

# 噻吗洛尔和普萘洛尔体外调控小鼠血管瘤细胞增殖及凋亡作用的比较

徐仙赞<sup>1,2</sup> 谢琼琚<sup>1,2</sup> 黄海金<sup>3</sup> 阎金龙<sup>1,2</sup> 许 露<sup>1,2</sup> 刘勤新<sup>1</sup> 陈海新<sup>1</sup> 赖 欣<sup>1</sup>  
周弋丰<sup>1</sup> 谢明峰<sup>1</sup> 翁彦颖<sup>1</sup> 刘 潜<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 通过比较同为非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂的普萘洛尔和噻吗洛尔对小鼠血管瘤(EOMA 细胞)细胞体外增殖及凋亡的调控作用,初步探讨普萘洛尔和噻吗洛尔对小鼠血管瘤的治疗作用及可能机制,为临床应用 $\beta$ 受体阻滞剂治疗婴幼儿血管瘤提供参考。**方法** 体外培养 EOMA 细胞,取对数生长期 EOMA 细胞,随机分为药物组和对照组,用不同浓度普萘洛尔和噻吗洛尔作用 EOMA 细胞,分别干预 24 h、48 h、72 h。通过连续光谱多功能酶标仪在 570 nm 和 630 nm 波长处测定以上质量浓度下光吸收值。应用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞存活率、吖啶橙染色检测细胞凋亡情况,观察普萘洛尔和噻吗洛尔对 EOMA 细胞体外增殖和凋亡的影响。**结果** 普萘洛尔作用 24 h 后,随剂量增加,EOMA 细胞存活率逐渐下降,与对照组相比,至药物浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时有显著差异( $P < 0.05$ ),吖啶橙染色亦显示药物浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时凋亡细胞显著增多。48 h 组和 72 h 组变化趋势与 24 h 组相似。噻吗洛尔作用 24 h、48 h 及 72 h 后,不同浓度和作用时间组之间,EOMA 细胞存活率及凋亡率均无显著差异( $P > 0.05$ )。**结论** 普萘洛尔在体外可有效抑制小鼠血管瘤 EOMA 细胞的增殖,并促进其凋亡;而同为非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂的噻吗洛尔在体外对 EOMA 细胞的增殖和凋亡无显著调控作用。提示噻吗洛尔对小鼠血管瘤的作用可能与 $\beta$ 受体通路以外的途径有关,其次,其治疗血管瘤的临床效果可能还需要多中心、大样本研究来验证。

**【关键词】** 血管瘤;噻吗洛尔;普萘洛尔;细胞增殖;细胞凋亡;小鼠

**Comparative study on the effects of timolol and propranolol on proliferation and apoptosis of mouse hemangioendothelioma endothelial Cells in vitro.** XU Xian-yun, XIE Qiong-jun, HUANG Hai-jin, et al. The 1st Affiliated Hospital of Hannan Medical College in Jiangxi Province, Jiangxi Hanzhou, 341000, China, E-mail: liuqiangmu@126.com

**【Abstract】 Objective** To primarily study the possible treatment effects and its mechanism of timolol and propranolol on a Mouse Hemangioendothelioma Model (EOMA) in vitro. **Methods** Comparative study on the effects of non-selective  $\beta$ -blocker propranolol and timolol, on the proliferation and apoptosis of Mouse Hemangioendothelioma Endothelial Cell (EOMA cells) was conducted in vitro. EOMA cells were cultured in vitro, randomly divided into different groups, propranolol and timolol were added into the medium respectively, after 24, 48, and 72 hours intervention, MTT assay and Acridine orange staining assay were conducted respectively to detect cell viability and apoptosis level. **Results** For propranolol, after 24 h treatment, significant differences of cell viability and apoptosis were noted ( $P < 0.05$ ) at the concentration of 50  $\mu\text{mol/L}$ , while continuing to increase to 50  $\mu\text{mol/L}$ , the cell survival rate decreased sharply to close to 0. Acridine orange staining at the 50  $\mu\text{mol/L}$  group after 24 h revealed many apoptotic cells. Groups of longer treatment to 48 h and 72 h showed a similar trend to the result of 24 h group in both MTT assay and Acridine orange staining. However,

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2014.02.009

作者单位:1 江西省赣南医学院(江西省赣州市,341000);2,南昌大学医学院研究生院(江西省南昌市 330006);3,江西省赣南医学院第一附属医院(江西省赣州市,341000),通讯作者:刘潜, E-mail:liuqiangmu@126.com, 本课题受国家自然科学基金项目(编号:81060267)、江西省自然科学基金项目(编号:2010GZY0016)、江西省教育厅青年基金项目(编号:GJJ11208)、赣州市科技项目及 2012 年赣南医学院本科生创新项目资助

at the same time, compared with propranolol, timolol did not appear significantly inhibition on EOMA cell viability and induction on apoptosis in the experiment ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Propranolol can effectively inhibit the proliferation and induce the apoptosis of EOMA cells in vitro; While, timolol, also  $\beta$ -blocker, failed to play a similar role when added into the medium of EOMA cells in our study, showed no significant treatment potential, indicating that timolol's treatment on EOMA cells may be related to pathways other than  $\beta$ -blocker way, furthermore, it is recommended to conduct further clinic study before its widely utilization in the treatment of infant hemangioma.

**[Key words]** Hemangioma; Timolol; Propranolol; Cell Proliferation; Apoptosis; Mice

2008 年, 法国 Bordeaux 儿童医院 Léauté-Labrèze 等医生在美国《新英格兰医学杂志》报道了他们应用普萘洛尔(propranolol)治疗婴儿血管瘤的重大发现<sup>[1]</sup>。因其治疗效果明显, 相比类固醇有较少的副作用, 逐渐成为药物治疗血管瘤的新选择<sup>[2-5]</sup>。普萘洛尔是临床常用非选择性 $\beta$ 肾上腺素受体阻滞剂, 其治疗血管瘤的机制尚不完全清楚。受其启发, 其他 $\beta$ 肾上腺素受体阻滞剂能否应用于血管瘤的治疗呢? 比如噻吗洛尔, 其对 $\beta$ 肾上腺素受体阻滞的药理作用是普萘洛尔的 4~10 倍。本研究以小鼠血管瘤(Mouse Hemangioendothelioma Model, EOMA)细胞为模型, 对普萘洛尔与噻吗洛尔对 EOMA 细胞体外增殖及凋亡调控作用进行初步比较研究<sup>[6]</sup>。

## 材料与方法

### 一、临床材料

小鼠血管瘤 EOMA 细胞(重庆医科大学金先庆教授惠赠)。DMSO、MTT、普萘洛尔(propranolol)和噻吗洛尔(Timolol)购自 Sigma 公司。吖啶橙(AO)购自美国 Amerseo 公司。胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素和高糖 DMEM 培养基购于 GIBCO 公司。

### 二、细胞培养方法

小鼠血管瘤(EOMA 细胞)细胞由金先庆教授惠赠。用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 培养基, 在 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 恒温培养箱中培养, 取对数生长期细胞实验。

### 三、MTT 比色法检测细胞增殖/存活率

取对数生长期细胞进行实验, 将  $1.0 \times 10^5$  个/mL EOMA 细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后加入不同浓度普萘洛尔和噻吗洛尔 PBS 溶液: 31.5、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000 和 8 000  $\mu\text{mol/L}$ , 终浓度分别为 3.15、6.25、12.5、25、50、100、200、400 和 800  $\mu\text{mol/L}$ , 作用时间分别为 24 h、48 h、72 h。单纯 PBS 处理作为溶剂对照组。

处理结束后, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$ 、5 mg/mL MTT 溶液, 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C 恒温培养箱继续孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 酶标仪(Thermo)测定 A570 nm 和 A630 nm 值。

### 四、吖啶橙(AO)染色荧光显微镜观察细胞凋亡

于 6 孔板中放入盖玻片接种 EOMA 细胞, 分别加入浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、500  $\mu\text{mol/L}$ 、1 000  $\mu\text{mol/L}$ 、2 000  $\mu\text{mol/L}$  普萘洛尔和噻吗洛尔溶液, 终浓度分别为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h。弃上清液, 加入 1 mL AO 染液(PBS 按 10:1 配制), 室温避光染色 30 s, 弃染液, PBS 洗涤 3 次。荧光显微镜下观察, 常规方法计数, 得出凋亡率。

### 五、统计学处理

所有实验重复 3 次, 计数资料采用百分率进行描述。对率进行平方根反正弦变换后, 用重复测量资料方差分析法比较不同浓度不同时间点普萘洛尔和噻吗洛尔的效应差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。数据录入采用 Excel 2007, 统计分析采用 SPSS14.0 软件。

## 结果

### 一、MTT 检测 EOMA 细胞增殖/存活率

普萘洛尔作用 24 h 后, 随剂量增加, EOMA 细胞存活率逐渐下降, 与对照组相比, 至药物浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时有显著差异( $P < 0.05$ ), 继续增加至 800  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞存活率接近 10%。48 h 组和 72 h 组与对照组相比, 至药物浓度 25  $\mu\text{mol/L}$  时有显著差异( $P < 0.05$ ), 变化趋势与 24 h 组相似(表 1, 图 1)。噻吗洛尔作用 24 h 后, 各剂量组 EOMA 细胞存活率无明显降低, 当药物浓度增加至 800  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞存活率为  $(88.97 \pm 7.34)\%$ , 与对照组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。48 h 组和 72 h 组变化趋势与 24 h 组相似(表 2, 图 2)。

表 1 普萘洛尔对 EOMA 细胞存活率的影响 (%)  
Table 1 Effects of propranolol on cell viability of EOMA cells (%)

普萘洛尔浓度 (μmol/L)	24 h	48 h	72 h	普萘洛尔浓度 (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
control	99.99 ± 7.59	100 ± 3.28	100 ± 2.95	50	75.53 ± 1.53 *	59.83 ± 5.17 *	53.74 ± 4.64 *
3.125	102.87 ± 5.57	91.41 ± 1.42	89.74 ± 2.52	100	65.76 ± 0.83 *	58.03 ± 0.31 *	47.21 ± 0.28 *
6.25	96.19 ± 4.24	86.12 ± 3.20	83.71 ± 4.28	200	54.16 ± 0.98 *	40.93 ± 0.33 *	44.43 ± 0.29 *
12.5	84.04 ± 2.99	80.74 ± 2.37	76.77 ± 3.04	400	25.39 ± 0.68 *	9.29 ± 0.65 *	12.96 ± 0.59 *
25	79.75 ± 3.00	71.68 ± 3.85 *	64.39 ± 3.45 *	800	10.13 ± 0.62 *	1.23 ± 0.53 *	1.11 ± 0.34 *

注：各组统计数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $n=6$ , \* 表示与各对照组相比,  $P<0.05$ 。

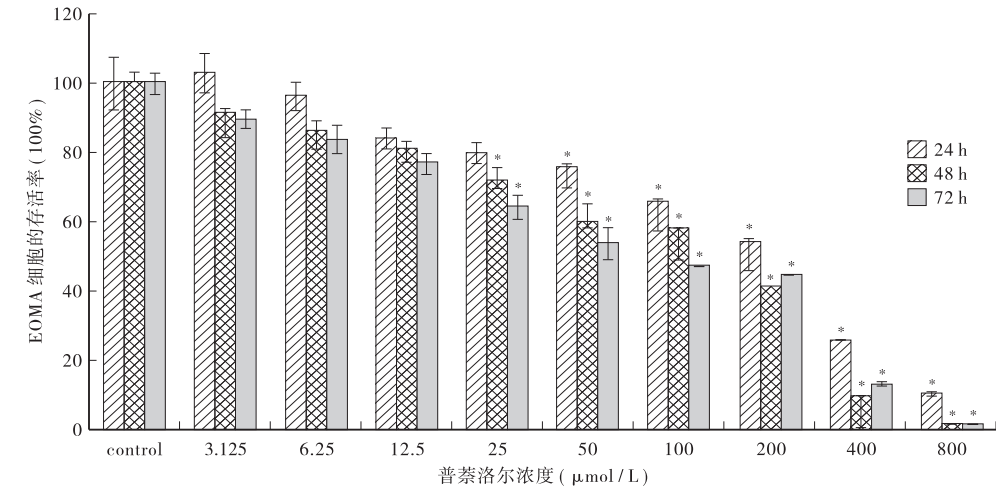


图 1 不同浓度普萘洛尔对 EOMA 细胞存活率的影响  
Fig. 1 Effects of propranolol on cell viability in EOMA cells

表 2 噻吗洛尔对 EOMA 细胞存活率的影响 (%)  
Table 2 Effects of timolol on cell viability of EOMA cells (%)

噻吗洛尔浓度 (μmol/L)	24 h	48 h	72 h	噻吗洛尔浓度 (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
control	100 ± 2.37	100 ± 5.37	99.99 ± 4.50	50	93.34 ± 1.52	104.40 ± 4.52	90.04 ± 4.65
3.125	97.97 ± 2.92	94.60 ± 5.92	97.02 ± 5.05	100	90.65 ± 1.60	90.83 ± 4.60	95.55 ± 4.73
6.25	99.77 ± 2.42	91.70 ± 5.42	94.77 ± 4.55	200	86.93 ± 1.97	85.01 ± 4.97	81.81 ± 4.10
12.5	92.39 ± 4.03	96.53 ± 7.03	97.95 ± 6.16	400	86.17 ± 0.68	87.65 ± 3.68	80.47 ± 2.81
25	98.56 ± 2.27	93.36 ± 5.27	96.02 ± 5.40	800	88.96 ± 6.73	80.43 ± 9.73	82.99 ± 8.86

注：各组统计数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $n=6$ , 与对照组比较,  $P>0.05$ 。

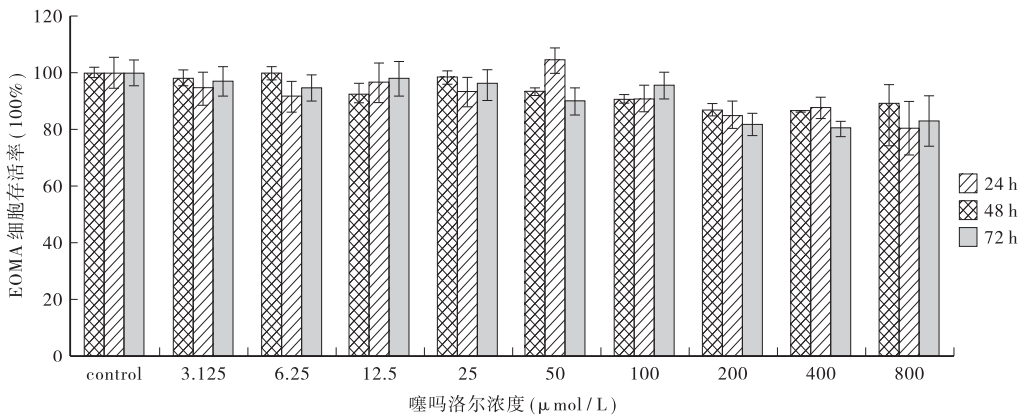


图 2 不同浓度噻吗洛尔对 EOMA 细胞存活率的影响  
Fig. 2 Effects of timolol on cell viability of EOMA cells

二、普萘洛尔和噻吗洛尔作用 EOMA 细胞的 AO 染色结果

普萘洛尔作用细胞后,经 AO 染色,荧光显微镜下观察可见 EOMA 细胞数量明显减少,且细胞体积缩小,细胞核固缩,可见浓缩致密的暗绿色或黄绿色荧光,呈团状或串珠状,对照组为均匀一致的绿色荧光,50  $\mu\text{mol/L}$  普萘洛尔作用细胞 24 h 后,细胞开始

明显变化,200  $\mu\text{mol/L}$  时,细胞数量明显减少,体积缩小、核固缩明显(图 3)。

噻吗洛尔作用细胞后,经 AO 染色,荧光显微镜下观察。凋亡细胞为细胞体积缩小,细胞核固缩,可见浓缩致密的暗绿色或黄绿色荧光,呈团状或串珠状,对照组为均匀一致的绿色荧光,不同剂量组细胞凋亡率无显著性差异(图 4)。

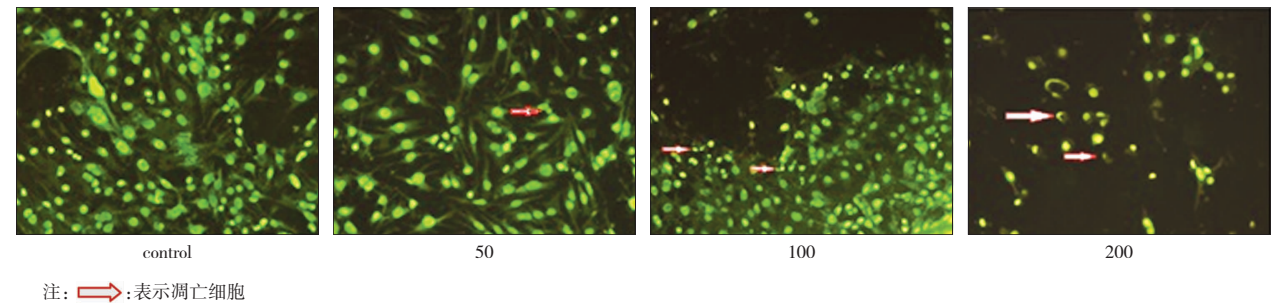


图 3 普萘洛尔作用小鼠血管瘤细胞 24 h 引起细胞凋亡(吖啶橙染色)

Fig. 3 Effects of propranolol on induction of apoptosis in EOMA cells stained by AO(24 h)

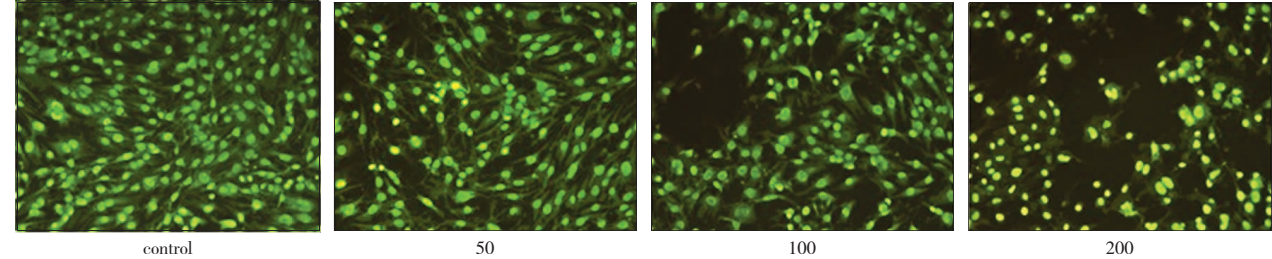


图 4 噻吗洛尔作用小鼠血管瘤细胞 24 h(吖啶橙染色)

Fig. 4 Effects of timolol on EOMA cells stained by AO(24 h)

普萘洛尔和噻吗洛尔诱导 EOMA 细胞凋亡的作用不同。当普萘洛尔浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时,能够观察到较多凋亡细胞,与对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),且随浓度的增加诱导凋亡作用越明显,

当浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  时凋亡率为  $(34.7 \pm 3.6)\%$ 。从 AO 染色结果观察并计数,不同浓度组噻吗洛尔诱导 EOMA 细胞凋亡率与各对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ,表 3)。

表 3 普萘洛尔和噻吗洛尔诱导 EOMA 细胞的凋亡率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 3 Effect of propranolol and timolol on induction of apoptotic EOMA cells(%)

药物	control	50 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$
普萘洛尔	0	$13.6 \pm 2.1^*$	$26.5 \pm 4.2^*$	$34.7 \pm 3.6^*$
噻吗洛尔	0	$2.4 \pm 0.35$	$5.1 \pm 1.2$	$6.4 \pm 0.85$

注: 各组统计数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $n = 3$ , \* 表示与各对照组相比,  $P < 0.05$ 。

讨论

普萘洛尔是非选择性竞争抑制肾上腺素  $\beta$  受体阻滞剂,其常见药效及机制为: ①抑制心脏起搏点电位的肾上腺素能兴奋,用于治疗心律失常; ②拮抗异丙肾上腺素及去甲肾上腺素的作用; ③降低血浆肾素活性。此外,可以对抗支气管舒张,以及降低

胰岛素分泌量,缓解低血糖引起的不适<sup>[7]</sup>。  
法国 Léauté-Labrèze 等<sup>[1]</sup>报道了普萘洛尔治疗血管瘤的新作用后,其药理作用机制再次引起同行们关注。广义的血管瘤包括血管瘤(真性)及血管畸形两大类<sup>[8]</sup>。目前普萘洛尔治疗报道多集中于血管瘤(真性)<sup>[9-11]</sup>。其与血管畸形的区别主要在于血管内皮细胞等的增殖状态,前者常有异常增殖,而后者增殖状态往往正常。这一区别提示,普萘洛

尔治疗血管瘤可能与抑制细胞的增殖有关。

噻吗洛尔也是一种非选择性  $\beta$  肾上腺素受体阻滞剂,小儿眼科医师将它作为青光眼的一线治疗药物已经超过 30 年,在婴幼儿人群中的应用具有较高的安全性<sup>[12]</sup>。近年来,有研究称,噻吗洛尔同样可应用于血管瘤的治疗,且治疗效果良好,局部使用治疗溃疡性血管瘤效果尤为明显<sup>[13-14]</sup>。

为进一步探讨噻吗洛尔对血管瘤的治疗作用及可能机制,本研究以小鼠血管瘤(EOMA)细胞为模型,对普萘洛尔与噻吗洛尔对 EOMA 细胞体外增殖及凋亡调控作用进行初步比较研究<sup>[9]</sup>。

EOMA 瘤是一种 129P3/J 小鼠来源的血管瘤<sup>[15]</sup>。主要由异常增殖的血管内皮细胞构成瘤体,伴不同程度的管腔化,是目前常用的血管瘤实验动物及细胞培养模型。本研究显示普萘洛尔处理组细胞增殖状况明显低于对照组,细胞凋亡明显增加,提示普萘洛尔具有抑制 EOMA 细胞体外增殖,诱导其凋亡的作用。从实验数据看,这一作用呈明显剂量-效应依赖性。中、低剂量组,时间-效应依赖性不明显,当剂量达到 100  $\mu\text{mol/L}$  时呈现一定的时间-效应依赖性。提示临床应用普萘洛尔治疗婴幼儿血管瘤时,剂量对疗效的影响应予重视。

同为非选择性  $\beta$  受体阻滞剂的噻吗洛尔,对  $\beta$  受体阻滞药理作用是普萘洛尔的 4 ~ 10 倍,也有报道称其对血管瘤有较好的临床治疗效果,据此,可以推测其对 EOMA 细胞体外增殖及诱导凋亡的作用更强。但是本研究中,与普萘洛尔相比,噻吗洛尔对 EOMA 细胞体外增殖及凋亡的调控作用并不显著。这一结果提示,噻吗洛尔对血管瘤的治疗机制可能并不依赖  $\beta$  受体通路,还与其他途径有关。其次,虽然本研究是针对小鼠血管瘤取得的结果,但一定程度上,提示噻吗洛尔对婴幼儿血管瘤的治疗效果仍需进行严格、有效的临床研究来验证。

综上所述,临床应用普萘洛尔治疗婴幼儿血管瘤时,单次剂量对疗效的影响应予考虑。而对于目前临床上使用噻吗洛尔等其他  $\beta$  受体阻滞剂治疗婴幼儿血管瘤的尝试,建议采用多中心、大样本联合临床研究。

## 参 考 文 献

- 1 Léauté-Labrèze CE, Dumas de la Roque E, Hubiche, T. et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy [J]. N. Engl. J. Med, 2008, 358(24): 2649-2651.
- 2 Frieden IJ, Drolet BA. Propranolol for infantile hemangiomas: promise, peril, pathogenesis [J]. Pediatr Dermatol, 2009, 26(5): 642-644.
- 3 Hermans DJ, Van Beynum IM, Schultze Kool LJ, et al. Propranolol, a very promising treatment for ulceration in infantile hemangiomas; a study of 20 cases with matched historical controls [J]. J Am Acad Dermatol, 2011, 64(5): 833-838.
- 4 Saint-Jean M, Léauté-Labrèze C, Mazereeuw-Hautier J, et al. Propranolol for treatment of ulcerated infantile hemangiomas [J]. J Am Acad Dermatol, 2011, 64(5): 827-832.
- 5 Bagazgoitia L, Torrelo A, Gutiérrez JC, et al. Propranolol for infantile hemangiomas [J]. Pediatr Dermatol, 2011, 28(2): 108-114.
- 6 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): 1017-1019.
- 7 施仲伟.  $\beta$  受体阻滞剂的临床应用价值 [J]. 心血管病学进展, 2011, 32(1): 9-12.
- 8 Webber EC, Rescorla FJ. Hemopneumothorax caused by vascularized bullae and a pulmonary hemangioma in an adolescent boy [J]. J Pediatr Surg, 2012, 47(4): 23-25.
- 9 Talaat AA, Elbasiouny MS, Elgendy DS, et al. Propranolol treatment of infantile hemangioma: clinical and radiologic evaluations [J]. J Pediatr Surg, 2012, 7(4): 707-714.
- 10 Hsu TC, Wang JD, Chen CH, et al. Treatment with propranolol for infantile hemangioma in 13 Taiwanese newborns and young infants [J]. Pediatr Neonatol, 2012, 53(2): 125-132.
- 11 Gelmetti C, Frasin A, Restano L. Innovative Therapeutics in Pediatric Dermatology [J]. Dermatol Clin, 2010, 28(3): 619-629.
- 12 Coppens G, Stalmans I, Zeyen T, et al. The safety and efficacy of glaucoma medication in the pediatric population [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 2009, 46(1): 12-18.
- 13 Semkova K, Kazandjieva J. Rapid complete regression of an early infantile hemangioma with topical timolol gel [J]. International journal of dermatology, 2014, 53(2): 241-242.
- 14 Thomas J, Kumar P, Kumar DD. Ulcerated infantile haemangioma of buttock successfully treated with topical timolol [J]. Journal of cutaneous and aesthetic surgery, 2013, 6(3): 168.
- 15 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, 01: 111-114.
- 1 Léauté-Labrèze CE, Dumas de la Roque E, Hubiche, T. et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy [J]. N.