

# 水蛭素对小鼠 EOMA 血管瘤细胞体外增殖及凋亡的影响

杨才志 陈胜贤 黄锦菁 吴绍锋<sup>1</sup> (广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405)

**摘要** 目的 探讨水蛭素作用于小鼠 EOMA 血管瘤细胞的抑制作用及其机制。方法 体外培养 EOMA 细胞,使用不同浓度水蛭素作用于 EOMA 细胞 48 h,应用噻唑蓝(MTT)法、流式细胞术检测细胞存活率和细胞凋亡情况,观察水蛭素对 EOMA 细胞的抑制作用,并筛选出水蛭素的最适抑制浓度,比较水蛭素和平阳霉素(PYM)单用对 EOMA 细胞的抑制率。结果 相较于溶剂对照组,EOMA 细胞存活率随水蛭素浓度增加而逐渐下降,至药物浓度为 4 U/ml 时有显著差异( $P < 0.05$ )。结论 水蛭素在体外可有效抑制小鼠 EOMA 血管瘤细胞的增殖并促进其凋亡,这一作用呈现明显的剂量效应关系。

**关键词** 水蛭素;血管瘤;EOMA;增殖;凋亡

**中图分类号** R73 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9202(2015)16-4445-02;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.16.011

血管瘤是婴幼儿时期常见的血管性肿瘤,新生儿发病率约为 10%~12%<sup>[1]</sup>。根据 Ji 等<sup>[2]</sup>关于血管瘤生成的理论,这是一种血管内皮细胞和周细胞异常增殖导致的病变,因此可以考虑应用血管内皮生成抑制药物加以干预和治疗。本研究利用小鼠血管瘤内皮细胞株(EOMA)初步探讨水蛭素的治疗效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 主要实验仪器与材料** ①CO<sub>2</sub> 培养箱:美国 FORMA 公司 3111;②倒置显微镜:奥林巴斯株式会社 CKX41;③酶标仪:六一公司;④流式细胞仪。

**1.1.2 细胞、药品和主要试剂** ①小鼠 EOMA 血管瘤细胞:广州吉妮欧生物科技有限公司;②RPMI-1640 培养基:GIBCO 公司,批号 20100923;③pen strep 青链双抗:GIBCO 公司,批号 201010;④溴化噻唑蓝四唑(MTT):BIOSHARP 公司,min > 98%;⑤天然水蛭素:郑州英诺生物科技有限公司,min ≥ 95%,批号 11111101;⑥0.25% trypsin 胰酶:GIBCO 公司,批号 201103;⑦newborn calf serum 牛血清:GIBCO 公司,批号 201310;⑧注射用盐酸平阳霉素(PYM):上海通用药业股份有限公司;⑨二甲亚砜(DMSO):BIOSHARP 公司,min > 99.5%, $\rho$ :10 g/ml。

### 1.2 方 法

**1.2.1 药液配制** (1)水蛭素原液:用培养液溶解成 32 U/ml 浓度原液保存,使用时用培养液稀释成不同浓度。(2)PYM 原液:用培养液溶解成 800  $\mu$ g/ml 浓度原液保存,使用时用培养液稀释成不同浓度。(3)5 mg/ml MTT 溶液:用无血清 1640 培养基按 5 mg/ml 配制。(4)碘化丙啶(PI)染液:用磷酸盐缓冲液(PBS)按 50 U/ml PI、50 U/ml RNaseA 配制。

基金项目:2012 年国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201210572012);2013 年广东省大学生创新创业训练计划项目(No.1057213003)

<sup>1</sup> 广州中医药大学基础医学院

通讯作者:吴绍锋(1979-)男,实验师,主要从事病理学与分子生物学技术研究。

第一作者:杨才志(1992-)男,主要从事临床医学研究。

**1.2.2 细胞培养** EOMA 细胞在 RPMI-1640 培养基(含 10% 灭活小牛血清、1% 双抗(青霉素、链霉素))中,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养。

**1.2.3 MTT 法检测水蛭素对 EOMA 细胞增殖抑制作用** 取对数生长期 EOMA 细胞,用含血清的 1640 培养液稀释成浓度为  $4 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板。培养 24 h 后,加入不同浓度的水蛭素使其终浓度分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 U/ml,阳性药物对照孔加入 PYM 溶液使 PYM 的终浓度分别为 200、100  $\mu$ g/ml,溶剂及细胞对照孔加入无血清 1640 培养液,以上每组各设 4 复孔。培养 36 h 和 48 h 后吸出各孔培养液,每孔加入 5 mg/ml MTT 100  $\mu$ l(避光),继续孵育 4 h,弃上清液,加入 DMSO 完全显色后,酶标仪测定光密度值(OD 值)。以溶剂处理的细胞为对照组,计算水蛭素对细胞的抑制率和半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

**1.2.4 流式细胞术检测不同浓度水蛭素作用 48 h 后 EOMA 细胞凋亡率** 取对数生长期生长良好的细胞,用含血清的 1640 培养基配制浓度为  $2 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液,接种于 24 孔培养板。培养过夜后,吸出培养液,加入不同浓度的水蛭素使其最终浓度分别为 4、2、1、0.5、0.25 U/ml,细胞对照组加入无血清 1640 培养基,每组设 3 个复孔,处理 48 h。收集处理后的细胞培养液至离心管;加 1 ml PBS 清洗 1 次,清洗液加入管中;胰酶消化收集细胞于管中;1 ml PBS 清洗剩余细胞 1 次,清洗液加入离心管;用同一离心管收集上述得到的细胞液。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;重悬细胞后再次离心弃上清,用 PBS 重悬细胞,将细胞加入预冷的无水乙醇中,乙醇终浓度为 70%,4℃避光固定 30 min 以上;1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,PBS 清洗 2 次;加 500  $\mu$ l 含 50  $\mu$ l/ml PI、50  $\mu$ l/ml RNaseA 的 PI 染液(PBS 配制),避光孵育 30 min。流式细胞仪检测分析细胞凋亡率。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS19.0 软件,测定结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,行重复测量资料的方差分析。

## 2 结 果

**2.1 MTT 检测水蛭素作用于小鼠 EOMA 血管瘤细胞 36 h、48 h 后的抑制率** 作用 48 h 后,随浓度增加,水蛭素对 EOMA

细胞的抑制率逐渐升高;与溶剂对照组相比,药物浓度为 0.25 U/ml 时细胞抑制率( IR) 为 44.005%,有显著性差异(  $P < 0.05$ );继续增加至 4 U/ml 时,IR 为 99.617%。36 h 组和 48 h 两组变化趋势相似,可认为不同浓度的水蛭素对小鼠 EOMA 血管瘤细胞 IR 的影响不同,呈现明显的剂量-时间依赖性。见表 1。

**2.2 流式细胞术检测不同浓度水蛭素作用于小鼠 EOMA 血管瘤细胞 48 h 后的细胞周期分布** 流式细胞术结果与 MTT 实验结果一致:与溶剂对照组对比,给药 48 h 后不同浓度组的水蛭素对  $G_2/M$  期 EOMA 细胞有诱导凋亡的作用。对比溶剂对照组,不同浓度水蛭素组  $G_1$  峰前方均出现亚二倍峰(凋亡峰),表明被诱导的凋亡细胞增加;不同浓度水蛭素组  $G_1/S/G_2$  期细胞数占总数的比例相比溶剂对照组均有明显变化, $G_1$  期细胞数占总数比例明显上升,而  $G_2$  期细胞数占总数比例均有不同程度的明显下降,可以看出给药后小鼠 EOMA 血管瘤细胞分裂合成受到限制或破坏,即水蛭素对小鼠 EOMA 血管瘤细胞有明显的诱导凋亡的作用。见表 2。

**表 1 水蛭素、PYM 作用于 EOMA 血管瘤细胞 36、48 h 后光密度值及细胞抑制率的变化(  $\bar{x} \pm s$  )**

组别	36 h		48 h	
	OD492	IR( % )	OD492	IR( % )
溶剂对照组	0.322 ± 0.017	-	0.392 ± 0.024	-
水蛭素 0.25 U/ml	0.317 ± 0.018	1.630	0.220 ± 0.009	44.005
水蛭素 0.5 U/ml	0.296 ± 0.015	8.075	0.182 ± 0.012	53.571
水蛭素 1 U/ml	0.221 ± 0.015	31.522	0.153 ± 0.040	60.969
水蛭素 2 U/ml	0.126 ± 0.018	60.792	0.062 ± 0.022	84.120
水蛭素 4 U/ml	0.055 ± 0.023	82.842	0.002 ± 0.001	99.617
PYM 100 μg/ml	0.040 ± 0.024	87.733	0.044 ± 0.024	88.903
PYM 200 μg/ml	0.037 ± 0.026	88.665	0.040 ± 0.026	89.732

**表 2 流式细胞仪检测不同浓度水蛭素作用于小鼠 EOMA 血管瘤细胞周期分布( % )**

组别	$G_0/G_1$	$G_2/M$	S
溶剂对照组	58.7	14.7	26.6
水蛭素 0.25 U/ml	85.9	0.2	13.9
水蛭素 0.5 U/ml	82.9	3.5	13.6
水蛭素 1 U/ml	88.4	3.3	8.3
水蛭素 2 U/ml	86.3	0	13.7
水蛭素 4 U/ml	54.7	11.7	33.6

**3 讨论**

血管瘤形成的机制是血管内皮细胞的增殖和血管生成<sup>(3)</sup>。因此,可以通过抑制血管内皮细胞的增殖、减少局部血管的生成来控制血管瘤的发生发展,从而达到治疗血管瘤的目的。

EOMA 细胞是 129P3/J 小鼠来源的血管瘤内皮细胞<sup>(4)</sup>,主要由这种异常增殖的血管内皮细胞构成 EOMA 血管瘤,目前常用于构建血管瘤实验动物及细胞培养模型<sup>(5)</sup>。水蛭是一种传统中药,《中国药典》记载水蛭具有破血通经,逐瘀消癥的功效<sup>(6)</sup>,广泛用于活血化瘀的组方中。现代研究表明,水蛭唾液腺分泌的水蛭素是一种由 65 个氨基酸组成的单链多肽,能以 1:1 的方式与凝血酶结合,使其失去凝血功能<sup>(7)</sup>。大量实验证

明,水蛭素是世界上已知的最有效的天然凝血酶抑制剂<sup>(8)</sup>。目前有研究表明水蛭提取物对凝血酶诱导的恒河猴视网膜脉络膜血管内皮细胞( RF-6A 细胞) 的增殖有抑制作用<sup>(9)</sup>。并且水蛭提取物能显著抑制肿瘤血管的生成及血管内皮生长因子( VEGF)、基质金属蛋白酶 9( MMP-9) 的表达<sup>(10)</sup>。可见水蛭素是凝血酶的特异性抑制剂,可抑制凝血酶对内皮细胞刺激诱导血管生成的作用,降低 VEGF 的表达,从而抑制血管内皮细胞的增殖、减少新型血管的生成。而进一步的现代临床研究表明,水蛭素还对血管瘤具有治疗作用,颜德馨老中医以水蛭粉为主药制成消瘤丸治疗血管瘤<sup>(11)</sup>,但其具体疗效及治疗机制尚不清楚。

本实验研究结果表明,水蛭素能在体外明显地抑制 EOMA 血管瘤内皮细胞的增殖,并且随着作用时间和浓度的增加,其抑制作用也增强,对 EOMA 细胞的抑制率增高,抑制率与药物浓度存在依赖关系。水蛭素抑制细胞增殖的作用较 PYM 强。本研究初步证明水蛭素抑制血管瘤细胞生长的主要机制是诱导血管内皮细胞凋亡。由于机体内的巨噬细胞会迅速清除掉凋亡细胞,减少了炎症反应的产生<sup>(12)</sup>,因此通过诱导凋亡而消灭血管瘤内皮细胞所产生的局部反应轻,对血管瘤治疗的安全性有重要意义,也保证了血管瘤治疗后的外观恢复。

**4 参考文献**

- 1 秦中平,刘学键,李克雷,等.小剂量普萘洛尔口服治疗婴儿血管瘤的近期疗效与安全性评价(J).中华医学杂志,2009;89(44):3130-4.
- 2 Ji Y,Chen S,Li K *et al.* Signaling pathways in the development of infantile hemangioma(J).J Hematol Oncol 2014;7(1):13.
- 3 Greenberger S,Bischoff J.Pathogenesis of infantile haemangioma(J).Br J Dermatol 2013;169(1):12-9.
- 4 许振起,刘宇,王依祥,等. Avastin 治疗小鼠血管内皮瘤的实验研究(J).北京大学学报(医学版) 2009;41(1):105-8.
- 5 徐仙赞,黄海金,潘明倩,等.普萘洛尔对小鼠血管瘤细胞体外增殖及凋亡的影响(J).中国肿瘤临床 2012;39(15):1017-9.
- 6 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部(S).北京:中国医药科技出版社 2010:77.
- 7 Duzgun S,Nisanci M,Unlu E.The effect of recombinant hirudin on rabbit ear flaps with venous insufficiency(J).Indian J Plast Surg,2014;47(1):102-8.
- 8 Kovach IM,Kakalis L,Jordan F *et al.* Proton bridging in the interactions of thrombin with hirudin and its mimics(J).Biochemistry,2013;52(14):2472-81.
- 9 郑燕林,刘聪慧,谭笑彦.水蛭提取液对恒河猴视网膜血管内皮细胞增殖和细胞周期的影响(J).眼科新进展 2010;30(5):413-7.
- 10 吴秋玲.水蛭、斑蝥对肿瘤血管生成及 VEGF、MMP 表达的影响(D).武汉:湖北中医药大学硕士论文 2011:22-5.
- 11 颜乾麟,胡泉林,王宇锋.颜德馨医案医话集(M).北京:中国中医药出版社 2010:17-39.
- 12 Fadeel B,Xue D,Kagan V.Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation(J).Biochem Biophys Res Commun,2010;396(1):7-10.

(2015-01-13 修回)  
(编辑 袁左鸣)