

穗花杉双黄酮抑制人脐静脉内皮细胞 血管形成的实验研究*

张金丽, 曹文娟, 熊喜峰, 戴丽冰, 刘志河
(广州市红十字会医院//暨南大学医学院附属广州红十字会
医院创伤外科研究所, 广东 广州 510220)

摘要: 为探讨穗花杉双黄酮(Amentoflame, AF)对人脐静脉内皮细胞 ECV304 血管形成及机制的影响, 从而为穗花杉双黄酮治疗肿瘤及其他血管增生性疾病提供理论基础, 采用 MTS 检测 AF 对 ECV304 血管内皮细胞增殖的作用, 细胞划痕实验观察 AF 对 ECV304 细胞迁移的影响, 体外血管形成实验观察 AF 对 ECV304 血管形成的影响, Western blot 检测 AF 对 ECV304 细胞血管形成相关信号通路及蛋白如磷酸化 AKT (p-AKT)、金属基质蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase -9, MMP -9)、促血管生成素 2 (angiopoietin 2, Ang 2) 表达影响。结果表明 AF 能够抑制 ECV304 细胞的增殖作用, 并呈梯度依赖性; AF 具有抑制 ECV304 细胞迁移的作用, 并且能够抑制 ECV304 体外血管样结构的形成; Western blot 结果显示 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AF 能够降低 ECV304 细胞 p-AKT、MMP -9、Ang -2 的蛋白表达。

关键词: 血管生成; 内皮细胞; 穗花杉双黄酮

中图分类号: R961; R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2016) 06 - 0148 - 05

Amentoflame inhibits human umbilical vein endothelial cells angiogenesis

ZHANG Jinli, CAO Wenjuan, XIONG Xifei, DAI Libing, LIU Zhihe

(Guangzhou Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Medical
College of Jinan University, Guangzhou 510220, China)

Abstract: The present study was designed to investigate the effect of Amentoflame (AF) on the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells ECV304 and the mechanisms involved. MTS assay was performed to assess the effect of AF on ECV304 cell proliferation. Wound Healing was performed to assess the effect of AF on ECV304 cell migration. Matrigel assay was performed to assess the effect of AF on ECV304 tube formation. Western blotting was used to analyze the expression of cell angiogenesis related proteins such as angiopoietin 2 (Ang - 2)、Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and p-AKT in ECV304 treated with or without AF. The results demonstrated that AF inhibited the proliferation, migration and tube formation of ECV304 concentration-dependently. Western blot showed that the expression of p-AKT, Ang-2 and MMP-9 were significantly down-regulated by 100 $\mu\text{mol/l}$ of AF.

Key words: angiogenesis; endothelial cells; Amentoflame

血管生成 (Angiogenesis) 是指源于已存在的
毛细血管和毛细血管后微静脉的新的毛细血管性血

管的生长。肿瘤血管生成是一个极其复杂的过程,
一般包括包括血管内皮基质降解、内皮细胞移行、

* 收稿日期: 2016 - 04 - 08

基金项目: 广州市卫生局基金资助项目 (20131A011038); 国家自然科学基金资助项目 (81272222)

作者简介: 张金丽 (1979 年生), 女; 研究方向: 肿瘤分子生物学; 通讯作者: 刘志河; E-mail: zliu0731@163.com

内皮细胞增殖、内皮细胞管道化分支形成血管环和形成新的基底膜等步骤^[1]。在这个复杂而有序的过程中，多种生物分子发挥关键作用。例如：血管生成素（angiopoietin, Ang），包括 Ang-1 和 Ang-2，血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、血管内皮生长因子受体（vascular endothelial growth factor receptors, VEGFR），此外还有基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）和缺氧诱导因子（hypoxia inducible factor, HIF）等。血管生成在肿瘤的发展转移过程中起到重要作用，抑制这一过程将能明显阻止肿瘤组织的发展和扩散转移。中药文化是我们国家的珍贵资源宝库，特别是经过提纯加工的中药单体，已经发现了它们在许多疾病治疗中的药理机制^[2-4]。在治疗肿瘤血管形成方面，目前研究较多的有人参皂苷、姜黄素等。潘子民等^[3]建立小鼠卵巢癌模型，通过免疫组织化学检测 CD34 和 VEGF 的表达，发现人参皂苷 Rg3 可抑制卵巢癌组织微血管密度的表达，并降低 VEGF 的表达水平。王力强等^[5]采用藻酸盐实验检测脂质谱姜黄素的抗血管生成作用，证实姜黄素能抑制血管生成。穗花杉双黄酮是来源于卷柏科植物卷柏的一种双黄酮类物质，在传统医学中卷柏曾用来治疗多种疾病，现代医学研究证明穗花杉双黄酮还具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种作用^[6]。但关于穗花杉双黄酮对血管内皮细胞及血管生成方面的研究还不是很多，因此，本文将穗花杉双黄酮作用于人脐静脉内皮细胞，以观察其对血管生成的影响及机制，从而为穗花杉双黄酮防治肿瘤或其他血管增生疾病提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器

人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞株由本实验室保存。高糖 DMEM、胎牛血清、胰酶及青链霉素均购于 Gibco 公司，穗花杉双黄酮购自于上海融禾医药科技发展有限公司，二甲基亚砷（DMSO）及丝裂霉素 C 购自 Sigma 公司，MTS 购于美国 Promega 公司，兔单克隆抗体 Angiopoietin-2、兔多克隆抗体 MMP-9 购自于 Abcam 公司，兔单克隆抗体 p-AKT 购自于 CST 公司，兔 GAPDH 多克隆抗体购自上海依科赛生物制品有限公司，Matrigel 购自美国 Corning, Bio-Rad 化学发光凝胶成像系统，OLYMPUS 倒置相差显微镜，ZEISS 荧光显微镜，Thermo 二氧化碳培养箱。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 在 37 °C， $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养箱中，用含 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基（含 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素）培养 ECV304，每 3 天更换培养基，至细胞融合 70% ~ 80% 对细胞进行消化、传代。

1.2.2 MTS 检测穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞活力的影响 取 ECV304 细胞以 3×10^3 /孔接种于 96 孔板中，贴壁过夜后分别加入含 0、25、50、75、100、150 μmol/L 穗花杉双黄酮的高糖 DMEM 完全培养基，每个浓度组设 6 个复孔，作用 48 h 后 MTS 法检测比较不同浓度穗花杉双黄酮对细胞生长的影响。

1.2.3 细胞划痕检测穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞迁移的影响 将细胞接种于六孔板中，待细胞完全融合，加入 10 μg/mL 丝裂霉素 C 处理 4 h 使细胞灭活，采用 200 μL 枪头分别在六孔板孔中划一“十”字划痕，然后 PBS 洗 3 次，一孔加入 $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛固定作为 0 h 对照，其余分别加入不含或含有 50、100 μmol/L 穗花杉双黄酮 DMEM 完全培养基，继续培养 16 h 后，将细胞用 $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛固定，并于显微镜下测量计算细胞迁移距离，细胞迁移距离 = 0 h 划痕宽度 - 16 h 划痕宽度。

1.2.4 血管形成实验 将融化的 matrigel 铺于冰上预冷的 24 孔板中，每孔加入 100 μL，然后放入 37 °C 培养箱 30 min，待 matrigel 完全凝固后，加入不含或含 50、100 μmol/L 穗花杉双黄酮 DMEM 完全培养基的细胞悬液，每孔细胞数约 1×10^4 个，培养 16 h 后，采用 $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛固定，并置显微镜下拍照观察血管状结构形成情况。

1.2.5 Western blot 检测穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞血管形成相关蛋白表达的影响 细胞接种于培养皿中，加入不含或含 50、100 μmol/L 穗花杉双黄酮的 DMEM 完全培养基作用 48 h 后，弃上清，PBS 洗 3 次，加入 RIPA 细胞蛋白裂解液冰上裂解 30 min，离心后收集上清测定蛋白浓度，SDS-PAGE 电泳分离蛋白，半干转膜仪转膜， $w = 3\%$ BSA 封闭 2 h，分别加入一抗 p-AKT（1:1 000）、Angiopoietin-2（1:1 000）、MMP-9（1:1 000），4 °C 冰箱摇床孵育过夜，次日 TBST 洗 3 次，分别加入相应二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗 3 次后加入 ECL 发光液，放入化学发光凝胶成像仪显影拍照。

1.2.6 统计学处理 实验结果采用 $(x \pm s)$ 表示，

采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示统计学上有显著差异。

2 结果

2.1 穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞活力的影响

从图 1 我们可以看出, 当穗花杉双黄酮浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, 与对照组 ($0 \mu\text{mol/L}$) 相比, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 随着浓度的升高, 其抑制细胞活力的作用增强, 当浓度超过 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 提高穗花杉双黄酮的浓度, 对 ECV304 细胞活力的抑制作用也不再增加。

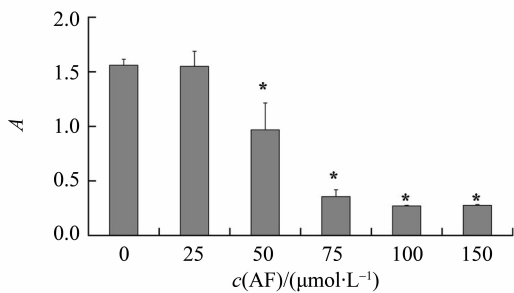


图 1 不同浓度穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞增殖的影响
Fig. 1 The effects of different concentration amentoflavone (AF) on ECV304 cell proliferation

2.2 细胞划痕显示穗花杉双黄酮抑制 ECV304 细胞迁移

如图 2 所示, 经显微镜下测量, 0 h 细胞划痕宽度约 (112.00 ± 6.17) μm (图 2Aa), 经过 16 h 的细胞迁移, 对照组划痕宽度缩短到 (29.00 ± 3.28) μm (图 2Ab), 而 $50 \mu\text{mol/L}$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 穗花杉双黄酮组划痕宽度分别为 (80.44 ± 2.00) μm (图 2Ac) 和 (110.77 ± 4.00) μm (图 2Ad), 由此可推算出对照组及 $50 \mu\text{mol/L}$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 穗花杉双黄酮组迁移距离分别为 (83.00 ± 3.28)、(31.56 ± 2.00)、(1.67 ± 3.38) μm , 经统计学分析, 各组间有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.3 穗花杉双黄酮抑制 ECV304 细胞体外血管形成

在 Matrigel 体外管样结构形成模型中, 对照组可以观察到完整的血管样结构, $50 \mu\text{mol/L}$ AF 组仅见个别细胞突触连接, 而 $100 \mu\text{mol/L}$ AF 基本上无细胞连接。由此可表明穗花杉双黄酮对 ECV304 成管样结构形成的抑制作用, 且此抑制作用具有浓度依赖性, 即穗花杉双黄酮浓度越高, 其对 ECV304 成管样结构形成的抑制作用就越强如 (图 3 所示)。

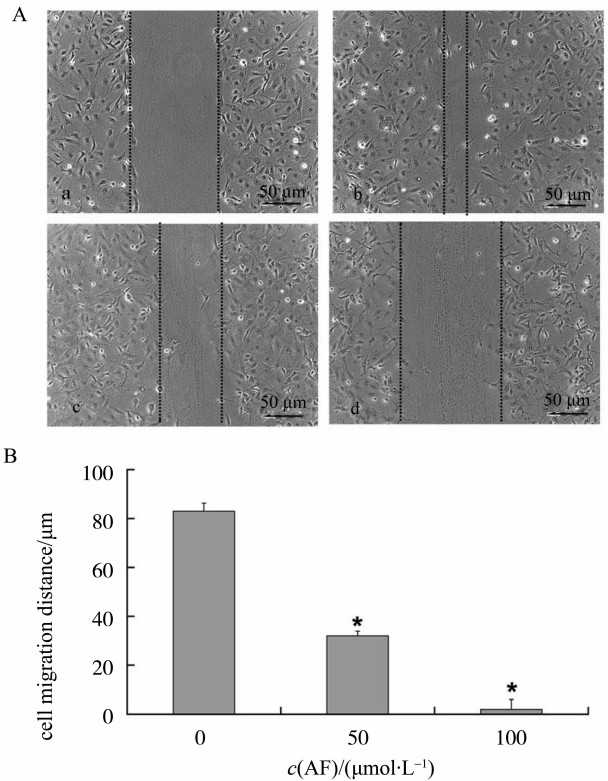


图 2 AF 对 ECV304 细胞迁移的影响

Fig. 2 The effect of AF on ECV304 cell migration

A: 细胞不同组划痕宽度。a: 用药前 0 h 细胞划痕; b: 16 h 后对照组细胞细胞划痕; c: 16 h 后 $50 \mu\text{mol/L}$ AF 细胞划痕; d: 16 h 后 $100 \mu\text{mol/L}$ AF 细胞划痕; B: 细胞迁移距离分析

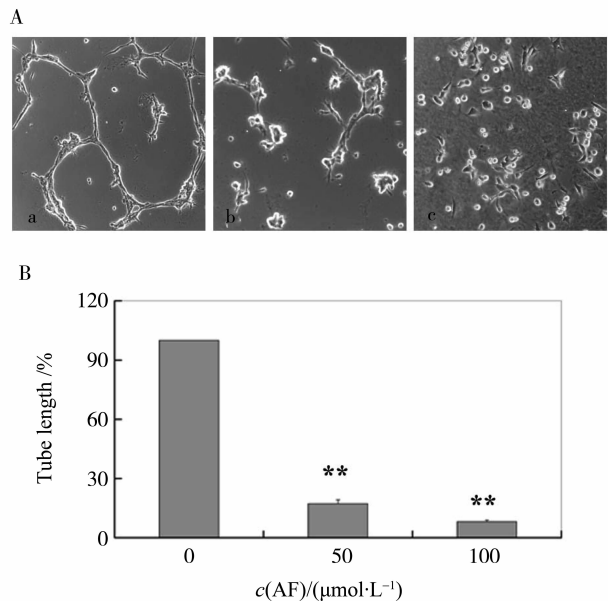


图 3 AF 对 ECV304 细胞体外血管样结构形成的影响

Fig. 3 The effects of AF on ECV304 cell tube formation

A: 对照组; B: $50 \mu\text{mol/L}$ AF 组;
C: $100 \mu\text{mol/L}$ AF 组

2.4 穗花杉双黄酮对 ECV304 细胞血管形成相关蛋白表达的影响

通过 Western blot 我们对 ECV304 细胞血管形成相关蛋白的表达进行了检测, 发现在 $100 \mu\text{mol/L}$ 穗花杉双黄酮的作用下, 一些对血管形成有利的蛋白如促血管生成素 2 (Angiopoietin-2)、MMP-9 表达下降, 而且能够抑制与细胞生长、分化、迁移密切相关的 PI3K/AKT 通路中关键蛋白 AKT 的磷酸化, 但 $50 \mu\text{mol/L}$ 浓度组作用不明显 (如图 4 所示)。

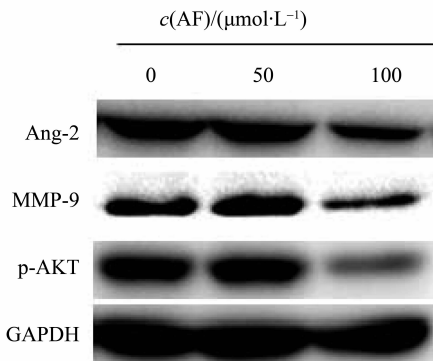


图 4 Western blot 检测 AF 对 ECV304 细胞 p-AKT, Ang-2, MMP-9 蛋白表达情况

Fig. 4 Western blot assay the expression of AF on ECV304 p-AKT, Ang-2 and MMP-9 protein

3 讨论

肿瘤血管是肿瘤赖以生长和转移的基础, 当既存血管提供的营养和氧不能满足肿瘤的迅速生长和侵袭时, 肿瘤会产生血管生成相关因子, 并改变局部微环境, 形成新生血管。在芽生过程中, 血管内皮细胞迁移、增殖、建立结点, 最终形成稳定的基底膜^[7]。

穗花杉双黄酮是一种黄酮类中药单体, 研究发现具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[8-9], 在本文我们发现 AF 还具有抑制人脐静脉血管内皮细胞增殖的作用。内皮细胞增殖是血管形成的基础, 除此之外, 内皮细胞的迁移也是血管形成的关键, 细胞迁移是一个多步骤的动态过程, 在促进血管生成和抑制血管生成的各种因子之间平衡精密调控下, 血管内皮细胞持续生长迁移, 延伸新生血管的顶端^[7,10]。我们通过划痕实验发现, 在采用丝裂霉素 C 处理后, 在排除细胞增殖对细胞迁移距离的影响下, AF 还是能够明显表现出对 ECV304 细胞迁移的抑制作用。最后, 体外血管形成实验利用 3D 细

胞基质模型模拟体内血管生成, 也验证 AF 抑制血管内皮细胞形成血管的作用。

关于血管形成的影响因素很多, 本研究中选取了几个与细胞生长、迁移关系比较密切的因素初步探讨了 AF 抑制血管内皮细胞血管形成的机制。PI3K/AKT 信号途径, 不仅在细胞凋亡、增殖、迁移、极化、代谢中具有重要作用, 也在肌肉和心肌纤维收缩、血管生成、干细胞自我更新中发挥重要作用^[11-12], 非正常激活状态的 Akt 与多种疾病具有广泛的联系, 尤其是肿瘤, Akt 的生物活性的全面激活需要 S473 和 T308 两个位点的磷酸化^[13], 本研究发现 AF 能够抑制 S473 位点的磷酸化, 由此我们推测 AF 抑制 ECV304 细胞的生长和迁移可能与 AF 抑制了 AKT S473 的磷酸化有关。基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMPs) 是一种内源性蛋白水解酶, MMP-9 属于明胶酶, 在降解细胞外基质各种成分中, 最为重要的是降解 IV 型胶原, 血管基膜的主要成分为 IV 型胶原, 因此其在诱导新生血管的生成和重塑, 促进肿瘤浸润和转移方面起很重要的作用^[14]。促血管生成素 2 (angiopoietin 2, Ang2) 由血管内皮细胞产生, 属于血管生成素家族, 该家族包括 Ang-1, 2, 3, 4 四个成员, Ang-1 有助于促进血管成熟, 维持血管稳定, 而 Ang-2 在生长的血管中表达, 通过与 Tie-2 受体相结合, 竞争性的抑制 Ang-1 的作用, 改变血管的稳定性, 并增加内皮细胞对 VEGF 等血管增殖因子的敏感性, 诱导内皮细胞分裂增殖、萌芽、迁移, 从而促进血管生成和肿瘤生长的作用, 与肿瘤血管生成的数目和密度、肿瘤大小、肿瘤侵袭及转移密切相关^[15]。在本研究中, 我们发现 $100 \mu\text{mol/L}$ AF 能够抑制血管内皮细胞细胞 MMP-9 及 Ang-2 的表达, 因此我们推测这可能是 AF 抑制 ECV304 细胞迁移、增殖及血管形成的机制之一, 但本实验中 $50 \mu\text{mol/L}$ AF 对 MMP-9 和 Ang-2 的作用却不是很确定, 我们分析一方面可能与药物浓度有关, 在不同的药物浓度下, 药物的作用效果不一定成线性关系, 另一方面可能还有其他因素参与而在本实验中没有检测。

参考文献:

- [1] FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] 王永刚, 谭沛, 李沛波, 等. 田基黄总黄酮抗胆管结扎

- 所致大鼠肝纤维化的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(1): 12-15.
- [3] 潘子民,叶大风,谢幸,等. 人参皂甙 Rg3 对荷卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究[J]. 中华妇产科杂志,2002,37(4): 202-204.
- [4] 辛颖,姜新,崔俊生,等. 人参皂苷 Rg3 抑制 B16 黑色素瘤新生血管生成及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(8):590-593.
- [5] 王力强,石华山,王永生. 脂质体姜黄素在 Lewis 肺癌中的抗肿瘤和抗血管作用[J]. 四川大学学报(医学版),2013,44(1):46-68.
- [6] 张震,王峰. 穗花杉双黄酮的生物活性研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(23):2775-2778.
- [7] GEUDENS I, GERHARDT H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation [J]. *Development*, 2011, 138: 4569-4583.
- [8] PEI J S, LIU C C, HSU Y N, et al. Amentoflavone induces cell-cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells via mitochondriadependent pathway [J]. *In Vivo*,2012,26(6):963-970.
- [9] 杨雨,徐文娟,彭康,等. 穗花杉双黄酮通过影响 caspase-3 和 β -catenin 表达诱导结肠癌细胞 SW480 凋亡[J]. *J South Med Univ*, 2014, 34(7): 1035-1038.
- [10] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. *Nature*, 2000, 407: 249-257.
- [11] LIAO Y, HUNG M C. Physiological regulation of Akt activity and stability[J]. *Am J Transl Res*,2010,2(1): 19-42.
- [12] MARKMAN B,DIENSTMANN R,TABERNERO J. Targeting the pi3k /akt /mTOR pathway—Beyond rapalogs [J]. *Oncotarget*,2010,1(7) : 530-543.
- [13] FELDMAN M E,APSEL B,UOTILA A, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2 [J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(2): e38.
- [14] ROMANIC A M,WHITE R F,ARLETH A J,et al. Matrix metalloproteinase expression in creases after cerebral focal ischemia in rats[J]. *Stroke*,1998,29(5) : 1020.
- [15] GEHLING U M,ERGN S. Mechanisms of tumour vascularisation[J]. *Memo-Magazine of European Medical Oncology*,2008, 1(1) :3-7.