

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.008.html>

马钱子碱诱导人脐静脉内皮细胞凋亡过程中 血管内皮生长因子和上皮细胞激酶 A2 的表达变化

徐 萌¹ 李 平²

摘要 目的 探讨马钱子碱诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡过程中血管内皮生长因子(VEGF)和上皮细胞激酶 A2(EphA2)的表达变化。方法 常规培养 HUVECs,分为对照组、马钱子碱低(10 $\mu\text{mol/L}$)、中(20 $\mu\text{mol/L}$)、高(40 $\mu\text{mol/L}$)剂量处理组,CCK-8 法检测 HUVECs 细胞活力,划痕实验检测 HUVECs 的迁移改变,Hoechst 33258 细胞免疫荧光、流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测马钱子碱对 HUVECs 细胞凋亡变化,Western blot 分别检测马钱子碱对 HUVECs 细胞 VEGF 和 EphA2 蛋白表达变化。结果 马钱子碱可以浓度依赖性的抑制 HUVECs 增殖,划痕实验表明马钱子碱可抑制 HUVECs 的迁移;Hoechst 33258 细胞免疫荧光和流式细胞术均表明马钱子碱呈浓度依赖性促进 HUVECs 凋亡,Western blot 结果表明马钱子碱呈浓度依赖性的方式下调 HUVECs 中 VEGF 和 EphA2 的蛋白表达。结论 马钱子碱可以抑制 HUVECs 的增殖和迁移,引起细胞凋亡,机制可能与下调 VEGF 和 EphA2 表达有关。

关键词 马钱子碱;人脐静脉内皮细胞;细胞凋亡;血管内皮生长因子;上皮细胞激酶 A2

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0195-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.008

马钱子又称番木鳖、苦实等,入药为干燥成熟的种子。始载于《本草纲目》中,临床上用于跌打损伤、痹症风湿、疮毒痈肿等。马钱子主要活性生物碱单体成分马钱子碱(brucine),又称番木鳖碱。近年来有文献报道,马钱子碱有一定的抗感染、抗肿瘤功效^[1]。在肿瘤发生过程中,血管生成是基础^[2]。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)是常用的进行血管内皮细胞功能实验的细胞模型^[3]。马钱子碱抗肿瘤作用中有无抑制肿瘤血管生成目前已见文献报道,该实验通过探索马钱子碱诱导 HUVECs 增殖活性和细胞凋亡的影响,并探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和上皮细胞激酶 A2(epithelial cell kinase A2, EphA2)的表达变化,从而为临床使用马钱子碱抗肿瘤作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 马钱子碱(成都普菲德生物技术

2019-11-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81673908)

作者单位: ¹安徽中医药大学中医临床学院, 合肥 230038

²安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科、中西医结合肿瘤中心, 合肥 230022

作者简介: 徐 萌,女,硕士研究生;

李 平,男,教授,博士生导师,主任医师,责任作者, E-mail: 1964liping@sina.com

constructing the lentiviral RNA interference vector of SHP-2 gene with interference technology. **Methods** The lentiviral vector of shRNA sequence targeting SHP-2 was constructed and transfected into human cervical cancer Hela cells to silence SHP-2 gene. The expression of SHP-2 mRNA and protein in transfected Hela cells was detected by Real-time PCR and Western blot respectively, and the effect of SHP-2 gene silencing associated with matrine on cell proliferation was detected by CCK8. **Results** The interference sequences of three groups of SHP-2 genes (SHP-2 shRNA1, SHP-2 shRNA2 and SHP-2 shRNA3) and the control sequence (NS) were designed and successfully constructed, and RT-PCR showed that the one with best interference effect was the SHP-2 shRNA2 sequence. After screening stable cells, fluorescence microscopy showed that the infection efficiency was high. Western blot demonstrated that the expression of SHP-2 in interference group was lower than that in control group. CCK-8 assay showed that the proliferation of Hela cells in the combined group was slower than that in the control group with time longer ($P < 0.05$). **Conclusion** A cervical cancer cell model with stable SHP-2 down-regulation was successfully established, and SHP-2 gene silencing combined with matrine can affect cervical cancer cells proliferation.

Key words SHP-2; lentiviral vector; cervical cancer cell; proliferation

有限公司);高糖的 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清(美国 Gibco 公司);羊抗人 VEGF 抗体(美国 Proteintech 公司);羊抗人 EphA2 抗体(美国 RD Systems 公司);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(上海玉博生物科技有限公司);HUVECs(上海肿瘤细胞研究所)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养实验 HUVECs 的培养与传代 HUVECs 细胞用含有 10% 胎牛血清高糖的 DMEM 培养基 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养,每 2 d 换液 1 次 3~5 d 传代 1 次,实验用细胞为 3~10 代细胞。

1.2.2 CCK-8 方法检测马钱子碱对 HUVECs 活性的影响 取对数生长期的 HUVECs 细胞,按照 5×10^3 个/孔细胞将接种在 96 孔板,设未给药的 HUVECs 为对照组(仅含培养基)、不同剂量马钱子碱(1.5、10、20、40、80、160 μmol/L)处理组,每组设 6 个复孔 5% CO₂ 浓度的培养 24 h 后,加入 20 μl CCK-8 试剂,培养 2 h 后,在 450 nm 处读取吸光度值(A_{450}),观察细胞增殖抑制情况。细胞活力抑制率(%) = $[(A_{\text{对照组}} - A_{\text{试验组}}) / A_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。根据绘制的 HUVECs 增殖抑制曲线,求得半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值。

1.2.3 划痕实验检测马钱子碱对 HUVECs 迁移的影响 在 6 孔板背面中线处,先用 Marker 笔用直尺均匀划线,加入 5×10^5 个 HUVECs 细胞,常规培养 48 h 后,使用枪头按照划线,垂直划痕,PBS 充分洗涤细胞 5 min × 3 次,去除划下细胞,加入含 10% 胎牛血清的培养基,加入不同浓度马钱子碱(0、10、20、40 μmol/L),在 37 ℃ 的 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。按照 0 h、24 h 取样拍照,计算抑制细胞迁徙率,细胞迁徙抑制率(%) = (初始划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 初始划痕宽度 × 100%。

1.2.4 Hoechst 33258 染色检测马钱子碱对 HUVECs 凋亡影响 收集不同浓度马钱子碱(0、10、20、40 μmol/L)处理 HUVECs 24 h 后,PBS 漂洗 2 次后,离心弃去上清液,加入 Hoechst 33258 染液(终浓度 10 mg/L),避光染色 10 min,离心后弃去染液,荧光显微镜下观察照相。

1.2.5 Annexin-V/PI 双染法检测 HUVECs 细胞凋亡 实验分组前,在 6 孔板中接种对数生长期 HUVECs 的 5×10^5 /L 细胞悬液,在 5% CO₂ 浓度恒温箱中,培养 24 h 后,加入不同浓度的马钱子碱(终浓

度 0、10、20、40 μmol/L)处理 48 h,弃上清液,4 ℃ 冷 PBS 冲洗细胞 3 min × 2 次,试管中加入 200 μl 结合缓冲液重悬细胞,加入 10 μl 的 Annexin V-FITC,暗室反应 15 min;再加入 10 μl 碘化丙啶(PI)染液,流式细胞仪检测马钱子碱对 HUVECs 细胞凋亡率。

1.2.6 Western blot 检测 细胞培养、分组和加药干预同 1.2.2 项。BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳以及电转,血清封闭 2 h 后,加入相应的一抗(羊抗人 VEGF 抗体 1:2 500、羊抗人 EphA2 抗体 1:2 000)4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 5 min × 3 次后,加入二抗,于室温孵育 2 h, TBST 再次洗涤 5 min × 3 次,显影,扫描条带,以 GAPDH 作为内参,VEGF、EphA2 蛋白表达强度进行灰度比值显示相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,Leven 检验方差齐性。当 F 值高于相应 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时,结果认为给药组与对照组之间的统计学差异具有显著性或较高显著性。

2 结果

2.1 马钱子碱对 HUVECs 增殖抑制作用 不同浓度的马钱子碱可抑制 HUVECs 的生长,随着马钱子碱剂量(1.5、10、20、40、80、160 μmol/L)的升高,对 HUVECs 的增殖呈明显抑制作用,以对照组抑制率为 0 计算,随着马钱子碱药物各处理组的浓度增加,增殖抑制作用逐渐增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1 90% 可信区间的 IC₅₀ 为(28.2 ± 2.6) μmol/L。

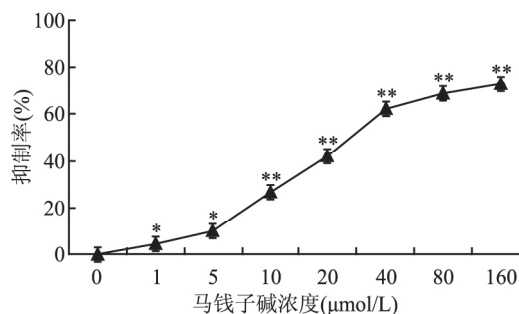


图1 CCK-8 法检测不同浓度马钱子碱对 HUVECs 增殖影响
与马钱子碱浓度 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 划痕实验示马钱子碱对 HUVECs 迁移抑制作用 划痕实验如图 2 所示,马钱子碱对 HUVECs 细胞迁移能力的影响,细胞死亡数随着马钱子碱浓度增高而增多,迁移能力越来越低,不同浓度马钱子碱(10、20、40 μmol/L)作用 24 h 后,与对照组

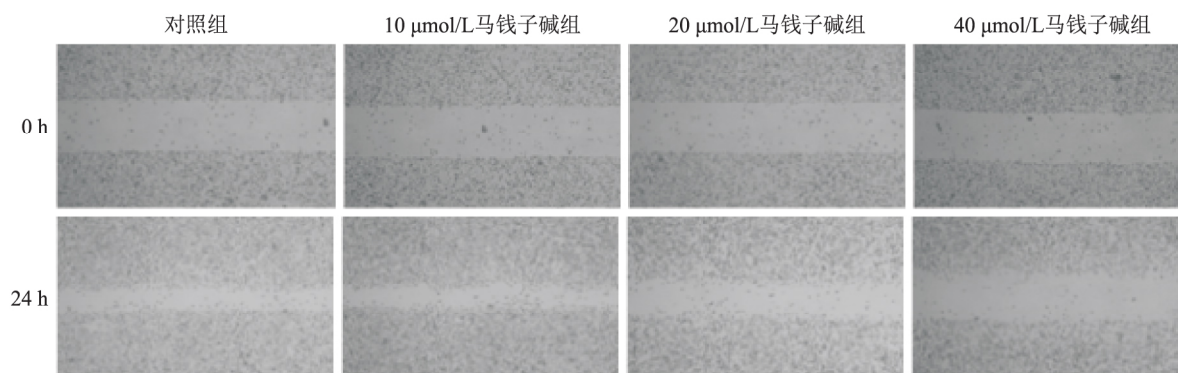
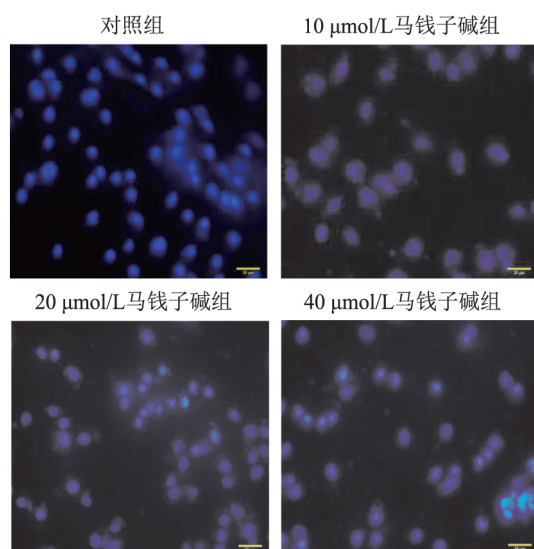


图2 不同浓度马钱子碱对 HUVECs 细胞 24 h 迁移能力的影响

(0 $\mu\text{mol/L}$ 马钱子碱) 比较, 马钱子碱处理组可抑制 HUVECs 的迁移, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组马钱子碱对 HUVECs 细胞迁移能力下降至 $(10.7 \pm 1.1)\%$ 、 $(21.7 \pm 1.9)\%$ 、 $(28.2 \pm 2.1)\%$ 。

2.3 马钱子碱对 HUVECs 凋亡的促进作用 不同浓度马钱子碱作用 24 h 后, 光学显微镜下观察各组细胞形态的变化。结果发现, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 马钱子碱) 比较, 随着浓度增加, 马钱子碱 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 对 HUVECs 的凋亡影响明显, 细胞数明显减少, 细胞凋亡数明显增加 (图 3)。

图3 不同浓度马钱子碱对 HUVECs 细胞凋亡的影响
Hoechst33258 $\times 200$

2.4 流式细胞术检测马钱子碱处理后 HUVECs 细胞凋亡结果 采取流式细胞术, Annexin-V/PI 双染实验表明, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 马钱子碱) $(1.76 \pm 0.32)\%$ 进行比较, 不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 马钱子碱处理组作用 24 h 后, HUVECs 早期的细胞

凋亡率显著增加 (图 4) 细胞凋亡率分别为 $(4.01 \pm 0.73)\%$ 、 $(8.56 \pm 0.87)\%$ 、 $(10.12 \pm 1.07)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 7.562, 8.129, 16.318$, $P = 0.045, 0.032, 0.003$)。

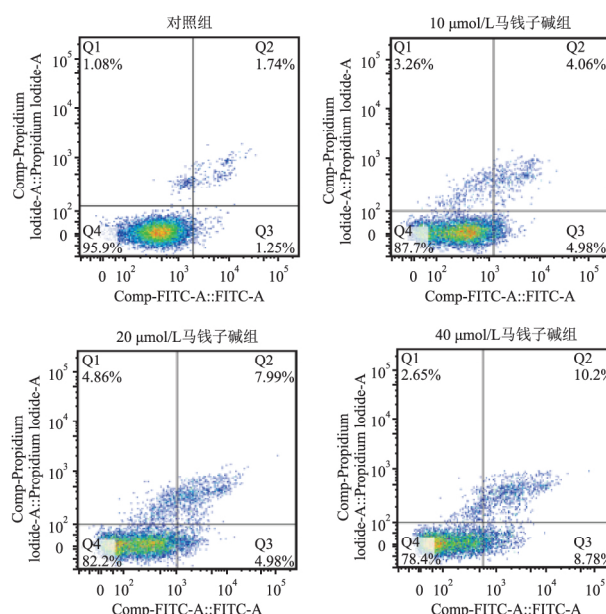


图4 流式细胞术检测不同浓度马钱子碱诱导 HUVECs 的凋亡

2.5 马钱子碱处理后 HUVECs 细胞 VEGF、EphA2 蛋白表达 Western blot 实验显示, 与空白对照相比, 随着马钱子碱 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组内药物浓度的增加, VEGF、EphA2 蛋白水平呈下降趋势 (图 5A)。图像分析显示, 与空白对照相比, 随着浓度升高, 马钱子碱 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 VEGF/GAPDH 和 EphA2/GAPDH 蛋白表达明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 5B。

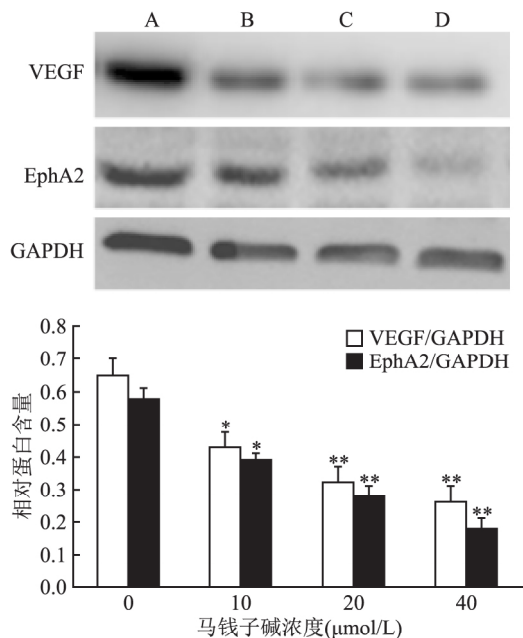


图5 Western blot 法检测马钱子碱对 HUVECs 细胞 VEGF 和 EphA2 的蛋白表达

A-D: 马钱子碱 0、10、20、40 μmol/L 处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

血管生成是临床上肿瘤疾病生长、复发和转移的关键环节^[1]。抗血管生成是调节肿瘤血管微环境,抑制肿瘤内血管生长,从而诱导肿瘤细胞凋亡,抑制增殖。由于多种细胞和信号通路参与肿瘤生长微环境,临床上近年来使用的抗肿瘤血管生成药物疗效有限,且有一定的副作用^[4-5]。目前,大量临床研究^[6]证实,传统中药由于其低毒、多靶点、多个信号通路作用,抗癌疗效确切,并可诱导肿瘤细胞凋亡,提高机体免疫功能,从而广泛使用。该课题组前期研究^[1]证实,马钱子碱具有很好地抗乳腺癌细胞增殖功能。马钱子碱的生物药理作用已成为目前抗肿瘤治疗作用的研究重点。同时,该研究通过划痕实验探讨马钱子碱影响 HUVECs 的细胞迁移能力,结果表明马钱子碱可以有效抑制 HUVECs 的迁移。

马钱子碱是提取自传统中药马钱子中的吲哚型生物碱,白色结晶性粉末,剧毒,细胞水平抗肿瘤研究表明,马钱子碱对多种肿瘤具有细胞毒作用,马钱子碱可显著抑制多种肿瘤细胞,如乳腺癌^[7]、肝癌^[8]等细胞增殖。该研究同样表明,马钱子碱明显抑制 HUVECs 增殖,且随着马钱子碱处理组的浓度增加,增殖抑制作用增强。在基因严格调控下,细胞

可以呈程序性死亡,即细胞凋亡,使得机体细胞增殖生长处于动态平衡;一旦增殖和凋亡失衡,即有可能引起肿瘤。诱导肿瘤细胞凋亡往往是化疗药物抗肿瘤作用的常见机制之一^[9]。该研究通过 Hoechst 33258 检测马钱子碱对 HUVECs 凋亡影响,结果显示不同浓度马钱子碱作用 24 h 后,在光学显微镜下,与对照组比较,随着马钱子碱浓度增加, HUVECs 细胞数明显减少,核浓缩和碎裂形态的凋亡细胞明显增加,表明马钱子碱浓度依赖性增加细胞凋亡。流式细胞仪定量分析凋亡细胞数表明,马钱子碱处理组明显增加细胞凋亡,且随着马钱子碱浓度的上升,发生细胞凋亡的 HUVECs 明显增多。故在一定浓度范围内,马钱子碱可能通过诱导 HUVECs 凋亡,从而抑制 HUVECs 细胞增殖。但需进一步研究明确马钱子碱诱导细胞凋亡的分子机制,是通过抑制凋亡信号通路关键蛋白 Caspase-3,还是升高 Bax/Bcl-2 蛋白比值,从而更好的为马钱子碱在临床上抗肿瘤血管生成提供依据。

肿瘤发生、生长、侵袭和转移需要新生血管,该过程为一个复杂过程,血管生成是众多促进和抑制血管生成的细胞因子参与过程,需要许多细胞因子参与信号传导途径,VEGF 和 EphA2 是两种重要的血管内皮细胞标志物,新生血管在肿瘤的发生和转移中至关重要。在临床治疗中,如果能阻止肿瘤新生血管,就能阻止肿瘤生成^[10]。EphA2 具有酪氨酸激酶活性,在细胞生长与分化、血管形成、细胞迁徙与粘附中,均有 EphA2 介导的信号参与;而 VEGF 是最为重要血管生成的促进因子,可特异性的促进细胞激活、增殖,通过控制 EphA2 与 VEGF 的表达,有可能调控肿瘤的血管生成,进而调控肿瘤行为^[11-12]。该研究表明,马钱子碱可以下调 VEGF 和 EphA2 的表达,然而是否可以通过激活 Caspase-9 引起线粒体凋亡途径,导致细胞凋亡尚需进一步研究。

综上所述,马钱子碱可抑制 HUVECs 血管生成活性物质 VEGF、Eph2 的表达,从而抑制 HUVECs 形成新生血管,有可能成为抗血管生成作用药物。

参考文献

- [1] 宋万吉,徐梦冉,董文钦,等. 马钱子碱对人乳腺癌裸鼠移植瘤生长的影响及机制探讨[J]. 安徽医科大学学报 2019, 54(7): 1047-51.
- [2] Mikhaylenko D S, Alekseev B Y, Zaletaev D V, et al. Structural alterations in human fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis[J]. Biochemistry(Mosc) 2018, 83(8): 930-43.

- [3] Liang H Z , Li S F , Zhang F , et al. Effect of endothelial microparticles induced by hypoxia on migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by delivering microRNA -19b [J]. *Chin Med J (Engl)* , 2018 , 131 (22) : 2726 - 33.
- [4] Kang M A , Kim W , Jo H R , et al. Anticancer and radiosensitizing effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors , AT7519 and SNS032 , on cervical cancer [J]. *Int J Oncol* 2018 , 53 (2) : 703 - 12.
- [5] Yoshida H , Yoshimura H , Matsuda S , et al. Effects of peritumoral bevacizumab injection against oral squamous cell carcinoma in a nude mouse xenograft model: A preliminary study [J]. *Oncol Lett* , 2018 , 15 (6) : 8627 - 34.
- [6] Wei D , Wang L , Chen Y , et al. Yangyin Fuzheng Decoction enhances anti-tumor efficacy of cisplatin on lung cancer [J]. *J Cancer* , 2018 , 9 (9) : 1568 - 74.
- [7] Serasanambati M , Chilakapati S R , Manikonda P K , et al. Anti-cancer effects of brucine and gemcitabine combination in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Nat Prod Res* 2015 , 29 (5) : 484 - 90.
- [8] Saraswati S , Alhaider A A , Agrawal S S. Anticarcinogenic effect of brucine in diethylnitrosamine initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats [J]. *Chem Biol Interact* , 2013 , 206 (2) : 214 - 21.
- [9] Zhang H , Jiao Y , Shi C , et al. Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially *via* the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018 , 50 (6) : 532 - 9.
- [10] Chen S , Zhang Y M , Zhang Y G , et al. Potentiation of treatment efficacy against colon cancer of dopamine *via* elevating KLF2 expression in tumor vascular endothelial cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* , 2017 , 21 (21) : 4860 - 6.
- [11] De Robertis M , Loiacono L , Fusilli C , et al. Dysregulation of EGFR pathway in EphA2 cell subpopulation significantly associates with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res* , 2017 , 23 (1) : 159 - 70.
- [12] Youngblood V , Wang S , Song W , et al. Elevated slit2 activity impairs VEGF-induced angiogenesis and tumor neovascularization in EphA2-deficient endothelium [J]. *Mol Cancer Res* 2015 , 13 (3) : 524 - 37.

Expression changes of vascular endothelial growth factor and epithelial kinase A2 in the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by brucine

Xu Meng¹ , Li Ping²

(¹ *Clinical College of Traditional Chinese Medicine , Anhui University of Traditional Chinese Medicine Hefei 230038;* ² *Dept of Chinese Integrative Medicine Oncology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the changes of vascular endothelial growth factor(VEGF) and epithelial kinase A2(EphA2) in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) apoptosis induced by brucine. **Methods** HUVECs cultured in conventional culture , which were divided into blank control group , treatment group with low brucine(10 μ mol/L) , medium(20 μ mol/L) and high(40 μ mol/L) . HUVECs cell activity was detected by CCK-8 assay , migration of HUVECs was detected by scratch assay , and apoptosis of HUVECs cells was detected by immunofluorescence of Hoechst 33258 and flow cytometry with Annexin V/PI double staining. The expression of VEGF and EphA2 in HUVECs cells was detected by Western blot. **Results** Brucine could inhibit HUVECs proliferation in a concentration-dependent manner. Scratch test showed that brucine could inhibit HUVECs migration. Immunofluorescence and flow cytometry showed that brucine promoted HUVECs apoptosis in a concentration-dependent manner , and Western blot results showed that brucine down-regulated protein expressions of VEGF and EphA2 in HUVECs in a concentration-dependent manner. **Conclusion** Brucine can inhibit the proliferation and migration of HUVECs , and induce apoptosis , which may be related to the down-regulated expression of VEGF and EphA2.

Key words Brucine; HUVECs; apoptosis; VEGF; EphA2