

参麦注射液对内皮细胞增殖和迁移的影响

丁志山, 高承贤, 尹丽慧, 陈妮钹, 沃兴德
(浙江中医学院分子医学研究所, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的: 探讨参麦注射液对血管生成的影响, 方法: 采用 MTT 法检测参麦注射液对牛血清和肿瘤细胞条件培养液促进的牛主动脉内皮细胞增殖的影响, 采用琼脂糖刮除法检测参麦对牛血清和肿瘤条件培养液促进的牛内皮细胞迁移的影响。结果: 在含 10% 新生小牛血清培养液中和在肿瘤细胞条件培养液中, 参麦都能明显抑制牛主动脉内皮细胞增殖, 且呈量效关系, 对肿瘤细胞条件培养液诱导的内皮细胞迁移抑制作用显著。结论: 参麦能抑制牛内皮细胞增殖和迁移, 具有抑制血管生成的作用。

关键词: 参麦注射液; 内皮细胞; 血管生成

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)02-0030-03

An Experimental Study on the Inhibiting Effect of Shenmai Injection on Endothelial Cell Proliferation and Migration

DING Zhi-san, GAO Cheng-xian, YIN Li-hui, CHEN Ni-pi, WO Xing-De

(Molecular Medical Institute, Zhejiang Traditional Chinese Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Object: To study the effects of Shenmai injection on angiogenesis. Methods: Proliferation of bovine aortic endothelial cells(BAECs) were measured by MTT colorimetric assay after treated by various concentrations of Shenmai injection. The effects of Shenmai injection on proliferation of BAECs induced by conditioned medium of tumor(CM) were also measured by the same method. The effect of various concentrations of Shenmai on the migration of BAECs induced by fetal bovine serum(FBS) or CM was investigated by agarose assay. Results: Shenmai injection significantly inhibited proliferation of BAECs induced by FBS or CM. And Shenmai injection inhibited the proliferation of BAECs in a dose-dependent manner. Shenmai injection inhibited migration of BAECs induced by FBS or CM. Conclusion: Shenmai injection can inhibit proliferation and migration of bovine aortic endothelial cells. It is suggested that Shenmai can suppress angiogenesis.

Key words: Shenmai injection; endothelial cell; angiogenesis

血管生成是指从已存在的血管中生成新毛细血管的过程。体内大部分血管在发育完全后保持高度的稳定性, 其血管生成缓慢且难以觉察。但是, 活跃的血管生成过程在胚胎发育, 创伤愈合等过程中起了重要作用, 也与肿瘤, 慢性关节炎, 糖尿病, 动脉粥样硬化等病理过程密切相关^[1]。1987年, Folkman 将这类毛细血管异常增殖的疾病称为“血管生成性疾病”。近年研究发现抗血管生成可以抗肿瘤消退动脉粥样硬化^[1,2]。血管新生是一个复杂过程, 由已形成的微血管内皮细胞冲破血管壁的基质, 迁移、增殖和连接组成新的血管。在血管生成过程中, 血管内

皮细胞的增殖是血管新生化发生的最基本和最重要的环节^[3], 而内皮细胞的迁移也是血管生成的重要环节, 因此检测血管内皮细胞增殖和迁移能力可测定血管生成活性。

参麦注射液由人参和麦冬两味药组成, 具有防治冠心病与抗肿瘤的作用^[4,5]。临床疗效显著。我们利用培养的牛主动脉内皮细胞, 观察参麦对牛内皮细胞(BAEC)增殖和迁移的影响, 探讨参麦对血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃腺癌细胞株 SGC-7901 与人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中国科学院细胞生物学研究所。

1.1.2 试剂 超级新生牛血清: 杭州四季青生物工

收稿日期: 2002-07-01

基金项目: 浙江省自然科学基金(No. 399009), 浙江省中医管理局科研基金(No. 2000C11)资助项目

程材料研究所,批号 20000914; RPMI1640 培养基: 美国 GIBCO 公司产品,批号 1083954; 二苯基四氮唑溴盐 (MTT): 华美生物工程公司,进口分装,批号 991102; 二甲基亚砷: 分析纯 江苏鸿声化工厂批号 20000914; 1: 250 胰蛋白酶: 吉泰科技有限公司,进口分装; 参麦注射液: 10ml~ 2g 正大青春宝公司,批号 0010156; 琼脂糖: 华美生物工程公司,进口分装 批号 9812。

1.2 方法

1.2.1 BAEC 培养

无菌获取新生牛主动脉, D-Hank'S 液洗 3 遍, 加适量 0.1% 胰蛋白酶 37℃ 消化 5min, 收集液体离心, 取沉淀悬浮于 1640 培养液(含 100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素和 10% FBS), 接种于培养瓶中置 37℃ CO₂ 培养箱培养。取第 3~ 8 代细胞供实验用。

1.2.2 肿瘤细胞条件培养液的制备

肿瘤细胞 (SGC-7901 和 SMMC-7721) 以 1×10^5 / 孔接种于 24 孔培养板中, 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中孵育, 从接种时刻开始计时, 每 8h 吸取其中 3 孔条件培养液, -20℃ 冰箱保存备用。BAEC 以 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后, 换成无血清培养液继续培养 24h, 分成 8 个组, 每组 6 孔, 分别加入含 10% FBS 的 1640 培养液及上述不同时间段的肿瘤细胞条件培养液, 继续培养 36h, 加入 MTT 孵育 5h 后, 吸弃上清液, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 150μl, 震荡 10min, 630nm 处测 OD 值。确定条件培养液促内皮细胞增殖的最佳时段。取促进内皮细胞增殖最佳时段的条件培养液供本实验研究用。

1.2.3 参麦注射液对牛血清及肿瘤细胞条件培养液促内皮细胞增殖的影响

BAEC 以 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后, 换成无血清培养液继续培养 24h 后, 换成 10% FBS 的 1640 培养液, 同时加入不同浓度的参麦, 每剂量组 6 复孔, 继续培养 36h, 按上述方法测 OD 值。

BAEC 以 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 8h 后, 换成肿瘤细胞条件培养液(保留 6 孔作为对照), 继续培养 16h, 加入不同浓度的参麦注射液, 每剂量组 6 复孔, 继续培养 36h, 按上述方法测 OD 值。

1.2.4 参麦注射液对牛血清及肿瘤细胞条件培养液促内皮细胞迁移的影响

参照 Trochon^[6] 的方法, 将琼脂糖在平皿上制成胶, 并切去其中的 2/3, 将消化好的内皮细胞接种在切去胶的部分, 培养 3d 待内

皮细胞长满单层后, 刮去另一部分胶, 并同时加入含有不同浓度参麦的培养基, 每剂量组 6 个平板, 继续培养 48h 后取出培养物, 甲醛固定染色, 显微摄影记录结果, 计数迁移细胞数, 计算迁移抑制率。同样按上述方法制胶, 接种细胞, 3d 后, 刮去另一部分胶, 并换成肿瘤细胞条件培养液, 同时加入不同浓度参麦, 每剂量组 6 个平板, 继续培养 48h 后取出培养物, 按上述方法记录结果。

$$\text{抑制率} \% = \frac{(\text{对照组细胞数} - \text{实验组细胞数}) \times 100\%}{\text{对照组细胞数}}$$

1.3 数据统计学分析

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 *t* 检验。

2 结果

2.1 牛内皮细胞培养

从牛主动脉内膜获取的 BAEC 培养 24h 后, 光镜下观察, 可见数个甚至成团的内皮细胞呈鹅卵石状贴壁生长。

2.2 肿瘤细胞条件培养液促内皮细胞增殖

见图 1, 同 10% FBS 的 RPMI1640 相比, 两种肿瘤细胞 40h 前的条件培养液均能显著促进内皮细胞增殖 ($P < 0.01$), 其中 SMMC-7721 的促增殖作用较为明显。两种条件培养液的促增殖作用均以 8h 时的细胞培养液最强, SMMC-7721 为 145%, SGC-7901 为 41%, 因此选择 8h 的 SMMC-7721 培养液作为促内皮细胞增殖的条件培养液。

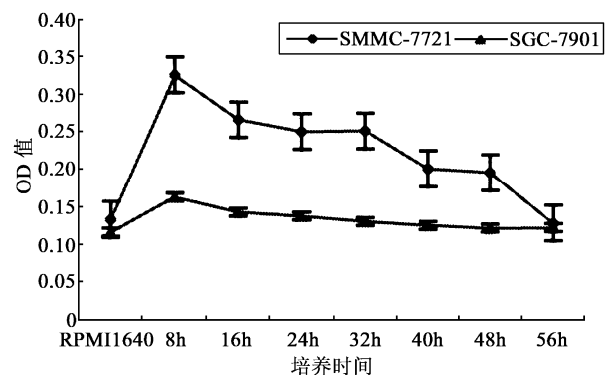


图 1 条件培养液对内皮细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

2.3 参麦注射液对牛内皮细胞增殖的影响

见图 2, 当参麦的浓度为 40μl/ml 时即可显著抑制牛血清促进的内皮细胞增殖(与对照组比 $P < 0.01$), 随着参麦的浓度增加, 抑制作用明显增强, 180μl/ml 的参麦对内皮细胞抑制率可高达 82%。而在 SMMC-7721 条件培养液中, 20μl/ml 的参麦即可明显地抑制内皮细胞的生长(与对照组相比 $P < 0.01$)。

如图 3 所示, 采用 SMMC-772 条件培养液, 当参

麦的浓度为 20 μ l/ml 时,即可明显地抑制内皮细胞的生长(与对照组相比 $P < 0.01$)。

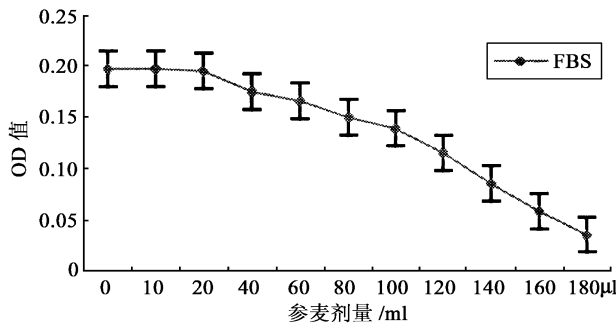


图2 参麦对牛血清促内皮细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

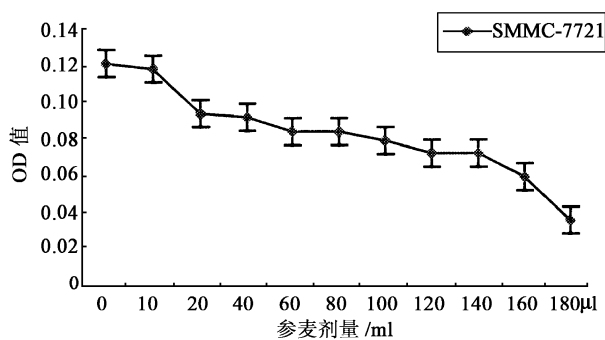


图3 参麦对条件培养液促内皮细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 参麦对牛内皮细胞迁移的影响 经 20 μ l/ml 参麦处理 48h 后,内皮细胞的迁移较对照组明显减少,差异有显著($P < 0.01$)。20 μ l/ml 的参麦对内皮细胞迁移的抑制率为 58%, 80 μ l/ml 参麦的抑制率为 91%, 120 μ l/ml 参麦的抑制率为 95%。可以看出参麦对内皮细胞的迁移抑制作用明显,迁移抑制率随着参麦浓度的增加而升高。

2.5 参麦对条件培养液促牛内皮细胞迁移的影响 条件培养液能明显促进内皮细胞迁移,使迁移的细胞数明显增加,差异具有显著性 $P < 0.05$ 。条件培养液中内皮细胞迁移率增加 16.5%。20 μ l/ml 的参麦对条件培养液中内皮细胞迁移的抑制率为 50%, 40 μ l/ml 参麦的抑制率为 63%, 80 μ l/ml 参麦的抑制率为 80%, 120 μ l/ml 的参麦抑制率为 87%。从以上结果可以看出参麦对条件培养液中内皮细胞迁移的抑制率也非常明显,迁移抑制率随着参麦浓度的增加而明显升高,参麦各组内皮细胞迁移数明显减少,与对照组比差异均有显著性 $P < 0.01$ 。

3 讨论

实体瘤的生长、转移需要大量的新生血管,且血管生成的增强强度和肿瘤转移能力呈正相关。在肿瘤组织中,肿瘤细胞的数目与内皮细胞数目是相关

的,它们之间能够互相促进。Folkman^[7]等研究表明,多种因子对血管内皮细胞的增生起作用,bFGF、VEGF 和内皮细胞生长因子还可引起内皮细胞的迁移。近几年来对血管生成的研究已取得较大进展,血管生成是一个受多种不同层次调节的过程,已经发现多种血管生成的抑制因子^[8]。但大部分都由于毒性较大而不能应用于临床,寻找新的高效低毒的血管生成抑制剂已经引起人们极大的兴趣。有研究发现参麦注射液具有抗肿瘤抗动脉粥样硬化作用^[4,5],但其机制仍不清楚。

本实验研究发现,参麦能直接作用于内皮细胞,显著抑制其增殖与游走。参麦在药物的浓度达到 40 μ l/ml 时,可显著地抑制牛血清促进的牛内皮细胞生长,并随着药物剂量的增大其抑制作用增强。同样参麦对肿瘤条件培养液中内皮细胞的增殖也明显抑制。参麦在较低的剂量下(20 μ l/ml)即可显著抑制内皮细胞迁移(迁移抑制率为 58%),并可显著抑制肿瘤细胞条件培养液诱发的内皮细胞的迁移(迁移抑制率为 50%),而在相同剂量下对内皮细胞的增殖抑制率只有 8%,提示参麦注射液抗迁移能力明显大于抗增殖能力。以上研究结果提示参麦具有抑制血管生成的作用,其作用机理可能是通过抑制内皮细胞迁移,抑制内皮细胞增殖,从而抑制新生血管生成。因此抗血管生成是参麦抗肿瘤防治冠心病的作用机制之一。如果体内实验能进一步证实参麦的抗血管生成作用,那么这将为参麦的临床应用提供新思路。

参考文献:

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-57.
- [2] Moulton KS, Heller E, Konecny MA, et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1726-32.
- [3] Hanada D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [4] 刘鲁明,钱华,陈震,等.参麦注射液抗肿瘤作用的初步实验研究[J].中国实验方剂学杂志,1996,2(4): 11-14.
- [5] 宋建丽.参麦注射液治疗冠心病的临床分析[J].药学进展,1999,23(1),44-46.
- [6] Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, et al. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro[J]. Int J Cancer, 1996, 66(5): 664-668.
- [7] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis[J]. J Biol Chem, 1992, 267(16): 10931-10934.
- [8] Ryan CJ, Wilding G. Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy[J]. Drugs Aging, 2000, 17(4): 249-255.