

## 青蒿琥酯诱导人脐静脉内皮细胞凋亡

吴国东, 周慧君\*

(浙江大学药学院药理学与毒理学研究室, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** 目的 探讨青蒿琥酯对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的诱导凋亡作用, 以及这种诱导作用与内皮细胞增殖及细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的关系。方法 采用 MTT 比色法测定青蒿琥酯对 HUVEC 增殖的影响, Fura-2/AM 荧光标记法测定 HUVEC 胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), 应用吖啶橙/溴化乙锭荧光双染色、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术检测细胞凋亡。结果 青蒿琥酯可抑制 HUVEC 增殖, 明显诱导 HUVEC 凋亡, 并呈浓度依赖性和时间依赖性效应关系。在发生凋亡的同时伴有  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  显著升高。结论 青蒿琥酯可诱导 HUVEC 凋亡, 其机制可能与  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高有关。

**关键词:** 青蒿琥酯; 内皮, 血管; 细胞, 培养的; 凋亡; 钙, 细胞内

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)04-0294-06

青蒿素(artemisinin)是我国科学家首次从菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* Linn)中提取的具有新型结构的倍半萜内酯, 临床用于对氯喹耐药的恶性疟的治疗和脑型疟的抢救。随后, 青蒿琥酯(artesunate)等抗疟活性更强的青蒿素衍生物相继问世。近 10 年来, 青蒿素类药物的抗肿瘤活性受到国内外学者的特别关注。其机制除了诱导多种肿瘤细胞凋亡外<sup>[1~4]</sup>, 还影响血管新生<sup>[5,6]</sup>。抑制血管新生是否与诱导内皮细胞凋亡有关, 则未见报道。本文基于人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial

cells, HUVEC)体外培养模型, 研究青蒿琥酯对于 HUVEC 的诱导凋亡作用, 以及这种诱导作用与内皮细胞增殖及细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

青蒿琥酯为广西桂林第二制药厂产品, 用 5%  $\text{NaHCO}_3$  注射液溶解; *L*-谷胺酰胺(*L*-glutamine)、噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(propidium iodide)、Fura-2/AM、蛋白酶 K(proteinase K)、RNase A 为 Sigma 产品; 吖啶橙(acridine orange)、溴化乙锭(ethidium bromide)为 Fluka 产品; 二甲亚砜(DMSO)、胰酶(trypsin)、Triton-X 100 为 Amerisco 产品; I 型胶原酶为 Worthington Biochemical 产品; 重组人血管内皮细胞生长因子(recombinant human vascular endothelial growth factor, rhVEGF)为 Bender 产品; M199 培养基为 Gibco 产品; 兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体为 Santa Cruz 产品; 琼脂糖(agarose)为 BBI 产品; 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。

#### 1.2 实验材料和仪器

细胞培养瓶(25  $\text{cm}^2$ )、96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板, 丹麦 Nunc 公司;  $\text{CO}_2$  培养箱、层流超净工作台, 美国 Forma 公司; 荧光倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; Elx800 型酶标仪, 美国 Bio-tek 公司; 台式高速离心机, 美国 Sigma 公司; Gel Doc2000 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司产品; 双波长荧光分光光度计, 德国 T.I.L.L. 公司产品。

#### 1.3 细胞培养

新鲜健康的新生儿脐带取自浙江大学医学院附属妇产科医院, 参照 Jaffe 等<sup>[7]</sup>的方法消化收集 HUVEC, 接种于 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶, 用含 20% FCS, 10  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$  rhVEGF, 2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  *L*-谷胺酰胺及 100

收稿日期: 2003-12-09 接受日期: 2004-03-02

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(M303842)

作者简介: 吴国东(1979-), 男, 硕士研究生; 周慧君(1955-), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤药理及生殖药理。

\*联系作者 E-mail: zhouhj@zju.edu.cn Tel: (0571) 87217206 Fax: (0571) 87217086

$\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 M199 培养液,置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养箱中培养,隔天换液 1 次。用兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体行间接免疫荧光鉴定<sup>[7,8]</sup>后取第 3~6 代细胞供研究用。

#### 1.4 MTT 比色法测定细胞增殖率

HUVEC  $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于 96 孔培养板,每孔  $100 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养 48 h,加入不同浓度的青蒿琥酯,每组 12 个复孔,并设  $5\% \text{ NaHCO}_3$  溶剂对照组,实验重复 3 次。孵育 24~48 h,MTT 比色法测定细胞增殖率。于测定前 4 h,每孔加入  $20 \mu\text{L}$  ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) MTT, $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  DMSO,培养板振荡 10 min,用酶标仪 ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) 测定各孔吸光度值 ( $A_{570 \text{ nm}}$ )。按下述公式计算细胞生长抑制率:抑制率 (%) = (对照组  $A_{570 \text{ nm}}$  - 给药组  $A_{570 \text{ nm}}$ ) / 对照组  $A_{570 \text{ nm}} \times 100\%$ 。采用上海医科大学编写的药理学统计计算程序 GW-Basic,按 Logit 法计算抑制细胞增殖 50% 的药物浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

#### 1.5 吖啶橙/溴化乙锭荧光双染色

HUVEC 接种于 24 孔培养板,加入不同浓度的青蒿琥酯作用 24 或 48 h 后,按文献方法<sup>[9]</sup>,各孔加入  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吖啶橙和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭,于暗室混合染色 5 min,荧光倒置显微镜下观察细胞形态。

#### 1.6 细胞 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳

$32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯作用于 HUVEC 48 h 后,各组收集  $5 \times 10^6$  个细胞,冰冷磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 6.8) 离心洗涤 1 次,去上清。加入  $500 \mu\text{L}$  细胞裂解液 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris·HCl, pH 8.0,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl,  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白酶 K,  $0.5\%$  SDS),混匀, $55^\circ\text{C}$  水浴震荡 30 min 至溶液变得澄清透明。加入  $600 \mu\text{L}$  氯仿,摇匀, $10\,000 \times g$  离心 5 min,吸取上清,加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  RNaseA  $3 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$  水浴震荡 1 h。加 1/10 体积的  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸钠和 2 倍体积的冷无水乙醇,置  $-20^\circ\text{C}$  10 min。 $10\,000 \times g$  离心 5 min,弃去上清, $70\%$  乙醇洗涤,晾干,用  $100 \mu\text{L}$  TE 缓冲液 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris·HCl,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0) 溶解 DNA。取  $10 \mu\text{L}$  DNA 样品液与上样缓冲液混匀,在含  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溴化乙锭的  $1\%$  琼脂糖凝胶和 TBE 缓冲液 ( $89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris·HCl,  $89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸,  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0)  $40 \text{ V}$  恒压电泳 5 h。电泳结束,以凝胶成像系统观察 DNA 带型并摄片。

#### 1.7 流式细胞仪测定细胞凋亡率和细胞周期

细胞接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶,待细胞生长至亚融合状态时,加入不同浓度青蒿琥酯孵育。于给药后 24 和 48 h,各组细胞经胰酶消化, PBS 离心洗涤 1 次,调整细胞数至  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,缓慢滴加  $70\%$  冰冷乙醇固定,置  $4^\circ\text{C}$  过夜。已固定的细胞经 PBS 离心洗涤 2 次,加入  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化丙啶,  $0.1\%$  Triton-X 100,  $37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  RNaseA,室温下避光进行 DNA 染色 (30 min),过 300 目尼龙网筛,24 h 内上流式细胞仪测定,CellQuest 3.1f 软件 (美国 Becton Dickinson) 获取直方图, ModFit 3.0 软件 (美国 Becton Dickinson) 计算细胞凋亡率及分析细胞周期相分布,按下述公式计算细胞增殖指数 (proliferating index, PI)。  $\text{PI} = (\text{S} + \text{G}_2\text{M}) / (\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2\text{M}) \times 100\%$ 。

#### 1.8 测定细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

在 24 孔培养板上用盖玻片作细胞爬片培养,待细胞生长至亚融合状态时,避光测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>[10]</sup>:各孔加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Fura-2/AM,  $37^\circ\text{C}$  孵育 45 min。细胞均分为两部分,一部分在胞外液含钙条件下测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,另一部分在胞外液无钙条件下测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。含钙条件下测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :用 Hanks 液洗涤 2 次,取出盖玻片,细胞面向上放入装有  $1 \text{ mL}$  Hanks 液的测定槽中,间隔 1 min 累积给药,共给 4 次,使青蒿琥酯终浓度分别达到 4, 8, 16 和  $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。激光激发荧光 (激发波长 340 nm 和 380 nm,发射波长 500 nm),于给药前和给药后连续用双波长荧光分光光度计测定荧光强度 (F),由微机测试系统直接输出。用比例法计算  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (\text{R} - \text{R}_{\min}) / (\text{R}_{\max} - \text{R}) \times (\text{S}_1 / \text{S}_2)$ 。  $\text{R} = \text{F}_{340 \text{ nm}} / \text{F}_{380 \text{ nm}}$ ,  $K_d = 224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{S}_1$  和  $\text{S}_2$  分别为零钙和饱和钙时激发波长 380 nm 时的荧光强度。

无钙条件下测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :用 D-Hanks 液洗涤 2 次,取出盖玻片,细胞面向上放入装有  $1 \text{ mL}$  D-Hanks 液的测定槽中,给药方法和测定方法同上。

#### 1.9 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS for Windows (Vol 10.0) 统计软件进行方差分析和 Dunnett 检验,百分率样本值先进行平方根反正弦转换后再行检验。

## 2 结果

#### 2.1 HUVEC 观察和鉴定

相差显微镜下,可见细胞呈扁平多角形或短梭

形,边界清楚,胞浆丰富。细胞核为圆形或椭圆形,核仁1~2个。细胞融合前多呈鱼贯状或旋涡状排列,细胞融合为单层后呈铺路石状镶嵌排列,互不重叠。

Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体行间接免疫荧光检查,荧光显微镜下可见原代及传代培养的 HUVEC 胞浆中均有中等强度的黄绿色荧光着色,胞核呈墨绿色,细胞轮廓清晰。

## 2.2 青蒿琥酯对 HUVEC 增殖的影响

4~128  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的青蒿琥酯作用于 HUVEC 24 或 48 h 后,细胞逐渐圆缩、上浮,漂浮的细胞数和药物浓度成正比,并随着时间的延长而增加。MTT 比色结果显示:随青蒿琥酯浓度的增大,作用时间的延长,  $A_{570\text{ nm}}$  值逐渐下降(表 1)。即随青蒿琥酯浓度的增大和作用时间的延长, HUVEC 增殖率逐渐降低。青蒿琥酯作用 24 或 48 h,其抑制 HUVEC 增殖的  $\text{IC}_{50}$  分别为 29.7 和 21.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Tab 1. Effect of artesunate on proliferation of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)

Artesunate / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{570\text{ nm}}$	
	24 h	48 h
0	$2.05 \pm 0.14$	$2.09 \pm 0.17$
4	$1.91 \pm 0.11$	$1.77 \pm 0.13$
8	$1.69 \pm 0.13$	$1.54 \pm 0.16$
16	$1.37 \pm 0.15$	$1.26 \pm 0.12$
32	$1.01 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.09$
64	$0.52 \pm 0.08$	$0.54 \pm 0.06$
128	$0.26 \pm 0.03$	$0.25 \pm 0.05$

HUVEC( $5 \times 10^7\text{ L}^{-1}$ ) were incubated with artesunate (dissolved in 5%  $\text{NaHCO}_3$ , the same for Tab 2-4 and Fig 1-3) of various concentration for 24 or 48 h. The cell viability was observed with MTT assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ .

## 2.3 青蒿琥酯对 HUVEC 形态的影响

光镜下可见, HUVEC 经不同浓度青蒿琥酯(16, 32, 64  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用 24 或 48 h 后,细胞相继出现细胞体积缩小、细胞核固缩边缘化、细胞膜发泡、细胞外形变得不规则。晚期可观察到凋亡小体,但细胞膜仍完整。HUVEC 经吖啶橙/溴化乙锭双染色后,荧光显微镜下可见,溶剂对照组细胞核呈密度不均的黄绿色荧光,胞浆中可见染成橙红色的 RNA,表现为正常细胞的染色特征,图 1A。32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯作用 24 h,多数细胞胞浆浓缩,染色质致密,细胞核固缩,呈染色均一的亮绿色圆珠状小体,表现

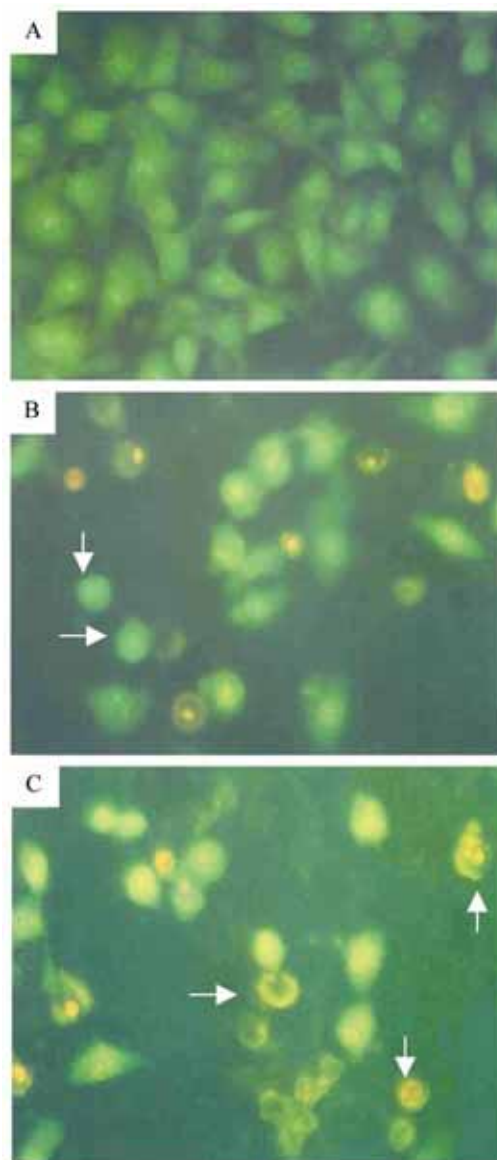


Fig 1. HUVEC dual staining by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB). Cells were incubated with artesunate in 24-well plates for 24 or 48 h. Then the cells were stained by AO/EB and morphology was immediately assessed using fluorescence microscopy. (A) control: viable cells with green nuclei and intact structure; (B) 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  artesunate treatment for 24 h: arrows marked the early apoptotic cells with bright green nuclei as dense green areas in the nucleus; (C) 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  artesunate treatment for 48 h: late apoptotic cells with orange nucleus showing condensation of chromatin as dense orange areas and reduced cell size. Arrows marked the apoptotic bodies in artesunate-treated cells. ( $\times 200$ )

为早期凋亡细胞的核形态与染色特征,如图 1B 箭头所示。32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯作用 48 h,可见部分细胞细胞核固缩成新月状、环状、念珠状,核呈现橙红色荧光,表现为明显的晚期凋亡细胞的核形态与染色特征,如图 1C 箭头所示。视野中也可见少数细胞

体积明显增大,发不均匀的红色荧光,但无凋亡小体结构,表现为坏死细胞的核形态与染色特征。

## 2.4 DNA 裂解片段分析

如图 2 所示,5% NaHCO<sub>3</sub> 溶剂对照组和青蒿琥酯组在靠近加样孔处均有一亮带,是未裂解的基因组 DNA 条带。32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯作用 48 h 可见典型的“梯形”条带,条带的位置恰为 200 bp 的整数倍(200, 400, 600, 800, 1000 bp)。

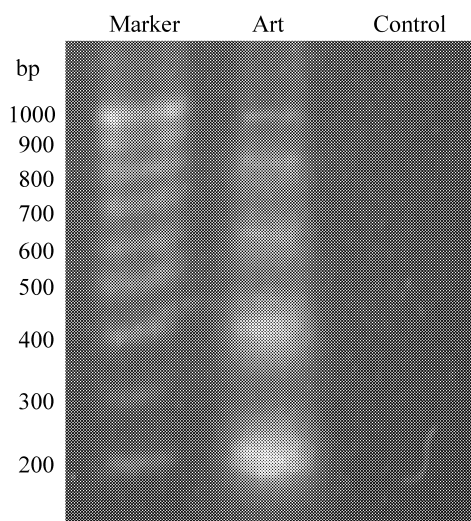


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HUVEC treated with 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  artesunate for 48 h.

## 2.5 细胞凋亡率和细胞周期相分布

流式细胞仪分析结果显示,DNA 直方图上,4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的青蒿琥酯作用于 HUVEC 24 ~ 48 h 后, G<sub>1</sub> 峰前均出现了代表凋亡细胞的亚二倍体峰(图 3)。且青蒿琥酯浓度越大,作用时间越长,细胞凋亡率越高,青蒿琥酯各剂量组(4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )与 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶剂对照组比较,均有显著性差异(表 2)。

Tab 2. Apoptosis rate in HUVEC treated with artesunate

Artesunate / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Apoptosis rate/%	
	24 h	48 h
0	3.5 ± 0.7	4.1 ± 1.0
4	8.0 ± 1.1 **	16.1 ± 1.3 **
8	8.4 ± 1.3 **	17.1 ± 1.4 **
16	25.3 ± 4.2 **	32.9 ± 3.6 **
32	31.5 ± 4.6 **	56.9 ± 6.5 **

The apoptosis rate in HUVEC treated with artesunate was assessed by flow cytometry.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with solvent control(0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

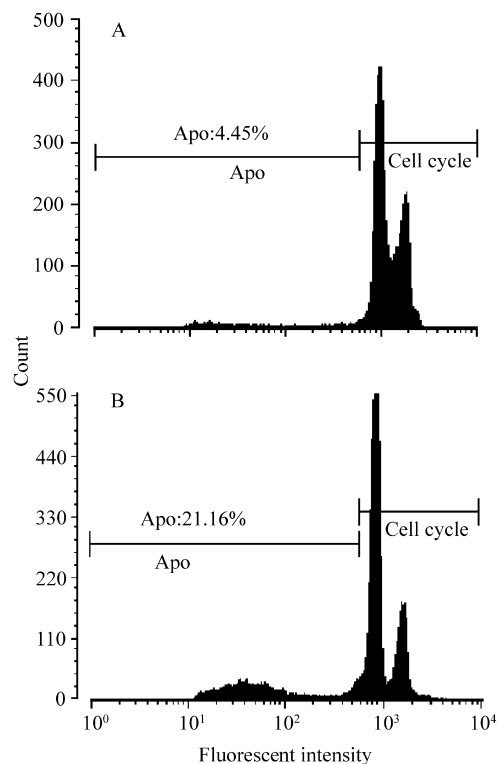


Fig 3. Flow-cytometrical analysis of propidium iodide-stained HUVEC treated with artesunate for 24 h. A: solvent control; B: artesunate (16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

细胞周期分析结果显示,4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的青蒿琥酯作用于 HUVEC 24 ~ 48 h 后,与 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶剂对照组比较,G<sub>1</sub> 期细胞增多,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞减少,而且药物浓度越高,作用时间越长,该作用越强;相应的,细胞增殖指数随青蒿琥酯的浓度增加及作用时间的延长而降低(表 3)。

## 2.6 青蒿琥酯对 HUVEC [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

在胞外液含钙条件下测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,与正常对照组比,给予 5% NaHCO<sub>3</sub> 后,[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),即溶剂对 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 测定没有影响;给予青蒿琥酯,在浓度低于 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),浓度高于 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 显著升高(表 4)。表明含钙环境中青蒿琥酯浓度为 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上时,可使 HUVEC [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 显著升高。在胞外液无钙条件下测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,无论给予 5% NaHCO<sub>3</sub> 或青蒿琥酯(4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 均没有显著性变化 ( $P > 0.05$ )。表明在无钙环境中青蒿琥酯对 HUVEC [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 没有影响。

**Tab 3. Distribution of cell cycle phases and proliferating index(PI) in HUVEC treated with artesunate**

Artesunate / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Time /h	Distribution of cell cycle/%			PI /%
		G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
0	24	73.5 ± 1.6	15.5 ± 1.1	11.0 ± 1.0	26.5 ± 1.6
4		76.0 ± 1.1	17.7 ± 1.9	6.3 ± 1.1 *	24.0 ± 1.1
8		76.6 ± 1.9	14.0 ± 1.3	9.4 ± 1.2	23.4 ± 1.9
16		76.7 ± 2.0	13.5 ± 1.5	9.8 ± 1.3	23.3 ± 2.1
32		80.8 ± 2.4 *	10.6 ± 2.0 *	8.6 ± 1.2 *	19.2 ± 2.4 *
0	48	73.2 ± 1.7	18.3 ± 1.4	8.5 ± 1.2	26.8 ± 1.7
4		83.7 ± 2.3 * *	9.7 ± 2.0 * *	6.6 ± 1.7	16.3 ± 2.3 * *
8		86.2 ± 2.2 * *	8.9 ± 2.1 * *	4.9 ± 1.4 *	13.8 ± 2.2 * *
16		91.1 ± 2.7 * *	4.9 ± 1.6 * *	4.0 ± 1.3 *	8.9 ± 2.7 * *
32		94.3 ± 2.5 * *	2.1 ± 1.0 * *	3.6 ± 1.1 * *	5.7 ± 2.5 * *

The distribution of cell cycle phases and PI  $[(S + G_2M)/(G_1 + S + G_2M) \times 100\%]$  in HUVEC treated with artesunate for 24 or 48 h were assessed by flow cytometry.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ , compared with corresponding solvent control( $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

**Tab 4. Intracellular free calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) of HUVEC treated with artesunate**

Artesunate/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Normal control	113 ± 6
0	114 ± 7
4	117 ± 7
8	117 ± 7
16	335 ± 19 * *
32	350 ± 28 * *

Normal control: Hanks solution.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . \* \*  $P < 0.01$ , compared with normal control.

### 3 讨论

本文通过对 HUVEC 的形态学观察,发现在青蒿琥酯作用的不同时段, HUVEC 表现出一系列凋亡特异性形态变化。如细胞收缩变圆,细胞核浓缩边缘化,凋亡小体形成等。结合 DNA 电泳呈现的典型梯状条带,表明青蒿琥酯能诱导 HUVEC 凋亡。通过流式细胞仪定量分析细胞凋亡率,显示青蒿琥酯在 4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围诱导 HUVEC 凋亡呈浓度依赖性和时间依赖性。其中,32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯作用于 HUVEC 48 h,凋亡率可达 56.9%。并且,青蒿琥酯在该浓度范围能特异性地抑制 HUVEC 进入 S 期和/或 G<sub>2</sub>/M 期,使细胞停留在 G<sub>1</sub> 期,同样表现出浓度依赖性和时间依赖性。结果提示青蒿琥酯主要诱导 HUVEC 的 S 期和/或 G<sub>2</sub>/M 期细胞凋亡,抑制了细胞的 DNA 合成,从而抑制 HUVEC 分裂增殖。

细胞凋亡是由基因严密调控的自主性并且依赖能量的有序死亡。当细胞接受凋亡信号,通过一系列的信号传递,如  $\text{Ca}^{2+}$  变化,效应酶的激活,影响凋亡相关的正负调节基因的表达,最终导致细胞凋亡。现已明确, $\text{Ca}^{2+}$  既是凋亡途径的起始信使,又参与凋亡执行阶段多种  $\text{Ca}^{2+}$  活化的蛋白酶(半胱天冬酶家族、calpain、核支架蛋白酶等)与  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性核酸内切酶的激活。细胞外钙内流和细胞内钙池释放是  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高的两条重要途径。一般认为,细胞内钙池释放只能引起  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  短暂升高,并不能导致细胞凋亡,甚至可能抑制细胞凋亡;凋亡的触发不仅需要  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  达到一定的阈值,而且必须持续较长的时间(> 2 h)<sup>[11]</sup>。本实验发现,当 HUVEC 处于含钙环境中时,16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯即可迅速持久地(> 3 h)显著升高 HUVEC 的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。当 HUVEC 处于无钙环境,4 ~ 32  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯对 HUVEC 的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  没有影响。由此推断青蒿琥酯引起 HUVEC 的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  迅速持续升高主要来源于外钙内流,这可能是青蒿琥酯诱导细胞凋亡的触发因子;同时内流的  $\text{Ca}^{2+}$  还可能参与细胞凋亡的下游机制。对于青蒿琥酯诱导凋亡有关的酶激活,正负调节基因的表达以及信号转导等调控机制作者正在深入研究。

现代肿瘤病理学研究证明,原发肿瘤的生长和转移依赖于源自即存血管的新生血管生成<sup>[12]</sup>。抗新生血管生成已成为国际上近年来抗肿瘤生长和转移治疗的一个有效的策略<sup>[13]</sup>。内皮细胞被视为血管新生的物质基础,是抑制血管新生的最佳靶点之一。本课题组的前期研究发现,青蒿琥酯在体外可明显抑制

HUVEC 的增殖、迁移及小管形成<sup>[5]</sup>,在体内可有效地抑制鸡胚绒毛尿囊膜、大鼠主动脉环无血清培养模型上的新生血管生成<sup>[6]</sup>。本研究作为后续研究,发现青蒿琥酯可特异地抑制 HUVEC 进入 S 期和/或 G<sub>2</sub>/M 期,明显诱导 HUVEC 凋亡,这可能是青蒿琥酯抑制新生血管生成的重要机制。

#### 4 参考文献:

- [1] Li Y, Shan F, Wu JM, Wu GS, Ding J, Xiao D, *et al.* Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, **11**(1): 5–8.
- [2] Sadava D, Phillips T, Lin C, Kane SE. Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, **179**(2): 151–156.
- [3] Wang Q, Wu LM, Zhao Y, Zhang XL, Wang NP. The anticancer effect of artesunate and its mechanism[J]. *Acta Pharma Sin*(药学报), 2002, **37**(6):477–478.
- [4] Li Y, Li Y, Xu GL. Clinical studies on the induction of apoptosis by artesunate on human leukaemic K562 cells[J]. *Shandong Med J*(山东医药), 2003, **43**(16):23–24.
- [5] Chen HH, Zhou HJ, Fang X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives *in vitro* [J]. *Pharmacol Res*, 2003, **48**(3):231–236.
- [6] Wang WQ, Zhou HJ, Chen HH, Wu GD. Inhibitory effect of artesunate in angiogenesis[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2004, **18**(1):32–36.
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest*, 1973, **52**(11):2745–2756.
- [8] Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions[J]. *Pharmacol Res*, 2000, **42**(1):9–19.
- [9] Gorman A. Morphological assessment of apoptosis[A]. In: Cotter TG, Martin SJ, ed. *Techniques in apoptosis. A use's guide*[M]. London: Portland Press Ltd., 1996.7–9.
- [10] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**(6):3440–3450.
- [11] Whyte MK, Hardwick SJ, Meagher LC, Savill JS, Haslett C. Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils *in vitro* [J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**(1):446–455.
- [12] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors[J]. *Science*, 1987, **235**(4787):442–447.
- [13] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, **333**(26):1757–1763.

## Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate

WU Guo-Dong, ZHOU Hui-Jun\*

(Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate if the antitumor effect of artesunate is related to the induction of apoptosis in endothelial cells. **METHODS** The antiproliferation activities of artesunate were evaluated on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by means of MTT vital staining. The induction of apoptosis was detected by acridine orange/ethidium bromide dual staining as well as DNA electrophoresis. The ratios of apoptosis in HUVEC and distribution of cell cycle phases were assessed by flow cytometry. The intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) of HUVEC was assayed with fluorescence spectroscopic analysis.

**RESULTS** Artesunate suppressed HUVEC proliferation, induced apoptosis of HUVEC, changed the distribution of cell cycle phases, and increased  $[Ca^{2+}]_i$  remarkably. **CONCLUSION** Artesunate induces apoptosis of HUVEC, which may be associated with the increase of  $[Ca^{2+}]_i$ . **Key words:** artesunate; endothelium, vascular; cells, cultured; apoptosis; calcium, cytosolic

**Foundation item:** The project supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province(M303842)

\* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)