

沙棘总黄酮对内皮细胞分泌功能的影响

程嘉艺, 滕 丹, 孙 静, 康廷国*
(辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 观察沙棘总黄酮对 ECV-304 细胞分泌组织型纤溶酶原激活物 (t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、血管性血友病因子(vWF) 的影响并探讨其可能的活性成分。方法: 以不同浓度的沙棘总黄酮和异鼠李素与培养的 ECV-304 细胞共同孵育 18 h 后, 用 ELISA 法检测培养液中 t-PA, PAI-1, vWF 的含量。结果: 沙棘总黄酮和异鼠李素均可剂量依赖性抑制 ECV-304 细胞 PAI-1 的分泌, 与空白对照组相比, 两者高, 中剂量组均有显著性差异 ($P < 0.01$), 低剂量组无显著性差异; 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV-304 细胞分泌 t-PA 和 vWF 均无明显影响。结论: 沙棘总黄酮抑制内皮细胞 PAI-1 的分泌, 异鼠李素可能是该作用的活性成分之一。

[关键词] 沙棘总黄酮; 纤溶酶原激活物抑制物-1; 组织型纤溶酶原激活物; 血管性血友病因子; 异鼠李素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0038-03

Influence of Total Flavones of Hippophae Rhamnoides L on Secretion of t-PA, PAI-1, vWF from Endothelial Cells

CHENG Jia-yi, TENG Dan, SUN Jing, KANG Ting-guo*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of total flavones of Hippophae Rhamnoides L (TFH) on secretion of t-PA, PAI-1, vWF from ECV304 cells and identify the possible active component. **Methods:** Cultured ECV-304 cell was commonly hatched 18 hours with The TFH and isorhamnetin of different concentrations, then the contents of t-PA, PAI-1, vWF in culture fluid were determined by ELISA. **Results:** The TFH and isorhamnetin of different concentrations could inhibit secretion of PAI-1 from ECV-304 cells in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, high and middle concentration groups significantly decreased the contents of PAI-1 ($P < 0.01$). TFH and isorhamnetin didn't influent the secretion of t-PA and vWF. **Conclusions:** TFH could inhibit PAI-1 secretion of endothelial cell, isorhamnetin may be one of the active components.

[Key words] total flavones of Hippophae Rhamnoides(TFH); plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1); tissue plasminogen activator(t-PA); von Willebrand factor(vWF); isorhamnetin

沙棘(Hippophae Rhamnoides L.) 是一传统藏药, 其有效部位之一为沙棘总黄酮(total flavones of Hippophae Rhamnoides L)。已有的研究报道认为沙棘总黄酮具有抑制血栓形成的作用, 并且其对血小

板活性的抑制作用是其抗栓作用的途径之一^[1,2]。异鼠李素(isorhamnetin) 是沙棘总黄酮中的主要单体成分^[3]。对于异鼠李素的研究目前多集中于其抗肿瘤的作用^[4-7]。为了进一步探讨沙棘总黄酮抗栓作用的机制及其有效成分, 本文观察了沙棘总黄酮和异鼠李素对人脐静脉内皮细胞系 ECV-304 分泌组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、von Willebrand 因子(vWF) 功能的

[收稿日期] 2007-11-05

[基金项目] 辽宁省科学计划项目(2005408001)

[通讯作者] * 康廷国, Tel: (024) 31207058; E-mail: cjt.61@163.com。

影响,旨在为沙棘总黄酮及其有效成分的进一步开发和利用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系及细胞培养 人脐静脉内皮细胞系 ECV-304,购于中国医科大学肿瘤研究所,复苏后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中静置培养,24 h 换液 1 次。

1.2 药物与试剂 沙棘总黄酮购自青海康普德生物制品有限公司,含量(以异鼠李素计) 27.2%,批号:20070312。异鼠李素购自南京青泽医药科技开发公司,标准品,纯度> 98%,淡黄色粉末。沙棘总黄酮和异鼠李素均用 0.1% NaOH 溶解配成母液,过滤除菌备用,用前用无菌 DMEM 培养液稀释。丹参注射液购自上海中西制药有限公司,批号:070104,规格为 2 mL/支,含生药量为 1 g·mL⁻¹,实验前用无菌 DMEM 培养液配成所需浓度。DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品。胎牛血清(FBS)为天津灏洋生物制品科技责任有限公司产品。胰蛋白酶为美国 Invitrogen 公司产品。t-PA,PAF-1,vWF 定量 ELISA 试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.3 实验仪器 VS-840-KU 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;HERAcell 150 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司;CK X 41 倒置显微镜,日本 Olympus 公司;SF-2 冷冻离心机,美国 SORVALL 公司;OLS 200 恒温水浴箱,英国 Grant 公司;SUNRISE RC 酶标仪,瑞士 TECAN 公司。

2 方法

2.1 分组培养 取对数生长期细胞培养 16 h,瓶底细胞达 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,调整密度为 1×10⁵,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,置培养箱中培养至细胞达 80% 融合时,将细胞随机分成 8 组,吸干培养液,各组均加入不含血清的培养液 180 μL,第 1 组空白对照组,加入 20 μL DMEM;第 2 组阳性对照组加入稀释后的丹参注射液 20 μL,使其终浓度为 2.5 mg·mL⁻¹;第 3,4,5 组均加入 20 μL 沙棘总黄酮,使终浓度分别为 92,184,920 μg·mL⁻¹;第 6,7,8 组均加入 20 μL 异鼠李素,使终浓度为 25,50,250 μg·mL⁻¹,每个浓度 6 复孔(PAF-1 为 5 复孔)。将各组细胞放入 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中静置培养,18 h 后取出,取上清,作为待测样品。

2.2 上清培养液中 t-PA, PAF-1, vWF 含量测定 用 ELISA 法测定上清液中 t-PA, PAF-1, vWF 含量(按说明书操作)。

2.3 统计学处理 各组数据以均数±标准差表示,多组间均数比较用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析, P< 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV-304 分泌 PAF-1 的影响 与空白组相比,阳性对照组、沙棘总黄酮各剂量组和异鼠李素高、中剂量组 PAF-1 含量显著降低 (P< 0.01),异鼠李素低剂量组较空白组降低但无显著性差异(0.10> P> 0.05)。沙棘总黄酮中,低剂量组的 PAF-1 含量显著低于相对应的异鼠李素剂量组(P< 0.01),沙棘总黄酮高剂量组 PAF-1 含量虽然低于相对应的异鼠李素高剂量组,但无统计学意义(0.10> P> 0.05),见表 1。

表 1 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV304 分泌 PAF-1 的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	终浓度 (mg·mL ⁻¹)	PAF-1 (ng·mL ⁻¹)
空白对照组	—	52.06 ± 4.76
丹参组	2.5	6.32 ± 1.17 ²⁾
沙棘总黄酮组	0.92	2.89 ± 0.31 ²⁾
	0.18	9.33 ± 1.49 ^{2,3)}
	0.092	18.17 ± 5.57 ^{2,3)}
异鼠李素组	0.25	7.18 ± 0.73 ²⁾
	0.05	30.64 ± 3.46 ²⁾
	0.025	40.16 ± 4.77

注:与空白对照组比较,¹⁾ P< 0.05, ²⁾ P< 0.01;与相应异鼠李素比较³⁾ P< 0.01(下同)

3.2 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV-304 分泌 t-PA 的影响 与空白组相比,仅阳性对照组有显著性差异(P< 0.01)。见表 2。

3.3 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV304 分泌 vWF 的影响 各实验组与空白组相比,均无明显差异(P> 0.05)。见表 3。

4 讨论

血栓的形成过程复杂,与血小板功能、血液流变性、血液成分及血管内皮细胞功能等多种因素密切相关。在小鼠光色素法活体血栓形成模型中,沙棘总黄酮可以延长血栓形成时间,表现了显著的抗血栓作用。进一步研究表明沙棘总黄酮可以明显抑制胶原和花生四烯酸引起的血小板聚集,这可能是沙棘总黄酮抗栓作用的机制之一^[1,2]。

表 2 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV304 分泌 t-PA 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t-PA ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照组	—	1.77 ± 0.36
丹参组	2.5	2.68 ± 0.56 ²⁾
沙棘总黄酮组	0.92	1.90 ± 0.20
	0.18	1.88 ± 0.43
	0.092	1.96 ± 0.38
异鼠李素组	0.25	1.87 ± 0.28
	0.05	1.89 ± 0.10
	0.025	1.57 ± 0.28

表 3 沙棘总黄酮和异鼠李素对 ECV304 分泌 vWF 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	vWF ($\text{mU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照组	—	0.50 ± 0.10
丹参组	2.5	0.61 ± 0.26
沙棘总黄酮组	0.92	0.59 ± 0.09
	0.18	0.55 ± 0.06
	0.092	0.41 ± 0.09
异鼠李素组	0.25	0.61 ± 0.21
	0.05	0.63 ± 0.16
	0.025	0.54 ± 0.07

内皮细胞合成分泌多种血管活性物质如 PAF-1、t-PA、vWF 等。本实验采用的 ECV304 内皮细胞株是由人脐静脉内皮细胞自发转化的一种永生化的细胞,具有一般血管内皮细胞的生长和功能特性。t-PA 是血管内皮细胞合成的组织来源的纤溶酶原激活物,通过促进纤溶酶原活化,可以使形成的血栓溶解。而 PAI 为纤溶酶原活化的抑制剂,包括 PAF-1 及 PAF-2,它们之间的平衡调节着血栓溶解和形成的进行^[8]。

本实验结果表明沙棘总黄酮和异鼠李素均能剂量依赖性抑制内皮细胞 PAF-1 的分泌,虽然对 t-PA 的分泌没有影响,但能提高 PAF-1 与 t-PA 的比值,使内皮细胞纤溶活性增强,这可能是沙棘总黄酮抗血栓形成的又一途径。异鼠李素是沙棘总黄酮中的主要单体成分,本实验所用沙棘总黄酮的含量以异鼠李素计为 27.2%,为了探讨沙棘总黄酮影响内皮细胞功能的有效成分,我们分别平行设计了与沙棘总黄酮各剂量组相对应的异鼠李素 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个剂量组。结果显示:沙棘总黄酮 0.18 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.092 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组的 PAF-1 含量显著低于相应的异鼠李素剂量组,说明异鼠李素是沙棘总黄酮抑制内皮细胞 PAF-1 分

泌的有效成分,但不是唯一的有效成分,沙棘总黄酮中一定还有其它成分贡献于其对内皮细胞 PAF-1 分泌的作用。沙棘总黄酮 0.92 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组 PAF-1 含量虽然低于相对应的异鼠李素组,但无统计学意义,可能是由于沙棘总黄酮和异鼠李素剂量较大,对 PAF-1 分泌的抑制作用接近了效能,而使指标钝化所致。

vWF 是由血管内皮细胞合成的一种大分子糖蛋白,生理状态下储存于内皮细胞的 Weiber Palade(棒管状)小体中,正常情况下,内皮细胞可分泌少量 vWF,在血管受损或某些病理条件下,内皮细胞受刺激,vWF 释放增加,该因子在血管损伤部位激发血凝块的形成,起到血小板与内皮下分子间桥梁作用^[9]。异鼠李素对正常内皮细胞培养上清液中 vWF 的含量无明显影响,但对血管受损,即血栓形成过程中 vWF 大量释放是否具有抑制作用还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 程嘉艺,汤 晴,杨金玲,等.沙棘总黄酮不同给药途径对血栓形成的影响[J].中成药,2006,28(2):262.
- [2] Cheng Jiayi, Kazunao Kondo, Yasuhiro Suzuki, et al. Inhibitory effects of total flavones of Hippophae rhamnoides L on thrombosis in mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation[J]. Life Sciences, 2003, 72: 2263.
- [3] 郑瑞霞,杨峻山.中国沙棘果实化学成分的研究[J].中草药,2006,37(8):1154.
- [4] 朱 玲,周黎明,杨春蕾.异鼠李素诱导 A549 细胞凋亡的研究[J].中国抗生素杂志,2004,29(11):687.
- [5] 李 华,李家富.异鼠李素对 Ang II 诱导新生大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J].中国心血管病研究杂志,2006,4(3):200.
- [6] 杨春蕾,彭 涛,屈 艺.异鼠李素对 Eca-109 细胞 DNA 的合成和 c-myc 基因表达近日节律的影响[J].生物医学工程学杂志,2005,22(6):1227.
- [7] 杨春蕾,屈 艺,王正荣.异鼠李素对 HeLa 细胞端粒酶活性的抑制作用[J].四川大学学报(医学版),2004,35(2):198.
- [8] Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 34(3): 631.
- [9] Denis CV. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor[J]. Int J Hematol, 2002, 75(1):3.