

环磷腺苷葡胺对人脐静脉血管内皮细胞增殖、迁移、管腔形成及凋亡的影响

王剑, 居建刚, 钟永红, 孙一波, 沈林峰* (杭州市临平区第一人民医院呼吸内科, 杭州 311100)

摘要: 目的 探索环磷腺苷葡胺(meglumine cyclic adenylate, MCA)对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增殖、迁移、管腔形成及凋亡的影响。方法 通过显微镜观察、MTT法、划痕修复试验、管腔形成试验、Western blotting 观察不同浓度 MCA 对 HUVEC 细胞形态、增殖、迁移、管腔形成能力及凋亡相关蛋白表达的影响。结果 显微镜观察发现, 随着 MCA 剂量增加, HUVEC 细胞形态由多角形变为卵圆形。MCA 可呈浓度依赖地抑制 HUVEC 增殖、迁移、管腔形成, 并且高剂量的 MCA 还可诱导细胞凋亡, 表现为细胞凋亡数目增加, Bax、Cleaved-PARP 蛋白表达上调, PARP、Bcl-2 蛋白表达下调。结论 MCA 可抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移、管腔形成, 并诱导细胞凋亡。**关键词:** 环磷腺苷葡胺; 人脐静脉血管内皮细胞; 增殖; 血管生成; 凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)03-0324-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.006

引用本文: 王剑, 居建刚, 钟永红, 等. 环磷腺苷葡胺对人脐静脉血管内皮细胞增殖、迁移、管腔形成及凋亡的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 324-328.

Effect of Meglumine Cyclic Adenylate on Proliferation, Migration, Angiogenesis and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Jian, JU Jianguang, ZHONG Yonghong, SUN Yibo, SHEN Linfeng* (Department of Respiratory Medicine, The First People's Hospital of Linping District, Hangzhou 311100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of meglumine cyclic adenylate(MCA) on the proliferation, migration, lumen formation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). **METHODS** The effects of different concentrations of MCA on HUVEC cell morphology, proliferation, migration, luminal formation ability and apoptosis-related protein expression were observed by microscope observation, MTT method, scratch repair experiment, lumen formation experiment and Western blotting. **RESULTS** Microscopic observation revealed that with the increase of the dose of MCA, the morphology of HUVEC cells changed from polygonal to oval. MCA could inhibit HUVEC proliferation, migration and lumen formation in a concentration-dependent manner, and high-dose MCA could also induce cell apoptosis, which was manifested by an increase in the number of apoptosis, the expression of Bax, Cleaved-PARP protein was up-regulated and the expression of PARP and Bcl-2 protein was down-regulated. **CONCLUSION** Meglumine cyclic adenylate can inhibit HUVEC cell proliferation, migration, luminal formation and induce cell apoptosis.

KEYWORDS: meglumine cyclic adenylate; human umbilical vein endothelial cells; proliferation; angiogenesis; apoptosis

血管生成与肿瘤生长、复发、转移密切相关^[1], 原因在于血管网在肿瘤内增殖为肿瘤提供营养物质及氧气, 保证肿瘤生长, 同时在肿瘤释放的各种生长因子作用下, 血管新生, 进一步促进了肿瘤增殖及浸润^[2]。因此对抗血管生成, 切断肿瘤恶性生长的供养途径, 阻断肿瘤侵袭转移的血行通道, 致使肿瘤静止于休眠状态, 可有效遏制肿瘤的恶性增殖, 是治疗肿瘤的有效策略。一些研究表明, 化疗联合抗血管生成治疗可使肿瘤患者获得更长的生存期^[3]。细胞内三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,

ATP)是维持细胞生命的重要能量物质, 细胞内 ATP 缺失将导致细胞死亡, 但越来越多的研究表明, 细胞外的高浓度 ATP 和腺苷具有细胞毒作用, 可诱导细胞坏死和凋亡。环磷腺苷葡胺(meglumine cyclic adenylate, MCA)是环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的葡甲胺盐, 而 cAMP 作为 ATP 和腺苷中间物可能在抗血管生成、诱导细胞凋亡方面发挥作用。故本研究采用 MCA 处理人血管内皮细胞, 探讨 MCA 对细胞活力及凋亡的影响, 以为临床抗血管生成治疗提供新思路。

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF19H010002)

作者简介: 王剑, 男, 硕士, 主治医师 E-mail: 451805474@qq.com *通信作者: 沈林峰, 男, 硕士, 主任医师 E-mail: SLF0920@alyun.com

1 材料

1.1 细胞系

人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)由浙江中医药大学提供。

1.2 试剂

MCA 冻干粉(湖南五洲通药业有限公司, 国药准字 H20041846), 用 0.9%氯化钠注射液配制成 $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 母液备用, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。Cleaved-PARP、PARP、Bcl-2、Bax、GAPDH 等抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 5625P, 9542P, 2876S, 2623S, ab181602; 羊抗兔 IgG 二抗(Jackson 公司, 批号: 7074P2); Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒(凯基公司, 批号: 401006)。1640 细胞培养液(含青霉素和链霉素)(浙江森瑞生物科技有限公司, 货号: CR31800-S); 胎牛血清(GIBCO 公司, 批号: 42F1394K)。

1.3 仪器

900 SERIFS- $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱、Forma 3111 型细胞培养孵箱、Multiskan™ GO 酶标仪均购自美国 Thermo 公司; DMIL 倒置荧光显微镜(德国 LEICA 公司); PowerPac Basic 垂直电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); 721 型分光光度计(上海光谱仪器有限公司); Neofuge 18R 高速低温离心机(德国 Sorvall 公司); J9-860B 凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞培养于含 10%胎牛血清和青霉素(终浓度为 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、链霉素(终浓度 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 RPMI1640 培养液, 常规置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 细胞分组

以不加药组为空白对照组, 实验组分别加入 50, 100, 200, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCA。

2.3 MTT 细胞活力测试试验

接种 3×10^3 个 HUVEC 细胞于 96 孔板, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 吸去培养基, 实验组按 50, 100, 200, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MCA 浓度加入全血清培养 $200 \text{ }\mu\text{L}$, 每 24 h 换液 1 次, 处理 48 h 后, 各孔加 $20 \text{ }\mu\text{L}$ MTT 溶液($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 无菌 PBS 配制), 继续培养 4 h, 吸去培养基, 各孔加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 摇床避光轻摇 10 min, 每孔吸 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 置于另一 96 孔板内, 酶标仪在 490 nm 处检测 OD 值。每组设 5 个复孔, 试验重复 3 次。

2.4 划痕修复试验

接种细胞前, 用 Marker 笔在 6 孔板背部均匀划横线, 每孔至少划 3 条线, 接 3×10^5 个 HUVEC 细胞于 6 孔板, 待细胞融合度为 80%时, 用枪头垂直于培养板底背部的横线划痕, 共 3 道, 然后用 PBS 洗 2 次, 显微镜下拍照。吸去培养基, 空白对照组加入含有 2.5%血清培养基 2 mL , 实验组加入含有 50, 100, 200, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MCA 的培养基 2 mL , 继续培养 24 h 后拍照, 计算划痕修复率。划痕修复率= $[\text{0 h 划痕宽度}-\text{24 h 划痕宽度}]/\text{0 h 划痕宽度}\times 100\%$ 。

2.5 管腔形成试验

将 1×10^4 ($200 \text{ }\mu\text{L}$) $^{-1}$ HUVEC 细胞接种于预先铺有 Matrigel 胶的 96 孔板内, 并加入含有 50, 100, 200, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MCA 的培养基 $200 \text{ }\mu\text{L}$, 培养 6 h 后用吖啶橙染色, PBS 清洗 3 遍后在倒置荧光显微镜下拍照, 并计算小管数量。

2.6 Western blotting 试验

接种 3×10^5 个 HUVEC 细胞于 6 孔板, 待细胞融合度为 80%时, 更换培养基, 其中实验组加入含有 50, 100, 200, $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MCA 的培养基, 继续培养 24 h。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 柔和漂洗 2 遍后, 用 RAPI 裂解液提取各组细胞总蛋白并进行蛋白定量, 每个泳道上蛋白样品 $10 \text{ }\mu\text{g}$, 8%SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 转印(300 mA , 120 min)到 PVDF 上。5%脱脂牛奶或牛血清白蛋白室温封闭 1 h。分别加入对应一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗孵育 2 h 后洗膜, 加入电化学发光法发光液, 凝胶成像系统拍照, 分析条带灰度值。

2.7 PI 染色检测细胞凋亡

取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中, 调整密度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 培养 12 h 后, 更换为含有不同浓度的 MCA 培养基, 培养 24 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 并收集各组所有悬浮细胞, PBS 柔和漂洗并 $2000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 离心 2 次, 调整细胞密度, 收集 1×10^5 个细胞, 加入 $5 \text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-EGFP、 $5 \text{ }\mu\text{L}$ Propidium iodide 混匀, 室温、避光反应 20 min, 取 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 加在细胞计数板上, 倒置荧光显微镜下计算细胞总数和凋亡细胞数, 凋亡率=PI 染色细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

2.8 统计学处理

以上试验均至少重复 3 次, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间的均数比较采用单因素方差分析(one-way

ANOVA), 多个样本均数两两比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MCA 对 HUVEC 形态的影响

光镜观察显示, 药物作用 48 h 后, 空白对照组 HUVEC 细胞呈长梭形、多角形, 细胞密度较高, 折光性强; 随着 MCA 浓度增加, HUVEC 形态逐渐由多角形、长梭形变为软圆形, 细胞密度减小、折光性减弱, 体型相对铺展, 结果见图 1。

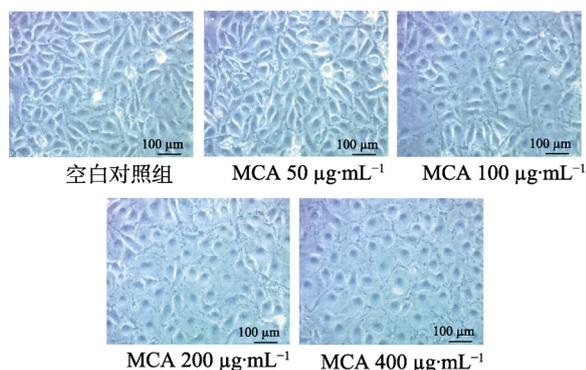


图 1 MCA 对 HUVEC 细胞形态学的影响(200×)

Fig. 1 Effect of MCA on the morphological changes of HUVEC(200×)

3.2 MCA 抑制 HUVEC 细胞增殖

MTT 检测结果显示, 与空白对照组相比, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCA 不能抑制 HUVEC 细胞增殖; 而随浓度的增加, MCA 对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用也逐渐增强, IC_{50} 为 776.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与空白对照组相比, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 2。

3.3 MCA 抑制 HUVEC 细胞迁移

划痕修复试验结果显示, 与空白对照组相比, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCA 不能抑制 HUVEC 细胞迁移, 而随浓度增加, MCA 对 HUVEC 细胞迁移的抑制作用也逐渐增强, 与空白对照组相比, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 3。

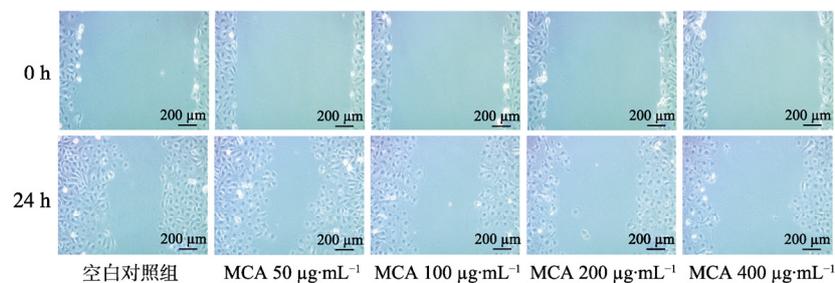


图 3 MCA 抑制 HUVEC 细胞迁移(100×)

与空白对照组对比, $^1)P < 0.05$, $^2)P < 0.01$ 。

Fig. 3 MCA inhibited HUVEC migration(100×)

Compared with blank control group, $^1)P < 0.05$, $^2)P < 0.01$.

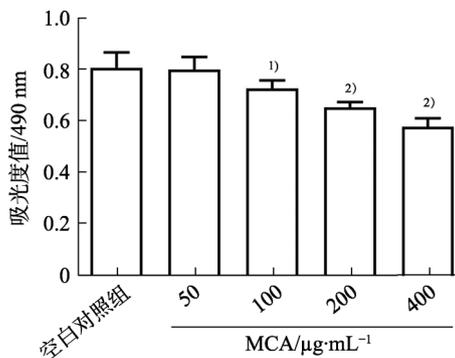


图 2 MCA 抑制细胞增殖

与空白对照组对比, $^1)P < 0.05$, $^2)P < 0.01$ 。

Fig. 2 MCA inhibited HUVEC proliferation

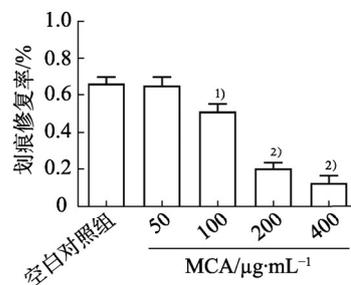
Compared with blank control group, $^1)P < 0.05$, $^2)P < 0.01$.

3.4 MCA 抑制 HUVEC 细胞管腔形成

管腔形成试验结果显示, 与空白对照组相比, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCA 不能抑制 HUVEC 细胞管腔形成, 而随浓度增加, MCA 对 HUVEC 细胞管腔形成的抑制作用也逐渐增强, 与空白对照组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 4。

3.5 MCA 诱导 HUVEC 细胞凋亡

荧光倒置显微镜观察显示, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCA 并不能诱导细胞凋亡, 当浓度升至 $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞凋亡数目随药物浓度增大而增加, 与空白对照组比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 5; Western blotting 结果显示, 当 MCA 浓度达到 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Bcl-2 蛋白表达下调, MCA 浓度达到 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Bax 蛋白表达出现上调, 两者与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 而当 MCA 浓度 $\geq 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, Bcl-2 蛋白表达显著下调, Bax 蛋白表达显著上调, 两者与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$); 此外, 只有当 MCA 浓度达到 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 才可引起 Cleaved-PARP 蛋白表达上调和 PARP 蛋白表达下调, 与空白对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 结果见图 6。



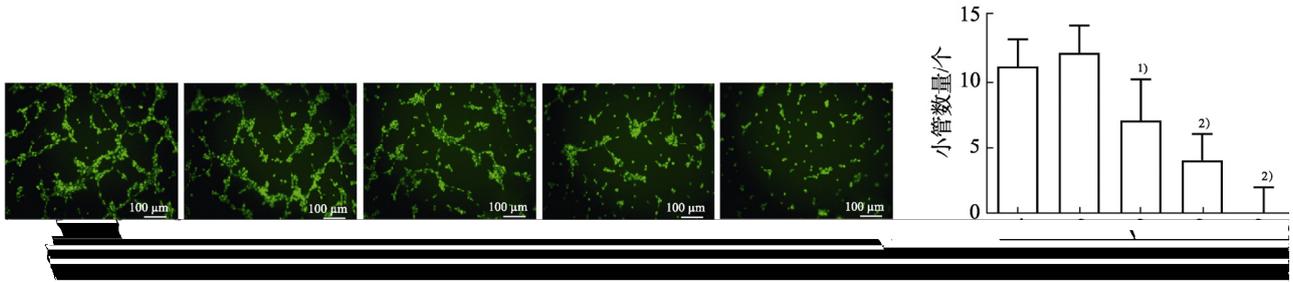


图4 MCA抑制HUVEC细胞血管形成(100×)
与空白对照组对比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 MCA inhibited HUVEC angiogenesis(100×)
Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

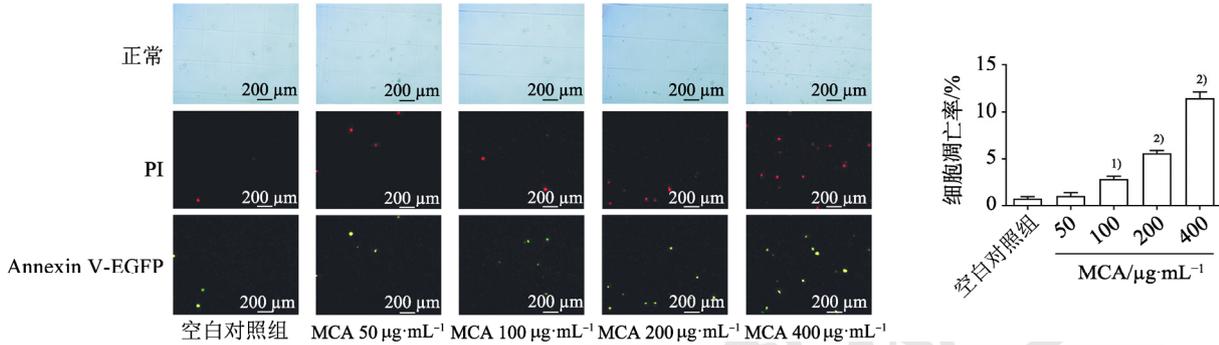


图5 MCA诱导HUVEC细胞凋亡(100×)
与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 MCA induced HUVEC apoptosis(100×)
Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

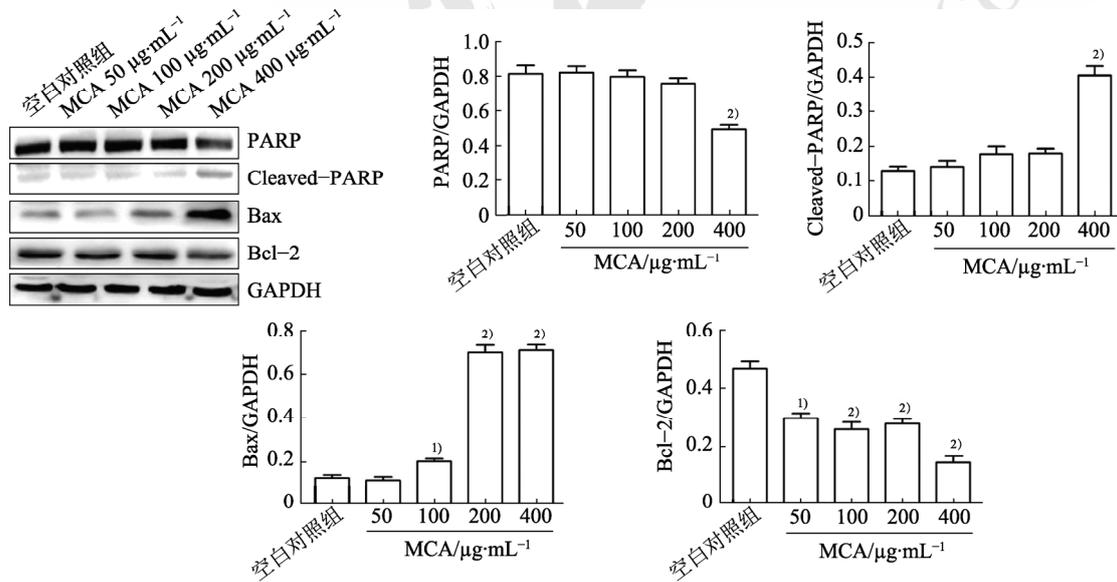


图6 MCA对HUVEC细胞凋亡相关蛋白表达的影响
与空白对照组对比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of MCA on the expression of apoptosis related proteins in HUVEC
Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

近年来,从临床药物中发现药物新的药理作用,特别是抗肿瘤作用是当前的研究热点之一。代表性药物如抑酸药物质子泵抑制剂泮托拉唑钠,可抑制 c-MET/PI3K/AKT 信号通路活化,从

而逆转耐顺铂肺癌细胞珠的间质表型,使其重获对顺铂的敏感性^[4];降糖药物二甲双胍可从调控能量代谢、免疫反应、分子信号等途径来发挥抗肿瘤作用^[5]。MCA是cAMP的葡甲胺盐,可透过细胞膜,改善细胞代谢,具有扩张心脑血管及强心

的作用,并减轻动脉和周围血管阻力,增加冠脉血流,降低心肌耗氧量,保护缺血缺氧的心肌,提高心肌的应激能力,临床上用于缺血性心脏病、心肌炎、心力衰竭、急性心肌梗死及缺血性脑血管病等的治疗^[6]。而 cAMP 是由 ATP 脱掉 2 个磷酸缩合而成,胞外 ATP 在生理条件下发挥递质调节、突触修饰和神经营养等作用。当中枢神经遭受各类应激,如缺氧缺血、炎症损伤后,受损细胞释放大量 ATP,可引起神经元继发性死亡^[7]。其机制可能为 ATP 被胞外的 ATP 酶、腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)酶和 5'核苷酸酶快速降解为 ADP、腺苷-磷酸(adenosine monophosphate, AMP)和腺苷。而腺苷酸降解的最后步骤是 AMP 转化为腺苷^[8],一些研究报道由核苷酸酶催化 cAMP 介导了腺苷的细胞毒作用,诱导的细胞死亡包括脑癌、乳腺癌、胃癌等^[9-11]。卢娜等^[12]报道胞外高浓度 ATP 能够诱导神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞发生自噬和凋亡。因此,笔者推测 MCA 可能具有潜在抗血管生成、诱导细胞凋亡的作用。

本研究结果发现 MCA 对 HUVEC 细胞的形态影响较大,随着药物浓度的增加,细胞由长梭形变为多角形、卵圆形,细胞密度减少、折光性减弱,细胞铺展。MTT 试验结果表明,随胞外 MCA 浓度增高,细胞存活率逐渐降低,同时其迁移能力及管腔形成能力也明显减弱,表明 MCA 可抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移、管腔形成,并且这种抑制作用呈浓度依赖性。

进一步研究 MCA 对凋亡的影响,通过 PI 染色检测发现,随着药物浓度增加,PI 染色细胞即晚期凋亡细胞数量有上升。Bcl-2 是细胞凋亡抑制基因,Bax 可拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用,Bax/Bcl-2 越高代表药物对细胞的促凋亡作用越强^[13]。caspase-3 在诱导细胞凋亡中起着不可替代的作用,caspase-3 的活化能够裂解其底物 PARP 为 Cleaved-PARP,进而抑制 PARP 修复 DNA 能力,促进 DNA 降解,使细胞发生凋亡^[14]。Western blotting 检测发现环磷腺苷脯胺可上调 HUVEC 细胞 Bax、Cleaved-PARP 蛋白表达,下调 PARP、Bcl-2 蛋白表达,呈浓度依赖性。这些结果证实 MCA 可诱导 HUVEC 细胞凋亡。但这并不意味着 MCA 在临床上用于缺血性心脏病、心肌炎等疾病治疗时具有潜在毒性,因为本研究药物浓度高于临床使用浓度,并且人体环境及代谢机制更为复杂,可避免 MCA 对内皮细胞直接杀伤,目前 MCA 的临床应用未见明显的不良反应报

道,可见其安全有效。如何将 MCA 安全有效地用于抗血管生成治疗有待深入研究。

综上所述,本研究首次证实了 MCA 可在体外抑制血管内皮细胞增殖、迁移、管腔形成,并诱导其凋亡,这为抑制血管生成发挥抗肿瘤作用提供了新思路,但其具体的分子机制、未来转化应用有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 409-426.
- [2] LI X, YU M, YANG C. YY₁-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2258-2267.
- [3] LI S, XU H X, WU C T, et al. Angiogenesis in pancreatic cancer: Current research status and clinical implications[J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1): 15-36.
- [4] SONG J, WANG J, LI Y, et al. Pantoprazole sodium inhibits epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in lung cancer cells and underlying mechanism[J]. *Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志)*, 2016, 32(10): 1788-1798.
- [5] LI L, MAO X, QIN X, et al. Aspirin inhibits growth of ovarian cancer by upregulating caspase-3 and downregulating Bcl-2[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(1): 93-96.
- [6] GE X L, MA F Y, JIN L J, et al. Effects of atorvastatin combined with meglumine adenosine cyclophosphate on BNP, hs-CRP, cTnI and cardiac function of patients with chronic heart failure[J]. *Hebei Med J(河北医药)*, 2019, 41(15): 2276-2279.
- [7] SKAPER S D, DEBETTO P, GIUSTI P. The P2X7 purinergic receptor: From physiology to neurological disorders[J]. *FASEB J*, 2010, 24(2): 337-345.
- [8] WANG M X, REN L N, WANG H F. Apoptosis related with extracellular adenosine triphosphate and adenosine and their purinergic receptors[J]. *Chin Phar Bull(中国药理学通报)*, 2006, 22(9): 1029-1034.
- [9] WEI Q, ZHANG Y, SUN L, et al. High dose of extracellular ATP switched autophagy to apoptosis in anchorage-dependent and anchorage-independent hepatoma cells[J]. *Purinergic Signal*, 2013, 9(4): 585-598.
- [10] DUBYAK G R. Luciferase-assisted detection of extracellular ATP and ATP metabolites during immunogenic death of cancer cells[J]. *Methods Enzymol*, 2019(629): 81-102.
- [11] YANG Z H, LIU Y, SHI C Z, et al. Suppression of PTEN/AKT signaling decreases the expression of TUBB3 and TOP2A with subsequent inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via ATP and caspase-3 signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1011-1019.
- [12] LU N, BAI R Y, WEI L Y. High concentration of extracellular ATP causes autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cells[J]. *Chin J Path(中国病理生理杂志)*, 2014, 30(8): 1388-1393.
- [13] FLETCHER L, NABRINSKY E, LIU T, et al. Cell death pathways in lymphoid malignancies[J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22(1): 10.
- [14] PRAKASH C, KUMAR V. Arsenic-induced mitochondrial oxidative damage is mediated by decreased PGC-1 α expression and its downstream targets in rat brain[J]. *Chem Biol Interact*, 2016(256): 228-235.

收稿日期: 2021-04-28
(本文责编: 蔡珊珊)