

人参和三七提取物在血管生成信号通路上作用靶点的实验研究

田 伟¹ 雷 燕¹ 杜雪君¹ 朱凌群² 陈可冀¹

摘要 目的 探讨益气活血中药人参和三七提取物在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成信号通路(VEGFR-2-Ras-MAPK)上的作用靶点。方法 通过逐级信号阻断的方法,首先加入半数抑制量(IC₅₀)的血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2)抑制剂SU5416,采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测其下游信号蛋白Ras、MAPK的表达,其次再加入IC₅₀的Ras抑制剂FPP,采用Western blot检测下游蛋白MAPK的表达。结果 与空白对照组比较,加入SU5416后Ras、MAPK的表达均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);加入FPP后MAPK的表达也显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与SU5416组比较,SU5416加中药组下游信号蛋白Ras、MAPK的表达均显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与FPP组比较,FPP加中药组下游信号蛋白MAPK的表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 益气活血中药人参和三七提取物对HUVEC血管生成的作用机制可能是分别促进VEGFR-2、Ras、MAPK这三个关键信号蛋白的表达而实现的。

关键词 人参;三七;信号抑制;血管生成

Action Target of Ginseng and Panax Notoginseng Extracts on Angiogenesis Signaling Pathway TIAN Wei, LEI Yan, DU Xue-jun, et al Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT **Objective** To investigate the action targets of ginseng (GS) and Panax notoginseng (PN), Chinese herbs for benefiting qi and activating blood circulation, on angiogenesis signaling pathway (VEGFR-2-Ras-MAPK) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** To block the signal pathway by turns, at the first, added the IC₅₀ of VEGFR-2 inhibitor, SU5416, and detected its downstream signaling protein Ras, MAPK expression using Western Blot. Secondly, added the IC₅₀ of the Ras inhibitor, FPP, and detected its downstream signaling protein MAPK expression. **Results** Compared with the control group, adding SU5416 made the Ras, MAPK expression significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$); and adding FPP made the expression of MAPK significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the group treated by SU5416 alone, the expression of downstream signaling protein Ras, MAPK were significantly higher in the group treated by SU5416 plus GS and PN ($P < 0.05, P < 0.01$); same state also found in comparison MAPK expression between groups treated with FPP alone and FPP plus GS and PN ($P < 0.05$). **Conclusion** The angiogenesis mechanism of GS and PN on HUVEC may be realized by increasing the protein expression of three key signals, VEGFR-2, Ras and MAPK, respectively.

KEYWORDS Ginseng; Panax notoginseng; signal inhibitor; angiogenesis

前期的研究证实益气活血中药人参和三七提取物可以促进人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖,并且促进血管生成信号通路上VEGFR-2、Ras、MAPK蛋白表达^[1]。但不清楚中药可能作用的环节和靶点,本研

究通过逐级信号阻断的办法,同时加入中药提取物进行干预,观察血管生成下游信号蛋白的表达变化,旨在探究中药提取物在此过程中的作用环节及可能的作用靶点。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30672750,30070956)

作者单位:1. 中国中医科学院西苑医院(北京 100091);2. 北京中医药大学东直门医院

通讯作者:雷 燕, Tel:010-64013948, E-mail:lei999@163.com

[△]现在中国康复研究中心北京博爱医院中西医结合康复科(北京 100068)

材料与方法

1 细胞 人脐静脉内皮细胞二代(HUVEC-2C, 箱号:C-023-5C, 批号:4C0218),购自 Cascade Biologicals 公司。

2 药物 人参提取物(批号:0609089)和三七提取物(批号:0612051)购自广东一方制药有限公司。

3 试剂及仪器 VEGFR-2 抑制剂: SU5416; 1, 3-Dihydro-3-[(3, 5-dimethyl-1-H-pyrrol-2-yl) methyl-ene]⁻²H-indol-2-one; 分子式: C₁₅ H₁₄ N₂ O; 分子量: 238.28。Ras 抑制剂: FPP: 3, 7, 11-Trimethyl-2, 6, 10-dodecatrien-1-yl pyrophosphate ammonium salt; 分子式: C₁₅ H₃₇ N₃ O₇ P₂; 分子量: 433.42。抑制剂均购自美国 Sigma 公司。Wellscan MK3 型全自动酶标仪, 芬兰 Labsystems Dragon 公司生产; 3K30 型高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司生产; BioRAD IQ5 型荧光定量 PCR 仪, 美国 BioRAD 生产。

4 方法

4.1 中药提取物制备方法 人参水溶后按吸附树脂层析法提得, 三七采用水煎提取和阳离子树脂吸附法分离获得。按 2:1 (人参:三七) 配比, 用时用完全培养基(M200 + LSGS)配成所需浓度, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装, 4℃保存。

4.2 分组方法 实验用细胞分为 6 组, 即:空白对照 I 组(以完全培养基 M200 加 LSGS 作为对照, 不加入 SU5416 和中药)、SU5416 组(IC₅₀ 的 SU5416: 0.04 μmol/L^[2])、SU5416 加中药组(IC₅₀ 的 SU5416 加生药人参 8/3 mg/mL, 生药三七 4/3 mg/mL^[1]), 以上 3 组检测下游蛋白 Ras 及 MAPK 表达; 以及空白对照 II 组(以完全培养基 M200 加 LSGS 作为对照, 不加入 FPP 和中药)、FPP 组(IC₅₀ 的 FPP: 0.1 μmol/L^[3-5])、FPP 加中药组(IC₅₀ 的 FPP 加生药人参 8/3 mg/mL, 生药三七 4/3 mg/mL^[1]), 以上 3 组仅检测下游蛋白 MAPK 表达。HUVEC 以 1 × 10⁵ 个/mL 密度接种于 75 cm² 培养瓶中, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。接种 24 h 后按实验分组加入 SU5416、FPP 和中药, 再培养 36 h 后分别收集细胞。

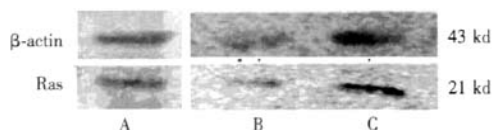
4.3 Ras、MAPK 蛋白的检测 采用蛋白免疫印迹(Western blot)法。分别收集细胞, 加入蛋白提取液并反复吹打, 置冰上 15 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 转移上清至新的 EP 管中。BCA 法测定蛋白浓度。取各蛋白样品 20 μL, 加入蛋白样品缓冲液变性后将蛋白样品加入 15% (Ras、MAPK) 十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 直至蓝色条带泳出分离胶底部。采用电转移法将蛋白质从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜, 转膜成功后, 以 5% 脱脂牛奶 TBS-T 液体封闭硝酸纤维素膜上的非特异蛋白位点, 按 1:400 比例加入兔抗人 Ras 多克隆抗体 5 μL; 1:800 比例加入兔抗人 MAPK 单克隆抗体 5 μL,

4℃过夜。次日经过洗膜, 加入 1:3 000 稀释的二抗, 再洗膜后, 杂交膜显色反应按照 ECL 试剂盒的说明进行, 采用数字扫描成像系统分析特异条带的强度。每组实验均重复 3 次。

4.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件, Western blot 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 One-way ANOVA 分析。

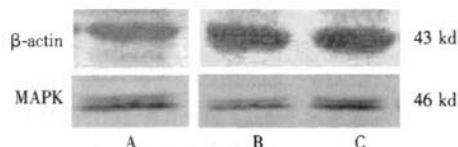
结 果

1 加入 VEGFR-2 信号转导蛋白抑制剂 SU5416 对下游 Ras 蛋白的影响(图 1, 表 1) 各组均有不同程度的 Ras 蛋白表达, SU5416 组 Ras 蛋白表达较空白对照 I 组有明显下降($P < 0.01$), 而 SU5416 加中药组 Ras 蛋白表达较 SU5416 组明显上升($P < 0.05$)。表明 VEGFR-2 信号转导蛋白抑制剂 SU5416 可以抑制 VEGFR-2 的信号转导, 从而下调下游信号蛋白 Ras 的表达; 中药可以通过作用于 Ras 蛋白而促进 HUVEC 的增殖。



注: A: 空白对照 I 组; B: SU5416 组; C: SU5416 加中药组
图 1 各组 Ras 蛋白表达条带

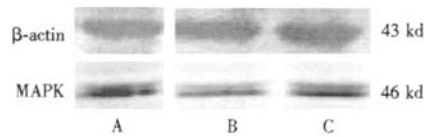
2 加入 VEGFR-2 信号转导蛋白抑制剂 SU5416 对下游 MAPK 蛋白的影响(图 2, 表 1) 各组均有不同程度的 MAPK 蛋白表达, SU5416 组 MAPK 蛋白表达较空白对照 I 组明显降低($P < 0.05$), 而 SU5416 加中药组 MAPK 蛋白表达较 SU5416 组明显增加($P < 0.01$)。表明 VEGFR-2 信号转导蛋白抑制剂 SU5416 可以通过抑制 VEGFR-2 的信号转导来抑制下游信号蛋白 MAPK 蛋白的表达; 中药可以促进 HUVEC MAPK 蛋白的表达。



注: A: 空白对照 I 组; B: SU5416 组; C: SU5416 加中药组
图 2 各组 MAPK 蛋白表达条带

3 加入 Ras 信号转导蛋白抑制剂 FPP 对下游 MAPK 蛋白的影响(图 3, 表 1) 各组均有不同程度的 MAPK 蛋白表达, 空白对照组 II 组的 MAPK 蛋白表达明显高于其他两组, 加入 Ras 信号转导蛋白抑制剂

FPP 组, MAPK 蛋白表达较空白对照 II 组明显降低 ($P < 0.01$), 而 FPP 加中药组下游蛋白 MAPK 蛋白表达较 FPP 组明显增加 ($P < 0.05$), 说明中药作用于 HUVEC 后促进了 MAPK 蛋白的表达。



注: A: 空白对照 II 组; B: FPP 组; C: FPP 加中药组

图 3 各组 MAPK 蛋白表达条带

表 1 各组蛋白免疫印迹杂交信号强度灰度平均值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ras/ β -actin	MAPK/ β -actin
空白对照 I	3	$0.26 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$	$0.40 \pm 0.02^{\Delta}$
SU5416	3	0.13 ± 0.02	0.27 ± 0.04
SU5416 加中药	3	$0.21 \pm 0.05^{\Delta}$	$0.35 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$
空白对照 II	3	—	$0.38 \pm 0.11^{**}$
FPP	3	—	0.22 ± 0.02
FPP 加中药	3	—	$0.33 \pm 0.06^{*}$

注: 与 FPP 组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 SU5416 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

讨 论

VEGFR-2 是一种受体酪氨酸激酶 (RPTK), 它结合信号分子后, 形成二聚体, 并发生自磷酸化而活化, 活化的 RPTK 激活 Ras, 由活化的 Ras 引起蛋白激酶的磷酸化级联反应。Ras 信号途径是一种很常见的细胞分子信号传导途径, 也是受体型酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 信号转递中的主要成员。Ras 蛋白是膜结合型蛋白, 它活化的第一步就是法尼基化, 即法尼基转移酶 (FTase) 将法尼基焦磷酸中的法尼基基团转移至 Ras 蛋白的 CAAX (C: 半胱氨酸; A: 脂肪族氨基酸; X: 任何氨基酸) 的半胱氨酸残基上^[6]。FPP 和 Ras 蛋白均为 FTase 的底物, 所以 FPP 可以竞争性抑制法尼基转移酶, 从而抑制 Ras 信号蛋白的传导^[7]。Ras 蛋白与 Raf 的 N 端结构域结合并使其激活, Raf 是丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶 (又称 MAPKKK), 活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶 MAPKK, 使其活化。MAPKK 又激活有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), MAPK 属丝氨酸/苏氨酸残激酶。活化的 MAPK 进入细胞核, 可使许多转录因子活化, 促使基因表达的增加, 进而促进细胞的增殖和分化。SU5416 是新合成的血管内皮生长因子受体 (VEGFR-2/Flk-1/KDR) 酪氨酸激酶的抑制剂^[5]。实验表明 SU5416 可抑制依赖于血管表皮生长因子刺激的血管内皮细胞增殖^[8], 能阻断来自细胞

外血管生长刺激信号和已激活信号的转化通路, 有效地抑制血管表皮生长因子的活性, 从而抑制血管内皮细胞的生长。大量的文献报道主要集中在 SU5416 抑制肿瘤的生长和转移^[9-11]。

本实验利用 SU5416 可以阻断 VEGFR-2 (KDR) 酪氨酸激酶的作用, 加入 IC_{50} 的 SU5416, 对血管生成信号通路进行阻断。在实验中仅加入 IC_{50} 的 SU5416 主要是防止大剂量的 SU5416 可能过分抑制细胞生长, 甚至导致细胞的凋亡或死亡。本实验结果表明, IC_{50} 的 SU5416 部分阻断血管生成通路上的 VEGFR-2 后, 下游 Ras 和 MAPK 蛋白的表达较空白组下降, 说明 VEGFR-2 在血管生成这个过程中的确影响到信号通路的下游蛋白。

用 IC_{50} 的 SU5416 部分阻断 VEGFR-2 后, 下游 Ras 和 MAPK 蛋白表达明显下降, 运用益气活血中药人参和三七提取物干预后, 两个蛋白表达有明显上升, 提示 SU5416 可以阻断血管生成信号通路上的 VEGFR-2, 也表明在 IC_{50} 的 SU5416 部分阻断 VEGFR-2 的条件下, 中药可以直接作用在 Ras 蛋白这一信号靶点上, 并促进信号蛋白 Ras 的表达, 但还暂不能肯定中药是否可以直接作用于 MAPK 上, 因为上游信号蛋白 Ras 的表达增加或活化, 均有可能引发信号的级联反应, 促使下游信号蛋白 MAPK 的增加。因此, 进行了下一步实验, 加入 IC_{50} 的 FPP 部分阻断 Ras 后, 同时加入中药进行干预, 观察其下游 MAPK 蛋白表达的变化。

用 IC_{50} 的 FPP 部分阻断 Ras 后, 下游 MAPK 蛋白表达较空白对照 II 组有明显下降, 加入益气活血中药人参和三七提取物干预后下游信号蛋白 MAPK 表达有明显上升, 提示 FPP 可以阻断血管生成信号通路上的 Ras, 而中药可以直接作用在 MAPK 蛋白这一信号靶点上。

综上, 本实验表明, 益气活血中药人参和三七提取物促进 HUVEC 增殖, 最终达到促血管新生作用, 主要是影响了 VEGFR-2-Ras-MAPK 这一血管生成信号通路, 而中药的有效作用靶点可能正是 VEGFR-2、Ras、MAPK 这三个关键的信号蛋白。这为研究中药复方的作用环节及作用靶标提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] 田伟, 雷燕, 朱凌群, 等. 人参、三七组方对 Ras 相关信号蛋白的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29 (9): 802-805.
Tian W, Lei Y, Zhu LQ, et al. Effect of Ginseng-Sanqi ex-

- tract on the Ras associated signal proteins[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2009, 29(9):802-805.
- [2] Francis JG, Alison TS, Lewis R, et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2003, 102(3):795-801.
- [3] 屈凌波, 郭宗儒. 法尼基转移酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 1998, 8(4):305-310.
Qu LB, Guo ZR. Advances in the study of farnesyltransferase inhibitors[J]. Chin J Med Chem, 1998, 8(4):305-310.
- [4] Woodward, Julia KL, Coleman, et al. Preclinical evidence for the effect of bisphosphonates and cytotoxic drugs on tumor cell invasion[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(1):11-19.
- [5] Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, et al. Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent[J]. Anticancer Drug Des, 2000, 15(1):29-41.
- [6] Lannuzel M, Lamothe M, Schambel P, et al. From pure FPP to mixed FPP and CAAX competitive inhibitors of farnesyl protein transferase[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(8):1459-1462.
- [7] 黄文林, 朱孝峰. 信号转导[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:70-75.
Huang WL, Zhu XF, editors. Signal transduction[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005:70-75.
- [8] Fong TA, Shawver LK, Sun L, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types[J]. Cancer Res, 1999, 59(1):99-106.
- [9] 侍立志, 王兆春, 陈紫平, 等. 血管生成抑制剂 SU5416 对大鼠胰腺癌生长和转移的抑制作用[J]. 中华普通外科杂志, 2004, 19(7):404-407.
Shi LZ, Wang ZC, Chen ZP, et al. Inhibition of angiogenesis inhibitor SU5416 on growth and metastasis of experimental rat pancreatic cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2004, 19(7):404-407.
- [10] 张国锋, 王元和, 王强, 等. SU5416 抑制胃癌生长和肝转移的实验研究[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(4):213-215.
Zhang GF, Wang YH, Wang Q, et al. Inhibition of growth and metastasis of implanted human gastric cancer in nude mice by SU5416[J]. Chin J Dig, 2002, 22(4):213-215.
- [11] 李万成, 刘维佳, 李艳萍, 等. 血管内皮生长因子受体抑制剂 SU5416 对小鼠肺间质纤维化的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2007, 6(1):55-58.
Li WC, Liu WJ, Li YP, et al. Effect of SU5416 on the inflammation of pulmonary fibrosis in mice[J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2007, 6(1):55-58.

(收稿:2010-01-05 修回:2010-05-26)

中国中西医结合泌尿外科第八次学术年会在天津召开

由中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会主办,天津市泌尿外科研究所、天津医科大学第二医院承办的中国中西医结合泌尿外科第八次学术年会暨天津市泌尿外科研究所建所 30 周年学术研讨会于 2010 年 6 月 26 日在天津顺利召开。

本次会议得到了中国中西医结合学会、中华医学会泌尿外科分会、天津市中西医结合学会、天津市医学会的大力支持。大会主席、中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会主任委员张亚强教授致开幕词,中国工程院院士吴咸中院士、中国工程院院士郭应禄院士、著名泌尿外科前辈马腾骧教授、中国中西医结合学会秘书长穆大伟教授、中华医学会泌尿外科分会主任委员邢彦群教授、天津市卫生局局长王贺胜教授、天津医科大学副校长张宁教授、天津医科大学第二医院院长王林教授到会并发表重要讲话,他们对近年来中西医结合泌尿科学所取得的成绩表示肯定,对学科的发展寄予厚望;并一致向天津市泌尿外科研究所建所 30 周年表示祝贺!本次大会组委会主席、天津市泌尿外科研究所所长韩瑞发教授主持开幕式。

参加会议的代表来自全国 20 多个省市,共 300 多人。会议共收到学术论文 242 篇,其中泌尿生殖系肿瘤 48 篇,膀胱炎性疾病 13 篇,前列腺疾病 52 篇,尿石症 44 篇,微创泌尿外科 21 篇,男性生殖系疾病 24 篇,基础研究及其他疾病 40 篇。

本次大会体现临床与基础相结合、国际与国内相结合的特点,突出“精、细、新”的学科特色,邀请国内外著名泌尿外科专家 Chawnshang Chang(美国)、陈志强(广州)、Yi Luo(美国)、金讯波(山东)、Saleh Altuwaijri(美国)、赵高贤(河南)、赵耀瑞(天津)、高文喜(湖北)、符庆吉(大连)、朱远杰(天津)、王昭辉(广东)、张家华(重庆)、周利群(北京)、李黎明(天津)等分别作了专题学术讲座,内容涉及中西医结合泌尿外科发展战略与人才培养、中医与泌尿外科的关系、泌尿系结石、肿瘤、前列腺疾病、微创泌尿外科技术等,反映了泌尿外科疾病中西医结合研究领域的最新动态。

这次会议是中西医结合泌尿外科在新世纪的又一次高规格的学术盛会,会议内容新颖,几乎涵盖了近年中西医结合泌尿外科领域的新思路、新进展,充分显示了中西医结合在防治泌尿系统疾病中的优势,为推进中西医结合泌尿外科学术发展发挥积极作用。

本次会议成立了中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会青年委员会,设青年委员会主任委员 1 人,副主任委员 1 人,委员 25 人,为学会的发展注入了新鲜血液。

(卢建新 宋竖旗供稿)

(收稿:2010-07-16)