑马鱼背主动脉、腹主静脉等主要血管已经形成, 72 hpf 肠下静脉等新生血管生成,因此选择这两个时间 点,通过斑马鱼胚胎血管中碱性磷酸酶的显色反应, 测定新生血管生成情况 [血管生长% = (A 处理组 72 hpf -A 对照组 24 hpf)/(A 对照组 72 hpf - A 对照组 24 hpf)×100%]^[11]。如图 2 所示, LDM (0.5~2.5 μmol·L⁻¹) 可以显著抑制斑马 鱼胚胎血管生成,并呈剂量依赖关系。图中所示数据 为 3 次实验的平均值。



Figure 2 LDM inhibited the vessel growth of zebrafish embryos. Zebrafish embryos were treated with the indicated concentration of LDM for 48 h. The vessel growth of zebrafish embryos was determined by quantitative endogenous alkaline phosphatase assay. n = 90

2.2 NBT/BCIP 血管染色分析 利用 NBT/BCIP 血 管染色法检测了不同浓度 LDM 对斑马鱼胚胎肠下静脉 (subintestinal vein, SIV) 生长的影响。发现 0.5 µmol·L⁻¹ LDM 对 SIV 发育的影响不明显 (图 3 I B); 1.0 µmol·L⁻¹ LDM 处理后,胚胎 SIV 篮状血管网的面 积减小 (图 3 I C); 2.0 µmol·L⁻¹ LDM 处理后,胚胎 SIV 的形成几乎完全被抑制 (图 3 I D)。利用 Image J 软 件测定斑马鱼胚胎 SIV 长度,统计结果如图 3 II 所示: 与空白对照组相比较,不同浓度 LDM 处理的斑马鱼 胚胎 SIV 的生长受到明显抑制。说明 LDM 抑制斑马 鱼胚胎肠下静脉生成,并呈剂量依赖关系。

2.3 *Flk1*-GFP 转基因斑马鱼血管发育观察 *Flk1*-GFP 转基因斑马鱼是将 GFP (绿色荧光蛋白) 标记插 入到 *flk1* 基因的启动子序列中,获得在血管内皮细胞 表面表达 GFP 的转基因斑马鱼,因此可以直接在荧光 显微镜下观察血管发育情况。结果显示,0.5 μmol·L⁻¹LDM 处理组与空白对照组的胚胎相比,对斑马鱼血 管生成无明显影响 (图 4 I B),但随着浓度的增高



Figure 3 LDM inhibited SIV development of zebrafish embryos. I : Zebrafish embryos were untreated (A) or treated with 0.5 (B), 1.0 (C), and 2.0 (D) μ mol·L⁻¹ LDM for 48 h, and the SIV development was visualized by alkaline phosphatase staining. II : Quantitative analysis of SIV inhibition by LDM. The vessel length was analyzed using Image J software. *P < 0.05, **P < 0.01 vs control group (0 μ mol·L⁻¹). n = 100



Figure 4 The inhibitory effects of LDM on the angiogenesis in transgenic zebrafish embryos. I : Transgenic *flk1*-GFP zebrafish embryos were untreated (A) or treated with 0.5 (B), 1.0 (C), and 2.0 (D) μ mol·L⁻¹ LDM for 48 h, and then visualized using a fluorescence microscope. II : Quantitative analysis of SIV inhibition by LDM. The vessel length was analyzed using Image J software. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 *vs* control group (0 μ mol·L⁻¹). *n* =100

(1.0 及 2.0 μmol·L⁻¹), 胚胎血管生成受到显著抑制(图 4 I C、D)。利用 Image J 软件对斑马鱼胚胎 SIV 长度 进行测定, 结果显示 LDM 能显著抑制斑马鱼胚胎 SIV 的生长 (图 4 II)。

3 LDM 对斑马鱼胚胎 VEGF 基因表达的影响

VEGF 在血管生成过程中具有关键作用,可以刺激血管内皮细胞增殖,增加血管的通透性,促进肿瘤 血管新生和肿瘤转移。LDM 处理斑马鱼胚胎后,利 用 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR 检测 VEGF mRNA 表达变化情况,Western blotting 检测 VEGF 蛋白表达 情况。结果显示,LDM 对胚胎 VEGF mRNA 表达水 平没有明显影响 (图 5 A、B);但对 VEGF 蛋白表达 具有显著的抑制作用 (图 5 C、D),0.5 µmol·L⁻¹LDM 处理组抑制 VEGF 表达作用不明显;随着剂量增大 (1.0 及 2.0 μmol·L⁻¹),抑制程度增加。上述结果说明 LDM 可能通过抑制 VEGF 蛋白表达,抑制斑马鱼胚 胎血管生成,提示 LDM 对 VEGF 的调控可能是通过 翻译或翻译后水平进行的。

讨论

以往研究显示, LDM 对体外培养的多种内皮类 细胞和肿瘤细胞有强烈的杀伤作用, 其半数抑制浓 度 (IC₅₀)均在 1.5×10⁻¹⁷~3.1×10⁻¹⁶ mol·L^{-1[13, 14]}。本 研究中使用斑马鱼胚胎为研究模型, LDM 作用浓度 较高, 作者分析是由于 LDM 是大分子蛋白质, 大分 子蛋白类药物扩散进入斑马鱼胚胎较困难, 需要较



Figure 5 Influence of LDM on VEGF mRNA and protein expressions. Zebrafish embryos were untreated (A and C, lane 1) or treated with 0.5 (A and C, lane 2), 1.0 (A and C, lane 3), and 2.0 (A and C, lane 4) μ mol·L⁻¹ LDM for 48 h. The expression of VEGF mRNA was detected by RT-PCR (A) and real-time PCR (B). The effect of LDM on VEGF protein was determined by Western blotting (C). Relative expression levels of VEGF protein were represented in D. **P < 0.01 vs control group (0 μ mol·L⁻¹)

高浓度才能发挥作用。

研究证实, LDM 能够明显抑制多种肿瘤细胞中 VEGF 蛋白的表达,从而发挥抗血管生成作用^[9,15]。 作者的研究结果表明,在斑马鱼模型中,LDM也可以 抑制 VEGF 蛋白表达,对 VEGF mRNA 水平没有影响, 提示 LDM 对斑马鱼 VEGF 的影响可能发生在翻译或 翻译后水平。有报道表明,LDM 具有氨肽酶活性^[16,7], 并且与 LDM 同属烯二炔类的其他药物也有切割蛋白 的作用^[17],为了证实是否由于 LDM 对 VEGF 蛋白具 有酶解活性,作者进行了体外试验,发现 LDM 对 VEGF 蛋白不具有降解作用 (数据未列出),说明 LDM 可能通过较为复杂的机制影响蛋白量的变化。作者正 在进行这方面的研究,以期进一步阐明 LDM 对 VEGF 调控的具体方式。

VEGF 是新生血管生成过程中的关键基因,已成为抗肿瘤药物的重要靶点^[18],多种以血管生成为靶点的抗肿瘤药物已进入临床应用,并取得了良好的结果。但目前应用的以 VEGF 为靶点的药物,主要是作用于 VEGF 的抗体药物或者阻止 VEGF 与受体结合的药物^[19],作者的实验表明,LDM 可以通过影响 VEGF 的表达量产生抗血管生成活性,这一结果为发展血管生成抑制剂提供了新的思路。

综上所述,本实验在整体动物水平上研究表明,

LDM 能够抑制斑马鱼胚胎血管生成;对其作用机制的研究表明,LDM不影响VEGF mRNA表达变化,而 是通过抑制 VEGF 蛋白的表达发挥作用。本研究为 阐明 LDM 的抗肿瘤作用机制提供了理论依据,为构 建斑马鱼抗肿瘤药理模型奠定了基础。

References

- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3: 391–400.
- [2] Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, et al. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 879–883.
- [3] Jin SW, Beis D, Mitchell T, et al. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish [J]. Development, 2005, 132: 5199–5209.
- [4] Yang SL, Yan S, Lin XK, et al. Suppression of zebrafish VEGF gene by cytomegalovirus promoter-driven short hairpin constructs induces vascular development defects and down regulation NRP1 expression [J]. Biologia, 2009, 64: 1025– 1031.
- [5] Zheng LH, Wang Z, Lin XK, et al. A novel peptide from shark cartilage with potent antiangiogenesis activity [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6: 775–780.

• 461 •

- [6] Wang Z, Zheng LH, Lin XK, et al. N-Acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357: 26– 31.
- [7] Shao RG, Zhen YS. Enediyne anticancer antibiotic lidamycin: chemistry, biology and pharmacology [J]. Anti Cancer Agents Med Chem, 2008, 8:123–131.
- [8] Wang XH, Wu SY, Zhen YS. Lidamycin inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2003, 28: 605-612.
- [9] Ou-yang ZG, Zhen YS. Antiangiogenic effects of lidamycin and mechanism of actin [C]. Oncol Res, 2006, 15: 474–474.
- [10] Zhen HY, Xue YC, Zhen YS. Inhibition of angiogenesis is by antitumor antibiotic C1027 and its effect on tumor metastasis
 [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 1997, 77: 657-660.
- Parng C, Seng WL, Semino C, et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening [J]. Assay Drug Dev Technol, 2002, 1: 41-48.
- [12] Habeck H, Odenthal J, Walderich B, et al. Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis [J]. Curr Biol, 2002, 12: 1405–1412.
- [13] Zhen YS, Ming XY, Yu B, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic. C-1027, III. antitumor activity [J]. J

Antibiot (Tokyo), 1989, 42:1294-1298.

- [14] Qiu Q, Wang Z, Jiang JM, et al. Effect of lidamycin on mitochondria initiated apoptotic pathway in human cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007, 42: 132-138.
- [15] Zhang SH, Chen J, Jiang M, et al. Lidamycin induces apoptosis of human gastric carcinoma BGC823 cells and inhibits xenograft growth in nude mice [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43: 601-604.
- [16] Sakata N, Tsuchiya KS, Moriya Y, et al. Aminopeptidase activity of an antitumor antibiotic, C-1027 [J]. J Antibiot, 1992, 45: 113–117.
- [17] Otani T, Yasuhara T, Minami Y, et al. Purification and primary structure of C-1027-AG, a selective antagonist of antitumor antibiotic C-1027, from Streptomyces-globisporus [J]. Agric biol Chem, 1991, 55: 407–417.
- [18] Xu F, Ou-yang ZG, Zhang SH, et al. Sodium caffeate induces endothelial cell apoptosis and inhibits VEGF expression in cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006, 41: 572– 576.
- [19] Tokuyama J, Kubota T, Saikawa Y, et al. Tyrosine kinase inhibitor SU6668 inhibits peritoneal dissemination of gastric cancer via suppression of tumor angiogenesis [J]. Anticancer Res, 2005, 25: 17–22.