

虫草菌丝中3种活性成分对血管新生与内皮细胞功能的影响

孙鑫¹, 刘洪亮¹, 黄恺², 赵志敏², 吕靖^{1*}, 刘成海^{1,2,3*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203

2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203

3. 上海高校中医内科学 E-研究院, 上海 201203

摘要: **目的** 探讨虫草菌丝中的3种活性成分(虫草素、腺苷、麦角甾醇)对血管新生和肝内皮细胞功能的影响。**方法** 采用鸡胚绒毛尿囊膜实验和转基因斑马鱼实验分别观察虫草素、腺苷、麦角甾醇对新生血管面积、功能血管数量及碱性磷酸酶变化的影响;MTT法测定3个化合物对人肝癌SK-HEP-1细胞的细胞毒性;采用血管内皮生长因子(VEGF)诱导SK-HEP-1细胞增殖为模型,以索拉非尼为阳性对照药,MTT法测定3个化合物对细胞增殖的影响,Transwell法观察细胞迁移,Matrigel管腔形成实验观察细胞管腔形成情况,荧光探针法检测胞内一氧化氮(NO)的量和一氧化氮合酶(NOS)活性。**结果** 虫草菌丝中腺苷、麦角甾醇能够显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生、减少转基因斑马鱼功能血管数量,而虫草素能够促进鸡胚绒毛尿囊膜血管新生;与对照组相比,VEGF可诱导SK-HEP-1细胞增殖,促进细胞迁移和管腔形成,并可使其胞内NO水平和NOS活性显著升高;与模型组相比,虫草素、腺苷、麦角甾醇呈剂量依赖性地抑制SK-HEP-1细胞增殖,腺苷、麦角甾醇能抑制SK-HEP-1细胞迁移,3者均可不同程度地抑制SK-HEP-1细胞管腔形成,且剂量依赖性地降低胞内NO水平和NOS活性。**结论** 虫草菌丝中的虫草素、腺苷、麦角甾醇对SK-HEP-1细胞增殖、迁移、管腔形成有不同程度的抑制作用,其中腺苷的作用尤为明显;其机制与抑制胞内NO水平和NOS活性有关。

关键词: 虫草菌丝; 虫草素; 腺苷; 麦角甾醇; 内皮细胞; 血管新生; 肝纤维化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5217-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.025

Effects of three active components in *Cordyceps sinensis* regulating liver endothelial cells functions based on angiogenesis

SUN Xin¹, LIU Hong-liang¹, HUANG Kai², ZHAO Zhi-min², LV Jing¹, LIU Cheng-hai^{1,2,3}

1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China

3. E-institute of TCM Internal Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the effects of three active components in *Cordyceps sinensis* (cordycepin, adenosine, and ergosterol) on angiogenesis and the function of hepatic endothelial cells. **Methods** Chick chorioallantoic membrane was used to record angiogenesis area, and transgenic zebrafish was used to evaluate the changes of intersegmental vascular and alkaline phosphatase. The toxicity of three active components was assayed in SK-HEP-1 cells by MTT. The proliferation of SK-HEP-1 cells was induced by vascular endothelial growth factor (VEGF), with sorafenib as the positive control. Cell proliferation was analyzed by MTT assay. Cell migration and tube formation were observed by Matrigel and Transwell assay, respectively. Fluorescence probe method was used to detect the levels of intracellular nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS). **Results** Adenosine and ergosterol inhibited angiogenesis of chick chorioallantoic membrane, and decreased the number of transgenic zebrafish intersegmental vascular. However, cordycepin can promote angiogenesis of chick chorioallantoic membrane. Compared with the blank control group, VEGF induced SK-HEP-1 cells proliferation, promoted cells migration and tube formation, further significantly increased the levels of NO and NOS in SK-HEP-1. All three active components inhibited the proliferation, tube formation of SK-HEP-1 and decreased the

收稿日期: 2017-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473404, 81603467); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划建设项目(ZY3-CCCX-2-1003)

作者简介: 孙鑫(1990—), 男, 在读博士, 研究方向为中西医结合防治慢性肝病。E-mail: 913637769@qq.com

*通信作者 吕靖 Tel: (021)20256409 E-mail: ljliiver@163.com

刘成海 Tel: (021)20256521 E-mail: chenghailiu@hotmail.com

levels of NO and NOS in a dose-dependent manner. Moreover, adenosine and ergosterol inhibited SK-HEP-1 cells migration significantly. **Conclusion** Three active components, especially adenosine, could inhibit SK-HEP-1 cells proliferation, migration and tube formation in different degrees. And the mechanism is related to the inhibition of intracellular NO levels and NOS activity.

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; cordycepin; adenosine; ergosterol; endothelial cell; angiogenesis; liver fibrosis

血管新生是指在原有血管结构的基础上通过芽生或套叠增生的方式形成新血管的生物学过程。在各种原因引起的肝脏炎症、纤维化甚至肝癌中均可见到血管新生,血管新生已成为肝纤维化过程中的关键病理变化^[1-3],也是造成肝癌细胞增殖、侵袭与转移的重要病理基础^[4-5]。虫草菌丝 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是通过人工生物分离技术发酵得到的冬虫夏草有效菌株,其功能与名贵中药冬虫夏草无异,具有补肺、益肾、强肝、益气、化痰、止血、补精的效果^[6]。实验研究表明,虫草菌丝能够保护肝脏损伤,减轻肝组织炎症和纤维化,纠正脂质代谢紊乱,对慢性肝病的治疗效果显著;本课题组前期研究发现,虫草菌丝对脂多糖/D-氨基半乳糖诱导的急性肝损伤小鼠的肝窦结构起到保护作用,还可以减轻肝窦内皮细胞的损伤^[7-11]。虫草菌丝中含有多糖类、蛋白质及氨基酸类、脂类、核苷类、甘露醇、麦角甾醇类、微量元素等多种化学成分^[12],其中虫草素、腺苷、麦角甾醇这 3 种化学成分可测性强,常作为药品质控的标准指标^[13],并且是虫草菌丝发挥药效的主要活性成分^[14]。本研究通过鸡胚绒毛尿囊膜实验和转基因斑马鱼实验观察虫草素、腺苷、麦角甾醇对血管新生的影响,采用血管内皮生长因子(VEGF)诱导的人肝癌 SK-HEP-1 细胞增殖模型观察各成分对细胞增殖、迁移与管腔形成的影响,并从其对一氧化氮(NO)的量及一氧化氮合酶(NOS)活性影响的角度初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

鸡胚购自上海市农业科学院畜牧兽医研究所种鸡场,动物许可证号 SYXK(沪)2016-0010;斑马鱼购自山东省科学院生物研究所;SK-HEP-1 细胞株(ATCC® Number: HTB-52™,第 2 代)购自中国科学院上海细胞库,为内皮来源的人肝癌细胞株。

1.2 药物与试剂

虫草素(批号 100525)、腺苷(批号 100317)、麦角甾醇(批号 100730)购自上海融禾医药科技发展有限公司,质量分数均 > 98%;索拉非尼(sorafenib)购自 Bayer 公司;MEM 培养液、胎牛

血清(FBS)购自 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶购自 Amresco 公司;重组鼠血管内皮生长因子(VEGF)购自 Prospec 公司;噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;NO 荧光探针、NOS 试剂盒、结晶紫染液购自碧云天生物技术研究;Matrigel 基质胶购自 BD Biosciences 公司;24 孔 Transwell 板购自美国 Corning 公司。

1.3 仪器

HVE-50 高温高压灭菌消毒锅,购自日本 Hirayama 公司;TELSTAR Bio-II-A/M 生物安全柜,购自西班牙泰事达公司;NanoVue 超微量分光光度计,购自美国通用电气医疗集团;PowerWave XS 微孔板分光光度计,购自美国伯腾仪器有限公司;Olympus IX70 倒置显微镜,购自日本奥林巴斯公司;Image-pro plus 6.1 图像分析软件,购自美国 Media Cybernetics 公司;Thermo Scientific Steri- Cycle CO₂ 培养箱、Thermo Scientific Varioskan Flash 全波长扫描多功能读数仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

2 方法

2.1 鸡胚绒毛尿囊膜实验

种蛋大头朝上,无菌培养箱 37.8 °C、湿度 60% 孵育 72 h。在种蛋大头打孔,无菌注射器吸弃蛋清 6 mL。根据预试验结果选取给药浓度,在种蛋中间位置开口,分别注入 100 μmol/L 的虫草素、腺苷、麦角甾醇溶液 100 μL,对照组加等体积生理盐水,阳性对照组加入 100 μmol/L 的索拉非尼 100 μL,每组 6 个种蛋,透明胶带密封中间开口处,继续孵育 24 h,摄片,用 Image-pro plus 6.1 图像分析软件分析血管面积。

2.2 斑马鱼血管新生实验^[15]

转基因斑马鱼(VEGFR: GFP)受精卵发育 24 h,移至 96 孔板中,分别加入虫草素、腺苷、麦角甾醇、索拉非尼溶液 100 μL,根据预试验结果选取各药品浓度为索拉非尼 100 μmol/L、虫草素 100 μmol/L、腺苷 80 μmol/L、麦角甾醇 20 μmol/L、对照组为胚胎培养用水,每组设 5 个复孔,置于 28 °C 光照培养箱内继续发育 24 h,观察并记录节间血管(intersegmental vessel, ISV)的血流数。将斑马鱼

麻醉,对 ISV 进行计数并拍照。4%多聚甲醛固定,甲醇脱水,丙酮透化,碱性磷酸酶(ALP)染色,镜下拍照。

2.3 MTT 法检测 SK-HEP-1 细胞活力

SK-HEP-1 细胞以含 10%胎牛血清,青、链霉素各 100 U/mL 的 MEM 培养基培养,并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,每 2~3 天传代 1 次。

取对数生长期的 SK-HEP-1 细胞,以每孔 8 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组 4~6 个复孔,待长至亚单层,换为含有各药物的培养液 100 μL,其中虫草素终浓度为 50、100、200、400 μmol/L,腺苷终浓度为 12.5、25、50、100 μmol/L,麦角甾醇终浓度为 1、10、100 μmol/L(药物均先以 DMSO 溶解,再以培养液稀释至所需最大浓度,经 1/2 或 1/10 倍比稀释至不同浓度梯度),孵育 24 h 后弃去培养液,每孔加入 0.5 g/L MTT 工作液孵育 4 h,可见蓝紫色结晶,小心吸弃工作液,每孔加入 DMSO 100 μL,至充分溶解,在微孔板扫描分光光度计上于 490 nm 处测定吸光度(A)值,采用公式求得细胞活性(细胞活性=A_{给药}/A_{对照}),实验重复 3 次。

2.4 MTT 法检测各药物对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞增殖的影响

取对数生长期的 SK-HEP-1 细胞,以每孔 8 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组 6 个复孔,待长至亚单层,对照组加入含 0.4%FBS 的培养基,模型组加入 VEGF 20 μg/L,各给药组分别加入含有低、高剂量药物(虫草素 1、10 μmol/L,腺苷 5、25 μmol/L,麦角甾醇 0.1、1.0 μmol/L)及阳性对照索拉非尼(2.5 μmol/L)的培养基,与 VEGF 20 μg/L 共孵育 24 h,按照“2.3”项下的方法测定各孔的 A 值,并采用公式求得细胞增殖抑制率[细胞增殖抑制率=(A_{模型}-A_{给药})/A_{模型}],实验重复 3 次。

2.5 Transwell 小室法检测细胞迁移能力

Transwell 小室下室用 1 mg/L 的纤维黏连蛋白于 37 °C 细胞培养箱内包被过夜,细胞同步化后,胰酶消化,离心,用含 0.4% FBS 的培养液调整细胞密度至 2×10⁵ 个/mL,上室加入 150 μL 细胞和 150 μL 药物培养液,实验分为 6 组,即对照组(含 0.4% FBS 的培养基)、模型组(VEGF 20 μg/L)、阳性对照组(VEGF 20 μg/L+索拉非尼 2.5 μmol/L)及各药物干预组(VEGF 20 μg/L+虫草素 100 μmol/L、VEGF 20 μg/L+腺苷 50 μmol/L、VEGF 20 μg/L+麦角甾醇 1 μmol/L),每组设 3 个复孔。下室

加 600 μL 含 5% FBS 的细胞培养液。37 °C 细胞培养箱内孵育 8 h,弃上下室培养液,4%多聚甲醛固定细胞,PBS 洗涤,结晶紫染色 10 min,PBS 洗涤,Olympus 倒置显微镜下观察并拍照,并对迁移后的细胞个数进行定量分析。

2.6 Matrigel 基质胶法检测细胞管腔形成能力

96 孔板 4 °C 预冷,每孔加入 100 μL Matrigel 基质胶,37 °C 细胞培养箱聚合 1 h 备用,细胞同步化后,胰酶消化,调整细胞浓度至 5×10⁴ 个/mL,与药物培养液按 1:1 混合后,每孔加入 200 μL 混合液铺在 Matrigel 基质胶上,分组同“2.5”项,每组设 4 个复孔,37 °C 细胞培养箱孵育 8 h,Olympus 倒置显微镜下观察并拍照,并统计完整管腔数目。

2.7 荧光探针法检测细胞内 NO 水平及 NOS 活性

SK-HEP-1 细胞以每孔 8 000 个接种于 96 孔板,长至亚单层,弃原培养液,换为各含药培养基 100 μL。实验分组及处理同“2.4”项。每组设 4 个复孔,37 °C 细胞培养箱孵育 24 h,弃药物培养基,每孔原位装载 5 μmol/L 的 DAF-FM DA(NO 探针)100 μL,37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,光谱扫描多功能读数仪上检测,使用 495 nm 激发波长,515 nm 发射波长;药物孵育 24 h 后,加入 100 μL NOS 检测缓冲液,再加入 100 μL 检测反应液,37 °C 细胞培养箱内孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,光谱扫描多功能读数仪上检测。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于符合正态性和方差齐性的计量资料,用单因素方差分析检验,两组间差异比较采用两独立样本的 *t* 检验。

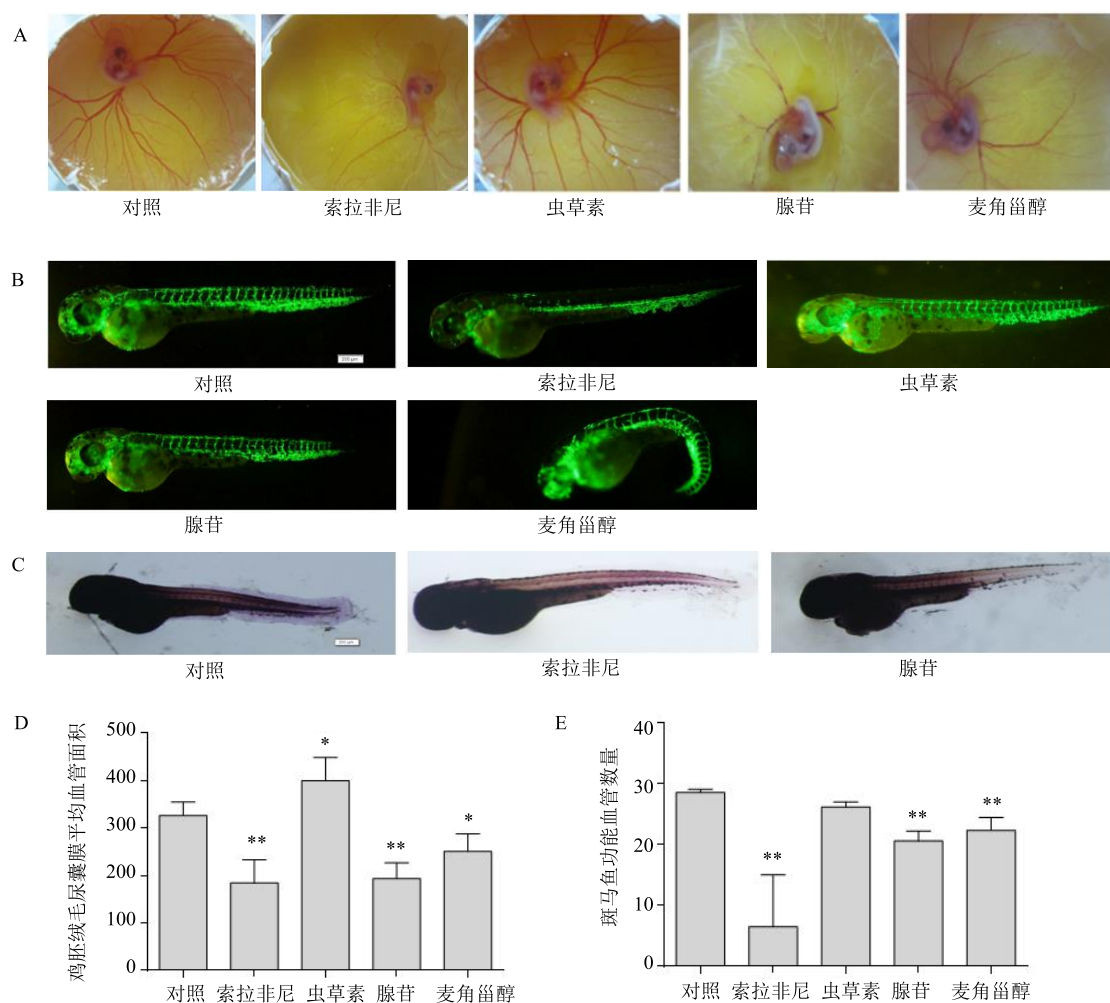
3 结果

3.1 虫草素、腺苷、麦角甾醇对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响

结果显示,与对照组比较,索拉非尼组、腺苷组和麦角甾醇组的鸡胚绒毛尿囊膜平均血管面积明显减少($P<0.05$),而虫草素组鸡胚绒毛尿囊膜平均血管面积明显增加($P<0.05$),结果见图 1-A、D。说明腺苷和麦角甾醇能够显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生。

3.2 虫草素、腺苷、麦角甾醇对转基因斑马鱼血管新生的影响

结果显示,与对照组比较,索拉非尼组、腺苷组、麦角甾醇组斑马鱼胚胎的功能血管数量明显减



A-虫草素、腺苷、麦角甾醇对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响 B-虫草素、腺苷、麦角甾醇对转基因斑马鱼血管新生的影响 (免疫荧光法)
C-腺苷对斑马鱼血管新生的影响 (ALP 法) D-鸡胚绒毛尿囊膜血管面积定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) E-斑马鱼功能血管数量定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$);
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

A-effects of cordycepin, adenosine, ergosterol on angiogenesis of chick chorioallantoic membrane B-effects of cordycepin, adenosine, ergosterol on transgenic zebrafish intersegmental vascular (fluorescence) C-effects of adenosine on transgenic zebrafish intersegmental vascular (ALP)
D-quantification of chick chorioallantoic membrane vascular area ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) E-numbers of functional vessels in transgenic zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$);
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 1 虫草素、腺苷、麦角甾醇对鸡胚绒毛尿囊膜、转基因斑马鱼血管新生的影响

Fig. 1 Effects of cordycepin, adenosine and ergosterol on angiogenesis of chick chorioallantoic membrane and transgenic zebrafish intersegmental vascular

少 ($P < 0.05$), 而麦角甾醇组还出现明显的毒性症状, 如脊柱弯曲、翘尾, 虫草素组斑马鱼未见明显形态变化 (图 1-B、E)。进一步检测内源性 ALP 活性, 结果显示, 与对照组比较, 索拉非尼、腺苷组斑马鱼泄殖腔后端的节间血管明显减少 (图 1-C)。结果表明, 腺苷、麦角甾醇能够显著抑制转基因斑马鱼功能血管的生长。

3.3 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 SK-HEP-1 细胞活力的影响

采用 MTT 法检测不同浓度药物对 SK-HEP-1 细

胞活力的影响, 结果显示, 虫草素 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 、腺苷 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 、麦角甾醇 0~1 $\mu\text{mol/L}$ 对 SK-HEP-1 细胞活力没有明显抑制作用, 认为各药物在此区间范围内对 SK-HEP-1 细胞没有明显的毒性, 故后续实验在此浓度范围内进行药效评价。

3.4 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞增殖、迁移和管腔形成的影响

MTT 法检测细胞增殖结果显示 (表 1), 与对照组相比, 20 $\mu\text{g/L}$ VEGF 组的 A_{490} 值显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 索拉非尼、虫草素、腺苷、

表 1 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of cordycepin, adenosine and ergosterol on the proliferation of SK-HEP-1 cells induced by VEGF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{490}	抑制率/%
对照	—	0.40 ± 0.02	—
模型	—	$0.50 \pm 0.07^*$	0
索拉非尼	2.5	$0.37 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	26
虫草素	1.0	$0.37 \pm 0.02^{\Delta}$	26
	10.0	$0.34 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	32
腺苷	5.0	0.42 ± 0.03	16
	25.0	$0.39 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$	22
麦角甾醇	0.1	$0.35 \pm 0.03^{\Delta\Delta}$	30
	1.0	$0.27 \pm 0.04^{\Delta\Delta}$	46

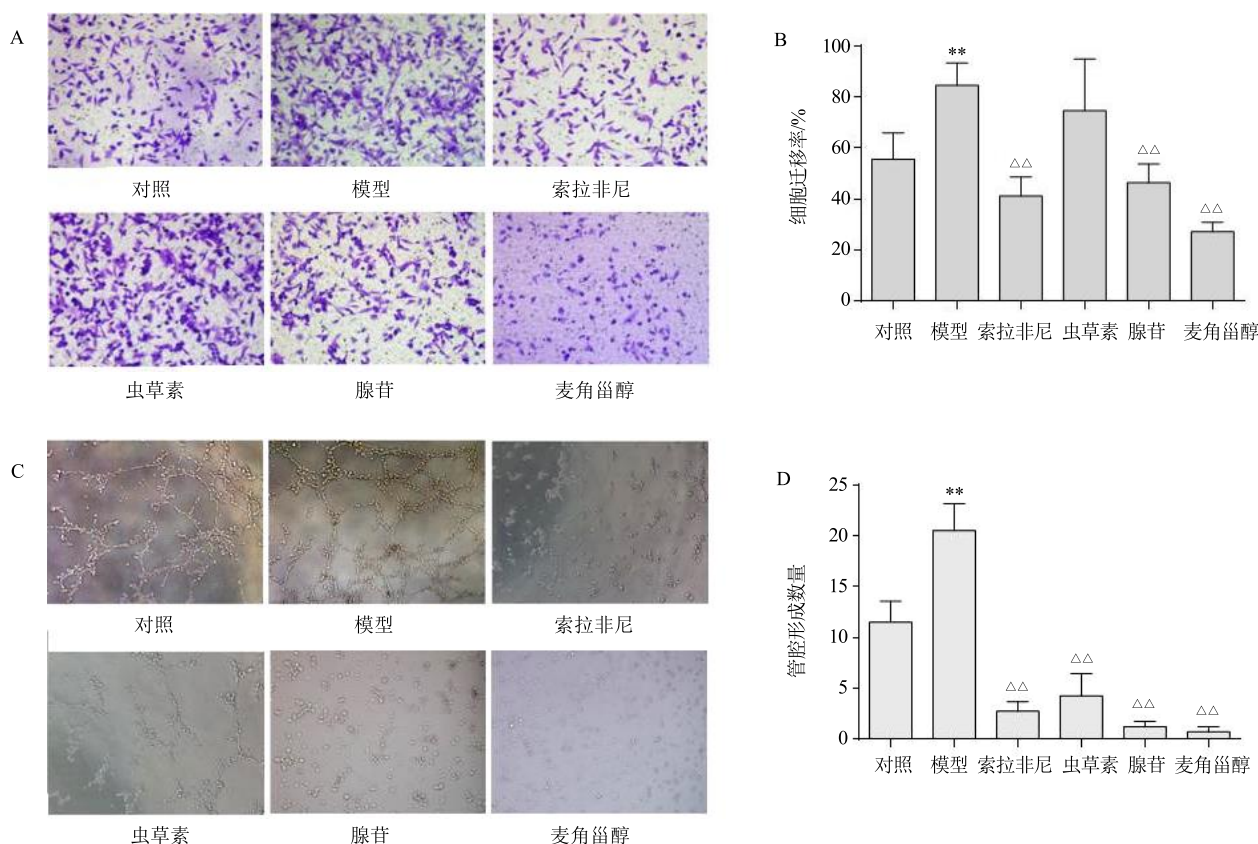
与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs model group

麦角甾醇组的 A_{490} 值均不同程度地下降 ($P < 0.05$), 且呈一定的剂量依赖性。

Transwell 小室法检测细胞迁移能力结果显示 (图 2-A、B), 与对照组比较, VEGF 能够显著促进 SK-HEP-1 细胞迁移 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 索拉非尼、腺苷、麦角甾醇均可不同程度地抑制 SK-HEP-1 细胞迁移 ($P < 0.01$), 虫草素组未见明显抑制作用。

Matrigel 基质胶法检测细胞管腔形成能力结果显示 (图 2-C、D), 与对照组比较, VEGF 能够显著促进 SK-HEP-1 细胞管腔形成 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 索拉非尼、虫草素、腺苷、麦角甾醇均不同程度地抑制 SK-HEP-1 细胞管腔形成 ($P < 0.01$)。上述结果表明, 虫草素、腺苷、麦角甾醇可不同程度地抑制 VEGF 诱导下的 SK-HEP-1 细胞增殖、迁移和管腔形成等细胞生物学功能。



A-Transwell 小室法检测细胞迁移能力 (×20) B-细胞迁移定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) C-Matrigel 基质胶法检测细胞管腔形成能力 (×10)

D-管腔形成数量定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 4$); 与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, 表 2 同

A-cells migration in Transwells (×20) B-rate of cells migration ($\bar{x} \pm s, n = 3$) C-tube formation in Matrigel (×10) D-numbers of tube formation ($\bar{x} \pm s, n = 4$); $^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs model group, same as table 2

图 2 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞迁移、管腔形成的影响

Fig. 2 Effects of cordycepin, adenosine, and ergosterol on migration and tube formation of SK-HEP-1 cells induced by VEGF

3.5 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞内 NO 水平、NOS 活性的影响

采用荧光探针法检测细胞内 NO 水平、NOS 活性, 结果显示 (表 2), 与对照组比较, 模型组 SK-HEP-1 细胞内 NO 水平和 NOS 活性均明显升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 索拉非尼、虫草素、腺苷、麦角甾醇组细胞内 NO 水平和 NOS 活性均显著下降 ($P<0.01$), 且呈一定的剂量依赖性。结果表明, 虫草素、腺苷、麦角甾醇均可剂量依赖性地降低 SK-HEP-1 细胞内 NO 水平和 NOS 活性。

表 2 虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞内 NO 水平、NOS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effects of cordycepin, adenosine and ergosterol on NO and NOS levels of SK-HEP-1 cells induced by VEGF ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NO (荧光强度)	NOS (荧光强度)
对照	—	331.61 $\pm$ 7.69	319.64 $\pm$ 10.00
模型	—	357.45 $\pm$ 8.02**	343.64 $\pm$ 8.07**
索拉非尼	2.5	273.37 $\pm$ 6.57 $\Delta\Delta$	262.08 $\pm$ 4.13 $\Delta\Delta$
虫草素	1.0	273.81 $\pm$ 13.89 $\Delta\Delta$	267.43 $\pm$ 13.42 $\Delta\Delta$
	10.0	265.69 $\pm$ 11.23 $\Delta\Delta$	257.62 $\pm$ 11.55 $\Delta\Delta$
腺苷	5.0	311.56 $\pm$ 5.82 $\Delta\Delta$	302.39 $\pm$ 6.54 $\Delta\Delta$
	25.0	302.74 $\pm$ 12.13 $\Delta\Delta$	294.58 $\pm$ 12.95 $\Delta\Delta$
麦角甾醇	0.1	264.90 $\pm$ 6.27 $\Delta\Delta$	258.74 $\pm$ 3.60 $\Delta\Delta$
	1.0	243.18 $\pm$ 11.50 $\Delta\Delta$	236.62 $\pm$ 10.39 $\Delta\Delta$

4 讨论

血管新生是各种炎症及间质增生性病变中常见的病理表现, 即从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管, 是一个涉及多种细胞、多种分子的复杂过程。肝脏血管新生可分为生理性和病理性 2 类, 生理性血管新生见于肝再生中, 病理性的血管新生常见于各种原因导致的慢性肝病和肝癌过程中^[16-18]。肝组织细胞氧化损伤是肝血管新生的始动环节, 组织缺氧活化低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 使之与缺氧反应元件 (HRE) 结合, 调节下游靶基因, 促进肝脏血管新生^[19]。肝窦毛细血管瘤是肝脏血管新生的主要形式。在病理条件下, 肝窦壁肝窦内皮细胞失窗孔, 内皮下形成连续性基底膜, 即“肝窦毛细血管瘤化”, 假性毛细血管转变成真性毛细血管, 肝内血管出现了套叠增生^[20-21]。这种血管新生阻碍了肝细胞与血液间的正常物质交换, 影响了肝细胞的合成与代谢, 线粒体功能发生障碍, 进一步造成组织缺氧。

本研究采用鸡胚绒毛尿囊膜、斑马鱼血管新生

实验从器官和整体水平评价虫草菌丝体中虫草素、腺苷、麦角甾醇活性。结果显示, 腺苷、麦角甾醇能明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生长, 且对斑马鱼血管新生具有明显抑制作用, 而虫草素能促进血管新生。已有研究报道^[22]以基质胶蚀斑法检测小鼠腹部皮下血管新生情况, 发现虫草素对其具有抑制作用, 本研究采用鸡胚绒毛尿囊膜作为血管新生观察模型, 种属上实有差异, 尚需考虑采用更为可靠的评价模型。另外, 在转基因斑马鱼血管新生实验中, 麦角甾醇对斑马鱼产生明显毒性, 需结合其他模型综合评价, 目前尚缺乏麦角甾醇对血管新生影响的文献报道, 可能为今后研究提供新的方向。

本研究评价了虫草素、腺苷、麦角甾醇对 VEGF 诱导的 SK-HEP-1 细胞迁移、管腔形成的影响, 以及对细胞内 NO 水平、NOS 活性的影响。结果显示, 虫草素、腺苷、麦角甾醇可剂量依赖性地抑制 SK-HEP-1 细胞增殖, 均可不同程度地抑制细胞管腔形成, 且腺苷、麦角甾醇对细胞迁移有明显抑制作用。血管新生过程中, 缺氧往往是血管新生的始动环节, 可促进多种血管生成因子释放。以往研究表明, 组织缺氧损伤, 细胞核内 HIF 活性增加, 调节 VEGF 的表达, 经下游 NO 信号途径, 引起 NOS 活性增加, NO 生成增加, 血管通透性增强^[19,23-24]。本研究在药效活性评价基础上初步探究其作用机制, 结果显示, 虫草素、腺苷、麦角甾醇均可剂量依赖性降低胞内 NO 水平以及 NOS 活性。有研究表明, 腺苷有促进人脐静脉内皮细胞 HUVEC 合成和分泌 VEGF 的作用^[25], 而本研究结果提示腺苷可抑制 SK-HEP-1 细胞增殖和其生物学功能, 降低 NO 及 NOS 活性, 考虑腺苷对血管新生的调节可能受到研究对象 (细胞、模式生物的种类) 和药物浓度的影响。

虫草菌丝是有效的抗肝纤维化中药, 其作用机制主要在于纠正脂质代谢紊乱、抑制星状细胞活化、保护肝窦结构和内皮损伤、调节基质金属蛋白酶的表达、抑制胶原合成与沉积等^[7-11]。本研究结果表明虫草菌丝的 3 种单体化合物虫草素、腺苷、麦角甾醇均具有不同程度的抑制内皮细胞功能以及调节血管新生的效果, 其中以腺苷效果最为显著, 其作用机制尚待深入研究。

参考文献

- [1] Valfrè di Bonzo L, Novo E, Cannito S, et al.

- Angiogenesis and liver fibrogenesis [J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(10): 1323-1341.
- [2] De Leve L D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1740-1746.
- [3] Greuter T, Shah V H. Hepatic sinusoids in liver injury, inflammation, and fibrosis: New pathophysiological insights [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(6): 511-519.
- [4] Wachsmann J, Peng F. Molecular imaging and therapy targeting copper metabolism in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1): 221-231.
- [5] Guo Y, Wang J, Zhang L, *et al.* Theranostical nanosystem-mediated identification of an oncogene and highly effective therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1240-1255.
- [6] 马淑梅, 余伯成, 唐 亮, 等. 虫草素制剂对百草枯致大鼠肺纤维化的作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(5): 753-757.
- [7] 杨朝霞, 代东伶, 沈 薇. 虫草菌丝和还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝大鼠模型治疗效果的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(22): 2176-2178.
- [8] 张新星, 沈 薇. 虫草菌丝对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞凋亡的作用及其相关机制 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2006, 15(5): 478-484.
- [9] Peng Y, Chen Q, Yang T, *et al.* Cultured mycelium *Cordyceps sinensis* protects liver sinusoidal endothelial cells in acute liver injured mice [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(3): 1815-1827.
- [10] 李风华, 刘 平, 王春树. 虫草菌丝逆转二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的有效组分及其作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(9): 164-168.
- [11] 吴建良, 王志勇, 孙丽伟, 等. 虫草菌丝对肝纤维化小鼠肝脏脂质过氧化的影响 [J]. *中国药师*, 2012, 15(3): 381-384.
- [12] 漆 伟, 雷 伟, 严亚波, 等. 冬虫夏草药理学作用的研究进展 [J]. *环球中医药*, 2014, 7(3): 227-232.
- [13] 陈 婷, 刘 群, 莫灼康, 等. HPLC 同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素和麦角甾醇 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 161-163.
- [14] 王林萍, 余 意, 冯成强. 冬虫夏草活性成分及药理作用研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(7): 132-136.
- [15] 黄 恺, 赵志敏, 刘洪亮, 等. 基于肝窦内皮细胞功能评价隐丹参酮抑制血管新生的作用 [J]. *药学报*, 2016, 51(8): 1257-1262.
- [16] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, *et al.* Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2002, 35(5): 1010-1021.
- [17] Medina J, Arroyo A G, Sanchez-Madrid F, *et al.* Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease [J]. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1185-1195.
- [18] Fernandez M, Semela D, Bruix J, *et al.* Angiogenesis in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 604-620.
- [19] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677-684.
- [20] 刘成海. 重视补虚化瘀中药对肝硬化肝脏微血管病变的影响 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2008, 18(6): 321-323.
- [21] Hernandez-Gea V, Friedman S L. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011, 6: 425-456.
- [22] 怡 悦. 虫草素抑制血管新生的作用 [J]. *国际中医中药杂志*, 2006, 28(3): 171.
- [23] Lucarini G, Tirabassi G, Zizzi A, *et al.* Uncoupling of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissue of type 2 diabetic patients [J]. *Inflammation*, 2016, 39(2): 632-642.
- [24] Iyer A K, Ramesh V, Castro C A, *et al.* Nitric oxide mediates bleomycin-induced angiogenesis and pulmonary fibrosis via regulation of VEGF [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2484-2493.
- [25] 王 艳, 郑国庆, 邵建华. 腺苷对脐静脉内皮细胞合成 VEGF 蛋白及表达 VEGF mRNA 的影响 [J]. *温州医学院学报*, 2005, 35(3): 176-179.