

# 土贝母苷甲对人脐静脉内皮细胞凋亡和 肿瘤诱导的血管生成的影响

于立坚 胡定慧 马润娣\* 苏伟明 王珍玉 廖铭能 张霄瑜 于廷曦\*

(广东海洋大学海洋药物研究与开发重点实验室, 湛江 524025)

**摘要** 研究了土贝母苷甲(下称苷甲)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡和肿瘤诱导的血管生成的影响。包括: MTT法检测苷甲对HUVECs生长的影响; 荧光显微镜观察苷甲作用下HUVECs的形态变化; 流式细胞术分析苷甲对HUVECs周期及凋亡的影响; 聚碳酸酯膜小室(Transwell model)趋化运动模型检测苷甲对HUVECs运动能力的影响; 鸡胚绒毛尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane, CAM)试验检测苷甲对人鼻咽癌细胞(human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells, CNE-2Z)诱导的CAM血管生成的影响; 免疫组化法检测苷甲对BALB/c裸小鼠Lewis肺癌组织微血管密度(microvessel density, MVD)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)表达的影响。苷甲明显抑制HUVECs的生长, 其抑制效果与剂量和作用时间相关, 苷甲作用HUVECs 24、48、72 h其 $IC_{50}$ 值分别为24.2、21.4、17.9  $\mu\text{mol/L}$ ; 苷甲作用下HUVECs发生周期阻滞, 呈现典型的凋亡特征, 20.0  $\mu\text{mol/L}$  苷甲作用12、24、36 h HUVECs的凋亡率分别为11.4%、20.8%、25.3%; 20.0  $\mu\text{mol/L}$  苷甲处理HUVECs 24 h, 对细胞迁移抑制率为58.4%; 苷甲抑制CNE-2Z细胞诱导的CAM血管生成, 并与剂量相关; 苷甲应用后癌组织MVD明显减少, VEGF、bFGF、PDGF表达下调。苷甲有明显的抑制血管生成活性, 其抑制血管生成作用与诱导血管内皮细胞凋亡, 抑制其运动能力, 下调VEGF、bFGF和PDGF的表达有关。

**关键词** 土贝母苷甲; 血管生成; 人脐静脉内皮细胞株; 鸡胚绒毛尿囊膜; Lewis肺癌组织

肿瘤的血管系统、癌基因产物及信号转导通路等已经成为抗癌药物作用的新靶标。将血管生成作为理论提出并探讨其治疗肿瘤的意义的是哈佛大学医学院的Folkman教授。他在实验中意外观察到小鼠移植瘤在生长过程中必须靠周围新生小血管来滋养; 没有足够的血供, 肿瘤的体积只能维持在较小的尺寸。肿瘤细胞距离毛细血管0.2 mm以上时, 氧气将无法通过弥散作用抵达肿瘤细胞, 肿瘤细胞既不能从肿瘤血管处得到营养和氧气, 也无法从周围血管通过弥散作用得到营养和氧气, 于是肿瘤组织发生退化或处于长期休眠状态。Folkman<sup>[1]</sup>在总结自己和他人观察的基础上大胆地提出了肿瘤血管生成的理论, 即肿瘤生长和转移都依赖于血管生成, 因此, 抑制肿瘤血管生成即可抑制肿瘤的生长和转移, 起到治疗肿瘤的作用<sup>[1-5]</sup>。抗血管生成疗法旨在抑制肿瘤血管生长, 使肿瘤得不到足够的营养和氧气供应而萎缩, 这就是所谓的“饿死肿瘤疗法”。与传统的治疗方法

相比, 血管生成抑制剂具有特异性高和容易达到靶细胞等诸多优点<sup>[6]</sup>。肿瘤血管生成的各个环节及其调节因子均可作为血管生成抑制剂的作用靶点。

土贝母[*Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet (Cucurbitaceae)]是一种传统中药, 载于清代赵学敏编著的《本草纲目拾遗》。古代用它的块茎来治疗乳岩、乳腺增生、瘰疬、痰核等疾病, 临床上显示出明显的散结毒、消痈肿效果<sup>[7]</sup>。四川和陕西省的老中医用它来治疗食道癌和胃癌, 效果显著, 但因恶心、呕吐等消化道副作用而限制了它的临床应用。我们从1978年开始从土贝母块茎中分离、纯化抗癌活性成份, 对其中得率高(1.9%)、水溶性和稳定性较好的苷甲(图1)的抗肿瘤生长和转移作用进行

收稿日期: 2008-03-20 接受日期: 2008-08-08

广东省自然科学基金资助项目(No.011809)

\* 通讯作者。Tel: 0759-2362480, Fax: 0759-2382424, E-mail:

mard@gdou.edu.cn, yutingxi@yahoo.com

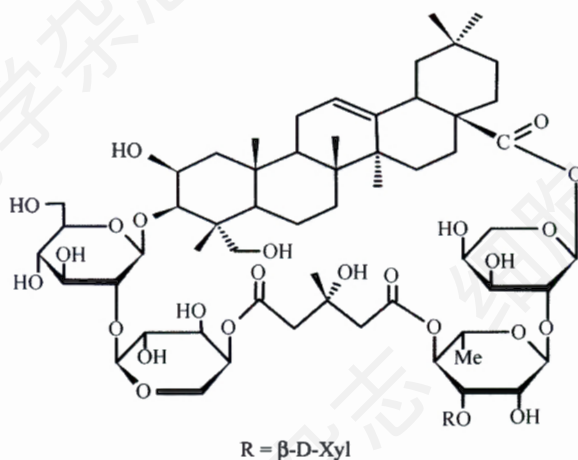


图1 苷甲的化学结构

了较系统的研究<sup>[8-14]</sup>, 并确定苷甲的作用靶点是线粒体和细胞色素 *c*、微管和微管蛋白<sup>[15,16]</sup>。初步研究还发现苷甲有抑制鸡胚绒毛尿囊膜(chick embryo-chorioallantoic membrane, CAM)血管生成的作用<sup>[17]</sup>。为了进一步搜集苷甲抗血管生成的证据并探讨其作用机制, 我们检查了苷甲对 HUVECs 细胞增殖、迁移及凋亡, 对癌细胞诱导的 CAM 血管生成, 对小鼠 Lewis 肺癌组织微血管密度(microvessel density, MVD)及血管生长因子表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 苷甲

自土贝母块茎分离纯化苷甲<sup>[8,18]</sup>, 纯度>98%。准确称取苷甲干粉, RPMI-1640 溶解(100  $\mu$ mol/L), 过滤除菌, -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。临用前稀释到所需浓度。

### 1.2 试剂

RPMI-1640 培养基, 美国 Hyclone 公司产品; 超级无支原体新生小牛血清, 杭州四季清公司产品; 胰蛋白酶、噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、Hoechst-33342 染色液、碘化丙锭(propidium iodide, PI)、吖啶橙(acridine orange, AO)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、RNase A 和 Triton X-100, 美国 Sigma 公司产品; 兔多克隆一抗 CD31、抗血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、抗碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和抗血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)抗体, APES 防脱片试剂, 免疫组化超

敏 S-P 试剂盒, 山羊抗兔 IgG 和第三抗体, 北京中山生物公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 细胞培养

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和人鼻咽癌细胞(human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells, CNE-2Z)分别购自中科院上海生物化学与细胞生物学研究所和广东医学院, 以含 10% 灭活新生小牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养。以 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞, 2~3 天传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

### 1.4 MTT 试验

取对数生长期 HUVECs 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 90  $\mu$ l 细胞悬液(1.0 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞)。培养过夜后, 加入不同浓度的苷甲溶液 10  $\mu$ l, 使终浓度分别为 10.0、15.0、20.0、25.0、30.0  $\mu$ mol/L, 对照组则加入相同体积的培养液。每一浓度设 3 个平行孔, 充分混匀, 培养 24、48、72 h。每孔加入 20  $\mu$ l 5 mg/ml MTT, 继续培养 4~6 h。每孔加入 100  $\mu$ l 三联液(1% SDS、5% 异丁醇、0.012 mol/L HCl, W/V/V), 37  $^{\circ}$ C 放置过夜后, 用 DG-5031 型酶标仪在 570 nm 波长处测各孔 A 值<sup>[19,20]</sup>。实验重复 3 次。以 Bliss 法计算半数抑制浓度, 并按下列公式计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值)  $\times$  100%

### 1.5 荧光显微镜观察

**1.5.1 Hoechst-PI 染色** 以 4 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 6 孔板, 培养液补加至 2 ml。于细胞对数生长期加入苷甲溶液, 使其终浓度为 20  $\mu$ mol/L 苷甲, 作用 48 h 后收集细胞。用预冷的 PBS 洗涤两次, 用 PBS 悬浮细胞, 取细胞悬液 100  $\mu$ l, 加入 Hoechst-33342 染色液, 使其终浓度为 10  $\mu$ g/ml, 混匀后于 37  $^{\circ}$ C 水浴染色 15 min。离心去上清液, 用 PBS 洗涤一次, 用 PBS 悬浮细胞, 加入 PI 染液, 使其终浓度为 50  $\mu$ g/ml, 混匀, 冰上染色 15 min。离心去上清液。制片, 荧光显微镜观察, 拍照。

**1.5.2 AO/EB 染色** 如上所述处理细胞, 苷甲作用 48 h 后收集细胞。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 离心, 去上清液。加入 8  $\mu$ l AO/EB 染色液, 混匀。置一滴于载玻片, 上覆盖玻片, 荧光显微镜下观察结果并拍照<sup>[15]</sup>。

### 1.6 流式细胞术分析细胞周期

细胞经 30  $\mu\text{mol/L}$  苷甲处理不同时间后, 用胰蛋白酶-EDTA 处理、收集细胞并置入离心管。无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 离心洗涤细胞两次。体积分数为 70% 的乙醇  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱固定 24 h 以上。离心去除固定液, 用 PBS 悬浮细胞, 加 PI 染色液  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光染色 30 min。300 目筛过滤处理。采用美国 Coulter 公司生产的 EPICS XL 型流式细胞仪(氩离子激光器为激发光源, 激发波长为 488 nm)测定, Multicycle 软件分析细胞 DNA 含量。每个样品计数 10 000 个细胞以上<sup>[20,21]</sup>。

### 1.7 细胞迁移试验

采用 24 孔带有聚碳酸酯膜小室的培养板(Corning Incorporated Costar 公司产品), 下室加入 600  $\mu\text{l}$  含 50 ng/ml VEGF 的 RPMI-1640 培养液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 备用。将经 20  $\mu\text{mol/L}$  苷甲处理 24 h 的细胞悬液 300  $\mu\text{l}$  ( $2.0 \times 10^4$  个细胞)加入上室, 对照组为未经苷甲处理的细胞, 设 3 个平行孔。细胞在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下迁移 4 h 后, 取出小室, 迁移到下室表面的细胞以 3% 福尔马林固定, 用 50  $\mu\text{mol/L}$  PI 染色, 在 100 倍荧光显微镜下随机选择 5 个视野, 计数每个视野穿过膜的细胞数。上述实验在给出的实验条件下重复 3 次。按下式计算迁移抑制率。

迁移抑制率(%) =  $(1 - \text{实验组迁移细胞数} / \text{对照组迁移细胞数}) \times 100\%$ 。

### 1.8 CNE-2Z 细胞诱导的 CAM 血管生成

选择清洁、蛋壳均质、气室均匀的海南文昌种鸡蛋, 在 19200 型智能孵化箱中孵化 1 周。无菌条件下在胚头端开一直径 1 cm 小孔, 形成假气室。接种 CNE-2Z 细胞( $1.9 \times 10^6$  个/胚), 透明胶带封口。置培养箱中培养 4 天, 将中央打有一小孔的滤纸置于气室内的尿囊膜上, 加不同浓度苷甲溶液 80  $\mu\text{l}$  于滤纸上。对照组则加等量 PBS。每天 1 次, 共给药 4 次。末次给药后第 2 天, 用丙酮和无水乙醇分别固定 15 min。剪下放有滤纸的膜置载玻片上, 弃取滤纸, 显微镜下随机选取 5 个视野, 计数血管分支点数并照相<sup>[17]</sup>。

### 1.9 小鼠 Lewis 肺癌组织 MVD

取对数生长期 Lewis 肺癌细胞制成悬液, 调整细胞浓度至  $2 \times 10^7$  个/ml, 按每只 0.2 ml ( $4 \times 10^6$  个细胞)接种于 BALB/c (nu/nu) 裸小鼠右侧背部皮下。接种后第 7 天挑选已长出瘤块的小鼠用于实验。实验组每日每鼠腹腔注射不同浓度苷甲溶液, 连续 14 天; 对照组同时腹腔注射同体积无菌生理盐水。末次给药第 2 天, 颈椎脱位法牺牲动物, 剥离肿瘤。10% 中

性福尔马林固定瘤组织, 常规脱水后制备成石蜡包埋组织块。4  $\mu\text{m}$  连续切片。免疫组化法标记 CD31。在 40 倍视野下扫视整个肿瘤组织切片, 寻找新生血管最密集区即“热点”, 在 200 倍视野下计数热点区 CD31 标记的微血管数目。选取标记微血管的原则是: 血管内皮细胞棕染, 与邻近的微血管、肿瘤细胞及其他结缔组织成分不相连, 标记清晰的内皮细胞或细胞串作为一个可计数的微血管, 而血管腔的有无不作为判断血管的标准。有较厚肌壁的大血管应排除在计数范围之外。此外, 肿瘤的坏死区、硬化区和肿瘤细胞稀少区不进行微血管计数。每个象限任选 CD31 标记阳性的血管数最多的 5 个视野计数, 取平均值作为瘤灶内 MVD<sup>[22,23]</sup>。

### 1.10 小鼠 Lewis 肺癌组织促血管生长因子

按 1.9 同法准备瘤组织切片。免疫组化法检测 VEGF、bFGF 和 PDGF 的表达<sup>[24]</sup>。表达产物定位于肿瘤细胞的胞浆、胞膜及部分肿瘤间质, 呈局灶性或弥漫性分布, 以细胞膜或细胞浆内出现明确的棕黄色颗粒为阳性细胞。采用双盲法, 每张切片至少观察 5 个具有代表性的高倍视野, 不少于 1 000 个细胞。

## 2 结果

### 2.1 苷甲对 HUVECs 生长的抑制作用

苷甲明显抑制 HUVECs 的生长, 其抑制效果与剂量和作用时间呈正相关(图 2)。苷甲作用 HUVECs 24、48、72 h, 其  $\text{IC}_{50}$  值分别为 24.2、21.4、17.9  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.2 荧光显微镜下观察苷甲诱导 HUVECs 凋亡

2.2.1 Hoechst-33342/PI 染色 荧光显微镜观察结果显示, 对照组细胞核大小较均一, 呈圆形或者椭圆形, 染色质分布均匀, 紫外光下显蓝色荧光; 苷甲 20  $\mu\text{mol/L}$  处理 48 h 的细胞则皱缩, 变形, 染色质浓缩, 部分核染色体碎裂, 偶有凋亡小体出现, 紫外光下显红色荧

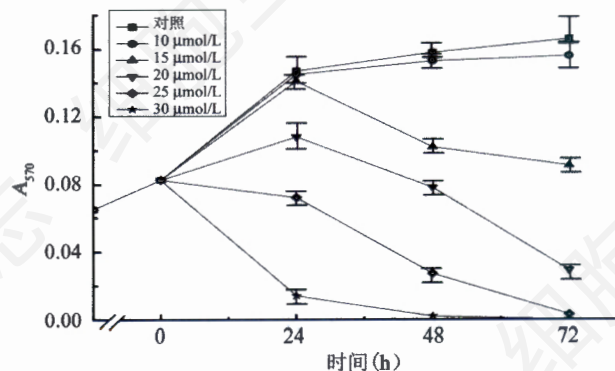


图 2 苷甲对 HUVECs 生长的抑制作用

光(图3)。

**2.2.2 AO/EB染色** 荧光显微镜观察结果显示,对照组细胞形态大小正常,胞核大小较均匀,呈圆形或者椭圆形,核染色质分布较均匀,着绿色荧光;20  $\mu\text{mol/L}$  苕甲作用48 h后,部分细胞胞膜破损,胞浆浓缩,胞核固缩,染色质着绿色或橘红色荧光,并有凋亡小体出现(图4)。

### 2.3 流式细胞术分析苕甲诱导 HUVECs 细胞周期阻滞和凋亡

流式细胞术分析结果显示,20  $\mu\text{mol/L}$  苕甲作用 HUVECs 12 h,  $G_1$  峰左侧出现典型的亚二倍体细胞群峰(凋亡峰)。随着作用时间的延长,凋亡峰面积相应增大。苕甲作用 HUVECs 12、24、36 h 的凋亡指数分别为 11.4%、20.8%、31.1%,明显高于对照组( $P<0.05$ )。苕甲阻滞 HUVECs 于  $G_2/M$  期(24、36 h)(表1,图5)。

### 2.4 苕甲抑制 HUVECs 细胞迁移

Transwell小室趋化运动模型检测结果显示,苕甲显著抑制 HUVECs 迁移,20  $\mu\text{mol/L}$  苕甲作用24 h,对细胞的迁移抑制率为 58.4% ( $P<0.01$ ) (图6)。

### 2.5 苕甲抑制 CNE-2Z 细胞诱导的 CAM 血管生成

CNE-2Z 细胞显著诱导 CAM 血管生成<sup>[25]</sup>。自然状态 CAM 血管的生长呈叶脉样,接种 CNE-2Z 细胞的 CAM 形成以接种区为中心的放射状生长的血管网。新生毛细血管向肿瘤接种区爬行生长,出现“血管辐辏现象”。肿瘤接种区周围血管分支数明显增多( $P<0.05$ ) (图7)。苕甲非常显著地抑制 CNE-2Z 诱导的 CAM 血管的生成( $P<0.01$ ),其抑制效果与剂量密切相关(表2)。与对照组相比,苕甲组血管管径较细,血管密度及其分支明显减少。

### 2.6 苕甲抑制小鼠 Lewis 肺癌组织血管增生

CD31 阳性颗粒呈棕黄色,主要定位于毛细血管、小静脉和小动脉血管内皮细胞膜和胞质。Lewis 肺癌组织中的 MVD 值分别为:苕甲组  $8.5\pm 1.5$ ,对照组  $18.2\pm 3.2$ ,苕甲组的 MVD 值明显低于对照组( $P<0.05$ ) (图8)。

### 2.7 苕甲下调小鼠 Lewis 肺癌组织血管生长因子的表达

VEGF、bFGF 和 PDGF 阳性表达产物定位于肿瘤细胞及部分肿瘤间质的胞浆和胞膜,呈深棕黄色颗粒状或弥漫性分布,苕甲组肿瘤组织阳性细胞数明显减少,大多数癌细胞染色呈阴性(蓝色)。对照组癌细胞胞浆及胞膜表达呈强阳性(表3,图9)。

表1 苕甲处理的 HUVECs 不同时相的 DNA 含量分析(%) ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

细胞周期	24 h		36 h	
	对照	苕甲	对照	苕甲
Sub- $G_1$	1.6 $\pm$ 0.3	20.0 $\pm$ 2.5**	2.5 $\pm$ 0.1	31.1 $\pm$ 2.4**
$G_0/G_1$	58.6 $\pm$ 0.6	48.8 $\pm$ 2.4*	70.2 $\pm$ 0.4	59.0 $\pm$ 0.1***
S	30.8 $\pm$ 0.8	27.2 $\pm$ 4.8	16.5 $\pm$ 1.1	22.5 $\pm$ 0.3*
$G_2/M$	10.6 $\pm$ 0.2	24.1 $\pm$ 2.5*	13.2 $\pm$ 0.8	18.0 $\pm$ 0.4*

与对照相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

表2 苕甲对 CNE-2Z 细胞诱导的 CAM 血管生成的抑制作用

组别	剂量 ( $\mu\text{mol}\times$ 天)	种蛋数 (只)	血管分枝点数 ( $\bar{x}\pm s$ )	诱导率 (%)	抑制率 (%)
对照组	-	6	139.8 $\pm$ 16.8	-	-
CNE-2Z 细胞	-	6	184.3 $\pm$ 12.2*	31.8	-
CNE-2Z+ 苕甲	5.0 $\times$ 4	6	113.2 $\pm$ 10.1*	-	38.6
CNE-2Z+ 苕甲	10.0 $\times$ 4	6	100.8 $\pm$ 6.8**	-	45.3
CNE-2Z+ 苕甲	20.0 $\times$ 4	6	80.7 $\pm$ 6.8**	-	56.2

CNE-2Z 细胞组与对照组比, \* $P<0.05$ ; CNE-2Z+ 苕甲组与 CNE-2Z 细胞组比, \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$ 。

表3 苕甲对肿瘤组织 VEGF、bFGF 和 PDGF 阳性表达率的影响(%,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	阳性细胞百分率(%)		
	VEGF	bFGF	PDGF
对照组	50.3 $\pm$ 8.5	59.1 $\pm$ 5.8	60.1 $\pm$ 3.6
苕甲组	8.0 $\pm$ 2.4**	5.6 $\pm$ 1.5**	7.5 $\pm$ 1.8**

与对照相比, \*\* $P<0.01$ 。

## 3 讨论

微管,一种构成细胞骨架的重要成分,是由微管蛋白及少量微管相关蛋白组成的亚稳定态管状细胞器,对细胞形状的维持、细胞信号转导和细胞分裂都具有重要意义。紫杉醇、长春碱类化合物和秋水仙碱都是以微管为靶点的药物。紫杉醇及其衍生物促进微管蛋白聚合,抑制微管解聚<sup>[26]</sup>,长春碱类化合物<sup>[27]</sup>、秋水仙碱等<sup>[28]</sup>则抑制微管蛋白的聚合,结果都干扰纺锤体的正常装配,把细胞阻滞在分裂期,进而启动一系列信号级联反应,诱导细胞凋亡<sup>[29]</sup>。药物的抗微管活性与抗血管生成之间有一定的关系,紫杉醇和长春碱类化合物的 vinflunine 就是既具有抗微管作用又能抗血管生成的药物<sup>[30,31]</sup>。

此前我们的实验结果证实,在离体条件下,苕甲和秋水仙碱类似,能够抑制猪脑微管蛋白 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热聚合,且在较低浓度时其抑制效应呈浓度依赖关系。苕甲能抑制 CNE-2Z 细胞内微管的聚合,25  $\mu\text{mol/L}$  苕甲作用 CNE-2Z 细胞 3 h 后,荧光图像显示其结果

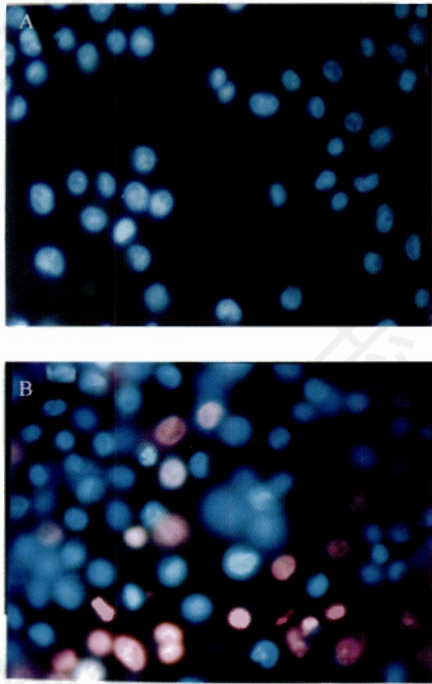


图3 荧光显微镜下观察昔甲对 HUVECs 细胞形态的影响 (Hoechst-33342/PI 染色, 200×)  
A: 对照; B: 20.0 μmol/L 昔甲。

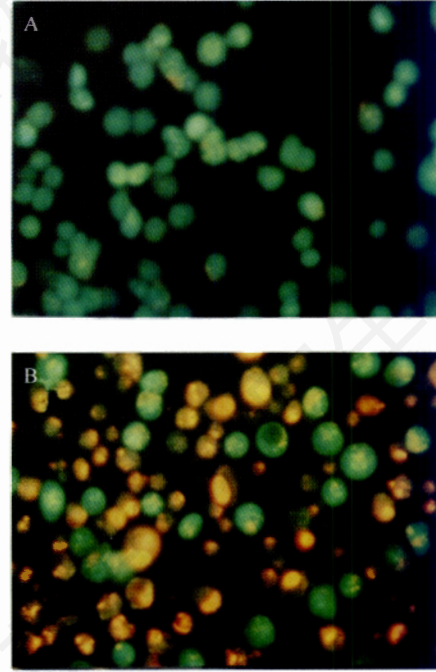


图4 荧光显微镜下观察昔甲对 HUVECs 细胞形态的影响 (AO/EB 染色, 200×)  
A: 对照; B: 20.0 μmol/L 昔甲。

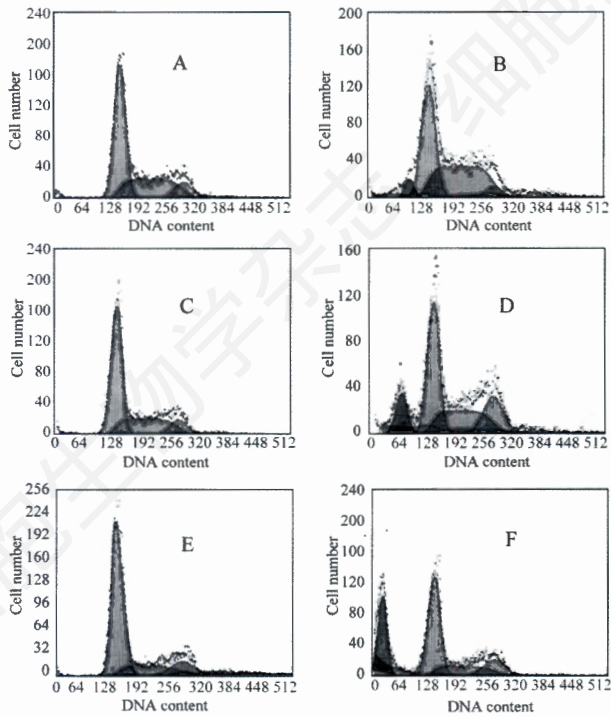


图5 流式细胞术分析 20 μmol/L 昔甲处理的 HUVECs 的 DNA 含量  
A、C、E: 对照 12、24、36 h; B、D、F: 昔甲 12、24、36 h。

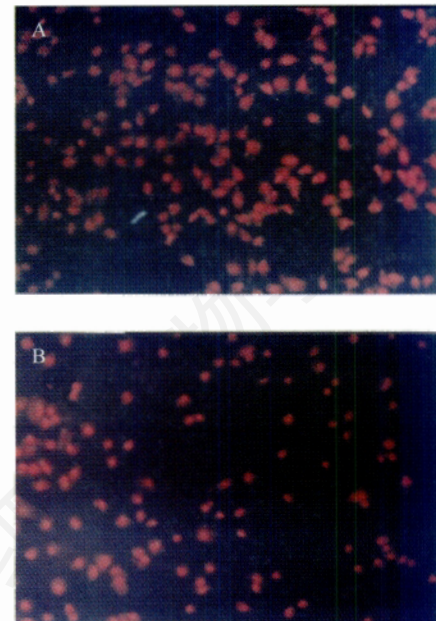


图6 昔甲对 HUVECs 运动能力的影响  
A: 对照; B: 昔甲。

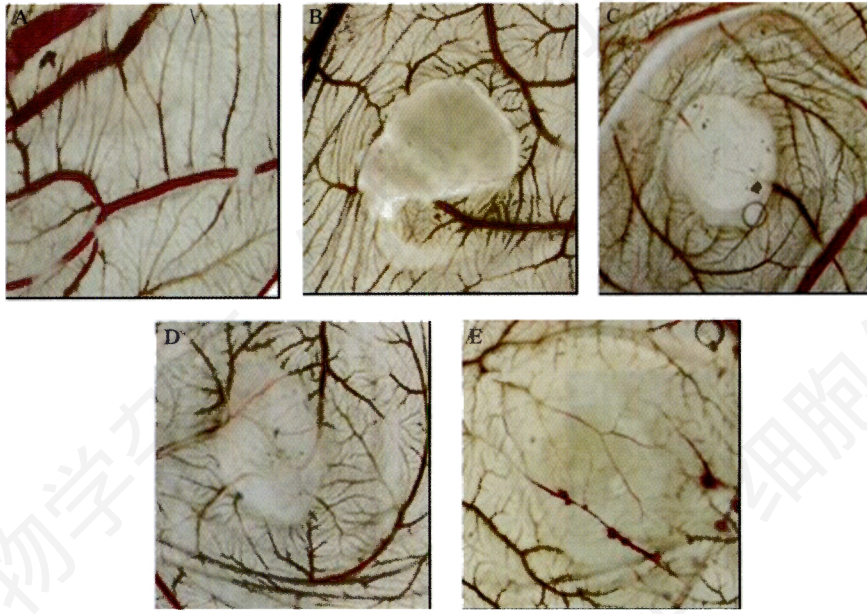


图7 苜甲对肿瘤细胞诱导的CAM血管生成的抑制作用

A: 对照; B: CNE-2Z; C: CNE-2Z+5.0  $\mu\text{mol}$  苜甲; D: CNE-2Z+10.0  $\mu\text{mol}$  苜甲; E: CNE-2Z+20.0  $\mu\text{mol}$  苜甲。

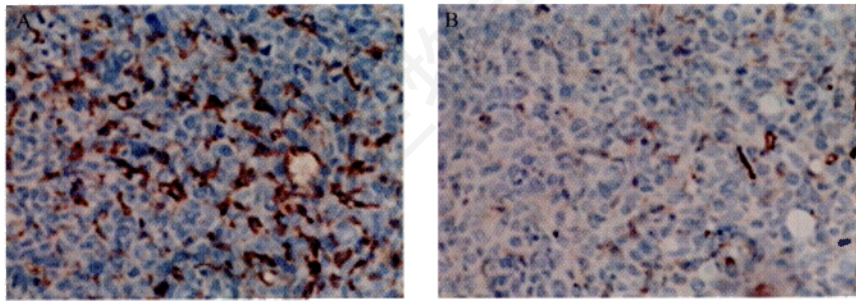


图8 苜甲对小鼠Lewis肺癌组织MVD的影响

A: 对照; B: 苜甲(每天3 mg/kg, 14天)。

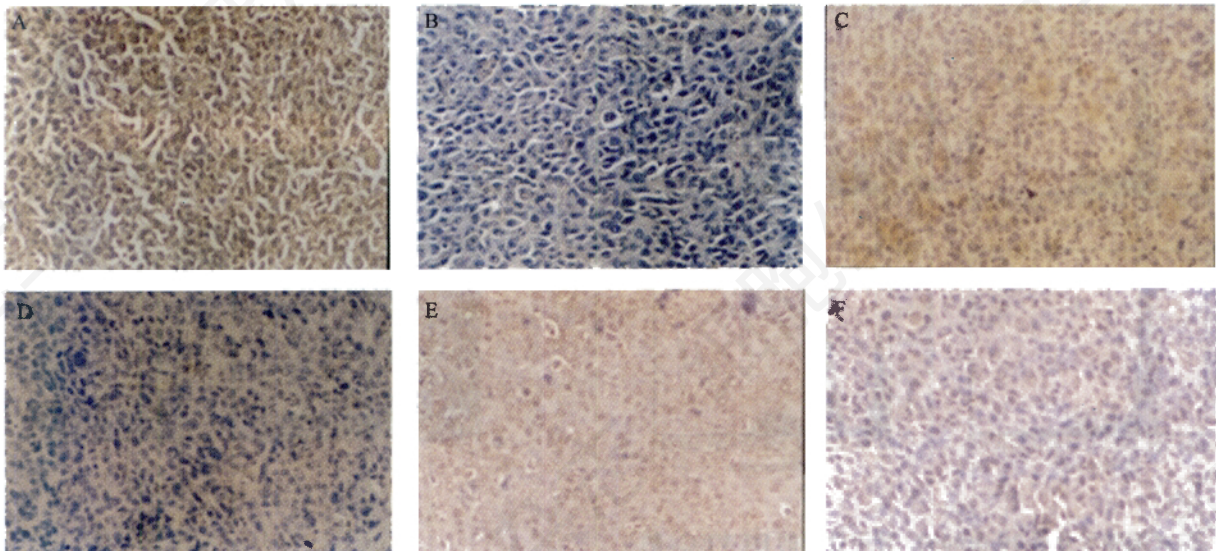


图9 苜甲对血管生长因子表达的影响

A: VEGF (对照); B: VEGF (苜甲); C: bFGF (对照); D: bFGF (苜甲); E: PDGF (对照); F: PDGF (苜甲)。

与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  秋水仙碱作用细胞 3 h 的结果相似, 荧光充满整个细胞质区域, 正常细胞所具有的毛玻璃样微管网络消失, 表明苷甲引起细胞微管解聚, 提示苷甲是一种有效的抗微管剂。苷甲与微管蛋白的结合在秋水仙碱位点<sup>[16]</sup>。

秋水仙碱与微管蛋白结合位点的研究始于 20 世纪 90 年代, Uppuluri 等<sup>[32]</sup>用 [<sup>3</sup>H] 标记的秋水仙碱和酶裂解及氨基酸序列测定的方法证实, 秋水仙碱与  $\beta$  微管蛋白上的氨基酸残基 1~46 和 214~241 的两个区段交联, 抑制  $\beta$  亚单位 E 位 GTP 的水解, 从而抑制微管的聚合。Bai 等<sup>[33]</sup>用 [<sup>14</sup>C] 标记的秋水仙碱类似物和内源酶消化的方法, 进一步证实秋水仙碱分子结构中的 A 环与  $\beta$  微管蛋白 354 半胱氨酸结合, 环庚三烯酚酮 C 环定位于 239 半胱氨酸和 N 末端之间。与秋水仙碱结合位点相似的新的微管蛋白抑制剂有 phenylcyclohexenes (PCHs), combretastatin A24 及其硫酸盐类似物等。卤代苯甲酰胺类小分子化合物也作用于秋水仙碱结合位点, 且抗癌活性强<sup>[34,35]</sup>, 其中 3-碘乙酰胺苯甲酰乙酯, 作为一种新型小分子微管蛋白配体, 不仅抑制微管蛋白的聚合, 使细胞滞留于有丝分裂期, 而且也能将细胞阻滞在 G<sub>1</sub>/S 转换期, 这种双重阻滞作用改变了传统的微管微丝抗肿瘤药只作用于 M 期的观念<sup>[36]</sup>。

现在我们用体内外实验证实, 苷甲对血管内皮细胞增殖、迁移和肿瘤血管生长有抑制作用。苷甲处理过的细胞经 Hoechst-33342/PI 染色后在荧光显微镜下观察发现, 细胞皱缩, 变形, 染色质浓缩, 部分核染色体碎裂, 偶有凋亡小体出现, 显红色荧光; 经 AO/EB 染色, 细胞固缩、呈圆珠状或新月状, 核染色质着橘红色荧光, 并有凋亡小体出现; 而对照组细胞着绿色荧光, 形态大小均一。流式细胞术分析表明, 30  $\mu\text{mol/L}$  苷甲处理改变 HUVECs 细胞周期, 诱导 HUVECs 细胞凋亡, 随着作用时间的推移细胞逐渐由凋亡早期、中期, 向晚期变化, 凋亡峰面积逐渐增大。20.0  $\mu\text{mol/L}$  苷甲处理 HUVECs 24 h, 对细胞迁移抑制率达 58.4%。苷甲抑制 CNE-2Z 细胞诱导的 CAM 血管生成, 并与剂量相关; 苷甲应用后瘤组织 MVD 明显减少, VEGF、bFGF、PDGF 表达下调。苷甲有明显的抑制血管生成活性, 其抑制血管生成作用与诱导血管内皮细胞凋亡, 抑制其运动能力, 下调 VEGF、bFGF 和 PDGF 的表达有关。

苷甲作用 HUVECs 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 值分

别为 24.2、21.4、17.9  $\mu\text{mol/L}$ ; 苷甲作用 HeLa 细胞 24、48、72 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 35.7、23.6、17.4  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[20]</sup>。显然, HUVECS 比 HeLa 细胞对苷甲更敏感, 考虑到: (1) 苷甲一般是通过血管途径到达实体瘤的, 血管内皮细胞通常比肿瘤细胞先接触苷甲, (2) 血管内皮细胞比肿瘤细胞对苷甲更敏感, 似乎可以认为: 苷甲对肿瘤生长和转移的抑制效果与苷甲诱导的血管生成过程中的毛细血管管腔塌陷和闭锁有关。

本文证实, 与秋水仙碱在微管蛋白有相同结合位点的苷甲也有抗血管生成作用。因此, 苷甲也是既具有抗微管活性又能抗血管生成的药物。

### 参考文献(References)

- [1] Folkman J. *Semin Oncol*, 2002, **29**(6 Suppl 16): 15
- [2] Carmeliet P. *Nature*, 2005, **438**: 932
- [3] Folkman J. *N Engl J Med*, 1971, **285**: 1182
- [4] Pandya NM. *Vascul Pharmacol*, 2006, **44**: 265
- [5] Folkman J. *Eur J Cancer*, 1996, **32A**: 2534
- [6] Burke PA et al. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, **39**: 155
- [7] 赵学敏. *本草纲目拾遗*, 北京: 人民卫生出版社, 1983 (按照 1765 年木刻版重印), 123
- [8] 王永清等. *陕西新医药*, 1981, **10**: 55
- [9] 马润娣等. *科学通报*, 1991, **36**: 1421
- [10] Yu L et al. *Planta Med*, 1994, **60**: 204
- [11] Yu L et al. *Planta Med*, 1996, **62**: 119
- [12] 翁昔阳等. *癌症*, 2003, **22**: 806
- [13] 于立坚等. *中国天然药物*, 2008, **6**: 135
- [14] 王长秀等. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, **11**: 764
- [15] Wang F et al. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, **57**: 389
- [16] Ma RD et al. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, **62**: 559
- [17] 胡定慧等. *中国药理学通报*, 2003, **19**: 713
- [18] Kong F et al. *Tetrahedron Lett*, 1986, **27**: 5765
- [19] Hansen MB et al. *J Immunol Methods*, 1989, **119**: 203
- [20] Ma RD et al. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, **9**: 261
- [21] Necoletti I et al. *J Immunol Methods*, 1991, **139**: 271
- [22] Fenton BM et al. *Br J Cancer*, 1999, **79**: 464
- [23] Weidner N. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, **36**: 169
- [24] 苏伟明等. *中国生化药物杂志*, 2008, **29**: 9
- [25] 廖铭能等. *中国生化药物杂志*, 2008, **29**: 217
- [26] Schiff PB et al. *Nature*, 1979, **277**: 665
- [27] Lobert S et al. *Biochemistry*, 1996, **35**: 6806
- [28] Correia JJ. *Pharmacol Ther*, 1991, **52**: 127
- [29] Wang LG et al. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, **44**: 355
- [30] Klauber N et al. *Cancer Res*, 1997, **57**: 81
- [31] Kruczynski A et al. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, **40**: 159
- [32] Uppuluri S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 11598
- [33] Bai R et al. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 12639
- [34] Jiang JD et al. *Cancer Res*, 1998, **58**: 2126
- [35] Jiang JD et al. *Cancer Res*, 1998, **58**: 5389
- [36] Jiang JD et al. *Cancer Res*, 2002, **62**: 6080

## Effects of Tubeimoside 1 on Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Inhibition of Tumor-induced Angiogenesis

Li-Jian Yu, Ding-Hui Hu, Run-Di Ma\*, Wei-Ming Su, Zhen-Yu Wang,  
Ming-Neng Liao, Xiao-Yu Zhang, Ting-Xi Yu\*

(Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract** The present study was conducted to investigate the effects of tubeimoside 1 (TBMS1) isolated from *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and inhibition of tumor-induced angiogenesis. Cell growth inhibitory effect of TBMS1 on HUVECs was measured by MTT assay; the apoptotic induction by TBMS1 was determined by fluorescence microscopy and flow cytometry; the effect of TBMS1 on migration of HUVECs was measured on transwell model; the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was adopted to evaluate the effects of various doses of the TBMS1 on the angiogenesis induced by CNE-2Z cells; the immunohistochemical staining assay was adopted to examine the intratumoral microvessel density (MVD) and the expressions of several angiogenic factors in Lewis lung carcinoma tissue of nude mice. The proliferation of HUVECs was inhibited by TBMS1, and the effect was time- and concentration-dependent. The values of  $IC_{50}$  for the effect of TBMS1 on HUVECs at 24, 48, 72 h are 24.2, 21.4, 17.9  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. TBMS1-treated HUVECs showed typical morphologic and cellular evidences of apoptosis. 20.0  $\mu\text{mol/L}$  of TBMS1 decreased the percentage of migrating HUVECs by 58.4%. TBMS1 exerted effective inhibitory effects on CNE-2Z cells-induced angiogenesis in CAM in a concentration-dependent manner. There was an obvious decrease of MVD in tumor tissue of nude mice treated by TBMS1. The expressions of VEGF, bFGF and PDGF in the TBMS1-treated tumor tissue were evidently down-regulated. TBMS1 is effective against angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. Apoptotic induction and inhibition of migrating and down-regulation of the expressions of angiogenic factors mediated by TBMS1 in HUVECs may be responsible to angiogenesis of TBMS1.

**Key words** tubeimoside 1; angiogenesis; human umbilical vein endothelial cells; chick embryo chorioallantoic membrane; Lewis lung carcinoma

Received: March 20, 2008 Accepted: August 8, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.011809)

\*Corresponding author. Tel: 86-759-2362480, Fax: 86-759-2382424, E-mail: mard@gdou.edu.cn, yutingxi@yahoo.com