

PTK787 对转基因斑马鱼血管生成的影响

陈锡强^{1,2} 刘可春^{1,2} 韩利文^{1,3} 何秋霞^{1,2} 袁延强^{1,2} 侯海荣^{1,2} 王希敏^{1,2}

(1.山东省生物传感器重点实验室 2.山东省科学院药物筛选技术研发平台 山东省济南市 250014)

[摘要] **目的:** 观察 PTK787 对转基因荧光斑马鱼的节间血管生成的影响 **方法** 采用荧光显像的方法考察多个浓度 PTK787 对斑马鱼节间血管生成的抑制率, 并对各浓度下各组胚胎的毒性反应进行考察。**结果** 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 以上浓度都具有明显的抑制血管生成的作用, 使 36hpf 后斑马鱼节间血管生成受到明显抑制。同时在 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 以上有心脏囊肿、心脏线性化、翘尾发生。**结论:** PTK787 可以有效的抑制转基因斑马鱼节间血管形成, 同时具有致畸作用。

[关键词] PTK787 斑马鱼 节间血管

The Inhibitory Effect of PTK787 on Angiogenesis of Transgenic Zebrafish

Chen Xiqiang^{1,2}, Hou Hairong^{1,2}, Wang Ximin^{1,2}, Liu Kechun^{1,2}, Han Liwen^{1,2}, He Qiuxia^{1,2}, Yuan Yanqiang^{1,2}.

(1.Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, china 2.Research and Development Platform for Drug Screening of Shandong Academy of Sciences)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of tyrosine kinase inhibitor PTK787 on angiogenesis of transgenic zebrafish, whose blood vessel is marked by green fluorescent protein. **Methods** The number of intersegmental blood vessel and the toxicity of PTK787 were detected by use of fluorescent microscope after the zebrafish was treated with or without PTK787. **Results** The angiogenesis of intersegmental blood vessel was obviously inhibited after the zebrafish was incubated with more than 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PTK787 for 12 h (36 hpf), which was accompanied with pericardial oedema, abnormal in heart development and tail rising. **Conclusion** PTK787 significantly inhibited the angiogenesis of transgenic zebrafish and it might restrain the growth of tumor.

[keywords] PTK787, zebrafish, intersegmental blood vessel

基金项目:山东省科学院科技发展基金项目(No SY2007BS10)

作者简介: 陈锡强, (1972-), 男, 助研, 博士, 主要从事天然活性物质研究。

*通讯作者: 刘可春, (1964-), 男, 研究员, 博士, 从事天然药物研发。Email: hliukch@keylab.net

斑马鱼是近年来逐渐深入研究的模式动物,在斑马鱼早期发育的过程中胚胎透明,可直接观察到各组织器官,由于斑马鱼血管生成的方式比较简单,在显微镜下就能够观察到节间血管、血流和红细胞的形态,因而常常用于血管形成和血液类疾病药物筛选。血管荧光标记的转基因斑马鱼可以清晰地进行斑马鱼节间血管的计数,考察药物的抑制血管生成的作用,能够快捷的计算抑制率。PTK787是目前国内研究较多的一个血管形成抑制剂,本试验考察PTK787对斑马鱼血管生成及对循环系统的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 材料: (1) 转基因斑马鱼(TG) 本实验室养殖,种鱼来自于哈佛大学医学院。

(2) 实验试剂 PTK787 (齐鲁制药有限公司合成实验室提供) 用0.1%二甲基亚砜助溶配制成终浓度 $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 与 $0.0625\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 水溶液,置冰箱中备用。

(3) 主要实验仪器 COIC XSZ-HY 荧光显微镜 重庆光学仪器厂, COIC 倒置生物显微镜 XDS-1B 重庆光学仪器厂, COIC 体视显微镜 ZSA302 重庆光学仪器厂, LRH-250-G 光照培养箱 广东医疗器械厂, 佳能 A-630 数码相机 佳能(中国)有限公司。

1.2 实验方法

(1) 胚胎的准备 实验所用的斑马鱼为血管荧光转基因斑马鱼(VEGFR2: GFP)。斑马鱼的养殖和培育参照Westerfield^[1]的方法。选择成熟斑马鱼雌雄一对,傍晚时放入培育缸中,产卵后取出受精卵,单独放入28℃光照培养箱备用。

(2) 施药 鱼胚胎于24hpf后取出,置于 $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 链霉蛋白酶溶液中数分钟后,用吸管吹去胚胎卵膜,将脱膜胚胎加入96孔板中,每孔一只;将试验药物加入96孔板中,PTK787 $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.0625\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 每个浓度各10个胚胎;对照组10个,不加入任何药物,加药后将96孔板放入日照培养箱24小时。

(3) 结果观察 将试验用96孔板取出,每孔取出30μl溶液,加入1%三卡因溶液麻醉鱼体,随后用吸管吸出鱼体放于载玻片上,在荧光显微镜下观察记录斑马鱼异常和血管荧光强弱状况,并对体节间血管计数。

1.3 血管抑制率的计算

$$\text{阻滞率} = \frac{\text{对照组平均血管数} - \text{实验组平均血管数}}{\text{对照组平均血管数}} \times 100\%$$

1.4 统计分析: 各组指标均以 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示,使用SPSS11.5统计软件进行统计描述,多

个样本均数采用单因素方差分析，组间比较采用 t 检验。

2 试验结果

2.1 PTK787 不同浓度对节间血管抑制率的比较

实验结果显示 PTK787 具有很强的抑制血管生成的作用，在 $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 抑制率达到了 100%，即使在浓度 $0.0625\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时仍然具有部分抑制节间血管形成的作用。

Tab1 Effect of PTK787 inhibited the angiogenesis of transgenic zebrafish' intersegmental blood vessel ($\bar{x}\pm s,n=10$)

sample	solvent	concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	intersegmental blood vessel	Angiogenesis inhibition rate(%)
control		blank	29.8 ± 1.40	0
		1	0	100
		0.5	0	100
PTK787 [#]	DMSO	0.25	$2.4\pm 1.58^{**}$	91.9
		0.125	$9.6\pm 3.34^{**}$	68.7
		0.0625	$21.6\pm 4.77^{**}$	20.7

*See Tab 1 for zebrafish treatments ,The intersegmental blood vessel were examined with at 24h PTK787(pretreatment) . $\bar{x}\pm s,n=10$,compared with contrlo group * $p<0.05$,** $p<0.01$.

2.2 斑马鱼对不同浓度 PTK787 的毒性反应

在 $0.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度以上各组胚胎出现了心脏囊肿、心脏线形化、心率缓慢和翘尾的体态变化，并且具有浓度依赖性。

Tab 2 Teratogenicity of PTK787 inhibited the angiogenesis of transgenic zebrafish test

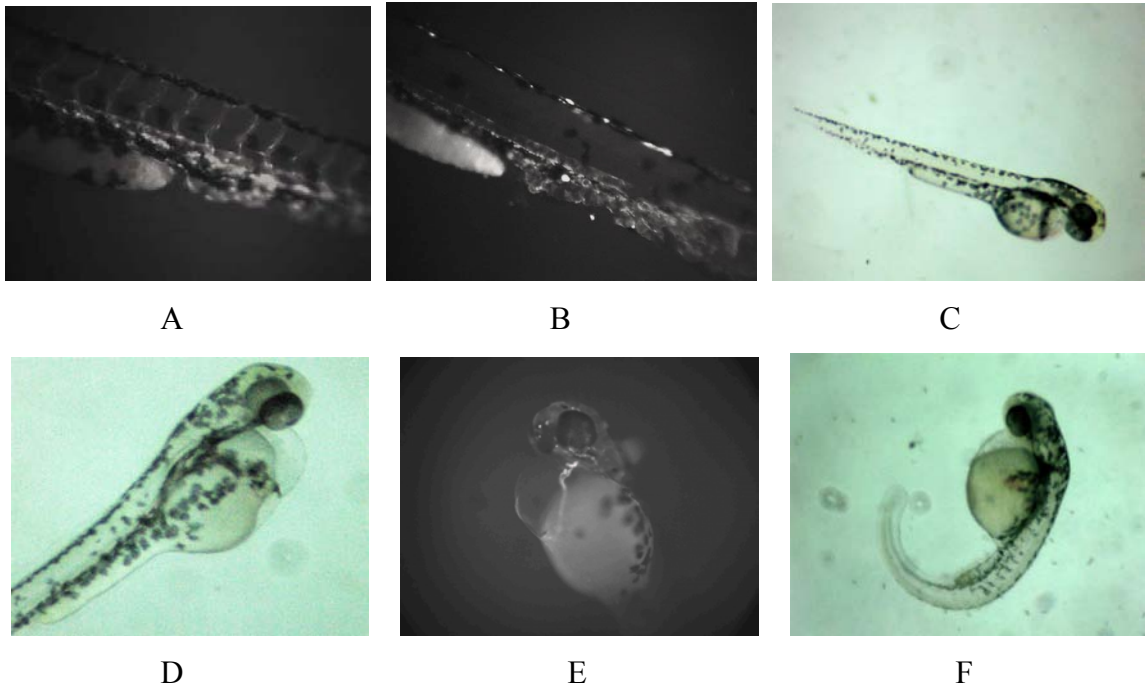
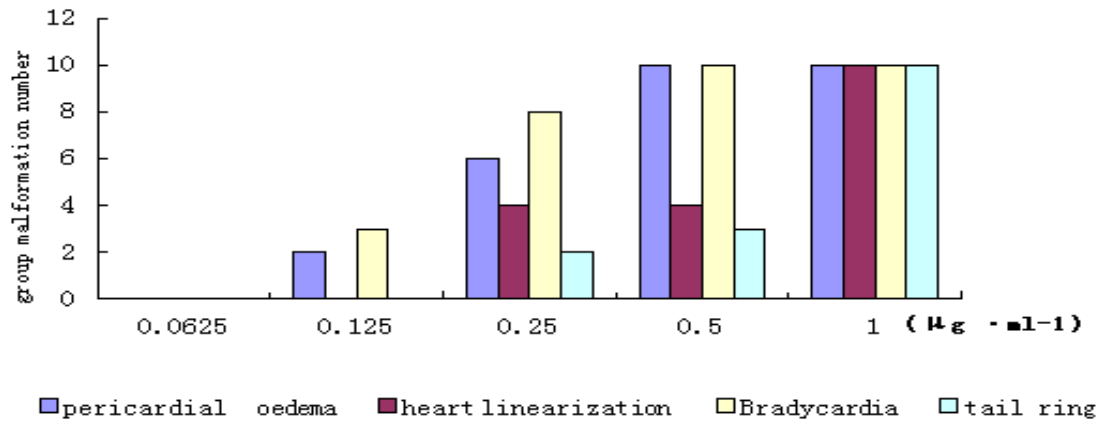


Fig 1 representative photomicrographs of PTK787 inhibited the angiogenesis of transgenic zebrafish test A photo of fluorescent intersegmental blood vessel of control group, B photo of PTK787 treated group, C is the photo of control group form, D-E teratogenicity of PTK787 ,D image of pericardial oedema , E image of heart linearization , F image of tail rising.

3 讨论

血管生成对肿瘤的生长和转移都有非常重要的意义，试验研究也发现多种实体瘤组织

都存在 VEGF 过度表达的现象,因而阻断肿瘤血管生成从而阻止肿瘤生长和转移是较为理想的肿瘤治疗途径之一^[2]。转基因斑马鱼是近年来新兴的抗肿瘤药物筛选模型,相对于分子水平、细胞水平筛选模型有很强的优势:斑马鱼胚胎透明易于观察内部器官、试验周期短、样品用量少等优点。目前斑马鱼基因组测序工程的完成,揭示了斑马鱼基因组与人类基因保守度达到了 85%,人的很多基因在斑马鱼中克隆得到,并且具有相似的功能。本实验中所用转基因斑马鱼是将荧光蛋白标记在血管 VEGFR 上,血管在紫外光激发下显现出荧光血管的形态,可在显微镜下直接观察计数,观察血管的形成非常简易方便。

PTK787 是 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂,它既可以作用了 VEGFR-2,又可以作用于 VEGFR-1,竞争性结合 ATP 结合位点,阻止磷酸化过程,阻断 VEGF 信号传递,达到抑制肿瘤血管的形成的目的^[3];在实体瘤抑制实验中, Lee 证实 PTK787 对转移性黑色素瘤具有良好的抗肿瘤效应^[4]。试验发现 PTK787 能有效抑制 SCID 小鼠-人 AML 模型中骨髓血管单位面积的血管数量^[5]。

在本试验中,我们选择了对斑马鱼自身发育无影响助溶剂,对本实验结果无影响^[6]。相对于较前的研究,我们发现 PTK787 除了具有良好的阻止血管形成的作用外,PTK787 对胚胎的早期发育中有致畸作用,PTK787 浓度 $0.25\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及以上药物组对斑马鱼早期心脏的形成有影响,出现心脏囊肿、心脏线性化等现象。

本实验通过荧光斑马鱼模型,验证 PTK787 抑制斑马鱼节间血管生成的作用,PTK787 抑制活性和毒性具有剂量依赖性, $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $0.5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 抑制率达到 100%,各种毒性反应都存在;PTK78 的抑制率在 $0.25\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $0.125\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 有活性而毒性较小,这样的浓度可以作为对照阳性药物来用; $0.125\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度及以下活性变弱,对幼鱼发育的影响消失。PTK787 在本实验中显示其对早期循环系统的形成有致畸作用,这样的毒性是否会影响它在临床上的应用,其副作用的危害究竟有多大?是否在可控范围内?这些疑问还要通过更为系统的试验研究来揭示。

[参考文献]

- [1].Westerfield M, Wegner J, Jegalian BG, Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes Dev.* 1992 Apr;6(4):591-8.
- [2].Folkman J. Tumor Angiogenesis : Therapeutic Implications [J]. *N Engl J Med* ,1971 , 285: 1182-1186.
- [3].Thomas AL, Morgan B, Dreves J, Unger C, Wiedenmann B, Vanhoefer U. et al. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors PTK787/ZK222584. *Semin Oncol.* 2003 Jun;30(3 Suppl 6):32-8.

- [4].Lee L, Sharma S, Morgan B,Allegri P, Schnell C, Brueggen J, et al. Biomarkers for assessment of pharmacologic activity for a vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor, PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK): translation of biological activity in a mouse melanoma metastasis model to phase I studies in patients with advanced colorectal cancer with liver metastases.cancer chemother pharmacol, 2006, Jun; 57(6):761--71.
- [5].陈日玲, 王欢, 田川, 陈铭珍, 叶泉英. PTK787 在 SCID 小鼠-人 AML 模型中的抗骨髓血管生成作用研究.医学研究杂志, 2008, 37(5): 23-27.
- [6].王思锋, 王希敏, 候海荣, 刘可春, 韩利文, 陈锡强等.有机溶剂对血管生成斑马鱼模型的适用性研究. 实验动物与比较医学,2008, 28(4): 238-241,