

合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞体外增殖的影响

冯磊¹, 谭莹², 陈爽², 邱丽颖^{1*}, 金坚²¹江南大学无锡医学院; ²江南大学药学院, 无锡 214122

摘要: 研究合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞增殖的药效学影响。采用人脐静脉微血管内皮细胞 HMEC-1 作为研究模型, 经不同剂量合欢皮总皂苷作用 48、72 h 后, 应用 SRB 法、光学显微镜观察合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞增殖、形态的影响; 应用台盼蓝染色法、DNA 梯形条带法、流式细胞仪 PI 单染方法分析合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞生长的影响。实验结果发现合欢皮总皂苷提取物具有抑制血管内皮细胞增殖的作用, 其与时间、剂量均存在依赖关系, 作用 48 h 的 IC₅₀ 为 1.5 μg/mL; 合欢皮总皂苷使 HMEC-1 细胞周期阻滞在亚 G₀/G₁ 期, 高剂量作用 48 h 后可能引起细胞产生坏死。因此, 合欢皮总皂苷可能通过改变细胞周期, 部分引起细胞坏死, 从而抑制人微血管内皮细胞的增殖。

关键词: 合欢皮总皂苷; 人微血管内皮细胞; 抑制增殖; 细胞周期

中图分类号: R932

文献标识码: A

Effects of *Albizzia julibrissin* Durazz Saponins on Proliferation of Human Microvascular Endothelial Cells

FENG Lei¹, TAN Ying², CHEN Shuang², QIU Li-ying^{1*}, JIN Jian²¹Wuxi Medical School, Jiangnan University; ²School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In this study, the effect of *Albizzia julibrissin* Durazz saponins on proliferation of microvascular endothelial cells (HMEC-1) was investigated. After 48-hour and 72-hour intervention on HMEC-1 with different doses of *A. julibrissin* saponins, HMEC-1 proliferation and morphology were observed by Sulforhodamine B staining and optical microscope. The effects of *A. julibrissin* saponins on HMEC-1 were also analyzed by Trypan blue staining, DNA ladder, PI staining and flow cytometer. The results showed that *A. julibrissin* saponins affected HMEC-1 proliferation in time and dose-dependent manner, the IC₅₀ of 48-hour intervention group was 1.5 μg/mL. In addition, a block was found in G₀/G₁ stage of mitotic HMEC-1 cycle under the saponins intervention, and cell necrosis in high dosage 48-hour intervention group. Above all, based on these results, it was concluded that cell necrosis was possibly due to cell cycle change under *A. julibrissin* saponins intervention, which inhibited HMEC-1 proliferation.

Key words: *Albizzia julibrissin* Durazz saponins; human microvascular endothelial cells; proliferation inhibition; cell cycle

合欢属 *Albizzia* 为豆科含羞草亚科植物^[1], 是 *Albizzia julibrissin* Durazz 的树皮^[2], 具有解郁安神、活血消肿之功效。已有文献报道合欢皮乙醇粗提物在体内明显抑制血管生成, 阻止肿瘤细胞生长、侵袭和迁移, 同时存在一定的毒性作用^[3-9]。本文通过制备合欢皮总皂苷, 考察其对人微血管内皮细胞 (HMEC-1) 增殖的抑制作用, 细胞形态学变化、细胞周期分布改变, 初步探讨其抑制细胞增殖的机制。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

实验所用细胞株为 SV40 猿猴空泡病毒转染人脐静脉微血管内皮细胞 HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells), 由法国国家卫生医药研究院 U553 研究所提供。

1.2 药物与试剂

合欢皮为豆科植物合欢 *Albizzia julibrissin* Durazz 的干燥树皮, 购自无锡山禾集团健康参药连锁有限公司, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定, 符合《中华人民共和国药典》2010 版标准^[10]; 细胞全基因 DNA 抽提试剂盒, 购自北京天根生物技术有限公

收稿日期: 2013-07-01 接受日期: 2013-11-15

基金项目: 江苏省中医药管理局康缘中医药科技创新基金项目 (HZ0816KY)

* 通讯作者 E-mail: qiulydoc@sina.com

司;SRB、PI 均购自美国 Sigma 公司。

1.3 主要仪器

SY18-WJ2/3 型 CO₂ 细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);SW-CJ-IF 超净工作台(江苏苏净集团安泰公司);Multiskan MK3 自动酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);BX40 显微镜(Olympus 公司);FAC SCiibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 实验方法

2.1 合欢皮总皂苷样品的制备

称取合欢皮,加入 60 倍 70% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 2.5 h,过滤,合并滤液,得提取液;提取液减压回收乙醇并冷冻干燥;取合欢皮提取物冻干粉经 D101 大孔树脂分离,依次用蒸馏水及 30%、70% 乙醇冲洗。收集 70% 乙醇洗脱馏分,减压回收乙醇,冷冻干燥得合欢皮总皂苷粉末,并分析其干物质量及总皂苷含量。

2.2 人微血管内皮细胞形态的观察及增殖的测定

按常规于 37 °C、5% CO₂ 培养箱以 10% 的小牛血清传代培养 HMEC-1 细胞,试验时将细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板,生长至对数期后同步化培养 24 h。取合欢皮总皂苷冻干粉,以全培养基分别配制至终浓度为 1.0、1.5、2.0 μg/mL 作为加样组,分别作用细胞 48、72 h,采用光学显微镜观察细胞形态变化。药物作用结束后,选用磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B, SRB) 比色法,去上清,每孔加入 100 g/L 三氯醋酸 100 μL 固定,静置 5 min 后移到 4 °C 再放置至 40 min,倾掉固定液,用去离子水洗 5 遍,空气干燥,每孔加入 4 g/L SRB 100 μL 室温放置 30 min,用 10 ml/L 醋酸液洗 5 遍,加入 150 μL 10 mmol/L Tris 碱液(pH 10.5)溶解,在 540 nm 波长下用酶标仪测定光密度值 OD。以阴性组(不加合欢皮总皂苷干预,显色为正常细胞与试剂反应)和空白组(不加任何物质,显色为试剂反应)为对照,按以下公式计算合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞生长的抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (\text{OD}_{\text{阴性组}} - \text{OD}_{\text{加样组}}) / (\text{OD}_{\text{阴性组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3 台盼蓝染色观察人微血管内皮细胞膜通透性

取对数期细胞经同步化培养 24 h,按“2.2”项所述步骤加入不同浓度的合欢皮总皂苷,继续在

37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养 48 h 或 72 h,消化收集细胞(包括漂浮细胞),1000 rpm 离心 5 min,弃去培养基,PBS 重悬并调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL。加入 0.2% 台盼蓝溶液,滴在载玻片上,以阴性组(不加合欢皮总皂苷干预)为对照进行观察。

2.4 DNA Ladder 观察人微血管内皮细胞凋亡

采用 DNA 梯形条带(DNA Ladder)法,对数期细胞经同步化培养 24 h,按“2.3”项所述步骤收集不同浓度的合欢皮总皂苷作用后的细胞,按细胞全基因组 DNA 提取试剂盒步骤说明,提取细胞全基因组的 DNA,4 °C 冰箱备用。制备 1.8% 琼脂糖凝胶,60 V 电泳 1 h,用紫外投射仪观察梯形条带,并摄影,以阴性组(不加合欢皮总皂苷干预)为对照进行观察。

2.5 流式细胞仪分析人微血管内皮细胞周期

取对数期细胞经同步化培养 24 h,按“2.3”项所述步骤收集不同浓度的合欢皮总皂苷作用后的细胞,1000 rpm 离心 5 min,弃去培养基,PBS 漂洗 2 次,在终浓度为 70% 的乙醇溶液中,冰上固定 2 h,4 °C 冰箱保存备用。上机前离心除去固定液,PBS 漂洗,滴加新鲜配制的 PI 染液,调至细胞浓度为 1×10^4 个/mL,4 °C 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

3 实验结果

3.1 合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞增殖的影响

所制合欢皮总皂苷粉末的干物质提取率为 2.95%,总皂苷含量为 63.18%。由图 1 可见,HMEC-1 细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖关系,其中作用 48 h 时,合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞的抑制效果较好,其 IC₅₀ 为 1.5 μg/mL。

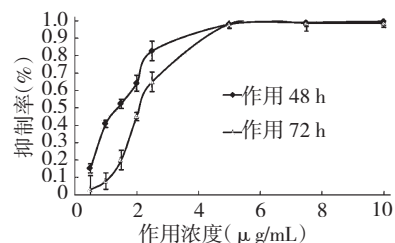


图 1 合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞增殖的影响

Fig. 1 The intervention effect of *A. julibrissin* saponins on HMEC-1 cell proliferation

3.2 合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞形态的影响

通过光学显微镜可以发现,阴性组中细胞生长良好,细胞形态规则,加入合欢皮总皂苷干预后,随着剂量的增加,细胞数量明显减少,与阴性组形成显著的差异,结果如图2所示。

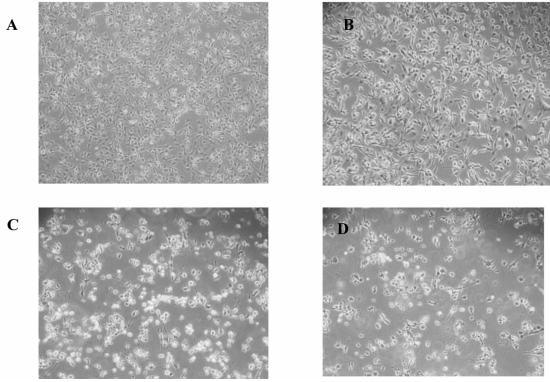


图2 合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞形态的影响(100 ×)
Fig.2 The intervention effect of *A. julibrissin* saponins on HMEC-1 cell morphology (100 ×)

A:阴性组;B:1.0 μg/mL组;C:1.5 μg/mL组;D:2.0 μg/mL组
A: Negative control; B: 1.0 μg/mL group; C: 1.5 μg/mL group; D: 2.0 μg/mL group

3.3 合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞膜通透性的影响

台盼蓝染色表明,随着合欢皮总皂苷剂量的增加,特别是高剂量组(2.0 μg/mL)有些细胞开始出现被染成蓝色的现象,正常细胞和凋亡早期细胞排

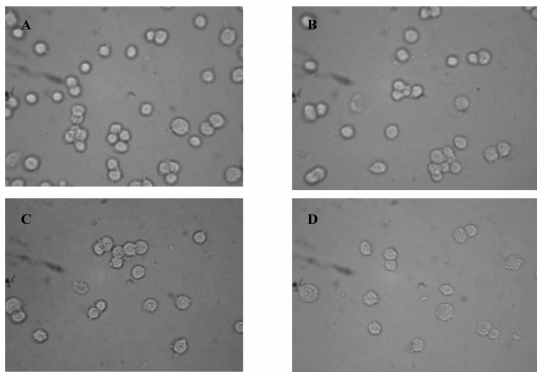


图3 合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞膜完整性的影响(台盼蓝染色,200 ×)

Fig.3 The intervention effect of *A. julibrissin* saponins on HMEC-1 cell membrane integrity (Trypan blue staining, 200 ×)

A:阴性组;B:1.0 μg/mL组;C:1.5 μg/mL组;D:2.0 μg/mL组
A: Negative control; B: 1.0 μg/mL group; C: 1.5 μg/mL group; D: 2.0 μg/mL group

斥台盼蓝染料,凋亡晚期和坏死细胞由于细胞膜通透性变化,出现摄取染料变蓝的现象,说明合欢皮总皂苷在高剂量下有可能改变细胞膜的通透性,引起细胞的凋亡坏死,结果如图3所示。

3.4 DNA Ladder 分析观察人微血管内皮细胞凋亡的情况

电泳凝胶成像如图4显示,合欢皮总皂苷作用48 h后三个剂量组均出现凋亡梯形条带现象,而在高剂量组(2.0 μg/mL)甚至出现了弥散现象,初步推断高剂量的合欢皮总皂苷可能使细胞发生了坏死现象。

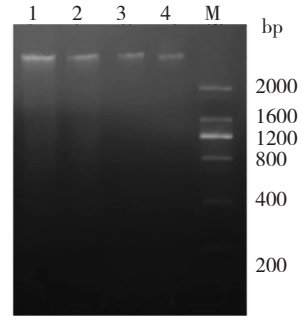


图4 合欢皮总皂苷对 HMEC-1 细胞凋亡的影响

Fig.4 The intervention effect of *A. julibrissin* saponins on HMEC-1 cell apoptosis

1:2.0 μg/mL组;2:1.5 μg/mL组;3:1.0 μg/mL组;4:阴性组;M: DNA Marker

1:2.0 μg/mL group; 2: 1.5 μg/mL group; 3: 1.0 μg/mL group; 4: Negative control; M: DNA Marker

3.5 合欢皮总皂苷对人微血管内皮细胞周期的影响

由表1所示,合欢皮总皂苷各剂量组干预48 h和72 h后,细胞被阻滞在亚G₀/G₁期,G₀/G₁期所占比例减少,且细胞周期变化呈药物剂量和时间的依赖关系。

4 讨论

内皮细胞的激活、增殖、迁移、基质降解及血管重构、血管和血管网形成等,在肿瘤新生血管生成过程中起着极重要的作用,其中最重要的是内皮细胞的增殖。已有文献报道合欢皮粗提取物在动物体内明显抑制肿瘤新生血管生成,从而抑制肿瘤生长、侵袭和迁移^[3-9]。

本文证明合欢皮总皂苷可显著抑制人微血管内皮细胞 HMEC-1 的体外增殖,且与时间、剂量均存在依赖关系,作用48 h后的 IC₅₀为 1.5 μg/mL。高剂

表1 合欢皮总皂苷作用后 HMEC-1 细胞周期分布
Table 1 HMEC-1 cell cycle under *A. julibrissin* saponins intervention

作用时间 Applied time (h)	作用浓度 Applied concentration (g/mL)	Sub-G ₀ /G ₁ (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
48	0	0.41	40.61	29.66	12.98
	1.0	0.48	38.72	27.17	14.27
	1.5	19.83	18.17	9.87	32.23
	2.0	38.50	10.80	29.62	9.95
72	0	11.28	56.77	11.27	11.54
	1.0	7.81	60.34	16.07	12.92
	1.5	64.71	18.49	10.01	3.09
	2.0	67.78	16.38	9.22	2.92

量组(2.0 μg/mL)作用时,光学显微镜发现细胞数量减少,台盼蓝染色发现其可能改变细胞膜的通透性,DNA 梯形条带法发现其引起 HMEC-1 细胞 DNA 弥散,提示出现细胞坏死现象。流式细胞仪 PI 单染结果显示,合欢皮总皂苷可使 HMEC-1 细胞周期阻滞在亚 G₀/G₁ 期。

综上所述,合欢皮总皂苷提取物具有抑制血管内皮细胞增殖的作用,使细胞周期阻滞在亚 G₀/G₁ 期,在高剂量作用下可能引起细胞产生坏死。

参考文献

- Huang TK(黄泰康),Ding ZZ(丁志遵),Zhao SX(赵守训). *Xiandai Bencao Gangmu; Volume 1(现代本草纲目:上卷)*. Beijing:China Medical Science Press,2001. 1090.
- Song LR(宋立人). *Modern Chinese Materia Medica Dictionary(现代中药学大辞典)*. Beijing: People's Medical Publishing House,2001. 876.
- Jin J(金坚),Hua H(花慧),Zhang LF(张莲芬), *et al.* The angiogenesis inhibition active ingredient from *Albizia julibrissin* durazz and its preparation and application(合欢皮中具有抑制血管生成作用的活性成份及其制备方法和应用). CN101239093,2008-08-13.
- Jin J(金坚),Hua H(花慧),Zhang LF(张莲芬), *et al.* The angiogenesis inhibition compound of *Albizia Durazz* extract and its preparation and application. CN101167787,2008-04-30.
- Qiu LY(邱丽颖),Li Q(李倩),Xu TZ(许天蟾), *et al.* Study of nephrotoxicity and its mechanism of saponin from *Albizia julibrissin* Durazz in mice. *J Toxicol(毒理学杂志)*, 2011,25:431-434.
- Du FF(杜芳芳),Chen LM(陈丽敏),Liu LY(刘玲艳), *et al.* Toxicology research of different extract from *Albizia julibrissin* Durazz on tumor-bearing mice. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2011,23:328-331.
- Chen LM(陈丽敏),Kang XX(康晓星),Wang H(王华), *et al.* Effect of different extract methods of *Julibroside* on the transplantable tumor of mice. *Strait Pharm J(海峡药理学)*, 2010,22:36-39.
- Feng L(冯磊),Hua H(花慧),Qiu LY(邱丽颖), *et al.* Pharmacodynamic study of *Albizia julibrissin* extracts on the anti-angiogenic effect *in vivo*. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2011,23:328-331.
- Hua H(花慧),Feng L(冯磊),Zhang XP(张小平), *et al.* The study on the anti-angiogenenic effect of *Albizia julibrissin* extracts. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2010,22:215-218.
- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)*. Beijing:China Medical Science Press, 2010. Vol I,134.