基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0571-04

羟基红花黄色素 A 对人主动脉内皮细胞增殖及血小板反应蛋白表达的影响

涂利宽,罗文军,王银光,张 琴
(重庆医科大学附属第二医院血管外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨羟基红花黄色素 A(Hydroxysafflor yellow A,HSYA)对人主动脉内皮细胞(Human aortic endothelial cells,HAEC)血小板反应蛋白 1(Trombospondin-1,TSP-1)表达的影响,以进一步研究 HSYA 抑制内皮细胞增殖及抗肿瘤的作用机制。方法:采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察 HSYA 对 HAEC 增殖作用的影响。Real Time PCR 法及免疫细胞化学法分别检测 HSYA 作用后,HAEC 内 TSP-1 的 mRNA 及蛋白表达;ELISA 法检测上清液中 TSP-1 含量。结果:HSYA 对 HAEC 增殖作用的影响表现出浓度依赖性,较高浓度(>0.065 7 g/L)对 HAEC 的增殖有抑制作用,较低浓度(<0.065 7 g/L)表现出促进作用。HSYA 对 TSP-1mRNA 表达有促进作用,且这种作用随浓度增加而增强;TSP-1 的蛋白表达与释放情况与 RT-PCR 结果相似。结论:HSYA 能促进 HAEC 表达 TSP-1;HSYA 对内皮细胞的增殖表现出促进和抑制的双向作用,可能是 TSP-1 和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)等多种因素共同作用的结果。而 HSYA 的抗肿瘤作用可能是通过较高浓度 HSYA 提高 TSP-1 的表达抑制内皮细胞增殖进而抑制血管形成来实现的。

【关键词】羟基红花黄色素 A;血小板反应蛋白 1;血管生成抑制剂;抗肿瘤作用;血管内皮细胞
【中国图书分类法分类号】R654.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-17

Influence of hydroxysafflor yellow A on the proliferation and expression of thrombospondin-1 in human aortic endothelial cells

TU Li-kuan, et al
(*Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of Hydroxysafflor yellow A (HSYA) on the expression of thrombospondin-1(TSP-1) in human aortic endothelial cells for a further study of the mechanism of hydroxysafflor yellow A inhibiting endothelial cells' proliferation and preventing the growth of tumor. *Methods*: We use the method of MTT to observe the proliferation of HAEC with the influence of HSYA. Real Time PCR and immunocytochemistry were used to detect the level of mRNA and protein of TSP-1 after HSYA's effect.TSP-1 in the culture medium is assayed in the way of ELISA.*Results*: HSYA's effect on proliferation of HAEC showed a concentration-dependence, for higher concentration (>0.065 7 g/L) causing inhibition of the proliferation of HAEC while a lower concentration(<0.065 7

作者介绍:涂利宽(1982-),男,硕士,
研究方向:周围血管疾病的微创疗法。
通讯作者:罗文军,男,教授,E-mail:Luowenjun516@yahoo.com.cn。

chromosomal localization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(6): 2542-2546.

[6] Hranilovic D, Stefulj J, Furac I, et al. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims[J]. Biol Psychiatry, 2003, 54(9): 884-889.

[7] De Luca V, Tharmalingam SKN, Strauss J, et al. Association study of a novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene in bipolar disorder and suicidal behaviour[J]. Psychopharmacology, 2005, 182: 128-131.

[8] Shen Y, Li H, Gu N, et al. Relationship between suicidal behavior of psychotic inpatients and serotonin transporter gene in Han Chinese[J]. Neurosci Lett, 2004, 372(1-2): 94-98.

[9] Yen F C, Hong C J. Hou S J, et al. Association study of serotonin transporter gene VNTR polymorphism and mood disorders: on set age and suicide attempts in a Chinese sample[J]. Neuropsychobiology, 2003, 48(1): 5-9.

[10] Courtet P, Baud P, Abbar M, et al. Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter gene[J]. Mol Psychiatry, 2001, 6(3): 338-341.

[11] Joiner T E. Association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of attempted and completed suicide[J]. Suicide Life Threat Behav, 2002, 32(3): 329.

[12] Chong S A, Lee W L, Tan C H, et al. Attempted suicide and polymorphism of the serotonin transporter gene in Chinese patients with schizophrenia[J]. Psychiatry Res, 2000, 97(2-3): 101-106.

[13] Brown J S. The serotonin transporter gene's association with mental disorders: a meta analysis[J]. Mol Psychiatry, 2003, 4: 125.

[14] The serotonin transporter gene: polymorphism and haplotype analysis in russian suicide attempters[J]. Neuropsychobiology, 2006, 54(1): 70-74.

(责任编辑:关蕴良)

g/L)arosing catalyst performance.HSYA promotes the expression of mRNA of TSP-1,and the effect is enhanced as the concentration increases.; The expression of TSP-1 is similar to the result of our RT-PCR . *Conclusion*: HSYA promotes the expression of TSP-1. The HSYA shows a two-way effect on the proliferation of endothelial cells,and regulating the expression of TSP-1and VEGF may be the main way to achieve it.The anti-tumor effect of HSYA may be through a way of promoting the expression of TSP-1 to inhibit the proliferation of endothelial cells and prevent angiogenesis.

【Key words】Hydroxysafflor yellow A;Thrombospondin-1; Angiogenesis inhibitor;Anti-tumor effects;Vascular endothelial cells

现代研究表明,肿瘤的生长需要血管为之提供营养和排除代谢产物。因此,如何阻断肿瘤血管生成已成为世界上治疗肿瘤的新热点。有文献报告一定浓度的羟基红花黄色素 A(Hydroxysafflor yellow A,HSYA)有抑制内皮细胞增殖的作用[1]。血小板反应蛋白 1(Trombospondin-1,TSP-1)和血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是调节血管生成的两个重要的因子,VEGF 可诱导内皮细胞增殖和抑制细胞凋亡,促进体内血管生成,是血管形成过程中起核心作用的因子。TSP-1 诱导内皮细胞凋亡,抑制新生血管生成,在抗肿瘤血管生成作用近年研究较为广泛 ,被认为是抑制血管生成最重要的一种蛋白。有文献报道低氧条件下 HSYA 能上调内皮细胞的 VEGF 释放[2],而其抑制内皮细胞增殖作用是否与 STP-1 的表达有关目前国内外尚没有相关研究报道。本文旨在研究 HSYA 作用于内皮细胞后对其 TSP-1 表达的影响,以进一步探讨其抑制内皮细胞增殖及抗肿瘤作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人主动脉内皮细胞(Human aortic endothelial cells,HAEC)购自北京裕恒丰科技有限公司;HSYA 购自天津市红花色素研究所; MTT 试剂购自 sigma 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程有限公司;引物购自上海生工公司;鼠抗人 TSP-1,CD3 单克隆抗体(工作液浓度 2 μg/ml),免疫组化染色(SP 法)试剂盒,抗原修复采用枸橼酸缓冲液均购自于福州迈新公司;DAB 显色试剂盒购自北京中山公司;ELISA 试剂盒购自华美生物公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 HAEC 培养 常规复苏冻存的 HAEC 细胞,于含 10% 小牛血清的 1640.培养液中,在 37 ℃,50 ml/L CO_2 饱和湿度培养箱中常规培养(后同),每 2 d 换液 1 次,光镜下观察细胞形态。

1.2.2 MTT 比色法测定细胞增殖 实验分组①空白组 只加 1640 细胞培养基。②对照组 每孔 5×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,加入培养基。③HSYA 处理组 每孔加入 5×10^4 个细胞和 200 μl 培养基培养 12 h 贴壁后吸出培养基,再分别加入含终浓度为 0.591 3 g/L,0.197 1 g/L,0.065 7 g/L,0.021 9 g/L,0.007 3 g/L, 0.002 4 g/L HSYA 的培养基,每组复孔数为 5 孔。孵育 48 h 终止培养[1],每孔加入 MTT (5 mg/ml)20 μl/孔,继续 孵育 4 h 终止培养,小心吸上清液,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min,在酶标仪上测 490 nm 处的 OD 值。

1.2.3 RT-PCR 检测不同浓度 HSYA 对 HAEC 表达 TSP-1mRNA 的影响 根据 MTT 结果选取 0.591 3 g/L,0.065 7 g/L,0.007 3 g/L 的 HSYA 终浓度,作用于以 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板的内皮细胞,并设立空白对照组,培养 48 h 后分别用 tripure 按说明书提取各孔细胞总 RNA, 并按 RT-PCR 试剂盒说明进行逆转录。反应条件为 30℃ 10 min,42℃ 30 min,99℃ 5 min ,5℃ 5 min,4℃ 0 s 取出后 -20 ℃保存。TSP-1(186 bp)引物上游 5'-ttgtctttggaaccacacca-3'下游 5'-ctggacagctcatcacagga-3'。在 94℃ 2 min 后 94℃ 15 s,58℃ 15 s,72℃ 20 s 进行 30 个循环,然后 72℃ 5 min,并在 4℃ 保温的条件下扩增 TSP-1 基因序列。内参引物 GAPDH(238 bp)上游 5'- gagtcaacggatttggtcgt-3'下游 5'- ttgattttggagggatctcg -3'。在 94℃ 2 min 后 94℃ 15 s,57℃ 15 s,72℃ 20 s 进行 30 个循环,然后 72℃ 5 min,并在 4 ℃保温的条件下扩增内参序列。琼脂糖凝胶电泳成像后,以 quantity one 分析图片,测出各条带的 OD,并以 OD_{TSP-1}/OD_{GAPDH} 表示 TSP-1 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 ELISA 法检测上清液中 TSP-1 的水平 根据 MTT 结果选取 0.591 3 g/L,0.065 7 g/L,0.007 3 g/L 的浓度 HSYA 作用于以 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板的内皮细胞,并设立空白对照组,每个浓度组 4 孔。培养 48 h 后, ELISA 法检测上清液中 TSP-1 的水平。具体步骤按说明书进行。

1.2.5 免疫细胞化学检测不同浓度 HSYA 对 HAEC 表达 TSP-1 的影响 在 6 孔板中每孔置入 18 mm×18 mm 盖玻片,每孔接种 1×10^5 个细胞,以 0.591 3 g/L,0.065 7 g/L,0.007 3 g/L 终浓度的 HSYA 作用于内皮细胞,并设立空白对照组。培养 48 h 后取出各盖玻片, 按照免疫组化 SP 试剂盒说明进行染色操作。用 PBS 代替一抗做阴性对照。胞浆染成棕黄色为 TSP-1 阳性细胞,显微镜下观察。数据分析使用 IPP 图像分析系统,随机选取 10 个高倍视野,测阳性细胞的平均光密度(AOD),比较各组平均光密度值。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件对数据资料进行统计分析。所有数据根据具体资料采用 F 检验,两两比较采用 tukey's 检验,以 P 值<0.05 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 MTT 检测结果

图 1 提示 0.065 7 g/L 的 HSYA 对内皮细胞的增殖无明显促进或抑制作用,与空白对照组比较无显著差异性(P<0.05)。

较低浓度(约 <0.065 7 g/L)HSYA 对内皮细胞的增殖有促进作用,0.007 3 g/L 的浓度 HSYA 促进作用最强(P<0.05)。较高浓度(>0.065 7 g/L)HSYA 对内皮细胞的增殖有显著抑制作用(P<0.01),与张前等[1]的结果相反,可能与选取的内皮不同有关。故我们选取 0.591 3 g/L,0.065 7 g/L,0.007 3 g/L 3 个浓度进行下一步实验。

2.2 RT-PCR 检测结果

照片中可见 186 bp 处 TSP-1 mRNA 扩增带,A 组正常内皮细胞 TSP-1 mRNA 表达呈阳性。B 组相对表达量较 A 组增强,但没有显著差异性(P<0.05)。C 组较 A,B 两组有显著差异性(P<0.05),D 组相对表达量较其他组增强,但与 C 组比较无显著差异性(P<0.05)。可见 HSYA 能促进 TSP-1mRNA 表达,且随浓度增强促进作用增强。

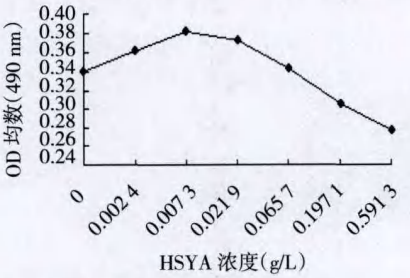
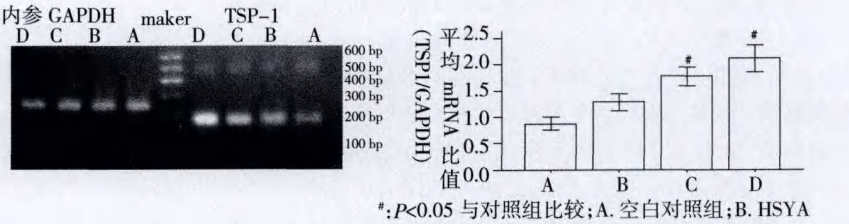


图 1 不同浓度 HSYA 作用 48 h 后对 HAEC 增殖的影响



#:P<0.05 与对照组比较;A. 空白对照组;B. HSYA 0.007 3 g/L;C. HSYA 0.065 7 g/L;D. HSYA 0.561 3 g/L

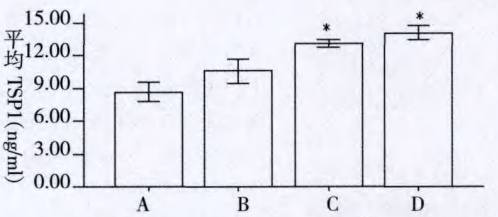
图 2 不同浓度 HSYA 作用 48 h 后对 HAEC 表达 TSP-1 mRNA 的影响

2.3 ELISA 法检测结果

ELISA 法检测示 B 组上清液中 TSP-1 含量较 A 组升高,但无统计学意义;C,D 两组分别与 A 组比较上清液中 TSP-1 含量有显著差异性(P<0.05)。TSP-1 含量随 HSYA 浓度增加而增加提示 HSYA 能促进 TSP-1 的释放(见图 3)。

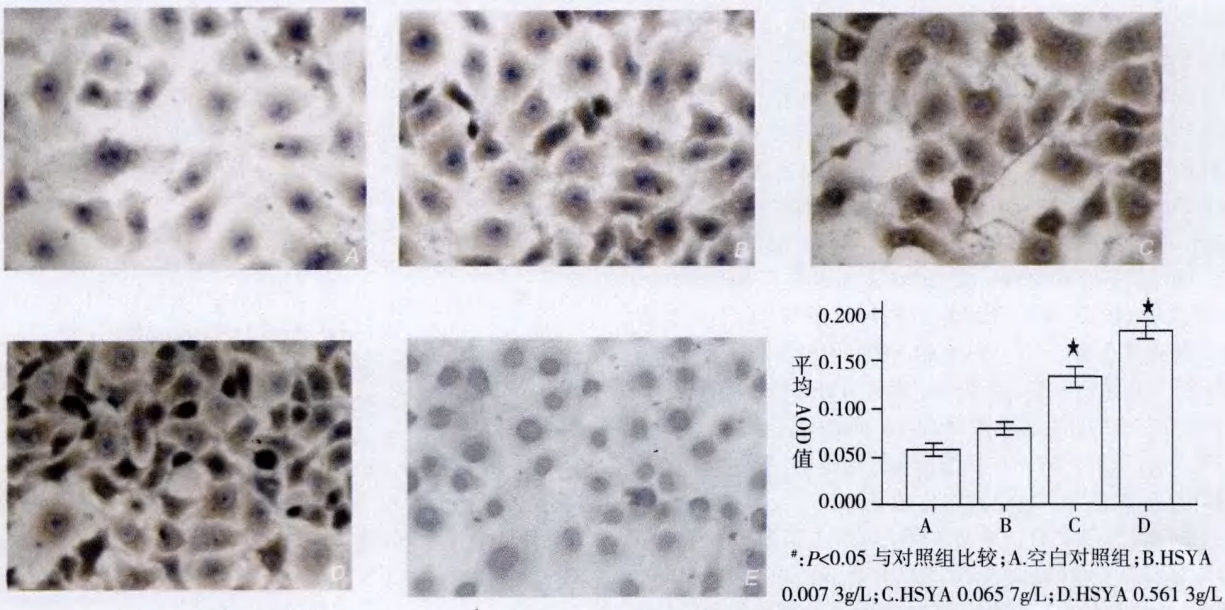
2.4 免疫细胞化学结果

图 4 中 A 为未加 HSYA 的空白对照组,B、C、D 是分别以 0.007 3 g/L,0.065 7 g/L,0.591 3 g/L 终浓度的 HSYA 作用于内皮细胞,培养 48 h 后 TSP-1 免疫组化图片。E 为 PBS 代替一抗阴性对照图片。可见 A 组胞浆内少量黄色颗粒,呈弱阳性。B 组 TSP-1 为胞浆内少量黄色颗粒,呈弱阳性。C 组见胞浆内较多黄色颗粒,呈阳性。D 组胞浆内见大量棕黄色颗粒,呈强阳性。E 组细胞显示胞浆为淡紫蓝色,无棕黄色颗粒,呈阴性。



#:P<0.05 与对照组比较;A.空白对照组;B.HSYA 0.007 3g/L;C.HSYA 0.065 7g/L;D.HSYA 0.561 3g/L

图 3 不同浓度 HSYA 作用 48 h 后对 HAEC 释放 TSP-1 的影响



#:P<0.05 与对照组比较;A.空白对照组;B.HSYA 0.007 3g/L;C.HSYA 0.065 7g/L;D.HSYA 0.561 3g/L

图 4 不同浓度 HSYA 作用 48 h 后对 HAEC 表达 TSP-1 的影响。(DAB 显色,苏木精复染,×400)

由图 4 可见 A、B、C、D 4 组 TSP-1 表达逐渐增强,但 A、B 两组之间比较无统计学意义,C、D 两组分别与 A 组比较 TSP-1 表达有显著差异($P<0.05$),同时 C、D 两组之间比较亦有显著差异性($P<0.05$),可见 HSYA 对内皮细胞表达 TSP-1 的影响具浓度依赖性,浓度越高其促进作用越强。

3 讨 论

TSP-1 是一种 450 ku 的同源 3 倍体细胞外糖蛋白,最初发现由血小板 α 一颗粒释放,现已发现包括血管内皮细胞的多种细胞可分泌 TSP-1,TSP-1 存在于血浆、激活的血小板上、内皮细胞浆中、基底膜和血管壁中,可与一系列因子相互作用,包括基质中的一些成分、细胞表面特异性受体等。据相关文献报道,TSP-1 对血小板的聚集、血栓的形成、动脉粥样硬化的病理过程有促进作用[3,4],而对内皮细胞的增殖有抑制作用[5]。其中 TSP-1 的 Type Ⅰ重复序列(Thrombospondin type Ⅰ repeats,TSRs)被认为是 TSP-1 抑制内皮细胞增殖、诱导内皮细胞凋亡和抑制血管新生等作用的重要结构基础,内皮细胞表面的 CD36 为介导 TSP-1 诱导内皮凋亡的关键受体[6],同时 TSP-1 应答 bFGF 后能抑制内皮细胞的增殖和迁移[7]。

HSYA 是从红花中提取得到的水溶性单体成分,是红花黄色素中含量较高的成分,是一种查耳酮葡萄糖苷。已有研究表明 HSYA 具有抗血小板聚集、抑制血栓形成[8,9]、减轻心脑缺血损伤及抗肿瘤等作用[10]。目前,对 HSYA 的效用及作用机制已引起不少学者的关注并进行了深入广泛的应用研究,而大多是对其抗凝及抗炎机制的研究,其抗肿瘤作用机制鲜见相关报道。

从本实验结果看出,低浓度的 HSYA(<0.065 7 g/L)具有促进人 HAEC 增殖的作用,而高浓度的 HSYA(>0.065 7 g/L)则表现出抑制 HAEC 增殖的作用,并且抑制强度随着浓度的增高而逐渐增强。而 RT-PCR 和免疫细胞化学结果显示 HSYA 能促进 HAEC TSP-1 的 mRNA 和蛋白的表达,且随着药物浓度的增加促进作用增强。因 TSP-1 的 TSRs 是其抑制内皮细胞增殖、诱导内皮细胞凋亡和抑制血管新生等作用的结构基础,高浓度的 HSYA 能上调 TSP-1 的表达,TSP-1 的高表达可能参与抑制 HAEC 增殖。而低浓度 HSYA 具有促进 HAEC 增殖的作用,本结果与张岭等[2]研究常氧条件下 HSYA 对犬胸主动脉内皮细胞增殖影响结果相似。张岭等认为 0.001 mol/L HSYA 与 2.6×10^{-7} mol/L VEGF 促增殖作用相当,在低氧条件下,HSYA 能上调内皮细胞中 VEGF 的释放,同时发现 HSYA 促内皮细胞增殖与其参与 VEGF 信号传导通路介导有关[11]。故 VEGF 的上调和 HSYA 作用于 VEGF 信号传导通路仍可能是本实验中促进 HAEC 增殖的原因。张前等[1]在实验中发现较低浓度 HSYA 抑制人脐静脉内皮细胞增殖,较高浓度 HSYA 对其增殖有促进作用,与本实验结果相反。这可能与人脐静脉内皮细胞缺乏 CD36 受体有关。Dawson 等[7]指出 TSP-1 抑制血管生成和人脐静脉内皮细胞迁移是依赖于 CD36 的表达,而只有细胞表达 CD36 才能为 TSP-1 所诱导凋亡。人脐静脉内皮细胞在正常情况下不表达 CD36 且对 TSP-1 的凋亡活性是不敏感的。但人脐静脉内皮细胞被 CD36 转染后的却对 TSP-1 诱导凋亡敏感。TSP-1 通过与 CD36 结合而诱导内皮细胞凋亡,抑制内皮细胞增殖和抑制血管新生。本实验中 HAEC 能表达 CD36,且得到与张前等相反结果,这从另一方面说明本实验中 TSP-1 在抑制内皮增殖方面可能扮演更为重要的角色。

综上所述,HSYA 能上调 TSP-1 的表达,同时 HSYA 对 HAEC 的增殖具有双向调节的作用,可能为 HSYA 上调 VEGF 和 TSP-1 的表达并参与调节 VEGF 信号传导共同作用的结果。较低浓度 HSYA 促进内皮细胞的增殖,可能因 VEGF 及 HSYA 作用于 VEGF 信号传导通路起主要作用。较高浓度抑制内皮细胞增殖,应该是上调的 TSP-1 对内皮细胞增殖的抑制作用强于 VEGF 及 HSYA 的促进作用所致。

目前 HSYA 上调 VEGF 和 TSP-1 的表达并参与调节 VEGF 信号传导作用机制尚不明确,但其促进和抑制内皮细胞增殖对缺血性疾病和肿瘤的治疗提供了新思路,有广阔的开发利用的前景。

参 考 文 献

[1] 张 前,牛 欣,闫 妍,等.羟基红花黄色素 A 对体外培养人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用[J].中国医药学报,2004,19(6):379-381.

[2] 张 岭,宋 艳,李长龄,等.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[J].中草药,2008,39(1):90-93.

[3] Jurk K,Clemetson KJ,de Goot PG,et al. thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ⅰb (GP Ⅰb):an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor[J].FASEB J,2003,17(11):1490-1492.

[4] Majesky MW Neointima formation after acute vascular injury. Role of counteradhesive extracellular matrix proteins[J].Tex Heart Inst J,1994,21(1):78-85.

[5] Jeff S,LisaA,Elizabeth M,et al.Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(37):13141-13146.

[6] Dawson DW,Pearce SF,Zhong R,et al.CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells [J].J Cell Biol,1997,38(3):707-717.

[7] Taraboletti G,Belotti D,Borsotti P,et al.The 140-kilodalton antiangiogenic fragment of thrombospondin-1 binds to basic fibroblast growth factor[J].Cell Growth Differ,1997,8(4):471-479.

[8] 臧宝霞,金 鸣,司 南,等.羟基红花黄色素 A 对血小板活化因子的拮抗作用[J].药学学报,2002,37(9):696-699.

[9] 夏玉叶,闵 吥,盛雨辰.羟基红花黄色素 A 对大鼠血栓形成和血小板聚集功能的影响[J].中国药理学通报,2006,22(5):554-557.

[10] 夏玉叶,闵 吥,盛雨辰.羟基红花黄色素 A 对大鼠脑缺血损伤的神经保护作用[J].中国医药工业杂志,2005,36(12):760-762.

[11] 张 岭,宋 艳,李长龄,等.羟基红花黄色素 A 促内皮细胞增殖的机制研究[J]. 中草药,2008,39(3):403-408.

(责任编辑:关蕴良)