

• 药理与临床 •

丹参水溶性成分抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性评价

刘洪亮¹, 吕靖¹, 赵志敏², 沈丽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** 探讨丹参水溶性成分对肝窦内皮细胞功能及血管新生的影响。**方法** 采用肝窦状内皮细胞 HHSEC 细胞株, 与不同浓度丹参水溶性成分丹酚酸 A、丹酚酸 C、丹参素钠、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 共孵育 24 h, CCK-8 法评估各成分细胞毒性。采用内皮细胞生长补充因子 (ECGS) 诱导 HHSEC 细胞增殖, 以索拉非尼为阳性对照, EdU 法检测细胞增殖; 荧光探针法检测胞内 NO 水平和 NOS 活力; 免疫荧光法检测 CD31 表达; 转基因斑马鱼实验观察斑马鱼荧光血管数量; 鸡胚绒毛尿囊膜实验检测血管面积。**结果** 与对照组比较, ECGS 能够诱导 HHSEC 细胞增殖, NO 水平和 NOS 活性升高, CD31 表达升高; 与模型组比较, 索拉非尼及丹酚酸 C、丹酚酸 B、丹酚酸 A 能显著抑制 ECGS 诱导的 HHSEC 细胞增殖, 降低细胞 NO 量和 NOS 活性, CD31 表达明显降低。丹酚酸 B、丹酚酸 A、咖啡酸能够显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生; 丹酚酸 C 对转基因斑马鱼功能血管数量具有显著抑制作用。**结论** 丹参水溶性成分丹酚酸 A、B、C 能够抑制肝窦内皮细胞功能, 且具有抑制血管新生的活性。

关键词: 丹参; 水溶性成分; 血管新生; 肝纤维化; 丹酚酸 A; 丹酚酸 C; 丹参素钠; 咖啡酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)06-0938-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.014

Inhibitory effect of water-soluble components from *Salvia miltiorrhiza* on liver sinusoid endothelial cell function and angiogenesisLIU Hong-liang¹, LV Jing¹, ZHAO Zhi-min², SHEN Li¹, 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 effect of water-soluble components from *Salvia miltiorrhiza* on liver sinusoid endothelial cell function and angiogenesis. **Methods** Different dosages of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* were incubated for 24 h with HHSEC cell line, and the toxicity of HHSEC cells was assayed by CCK-8 method. The proliferation of HHSEC cells was induced by endothelial cell growth supplements (ECGS), with receptor tyrosine kinase inhibitor sorafenib as positive control, cell proliferation was analyzed by EdU DNA cell proliferation kit; Fluorescence probe method was used to assay the intracellular NO level and NOS activity; Immunofluorescence method was performed to observe the expression of CD31; The transgenic zebrafishes were incubated for 24 h with each component. The fluorescence vessels, the number of functional blood vessels, and intersegmental vessel changes were observed; Chicken chorioallantoic membranes were incubated for 24 h with each component, Image Analysis Software was used to analyze the vessel area changes. **Results** Compared with control group, the proliferation of HHSEC cells induced by ECGS increased, the level of NO and NOS activity reduced and the expression of CD31 increased; Compared with the model group, salvianolic acid A, salvianolic acid B, salvianolic acid C, and sorafenib inhibited the proliferation of HHSEC cells induced by ECGS, reduced the level of NO, NOS activity, and expression of CD31. The vessel area of chicken chorioallantoic membranes was decreased in sorafenib, salvianolic acid A, salvianolic acid B and caffeic acid. Salvianolic acid C also significantly inhibited the

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 重大科技专项 (2014ZX10005001); 国家自然科学基金资助项目 (81173405, 81473404, 81270053)

作者简介: 刘洪亮, 在读硕士研究生, 研究方向为中医药防治慢性肝病。Tel: 13636698611 E-mail: 286263975@qq.com

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

intersegmental vessel changes of transgenic zebrafish. **Conclusion** Salvianolic acid A, salvianolic acid B, and salvianolic acid C have the potential effects on function of endothelial cell proliferation and angiogenesis.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; water-soluble component; angiogenesis; liver fibrosis; salvianolic acid A; salvianolic acid C; salvianic acid A sodium; caffeic acid; rosmarinic acid; salvianolic acid B

肝纤维化是多种慢性肝病的共同病理过程,以细胞外基质(ECM)成分的过度增生与异常沉积为特征。近年研究发现,肝脏血管新生是肝纤维化的重要病理特点^[1],也是门脉高压发生、发展的病理机制^[2-3],更重要的是,血管新生是肝纤维化难以逆转的重要原因^[4],其中肝窦内皮细胞是肝纤维化血管新生的关键细胞学基础。

丹参始载于《神农本草经》,具有活血散瘀、通经止痛、宁心安神等功效^[5]。现代药理学研究发现,丹参在治疗慢性肝病,尤其是抗肝纤维化方面有很好的疗效^[6]。同时研究也表明丹参对肿瘤及缺血性疾病的血管新生具有干预作用^[7]。丹参成分包括水溶性和脂溶性两大类,其中水溶性成分主要为酚酸类化合物,包括丹参素钠、丹酚酸A、丹酚酸C、迷迭香酸、咖啡酸、丹酚酸B等,研究证实丹参对急慢性肝损伤有治疗作用^[8]。本研究通过观察丹参水溶性成分对人肝窦内皮细胞增殖、转基因斑马鱼及鸡胚血管生成的影响,评价丹参水溶性成分抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性。

1 材料

1.1 药物

丹参素钠、丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C、咖啡酸、迷迭香酸,由上海融禾医药科技发展有限公司分离、提取、鉴定,质量分数>98%;甲苯磺酸索拉非尼片(简称索拉非尼,商品名多吉美),购自Bayer公司,质量分数>98%,批号PY595112。CCK-8检测试剂盒,上海翊圣生物科技有限公司。

1.2 试剂

内皮细胞培养基、胎牛血清(FBS)、内皮细胞生长补充因子(ECGS),购自ScienecellTM公司;二甲基亚砜(DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司;CD31,购自Abcam公司;EdU细胞增殖试剂盒,购自广州锐博生物科技有限公司;NO荧光探针、NOS试剂盒,购自碧云天生物技术研究所。

1.3 实验对象

人来源的肝窦状内皮细胞HHSEC细胞株,上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所长期保存,以含5%FBS的内皮细胞培养液培养,每3天传代1次。斑

马鱼购自山东省科学院,鸡胚购自上海市农业科学院。

1.4 主要仪器

Olympus IX70 倒置显微镜(日本 Olympus); Image-pro Plus 6.1 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司); ArrayScan® VTI 高内涵筛选分析仪(美国 Thermo Scientific); 微孔板扫描分光光度计(美国 Bio-Tek); Thermo Scientific Varioskan Flash 光谱扫描多功能读数仪(美国 Thermo Scientific)。

2 方法

2.1 HHSEC 细胞增殖实验

2.1.1 CCK-8 法确定各成分的无毒浓度 按每孔7 500个HHSEC细胞接种于96孔板,长至亚单层,弃原培养液。6种丹参主要水溶性成分以含5%FBS的内皮细胞培养液稀释成5~160 μmol/L添加至HHSEC细胞,同时设正常培养液作为对照组,设4个复孔,孵育48 h。弃原培养液,添加CCK-8工作液,100 μL/孔,再孵育2 h,于波长450 nm处微孔板扫描分光光度计测定各孔吸光度(A)值。分别与对照组进行比较,以各药物组与对照组A值有显著差异($P<0.05$)的相应浓度为有毒浓度,从而确定各成分无毒浓度。丹酚酸A、丹酚酸C、丹参素钠、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸B浓度分别在12.5、100、25、50、50、12.5 μmol/L以下时对HHSEC细胞活力无显著影响。

2.1.2 CCK-8 法检测各成分对 ECGS 诱导 HHSEC 细胞活力的影响 以每孔7 500个HHSEC细胞接种于96孔板,待细胞长至亚单层,在无毒浓度范围内,分别选择丹酚酸A 10 μmol/L、丹酚酸C 80 μmol/L、丹参素钠 20 μmol/L、咖啡酸 40 μmol/L、丹酚酸B 10 μmol/L、迷迭香酸 40 μmol/L(各成分对细胞无毒浓度的0.8倍)及阳性对照索拉非尼 5 μmol/L与2% ECGS共同孵育48 h诱导细胞增殖,以正常培养基为对照组,单独ECGS作用为模型组。按照“2.1.1”项方法测定各组A值。

2.1.3 EdU 法检测各成分对 ECGS 诱导 HHSEC 细胞增殖的影响 细胞接种及分组给药同“2.1.2”项。细胞经药物处理48 h后,弃原培养液,加入50

$\mu\text{mol/L}$ EdU 溶液孵育 2 h, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.2% 甘氨酸孵育 10 min, PBS 洗 5 min $\times$ 2 次, 0.5% Triton X-100 透化 10 min, PBS 洗 5 min, Appllo[®] 染色反应液避光孵育 30 min, PBS 洗 5 min $\times$ 3 次, Hoechst 避光孵育 10 min, PBS 洗 5 min $\times$ 2 次, ArrayScan[®] VTI 高内涵筛选分析仪检测各组细胞荧光强度。

2.1.4 荧光探针法检测细胞内 NO 和 NOS 水平 (1) NO 水平检测: 细胞接种及分组给药同“2.1.2”项。细胞经药物处理 48 h 后, 弃药物培养液, 原位装载 5 $\mu\text{mol/L}$ DAF-FM DA (NO 探针), 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 20 min, PBS 洗 3 次, Thermo Scientific Varioskan Flash 光谱扫描多功能读数仪上检测各组细胞荧光强度, 使用 495 nm 激发波长, 515 nm 发射波长。(2) NOS 活性检测: 细胞接种及分组给药同“2.1.2”项。细胞经药物处理 48 h 后, 弃原培养液, 加入 100 μL NOS 检测缓冲液, 加入 100 μL 检测反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 2 h, PBS 洗 3 次, Thermo Scientific Varioskan Flash 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。

2.1.5 免疫荧光法检测细胞 CD31 表达 细胞接种及分组给药同“2.1.2”项, 细胞经药物处理 48 h 后, 弃原培养液, 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 次, 2.5% 小牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次, 相应的荧光二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤 3 次, 高内涵分析^[9]。

2.2 鸡胚绒毛尿囊膜实验

种蛋大头朝上, 无菌培养箱孵育 72 h, 温度 37.8 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 60%。眼科剪在种蛋大头打孔, 10 mL 无菌注射器吸取蛋清 4~6 mL, 弃去。在种蛋中间位置开口, 加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的各药物成分(部分药物剂量高于 100 $\mu\text{mol/L}$, 出现鸡胚坏死, 各成分浓度统一确定为 100 $\mu\text{mol/L}$) 100 μL , 对照组加生理盐水, 每组 6 个种蛋, 透明胶带密封开窗处, 继续孵育 24 h, 摄片, Image-pro plus 6.1 图像分析软件分析血管面积。

2.3 斑马鱼血管新生实验

转基因斑马鱼 (VEGFR:GFP) 受精卵发育 24 h, 移至 96 孔板中, 每孔预加入受试样品溶液(多次实验摸索发现 100 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度为斑马鱼可耐受浓度), 每组 5 个复孔, 对照为胚胎培养用水加相应量的助溶剂, 加盖封闭, 置于光照培养箱 (28 $^{\circ}\text{C}$) 内继续发育 24 h, 于倒置显微镜下观察, 记录节间血管 (ISV) 的血流情况。麻醉, 荧光显

微镜下对体节间血管进行计数并拍照。

2.4 统计学处理

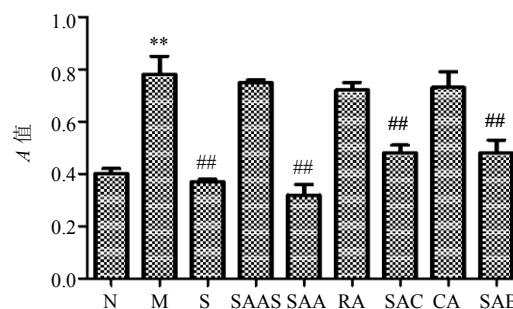
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据均使用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 组间比较使用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 ECGS 诱导的 HHSEC 细胞活力及增殖的影响

CCK-8 法检测结果 (图 1) 显示, 丹酚酸 A (10 $\mu\text{mol/L}$)、丹酚酸 C (80 $\mu\text{mol/L}$)、丹酚酸 B (10 $\mu\text{mol/L}$) 均能显著抑制 ECGS 刺激的 HHSEC 细胞活力; 丹参素钠 (20 $\mu\text{mol/L}$)、咖啡酸 (40 $\mu\text{mol/L}$)、迷迭香酸 (40 $\mu\text{mol/L}$) 无明显抑制作用。

EdU 法检测细胞增殖显示, 与对照组相比, 模型组 ECGS 诱导的 HHSEC 细胞增殖明显; 与模型组相比, 索拉非尼、丹酚酸 A、丹酚酸 C、丹酚酸 B 可以明显抑制 ECGS 诱导的细胞增殖 (图 2)。



N-对照 M-模型 S-索拉非尼 SAAS-丹参素钠 SAA-丹酚酸 A RA-迷迭香酸 SAC-丹酚酸 C CA-咖啡酸 SAB-丹酚酸 B, 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

N-control M-model S-sorafenib SAAS-salvianic acid A sodium SAA-salvianic acid A RA-rosmarinic acid SAC-salvianic acid C CA-caffeic acid SAB-salvianic acid B, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 丹参水溶性成分对 ECGS 诱导的 HHSEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on HHSEC cells activity induced by ECGS ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 对 HHSEC 细胞内 NO 水平和 NOS 活性的影响

与对照组相比, ECGS 诱导的 HHSEC 细胞 NO 水平和 NOS 活性明显升高; 与模型组相比, 索拉非尼、丹酚酸 C、丹酚酸 B、丹酚酸 A 可显著降低细胞 NO 量及 NOS 活性, 其余组无显著变化 (图 3)。

3.3 对 HHSEC 细胞 CD31 表达的影响

与对照组相比, ECGS 诱导的 HHSEC 细胞 CD31 表达明显升高; 与模型组相比, 索拉非尼、丹酚酸 A、丹酚酸 C、丹酚酸 B 组细胞内 CD31 表达显著降低, 其余各药物组对 CD31 无明显影响 (图 4)。

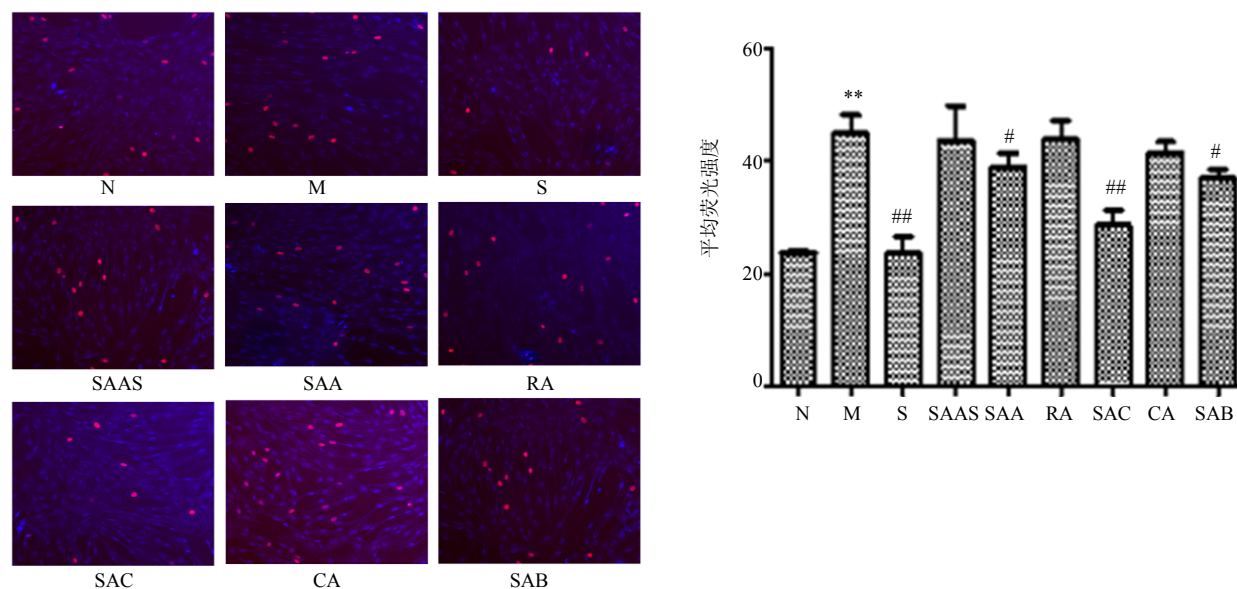


图 2 丹参水溶性成分对 ECGS 诱导的 HHSEC 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on HHSEC cells proliferation induced by ECGS ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

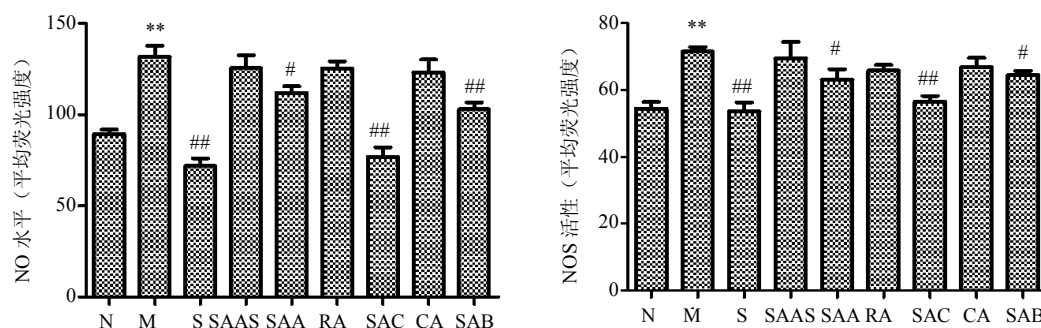


图 3 丹参水溶性成分对 HHSEC 细胞内 NO 水平和 NOS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on intracellular NO level and NOS activity of HHSEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

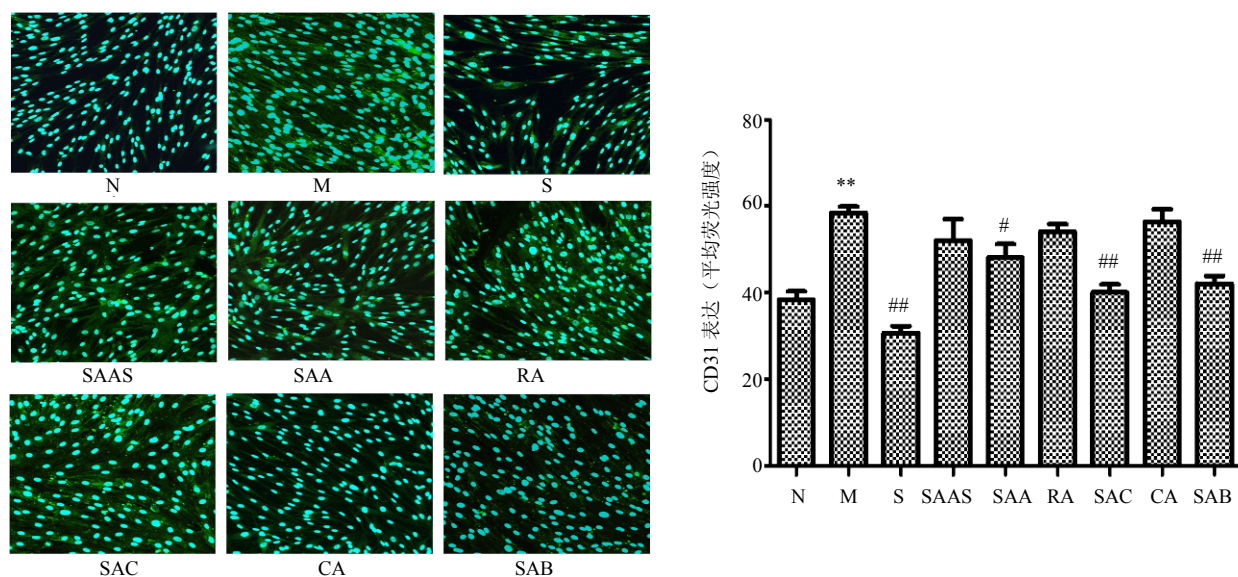


图 4 丹参水溶性成分对 HHSEC 细胞 CD31 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on CD31 expression in HHSEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响

实验结果显示,与对照组相比,索拉非尼、丹酚酸 B、丹酚酸 A、咖啡酸可显著抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生,其余各药物无明显作用(图 5)。

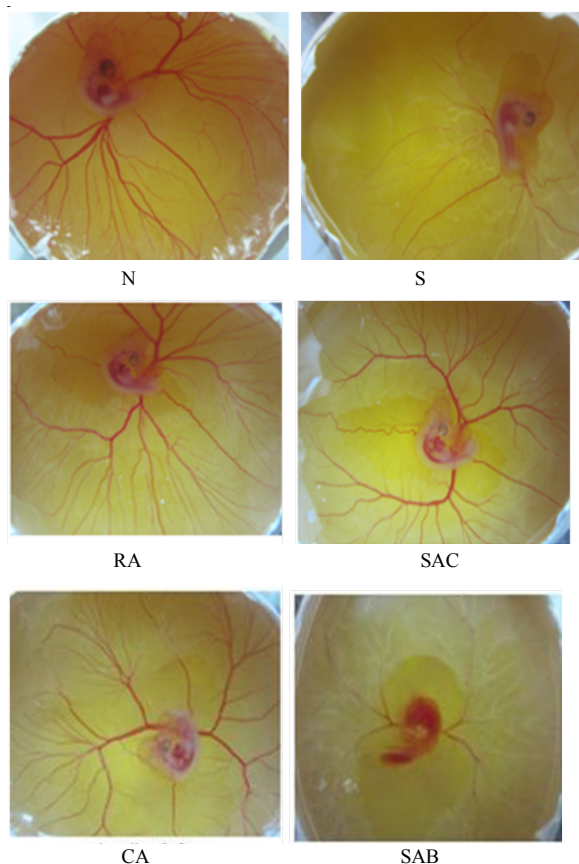


图 5 丹参水溶性成分对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on angiogenesis in chick chorioallantoic membranes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 对斑马鱼血管新生的影响

实验结果显示,与对照组相比,索拉非尼和丹酚酸 C 对斑马鱼功能血管具有明显的抑制作用,其余组无明显抑制作用(图 6)。

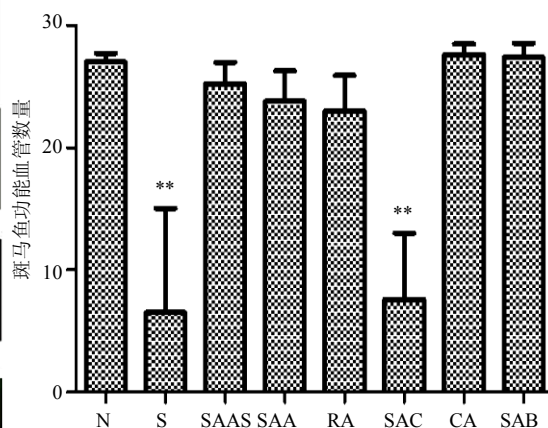
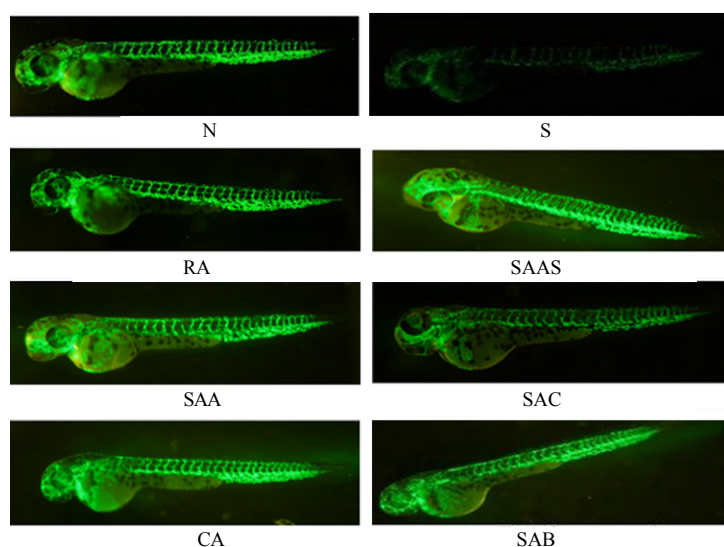
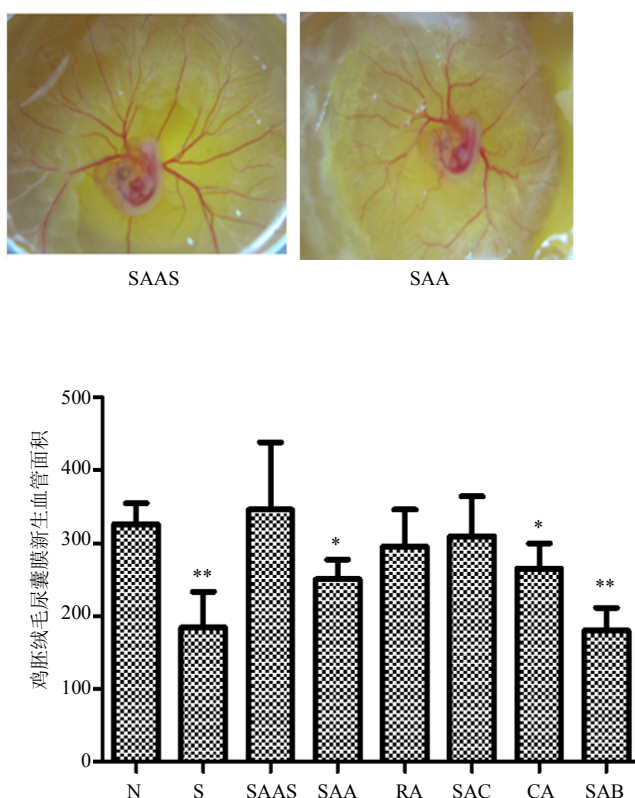


图 6 丹参水溶性成分对斑马鱼血管新生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effects of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* on angiogenesis of transgenic zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

近年来,随着肝纤维化、肝硬化研究的不断深入,相关认识也发生很大变化。肝纤维化不仅存在严重程度、病理特点、分子病理机制的差异,而且存在静止性与活动性的区别。与静止性肝纤维化相比,活动性肝纤维化纤维间隔内有大量血管增生与炎性细胞浸润,这种血管新生特征明显的肝纤维化进展迅速,且难以逆转,即使纤维胶原成分被降解吸收,肝小叶结构亦难以恢复到正常状态,其危害更为严重^[1,10]。

肝脏血管结构由肝窦内皮细胞(LSECs)和周细胞组成。LSECs构成血管腔,是血管或肝窦的基础。在炎性损伤等病理情况下,LSECs可发生“去分化”表型改变:失窗孔、CD31表达增加,回到原始幼稚状态;胞内NO水平可影响细胞表型发生改变^[11-13],促进血管新生的发生与发展。研究结果显示,丹酚酸A、丹酚酸C、丹酚酸B能够抑制细胞增殖;降低胞内NO水平以及NOS活性;下调HHSEC细胞CD31表达。

鸡胚绒毛尿囊膜是高度血管化了的、附着于蛋壳内面、薄而透明的膜结构,无需特别准备便能观察到其微血管结构变化,是公认的测试促进或抑制血管新生药物的试验器官^[14]。斑马鱼血管以其直观性强、易于获得、重复性好且基因组与人类基因组具有高度同源性^[15],逐渐被用作筛选血管活性药物的模型。故本研究采用这两个模型,从器官和整体水平评价药物抑制血管新生的活性。结果提示,丹酚酸A、咖啡酸、丹酚酸B对鸡胚绒毛尿囊膜血管具有抑制作用;丹酚酸C能够显著抑制斑马鱼功能血管数量。

本研究采用肝窦内皮细胞增殖模型、鸡胚绒毛尿囊膜实验及转基因斑马鱼模型,从细胞、器官、整体层次评价丹参水溶性成分抑制血管新生的活性,综合不同层次实验结果,初步发现丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C具有调节内皮细胞功能、抑制血管新生的良好效果,其作用机制仍有待于后期结合体内实验进一步研究

参考文献

[1] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, *et al.* Angiogenesis in chronic liver disease and its complications [J]. *Liver Int*,

2011, 31(2): 146-162.

- [2] Fernandez M, Semela D, Bruix J, *et al.* Angiogenesis in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 604-620.
- [3] Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, *et al.* Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease [J]. *Gut*, 2013, 62(9): 1234-1241.
- [4] Hu D D, Habib S, Li X M, *et al.* Angiogenesis: a new surrogate histopathological marker is capable of differentiating between mild and significant portal hypertension [J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(2): 205-212.
- [5] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, doi:10.1038/nature04478.
- [6] 陶艳艳, 刘成海. 丹参及其化学成分抗肝纤维化作用机制研究进展 [J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(2): 145-148.
- [7] 王爱云, 陶丽, 陆茵, 等. 丹参干预肿瘤和缺血性疾病血管生成研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1399-1404.
- [8] Tsai M K, Lin Y L, Huang Y T. Differential inhibitory effects of salvianolic acids on activation of rat hepatic stellate cells by platelet-derived growth factor [J]. *Planta Med*, 2011, 77(13): 1495-1503.
- [9] 闫秀川, 刘成海. 可用于中医药系统研究的药物高内涵筛选分析 [J]. *中草药*, 2008, 39(8): 1121-1124.
- [10] Hu D D, Habib S, Li X M, *et al.* Angiogenesis: a new surrogate histopathological marker is capable of differentiating between mild and significant portal hypertension [J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(2): 205-212.
- [11] Zhang Z, Zhang F, Lu Y, *et al.* Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis [J]. *Hepatol Res*, 2015, 45(2): 162-178.
- [12] Iwakiri Y, Grisham M, Shah V. Vascular biology and pathobiology of the liver: Report of a single-topic symposium [J]. *Hepatology*, 2008, 47(5): 1754-1763.
- [13] De Leve L D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. [J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1740-1746.
- [14] Medina J, Arroyo A G, Sanchez-Madrid F, *et al.* Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease [J]. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1185-1195.
- [15] Ribatti D, Nico B, Vacca A, *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo* [J]. *Anat Rec*, 2001, 264(4): 317-324.