

• 基础实验研究论著 •

葛根素对人脐静脉内皮细胞的促血管生成作用及机制的研究

张杰, 龚妙添

(广东省佛山市三水区妇幼保健院检验科, 广东佛山 528100)

摘要: 目的 研究葛根素对人脐静脉内皮细胞增殖、迁移、侵入和血管形成的影响, 并探讨其机制。方法 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定葛根素对人脐静脉内皮细胞增殖的影响, 细胞侵入试验检测葛根素对细胞侵入能力的影响, 细胞迁移试验检测葛根素对细胞迁移能力的影响, 管道形成试验检测葛根素对细胞血管形成能力的影响, 蛋白质印迹法检测磷酸化Akt(p-Akt)、磷酸化一氧化氮合酶(p-eNOS)蛋白水平的表达变化。结果 葛根素明显促进了人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移、侵入和血管形成能力($P < 0.05$), 并显著上调 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 葛根素能够促进人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移、侵入和血管形成, 上调 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白的表达可能是其机制之一。

关键词: 脑卒中; 葛根素; 磷酸化一氧化氮合酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2579-03

The angiogenesis effect and mechanism of puerarin in human endothelial cells

Zhang Jie, Gong Miaotian

(Department of Clinical Laboratory, Maternity and Child Care Center of Sanshui District, Foshan, Guangdong 528100, China)

Abstract: Objective To explore the effects of puerarin on proliferation, invasion, migration and tube formation in human endothelial cells and its possible mechanism. **Methods** The effect of puerarin on cell proliferation was determined using methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. Invasion was evaluated with transwell chamber. Migration was performed by the wound healing method. Endothelial tube formation was performed by tube formation assay. The expressions of phosphorylase Akt(p-Akt) and phosphorylase nitric oxide synthase(p-eNOS) protein were determined by western blot. **Results** Puerarin promote the proliferation, invasion, migration and tube formation of human endothelial cells($P < 0.05$). The expression of p-Akt and p-eNOS were increased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** Puerarin can promote the proliferation, invasion, migration and tube formation of human endothelial cells. Up regulation of p-AKT and p-eNOS protein may be one of its mechanisms.

Key words: stroke; puerarin; phosphorylase nitric oxide synthase

脑卒中的高发病率、病死率和致残率, 给个人、家庭和社会造成沉重的经济负担和精神压力。促血管新生及改善脑部微循环是治疗脑卒中的关键。葛根素(puerarin)是从豆科植物野葛或干葛藤根中提取并分离出的单体, 在心血管系统中发挥调节微循环、抗高血压、抗血小板聚集等作用^[1]。有研究发现葛根素在改善脑卒中引起的神经功能缺损方面也具有出色的表现^[2-3], 这些作用可能基于葛根素可以保护细胞免受氧化应激、DNA 损伤和细胞凋亡的影响^[4-7]。但是葛根素对人脐静脉内皮细胞的促血管形成作用及机制的研究不多。因此, 本研究用葛根素作用于人脐静脉内皮细胞, 探讨葛根素对人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移、侵入和促血管形成作用, 并探讨其作用机制, 从而为后续研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞株(HUVE-12 细胞)购于美国模式培养物集存库(ATCC)。DMEM 培养基、小牛血清、胰蛋白酶、Transwell chamber 购于美国 Invitrogen 公司。葛根素、Matrigel 购于美国 Sigma 公司。Akt、磷酸化 Akt(p-AKT)、一氧化氮合酶(eNOS)、磷酸化一氧化氮合酶(p-eNOS)免抗人多克隆抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 HUVE-12 细胞加入 DMEM 培养基后, 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中进行培养。细胞分为阳性对

照组、葛根素组及对照组。阳性对照组在培养基中加入 20 ng/mL 的血管内皮生长因子(VEGF)和 0.1% 的二甲基亚砜(DMSO); 葛根素组设为 3 个剂量组, 分别在培养基中加入 10、50、100 μmoL/L 的葛根素; 对照组只在培养基中加入 0.5% 的小牛血清和 0.1% 的 DMSO。

1.2.2 细胞增殖能力检测 取 HUVE-12 细胞, 按每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板。正常培养 24 h 后弃去培养液, 换只含有 0.5% 小牛血清的培养液预处理 24 h 以达到细胞同步化。按照 1.2.1 方法加入不同培养基, 继续培养 48 h 后加入四甲基偶氮唑盐(MTT), 继续培养 4 h 后弃去孔中的上清液, 每孔加入 200 μL DMSO, 混匀 10 min, 在全自动酶标仪上(570 nm 处)测定各孔吸光度值。细胞增殖率(%) = 阳性对照组或葛根素组的吸光度值/对照组的吸光度值 × 100%。

1.2.3 细胞迁移能力检测 取 HUVE-12 细胞, 按每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板。正常培养 24 h 后弃去培养液, 换只含有 0.5% 小牛血清的培养液预处理 24 h 以达到细胞同步化。然后用 100 μL 移液器滴头在每个孔中沿培养板底部呈“一”字形划痕, 在 50 倍倒置荧光显微镜和电荷耦合元件(CCD)相机下, 每孔任意选取 3 个视野拍照以记录划痕区的相对距离。按照 1.2.1 方法加入不同培养基, 每组设 3 个复孔, 继续培养 16 h 后, 参照先前拍照方式记录各组划痕区的相对距离。以上检测均重复 3 次以上。

1.2.4 细胞侵入能力检测 采用 Transwell chamber 进行。

利用微孔滤膜(孔径 8 μm)把小室分隔为上、下 2 层。检测前滤膜的上、下层预先覆盖体积比分别为 1:30 和 1:100[用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释]的 Matrigel。取 HUVE-12 细胞,按每孔 5×10^4 个细胞注入 chamber 上层。chamber 下层按每孔 500 μL 注入不同培养基(参照 1.2.1 方法),每组设 3 个复孔,继续培养 7 h 后,取出 chamber,经 PBS 冲洗后,用 3.7% 多聚甲醛固定,擦净滤膜内表面细胞,采用 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Hoechst 33342 染色,撕下微孔滤膜于载玻片上,在 100 倍荧光显微镜下随机选取 3 个视野拍照,经显微图像获取分析软件计算侵入下层的细胞数目。上述检测均重复 3 次以上。

1.2.5 血管形成能力检测 从 -20°C 冰箱中取出 Matrigel 放在 4°C 冰箱中过夜,使之成为液态。在 24 孔板中,每孔注入 300 μL 体积比为 1:1(用小牛血清稀释)的 Matrigel,小心摇动使之均匀分布于孔的各个部位,并避免产生气泡,所有操作在冰上进行。然后将 24 孔板放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中 30 min。经过清洗、消化后的用含有 0.5% 小牛血清的培养基进行收集,按每孔 1×10^5 个细胞接种于覆盖 Matrigel 的 24 孔板中。每组按 1.2.1 方法加入不同培养基,继续培养 6 h 后,在 50 倍荧光显微镜下,每孔随机选取 3 个视野进行拍照,通过图像处理软件计算管道交叉点的数目。上述检测均重复 3 次以上。

1.2.6 p-AKT、p-eNOS 蛋白表达的影响 各组 HUVE-12 细胞用冷 PBS 冲洗 3 次,加入预冷细胞裂解液裂解,低速离心 30 min,上清液为细胞质分解的蛋白质。取 40 μg 的上述蛋白质与等量十二烷基硫酸钠(SDS)加样缓冲液混匀,置 100°C 加热变性 5 min,采用 SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳,再电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h,洗膜后加一抗 4°C 孵育过夜,PBS 洗膜 5 min(3 次),1:2 000 二抗温育 2 h,PBST 洗膜 10 min(3 次),增强化学发光法自显影 1 min,洗片显带, β -actin 多克隆抗体作内参。所有杂交信号用美国 Bio Rad 公司生产的图像分析系统进行光密度扫描,数值以各干预组与 β -actin 的比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 葛根素对 HUVE-12 细胞增殖能力的影响 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葛根素可以明显促进 HUVE-12 细胞增殖,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.2 葛根素对 HUVE-12 细胞迁移能力的影响 与对照组比较,10、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葛根素,分别使 HUVE-12 细胞迁移率增加了 13%、35%、46%($P < 0.01$),见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.3 葛根素对 HUVE-12 细胞侵入能力的影响 与对照组比较,10、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葛根素,分别使 HUVE-12 细胞侵入率增加了 6%、46%、62%($P < 0.05$),见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.4 葛根素对 HUVE-12 细胞血管形成的影响 在 10、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葛根素的作用下,HUVE-12 细胞形成管型长度分别为 8.6、12.3 和 17.9 mm,与对照组(3.2 mm)比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

页“论文附件”。

2.5 葛根素对 HUVE-12 细胞 p-AKT、p-eNOS 蛋白表达的影响 与对照组比较,10、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葛根素均使 p-AKT 的 p-eNOS 的表达量增加($P < 0.05$)。见图 5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

3 讨 论

缺血性脑血管病治疗的关键是恢复血供,改善缺血脑组织的代谢。虽然在缺血条件可出现自身代偿性血管再生,从而提高缺血组织区氧气和营养物质的供应,促进突触发生、神经通路形成及神经功能修复作用^[8],但仅靠自身调节的代偿性血管再生数量有限,不足以形成有效的侧支循环^[9]。研究证明通过促进内源性血管生长因子的局部表达或给予外源性血管生长因子刺激机体的血管再生,可以有效减轻缺血所致的脑损伤^[10-11]。治疗性血管生成是指通过药物、基因或干细胞移植等方法促进缺血组织在原有微血管基础上形成新的毛细血管,并与原有的血管网相交汇以改善血供的一种方法^[12]。因此,治疗性血管生成具有广阔的应用前景。

由于脑卒中是一种慢性疾病,需要长期治疗,从而对药物的应用有一定限制。葛根素是从中药豆科植物野葛或干葛藤根中提取的一种黄酮苷。葛根素注射液在中国已广泛应用于脑卒中的治疗^[13],然而葛根素预防脑卒中的机制却很少有报道。研究表明葛根素具有神经保护作用^[14-15]。本研究结果显示葛根素能明显促进 HUVE-12 细胞增殖,明显增加 HUVE-12 细胞的迁移、侵入和血管形成能力。

了解药物诱导的信号通路对发展药物的安全性和有效性至关重要。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,约由 480 个氨基酸残基组成,是磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)的主要下游效应分子之一,通过直接磷酸化多种转录因子,参与调节血管生成^[16]。Akt 被激活后就会使 eNOS 磷酸化,p-eNOS 增加一氧化氮(NO)的释放,从而促进血管生成。为了明确观察葛根素诱导血管生成的信号转导机制,笔者检测了 Akt-eNOS 信号通路在葛根素诱导的血管生成中的作用,发现葛根素上调了 p-AKT、p-eNOS 的表达,提示葛根素可能通过激活 Akt-eNOS 信号转导通路促进人脐静脉内皮细胞的血管生成。

综上所述,笔者认为葛根素促进了人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移、侵入和血管形成,上调 p-AKT 和 p-eNOS 蛋白的表达可能是其机制之一。葛根素通过直接或间接影响 Akt-eNOS 信号转导通路去调控人脐静脉内皮细胞的血管生成。

参考文献

- [1] Li Y, Pan W, Chen S, et al. Pharmacokinetic, tissue distribution, and excretion of puerarin and puerarin-phospholipid complex in rats[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(4): 413-422.
- [2] Tan Y, Liu M, Wu B. Puerarin for acute ischaemic stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008, 39(1): 41-45.
- [3] 胡海涛, 封菲, 丁美萍. 葛根素协同阿司匹林治疗对急性脑梗死患者血管内皮细胞损伤标志物的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2827-2829.
- [4] Xu X, Zhang S, Zhang L, et al. The neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats[J]. Planta Med, 2005, 71(7): 585-591.
- [5] Wan H, Zhu H, Tian M, et al. Protective effect of chuanxiongine-puerarin in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia[J]. Nucl (下转第 2583 页)

(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

表 1 不同诱导方法产出纯化蛋白的结果对比

诱导方法	上清液中的纯化	包涵体中的纯化	总量
	蛋白(mg)	蛋白(mg)	(mg)
IPTG 诱导	0	24	24
自诱导	30	40	70

3 讨 论

SLO 是 A 群链球菌的代谢产物之一,由 538 个氨基酸构成,相对分子质量为 60×10^3 ,SLO 能够使细胞膜产生大的孔道,使大量有毒物质进入细胞质,从而对细胞产生毒性作用^[5]。SLO 具有很强的抗原性,机体因感染 A 群链球菌可导致的咽炎、扁桃体炎、猩红热、风湿热等疾病,机体可立即产生抗 SLO 抗体。临床通过测定抗 SLO 抗体用于诊断 A 群链球菌感染^[6]。

SLO 是制备抗 SLO 抗体的主要试剂原料^[7-8]。获得 SLO 的方法有天然培养和重组表达获得。天然培养是通过大规模培养 A 群链球菌获得其代谢产物,再分离获得 SLO,该方法最大的优点是得到的 SLO 为天然结构,但操作复杂、产量低,受环境因素影响,目前基本被重组表达法取代。大肠杆菌表达系统是目前使用最为广泛、最简单和经济的方法,其优势在于:表达基因明确;在普通培养基中生长迅速;表达时可以带上相应纯化标签,实现快速分离纯化^[9]。其缺陷在于:缺乏真核细胞的翻译后修饰系统;易造成表达过快、折叠混乱而导致的包涵体表达,失去原有的功能。

由于不同的诱导条件在一定程度上决定了目的蛋白的产量和质量,因而找到该目的蛋白优化的诱导表达条件就非常重要。自诱导是针对大肠杆菌 T7 表达系统建立的一种优化诱导条件,该系统中大肠杆菌以葡萄糖为碳源支持生长至饱和,待葡萄糖消耗完全,培养基中的乳糖则开始起作用。在 lacY 与 lacZ 的基因产物——乳糖透过酶(lactose permease)和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的协助下,乳糖穿过细胞膜并部分

转化为异乳糖开启大肠杆菌 T7 表达系统。笔者开始选用 IPTG 诱导系统,表达量极低;而后采用自诱导的方式,不仅表达量明显提高,并实现了部分可溶性表达。

总之,成功构建了 SLO 的原核表达质粒,优化筛选出能高效可溶性表达的诱导条件,纯化获得了 SLO 重组融合蛋白,为 SLO 临床定量检测技术及应用研究奠定基础。

参考文献

- 张晶梅,于魁忠. C 反应蛋白、红细胞沉降率、抗链球菌溶血素 O 在风湿性心脏病手术中的变化及预测价值[J]. 临床合理用药杂志,2011(9):84-85.
- Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in Escherichia coli cultivation using lactose as inducer[J]. J Biotechnol, 1998, 60(1/2):47-54.
- Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(1):207-234.
- Chen WB, Nie Y, Xu Y, et al. Enhancement of extracellular pullulanase production from recombinant Escherichia coli by combined strategy involving auto-induction and temperature control[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2014, 37(4):601-608.
- 唐新杰,盛玲玲,张群,等. 链球菌溶血素 O 提高细胞的通透性[J]. 中国组织工程研究,2012,16(46):8689-8692.
- Madeleine WC. Pathogenesis of group A streptococcal infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3):470-511.
- Hall EH, Gurel V, Dahlberg AE, et al. Inhibition of human breast cancer matrigel invasion by streptolysin O activation of the EGF receptor ErbB1[J]. Cell Signal, 2011, 23(12):1972-1977.
- Bru T, Clarke C, McGrew MJ, et al. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts[J]. Exp Cell Res, 2008, 314(14):2634-2642.
- 戚大梁,王强,易维京. 抗组氨酸标签单克隆抗体的制备、鉴定及应用[J]. 重庆医学,2013,42(32):3918-3920.

(收稿日期:2014-04-16)

(上接第 2580 页)

- Med Commun, 2008, 29(12):1113-1122.
- Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead[J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(6):575-582.
 - Tang XL, Liu XJ, Tian Q, et al. Dynamic oxidative stress and DNA damage induced by oestrogen deficiency and protective effects of puerarin and 17 β -oestradiol in ovariectomized rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012, 111(2):87-91.
 - Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(5):481-496.
 - Vasir B, Jonas JC, Steil GM, et al. Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets[J]. Transplantation, 2001, 71(7):924-935.
 - Yao RQ, Zhang L, Wang W, et al. Cornel iridoid glycoside promotes neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function after focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 2009, 79(1):69-76.
 - An SS, Jin HL, Kim KN, et al. Neuroprotective effect of combined hypoxia-induced VEGF and bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment[J]. Childs Nerv Syst, 2010, 26(3):323-331.
 - Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, et al. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2007, 9(3):205-212.
 - Wong KH, Li GQ, Li KM, et al. Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3):584-607.
 - Xu X, Zheng X. Potential involvement of calcium and nitric oxide in protective effects of puerarin on oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113(3):421-426.
 - 陈连壁,柴强,赵爱萍,等. 葛根素对犬脑血流的影响[J]. 中国中西药杂志,1995,20(9):560-562.
 - Gu M, Roy S, Raina K, et al. Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in prostate carcinoma cells in culture and nude mouse xenograft: PI3K-Akt pathway as potential target[J]. Cancer Res, 2009, 69(24):9465-9472.

(收稿日期:2014-06-01)