

云南昭通年青褐煤黄腐酸钠对血管新生作用的影响

杨 静, 何 静*, 丁亚芳, 庄文婷, 向 诚, 秦 谊, 李宝才

昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500

摘要: 研究云南昭通地区年青褐煤黄腐酸钠对体内外血管新生作用的影响。将不同浓度的黄腐酸钠作用于人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)体外模型和鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)体内模型, 采用MTT和划痕法检测其对HUVECs增殖和迁移的影响, 以ELISA试剂盒测定细胞上清液血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, 采集CAM图片用Image-Pro Plus6.0软件考察给药区域血管新生的情况。结果显示, 与对照组比较, 云南昭通年青褐煤黄腐酸钠在100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下对HUVECs的增殖有抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$), 在100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时对迁移有抑制作用并能下调血管内皮生长因子VEGF的表达($P < 0.01$), 在高浓度800、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下能抑制CAM血管的新生($P < 0.05$)。研究结果表明, 云南昭通地区年青褐煤黄腐酸钠具有良好的血管新生抑制作用, 其机制可能与生长因子VEGF表达的下调有关。

关键词: 黄腐酸钠; 血管新生; 人脐静脉内皮细胞; 鸡胚绒毛尿囊膜; VEGF

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.026

Angiogenesis Effect of Sodium Fulvate Extracted from Young Lignite of Zhaotong Region in Yunnan Province

YANG Jing, HE Jing*, DING Ya-fang, ZHUANG Wen-ting, XIANG Chen, QIN Yi, LI Bao-cai

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: The purpose of the present study was to evaluate the effect of sodium fulvate on angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. Sodium fulvate was extracted from young lignite of Zhaotong region in Yunnan province. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and chick chorioallantoic membrane (CAM) were treated with different concentrations of sodium fulvate. MTT and scratch assays were applied to analyze HUVECs viability and migration. The expression of autocrine vascular endothelial growth factor (VEGF) in HUVECs was detected by ELISA method. Image-Pro Plus6.0 imaging software was used to quantify the area of the photoed blood vessels in CAM. Compared with the untreated group, sodium fulvate with the concentrations of 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can significantly inhibit proliferation of HUVECs ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the concentrations of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the migration of HUVECs was also inhibited and the expression of autocrine VEGF was down-regulated as well ($P < 0.01$). CAM assay results showed that the capillary vessels sprouts can be inhibited at the concentrations of 800 and 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$). In conclusion, sodium fulvate extracted from young lignite of Zhaotong region in Yunnan province showed anti-angiogenesis activity, which may be related to the down-regulation of VEGF expression.

Key words: sodium fulvate; angiogenesis; HUVECs; CAM; VEGF

血管新生(angiogenesis), 指原有毛细血管和/或毛细血管后微静脉基础上的新毛细血管形成, 涉及促血管生成因子分泌增加, 内皮细胞迁移、增生和浸润, 血管管腔形成等过程^[1]。血管新生异常可能导致癌症、糖尿病性眼病、类风湿性关节炎等疾病。

在众多促血管生成因子当中, 血管内皮生长因子(VEGF)是公认的介导血管新生的关键因素, 可强烈促使血管内皮有丝分裂并最终形成新生血管^[2,3]。目前, 抑制血管新生已成为心血管疾病、癌症和其它多种疾病的重要治疗策略。黄腐酸是腐植酸中分子量较小, 活性官能团多, 医疗效果最好的组分^[4]。传统医学认为, 腐植酸具有消炎、抗溃疡、止血活血等多种药理活性, 现代药理研究也证实腐植

酸及黄腐酸具有抗氧化、抗癌等作用,但其对血管新生作用的影响目前尚未见报道^[5,6]。本研究采用 HUVECs 及 CAM 模型对选自云南昭通地区的年青褐煤氧化降解所得黄腐酸钠进行抗血管新生活性评价,并对可能的影响机制 VEGF 作探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 药物

黄腐酸由本实验室依据文献^[7,8]方法提取、纯化,纯度达药用级别,褐煤原料采自云南昭通三善堂;ECM 内皮细胞培养基(ScienCell,批号:12160);VEGF ELISA 试剂盒(武汉博士德生物,批号:253973820);二甲基亚砜(DMSO, Amresco,批号:D0231)、四氮唑蓝(MTT, Solarbio,批号:705B0514)、胰蛋白酶(trypsin, HyClone,批号:J130020);甲醇(AR)、丙酮(AR)。

1.1.2 鸡胚

8日龄鸡胚购自昆明云岭广大种禽饲料有限公司(许可证号:滇 A090409)。

1.1.3 细胞

人脐静脉内皮细胞 HUVECs(ATCC: CRL-1730)购于上海复祥生物。

1.1.4 仪器

倒置显微镜(南京江南永新光有限公司),酶标仪(Perkin Elmer 公司),CO₂培养箱(Smartcell 公司),生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),电子天平(梅特勒-托利多仪器),离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 药物处理

黄腐酸在使用前用 PBS 定量溶解,NaOH 调 pH 至中性配制成钠盐,微孔滤膜除菌后根据实验需要稀释至所需浓度。

1.2.2 HUVECs 的培养

将购自于上海复祥生物的人脐静脉内皮细胞 HUVECs 培养于内皮细胞专用培养基中,置于 37℃,5% CO₂ 的培养箱中静止培养。待细胞长至对数生长期,PBS 清洗细胞再用 0.05% 胰酶消化传代,取 3~6 代细胞用于实验。

1.2.3 HUVECs 增殖抑制实验

采用 MTT 法^[9],取对数生长期的 HUVECs 以 8

×10³ 个/孔接种于 96 孔培养板中,每孔 180 μL 培养于 37℃,5% CO₂ 的培养箱内,24 h 后按对照组 PBS、黄腐酸钠组(终浓度为 10、25、50、100、200、400 μg/mL),每组 6 个复孔加样 20 μL 继续培养 48 h。每孔加入 20 μL 的 MTT(5mg/mL),孵育 4 h 后吸去上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 DMSO,振荡 10 min 使蓝色结晶充分溶解,酶标仪 490 nm 处测定吸光值。

1.2.4 HUVECs 迁移划痕实验

HUVECs 细胞迁移能力实验按照文献^[10]方法进行。HUVECs 以 3×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中,并用完全培养基在 37℃,5% CO₂ 条件下正常培养 24 h 后弃去培养液,换上只含有 0.5% FBS 的 ECM 培养液培养 24 h。然后,显微镜下观察细胞,在长至单层状态良好的细胞上用无菌 10 μL 加样枪头进行划痕,并用无血清培养液洗涤细胞 1~2 次,每孔随机选取三个划痕视野拍照记录,之后分别将终浓度为 25、50、100、200 μg/mL 的黄腐酸钠作用于细胞,以含 0.5% FBS 及相同加样量 PBS 的培养基作为空白对照组,加样 12 h 后在相应位置拍照记录,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析处理结果。

1.2.5 上清液 VEGF 含量检测

取对数生长期的 HUVECs 细胞以 5×10⁴ 个/孔接种至 24 孔板,37℃,5% CO₂ 培育箱内孵育,培养 24 h 后加入不同浓度梯度的黄腐酸钠使其终浓度为 10、25、50、100、200 μg/mL,以溶媒 PBS 作为空白对照。48 h 后再收集培养液,1200 rpm 离心 5 min 取上清液,按照人 VEGF ELISA 试剂盒操作步骤进行 VEGF 浓度测定。同时将各孔进行细胞计数,校正所测的吸光度值,最后根据样本的校正吸光度值,利用 CurveExpert1.4 软件在标准曲线上查得其含量。

1.2.6 CAM 血管新生测定^[11]

将购买的受精种蛋用巴氏消毒液消毒温水清洗后,在孵育箱中以 37℃,5% CO₂ 湿度适宜的条件孵育 7 d。在气室端开窗(1.0 cm×1.0 cm),用直径为 6 mm 的无菌滤纸片作为给药载体,放置于尿囊膜上,药物组向载体上加入 20 μL 配置好的黄腐酸钠溶液(浓度为 200、400、600、800、1200 μg/mL),空白对照组加入 20 μL 生理盐水。用透明胶带封窗后放入孵育箱继续孵 72 h,滴入固定液(甲醇-丙酮 1:1)将尿囊膜上的血管做固定处理,然后取下尿囊膜组织用数码相机微距拍照,Image-Pro Plus 6.0 图

像处理软件^[12]计算给药区域的血管面积。

1.2.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析,比较组间差异性, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 黄腐酸钠对 HUVECs 增殖的影响

与溶媒对照组比较,48 h 后 100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄腐酸钠能显著抑制 HUVECs 的生长($*P < 0.05$, $**P < 0.01$),且随药物浓度增加抑制效应增强,呈浓度依赖性效应,见图 1。

2.2 黄腐酸钠对 HUVECs 迁移的影响

不同浓度的黄腐酸钠作用于 HUVECs 12 h 后,

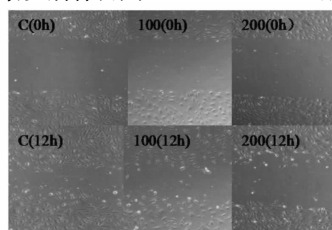


图 2 黄腐酸钠对 HUVECs 迁移率的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of sodium fulvate on the mobility of HUVECs

注: $\bar{x} \pm s, n = 3, **P < 0.01$,与对照组比较

Note: $\bar{x} \pm s, n = 3, **P < 0.01$,vs control

2.3 黄腐酸钠对 HUVECs 分泌 VEGF 的影响

如图 3 所示,ELISA 实验结果显示,用不同浓度的黄腐酸钠处理 HUVECs 细胞 48 h 后,培养基中的 VEGF 水平显著减少,与对照组相比,100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组有极显著统计学意义($**P < 0.01$)。

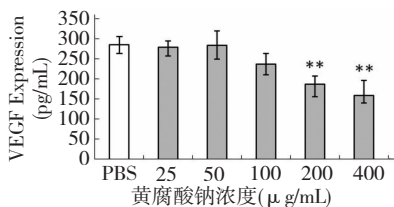


图 3 黄腐酸钠对 HUVECs 分泌 VEGF 的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of sodium fulvate on VEGF expression in HUVECs

注: $\bar{x} \pm s, n = 4, **P < 0.01$,与对照组比较

Note: $\bar{x} \pm s, n = 4, **P < 0.01$,vs control

2.4 黄腐酸钠对 CAM 模型血管生长的影响

不同浓度的黄腐酸钠作用于 CAM 模型 72 h 后,所取得的图像经 Image-Pro Plus 6.0 软件处理,

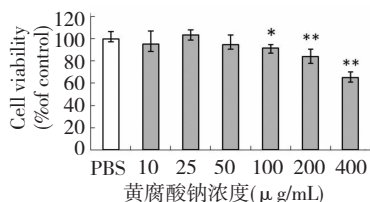


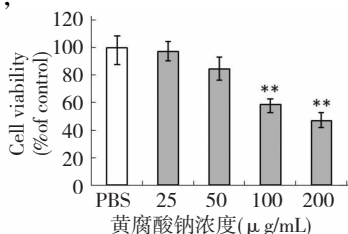
图 1 黄腐酸钠对 HUVECs 增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of sodium fulvate on HUVECs proliferation

注: $\bar{x} \pm s, n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01$,与对照组比较

Note: $\bar{x} \pm s, n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01$,vs control

随着黄腐酸钠浓度的增加,HUVECs 迁移率受到显著抑制,与对照组相比,100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组有极显著统计学意义($**P < 0.01$),见图 2。



计算出血管面积点数,结果显示黄腐酸钠在高浓度 800、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能显著抑制体内 CAM 模型血管的新生($*P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

黄腐酸用药历史悠久,早在明李时珍的《本草纲目》中就有类似腐植酸类物质的用药记载,近现代的研究也表明腐植酸及黄腐酸具有多种生理、药理活性,但由于腐植酸类物质是结构复杂的有机混合体系,加之其原料和腐化过程不同会导致其成分及功能活性不同,这也成为腐植酸医药应用研究进展缓慢的原因之一^[13],因此本研究以明确黄腐酸的来源为前提探讨其在血管新生方面的药理作用。

血管新生是一个复杂的多步骤过程,涉及到内皮细胞的增殖、迁移、分化和最后形成管状结构。正常情况下这些过程受到严密的调控,处于相对平衡的状态^[14]。但当机体出现某种疾病时,这种平衡机制就会被打破,如糖尿病,类风湿性关节炎和肿瘤等,造成血管异常增生^[15]。

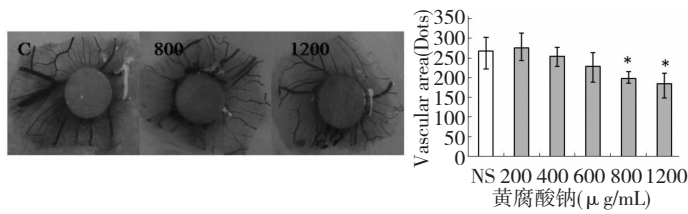


图4 黄腐酸钠作用于CAM后血管生长面积点数

Fig. 4 The dots of vascular area of CAM after treated with different concentrations of sodium fulvate

注: $x \pm s, n = 5, * P < 0.05$, 与对照组比较

Note: $x \pm s, n = 5, * P < 0.05$, vs control

目前,国内外对血管新生的基础研究主要有:鸡胚绒毛尿囊膜实验,血管内皮细胞培养,相关生长因子、胞外基质的研究等。本实验通过HUVECs和CAM模型考察了云南昭通地区年青褐煤氧化降解所得黄腐酸钠对血管新生作用的影响。实验研究发现,昭通年青褐煤黄腐酸钠在相对低的浓度(100、200、400 µg/mL)时能使VEGF表达下调,并抑制HUVECs的增值和迁移,此效应具有浓度依赖性;高浓度(800、1200 µg/mL)黄腐酸钠对CAM模型血管的新生呈现良好的抑制作用。

血管异常增生的过程涉及多种因子其中血管内皮细胞生长因子(VEGF)尤为重要,它能够高度特异性地作用于内皮细胞,诱导内皮细胞增殖、迁移,最后形成管腔^[16]。VEGF在生理性血管新生以及肿瘤血管新生过程中均可以有效的延长内皮细胞的生命,诱导内皮细胞表达抗凋亡蛋白。ELISA实验结果显示,不同浓度的昭通地区年青褐煤黄腐酸钠处理HUVECs细胞48h后,培养基中的VEGF水平显著减少($** P < 0.01$),其血管新生抑制作用机制可能与生长因子VEGF表达的下调有关。

综上所述,本研究证实了昭通地区年青褐煤黄腐酸钠对血管新生具有一定的抑制作用,此结果为昭通黄腐酸钠在以抗血管新生为机理的药物应用方面奠定了基础。

参考文献

- Li YJ(李玉娟), Duan CL(段昌令), Liu JX(刘建勋), *et al.* Effects of salvianolic acid A (sal A) on angiogenesis of the chick embryo chorioallantoic membrane. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 2634-2636.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*, 2013, 153: 13-19.
- Duan ZX(段泽星), Xie LQ(谢立群). Role of the vascular

endothelial growth factor signaling pathway in tumor growth and angiogenesis. *World Chin J Dig* (世界华人消化杂志), 2010, 18: 2894-2900.

- He J(何静), Bi YY(毕艳艳), Li BC(李宝才), *et al.* Hypoglycemic effect of fulvic acid and sodium fulvate on diabetic mice. *J Kunming Univ Sci Technol, Nat Sci Ed* (昆明理工大学学报, 自科版), 2011, 36(5): 64-69.
- Aeschbacher M, Graf C, Schwarzenbach RP, *et al.* Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*, 2012, 46: 4916-4925.
- Ting HC, Yen CC, Chen WK, *et al.* Humic acid enhances the cytotoxic effects of arsenic trioxide on human cervical cancer cells. *Environ Toxicol Pharm*, 2010, 29: 117-125.
- Zhang SH(张水花), Li BC(李宝才), Zhang HF(张惠芬), *et al.* Oxidation degradation technology with H₂O₂ for producing fulvic acids from brown coal and properties of products. *Chem Eng (China)* (化学工程), 2010, 38(4): 85-88.
- Zhang HF(张惠芬), Qin Y(秦谊), He J(何静), *et al.* Study on the purification technology of medicinal fulvic acid. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33: 296-302.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- Sato Y, Rifkin DB. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol*, 1988, 107: 1199-1205.
- Ribatti D, Nico B, Vacca A, *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec*, 2001, 264: 317-324.
- Xu Y(许扬), Zhao YK(赵英凯), Bi MG(毕明刚), *et al.* Quantitation of angiogenesis in chick chorioallantoic membrane using Image-Pro Plus software. *Chin J Compar Med* (中国比较医学杂志), 2007, 17: 745-747.