

实验研究

淫羊藿素抑制人脐静脉内皮细胞血管生成及其机制

吕祥^{1,3} 冯彦军² 夏英³ 刘静¹ 侯凤刚¹ 李雁¹ 任建琳¹ 陈伟杰⁴

(1 上海市中医医院肿瘤科, 上海, 200071; 2 苏州市第五人民医院肿瘤科, 苏州, 215007; 3 上海市中医医院药物临床试验机构办公室, 上海, 200071; 4 上海市中医医院泌尿外科, 上海, 200071)

摘要 目的:探讨淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成的抑制作用及其机制。方法:体外培养人脐静脉内皮细胞,分别观察淫羊藿素对其增殖、迁移及其小管形成的影响。采用酶联免疫吸附法检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)和色素上皮衍生因子(PEDF)的含量。结果:经淫羊藿素作用 48 h 后,未见对内皮细胞增殖有影响。淫羊藿素高浓度组(ICT1 10^{-6} mol/L)、中浓度组(ICT2 10^{-7} mol/L)、低浓度组(ICT3 10^{-8} mol/L)和沙利度胺(TLD)组 HUVEC 细胞迁移数目(4.67 ± 1.26)、(10.48 ± 3.15)、(21.06 ± 6.83)和(19.15 ± 6.03)个,明显低于空白对照(Control)组(41.38 ± 7.78)个($P < 0.01$)。ICT1、ICT2、ICT3 及 TLD 组小管形成的面积分别为($5\ 867.45 \pm 925.36$)、($1\ 627.33 \pm 288.56$)、(735.73 ± 325.65)和($2\ 933.24 \pm 741.43$) μm^2 /视野,均低于 Control 组($7\ 883.69 \pm 1\ 034.85$) μm^2 /视野($P < 0.01$)。经淫羊藿素处理后, HUVEC 细胞分泌 VEGF 功能明显下降,而分泌 PEDF 功能明显升高。结论:体外实验结果表明淫羊藿素具有抑制 HUVEC 细胞血管生成的作用,这种效应与血管内皮细胞 VEGF 的活性降低及其合成受到抑制,同时对 PEDF 活性升高及其合成受到促进作用有关。

关键词 淫羊藿素;人脐静脉内皮细胞;血管新生;血管生成抑制剂

The Suppressive Effect of Icaritin on Angiogenesis of Endothelial Cells in Human Umbilical Vein and Its Associated Mechanisms

Lv Xiang¹, Feng Yanjun², Xia Ying¹, Liu Jing¹, Hou Fenggang¹, Li Yan¹, Ren Jianlin¹, Chen Weijie³

(1 Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China; 2 The fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou 215007, China; 3 Department of Urology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

Abstract Objective: To investigate the suppressive effect of Icaritin on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its associated mechanisms. **Methods:** HUVEC cells were cultured in vitro, and we observed the effects of Icaritin on its proliferation, migration and tube formation. The content of vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) was detected by ELISA. **Results:** Icaritin had no significant effect on the proliferation of HUVEC cells after 48h treatment. The number of migrated cells in Icaritin high concentration group (ICT1 10^{-6} mol/l), middle concentration group (ICT2 10^{-7} mol/l), low concentration group (ICT3 10^{-8} mol/l) and Thalidomide (TLD) group were 4.67 ± 1.26 , 10.48 ± 3.15 , 21.06 ± 6.83 , 19.15 ± 6.03 respectively, and all of which were lower compared with the control group (41.38 ± 7.78) ($P < 0.01$). The area of tube formation in ICT1, ICT2, ICT3 and TLD were separately $5\ 867.45 \pm 925.36$, $1\ 627.33 \pm 288.56$, 735.73 ± 325.65 , $2\ 933.24 \pm 741.43$ μm^2 per vision, all of which were lower than the control group ($7\ 883.69 \pm 1\ 034.85$ μm^2 per vision) ($P < 0.01$). After Icaritin treatment, HUVEC cells had a significant lower ability to secrete VEGF, but as for PEDF, it was on the opposite situation. **Conclusion:** Icaritin can inhibit the angiogenesis of HUVEC cells in vitro. Such effect may be related to the decreased activity and synthesis of VEGF in vascular endothelial cells, and also associated with the increased activity and synthesis of PEDF.

Key Words Icaritin, Human umbilical vein endothelial cell; Angiogenesis; Angiogenesis inhibitor

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.01.026

血管新生在人体正常发育以及许多疾病的发生与 发展中起着重要作用, 尤其与肿瘤的形成及转移关系

密切^[1],新生血管保证了肿瘤持续生长所需要营养物质的有效供给,抑制肿瘤的血管新生,切断肿瘤生长和转移所依赖的命脉已经成为当前治疗肿瘤的重要策略之一^[2]。现代药理研究表明,淫羊藿及其有效成分具有多种药理作用,以往研究发现淫羊藿苷可以诱导体外肿瘤细胞凋亡等作用^[3-10]。淫羊藿素是淫羊藿活性成分之一,是淫羊藿苷在体内的一种代谢产物,在一定的浓度范围内具有雌激素样作用^[11-12]。前期在鸡胚尿囊膜体内实验(Chick Chorioallantoic Membrane, CAM)研究中发现淫羊藿素对新生毛细血管生成具有明显抑制作用^[13]。淫羊藿素是一种十分具有应用前景的抗肿瘤天然药物,但其作用机制尚不明确。本研究通过体外模拟血管生成,观察淫羊藿素对内皮细胞血管生成的抑制作用,并探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 淫羊藿素(上海融禾医药科技发展有限公司,批号:100109)和 MMT(美国 Sigma 公司);沙利度胺(常州制药厂有限公司,批号:国药准字 H32026130);二甲基亚砜(DMSO)(北京亚太精细化工公司产品);Transwell 小室(美国 Corning 公司);基质胶(美国 Becton - Dickinson 公司);人内皮细胞生长因子(VEGF)和色素上皮衍生因子(PEDF)定量 ELISA 试剂盒(美国 R&D systems 公司);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);XDS - 1B 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Modle 500 型酶联免疫检测仪(美国 Bio - Rad 公司);人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(中国科学院上海细胞研究所)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有 10% 热灭活小牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃,体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度条件下常规培养,2 ~ 3 d 传代 1 次,实验用对数生长期细胞。

1.2.2 细胞增殖实验 取对数生长期的人脐静脉内皮 HUVEC 细胞进行细胞计数,调整细胞浓度为 5×10^4 /mL,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板。细胞常规培养 24 h 后完全贴壁,分别设立空白对照组、实验组、溶剂对照组和阳性对照组,每组设立 6 个复孔。分别加入 $0, 2 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-6}, 2 \times 10^{-7}, 2 \times 10^{-8}$ mol/L 的 ICT, 0.02% DMSO 及 100 μ g/mL 的 TLD。24 h、48 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液,孵育 4 h,翻板,每孔加入 100 μ L DMSO。微型混合器上震荡 2 min, 10 min 后于酶标仪检测 OD 值,波长选择 490 nm。按下述公式计算不同浓度淫羊藿素对 HUVEC 细胞的增殖抑制率:抑制率(%) = [(空白对照组 OD 值 - 实验组

OD 值)/空白对照组 OD 值] $\times 100\%$ 。

1.2.3 内皮细胞迁移实验 取对数生长期 HUVEC 细胞,用消化液消化后,加入无血清培养基,吹打制成单细胞悬液,调整细胞密度为 9×10^4 个/mL。在 24 个上室中加入细胞悬液 90 μ L,分为六组,每组 4 个复孔,每组依次加入药物为 $0, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ mol/L ICT, 0.1% DMSO 及 500 μ g/mL 的 TLD 各 10 μ L。在小室下室中各加入含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μ L。于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中孵育 12 h。取出小室,吸弃上下小室的培养基,用棉签擦去膜内表面细胞,然后用 PBS 液洗 2 遍。常温下用 95% 乙醇固定 30 min,取出小室风干,用结晶紫染色液染色 10 min,最后再用 PBS 液洗两遍。在 100 倍光镜下,观察微孔滤膜外表面的细胞,在 400 倍镜下随机选择 5 个视野拍照,计得每个视野的细胞数目,取平均值。细胞数目的多少反映内皮细胞的迁移能力,并按下列公式计算迁移抑制率。迁移抑制率 = [1 - (实验组细胞的迁移数/空白对照组细胞的迁移数)] $\times 100\%$ 。

1.2.4 小管形成实验 用 Matrigel 胶以每孔 120 μ L 包被 24 孔培养板,铺平后置于 37 ℃ 培养箱中聚合 4 h。取对数生长期 HUVEC 细胞消化后,将不同浓度 ICT、空白对照及 TLD 与含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,以及 HUVEC 细胞(5×10^4 /孔,每孔体积为 1 mL)混匀后加入 24 孔培养板。每组 4 个复孔。于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中孵育 24 h。在倒置显微镜下于 100 倍镜头观察小管形成情况,每孔随即取 5 个视野拍照,用图像分析软件处理后,以形成的管状结构面积表示 ICT 的作用强弱。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液中 VEGF 及 PEDF 的浓度 采用双抗体夹心 ABC - ELISA 方法,检测人脐静脉内皮细胞 HUVEC 分泌 VEGF 及 PEDF 的水平。取对数生长期 HUVEC 细胞,常规胰酶及 EDTA 消化,细胞计数后调整细胞浓度 1×10^5 /mL,取 100 μ L 接种于 96 孔培养板,待细胞完全贴壁后,弃原培养基,加入分别含有终浓度为 $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ mol/L 淫羊藿素及 50 μ g/mL 沙利度胺的 DMEM 培养基 250 μ L,同时设立空白对照组,作用 24 h 后收集各孔上清液,在 4 ℃ 条件下,1 000 r/min 离心 5 min,吸取上清作为待测样品。测定时取 200 μ L 上清液,严格按照 ELISA 试剂盒操作说明进行。

2 结果

2.1 淫羊藿素对 HUVEC 细胞增殖的影响 淫羊藿素对 HUVEC 的增殖无明显抑制作用,与药物浓度无依赖关系。沙利度胺对 HUVEC 的增殖存在抑制作用

(见表1,图1)。

2.2 淫羊藿素对血管内皮细胞迁移的影响

2.2.1 划痕闭合实验 结果显示,在空白对照组划痕处发生迁移的细胞数目明显多于淫羊藿素各组及沙利度胺组,划痕损伤区重新被内皮细胞覆盖。在淫羊藿素各组中,随着药物浓度的增大,迁移细胞数目逐渐减少,划痕区被细胞重新覆盖的面积也不断缩小。沙利度胺组亦有部分细胞发生迁移,但与空白对照组比较,迁移细胞数目明显减少(见图2)。

表1 ICT对HUVEC细胞株增殖的影响及其抑制率

分组	24 h 光密度	抑制率	48 h 光密度	抑制率
空白组	1.25 ± 0.07	0	1.38 ± 0.05	0
二甲基亚砜 0.1%	1.21 ± 0.01	3.2%	1.35 ± 0.10	2.2%
淫羊藿素 10 ⁻⁵ mol/L	1.28 ± 0.07	-2.4%	1.45 ± 0.01	-5.1%
淫羊藿素 10 ⁻⁶ mol/L	1.26 ± 0.06	-0.8%	1.41 ± 0.05	-2.2%
淫羊藿素 10 ⁻⁷ mol/L	1.18 ± 0.06	5.6%	1.28 ± 0.06	7.2%
淫羊藿素 10 ⁻⁸ mol/L	1.08 ± 0.02	13.6%	1.21 ± 0.06	12.3%
沙利度胺 50 μg/mL	1.03 ± 0.02	17.6%	1.18 ± 0.13	14.5%

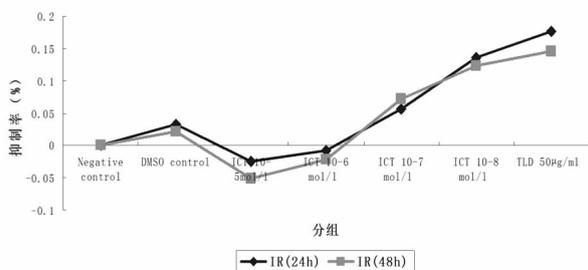


图1 ICT对HUVEC细胞株增殖的抑制率

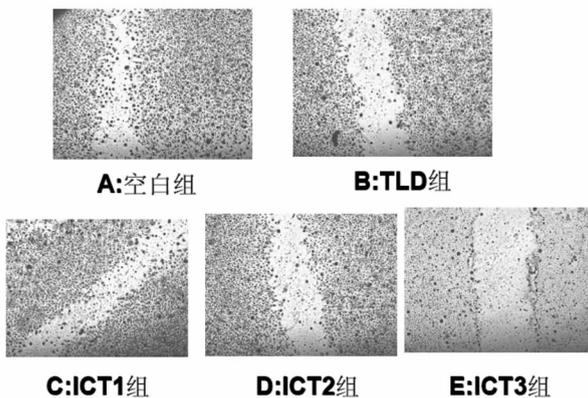


图2 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞迁移的影响(×400倍)

2.2.2 Transwell 小室趋化实验 结果显示,浓度为 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol/L 的淫羊藿素对 HUVEC 细胞的迁移有明显的抑制作用,并呈浓度依赖关系。与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。浓度为 50 μg/mL 的沙利度胺也可抑制内皮细胞迁移,迁移抑制率达 53.72%,与淫羊藿素中高浓度组比较,组间差异具有统计学意义($P < 0.01$),但与淫羊藿素低浓度组比较,两组差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表2,图3)。

表2 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	浓度	迁移细胞数	迁移抑制率(%)
空白组	0	41.38 ± 7.78	0
沙利度胺组	50 μg/mL	19.15 ± 6.03 **	53.72
淫羊藿素高浓度组	10 ⁻⁶ mol/L	4.67 ± 1.26 **△△	88.71
淫羊藿素中浓度组	10 ⁻⁷ mol/L	10.48 ± 3.15 **△△	74.67
淫羊藿素低浓度组	10 ⁻⁸ mol/L	21.06 ± 6.83 **	49.11

注: ** $P < 0.01$ 与空白组比较, △△ $P < 0.01$ 与沙利度胺组比较。

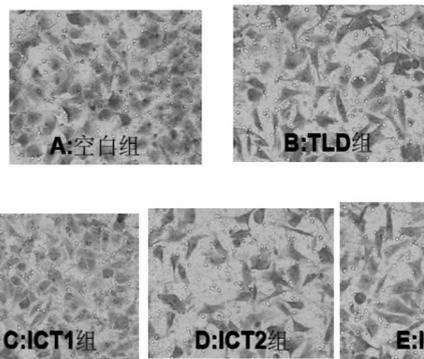


图3 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞迁移的影响(×100倍)

表3 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞 HUVEC

小管形成的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	浓度	小管面积(μm ² /field)	小管周长(μm/field)
空白组	0	7 883.69 ± 1 034.85	886.61 ± 168.73
沙利度胺组	50 μg/mL	2 933.24 ± 741.43 **	462.75 ± 161.58 **
淫羊藿素高浓度组	10 ⁻⁶ mol/l	5 867.45 ± 925.36 **△△	734.51 ± 71.57 *△△
淫羊藿素中浓度组	10 ⁻⁷ mol/l	1 627.33 ± 288.56 **△△	249.58 ± 68.25 **△△
淫羊藿素低浓度组	10 ⁻⁸ mol/l	735.73 ± 325.65 **△△	132.31 ± 52.73 **△△

与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与沙利度胺组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

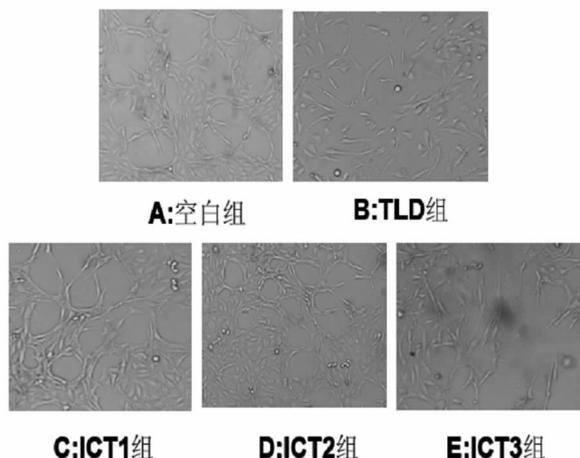


图4 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞 HUVEC

小管形成的影响(×100倍)

2.3 淫羊藿素对血管内皮细胞小管形成的影响 光镜下观察结果显示,与空白对照组比较,淫羊藿素各组形成管状结构的数目明显减少,小管间距离增大,管状结构不完整。图像经量化分析后发现,淫羊藿素各组及沙利度胺组管状结构面积和周长明显小于空白对照

组($P < 0.01$)。沙利度胺组管状面积及周长小于淫羊藿素高浓度组($P < 0.01$),但高于淫羊藿素中低浓度组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见表3,图4)。

2.3 淫羊藿素对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 分泌 VEGF 及 PEDF 的影响 ICT 和 TLD 作用于 HUVEC 24 h 后,ICT 和 TLD 的抑制作用与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。中高浓度淫羊藿素的抑制作用明显强于沙利度胺($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而低浓度淫羊藿素与沙利度胺比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表4)。

表4 淫羊藿素对 HUVEC 细胞分泌 VEGF 及 PEDF 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	浓度	VEGF 表达量 (pg/mL)	PEDF 表达量 (pg/mL)
空白组	0	1 082.53 ± 18.91	19.31 ± 2.51
沙利度胺组	50 μg/mL	963.77 ± 24.58 **	23.69 ± 3.18 *
淫羊藿素高浓度组	10 ⁻⁶ mol/L	938.43 ± 42.23 **	25.97 ± 3.65 *
淫羊藿素中浓度组	10 ⁻⁷ mol/L	890.45 ± 6.86 *△△	27.77 ± 3.64 *
淫羊藿素低浓度组	10 ⁻⁸ mol/L	861.72 ± 21.34 *△△	28.28 ± 4.75 *△

注: * $P < 0.05$ 与空白组比较, ** $P < 0.01$ 与空白组比较; △ $P < 0.05$ 与沙利度胺组比较, △△ $P < 0.01$ 与沙利度胺组比较。

3 讨论

血管生成是一个由一系列细胞因子介导的级链反应过程,其中血管内皮细胞的增殖、侵袭、迁移和分化是血管生成过程中的关键环节^[14]。本研究分别观察了 ICT 对血管内皮细胞增殖、迁移和小管形成的直接效应。我们发现,ICT 在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol/L 时对 HUVEC 细胞的增殖没有抑制作用,表明 ICT 无细胞毒性作用。研究发现,在浓度 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol/L 时,ICT 对纤维粘连蛋白诱导的血管内皮细胞的迁移具有抑制作用。在相同浓度下,ICT 可降低血管内皮细胞在体外分化成管状结构的能力,这表明血管内皮细胞在形成血管的几个关键环节均不同程度受到 ICT 的抑制,提示 ICT 可能通过抑制血管内皮细胞的迁移和分化而发挥其抗血管生成作用。

在血管生成过程中,VEGF 是内皮细胞中一种选择性、特异性有丝分裂原,它能够促进内皮细胞进行有丝分裂,提高内皮细胞的生存能力,还能够增强内皮细胞的趋化性和血管壁的通透性。其不仅能够体内诱发新血管发生,而且在体外还能够促进内皮细胞的增殖,是迄今为止已知的最强的血管生成促进因子之一。PEDF 属于丝氨酸蛋白酶超家族,具有高度保守的序列以及独特的分子结构,近年来因研究发现其具有营养神经,抑制新生血管,抗肿瘤等多种功能而成为研究的

热点,其中抗新生血管的功能尤为重要^[15]。为了探讨淫羊藿素对血管内皮细胞合成和分泌 VEGF 和 PEDF 是否有影响,我们检测了血管内皮细胞上清液中 VEGF 和 PEDF 的含量。结果表明,淫羊藿素具有抑制血管内皮细胞分泌 VEGF 的作用,同时具有促进血管内皮细胞分泌 PEDF 的作用,而且其作用存在浓度依赖关系。本研究结果说明,淫羊藿素对 HUVEC 细胞体外构建新生血管具有明显的抑制作用,但它在体内是否也具有抗血管生成效应需要进一步研究发现。

参考文献

- [1] 赵国旗,许奕,王蕾.鼻咽癌放射治疗前测定血管内皮生长因子的意义[J]. 中西医结合学报,2005,3(4):274-277.
- [2] Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression [J]. Cancer Cell,2004,5(1):13-17.
- [3] 叶丽卡,陈济民.淫羊藿的药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,25(6):293-295.
- [4] 李贵新,张玲.淫羊藿甙诱导白细胞细胞凋亡及其对癌基因表达的影响[J]. 中华血液学杂志,2002,2(4):352-353.
- [5] 李贵新,张玲.淫羊藿苷诱导肿瘤细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,1999,4(3):235-236.
- [6] 毛海婷,张玲.淫羊藿甙对高转移肺癌细胞恶性表型的逆转作用及其调控机制研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,1999,6(1):7-8.
- [7] 赵勇,张玲.淫羊藿甙的体外免疫调节作用研究[J]. 中草药,1996,27(11):669-672.
- [8] 陈逸青,刘从云,孙静,等.淫羊藿总黄酮对丝裂霉素致小鼠骨髓细胞突变的保护作用[J]. 毒理学杂志,2008,22(5):368-370.
- [9] 赵连梅,纪昕,潘晓明,等.淫羊藿苷(ICA)对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用[J]. 中国免疫学杂志,2009,25(12):1092-1099.
- [10] 王洪武,贾亮亮,徐媛青,等.淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. 天津医药,2010,38(12):1068-1071.
- [11] 王大伟,邓秀兰,牛建超,等.淫羊藿素和脱水淫羊藿素对人类乳腺癌细胞 T47D 增殖和细胞周期的影响[J]. 北京中医药,2009,28(8):637-640.
- [12] 叶海勇,刘健,楼宜嘉.淫羊藿苷衍生物的制备及其雌激素样作用研究[J]. 浙江大学学报:医学版,2005,34(2):131-136.
- [13] 吕祥,吴金峰,易婷娇,等.淫羊藿素抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. 中医药导报,2010,16(6):96-97.
- [14] Soff GA. Angiostatin and angiostatin - related proteins [J]. Cancer Metast Rev,2000,19(1-2):97-107.
- [15] Tombran T ink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells [J]. Exp Eye Res,1989,48(4):549-559.

(2013-11-21 收稿 责任编辑:王明)