

知母皂苷 A III 对人脐静脉内皮细胞增殖和凋亡的影响^Δ

潘会君^{1,2*}, 莫小辉³, 冯彦军⁴, 陈中建¹, 陈松¹, 秦路平²(1.上海市皮肤病医院药剂科, 上海 200443; 2.第二军医大学药学院生药教研室, 上海 200433; 3.上海市皮肤病医院中心实验室, 上海 200443; 4.苏州市第五人民医院, 江苏苏州 215000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4049-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.06

摘要 目的:研究知母皂苷 A III 对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖和凋亡的影响。方法:体外培养 HUVECs, 分别以浓度为 0、1、2、4、8 μmol/L 的知母皂苷 A III 作用 24、48、72 h, 通过 MTT 比色法检测细胞生长程度; 倒置显微镜观察细胞形态。流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果:8 μmol/L 知母皂苷 A III 作用 24、48、72 h 可明显抑制 HUVECs 增殖, IC₅₀ 分别为 7.2、4.0、2.0 μmol/L; 随着知母皂苷 A III 作用时间的延长和浓度的增加, HUVECs 数目逐渐减少, 细胞开始出现空泡、固缩现象; 8 μmol/L 知母皂苷 A III 作用于 HUVECs, 细胞凋亡率为(4.03±0.41)%。结论:知母皂苷 A III 可明显抑制 HUVECs 的生长, 并诱导部分细胞发生凋亡。

关键词 知母皂苷 A III; 人脐静脉内皮细胞; 生长抑制; 凋亡

Effects of Timosaponin A III on the Proliferation and Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

PAN Hui-jun^{1,2}, MO Xiao-hui³, FENG Yan-jun⁴, CHEN Zhong-jian¹, CHEN Song¹, QIN Lu-ping²(1.Dept. of Pharmacy, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China; 2. Dept. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Central Laboratory, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China; 4. Suzhou Fifth People's Hospital, Jiangsu Suzhou 215000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of timosaponin A III on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). METHODS: HUVEC were cultured *in vitro* and treated with 0, 1, 2, 4 and 8 μmol/L timosaponin A III for 24, 48 and 72h. MTT assay was adopted to detect the cell growth. The morphological changes of HUVECs were observed by inverted microscope. The apoptosis of HUVECs were detected by Annexin V-FITC/PI assay. RESULTS: Timosaponin A III (8 μmol/L) significantly inhibited the proliferation of HUVECs after treated for 24, 48 and 72 h. IC₅₀ were 7.2, 4.0 and 2.0 μmol/L. The morphological observation of inverted microscope showed that the number of HUVECs was decreased as the duration of timosaponin A III treatment and its dose were increased; cell vacuoles and pycnosis were found. The flow cytometry showed that apoptosis rate of HUVEC was (4.03±0.41)% after treated with 8 μmol/L timosaponin A III (*P*<0.01). CONCLUSIONS: Timosaponin A III can significantly inhibit the proliferation of HUVECs and induced the apoptosis of HUVECs.

KEYWORDS Timosaponin A III; Human umbilical vein endothelial cells; Proliferation inhibition; Apoptosis

据预测 2000—2050 年, 全球癌症新发患者将以每年 2 倍的速度递增, 治疗费用在未来 10 年将增加 800 亿美元^[1], 为改善肿瘤治疗现状, 各国以及各大制药公司都在加大开发肿瘤药物的研发力度。自 1971 年 Judan Folkman 首次提出“肿瘤的生长和转移依赖于血管生成”的假说以来^[2], 血管生成在肿瘤发展过程中的作用逐渐明朗。Douglas Hanahan 和 Robert A. Weinberg 先后撰文描述肿瘤特征, 将血管生成(Sustained Angiogenesis)学说明确提出^[3], 揭示了血管生成在肿瘤生长中的重要地位。

知母皂苷 A III 为中药知母中甾体皂苷类成分, 近年来发现其对部分肿瘤细胞有很好的抑制作用: (1) 通过线粒体介导诱发 Hela 肿瘤细胞凋亡^[4]; (2) 通过自噬机制抑制 Hela 肿瘤细胞生长^[5]; (3) 诱导人乳腺癌细胞 BT474 凋亡^[6]; (4) 诱导人结肠癌

HCT-15 细胞凋亡和阻止细胞周期; (5) 抑制 HCT-15 细胞移植瘤动物模型的肿瘤生长^[7]。

本研究采用人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 观察知母皂苷 A III 对内皮细胞增殖和凋亡的影响, 为研究其抗血管作用提供前期数据支持。

1 材料

1.1 仪器

HF90/HF240 型 CO₂ 培养箱、生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); 40R 型低温高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司); EPICS XL 分析型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); ELX800NB 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.2 药品与试剂

知母皂苷 A III(上海同田生物技术股份有限公司, 批号: 070503, 纯度: ≥98%); MTT(美国 Sigma 公司); RPMI Medium 1640、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司); Annexin

Δ 基金项目: 上海市皮肤病医院青年人才培养计划(No.2013)

* 主管中药师, 博士。研究方向: 中药药效学。电话: 021-61833173。

E-mail: ppphhhhjjj@163.com

V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.3 细胞株

HUVEC由苏州市第五人民医院冯彦军医师馈赠。

2 方法

2.1 细胞培养

HUVECs于37℃下,在5%CO₂培养箱中,以含10%胎牛血清的DMEM培养液培养。

2.2 MTT 比色法检测细胞生长

收集对数期细胞,接种于96孔板,细胞密度为5000/孔。于37℃、5%CO₂培养箱中培养,细胞贴壁24h后,加入0(即空白对照)、1、2、4、8 μmol/L浓度的知母皂苷AⅢ,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24、48、72h,每孔加入10 μl MTT溶液,继续培养4h。吸去孔内培养液,每孔加入150 μl二甲亚砜,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。在酶标仪490nm波长处测定吸光度(A),计算细胞生长抑制率(%)。细胞生长抑制率(%)=(空白对照A-用药A)/空白对照A×100%。

2.3 细胞形态学观察

收集对数期细胞,接种细胞于96孔板,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,细胞贴壁24h后,加入0、1、2、4、8 μmol/L浓度

的知母皂苷AⅢ,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24、48、72h。倒置显微镜观察细胞形态。

2.4 流式细胞仪检测凋亡细胞

收集对数生长期细胞,接种于24孔板,分别加入0、4、8 μmol/L药物作用24h后收集细胞,预冷的PBS洗涤细胞2次,用500 μl结合缓冲液重悬细胞,加入AnnexinV-FITC和PI各5 μl,混匀于室温避光孵育15min,收集到流式管中,流式细胞仪检测细胞凋亡程度。

2.5 统计学方法

采用SPSS15.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计;组内两两比较采用SNK法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 知母皂苷AⅢ对HUVECs生长的抑制作用

终浓度分别为1、2、4、8 μmol/L的知母皂苷AⅢ作用HUVECs 24、48、72h,细胞生长受到抑制,并与时间、浓度呈正比。计算可知,知母皂苷AⅢ作用HUVECs 24、48、72h的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为7.2、4.0、2.0 μmol/L。知母皂苷AⅢ对HUVECs生长的抑制作用见表1。

表1 知母皂苷AⅢ对HUVECs生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Inhibitor of timosaponin AⅢ on the proliferation of HUVECs($\bar{x} \pm s, n=3$)

知母皂苷AⅢ浓度, μmol/L	24 h			48 h			72 h		
	A	抑制率, %	IC ₅₀ , μmol/L	A	抑制率, %	IC ₅₀ , μmol/L	A	抑制率, %	IC ₅₀ , μmol/L
0	0.283 ± 0.013			0.465 ± 0.015			0.479 ± 0.103		
1	0.283 ± 0.016	0		0.434 ± 0.016*	6.67		0.334 ± 0.058*	30.27	
2	0.280 ± 0.015	1.06	7.2	0.374 ± 0.018**	19.57	4.0	0.303 ± 0.035**	36.74	2.0
4	0.231 ± 0.015**	18.37		0.230 ± 0.030**	50.54		0.145 ± 0.055**	69.73	
8	0.176 ± 0.008**	37.81		0.092 ± 0.014**	80.22		0.021 ± 0.006**	95.62	

与0 μmol/L比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs. 0 μmol/L: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 知母皂苷AⅢ对HUVECs细胞形态的影响

低倍镜(100×)可见,8 μmol/L知母皂苷AⅢ处理HUVECs 24、48、72h后细胞逐渐固缩,细胞减少。高倍镜(400×)可见,2 μmol/L知母皂苷AⅢ处理HUVECs 24h后逐渐出现空泡,4、8 μmol/L知母皂苷AⅢ处理HUVECs明显出现空泡。知母皂苷AⅢ对HUVECs细胞形态的影响见图1。

3.3 知母皂苷AⅢ对HUVECs凋亡的促进作用

知母皂苷AⅢ作用于HUVECs 24h,其IC₅₀为7.17 μmol/L,因此本研究选用接近IC₅₀和2 IC₅₀,即4、8 μmol/L知母皂苷AⅢ。与0 μmol/L比较,8 μmol/L浓度下知母皂苷AⅢ可明显提高HUVEC凋亡率($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果见图2[图中左下象限显示活细胞(LL: Annexin V -/PI-);右下象限为早期凋亡细胞(LR: Annexin V +/PI-);右上象限为晚期凋亡细胞(UR: Annexin V +/PI+);而左上象限是非活细胞,即坏死细胞(UL: Annexin V -/PI+)。凋亡细胞为右上象+右下象];知母皂苷AⅢ对HUVECs凋亡的影响见表2。

4 讨论

本研究发现,知母皂苷AⅢ对体外培养HUVECs有明显抑制作用,细胞形态学观察也证明了这一点。高倍镜下可见从知母皂苷AⅢ2 μmol/L开始HUVECs即出现空泡,随着浓度的加大,空泡逐渐明显。李梢等^[8-9]采用网络药理学方法发现知母皂苷AⅢ可能具有抗血管作用,并采用VEGF刺激内皮细胞过度增殖,发现其具有抑制作用,与本研究直接采用HUVECs观察到相同的现象,提示其抗血管作用可能不完全依赖血管内皮生长因子(VEGF),但尚需进一步实验验证。

已有研究显示,知母皂苷AⅢ能促进肿瘤细胞凋亡,但其抑制VEGF增殖的作用与促进细胞凋亡是否有关?为了验证此想法,笔者采用流式细胞仪检测其对HUVECs凋亡的影响,选用接近IC₅₀和2 IC₅₀,即4、8 μmol/L知母皂苷AⅢ作用HUVECs 24h后检测细胞凋亡。结果显示,知母皂苷AⅢ能诱导部分HUVECs凋亡,可初步推测其抑制内皮细胞增殖与诱导凋亡有关。

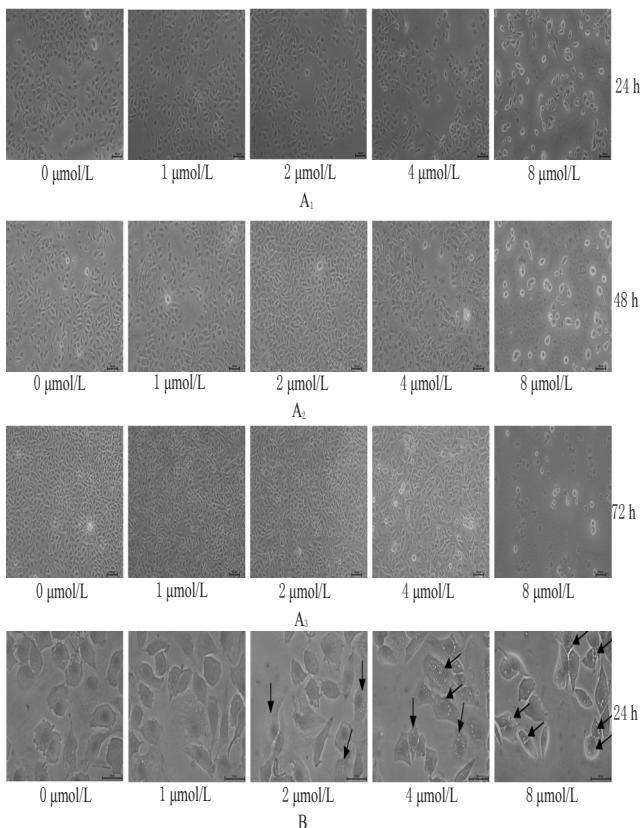


图1 知母皂苷AⅢ对HUVECs细胞形态的影响

A.作用24、48、72 h(100×);B.作用24 h(400×,箭头为细胞空泡)

Fig 1 Effect of timosaponin A III on morphology of HUVECs
A.treated for 24 h, 48 h and 72 h(100×); B. treated for 24 h(400×, arrowhead means cell vacuoles)

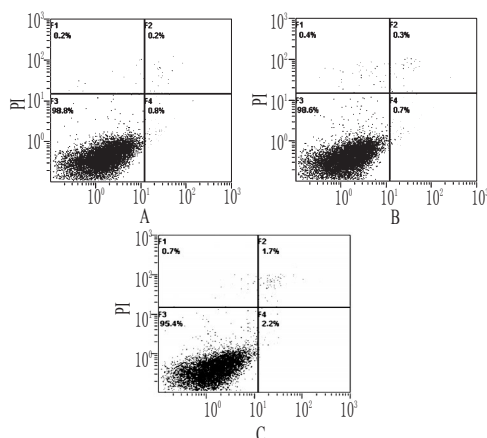


图2 流式细胞仪检测结果

A.0 μmol/L;B.4 μmol/L;C.8 μmol/L

Fig 2 Results of flow cytometry test

A.0 μmol/L;B.4 μmol/L;C.8 μmol/L

正常成人除了创伤愈合及生殖周期外,几乎所有新生血管生成都是病理性的,如肿瘤、风湿性关节炎、糖尿病及视网膜病变等^[10]。笔者推测知母皂苷AⅢ对内皮系统的抑制作用

表2 知母皂苷AⅢ对HUVECs凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effect of timosaponin A III on the apoptosis of HUVECs($\bar{x} \pm s, n=3$)

知母皂苷AⅢ浓度, μmol/L	凋亡率, %
0	1.00 ± 0.20
4	0.83 ± 0.15
8	4.03 ± 0.42*

与0 μmol/L比较: * $P < 0.05$

vs.0 μmol/L: * $P < 0.05$

有可能是其对血管增生性疾病具有广谱对抗作用。下一步需要加强血管增生性疾病动物模型及相关血管生成分子靶点的研究,以验证该假说。

参考文献

- [1] Li WW, Li VW, Hutnik M, *et al.* Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention[J]. *J Oncol*, 2012(2012):87 9623.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646.
- [3] Makrilia N, Lappa T, Xyla V, *et al.* The role of angiogenesis in solid tumours: an overview[J]. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(7):663.
- [4] Sy LK, Yan SC, Lok CN, *et al.* Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24):10 229.
- [5] Lok CN, Sy LK, Liu F, *et al.* Activation of autophagy of aggregation-prone ubiquitinated proteins by timosaponin A-III[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(36):31 684.
- [6] King FW, Fong S, Griffin C, *et al.* Timosaponin A III is preferentially cytotoxic to tumor cells through inhibition of mTOR and induction of ER stress[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9):e7 283.
- [7] Kang YJ, Chung HJ, Nam JW, *et al.* Cytotoxic and anti-neoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4):701.
- [8] Shao Li, Bo Zhang, Duo Jiang, *et al.* Herb network construction and co-module analysis for uncovering the combination rule of traditional Chinese herbal formulae[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(Suppl 11):S6.
- [9] 李梢.知母皂苷A-III作为具有抗血管新生作用的药物有效成分:中国,2009100929708[P]. 2012-07-04.
- [10] 张永莉.肿瘤新生血管生成抑制剂的研究进展[J]. *中国药房*, 2008, 19(31):2 465.

(收稿日期:2014-06-30 修回日期:2014-08-11)