文章编号:1000-5404(2008)07-0631-03

论著

温度时间及^{125}I-AS浓度对ECV304细胞AS受体内化的影响

张王峰[1],徐海峰[1],周润锁[1],袁梦晖[1],周飞华[1],孙 涛[1],赵华栋[2] (第四军医大学唐都医院:[1]核医学科,[2]普通外科,西安 710038)

摘 要:**目的** 探讨温度、时间及^{125}碘-血管抑素(^{125}I-angiostatin,^{125}I-AS)浓度等因素对人脐静脉内皮细胞系ECV304细胞血管抑素(angiostatin,AS)受体内化的影响。**方法** 利用弹性蛋白酶有限水解法制备AS,SDS-PAGE凝胶电泳鉴定,Ch-T法进行^{125}I标记,纸层析法测标记率,Sephadex-G_{50}柱纯化,将纯化产物分别加入牛血清白蛋白(BSA)、生理盐水及不同物质的量比的半胱氨酸,以观察其体外稳定性。利用放射性配基结合分析法,以^{125}I-AS为放射性配基,于4、24、37 ℃条件下,固定浓度^{125}I-AS与ECV304细胞共同保温不同时间后,分别检测细胞的受体内化率;37 ℃条件下,不同浓度^{125}I-AS与ECV304细胞共同保温不同时间后,分别检测细胞的受体内化率。**结果** 蛋白水解产物凝胶电泳相对分子质量为38×10^3,标记率可达85%,标记产物在体外较稳定。4 ℃时,受体内化率较低,24 ℃时,受体内化率有所增加,37 ℃时,受体内化率较高;37 ℃时,随^{125}I-AS浓度增大,受体内化率降低($P<0.01$);不同温度、浓度时,受体内化率均随时间延长而增加($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** ECV304细胞AS受体内化受温度、时间及^{125}I-AS浓度等因素影响,呈温度-效应、时间-效应关系,与^{125}I-AS浓度呈负相关。

关键词:ECV304细胞;血管抑素;受体;内化
中图法分类号:R322.123;R329.24;R817 **文献标识码**:A

Influences of temperature, incubation time and angiostatin concentration on internalization of its receptor in ECV304 cells

ZHANG Wang-feng[1], XU Hai-feng[1], ZHOU Run-suo[1], YUAN Meng-hui[1], ZHOU Fei-hua[1], SUN Tao[1], ZHAO Hua-dong[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, [2]Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: Objective To investigate the influences of temperature, incubation time and ^{125}I-angiostatin (AS) concentration on the internalization of AS receptor in ECV304 cells. Methods After ECV304 cells were incubated together with ^{125}I-AS at different temperature (4, 24 or 37 ℃) for 0.5, 1, 4, 8 or 24 h, the amount of membrane receptor that internalized ^{125}I-AS was detected with γ counter. ECV304 cells were incubated with ^{125}I-AS of different concentrations at 37 ℃ for 0.5, 1, 4, 8 or 24 h, then the amount of membrane receptor that internalized ^{125}I-AS was detected. **Results** The ratio of internalized ^{125}I-AS was lower at 4 ℃, moderate at 24 ℃, and higher at 37 ℃. With the increasing concentration of ^{125}I-AS, the internalization ratio decreased at 37 ℃. The ratio of AS receptor internalization increased as the incubation time prolonged at any temperature and concentration. Conclusion Temperature, incubation time and ^{125}I-AS concentration affect the internalization of AS receptor of ECV304 cells. The internalization has a temperature-effective and time-effective relation, and is negative correlated with ^{125}I-AS concentration.

Key words: ECV304 cells; angiostatin; receptor; internalization

血管抑素(angiostatin,AS)是O'Reilly等于1994年从Lewis肺癌小鼠血清和尿液中分离出的能够特异性抑制肿瘤血管内皮细胞增生的因子,是纤溶酶原的一个片段,相对分子质量为38×10^3。自从发现AS能强烈抑制血管内皮细胞生长和血管的新生,其生物学效应和作用方式即引起了人们极大的关注。近年来,国学内已有者先后进行了^{131}I-AS在荷Lewis肺癌小鼠体内的分布及放射受体显像研究,^{131}I-AS对内皮细胞及小鼠Lewis肺癌移植瘤生长的抑制作用研究,^{99m}Tc直接标记AS及其在荷瘤小鼠体内研究,^{188}Re-AS的制备和其生物活性及其在小鼠体内生物学分布等研究。2003年,Lee通过乳过氧化物酶法,用^{125}I标记AS,并进行了^{125}I-AS在荷人结肠癌的BALB/c小鼠体内的药代动力学分布及肿瘤显像研究。但国内外少有学者利用^{125}I-AS进行细胞内化及影响因素等方面的研究。AS的确切作用机制尚不清楚,可能与其受体结合后的

作者简介:张王峰,男,陕西省澄城县人,硕士研究生,主要从事肿瘤核医学方面的研究。电话:(029)84777795
通信作者:徐海峰,电话:(029)84777472,E-mail:xuhaif@163.com
收稿日期:2007-09-03;修回日期:2007-12-11

内化密切相关，人们公认的受体大致为 $\alpha_V\beta_3$、ATP 合酶及 Angiomotin 等。本实验以 ^{125}I-AS 为放射性配基，初步探索 ^{125}I-AS 的作用机制，以及温度、时间及 ^{125}I-AS 浓度等因素对受体内化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

XH-6010γ 放免计数器（国营 262 厂）；NU-2500 型 CO_2 培养箱（美国 HUAIRE 公司）；GU-20 低温高速冷冻离心机（江苏太仓医疗仪器厂）；SW-CJ-IF 净化工作台（苏净集团苏州安泰空气技术有限公司）；HL-1 型恒流泵（上海沪西仪器厂）；脐静脉内皮细胞系 ECV304（本院传染科）；溴化氰活化的 Sepharose4B 亲和层析柱（Pharamacia 产品）；弹性蛋白酶（Sigma 公司）；6-氨基己酸（上海试剂厂）；低分子量标准蛋白质（上海生物研究所）；人新鲜冰冻血浆（本校西京医院血库）；改良型 RPMI1640 培养基（海克隆生物化学制品北京有限公司）；Na^{125}I（成都中核高通同位素有限公司生产，放射化学纯度 99.7%，无载体，pH=8.0）；人血清白蛋白（Sigma 公司）；氯胺 T（Ch-T）（Aldrich chemical 公司产品，纯度 >98%）；胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司产品）；其他试剂均为国产分析纯（A. R 级）。

1.2 125I-AS 制备

AS 采用弹性蛋白酶有限水解法从人血浆中分离制备[1]，以 Bradford 法定量，纯度为 500 mg/L，SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定。Ch-T[2] 法进行 AS 的 ^{125}I 标记，Ch-T 和 $Na_2S_2O_5$ 用 50 mmol/L，pH=7.5 的 PBS 液新鲜配制，浓度分别为 0.5、1.0 μg/μl。取 Na^{125}I 37MBq（10 μl）、As 10 μg（20 μl）及 Ch-T20 μg（40 μl），24 ℃ 下混匀反应 40～50 s，然后加入 $Na_2S_2O_5$ 40 μg（即40 μl）终止反应。标记物用 Sephadex-G_{50} 柱纯化，以 50 mmol/L，pH=7.5 的 PBS 液淋洗，洗脱速度为 0.6 ml/min，收集 1 ml/管，以 60 s/管时间测各管放射性计数。第 1 峰为 ^{125}I-AS，第 2 峰为游离 ^{125}I。用新华 1 号层析纸，生理盐水作展开剂测第 1 峰各管放化纯，合并放化纯 >95% 的各管，4℃ 贮存待用。测定纯化物于 37 ℃ 分别放置于牛血清白蛋白（BSA）、生理盐水及不同物质的量比的半胱氨酸中 1、4、24 h 的稳定性。测量并计算 ^{125}I-AS 比活度，分别测量不同时间实验时所用 ^{125}I-AS 的放化纯（体外稳定性）。

1.3 ECV304 细胞培养

用改良型 RPMI1640 培养液（含 10% 胎牛血清，100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素，pH=7.2）培养 ECV304 细胞，37℃、5% CO_2、饱和湿度常规培养传代。细胞传代用胰蛋白酶消化法，浓度为 0.25%（用 pH=7.4 的 PBS 配制，过滤除菌，4 ℃保存备用）。消化后所制细胞悬液，计数后按 1×10^5/ml 接种于新的培养瓶内，置孵箱中继续培养，取对数生长期细胞用于实验。

1.4 ^{125}I-AS 与 ECV304 细胞 AS 受体结合后的内化实验

1.4.1 ^{125}I-AS 浓度对 AS 受体内化的影响[3,4] 取对数生长期 ECV304 细胞，胰酶消化，用 RPMI1640（含终浓度为 100 U/ml 的青链霉素，质量分数 0.02% FBS）制成细胞悬液，调整细胞密度为 5×10^6/ml，以质量分数 0.4 % 台盼蓝计数细胞存活率 >95%，置 4 ℃ 待用。实验分为高浓组、中浓组及低浓组，各自设内化组及对照组（非特异结合组），每组再分为 5 个时间亚组，每亚组设 4 个平行管。各浓度组均加入细胞悬液 100 μl（含细胞 5×10^5 个），并加入不同浓度 ^{125}I-AS 各 50 μl，分别含放射性计数 3.0×10^5、2.0×10^5、1.0×10^5 cpm，非特异结合组加 50 μl（10 μg/ml）未标记的 AS，内化组加 50 μl 的 AS 配制液（PBS 缓冲液，pH=7.5）补足反应体积，在 37 ℃ 培养箱中分别温育 0.5、1、4、8、24 h，到时间点后，加入 1 ml 预冷的 RPMI1640（同前），24 ℃，600×g 离心 5 min，重复 1 次，收集 2 次上层清液（代表未结合部分）。向沉淀加 1 ml HBSS-Ac 液（Hanks 平衡盐溶液，含 20 mmol/L 乙酸钠，pH=5.0），37 ℃ 保温 10 min，24 ℃，600×g 离心 5 min，再用 HBSS-Ac 洗 1 遍，离心，收集 2 次上层清液（代表膜受体结合部分）和沉淀（代表内化部分），分别测量放射性计数，并计算受体内化率。受体内化率 =（内化部分放射性计数/总放射性计数）×100%，总放射性计数 = 未结合放射性计数 + 膜受体结合放射性计数 + 内化放射性计数。

1.4.2 温度对 AS 受体内化的影响[5,6] 细胞准备同 1.3。实验分为低温组、中温组及高温组，各自设内化组及对照组（非特异结合组），每组再分为 5 个时间亚组，每亚组设 4 个平行管。依次分别加入细胞悬液 100 μl（含细胞 5×10^5 个）和 ^{125}I-AS 50 μl（2×10^5 cpm），非特异结合组加 50 μl（10 μg/ml）未标记的 AS，内化组加 50 μl 的 AS 配制液（PBS 缓冲液，pH=7.5）补足反应体积，分别在 4、24 ℃ 及 37 ℃ 孵育 0.5、1、4、8、24 h，到时间点后，样品的处理、测定及参数计算同 1.4.1。

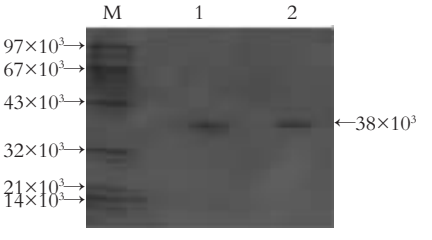
1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计学软件，进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 ^{125}I-As 的标记率

蛋白水解产物 SDS-PAGE 凝胶电泳相对分子质量为 38×10^3（图 1），用 Ch-T 法标记 ^{125}I-AS，纸层析法测定的标记率较高且稳定，标记率为 85%，放化纯为 94%，比活度为 5.2 MBq/ml。进行 ^{125}I-AS 浓度对 AS 受体内化的影响实验时放化纯为（92.0±2.1）%，进行温度对 AS 受体内化的影响实验时放化纯为（88.0±1.7）%。纯化产物 ^{125}I-AS 在生理盐水中 1、4、24 h 的解离率分别为 2.3%、5.2%、8.0%，在 10 g/L BSA 中 1、4、24 h 的解离率分别为 4.6%、9.1%、11.0%，在不同物质的量比半胱氨酸溶液中孵育，^{125}I-AS 存在不同程度的解离，物质的量比在 5 以下时，4 h 的解离率不超过 11%，表明标记产物在体外较稳定。



M：低分子量蛋白标准；1：微量商品化血管抑素；2：纯化后的纤溶酶原水解产物

图1 AS 的聚丙烯酰氨凝胶电泳图

表 1　37 ℃时，不同浓度 AS 受体内化率[$n=4$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	0.5 h	1 h	4 h	8	24 h
低浓组(1×10^5 cpm)	18.25 ± 1.66	25.29 ± 3.75	28.20 ± 1.10	32.91 ± 4.06	38.62 ± 5.66
中浓组(2×10^5cpm)	12.56 ± 1.09[a]	18.15 ± 2.63[a]	22.65 ± 3.46[a]	25.21 ± 1.95[a]	28.03 ± 3.03[a]
高浓组(3×10^5cpm)	8.02 ± 0.73[b]	10.67 ± 3.16[b]	13.70 ± 1.52[b]	15.81 ± 1.96[b]	18.58 ± 2.71[b]

a：$P<0.05$，与低浓度组同时间点受体内化率比较；b：$P<0.01$，与低浓度组同时间点受体内化率比较

表 2　不同温度、固定浓度时 AS 受体内变化率[$n=4$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	0.5 h	1 h	4 h	8 h	24 h
低温组(4℃)	2.30 ± 0.14	2.80 ± 0.12	3.23 ± 0.26	3.77 ± 0.36	5.36 ± 0.59
中温组(24℃)	5.40 ± 0.19[a]	6.27 ± 0.25[a]	8.33 ± 0.47[a]	10.31 ± 1.30[a]	15.58 ± 0.97[a]
高温组(37℃)	12.56 ± 1.09 [b]	18.15 ± 2.63 [b]	22.65 ± 3.46 [b]	25.21 ± 1.95 [b]	28.03 ± 3.03 [b]

a：$P<0.05$，与低温组同时间点受体内化率比较；b：$P<0.01$，与低温组同时间点受体内化率比较

2.2　各浓度^{125}I-AS 对 AS 受体内化的影响

37 ℃时，各浓度^{125}I-AS 都能与受体结合并使之发生内化，受体内化率随浓度增加而降低($P<0.05$，$P<0.01$)。各时间点均以低浓组 AS 受体内化率较高($F=142.099$，$P<0.01$)(表 1)。各浓度组受体内比率均随时间延长而增加($P<0.01$)。

2.3　温度对 AS 受体内化的影响

4℃时，AS 受体内化率较低，24 ℃时略高($P<0.05$)，37℃时较高($P<0.01$)，AS 受体内比率均随着保温时间的延长增加($F=38.585$，$P<0.01$)(表 2)。

3　讨论

近年来抗血管生成因子及其在动物实验中所表现出来的潜能，使人们看到了肿瘤治疗前景，AS 就是其中之一，其作用机制主要为：① 通过特异性结合内皮细胞膜表面的 ATP 合成酶的 α 和 β 亚单位而抑制其活性；②诱导促进细胞有丝分裂的蛋白激酶 ERK-1 和 ERK-2 脱磷酰化，使其活性明显降低，抑制内皮细胞增生；③通过非竞争性结合组织型纤溶酶原激活物(tPA)，降低 tPA 作用，减少纤溶酶生成，从而抑制血管内皮细胞的定向迁移；④竞争性结合内皮细胞表面的特异性粘附分子受体如整合蛋白 αvβ3，干扰整合素介导信号传导而抑制血管生成。具体的作用机制尚不清楚，推测可能与内化作用有关。伴随配体受体复合物在质膜凹陷处的聚集和内吞称之为内化。受体内化都受到哪些因素的影响呢，这个问题受到人们的极大关注。

^{125}I-AS 浓度对 AS 受体内化的影响实验提示：37℃条件下，各种浓度^{125}I-AS 都能迅速与受体结合并使受体发生内化，各时间点均以较低浓度^{125}I-AS 内化率较高。推测其原因，可能为 ECV304 细胞 AS 受体为一定数量，可以结合的^{125}I-AS 受到一定限制，当^{125}I-AS 浓度增加时，结合的^{125}I-AS 量虽有所增加，但^{125}I-AS 结合率这一比值就下降了。

温度对 AS 受体内化的影响实验提示：4℃时，AS 受体内化率较低；24℃时，各时间点受体内化率较 4℃时均有增加；37℃时，AS 受体内化迅速，受体内化率明显高于其他温度组。本实验结果与相似实验结果基本一致[3,7]。可以利用温度对受体内化率的影响，根据实验需要，选择相应的实验温度。

各种浓度、温度条件下，受体内化率均随时间的延长而增加。本实验结果与相似实验结果基本一致[5]。受体内化可以延长放射性核素标记产物在细胞内的贮留时间，可以利用 AS 直接抗增殖及^{125}I 辐射电离杀伤，对肿瘤细胞起到协同杀伤效应[3]。

本实验探讨了温度、时间及^{125}I-AS 浓度等因素对 ECV304 细胞 AS 受体内化的影响，得出了初步结论。在以后进行 AS 受体内化的相关研究时，就可以根据实验需要，选择、控制实验条件，使得 AS 受体内化率随着需要调节，更好地进行肿瘤防治研究。

参考文献：

[1] 张晓慧，徐海峰，张金赫. 血管抑素的制备[J]. 第四军医大学学报，2004，25(17)：1557.

[2] 邓新荣，李金英. ^{125}I-NT 类似物与人结肠癌细胞 HT29 体外结合特性研究[J]. 中华核医学杂志，2006，26(3)：160－161.

[3] 孙俊杰，范　我，许玉杰，等. ^{125}I-[Tyr^3]-octreotide 内化及杀伤NCI-H446 细胞的研究[J]. 中华核医学杂志，2004，24(3)：144－146.

[4] 汪　静，李富军，邓敬兰，等. RC-160 对 NCI-H446 细胞生长抑素受体内化及调变的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2002，18(4)：373－375.

[5] 赵明玄，汪　静，王　□，等. 放射性碘标记 RC-160 对 A549-hSSTR2 细胞受体内化及杀伤作用的研究[J]. 中华核医学杂志，2007，27(2)：73－76.

[6] 华　兴，王　峰，莫雪梅，等. vMIP-Ⅱ对细胞表面趋化因子受体 CXCR4 内化及调变的研究[J]. 现代免疫学，2006，26(3)：213－216.

[7] 孙沫逸，刘宝林，蒋月桂，等. 不同温度对 Tca-8113 细胞表皮生长因子受体复合物内化的影响[J]. 上海口腔医学，2003，12(1)：18－20.

（编辑　薛国文）