

姜黄素对血管生成影响的实验研究

★ 梁斌¹ 黄美健¹ 丁志山² (1. 浙江省杭州市第三人民医院 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学生命科学系 杭州 310053)

摘要:目的:从姜黄素对内皮细胞增殖和迁移的影响角度,探讨姜黄素抗血管生成的作用机理。方法:用 MTT 法检测姜黄素对牛主动脉内皮细胞及人胃腺癌细胞系 SGC-7901 细胞增殖的影响;用琼脂糖刮除法检测姜黄素对牛内皮细胞迁移的影响。结果:姜黄素能明显抑制牛内皮细胞增殖,对非内皮细胞包括肿瘤细胞也有抑制作用,但同内皮细胞相比,差异显著,说明姜黄素能特异性抑制内皮细胞增殖;姜黄素能显著抑制牛内皮细胞迁移,在实验浓度范围内,其抑制作用呈明显量效关系。结论:姜黄素是一种特异性血管生成抑制剂;抑制内皮细胞增殖和迁移可能是姜黄素抑制血管生成的机理之一。

关键词:姜黄素;血管生成;内皮细胞

中图分类号:R 282.75 **文献标识码:**A

肿瘤的发生发展依赖新生血管生成^[1],新生血管生成是肿瘤发病的重要机制之一,抑制肿瘤新生血管生成已成为抗肿瘤治疗的重要手段。姜黄作为一种传统的活血化瘀药,目前的大量研究表明其具有明显的抗肿瘤作用^[2-6],本研究拟探讨姜黄抗肿瘤作用是否通过其主要有效成分——姜黄素起作用,并探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞株 (1)牛主动脉内皮细胞(BAEC)(本实验室培养)。(2)人胃腺癌细胞株 SGC-79019(购自中国科学院细胞生物学研究所)。

1.2 药物 姜黄素为本室采用硅胶柱层析方法制

3.4 不溶性微粒 中国药典 2005 年版规定:标示量为 100 ml 或 100 ml 以上的静脉用注射液,除另有规定外,每 1 ml 中含有 10 μm 以上的微粒不得超过 25 粒,含 25 μm 以上的微粒不得超过 3 粒。从表 2 微粒数据看出,配伍液在 0~3 h 内大小微粒变化不大,均符合中国药典 2005 年版的要求。而 3~4.5 h 不溶性微粒有上升的趋势,可能由于中药注射液成分多复杂,随着时间的延长发生氧化、缩合、水解等反应,各种微粒数都有不同程度不同的改变,导致微粒数增加,也导致输液成分的改变,这也可能是引起临床出现过敏反应的重要原因之一。25 μm 以上微粒的变化应引起足够的关注,有的数据超出中国药典 2005 年版关于微粒的限度的规定,对于不溶性微粒的控制建议使用质量可靠的终端滤器的一次性输

备,先用 DMSO 配制成 50 mmol/L,再用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

1.3 试剂及仪器 超级新生牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所产品);DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司产品);二苯基四氮唑溴盐(MTT)(华美生物工程公司,进口分装);1:250 胰蛋白酶(吉泰科技有限公司,进口分装);琼脂糖(华美生物工程公司,进口分装);实验仪器由所在实验室提供。

2 实验方法

2.1 牛内皮细胞原代培养 无菌获取新生牛主动脉,修剪掉血管周围组织,D-Hanks 液洗 3 遍,将内皮层朝下置于培养皿中加适量 0.1% 胰蛋白酶消化液器。

银杏达莫注射液与 5% 葡萄糖注射液、10% 葡萄糖注射液、0.9% 氯化钠注射液配伍后,从吸收度、不溶性微粒数所见,其稳定性较差,为了保证临床用药的安全、有效,建议银杏达莫注射液与 5% 葡萄糖注射液、10% 葡萄糖注射液、0.9% 氯化钠注射液配伍后应在 3 h 内使用。

参考文献

- [1]杜秀芳,詹文红. 银杏达莫注射液的临床应用进展[J]. 临床荟萃,2007,22(18):1367-1368.
- [2]李文玲,翁志华. 银杏达莫注射液致严重过敏性休克 1 例[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(3):251-252.
- [3]韦丽华. 银杏叶制剂的药理作用及不良反应[J]. 海峡药学,2007,19(17):101-102.

(收稿日期:2008-12-23 责任编辑:曹征)

数分钟,收集液体,离心,取细胞沉淀悬浮于 1640 培养液(含 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素和 10% FBS),接种于培养瓶,置 37 °C 培养箱培养,长满后常规胰蛋白酶消化法传代培养。

2.2 姜黄素对肿瘤细胞增殖的影响 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养的 SGC-7901 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,37 °C 5% CO² 的培养箱中培养 24 小时后,加入不同浓度的姜黄素,每剂量组 6 复孔,继续培养 48 小时,加入 MTT 孵育 4 小时后,吸弃上清液,加入 DMSO 150 μl 震荡 10 分钟,630 nm 处测 OD 值。

2.3 姜黄素对牛内皮细胞增殖的影响 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养的牛内皮细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,37 °C 5% CO² 的培养箱中培养 24 小时后,加入不同浓度的姜黄素,每剂量组 6 复孔,继续培养 48 小时,加入 MTT 孵育 4 小时后,吸弃上清液,加入 DMSO 150 μl 震荡 10 分钟,630 nm 处测 OD 值。

2.4 姜黄素对牛内皮细胞迁移的影响 参照 Trochon 介绍的方法,将琼脂在平皿上制成胶,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 3 天后待内皮细胞长满单层后,刮去另一部分胶,并同时加入 DMEM 培养液(作为对照组)及含有高、中、低浓度姜黄素(作为实验组),每剂量组 4 个平板,继续培养 48 小时后取出培养物,甲醛固定,染色后,显微摄影记录结果,计数迁移细胞数,计算迁移抑制率。

抑制率(%)

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

3 实验结果

3.1 姜黄素对肿瘤细胞和内皮细胞增殖的影响

姜黄素能明显抑制牛内皮细胞增殖,且随着药物浓度增加,其抑制作用也增强,显示出剂量依赖效应。同样对肿瘤细胞增殖也有一定的抑制作用,但同内皮细胞相比,差异显著。

3.2 姜黄素对牛内皮细胞迁移的影响 见表 1。

表 1 姜黄素对牛内皮细胞迁移的影响

| 组别 | 细胞数 | 抑制率(%) |
|----------|---------------|--------|
| DMEM 对照组 | 125.20 ± 6.45 | - |
| 姜黄素低剂量组 | 110.83 ± 5.71 | 11.5 |
| 姜黄素中剂量组 | 84.64 ± 3.87 | 32.4 |
| 姜黄素高剂量组 | 53.46 ± 2.75 | 57.3 |

可见内皮细胞迁移的抑制率随着姜黄素浓度的增加而增大,姜黄素对内皮细胞迁移有明显的抑制作用。

4 讨论

血管生成是指毛细血管从原血管中以出芽方式形成新血管床的过程,在血管生成过程中,血管内皮细胞的增殖和迁移是血管新生化发生的最基本和最重要的环节^[7]。因此通过检测血管内皮细胞增殖和迁移活性可测定血管生成。肿瘤的生长和转移都依赖于既存血管的新生血管生成,阻断肿瘤血管生成、切断肿瘤组织获得营养途径已经成为新的抗肿瘤治疗靶点。利用体外培养的内皮细胞模型研究物质抑制内皮细胞增殖、迁移,对抑制血管形成研究和开发来源于抑制血管形成的抗肿瘤新药都具有重大意义。

本实验运用体外细胞培养技术,观察了姜黄素对内皮细胞和非内皮细胞增殖的影响,发现姜黄素能特异性抑制内皮细胞的增殖;用琼脂糖刮除法检测姜黄素对牛内皮细胞迁移的影响。结果显示,姜黄素对肿瘤细胞和内皮细胞增殖有较强的抑制作用,对内皮细胞的抑制作用更强,并且可以显著抑制内皮细胞迁移,是一种特异性内皮细胞生长抑制剂。提示姜黄素通过抑制内皮细胞增殖和迁移从而抗新生血管生成。通过本实验研究,阐明姜黄素抗血管生成的主要作用机制,为临床姜黄素治疗肿瘤提供了实验及理论基础。

参考文献

- [1] Natalie S, Larsen I. Angiogenesis research yield new approaches to cancer treatment and prognosis [J]. J National Cancer Institute, 1993, 85: 1629 - 1630.
- [2] 肖小河, 苏中武, 乔传卓. 姜黄属药用植物研究进展 [J]. 中草药, 1997, 28(2): 114.
- [3] 马晓华, 沃兴德. 姜黄素抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡的研究概况 [J]. 国外医学·肿瘤学分册, 1999, 26(1): 21.
- [4] 陈宏. 姜黄的药理作用研究概况 [J]. 国外医学·中医中药分册, 1996, 18(6): 3 - 7.
- [5] 张国平. 莪术的临床应用研究概况 [J]. 珍国药研究, 1998, 9(1): 93 - 94.
- [6] 李巧云. 姜黄挥发油抗癌作用的研究 [J]. 四川卫生管理干部学院学报, 1995, 14(1): 3 - 4.
- [7] Hanada D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 186(3): 353 - 364.

(收稿日期: 2008-07-09 责任编辑: 查青林)