

参考文献:

- [1] 韩 澍, 崔亚君, 郭洪祝, 等. 密蒙花化学成分及其活性研究. [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1086-1090.
- [2] 刘长山, 朱禧星. 糖尿病患者红细胞醛糖还原酶活性初步考察 [J]. 中国糖尿病杂志, 1996, 4(4): 198-201.
- [3] 王 琦, 周玲仙, 罗晓东. 植物中醛糖还原酶抑制剂的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 298-303.
- [4] 韩 澍, 崔亚君, 郭洪祝, 等. 中药密蒙花药材 RP-HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(10): 938-940.
- [5] 张均田. 现代药理实验方法学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [6] Rackietan N, Rackietan M L, Nadkarni M R. Studies on diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917) [J]. *Cancer Chem other Reports*, 1993, 29: 91-95.
- [7] 孙子林, 葛祖恺. 糖尿病动物模型及其进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 1999, 7(4): 227-229.
- [8] 于德民, 吴 锐, 尹 淮, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(2): 105-109.
- [9] Hammes H P, Martin S, Federlin K, et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(24): 11555-11558.
- [10] 丁正华, 严 宏, 哈文静, 等. 氨基胍滴眼液防治大鼠糖尿病性白内障的研究 [J]. 眼科新进展, 2006, 26(5): 336-339.

羟基红花黄色素A 对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响

张 岭¹, 宋 艳^{1,2}, 李长龄², 刘 珂³, 朱海波^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 2. 北京大学药学院, 北京 100083; 3. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘 要:目的 探讨羟基红花黄色素A (HSYA) 对常氧/低氧两种条件下体外培养的犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响。方法 采用内膜消化刮取法获取犬胸主动脉内皮细胞, 在常氧(21%)/低氧(10%)两种条件下, 分别以噻唑蓝(MTT)法观察 HSYA 对血管内皮细胞(VEC)增殖的影响, 血管内皮生长因子(VEGF)作为阳性对照。结果 常氧条件下 HSYA 1、0.1 mmol/L 在 72、96、120 h 时对 VEC 有明显促增殖作用; 低氧条件下 HSYA 1、0.1、0.01 mmol/L 在 24、48 h 时对 VEC 有明显促增殖作用, 且具有浓度和时间依赖性。HSYA 1 mmol/L 与 VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 在同样条件下对 VEC 的促增殖作用强度相当。结论 在常氧/低氧两种条件下, HSYA 均具有明显促 VEC 增殖作用, 且在低氧条件更为明显。

关键词: 红花; 羟基红花黄色素A (HSYA); 血管内皮细胞 (VEC); 血管新生; 常氧; 低氧; 血管内皮生长因子 (VEGF)

中图分类号: R 286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0090-04

心脑血管死性疾病的病理特征之一是慢性或持续性组织供血不足, 导致组织代偿性血管再生, 逐渐建立侧枝循环以适应缺血缺氧的需要。但是这种代偿过程缓慢, 而且往往不够充分, 应用外源性物质可刺激缺血组织毛细血管生长及侧枝循环形成的治疗方法称为“药物分子搭桥术”或称“治疗性血管新生”, 目前已成为缺血性心脑血管组织血运重建研究的热点^[1,2]。

羟基红花黄色素A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 是从传统的活血化瘀类中药红花中分离出来的, 具有抗心脑血管缺血损伤和抗凝血^[3]、抗氧化^[4]作用的有效单体成分。前期实验证实: HSYA 可通过增强血管内皮生长因子(VEGF)表达而增加脑组织缺血区半暗带内新生血管数目, 从而明显缩小脑组织的梗死面积^[5]。血管新生是一个多因素参与

多环节相互作用的极其复杂的过程。由于血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 的增殖是新生血管形成的必要条件, 而 VEC 的增殖和分化也一直被认为是血管新生的最重要环节, 是药物治疗心脑血管死性疾病的重要靶区。故此 Gargett 等^[6]认为对 VEC 增殖的检测是研究体外血管新生合适的模型^[6]。

本实验采用体外培养的犬胸主动脉内皮细胞作为模型材料, 观察在常氧/低氧两种条件下, 不同浓度的 HSYA 作用不同时间对 VEC 增殖的影响, 探讨 HSYA 促血管新生作用的细胞生物学基础。

1 材料

1.1 药品与试剂: HSYA (质量分数 99.7%), 山东省天然药物工程技术研究中心提供, 为黄色疏松冻干块状物, 易溶于水, 批号 20000525; 人 VEGF, PE-

* 收稿日期: 2007-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370720; 30572343)

* 通讯作者 朱海波 Tel: (010) 63188106 Fax: (010) 63017757 E-mail: zhuhaibo@mm.ac.cn

PRO-TECH 公司产品,批号 030210;DM EM 细胞培养基和低糖DM EM 细胞培养基,Gibco 公司产品;小牛血清(FBS),杭州四季青公司产品,批号 031208;胰蛋白酶,Sigma 公司产品;第Ⅷ因子鉴定试剂,Kirkegaard & Perry 实验室提供;MTT、二甲基亚砜(DMSO),均为 Amresco 公司产品;Hepes,Roche 产品;青霉素,华北制药集团生产;D-Hanks 液,自制。

1.2 动物:健康雄性杂种犬,15~20 kg,由北京方元缘实验动物养殖场提供。

1.3 仪器:Thermo Forma CO₂培养箱及三气培养箱,美国 Forma 公司;XDS-1B 型倒置显微镜,重庆光学仪器公司;FLC-3 型超净工作台,哈尔滨市东联公司;SPECTRA MAX 190 型酶标仪,Molecular Devices 公司。

2 方法

2.1 VEC 的分离培养:采用内膜消化刮取法获取犬胸主动脉 VEC^[7]。犬处死后,取出胸主动脉,放于 D-Hanks 液中,用眼科剪修剪血管的外膜,去除脂肪组织,用眼科剪纵行剖开动脉,内膜朝下放于含有 0.25% 胰蛋白酶中,37℃ 消化 20 min,轻轻刮取 VEC,收集消化液,离心(1 000 r/min, 5 min),去上清,收集细胞,含 20% FBS DM EM 培养液洗 1 次,再制备细胞悬液,调整细胞数,种植于培养瓶中。24 h 后倾去含细胞碎片和未贴壁细胞的培养液,换入新鲜培养液培养。

2.2 VEC 的传代:VEC 接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂中静置培养,约 2~3 d 换液 1 次,弃去原培养液,每瓶中加入新鲜的含 20% FBS 的 DM EM 培养液进行培养,约 4~7 d,细胞长成致密单层,铺满培养瓶底,进行传代;弃去原培养液,用 D-Hanks 液冲洗 2 遍,每瓶加入 0.25% 胰蛋白酶消化,相差显微镜下观察细胞,约 1~3 min 细胞成圆形,中止消化,加入培养液,吹打培养瓶底,使 VEC 脱落,计数,用含 10% FBS 的 DM EM 培养液制成细胞悬液(细胞数 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ /mL),接种于新的培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂中静置培养。

2.3 VEC 形态学鉴定^[8]:在加有盖玻片的 6 孔板包被明胶后接种胰酶消化的培养犬胸主动脉 VEC (细胞数 1×10^5 /孔),待 VEC 长至近单层时取出 6 孔板内的盖玻片,丙酮-甲醇(1:1)固定 5 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次。加 1:100 稀释的Ⅷ因子单抗,4℃ 下作用 4 h。PBS 洗涤后,加 1:250 FITC-羊抗鼠 IgG,室温下作用 1 h。PBS 洗涤后荧光显微

镜观察。

2.4 常氧条件下 VEC 增殖测定^[9]:取经 4 代细胞经 0.25% 胰酶消化后,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板内,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂、21% O₂(常氧)条件下静置培养。24 h 后更换为含 10% FBS 的不同剂量含药培养液(包括对照组,VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 组,HSYA 1、0.1、0.01 mmol/L 组,每组 6 个复孔。继续于 37℃、5% CO₂、21% O₂(常氧)条件下分别培养 48、72、96、120 h 后,采用 MTT 比色法测定细胞增殖变化。每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ L,继续孵育 4 h 终止培养,吸弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 振荡 10 min,然后在波长 490 nm 处,于酶标仪上测定吸光度值。同时设立空白对照孔,与实验组平行,不加细胞只加培养液。比色时以空白对照孔调零。

2.5 低氧条件下 VEC 增殖测定^[9]:取第 4 代细胞经 0.25% 胰酶消化以后,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板内,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂、21% O₂(常氧)条件下静置培养。24 h 后更换为含 10% FBS 的不同剂量含药培养液(分组同 2.4 项),每组 6 个复孔。继续于 37℃、5% CO₂、10% O₂(低氧)条件下分别培养 12、24、48、72 h 后,采用 MTT 比色法测定细胞增殖变化。

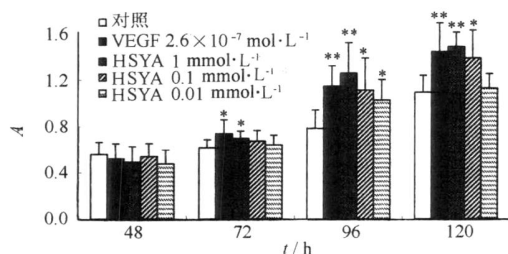
2.6 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析方法(ANOVA)进行组间比较。

3 结果

3.1 VEC 的鉴定:光学显微镜下细胞主要呈小圆形、多角形或长梭形,边界清楚,胞浆丰富,有大且明显的圆形或椭圆形的细胞核,核内染色质稀疏,核仁 1~2 个;细胞呈单层生长,互不重叠,呈铺路石状镶嵌排列。第Ⅷ因子单抗间接免疫荧光染色结果显示所培养的细胞表达较高密度的Ⅷ因子,可见 95% 以上的细胞膜、细胞浆内有棕黄色颗粒分布,尤其是核周边区染色较深,证明所培养的细胞为犬胸主动脉 VEC。

3.2 常氧条件下 HSYA 对 VEC 增殖的影响:由图 1 可见,加药培养 48 h 后,各实验组和对照组犬胸主动脉 VEC 数量(A)值都随时间延长而逐渐增加,细胞形态无明显差别。48 h 时,各实验组与对照组比较,细胞增殖无统计学意义($P > 0.05$);72 h 时,各实验组的细胞数均比对照组高,尤其 HSYA 组、VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 组与对照组比较,差异显著($P < 0.05$);作用 96、120 h 时,各组细胞数量继续增加,HSYA 1、0.1 mmol/L 和 VEGF $2.6 \times$

10^{-7} mol/L 组的细胞数均比对照组明显增加 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, HSYA 1、0.1 mmol/L 对体外培养的犬胸主动脉 VEC 有明显促增殖作用, 且具有浓度依赖性和时间依赖性。HSYA 1 mmol/L 与 VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 在各时间点对 VEC 的促增殖作用强度相当 ($P > 0.05$)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

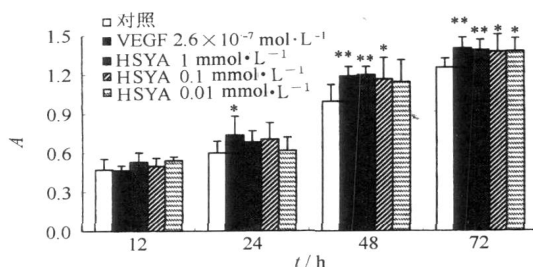
图1 常氧条件下 HSYA 对犬胸主动脉 VEC 增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 1 Effect of HSYA on proliferation of canine aortic endothelial cells in normoxic culture
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.3 低氧条件下 HSYA 对 VEC 增殖的影响: 由图2可见, 低氧条件下, 加药培养 12 h 时, 各组 VEC 均无明显变化, HSYA 组细胞数与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。24 h 后, 实验组和对照组 VEC 数量都随时间延长而逐渐增加, 细胞形态无明显差别。24 h 时, 各给药组的细胞数均比对照组增多, 尤其 VEGF 组与对照组比较, 有明显差异 ($P < 0.05$); 48 h 时, 各组细胞数量继续增加, HSYA 1、0.001 mmol/L 和 VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 各组的细胞数均比对照组明显增加, 差异显著 ($P < 0.01$); 72 h 时, 各组细胞数量继续增加, 但增殖速度渐缓, 这可能是由于细胞数量趋于饱和和引起的, VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 组与对照组比较, 仍有显著性差异 ($P < 0.01$)。结果表明, HSYA 1、0.1、0.01 mmol/L 对低氧体外培养的犬胸主动脉 VEC 有明显促增殖作用, 且具有浓度依赖性和时间依赖性。

4 讨论

血管的发生主要有两种形式, 即血管新生和血管生长。在成熟动物新生血管形成的过程中, 两种机制都起作用, 一般认为作用较大的是血管新生。血管新生是一个复杂的过程, 在某些刺激因素(如缺氧、缺血或炎症等)作用下, 细胞外基质降解及 VEC 增殖、迁移、黏附和连接, 由已有的血管网的内皮细胞分化增殖而形成新的毛细血管^[10]。正因为构成血管



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图2 缺氧条件下 HSYA 对犬胸主动脉 VEC 增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 2 Effect of HSYA on proliferation of canine aortic endothelial cells in hypoxic culture
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

内壁的内皮功能与新生血管的关系密切, 所以 20 年来有关新生血管研究的体外实验多集中在 VEC 的相关研究上, 故 VEC 的增殖和分化也一直被认为是血管新生的最重要环节之一, 也是药物治疗心脑血管缺血性疾病的重要靶区。前期实验结果^[5]表明, HSYA 可明显增加缺血脑组织内的微血管密度(MVD), 且 MVD 与脑梗死区的面积比成负相关, 提示 HSYA 抗脑缺血作用与其促血管新生有关。

由于 VEC 的增殖是新生血管形成的必要条件, 因此 HSYA 促新生血管形成作用机制可能与其促进 VEC 增殖有关。故研究采用体外常氧/低氧 VEC 增殖两种模型, 观察到尽管 HSYA 均能促进 VEC 增殖, 但在作用时间方面有较大的差异。在常氧条件下, 对照组与各给药组之间的 VEC 增值速率相当, 在 96 h 时间点才见明显差异; 但在低氧的条件下, 给药组 VEC 增值速率与对照组出现差异, 比在常氧条件下提前了 48 h, 说明体外低氧低糖这种模拟体内缺血缺氧的人为条件, 的确可以作为一个较好的体外促进 VEC 增殖的刺激因素; 同时本实验结果也可以初步说明, 在正常动物体内观察到 HSYA 促血管新生所需的用药剂量比在缺血缺氧模型动物达到同样效果的实验用药量大得多。但是, 血管新生并不是简单的 VEC 的生长, 它还包括 VEC 的迁移、分化、排列以及周围细胞的生长等一系列复杂过程, 更何况 VEC 的迁移、分化、排列以及周围细胞的生长等一系列复杂过程, 更何况 VEC 的增殖和迁移是同步发生的, 新生血管正是依靠这两个过程来增加发育过程中血管的长度, 增殖的 VEC 随即整合到新血管的中间部分。由于本研究只发现 HSYA 具有促进 VEC 增殖作用, 但尚未进行

有关 HSYA 对新生血管生成过程中其他环节如 VEC 迁移、黏附等方面的作用, 因此对于 HSYA 是如何通过促进 VEC 增殖途径导致新血管生成的具体机制仍不清楚, 需要在今后的实验中进一步阐明。

VEGF 已被证实具有强大促 VEC 增殖作用, 其可由内皮细胞释放, 特异性作用于 VEC, 是当今发现的最强的内源性 VEC 分裂原^[11]。HSYA 在 1×10^{-3} mol/L 浓度下与 VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 在各时间点对 VEC 的促增殖作用强度相当, 表明 HSYA 作为天然化合物, 对 VEC 增殖有着较强的活性, 这可能是其促新血管生成的细胞学基础。从本实验结果可以进一步考虑, 在当今从天然药物中寻找高效低毒的治疗心脑血管死性疾病药物的国际呼声日趋高涨的形势下, 与国外运用的高通量活性筛选方法相比, 以传统的活血化瘀类中药作为切入点, 则不失为寻找开发促血管新生药物的一条捷径。

致谢: 山东省天然药物工程技术研究中心马成俊博士提供 HSYA。

参考文献:

- [1] Gibaldi M. Regulating angiogenesis: a new therapeutic strategy [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, 38: 898-903.
- [2] Hendel R C, Henry T D, Rocha-Singh K, et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for dose-dependent effect [J]. *Circulation*, 2000, 101: 118-121.
- [3] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 羟基红花黄色素A 抗凝作用的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 741-743.
- [4] 金 鸣, 李金荣, 吴 伟. 羟基红花黄色素A 抗氧化作用的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 665-666.
- [5] Zhu H B, Wang Z H, Ma C J, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 429-433.
- [6] Gargett C E, Bucak K, Roger P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 293-301.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] 陈丽华, 金伯泉, 贾 卫, 等. 一种新的人内皮细胞可诱变性粘附分子 PTAL 的表达、调变及粘附功能 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(1): 23-26.
- [9] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996.
- [10] Schumacher B, Pecher P, von Specht B U, et al. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors [J]. *Circulation*, 1998, 97(7): 645-650.
- [11] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 669-676.

鼠尾藻多酚的抗肿瘤活性研究

魏玉西¹, 孙 炯², 王长云³, 王春波^{1*}

(1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学 科研处, 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学医药学院 海洋药物研究所 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘 要: 目的 研究鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 多酚对肺癌 A-549 细胞和肝癌 BEL-7402 细胞体外增殖的抑制作用。方法 采用有机溶剂提取、透析法获得鼠尾藻多酚 STK1 (相对分子质量 $> 1 \times 10^4$) 和 STK2 (相对分子质量 $< 1 \times 10^4$), 采用磺酰罗丹明 B (SRB) 蛋白染色法检测体外细胞增殖抑制率。结果 STK1 在质量浓度为 87.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别为 90.7% 和 89.3%; STK2 在质量浓度为 340 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别为 89.9% 和 90.1%。在相同质量浓度下 STK1 比 STK2 活性强。结论 鼠尾藻多酚化合物 (STK1 和 STK2) 对人肺腺癌 A 549 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞均有较强的抑制作用, 相对分子质量高的 STK1 具有更强的抑制活性。

关键词: 鼠尾藻; 多酚; 肺癌 A-549 细胞; 肝癌 BEL-7402 细胞; 增殖

中图分类号: R 286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)01-0093-03

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* (Mert.) O. Kuntze 是一种广布于我国沿海的一种褐藻, 系统分类上隶属于马尾藻科、马尾藻属。该藻集生于中潮带和低潮带岩石, 或在高、中潮带的水陆或石沼中。研究表明, 鼠尾藻中除富含胶质、甘露醇、碘、钾、锌、铜等有效成分外, 尚含有由间苯三酚作为单体组成的

褐藻多酚类物质, 它们作为次级代谢产物具有许多生物活性, 如抗氧化^[1,2]、抑菌^[3]、拒食等^[4]。因此, 鼠尾藻除在海洋生态系统中占有重要地位外, 在医药、保健、水产养殖及化学工业等行业中也具有许多可开发的潜力^[5,6]。到目前为止, 对鼠尾藻的抗肿瘤活性研究多以多糖成分或粗提物为研究对象, 如鼠尾

* 收稿日期: 2007-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572314); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目 (BS07002)

作者简介: 魏玉西 (1964—), 男, 山东青岛人, 博士, 教授, 研究方向为海藻化学与海洋药物。

Tel: (0532) 85953227 E-mail: yuxiw729@163.com