

23-羟基白桦酸抑制血管内皮细胞增殖和诱导凋亡的实验

蒋孟军, 杨敏, 周尧远, 张荣军, 曹国宪, 蔡刚明

Proliferation Inhibition and Apoptosis Induction of HMEC Cells by 23-HBA

JIANG Meng-jun, YANG Min, ZHOU Yao-yuan, ZHANG Rong-jun, CAO Guo-xian, CAI Gang-ming
Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, The Key Lab of Nuclear Medicine of Ministry of Public Health, Wuxi 214063, China

Abstract: Objective To study the proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of 23-hydroxy betulinic acid (23-HBA) on human microcapillary endothelial cells (HMEC). **Methods** The effect of 23-HBA on *in vitro* proliferation of HMEC was examined by SRB assay. The effect of 23-HBA on the cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** The proliferation of HMEC was inhibited significantly by 23-HBA with IC_{50} being 40.44 $\mu\text{g/ml}$. Apoptosis peak was also shown by flow cytometry. The percentage of cell apoptosis increased with the increase of the drug concentration, and the increase rate was significantly higher than that of the control cell group. The content of cells increased in S phase and decreased in G_2/M phase. **Conclusion** 23-HBA can inhibit HMEC proliferation and induce apoptosis, could be developed as an anti-angiogenic drug.

Key words: 23-Hydroxy betulinic acid; Microcapillary endothelial cell; Proliferation; Apoptosis

摘要:目的 研究 23-羟基白桦酸(23-hydroxy betulinic acid, 23-HBA)对人血管内皮细胞(human microcapillary endothelial cells, HMEC)增殖及凋亡的影响。方法 采用 SRB 法测定 23-HBA 对 HMEC 增殖的抑制率,并用流式细胞术测定 23-HBA 对 HMEC 周期及凋亡的影响。结果 23-HBA 可明显抑制 HMEC 的体外增殖, IC_{50} 为 40.44 $\mu\text{g/ml}$ 。流式细胞术测定, HMEC 出现典型的凋亡峰,其凋亡百分率随着药物浓度的提高而明显升高,与对照组相比,差别有统计学意义。HMEC 的 S 期细胞含量明显上升,而 G_2/M 期细胞含量下降。结论 23-HBA 具有明显抑制血管内皮细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用。

关键词: 23-羟基白桦酸;血管内皮细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:Q24;Q319.33;R730.5;R282

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2007)12-0911-03

收稿日期:2007-01-05;修回日期:2007-03-15

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2004025)

作者单位:214063 江苏无锡,江苏省原子医学研究所、卫生部核医学重点实验室

作者简介:蒋孟军(1972-),男,大专,助理研究员,主要从事核医学研究

0 引言

1971年,Folkman最早提出肿瘤生长是血管依赖性的,肿瘤血管生成是肿瘤赖以发展及转移的重要条件。2~3 mm³大小以上肿瘤的生长需要通过微血管网获得营养并排除代谢产物^[1-3]。血管的形成其中包括了血管内皮细胞的增殖和游走,构成血管样结构,

参考文献:

- [1] Shi XZ, Sarna SK. Transcriptional regulation of inflammatory mediators secreted by human colonic circular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 2005, 289(2): G274-284.
- [2] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism[J]. Cell, 1986, 47(6): 921-928.
- [3] Aggarwal BB. Nuclear factor- B: The enemy within[J]. Cancer Cell, 2004, 6(3): 203-208.
- [4] 田芳, 许培荣, 侯卫红, 等. NF- B 信号通路在食管鳞癌细胞系中的激活[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(1): 11-14.
- [5] Wang WX, Abbtuzzese JL, Evans DB, et al. The nuclear factor- B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Clin Can Res, 1999, 5

(8): 119-127.

- [6] Liptay S, Weber CK, Ludwig L, et al. Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF- B/Rel activity in pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2003, 105(6): 735-746.
- [7] Kang X, Wang F, Xie JD, et al. Clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(27): 4250-4253.
- [8] Rahman A, Anwar KN, True AL, et al. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion[J]. J Immunol, 1999, 162(9): 5466-5476.

[编辑:安凤;校对:贺文]

在这一过程中包含了肿瘤细胞与正常血管内皮细胞的相互作用。因此,抑制血管内皮细胞的增殖可切断肿瘤细胞的营养来源,抑制其生长、转移。

23-羟基白桦酸是从中药白头翁根部提取的活性成分,近年来随着对其化学成分和药理作用研究的不断深入,已取得一些新的进展,发现其具有显著药理活性,其醇提物和水提物均有抗肿瘤作用,体内、外抑瘤实验表明,它较白头翁中提取的其他衍生物抗癌作用更强^[4,5]。但由于其抗癌作用机制还不明确,限制了其抗癌作用的发挥。本实验探讨 23-HBA 对血管内皮细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 23-HBA 由中国药科大学叶文才教授惠赠;磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B, SRB)、EGF 为 SIGMA 产品;MCDB-131 培养基为 GIBICOL 产品;小牛血清购自杭州四季青生物公司;细胞培养板为 NUNC 产品;荧光显微镜为 OLYMPUS IX 51;酶标仪为 BIO-RAD MODEL 3550;流式细胞仪为美国 BIO-RAD 公司的 BRYTE HS,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞株及细胞培养 HMEC 由法国国家卫生医学研究院惠赠。培养基为含 1 mmol 谷氨酰胺, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化可的松, 10 ng/ml EGF 和 15% 小牛血清的 MCDB-131 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 湿化 CO_2 培养箱中传代培养。

1.3 23-HBA 对各细胞株的体外增殖试验 参照 Skehan 等^[6]的 SRB 方法测定 23-HBA 对细胞的增殖抑制率。取对数生长期细胞铺到 96 孔板中,过夜。加不同浓度(10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 23-HBA,以溶媒 DMSO 为阴性对照培养 72 h。去上清,细胞固定,0.4% SRB 染色,Tris 碱液溶解,531 nm 波长处测定每孔的 OD 值。抑制率(%) = (对照组 A 值 - 药敏组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) \times 100%。同时绘制药剂浓度抑制率曲线,求出半数细胞抑制浓度(IC_{50})。

1.4 细胞形态学观察 24 孔板中先加入玻璃片,再加对数生长期 HMEC 细胞,培养 24 h,加不同浓度(1~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 23-HBA 培养 72 h,取出玻璃片,0.001 M PBS, pH 7.4 洗涤,用冷丙酮固定,HE 染色,观察凋亡细胞的形态学改变并拍照。

1.5 流式细胞仪分析 取对数生长期细胞,以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞接种于 6 孔板,每孔 4 ml,每组设 4 个平行孔,培养过夜。加不同浓度(1~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 23-HBA,以溶媒 DMSO 为阴性对照,培养 72 h 后用胰酶消化,收集细胞,0.001 M PBS, pH 7.4 洗涤

后固定在 75% 冷乙醇 PBS 中 24 h。固定的细胞再用上述 PBS 洗涤 3 次,制成单细胞悬液,加入 1 ml PI 染色液(50 mg/ml PI, 0.1% 柠檬酸钠, 1.0% Triton X-100, 1 mg/ml RNase A), 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,流式细胞仪测定,Modfit 1.0 软件分析细胞群体中各倍体 DNA 含量、细胞周期及细胞凋亡。

1.6 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件,各组间应用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 23-HBA 对血管内皮细胞体外增殖的抑制作用 23-HBA 对 HMEC 的增殖有明显的抑制作用。加入 23-HBA 24 h 后,可见细胞增殖变慢,细胞内颗粒增多,48~72 h 后随着 23-HBA 浓度增加贴壁细胞减少,悬浮细胞增多,细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性,见图 1, HMEC 细胞的 IC_{50} 为 40.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

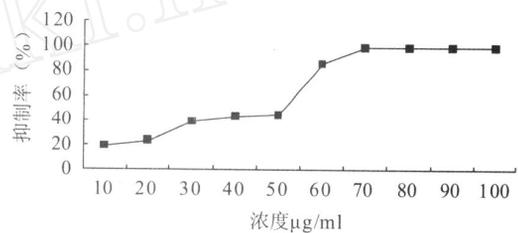


图 1 23-HBA 对 HMEC 细胞的生长抑制作用($n=4, \bar{x} \pm s$)

2.2 23-HBA 对血管内皮细胞的形态学影响 正常的血管内皮细胞经染色仍然保持原有的生长形状,细胞核完整,染成均一蓝色或略带一点红色。加 23-HBA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,部分细胞开始凋亡,贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落,细胞的体积变小、变形,细胞膜完整但出现发泡现象,细胞核呈蓝黑色,胞浆呈淡红色或深红色,染色质浓缩、边缘化,核膜裂解、染色质分割成块状。当 23-HBA 浓度提高到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, HMEC 细胞的凋亡现象更加明显,并呈剂量依赖性,见图 2。

2.3 23-HBA 对细胞周期及凋亡的影响 乙醇固定细胞使细胞膜通透,降解的 DNA 释放至细胞外,低于 $G_0 \sim G_1$ 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。HMEC 细胞经 23-HBA 作用 72 h 时,与对照组相比,细胞凋亡明显增加, S 期细胞比例明显增多, G_2/M 细胞比例明显减少,产生 S 期阻滞,而 G_0/G_1 期细胞增殖基本不受影响。

3 讨论

Folkman^[7] 提出抗血管疗法,设想抑制肿瘤血管生成,使肿瘤细胞因缺血、缺氧而大部分死亡,从

表 1 23-HBA 对 HMEC 细胞周期及凋亡的影响(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M (%)	S (%)	Apoptosis (%)
正常对照组	45.77 ±6.12	31.67 ±3.07	22.25 ±1.93	1.02 ±0.62
1 μg/ml 23-HBA	49.48 ±7.63	27.85 ±4.14	22.80 ±4.28	32.14 ±7.24 ^b
5 μg/ml 23-HBA	50.73 ±6.55	23.47 ±5.11 ^a	25.77 ±6.74	33.30 ±6.29 ^b
10 μg/ml 23-HBA	51.57 ±4.76	21.66 ±4.77 ^a	26.73 ±5.25	39.94 ±7.30 ^b
20 μg/ml 23-HBA	52.65 ±4.35	21.20 ±3.55 ^a	27.50 ±4.40 ^a	46.77 ±2.41 ^b
40 μg/ml 23-HBA	47.79 ±5.87	15.77 ±3.72 ^b	39.23 ±7.21 ^b	48.09 ±4.96 ^b

注:^a P < 0.05; ^b P < 0.01

而可延缓晚期肿瘤生长,延长病人带瘤生存期,并可抑制亚临床转移灶生长,推迟复发。这一设想为越来越多的证据所支持,并使这一领域成为肿瘤研究的热点及肿瘤治疗的新策略。与传统的抗癌治疗相比,抗血管生成治疗具有许多优势:(1)正常血管内皮细胞常处于不分裂状态,抗血管生成治疗对正常内皮细胞影响不大;(2)血管内皮细胞暴露在血液中,药物能够直接发挥作用;(3)血管内皮细胞基因表达相对稳定,不易产生耐药性^[8,9]; (4)作用具有放大效果,因为一个内皮细胞支持 50~100 个肿瘤细胞生长^[10]。因此,以新生血管为靶点,抑制肿瘤生成,阻断肿瘤的营养来源和迁移通道,已成为近年来国内外研究的热点^[11,12]。而寻找高效、无毒、价廉、易得的血管生长抑制剂是该领域的关键问题,有可能成为 21 世纪肿瘤治疗的重要手段之一。

传统中药白头翁为多年生草本植物白头翁的干燥根。具有清热解毒、凉血止痢的功效,临床用于阿米巴痢疾、细菌性痢疾和阴道滴虫等疾病。23-HBA 是从白头翁根部分离出的一种五环三萜类皂苷,是中药白头翁的特征性成分,具有广泛的抗肿瘤活性,而且能抑制血管生成^[13]。本实验结果表明,23-HBA 在体外能够明显抑制血管内皮细胞的增殖,IC₅₀为 40.44 μg/ml。直接用光学显微镜观察,23-HBA 对 HMEC 细胞的形态学发生了明显的改变,可见细胞凋亡的发生,并呈剂量依赖性。用流式细胞术测定,23-HBA 作用 72 小时后,与对照组相比,细胞凋亡明显增加,S 期细胞比例明显增多,G₂/M 细胞比例明显减少,而 G₀/G₁ 期细胞增殖基本不受影响,产生 S 期阻滞。因此,23-HBA 具有显著抑制血管内皮细胞的增殖并诱导其凋亡的作用,有可

能成为一种有较好前途的抗肿瘤血管生成抑制剂。
(本文图 2 见第 985 页)

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis:therapeutic implication [J]. New Engl J Med, 1971,285(21):1182-1186.
- [2] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J]. J Natl Cancer Inst,1990,82(1):4-6.
- [3] Sapos EP, Tamargo RJ, Weingart JD, et al. Inhibition of angiogenesis[J]. Ann N Y Acad Sci,1994,732(1):263-272.
- [4] 叶银英,何道伟,叶文才,等. 23-羟基桦木酸体外抗恶性肿瘤作用的研究[J]. 东南大学学报(医学版),2001,20(3):141-144.
- [5] 钟长斌,李祥,陈建伟. 23-羟基白桦酸体内抗肿瘤作用实验研究[J]. 实验中医内科杂志,2003,17(2):80.
- [6] Skehan P,Storeng R,Scudiero D,et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. J Natl Cancer Inst,1990,82(13):1107-1112.
- [7] Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors[J]. Ann Surg, 1972,175(3):409-416.
- [8] Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis [J]. J Pathol,1996,179(2):232-237.
- [9] Scott PA, Harris AL. Current approaches to targeting cancer using antiangiogenesis therapies[J]. Cancer Treat Rev,1994,20(4):393-412.
- [10] Groatall JD, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89(8):3571-3575.
- [11] He ZY, Chen ZY, Qiu CP, et al. Cloning expression and tumor suppression of human endostatin [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2000,32(4):333-336.
- [12] 沈先荣,贾福星,王玲,等. 鲨鱼软骨抑制剂抑制血管生成的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1997,24(2):155-159.
- [13] 蒋孟军,杨敏,周尧远,等. 23-羟基桦木酸体外抑制血管生成的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006,22(1):88-91.

[编辑:贺文;校对:刘红武]

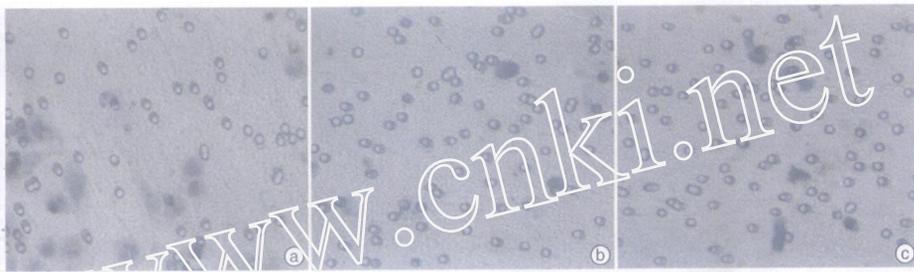
NF-κB 反义核酸对胰腺癌细胞 ICAM-1 表达及侵袭转移能力的影响

(正文见 908 页)



a. 反义治疗组; b. 空 ASODN 组; c. 空脂质体组

图 1 荧光显微镜检测转染效率

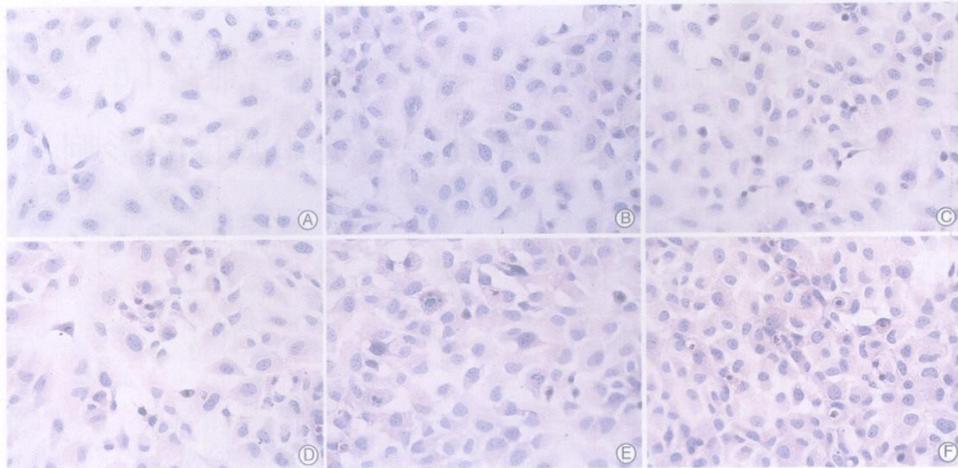


a. 反义治疗组; b. 空脂质体组; c. 空白对照组

图 4 p65 ASODN 转染对细胞侵袭转移能力的影响 (苏木素染色 × 200)

23-羟基白桦酸抑制血管内皮细胞增殖和诱导凋亡的实验

(正文见 911 页)



A. 对照组细胞; B. 1μg/ml 23-HBA; C. 10μg/ml 23-HBA;
D. 20μg/ml 23-HBA; E. 40μg/ml 23-HBA; F. 60μg/ml 23-HBA

图 2 23-HBA 对 HMEC 细胞的形态学变化