

青蒿琥酯抑制新生血管生成的作用

王玮琴², 周慧君^{1*}, 陈欢欢¹, 吴国东¹

(1. 浙江大学药学院药理学与毒理学教研室, 浙江 杭州 310031;

2. 浙江省中医院药剂科, 浙江 杭州 310006)

摘要: **目的** 为研究青蒿琥酯成为抗血管生成药物的可能性, 观察其对新生血管的影响, 并初步探讨其机制。**方法** 采用鸡胚绒毛尿囊膜、大鼠主动脉环无血清培养、人脐静脉内皮细胞损伤迁移等实验, 检测青蒿琥酯对新生血管增殖与迁移的抑制作用。**结果** 鸡胚绒毛尿囊膜实验表明, 青蒿琥酯有较强的血管增殖抑制作用, 对微血管作用强于大血管; 大鼠主动脉环无血清培养实验表明, 青蒿琥酯能明显推迟血管新生, 减少新生血管数量; 人脐静脉内皮细胞损伤迁移实验表明青蒿琥酯对内皮细胞具有增殖和迁移抑制作用。在这些体内外实验中, 青蒿琥酯抑制血管生成作用呈剂量依赖性。**结论** 青蒿琥酯具有抑制新生血管生成作用, 此作用可能与抑制血管内皮细胞迁移有关。

关键词: 青蒿琥酯; 新生血管化; 鸡胚绒毛尿囊膜; 主动脉; 内皮, 血管; 细胞增殖

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0032-05

大量实验证明, 多种肿瘤的生成、转移、复发和预后均与肿瘤血管生成密切相关^[1,2]。因此, 以肿瘤血管生成成为靶点, 开发血管生成抑制剂在抗肿瘤研究中是一个新的十分活跃的研究领域。抗疟药青蒿琥酯(artemunate)是倍半萜内酯类化合物青蒿素(artemisinin)的水溶性衍生物, 为二氢青蒿素(dihydroartemisinin)的 12- α -琥珀酸酯钠, 临床上用于抢救和治疗脑型疟疾和恶性疟疾。近年来, 青蒿琥酯的

抗肿瘤作用已引起重视, 但尚未见在抗血管生成方面的报道。本文采用鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)、大鼠主动脉环无血清培养、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤迁移等实验, 探讨青蒿琥酯抑制新生血管增殖与迁移作用, 为进一步分析青蒿琥酯抗血管生成作用的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与动物

青蒿琥酯, 广西桂林第二制药厂; 氢化可的松(hydrocortisone) 扬州制药有限公司; 0.5% 甲基纤维素、RPMI 1640 培养介质、DMEM 培养介质, Gibco 产品; 纤维蛋白原(fibrinogen)、牛凝血酶(bovine thrombin)、 ϵ -氨基己酸(ϵ -aminocaproic acid)、MCDB-131、MTT, Sigma 产品; 胎牛血清, 杭州四季青生物技术研究。北京白鸡种蛋(杭州常青名鸡养殖场); 2~3 周龄 100~150 g 雄性 Wistar 大鼠(浙江省药物检验所)。

1.2 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成检测

参考付生法等^[3]方法加以改进。将孵化 7 d 的鸡胚, 在近气室处开 0.5 cm \times 1.0 cm 窗, 置孵箱内稳定 24 h 之后, 将药物-甲基纤维素薄片放置于窗口 CAM 上, 远离已形成的致密血管网。以 0.3% NaHCO₃ 为溶剂对照, 氢化可的松每胚 30 μ g 为阳性对照, 加入不同剂量的青蒿琥酯, 48 h 后, 照相记录结果。并以给药点为中心, 解剖显微镜下常规计数周围 5 mm 内的大、小血管。

1.3 动脉体外培养及血管生成检测

取大鼠胸主动脉, 切成 1 mm 长的主动脉环, 按照 Nicosia 等^[4]的方法并略加改进。即将 1.2 mg 的纤维蛋白原和 0.5 U 的牛凝血酶溶于无血清培养液 MCDB-131, 加于 24 孔板, 待形成凝胶后, 放入动脉环, 再加入纤维蛋白原和牛凝血酶, 使成凝胶, 以固定新生血管。加入培养液 MCDB-131 1 mL 及 ϵ -氨基

收稿日期: 2003-05-15 接受日期: 2003-09-04

作者简介: 王玮琴(1970-), 女, 浙江省中医院临床药师, 浙江大学在职硕士研究生; 周慧君(1956-), 女, 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

己酸。72 h 第 1 次换液,以后每隔 48 h 换液 1 次。前 2 次换液时同时分别给予二甲亚砜(DMSO)每孔 12 μL (空白对照组),氢化可的松每孔 12 μg (阳性对照组),青蒿琥酯每孔 6 或 12 μg 。每日在倒置显微镜下观察新生血管生长情况,并计数新生血管数目,拍照片记录。

1.4 人脐静脉内皮细胞的原代培养

新鲜人脐静脉取自浙江省妇女保健院。将脐带剪成约 20 cm 长,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍,将 0.25% 胰酶加入脐静脉中,于室温消化 30 min,抽出消化液,用血清终止反应,离心后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬细胞,置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养。

1.5 MTT 法检测人脐静脉内皮细胞活性

将 HUVEC 悬浮液加入 24 孔板,每孔 5×10^4 个细胞。24 h 后,加入不同浓度的青蒿琥酯,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养 48 h,加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 100 μL DMSO。振荡溶解,用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度($A_{570 \text{ nm}}$)值。细胞增殖抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 } A_{570 \text{ nm}} / \text{对照组 } A_{570 \text{ nm}})] \times 100\%$ 。

1.6 人脐静脉内皮细胞损伤后迁移的测定

用刀片损伤生长在 35 mm 塑料培养皿中已融合为单层的 HUVEC,用 PBS 冲洗 3 次,加入含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液,然后加入不同浓度的青蒿琥酯,置 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,24 h 后,在倒置显微镜下,从受伤边缘起连续计数 500 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ 区段中迁移的内皮细胞数,数值表示 10 个随机视野内的细胞数均值。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计程序,

多组间应用方差分析进行样本间比较,两样本均数间显著性检验用 t 检验。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

溶剂对照组的血管密度、分支明显多于青蒿琥酯组,管径也较青蒿琥酯组粗(图 1),给予高浓度青蒿琥酯时,CAM 只见极少数管径变细的大血管,细小血管明显减少。甚至出现溶血现象,个别鸡胚死亡。解剖显微镜下观察并计数给药点周围 5 mm 内的大、小血管,不同剂量组及与对照组间大血管数无明显差异($P > 0.05$),而各青蒿琥酯组微血管则较溶剂对照组显著性减少。青蒿琥酯 60, 30 μg 组的 CAM 血管抑制作用明显 $> 30 \mu\text{g}$ 氢化可的松组(表 1)。

Tab 1. Effect of artesunate on number of vessels in chick chorioallantoic membrane

Drug/ μg per egg	No. of main vessels	No. of microvessels
0.3% NaHCO_3	5.0 ± 1.0	40.6 ± 2.3
Artesunate 15	4.2 ± 1.1	$27.1 \pm 8.5^{**\#\#}$
30	3.8 ± 0.9	$9.7 \pm 2.7^{**\#\#}$
60	3.2 ± 0.7	$3.8 \pm 1.6^{**\#\#}$
Hydrocortisone 30	3.6 ± 0.9	$19.5 \pm 5.6^{**}$

See Fig 1 for drug treatments. The number of vessels were counted in the area of 5 mm-diameter around the injection point. $\bar{x} \pm s$, $n = 16$. $^{**} P < 0.01$, compared with NaHCO_3 group; $^{\#\#} P < 0.01$, compared with hydrocortisone group.

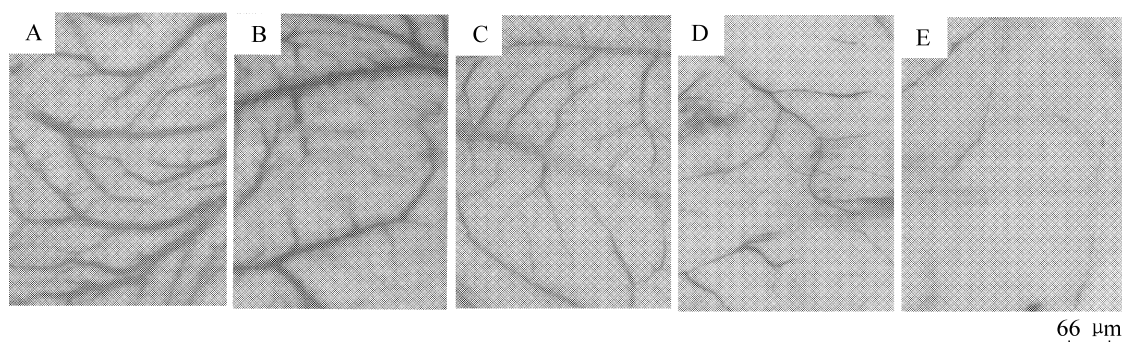


Fig 1. Effect of artesunate on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. Chick chorioallantoic membrane on d 7 was incubated with artesunate at different concentrations for 48 h and observed the morphology of vessels growth. (A) 0.3% NaHCO_3 ; (B) hydrocortisone 30 μg per egg; (C, D, E) artesunate 15, 30, 60 μg per egg, respectively.

2.2 青蒿琥酯对大鼠主动脉环血管生成的影响

正常对照组微血管于培养 d 3 起有新生血管生成, 7~13 d 新生血管迅速增多; 14 d 后血管生成减慢, 并逐渐减少。氢化可的松组微血管生成的时间规律与正常对照组相似, 但生成的血管数较少。青蒿琥酯组的血管数明显少于正常对照组和氢化可的松组, 且血管新生明显滞后, 青蒿琥酯 6 和 12 μg 组分别于 7 和 10 d 才有新生血管生成(图 2, 3)。

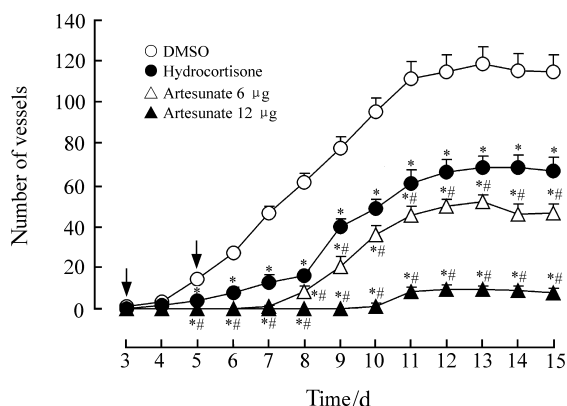


Fig 2. Microvascular growth curves of cultured rat aorta in fibrin gel in serum-free MCDB-131. Artesunate 6 or 12 μg per well was added in the cultures with aortic ring explants at d 3 and d 5 (\downarrow). $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, compared with control group (DMSO); # $P < 0.05$, compared with hydrocortisone 12 μg group.

2.3 青蒿琥酯对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响

青蒿琥酯浓度为每孔 2 μg 时, HUVEC 的增殖抑

制率为 3.3%, 无显著性差异 ($P > 0.05$); 当浓度为每孔 5 μg 时对 HUVEC 有明显的增殖抑制作用; 当浓度为每孔 20 μg 时抑制率可达 90.1%。结果显示青蒿琥酯对 HUVEC 增殖有抑制作用, 且呈浓度依赖性。IC₅₀ 值为每孔 $(11.4 \pm 3.8) \mu\text{g}$ (表 2)。

Tab 2. Inhibitory effect of artesunate on proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

Drug/ μg per well	$A_{570 \text{ nm}}$	Inhibitory rate/%
DMSO	0.71 ± 0.05	0
Artesunate 2	0.70 ± 0.04	3.3 ± 4.1
5	0.59 ± 0.03	$16.9 \pm 3.9^{**}$
10	0.42 ± 0.03	$41.4 \pm 4.4^{**}$
15	0.23 ± 0.03	$67.1 \pm 3.7^{**}$
20	0.07 ± 0.02	$90.1 \pm 2.8^{**}$

HUVEC were plated in 24-well plates, 24 h later, they were treated with artesunate for 48 h. Cell proliferation was determined by the MTT assay. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. ** $P < 0.01$, compared with DMSO group.

2.4 青蒿琥酯对人脐静脉内皮细胞损伤迁移的影响

图 4 表明, 在青蒿琥酯的作用下, HUVEC 迁移进入受伤裸露区的数量明显减少。药物浓度越高, 细胞迁移率越低(表 3)。结果提示青蒿琥酯可能通过抑制血管内皮细胞的迁移而抑制新生血管的生成, 并呈浓度依赖性。

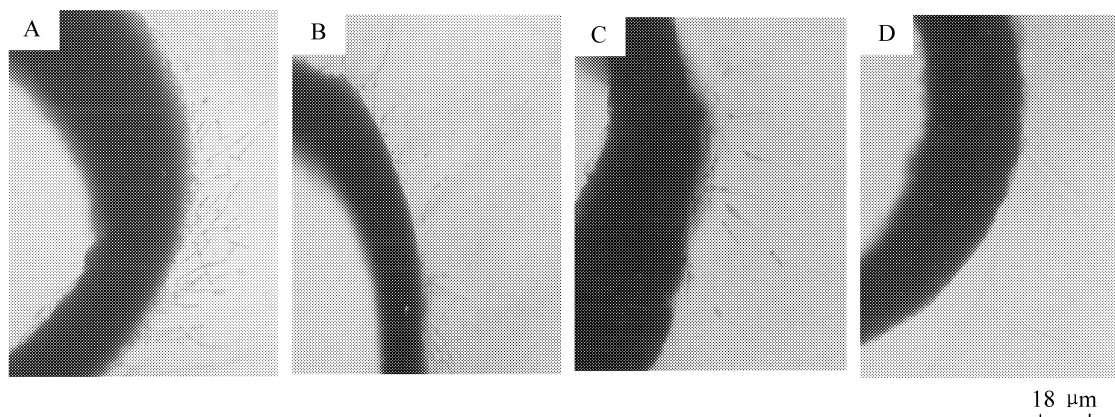


Fig 3. Microscopic pictures of a representative sample of aortic ring embedded in fibrin that shows microvessel structures extending radially from the explant of 8-days-old. A: control; B: hydrocortisone 12 μg per well; C: artesunate 6 μg per well; D: artesunate 12 μg per well.

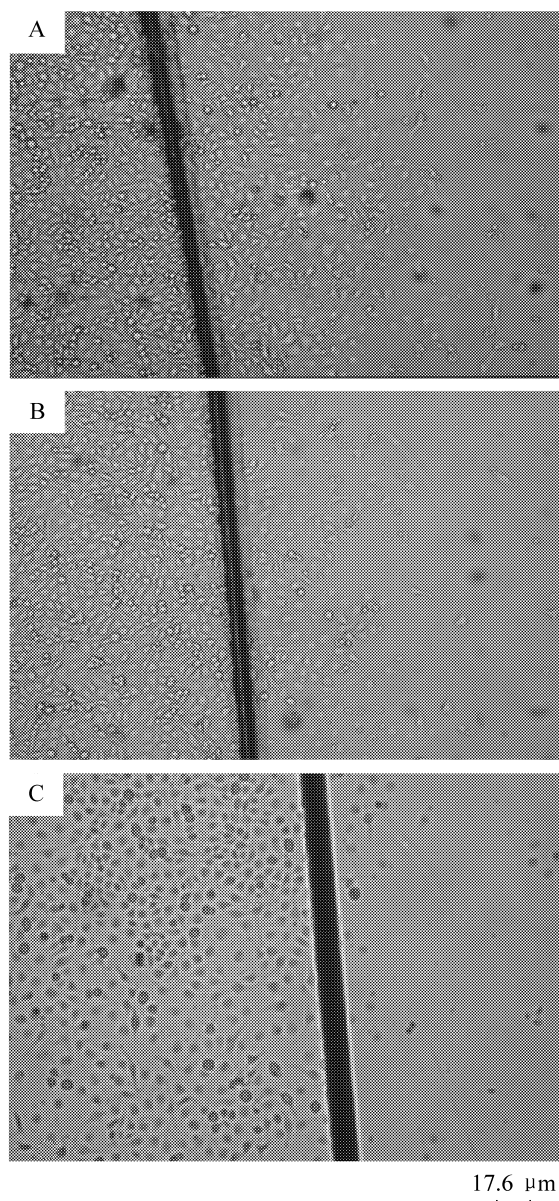


Fig 4. Effect of artesunate on wounded human umbilical vein endothelial cells migration. Confluent cultures of HUVEC were wounded with a razor blade. The cells were incubated with artesunate at different concentrations for 24 h. The number of cells migrated from the edge of the wound within each $500\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ area were counted. A: control(DMSO); B, C: artesunate 5, 20 μg per plate, respectively.

3 讨论

文献报道,青蒿琥酯在体外对小鼠 P388 细胞、HeLa 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人鼻咽低分化鳞癌 CNE2、SUNE-1、人 SACC-83 细胞及体内对肝癌、网状红细胞肉瘤及裸鼠移植人鼻咽癌等有肿瘤抑制

Tab 3. Effect of artesunate on the number of migrated human umbilical vein endothelial cells

Drug/ μg per plate	No. of migrated cells	Migration rate /%
DMSO	259 ± 29	100
Artesunate 0.2	252 ± 46	97.6 ± 17.4
1	183 ± 25	$70.6 \pm 9.7^*$
5	89 ± 12	$34.3 \pm 3.2^*$
10	26 ± 8	$10.0 \pm 3.2^*$
20	8 ± 6	$2.9 \pm 2.4^*$

See Fig 4 for treatments. The number of migrated cells was counted in the area of $500\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 30$ (3 plates, 10 sights each plate). * $P < 0.05$, compared with DMSO group.

作用^[5~11]。本文以氢化可的松作为阳性对照,检测青蒿琥酯对血管生成的抑制效应。CAM 法是一种经典的血管形成的研究方法,属于半定量的测定方法,在此实验中,可以看到青蒿琥酯对大血管的作用明显小于微血管;动脉环体外培养形成微血管样结构的测定方法,则能动态、定量反应血管生成情况,实验中,可见正常对照组及阳性对照组微血管生成的动态变化规律呈现:初期(前 6 d)为迟滞期,于培养 d 3 起有新生血管生成,随后进入生长期(7~13 d),新生血管迅速增多;最后进入衰退期(14 d 后)。给青蒿琥酯组的血管数明显少于正常对照组和氢化可的松组,且血管新生明显推迟。通过这两种方法的研究发现,青蒿琥酯具有明显的血管抑制作用,且两种研究结果相一致。由于血管生成是一个复杂的过程,完整的血管要经历血管内皮的增殖和迁移、实心条索的形成、管壁的胶原沉积及外周细胞的形成等多个步骤才能完成。在动脉环体外培养形成微血管样结构的测定中,作者发现青蒿琥酯能明显推迟血管新生,这提示可能与抑制血管新生的起始步骤,即与血管内皮的增殖与迁移、管状形成有关。为了证实这个推测,本研究又进一步进行 HUVEC 迁移实验,实验证实青蒿琥酯可以抑制血管内皮细胞的迁移而抑制新生血管的生成。但青蒿琥酯抑制新生血管生成作用是否还包括其他过程,及具体机制,则需要进一步研究。

血管生成抑制剂作用的内皮细胞具有遗传稳定性,因此与细胞毒化疗药物相比,不易产生抗药性。目前,大部分已发现的多种抑制血管生成的物质,由

于毒性较高而应用受到限制。本研究从抑制血管新生着手,研究青蒿琥酯抗肿瘤作用,希望为其药理作用增添新的内容,为开拓青蒿琥酯新用途提供理论依据。

4 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors[J]. *Science*, 1987, **235**(4787):442 – 447.
- [3] Fu SF. Technology of chick chorioallantoic membrane to test stimulatory factors in angiogenesis[J]. *Bull Acad Mil Med Sci*(军事医学科学院院刊), 1993, **17**(4):294 – 297.
- [4] Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro* [J]. *Lab Invest*, 1990, **63**(1):115 – 122.
- [5] Wang Q, Wu LM, Zhao Y, Zhang XL, Wang NP. The anticancer effect of artesunate and its mechanism[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **37**(6):477 – 478.
- [6] Yang XP, Pan QC, Liang YJ, Zhang YL. Study on antitumor effect of sodium artesunate[J]. *Chin J Cancer*(癌症), 1997, **16**(3):186 – 190.
- [7] Zhang JQ, Wang SX, Zhang FG, Zhang YH, Liu AH. Effect of artesunate on proliferation of human cancer cell line (HeLa and SACC-83) *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, **32**(4):345 – 346.
- [8] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, **18**(4):767 – 773.
- [9] Wu JM, Shan F, Wu GS, Li Y, Ding J, Xiao D, *et al*. Synthesis and cytotoxicity of artemisinin derivatives containing cyanoarylmethyl group[J]. *Eur J Med Chem*, 2001, **36**(5):469 – 479.
- [10] Efferth T, Olbrich A, Bauer R. mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64**(4):617 – 623.
- [11] Moore JC, Lai H, Li JR, Ren RL, McDougall JA, Singh NP, *et al*. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat[J]. *Cancer Lett*, 1995, **98**(1):83 – 87.

Inhibitory effect of artesunate on angiogenesis

WANG Wei-Qin², ZHOU Hui-Jun^{1*}, CHEN Huan-Huan¹, WU Guo-Dong¹

(1. Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, China)

Abstract: **AIM** To study whether artesunate may be used as an anti-angiogenetics. **METHODS** The inhibition of artesunate on angiogenesis was studied in the model of chick chorioallantoic membrane, the culture of rat aortic sprouting in fibrin gel, as well as wound assay of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **RESULTS** Artesunate significantly inhibited chick chorioallantoic membrane angiogenesis, the effect on microvessels was stronger than on main vessels. Rat aortic sprouting in fibrin gel experiment showed that artesunate inhibited microvessel sprouting and put off microvessel forming. Wound assay for migration of HUVEC showed that arte-

sunate inhibited HUVEC proliferation and migration. Both experiments *in vivo* and *in vitro* showed dose-dependent inhibition on angiogenesis and migration by artesunate. **CONCLUSION** Artesunate can inhibit angiogenesis, which may be related to the decreased migration of endothelial cell.

Key words: artesunate; neovascularization; chick chorioallantoic membrane; aorta; endothelium, vascular; cell proliferation

* Corresponding author.