

· 论 著 ·

## 羟基红花黄色素 A 对血管内皮细胞黏附功能的影响\*

张明宇<sup>1</sup>, 刘丙辰<sup>1</sup>, 韦国千<sup>1</sup>, 李学奇<sup>1</sup>, 刘 莉<sup>2</sup>, 钟丽华<sup>1</sup>, 金 鹏<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨医科大学附属第四医院心内科, 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院心内科, 哈尔滨 150040)

**摘要:**目的 研究羟基红花黄色素 A(HSYA)对血管内皮细胞黏附功能的影响。方法 选用猪髂动脉内皮细胞(PIECs)作为细胞模型,应用同位素氘与胸腺嘧啶结合的方法标记细胞,通过检测放射性计算出在共培养不同时段黏附于聚酯膜上的细胞数,利用 Rh 123 染色显示黏附细胞中的线粒体活性。结果 在 HSYA 作用 24 h 后,与对照组相比 HSYA 明显升高黏附细胞数量,并且这一作用呈现出剂量依赖性的现象( $P < 0.05$ ),同时内皮细胞中的线粒体荧光增强,也呈剂量依赖性( $P < 0.05$ ),都在 HSYA 浓度为 0.007 3 g/L 达到最理想效果。结论 HSYA 能够促进内皮细胞的黏附和提高内皮细胞线粒体活性。

**关键词:**内皮细胞;动脉硬化;红花黄色素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.05.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)05-0493-03

## Effect of hydroxy safflor yellow A on adherent function of endothelial cells\*

Zhang Mingyu<sup>1</sup>, Liu Bingchen<sup>1</sup>, Wei Guoqian<sup>1</sup>, Li Xueqi<sup>1</sup>, Liu Li<sup>2</sup>, Zhong Lihua<sup>1</sup>, Jin Peng<sup>1</sup>

(1. Cardiovascular Department, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin,

Heilongjiang 150001, China; 2. Cardiovascular Department, First Affiliated Hospital,

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of hydroxy safflor yellow A (HSYA) on endothelial cells function. **Methods** PIECs were chosen as cell model. PIECs were labeled with isotope through the combination of <sup>3</sup>H-thymidine. The radioactivity of cells was detected to determine the number of cells attached to the material surface following the time course. The activity of adhesive cells was measured by rhodamine123 staining. **Results** HSYA had significant impact on cell adhesion and activity compared with control group after 24h ( $P < 0.05$ ), and this showed dose- and time-dependently increased. The action was most powerful when the concentration of HSYA was 0.007 3 g/L. **Conclusion** HSYA could promote adhesion and increase mitochondrion viability of PIECs.

**Key words:** endothelial cells; arteriosclerosis; safflor yellow

羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)是从红花中提取的水溶性单体成分,是一种查耳酮葡萄糖苷,在治疗冠心病和缺血性脑血管病等多种血液循环障碍性疾病中具有较好的效果,其机制有抗血小板聚集、提高纤溶活性、扩张血管、改善微循环、抗炎、调节血脂等作用<sup>[1-2]</sup>。动脉硬化性疾病尤其是急性血管闭塞性疾病和血管内皮细胞功能紊乱相关<sup>[3]</sup>,但 HSYA 和血管内皮功能关系尚不明确,本文旨在研究 HSYA 对血管内皮功能的影响。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 双人超净工作台(丹麦 Heto),台式低速离心机, TriAthler 多重标记检测仪,倒置荧光显微镜(OLYMPUS),血球计,猪髂动脉内皮细胞(porcine vascular endothelial cells, PIECs, 上海赛生生物医药),同位素氘,南美胎牛血清(Hyclone),RPMI 1640 细胞培养基(Hyclone),聚酯膜,罗丹明 123 (Sigma),HSYA(山西华辉凯得制药)。

**1.2 细胞培养同位素标记及黏附研究** 取 HSYA 用 M199 培养基配成终浓度为:对照组 0.000 0 g/L、1 组 0.000 9 g/L、2 组 0.001 8 g/L、3 组 0.003 7 g/L、4 组 0.007 3 g/L、5 组 0.014 6 g/L。使用 RPMI 1640 培养基培养猪 PIECs,每 2 天

更换液体,先将细胞与同位素氘标记胸腺嘧啶结合,用含有同位素氘的培养液(5  $\mu$ Ci/mL)培养达到对数期的细胞,当细胞融合铺满培养瓶时,0.25%胰酶消化后用血细胞计数仪计数,均匀铺于使用聚酯纤维膜铺底的 6 孔板中,保证每孔细胞量达到  $5 \times 10^5$  个,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37  $^{\circ}$ C 培养。留出  $5 \times 10^5$  整除 2 个细胞检测细胞放射性。2 h 后弃掉含未黏附细胞的培养液,换用含 2  $\mu$ Ci/mL 浓度氘的培养液培养。分别在培养后 24、48、72 h,离心弃掉培养液中的未贴壁细胞后经裂解检测胸腺嘧啶放射性,各实验组终止培养并裂解细胞,应用 TriAther 多重标记检测仪检测氘标记胸腺嘧啶的放射性。通过已知细胞数的放射性减去未黏附细胞的放射性,得出不同时间黏附于材料上的细胞数,采用 Commfiler Version 2.068 分析软件计算结果。

**1.3 Rh123 染色检测线粒体** 在 1 mL 二甲基亚砷中溶解 0.4 mg Rh123,制备成 1 mmol/L Rh123-二甲基亚砷溶液,用载玻片准备细胞,孵育该载玻片,用 PBS 液洗涤细胞。用培养基稀释 1 mmol/L Rh123 溶液以制备 1~20  $\mu$ mol/L Rh123 缓冲液,将 Rh123 缓冲液加入细胞与聚酯膜铺底 6 孔板中共培养 24 h,并在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 1 h,去除 Rh123 缓冲液后用培养基

\* 基金项目:黑龙江省科技厅国际合作资助项目(WB08B06);黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-09002);黑龙江中医药科研资助项目(ZHY12-Z158)。 作者简介:张明宇(1973~),副主任医师,博士,主要从事内皮细胞和动脉硬化的研究。

洗涤细胞,然后加 10% 甲醛缓冲液孵育 15 min 固定,接着用 PBS 洗涤细胞。用带有荧光素滤片的荧光显微镜观察细胞,电脑软件测定相对荧光强度。

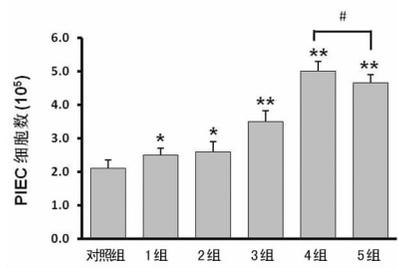
**1.4 统计学处理** 用 SPSS13.0 统计软件进行统计处理。统计学方法采用 Student's *t* 检验来对比各组数据,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表达。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HSYA 促进细胞在聚酯膜上的黏附** 实验结果显示在 HSYA 作用 24 h 后,与对照组相比可以有效升高黏附细胞数(图 1),并且这一作用呈现出剂量依赖性的现象,0.000 9 g/L 的浓度即出现有意义的升高( $P < 0.05$ ),在 0.007 3 g/L 的浓度作用下达到最高值( $P < 0.01$ ),而进一步升高浓度可以看到对于黏附细胞数没有进一步的增加,虽然与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但与 0.007 3 g/L 的浓度作用相比已出现统计学意义上的减少( $t = 2.324 7, P < 0.05$ ),提示高剂量的 HSYA 可能对细胞黏附出现了轻微的抑制。应用在 24 h 具有最强作用的 0.007 3 g/L 的浓度进行了时间曲线实验(图 2),与对照组比较黏附细胞数最早出现有意义的升高发生在 12 h ( $P < 0.01$ ),并在共培养 48 h 后达到平台期( $P < 0.01$ ),72 h 没有进一步促进作用。

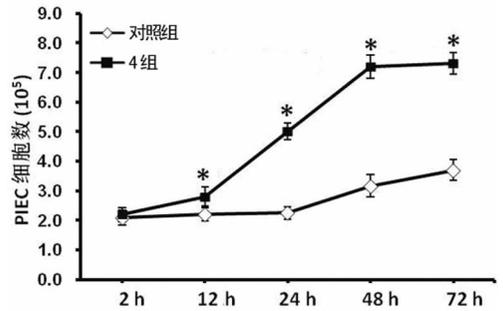
**2.2 HSYA 可提高活 PIECs 细胞线粒体活性** 共聚焦显微镜实验结果显示(图 3):在对照组聚酯膜纤维上仅有稀少的绿色荧光点,而应用 0.000 9 g/L 和 0.001 8 g/L HSYA 作用 24 h 后,荧光强度并没有明显变化,相对荧光强度分析差异无统计学意义(图 4),出现差异的浓度为 0.003 7 g/L,图片显示出现了片状荧光团覆盖了一些纤维缝隙,与对照组相比相对荧光强度有意义的增强( $P < 0.01$ ),其中 4 组,相当面积的纤维网

被荧光团覆盖,荧光强度也最高( $P < 0.01$ ),然而,与黏附实验类似 5 组出现了相对荧光强度降低( $t = 2.337 3, P < 0.05$ ),说明更大剂量 HSYA 并不会无限提高内皮细胞线粒体活性。



\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 组间对比。

图 1 不同浓度的 HSYA 共培养 24 h 对黏附于聚酯膜上 PIECs 细胞数的影响



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 2 0.007 3 g/L HSYA 作用组与对照组的黏附细胞数的时间曲线

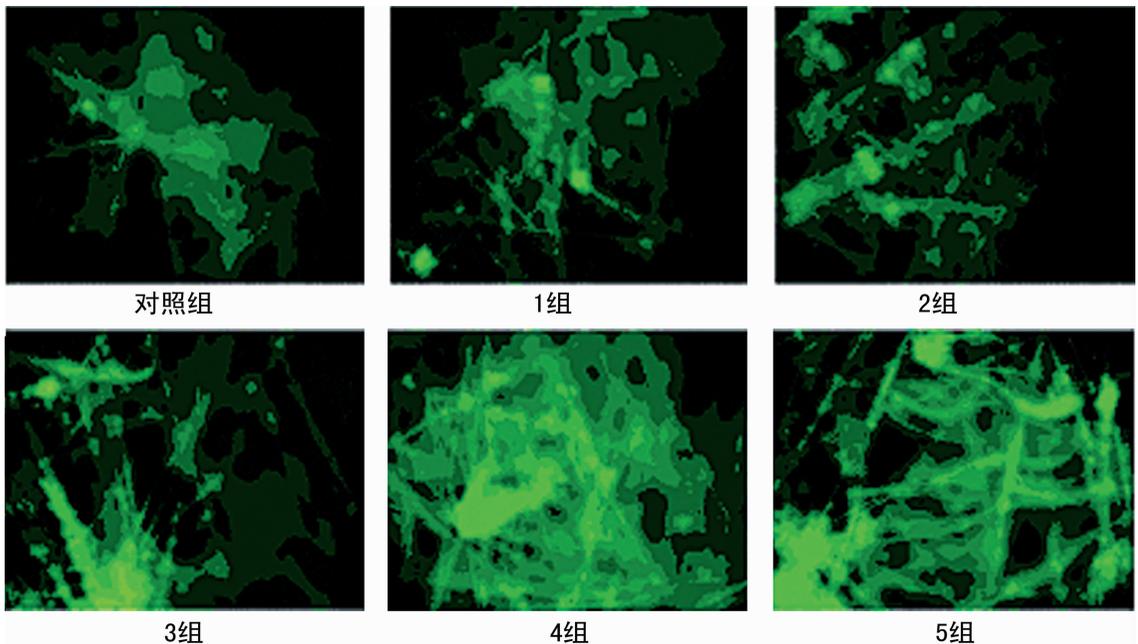


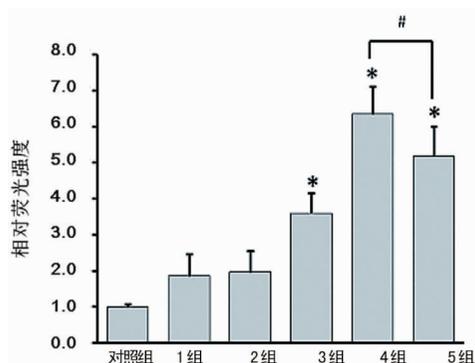
图 3 Rh123 染色不同浓度的 HSYA 作用 24 h 后黏附的活 PIECs 细胞荧光表达 ( $\times 200$ )

## 3 讨论

血管内皮细胞不仅起血管内外的屏障作用,还参与人体代谢和内分泌功能,通过合成与释放许多活性物质来调节血管张力和血液流动性及黏附性,对维持正常血管壁的通透性,血管

的功能状态,凝血纤溶系统及炎症反应起着重要作用<sup>[4]</sup>。内皮细胞受到破坏引发血管损伤则会触发动脉硬化,成为动脉硬化形成早期的始动环节<sup>[5]</sup>。因此,近年来关于血管内皮细胞的功能和动脉硬化的关系越来越受到重视,抗动脉硬化成为降低心

脑血管疾病发病的一个重要环节。HSYA 在治疗动脉硬化导致的心脑血管疾病中有和内皮细胞相似的作用, HSYA 治疗动脉硬化疾病的机制之一是否和改善内皮细胞功能有关值得进一步研究。



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 组间对比。

图 4 各组相对荧光强度的量化分析

既往研究中报道了 HSYA 和内皮细胞增殖之间的关系。张岭等<sup>[6]</sup>研究发现 HSYA 具有促血管内皮细胞增殖作用, 且在缺氧时更为明显。王传恩等<sup>[7]</sup>认为, HSYA 能增加中枢血管内皮细胞生长因子的浓度, 如果内皮细胞生长因子浓度增加必然带来血管内皮细胞的增殖<sup>[8]</sup>; 但文献研究结果显示不尽相同, 王济等<sup>[9]</sup>的研究显示 HSYA 对健康人脐静脉内皮细胞生长无明显促进或抑制作用。涂利宽等<sup>[10]</sup>研究显示 HSYA 对主动脉内皮细胞增殖作用的影响表现出双向性, 较高浓度 ( $> 0.0657 \text{ g/L}$ ) 对人主动脉内皮细胞的增殖有抑制作用, 较低浓度 ( $< 0.0657 \text{ g/L}$ ) 表现出促进作用。大多数研究显示低浓度的 HSYA 能够促进的内皮细胞的增殖, 作者在此基础上进一步探讨 HSYA 是否可以加强内皮细胞增殖和黏附功能及黏附后的细胞线粒体活性。采用聚酯膜和内皮细胞共同培养, 观察内皮细胞在聚酯膜上的黏附覆盖能力和细胞线粒体活性。为了研究不同剂量的 HSYA 对黏附于聚酯膜上的 PIECs 细胞数的影响, 本研究应用氚标记胸腺嘧啶与细胞 DNA 结合, 通过检测放射性来计算黏附于聚酯膜上的细胞数。因为聚酯膜属于三维结构, 黏附细胞处于三维空间内, 所以不能应用常规细胞计数的方式来评价, 本方法通过细胞 DNA 合成后依然带有放射性标记的优点可以相对准确地判断黏附细胞数<sup>[11]</sup>。结果显示 HSYA 能够促进内皮细胞黏附能力, 作用最强的 HSYA 浓度是  $0.0073 \text{ g/L}$ , 出现作用最有效的时间是作用后 48 h。为测定不同浓度 HSYA 作用下黏附细胞的线粒体活性, 本研究应用了 Rh123 染色剂, 它是一种阳离子染料, 分布于线粒体基质中对跨线粒体膜的电位变化做出反应, 从而评价线粒体功能<sup>[12-14]</sup>。研究表明, 处于细胞周期中的细胞比静止期细胞的 Rh123 染色荧光强度高, 这与静止期细胞线粒体活力低有关<sup>[15]</sup>, 被 Rh123 标记的线粒体如果荧光增强证明细胞处于激活状态<sup>[16]</sup>。实验结果显示 HSYA 能够提高黏附细胞的线粒体活性, 当浓度为  $0.0073 \text{ g/L}$  时, 内皮细胞的线粒体染色最强, 也即内皮细胞的线粒体活性最强。本实验证明, HSYA 能够促进内皮细胞在组织上的黏附并提高内皮细胞线粒体活性, 提高机体对损伤内皮组织的修复能力, 由增加的内皮细胞释放更多的活性物质, 起到抗动脉硬化的作用。

#### 参考文献:

- [1] 杨红述, 魏宗德. 红花黄色素与心血管疾病的研究进展 [J]. 西南军医, 2009, 11(1): 83-85.
- [2] 秦晓娟, 魏宗德. 红花黄色素对心血管保护作用的研究进展 [J]. 临床荟萃, 2009, 24(3): 263-265.
- [3] Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance [J]. Geriatr Gerontol Int, 2010, 10(Suppl 1): S213-S220.
- [4] Maier JA. Endothelial cells and magnesium; implications in atherosclerosis [J]. Clin Sci, 2012, 122(9): 397-407.
- [5] 山丽梅, 张锦超, 汪海. 血管内皮细胞功能与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. 解放军药理学学报, 2002, 18(5): 294-297.
- [6] 张岭, 宋艳, 李长岭, 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.
- [7] 王传恩, 黄玉川, 杨淑娟. 羟基红花黄色素 A 对力竭大鼠大脑皮质 VEGF 及受体 VEGFR-2 表达的影响 [J]. 现代预防医学, 2009, 36(9): 1760-1761.
- [8] Joseph R, Shelma R, Rajeev A, et al. Characterization of surface modified polyester fabric [J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(Suppl 1): S153-S159.
- [9] 王济, 张前, 解华, 等. 羟基红花黄色素 A 对肿瘤上清诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 252-257.
- [10] 涂利宽, 罗文军, 王银光, 等. 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 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(4): 571-574.
- [11] Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(2): 990-994.
- [12] Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells [J]. Annu Rev Cell Biol, 1988, 4(2): 155-181.
- [13] Smith JC. Potential-sensitive molecular probes in membranes of bioenergetic relevance [J]. Biochim Biophys Acta 1990, 1016(1): 1-28.
- [14] Dykens JA, Stout AK. Assessment of mitochondrial membrane potential in situ using single potentiometric dyes and a novel fluorescence resonance energy transfer technique [J]. Methods Cell Biol, 2001, 65(2): 285-309.
- [15] 章涛, 方宁, 张潜, 等. 脐带血造血干/祖细胞罗丹明 123 荧光染色及其意义 [J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(3): 206-210.
- [16] Liu L, Ratner BD, Sage EH, et al. Endothelial cell migration on surface-density gradients of fibronectin, VEGF, or both proteins [J]. Langmuir, 2007, 23(22): 11168-11173.

(收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-21)