

· 论 著 ·

β -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的大鼠骨髓来源的内皮祖细胞增殖、管腔形成能力及细胞周期的影响

宋颖^{1#}, 孟晓¹, 杨向红^{1 Δ} , 刘云鹏²

(1. 中国医科大学附属盛京医院病理科, 沈阳 110004; 2. 中国医科大学第一附属医院肿瘤科, 沈阳 110004)

摘要:目的 探讨 β -榄香烯对内皮祖细胞(EPCs)参与肿瘤血管形成的抑制作用。方法 原代培养大鼠骨髓来源内皮祖细胞,胃癌细胞株 SGC-7901 培养上清液刺激与 β -榄香烯干预,四唑氮蓝还原反应(MTT)法检测内皮祖细胞增殖;碘化丙啶(PI)标记流式细胞仪检测细胞周期,Matrigel 检测细胞管腔形成能力。结果 β -榄香烯抑制肿瘤细胞上清液诱导的内皮祖细胞的增殖,并呈剂量和时间依赖性。细胞周期检测结果显示, β -榄香烯干预后, G_1 期细胞增多,进入 S 期及 G_2 期细胞减少,细胞周期被阻滞于 G_1 期;接种于 Matrigel 的内皮祖细胞形成管腔数目减少。结论 β -榄香烯可抑制内皮祖细胞的增殖,阻滞其从 G_1 期进入 S 期,并降低其形成管腔的能力。

关键词: β -榄香烯;内皮祖细胞;肿瘤细胞上清液;细胞增殖;细胞周期;管腔形成能力

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0537-03

Effect of β -elemene on proliferation, cell cycle and angiogenesis of endothelial progenitor cells

Song Ying^{1#}, Meng Xiao¹, Yang Xianghong^{1 Δ} , Liu Yunpeng²

(1. Department of Pathology, Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China;

2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: Objective To discuss the inhibitory action of β -elemene on endothelial progenitor cells(EPCs) angiogenesis. **Methods** EPCs were primarily cultured and treated with tumor cells supernatant and β -elemene; MTT assay was used to evaluate the proliferation of EPCs; the cell cycle was analyzed by using flow cytometry with PI staining; Matrigel was used to evaluate the angiogenic ability of EPCs. **Results** After treating with tumor cells supernatant and β -elemene, the proliferation of EPCs was apparently inhibited in a dose-dependent and time-dependent manner; FCM assays showed that EPCs in G_1 phase were increased, while in S phase and G_2 phase were decreased, which indicated that G_1 phase arrest happened; EPCs after treating with tumor cells supernatant and β -elemene, were planted to Matrigel, and the number of tube formation was decreased notably compared with control group. **Conclusion** β -elemene can directly influence the proliferation and cell cycle of EPCs, arrest cells entering S phase from G_1 phase and decrease their angiogenic ability.

Key words: β -elemene; vascular endothelial progenitor cells; tumor cells supernatant cell; proliferation; cell cycle; angiogenesis

榄香烯(elemene)是从姜科植物温郁金(莪术)中提取的以 β -榄香烯(化学名:1-甲基-1-乙烷基-2,4-二异丙基环己烷)为主要成分的榄香烯类化合物^[1-2]。大量研究发现, β -榄香烯可阻滞多种肿瘤细胞从 S 期进入 G_2 /M 期,抑制肿瘤细胞增殖^[3],在诱导肿瘤细胞凋亡、分化、抗肿瘤转移、逆转肿瘤细胞的耐药性等诸多方面都发挥着显著的作用^[4-5]。此外, β -榄香烯还具有毒副作用小和不易耐药等优点,具有良好的应用前景^[2,6],但有关 β -榄香烯作用机制的研究仍处于起步阶段。现在已有大量研究证明内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)参与了肿瘤的血管形成^[7-10]。本研究检测了 β -榄香烯对肿瘤诱导的 EPCs 增殖、细胞周期和管腔形成能力的影响,为 β -榄香烯的抗肿瘤机制提供一个新的靶点,同时也为抑制肿瘤血管生成提供了新的策略。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 大鼠骨髓来源内皮祖细胞的分离、培养、纯化及鉴定 采用 Ficoll 密度梯度离心法结合差速贴壁筛选法从大鼠骨髓

分离 EPCs;收集培养 24 h 的 EPCs,用激光共聚焦显微镜鉴定,AC133 和 vWF 双染阳性细胞为正在分化的 EPCs。

1.1.2 肿瘤细胞上清液的制备 胃腺癌细胞株 SGC-7901 用含 10% 胎牛血清培养液培养,当细胞融合达 80% 时,更换为无血清的 DMEM 培养液,24 h 收集上清液,0.22 μ m 滤膜过滤, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 待 EPCs 培养到第 4 天时,加入 40% 体积分数肿瘤细胞上清液诱导 12 h, (1) 浓度效应组:不同浓度的 β -榄香烯(0、5、10、20 μ g/mL)作用 48 h; (2) 时间效应组:20 μ g/mL β -榄香烯作用不同时间(0、12、24、48 h)。

1.2.2 四唑氮蓝还原反应(MTT)检测细胞增殖 将 EPCs 以每孔 200 μ L 细胞悬液(5×10^3 /mL)接种于 96 孔板中;加入无血清培养液继续培养 12 h;吸出培养液,40% 体积分数的肿瘤细胞上清液作用 12 h 后,分别加入含有 0、5、10、20 μ g/mL β -榄香烯的 DMEM 培养液,以只加培养液的孔为空白调零孔,以不含 β -榄香烯的孔为对照孔,每种浓度平行 5 孔,继续培养

48 h。加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 4 h 后孔内形成紫色结晶, 加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液终止反应, 振荡混匀, 置于酶标仪上检测光吸收值 (OD), 测定波长为 490 nm。

1.2.3 碘化丙啶 (PI) 标记流式细胞仪检测细胞周期 取生长 4 d 的 EPCs, 40% 体积分数的肿瘤细胞上清液作用 12 h 后加入含有 0、5、10、20 μ g/mL β -榄香烯的 DMEM 培养液作用 48 h, 胰蛋白酶消化吹打, 制成细胞悬液, 1 000 r/min, 离心 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜。1 000 r/min, 离心 10 min, PBS 清洗, 弃上清, 加入终浓度为 200 μ g/mL 的 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 再加入浓度为 20 μ g/mL 的 PI 溶液, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min。流式细胞仪进行细胞周期分析得出细胞各周期的百分率。

1.2.4 Matrigel 检测 EPCs 形成管腔的能力 消化收集贴壁 EPCs; 以 5×10^5 /孔的细胞数接种于涂有 Matrigel 的 24 孔板中; 在 40% 体积分数的肿瘤细胞上清液作用 12 h 后, 分别加入含有 0、5、10、20 μ g/mL β -榄香烯的 DMEM 培养液, 继续培养 48 h。在倒置显微镜下观察管腔形成情况, 每孔随机选取 5 个视野计数管腔数, 并取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。用方差分析对实验数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 的培养 EPCs 贴壁较慢, 3 d 后细胞开始伸展成梭形或纺锤形, 7 d 有细胞集落形成, 集落中央为圆形细胞群, 周边有梭形细胞生成; 大约 14 d 呈典型的铺路石样形态。

2.2 EPCs 的鉴定 vWF 阳性细胞被标记上红色荧光, AC133 阳性细胞被标记上绿色荧光, 双染阳性的细胞发黄绿色 (封 2 图 1), 被认为是正在分化中的 EPCs。

2.3 β -榄香烯对 EPCs 增殖的抑制作用 MTT 法检测结果显示: 不同浓度 β -榄香烯作用 48 h, 当 β -榄香烯浓度为 5 μ g/mL 时, 与对照组相比对 EPCs 增殖的抑制作用较明显 ($P < 0.05$), 当 β -榄香烯浓度达到 20 μ g/mL 时, 其抑制增殖作用更加明显 ($P < 0.01$); 随着 β -榄香烯作用时间的延长, β -榄香烯对 EPCs 增殖的抑制作用相应增强 ($P < 0.01$)。

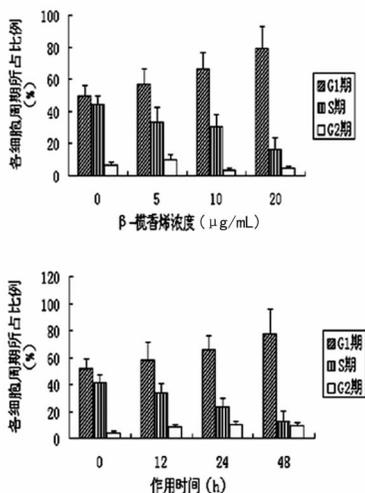


图 2 β -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的 EPCs 细胞周期的影响

2.4 β -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的 EPCs 细胞周期的影响 β -榄香烯作用于肿瘤细胞上清液诱导的 EPCs 后, 结果如

图 2 所示, 随着 β -榄香烯浓度的增加, G_1 期细胞所占比例增加, S 期细胞所占比例减少 ($P < 0.05$); 随着 β -榄香烯作用时间的延长, G_1 期细胞所占比例增加, S 期细胞所占比例减少 ($P < 0.05$)。

2.5 β -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的 EPCs 管腔形成能力的影响 40% 体积分数的肿瘤细胞上清液诱导 EPCs 12 h 后, 结果如封 2 图 3 所示, 不同浓度 β -榄香烯作用 48 h 后, 随着 β -榄香烯浓度的增加 EPCs 形成管腔的数量明显减少 ($P < 0.01$); 20 μ g/mL β -榄香烯作用 0~48 h, 随着时间的延长, EPCs 形成管腔的数量也明显减少 ($P < 0.01$)。

3 讨论

肿瘤在无血管的组织中仅呈缓慢的线性生长, 但当给予促血管化作用时, 呈指数生长^[11], 而且肿瘤组织中微血管的密度与其转移及预后有着极大的关系^[12]。因此, 新血管的形成在肿瘤的发生及发展过程中起很重要的作用, 通过抑制新血管的形成以抑制肿瘤的生长和转移成为肿瘤治疗的一种新的重要策略。1997 年, Asahara 等^[13]首次从人外周血中分离出 EPCs, 并证实了 EPCs 可以分化为血管内皮细胞。在生理或病理情况下, EPCs 可从骨髓被动员到外周血中, 增殖并分化为血管内皮细胞, 修复受损的内皮细胞, 并能促进缺血组织的血管再生, 大量研究证明 EPCs 同样参与了肿瘤新血管的形成。

研究显示 β -榄香烯可抑制多种肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡, 但其对肿瘤组织中血管形成的影响还未见报道。本实验通过检测 β -榄香烯对肿瘤诱导的 EPCs 生物活性的影响, 为抑制肿瘤的生长及转移提供了新的思路。

MTT 法检测细胞的增殖率, 结果显示 0~20 μ g/mL β -榄香烯作用于 EPCs 48 h 及 20 μ g/mL β -榄香烯作用 0~48 h 后, 细胞增殖率明显下降, 提示 β -榄香烯对 EPCs 的增殖具有直接的抑制作用, 并呈剂量和时间依赖性。国内外学者研究发现许多抗癌剂可通过阻滞细胞周期进程而抑制肿瘤细胞的增殖^[14], 因此作者进一步检测了 EPCs 的细胞周期。

PI 标记流式细胞仪检测细胞周期, 结果显示, 随着 β -榄香烯浓度的增加和作用时间的延长, 与对照组相比, G_1 期细胞比例增多, S 期细胞比例相应减少, 即细胞周期被阻滞于 G_1 期。这提示 β -榄香烯可通过将 EPCs 的细胞周期阻滞于 G_1 期, 从而抑制 EPCs 的增殖。Li 等^[3]研究显示 β -榄香烯可使卵巢癌细胞停滞于 G_2 -M 期, 刘跃明等^[15]实验结果显示 β -榄香烯可诱导肝 Hep-2 细胞凋亡并使细胞发生 G_1 期阻滞。以上结果显示, β -榄香烯可使不同的细胞阻滞于不同的细胞周期, 从而抑制细胞的分裂增殖, 使其活性减弱。

EPCs 的一个重要的生物学活性就是形成血管腔结构, 进而发展成为成熟的血管。有研究结果显示: 0~20 μ g/mL β -榄香烯作用于 EPCs 48 h 后, 本 Matrigel 胶上形成的管腔数目较对照组明显减少, 提示 β -榄香烯对 EPCs 的成血管能力具有明显的抑制作用。因此, 作者推测 β -榄香烯通过将 EPCs 阻滞于 G_1 期, 进而抑制其增殖率, 并使其形成血管腔的能力下降, 最终减少肿瘤新生血管的形成, 抑制肿瘤的生长及转移。

本实验结果显示, β -榄香烯对肿瘤诱导的 EPCs 可以抑制其增殖, 并呈时间依赖性和剂量依赖性, 使细胞周期阻滞于 G_1 期, 并降低其形成管腔的能力, 从而减少 EPCs 在肿瘤组织的血管形成。这从一个新的角度说明了 β -榄香烯可能通过抑制

EPCs 在肿瘤新生血管中的作用,抑制肿瘤的生长,为肿瘤的治疗提供了一个新的靶点。

参考文献:

- [1] 时继慧,傅乃武. β -榄香烯的抗肿瘤作用和药理学研究[J]. 中国中药杂志,1984,9(2):35-39.
- [2] 郭永田. 温莪术的抗癌成分研究[J]. 中药通报,1983,8(3):31.
- [3] Li X, Wang G, Zhao J, et al. Antiproliferative effect of beta-elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the $G_2 - M$ phase[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(7/8):894-904.
- [4] 周昆,崔黎,闫焱,等. 榄香烯对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞 VEGF-C 及 VEGFR-3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(6):551-553.
- [5] 陶磊,周梁,郑璐滢,等. 榄香烯对真核细胞翻译起始因子家族表达和血管生成的抑制作用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(11):840-845.
- [6] 钱军,等. 抗癌新药——榄香烯的药理及临床[J]. 中国肿瘤临床, 1996, 23(6):453-455.
- [7] De Bont ES, Guikema JE. Mobilized human CD34+ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non Hodgkin's lymphoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(20):7654-7659.
- [8] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post-

natal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85(3):221-228.

- [9] Shinkaruk S, Bayle M, Lain GD. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy[J]. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2003, 3(2):95-117.
- [10] Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity [J]. Cell Signal, 2001, 13(11):777-785.
- [11] Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea[J]. J Natl Cancer Inst, 52(2):413-427.
- [12] Ribatti D, Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2008, 10(11):3-10.
- [13] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(14):964-967.
- [14] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability[J]. Immunol Methods, 1986, 89(2):271-277.
- [15] 刘跃明,孙立群,王义. 榄香烯诱导 Hep22 细胞凋亡及其对细胞周期各时相的影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(5):868.

(收稿日期:2011-09-09 修回日期:2011-10-22)

(上接第 536 页)

- expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043):834-838.
- [6] Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2007, 26(30):4442-4452.
- [7] Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: potential for cancer detection, diagnosis, and prognosis[J]. Cancer Res, 2007, 67(10):4553-4555.
- [8] Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients [J]. Cancer Res, 2011, 71(2):550-560.
- [9] Zhao H, Shen J, Medico L, et al. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13735.
- [10] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,

2011, 108(12):5003-5008.

- [11] Shibuya H, Iinuma H, Shimada R, et al. Clinicopathological and Prognostic Value of MicroRNA-21 and MicroRNA-155 in Colorectal Cancer[J]. Oncology, 2010, 79(3/4):313-320.
- [12] Gong C, Yao Y, Wang Y, et al. Upregulation of MIR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer[J]. J Biol Chem, 2011, 286(21):1927-1937.
- [13] Kwak HJ, Kim YJ, Chun KR, et al. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas [J]. Oncogene, 2011, 30(21):2433-2442.
- [14] Lu ZX, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene[J]. Oncogene, 2008, 27(31):4373-4379.
- [15] Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma[J]. Int J Cancer, 2007, 121(5):1156-1161.

(收稿日期:2011-06-16 修回日期:2011-11-24)