

青蒿琥酯纳米脂质体对人肝癌 HepG2 细胞抗血管生成作用的研究

赵春霞, 沈雪松*, 金美华, 黄丽芳, 刘汉甫
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**探讨在青蒿琥酯纳米脂质体的干预下,血管内皮生长因子(VEGF)及血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)在 HepG2 中的表达,为肝癌的治疗提供理论依据。**方法:**取对数生长期 HepG2 细胞制成 3×10^5 /mL 单细胞悬液,接种于 35 cm^2 培养皿中培养 24 h 后给药,分别设生理盐水对照组、青蒿琥酯原料药组、青蒿琥酯纳米脂质体组(浓度均为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),药物作用 24 h。采用 RT-PCR 法检测各处理组 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 及 VEGFR2 mRNA 的表达水平;Western blotting 法检测各处理组 HepG2 细胞中 VEGF 及 VEGFR2 的蛋白表达水平。**结果:**青蒿琥酯纳米脂质体组 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 相对表达量为 $0.22 \pm 0.02, 0.09 \pm 0.02$;对照组为 $0.55 \pm 0.03, 0.53 \pm 0.02$;青蒿琥酯纳米脂质体组 VEGF, VEGFR2 蛋白相对表达量为 $0.33 \pm 0.06, 0.25 \pm 0.06$,对照组为 $0.95 \pm 0.03, 0.78 \pm 0.03$, ($P < 0.05$)。青蒿琥酯纳米脂质体组与原料药组的 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 表达和蛋白表达均低于对照组,且纳米脂质体组表达量低于原料药组。**结论:**青蒿琥酯纳米脂质体能够抑制肿瘤血管的生成达到抗肿瘤作用,且作用强于青蒿琥酯原料药,有应用于肝癌治疗的潜在价值。

[关键词] 青蒿琥酯; 纳米脂质体; 肝癌; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0226-04

[doi] 10.11653/zgsyxfjxzz2013070226

Anti-angiogenesis Effect of Artesunate Nano-liposomes on Liver Cancer Cell Line HepG2

ZHAO Chun-xia, SHEN Xue-song*, JIN Mei-hua, HUANG Li-fang, LIU Han-fu
(Guilin University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of artesunate nano-liposomes on vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor expression in HepG2 cells, provide the basic theory for liver cancer treatment. **Method:** HepG2 cells were cultured *in vitro*. Expression levels of VEGF mRNA and VEGFR-2 mRNA in HepG2 cells were evaluated in the control group, the artesunate active pharmaceutical ingredient (API) group and the artesunate nano-liposomes group by using RT-PCR method, protein expression levels of VEGF and VEGFR2 in HepG2 cells were detected by Western blotting method. **Result:** Compared mean values between the three groups, the artesunate nano-liposomes and the artesunate API could decrease the protein expression levels of mRNA and of VEGF and VEGFR2 in HepG2 cells ($P < 0.05$). The expression intensity of the artesunate nano-liposomes group was lower than that of the artesunate API group. **Conclusion:** Artesunate nano-liposomes could inhibit the formation of new blood vessels, suppress tumor cells and have the potential use for the treatment of liver cancer.

[Key words] artesunate; nano-liposome; liver cancer; VEGF; VEGFR2

[收稿日期] 20120829(016)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(0728227);广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053137);广西教育厅科学研究项目(201012MS171)

[第一作者] 赵春霞,硕士研究生,从事肝癌的研究,Tel:15878383089,E-mail:chunxia121310@yahoo.com

[通讯作者] *沈雪松,教授,硕士研究生导师,从事物理药剂学研究,E-mail:shenmedxs@163.com

肿瘤的生长过程伴有血管的不断生成,从而为肿瘤细胞的旺盛生长提供营养。新生血管的生长又为肿瘤细胞转移创造了有利条件,因此抗肿瘤血管生成,切断肿瘤细胞的营养供应和转移途径成为肿瘤治疗的新策略^[1-4]。青蒿琥酯(artemunate)是具有倍半萜结构的抗疟疾药青蒿素(artemisinin)的水溶性衍生物,多用于抢救和治疗脑型疟疾和恶性疟疾等。邓定安^[5]首次发现青蒿琥酯还具有明显的抗肿瘤作用,尤其是它对多药耐药的肿瘤细胞具有活性^[6-7],毒副作用较小^[8],但是由于其快速起效、快速消除的特点^[9],临床治疗需要频繁给药,患者依从性差,治疗效果不理想。因此青蒿琥酯的缓释制剂被视为解决弊端的有效方法。纳米脂质体作为一种新型药物载体,具有缓释、减少药物治疗剂量、降低药物的不良反应、被动靶向性等特点,且脂质体本身对人体无毒性及免疫抑制作用。尤其作为抗肿瘤药物的载体,能延长药物的血液循环时间,能有效的聚集在肿瘤部位,增强药物抗肿瘤作用^[10-14]。青蒿琥酯纳米脂质体结合了青蒿琥酯抗肿瘤作用的优点及纳米脂质体所具有的优势,但其是否具有更优良的抗肿瘤作用以及同时具有抑制血管生成的作用,尚未见报道,为此对其进行了研究和机制的探讨。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 HepG2 细胞株由桂林医学院科学实验中心所提供。

1.2 药品和试剂 青蒿琥酯原料药(桂林南药有限公司提供,批号 050409),青蒿琥酯纳米脂质体(本课题组自制,参考课题组发表论文^[15-18]),DMEM 培养基、胰蛋白酶(批号 27250018,美国 GRL Gibco 公司),无支原体新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),Trizol(Takara 公司);反转录试剂盒(Takara 公司),PCR 基因扩增引物(上海生物工程有限公司),TaqDNA 聚合酶(康为世纪有限公司),Western 及 Ip 细胞裂解液,蛋白酶抑制剂 PMSF,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,预染蛋白质分子量标准,鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:200),兔抗人 VEGFR2 单克隆抗体(1:300~1:1 000), β -actin 抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(1:5 000),(均为中杉金桥公司提供)。

1.3 仪器 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),MLDEL680 型酶标仪(美国伯乐公司),紫外分光光度仪(日本岛津公司),微量台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Sorvall),恒温震荡仪(常州国华电器有限公司),恒温水浴锅(上海亚荣生

化仪器厂),电子天平(德国 Startorius),基因扩增仪(德国 Biometra),蛋白垂直电泳槽,半干转膜仪(Bio-Rad 公司),全自动数码凝胶成像分析系统(南宁精密仪表有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2 细胞株常规方法复苏后,用含 12% 小牛血清的 DMEM 的低糖培养基,置 5% CO₂ 培养箱(37 °C,相对湿度 95%)培养,2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞制成 3×10^5 单细胞悬液,接种于 35 cm² 培养皿中继续培养,24 h 后给药,分别设生理盐水对照组、青蒿琥酯原料药组、青蒿琥酯纳米脂质体组(浓度均为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)给药后 24 h 收集备用。

2.2 检测 HepG2 细胞中 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 的表达水平 收集各组细胞按 Trizol 说明书分别提取总 RNA,利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计。
① VEGF 引物,上游:5'-CGGATCAAACCTCACC-3',下游:5'-ATTTTCTGGC TTTGTTCTATCT-3',扩增产物片段为 102 bp,退火温度 45 °C。
② VEGFR2 引物,上游:5'-ACAGGC AACATCGGTCCA-3',下游:5'-GAAATGCCACAA TCAAGATGTC-3',扩增产物片段为 125 bp,退火温度 60 °C。
③ 内参照 GAPDH,上游:5'-CGAGCACAGAGCCCTCGCCTTTG-3',下游:5'-GCCAGATTTTCTCCATGTCGTCCC-3',扩增产物片段 313 bp,退火温度 58 °C。根据 Taq 酶说明书体系进行基因扩增,PCR 循环参数设置:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,72 °C 延伸 30 s,不同温度退火 30 s:VEGF 为 45 °C,VEGFR-2 为 60 °C,GAPDH 为 58 °C。反应 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。然后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。结果用全自动数码凝胶成像分析系统对扩增产物条带进行分析,分别测定各扩增带吸光度(A),将目的基因 VEGF,VEGFR2 扩增带分别与内参照 GAPDH 扩增带的 A 值比作为其 mRNA 水平的定量指标。

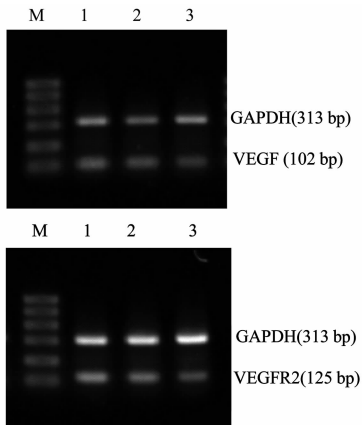
2.3 HepG2 细胞总蛋白的提取及检测 HepG2 细胞中 VEGF 及 VEGFR2 的蛋白表达水平 分别收集各组细胞,根据蛋白提取试剂盒说明提取蛋白,用酶标仪测定总蛋白浓度后 -80 °C 储存。Western blot 检测 VEGF 及 VEGFR2 蛋白表达:每组取 50 μg 总蛋白,按 1:3 比例加入 4 \times SDS 样品溶解液(10% 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl pH 6.8,4% SDS,0.2% 溴酚蓝,20% 2-巯基乙醇,40% 甘油),100 °C 加热 5 min 使蛋白变性。经 12% (VEGF 用到) 及 5% (VEGFR2

用到) SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 半干法转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 鼠抗 VEGF 及 VEGFR2 抗体(稀释度 1: 400) 孵育, 4 ℃ 过夜, TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗(稀释度 1: 1 000) 室温孵育 2 h, TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 然后 ECL 试剂进行发光检测。用全自动数码凝胶成像分析系统分析蛋白条带的灰度值。

2.4 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较用方差分析, 其中两两比较用 LSD 检验, 检验标准均采用 $P < 0.05$ 为统计学差异具有显著性, 所有统计学分析均使用 SPSS 17.0 统计软件。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞的 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 表达影响 对照组、青蒿琥酯原料药组、青蒿琥酯纳米脂质体组 3 组相比较, 纳米脂质体组与原料药组的 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 表达减少 ($P < 0.05$) 并且纳米脂质体组表达量低于原料药组 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。



M. marker; 1. 对照组; 2. 青蒿琥酯原料药 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
3. 青蒿琥酯纳米脂质体 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 RT-PCR 分析各组 VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达比较

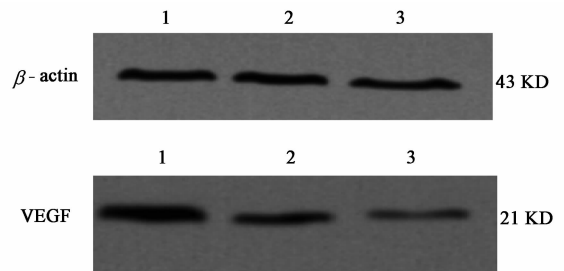
表 1 各处理组 HepG2 细胞 VEGF, VEGFR2 mRNA 相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF $/\text{GAPDH}$	VEGFR2 $/\text{GAPDH}$
对照	-	0.55 ± 0.03	0.53 ± 0.02
青蒿琥酯原料药	50	$0.35 \pm 0.04^{1)}$	$0.28 \pm 0.03^{1)}$
青蒿琥酯脂质体	50	$0.22 \pm 0.02^{1,2)}$	$0.09 \pm 0.02^{1,2)}$

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与青蒿琥酯原料药比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对 HepG2 细胞内 VEGF, 及 VEGFR2 蛋白表达的影响 Western blot 法检测 VEGF 及 VEGFR2 蛋

白表达, 分析显示青蒿琥酯纳米脂质体组的 HepG2 细胞中 VEGF 及 VEGFR2 的蛋白表达明显低于原料药组和对照组, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。见图 2 ~ 3 和表 2。



1. 对照组; 2. 青蒿琥酯原料药 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
3. 青蒿琥酯纳米脂质体 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 3 同)

图 2 Westem blot 检测各组 VEGF 蛋白表达比较

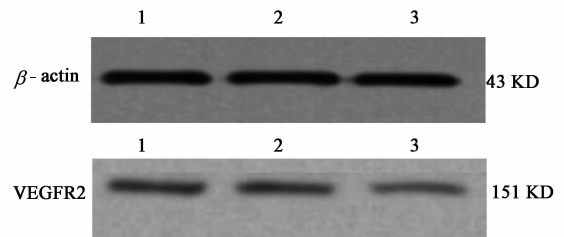


图 3 Westem blot 检测各组 VEGFR2 蛋白表达比较

表 2 各处理组 HepG2 细胞 VEGF, VEGFR2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF $/\beta\text{-actin}$	VEGFR2 $/\beta\text{-actin}$
对照	-	0.95 ± 0.03	0.78 ± 0.03
青蒿琥酯原料药	50	$0.82 \pm 0.03^{1)}$	$0.53 \pm 0.06^{1)}$
青蒿琥酯脂质体	50	$0.33 \pm 0.06^{1,2)}$	$0.25 \pm 0.06^{1,2)}$

4 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)具有促进血管内皮细胞分裂、增殖、细胞质钙聚集以及诱导血管生成等作用。VEGF 与其受体结合后, 可激活丝裂酶原活化蛋白(MAPK)和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号转导通路, 诱导淋巴管内皮细胞有丝分裂产生细胞增殖效应, 刺激新生淋巴管和血管生成, 从而为肿瘤组织提供营养物质, 加速肿瘤的生长和转移过程。因此, 通过抑制 VEGF 因子分泌或下调其受体的表达, 可以有效抑制肿瘤新生血管的形成, 起到抗肿瘤的作用。

青蒿素类药物通过抗血管生成的达到抗肿瘤机制等得到很多学者的认可, 本实验研究结果: 青蒿琥酯纳米脂质体组和青蒿琥酯原料药组相对于对照组均能明显地下调肿瘤细胞的 VEGF 及 VEGFR-2 的

mRNA 表达和蛋白表达 ($P < 0.05$),且纳米脂质体组 VEGF 及 VEGFR2 mRNA 表达和蛋白表达低于原料药组 ($P < 0.05$)。结合本课题前期细胞生长抑制试验结果,当药物浓度达到 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,青蒿琥酯纳米脂质体的细胞生长抑制率为 90.9%,青蒿琥酯的抑制率为 85.1%^[15]。可考虑青蒿琥酯原料药和青蒿琥酯纳米脂质体均可通过抑制 VEGF 及 VEGFR2 的表达抑制肿瘤血管的生成,以达到抗肿瘤的目的,且青蒿琥酯纳米脂质体作用强于青蒿琥酯原料药,纳米脂质体可有效增加药物的抗肿瘤效果。

鉴于体外研究可以有效的控制实验条件,但为了更好的说明其体内作用效果,本课题组已经制做了肝癌的裸鼠模型,观察到用药组裸鼠腋下肿瘤表面皮肤血管明显少于生理盐水对照组,同时正在拟用分子生物学方法验证和统计学方法对血管分布进行统计学处理,有待进一步的研究结果。

[参考文献]

[1] Gerald M M. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis [J]. *The Oncologist*, 2000, 3:1634.

[2] Hyun J B, Jeong H L, Boh R K, et al. Anti-angiogenic effects of thioridazine involving the FAK-mTOR pathway [J]. *Microvascular Research*, 2012, 3(84):223.

[3] 魏正茂,路军章,窦永起. 天然药物对肿瘤组织中血管内皮生长因子调节作用的研究现状[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(6):66.

[4] 欧阳华强,黄雯霞,宋明志,等. 消瘦方抑制人乳腺癌裸鼠移植瘤血管内皮生长因子表达的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(3):44.

[5] 邓定安. 具有抗肿瘤活性的青蒿 B 衍生物[J]. *药理学报*, 1992(4):317.

[6] Ribeiro I R, Olliaro P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials[J]. *Med Trop*, 1998, 58(3): 50.

[7] Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(2): 82.

[8] Johann-Liang R, Albrecht R. Safety evaluations of drugs containing artemisinin derivatives for the treatment of malaria[J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 36(12): 1627.

[9] Barradell L B, Fitton A. Arteunate: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of malaria[J]. *Drugs*, 1995, 50: 714.

[10] Rasheed S A, Efferth T, Asanani I A, et al. First evidence that the antimalarial drug artesunate inhibits invasion and *in vivo* metastasis in lung cancer by targeting essential extracellular proteases [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(6): 1475.

[11] 熊清平,张强华,徐燕萍,等. 白藜芦醇固体脂质纳米粒抑制小鼠移植性肿瘤 H22 的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2):153.

[12] 洪怡,何伟,李丹,等. 黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3): 29.

[13] 凌家俊,古锦辉,谢毅,等. 羟基喜树碱磁性脂质体的制备及其靶向性特征试验[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(16):19.

[14] 瞿叶清,陈军,林爱华,等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3):143.

[15] 金美华,沈雪松,赵春霞. 青蒿琥酯纳米脂质体抗人肝癌 HEPG2 细胞作用研究[J]. *华夏医学*, 2011, 24(6):638.

[16] Shen X S, Su Q, Qiu Z P, et al. Effects of artemisinin derivative on the growth metabolism of *tetrahymena thermophila* BF5 based on expression of thermokinetics [J]. *Biological Trace Element Research*, 2010, 136(1):17.

[17] Shen Xuesong, Wang Tao, Jin Meihua, et al. Microcalorimetric studies of the effects of artesunate liposomes on the Metabolism of *Escherichia coli* during growth[J]. *J Them Anal Calorim*, 2012, 107:1307.

[18] 沈雪松,徐伟,金美华,等. 青蒿琥酯纳米脂质体在大鼠体内药动学研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2):384.

[责任编辑 聂淑琴]