

常绿钩吻碱对人脐静脉内皮细胞迁移的影响

陈亮, 聂平平

(福州市中医院肿瘤内科, 福建 福州 350011)

摘要: **目的** 探讨常绿钩吻碱对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)迁移的影响。**方法** 常绿钩吻碱体作用于HUVEC细胞24 h后,显微镜观察各组HUVEC增殖及形态变化情况。CCK-8实验检测常绿钩吻碱干预48 h后各组HUVEC的增殖情况。划痕实验观察常绿钩吻碱干预后各组HUVEC迁移的情况。Western blot实验观察常绿钩吻碱对HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达情况的影响。**结果** 显微镜观察及CCK-8实验发现常绿钩吻碱可抑制HUVEC细胞增殖。 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 常绿钩吻碱作用48 h后,对HUVEC增殖的抑制率可达 $58.13\%\pm 2.20\%$ 。划痕实验表明常绿钩吻碱可抑制HUVEC的迁移。Western blot法观察到常绿钩吻碱可降低HUVEC的bFGF及VEGF-A蛋白的表达。**结论** 常绿钩吻碱能有效地抑制HUVEC的增殖及迁移,其机制可能与影响bFGF、VEGF-A蛋白表达相关。

关键词: 常绿钩吻碱;人脐静脉内皮细胞;迁移

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1004-6879(2026)03-0220-04

钩吻,为马钱科植物胡蔓藤[Gelsemium elegans(Gardn. et champ) Benth.]的全草,主要见于浙江省、福建省、广东省等地^[1]。有研究发现钩吻具有抗肿瘤、止痛、抗炎等功效^[2]。使用钩吻治疗恶性肿瘤在我国民间也有一定记录^[3]。另有研究表明^[4-5],钩吻中提取出的常绿钩吻碱也具有一定抗肿瘤作用。实体肿瘤的生长需要血液供应提供支持^[6]。血管组织是肿瘤生长微环境的重要组成部分,肿瘤血管的生成可以给肿瘤生长提供所需的营养物质,肿瘤细胞也可通过血管发生远端转移。肿瘤细胞也可通过分泌的蛋白酶,降解细胞外基质和血管周围基膜,协助新生内皮细胞移出微血管,进而发育形成新生血管^[7]。本文通过研究常绿钩吻碱对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)迁移的影响及相关机制,从抑制血管新生的角度出发,探讨常绿钩吻碱抗肿瘤作用的机制。

1 材料

1.1 药物与细胞

常绿钩吻碱,由昆山远慕公司提供(纯度>98%),用二甲基亚砜溶解备用。HUVEC细胞株,由广州吉妮欧公司提供。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM高糖培养基、青链霉素、BCA蛋白浓度测定

试剂盒(北京索莱宝公司),胰蛋白酶-EDTA(美国Gibco公司),胎牛血清(德国PAN biotech公司),细胞划痕实验插件(德国ibidi公司),ECL化学发光试剂(美国Thermo公司), β -actin一抗、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)一抗、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)一抗(武汉三鹰公司),96孔培养板、6孔培养板(美国Corning公司),细胞培养箱(上海精宏公司),倒置显微镜(广州明美公司),酶标仪(北京普朗新公司),化学发光仪(上海培清公司)。

2 方法

2.1 HUVEC细胞培养

用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖培养液置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2.2 显微镜观察

6孔培养板接种HUVEC细胞,培养24 h后,弃去原培养液,细胞分为对照组(用未含有常绿钩吻碱的培养液培养),实验组(用含常绿钩吻碱 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的培养液培养)。各组细胞再培养24 h后,用倒置显微镜观察各组细胞的形态及相互变化情况,并于100倍镜下拍照。

2.3 CCK-8实验

HUVEC细胞接种于96孔培养板,培养24 h,待细胞贴壁后,吸弃原培养液,分为调零组(仅培养液无细胞),

资助项目:福建省自然科学基金项目(2023J011562)

作者简介:陈亮(1988—),男,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合肿瘤基础与临床;E-mail:chenliangraul@sina.com。

对照组(HUVEC用未含有常绿钩吻碱的培养液培养)以及实验组(HUVEC用含常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的培养液培养),每组各6个复孔,培养48 h后,每孔加入10%的CCK-8溶液,继续培养1 h,酶标仪于450 nm处测定5组吸光度值(即OD值),计算实验组细胞生长的抑制率,抑制率=[1-(实验组OD值-调零组OD值)/(对照组OD值-调零组OD值)] $\times 100\%$ 。

2.4 划痕实验

将细胞划痕实验插件(ibidi细胞插件)紫外消毒30 min后置入24孔板中,再将HUVEC细胞悬液接种于24孔板中,当细胞长满培养孔时,用镊子将ibidi细胞插件提出,用不含血清的DMEM高糖培养液冲洗2遍,将漂浮的细胞冲洗干净。细胞分为对照组(用未含有常绿钩吻碱的培养液培养)以及实验组(用含常绿钩吻碱分别为 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的培养液培养),每组3个复孔,将各组细胞药物干预前及药物干预后24 h取出至100倍镜下拍照,每孔分别取3处视野,观察细胞划痕愈合的情况,并计算细胞迁移率,细胞迁移率=(1-干预前划痕宽度/干预后划痕宽度) $\times 100\%$ 。

2.5 蛋白印迹法(Western blot)检测HUVEC细胞bFGF、VEGF-A蛋白表达情况

HUVEC细胞接种于6孔板,同2.4步骤分组后,药物干预培养24 h, PBS洗涤2次,收集细胞,加入细胞裂解液,裂解20 min,收集细胞裂解上清液,BCA法测定各组HUVEC的蛋白含量。蛋白样品稀释至同一浓度后, $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴变性5 min,上样到SDS聚丙烯酰胺凝胶,接着进行电泳分离。将蛋白转至PVDF膜,牛血清白蛋白封闭2 h。封闭完成后将PVDF膜放入装有一抗(β -actin 1:4 000、bFGF 1:500、VEGF-A 1:2 000稀释)的抗体杂交盒中,孵育过夜, TBST洗膜3次。洗膜完毕后,放入兔二抗中室温孵育2 h, TBST漂洗3次, ECL化学发光显色, β -actin作为内参蛋白,化学发光仪进行显色分析,实验重复3次。

2.6 统计学处理

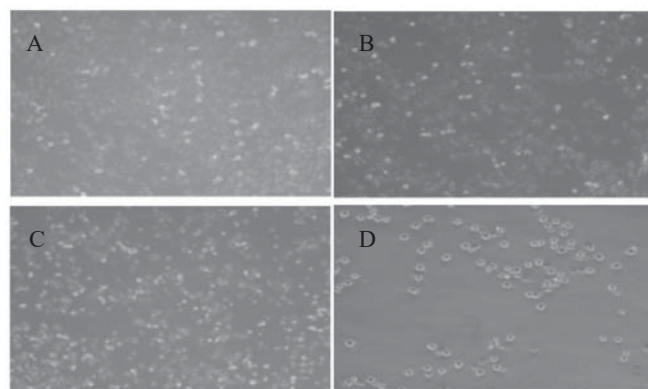
采用SPSS 18.0软件进行统计分析,实验数据使用($\bar{x}\pm s$)描述,组间使用单因素方差分析进行数据分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态观察

无常绿钩吻碱干预的对照组HUVEC细胞核清晰,

细胞质均匀,细胞的生长状况良好。当 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的常绿钩吻碱作用24 h后,可观察到HUVEC数量减少,体积缩小,细胞出现悬浮、脱落、死亡现象,常绿钩吻碱的浓度越高, HUVEC生长状态越差。 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的常绿钩吻碱组中HUVEC细胞已大量死亡。实验结果显示常绿钩吻碱可明显影响HUVEC的生长状况。

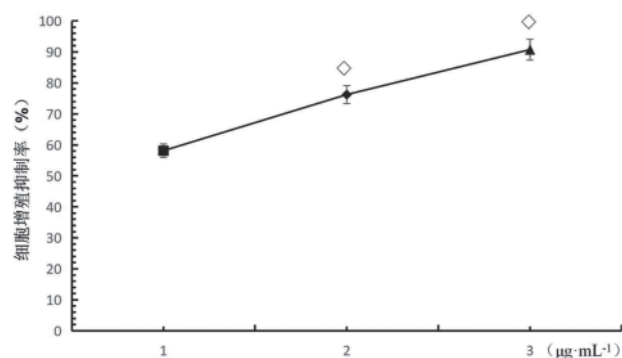


注:A.对照组;B.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图1 各组HUVEC生长情况($\times 100$)

3.2 常绿钩吻碱对HUVEC细胞增殖的影响

$1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的常绿钩吻碱干预48 h后, HUVEC的增殖受到明显抑制($P<0.05$), HUVEC增殖的抑制率分别为 $58.13\%\pm 2.20\%$, $76.24\%\pm 2.89\%$, $90.77\%\pm 3.37\%$ 。随着药物浓度的提高,常绿钩吻碱对HUVEC增殖的抑制率也逐渐加强,表明常绿钩吻碱可明显抑制HUVEC的增殖。



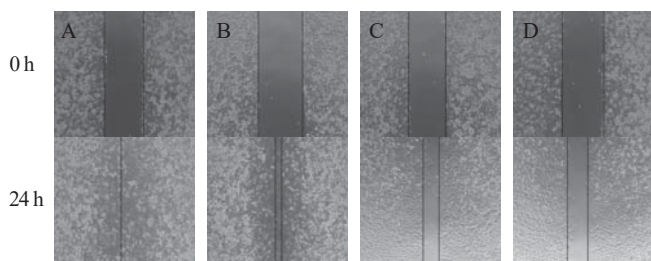
注:A.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;B.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;与A组相比, $\diamond P<0.05$ 。

图2 各实验组HUVEC增殖的抑制率

3.3 划痕实验

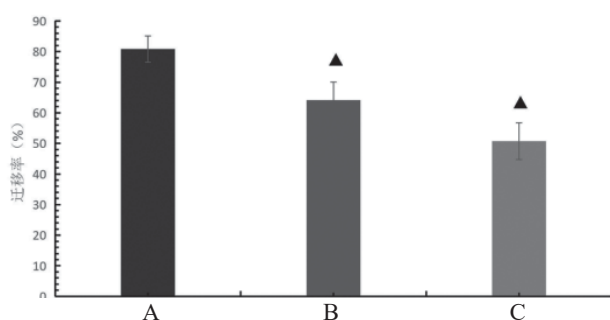
对照组细胞生长24 h后已覆盖划痕区域,常绿钩吻碱干预24 h后,实验组HUVEC生长至划痕区域细胞数少于

对照组,而且随着常绿钩吻碱浓度的增加,划痕区域的宽度也逐渐增加,表明HUVEC细胞迁移率逐渐下降($P<0.05$)。



注:A.对照组;B.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图3 各组HUVEC迁移情况($\times 100$)

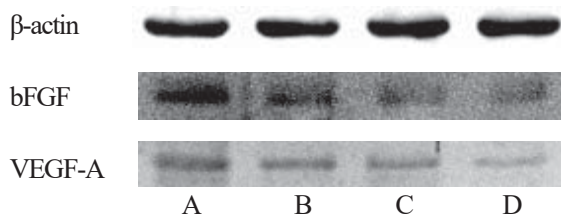


注:A.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;B.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;与A组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图4 实验组HUVEC迁移率

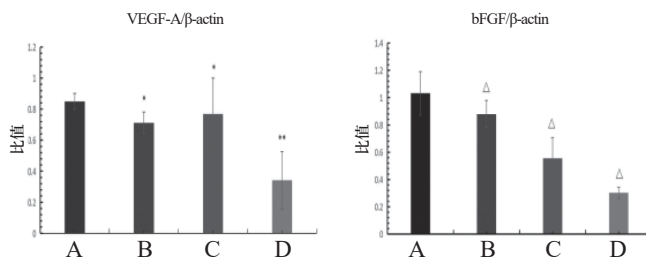
3.4 bFGF、VEGF-A蛋白表达

与对照组相比,各实验组HUVEC的bFGF蛋白表达逐渐降低($P<0.05$),常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组HUVEC的VEGF-A蛋白表达与对照组无明显差别($P>0.05$),常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组HUVEC的VEGF-A蛋白表达明显低于对照组($P<0.05$),表明常绿钩吻碱可降低HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达。



注:A.对照组;B.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图5 Western blot检测各组HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达的电泳情况



注:A.对照组;B.常绿钩吻碱 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;C.常绿钩吻碱 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D.常绿钩吻碱 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;与A组相比, $\Delta P<0.05$, $*P>0.05$, $**P<0.05$ 。

图6 各组HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达情况

4 讨论

抗血管生成治疗可协助肿瘤血管的正常化,能有效地抑制肿瘤发展,还有利于提高化疗药物作用的疗效^[8]。多种促血管生成因子被证实可促进血管新生。bFGF可促进血管内皮细胞以及成纤维细胞增殖,进而促进肿瘤血管新生^[9]。VEGF是目前已知促血管生成因子中作用力最强的因子,可促进肿瘤细胞通过血液向远端发生转移^[10]。VEGF-A是VEGF家族的成员之一,与bFGF均是促血管生成因子中的重要成员,可诱导肿瘤血管新生,促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[11-12]。肿瘤血管新生还可以影响肿瘤微环境中免疫细胞的浸润和功能^[13]。抑制促血管生成因子表达,从而抑制肿瘤血管新生,也是抗肿瘤治疗的研究方向之一。

中药含有的生物碱成分可通过调控肿瘤细胞增殖、侵袭,促进肿瘤细胞凋亡等途径起到抗肿瘤作用^[14]。本研究通过钩吻中含有的常绿钩吻碱作用于HUVEC,发现常绿钩吻碱可降低HUVEC的增殖及迁移能力,Western blot检测发现常绿钩吻碱还可抑制HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达。以上研究表明常绿钩吻碱可能通过抑制HUVEC的bFGF、VEGF-A蛋白表达起到抑制HUVEC增殖及迁移的作用,提示常绿钩吻碱具有一定抗肿瘤血管新生的作用,这也可能是其抗肿瘤效应的机制之一,也可为开发利用常绿钩吻碱的抗肿瘤作用提供相关理论支持。

肿瘤的发病原因复杂,肿瘤血管新生与肿瘤生长微环境的形成密切相关。抗血管新生药物也可对肿瘤微环境产生一定调控作用,但是通过单一抑制某一靶点来抑制血管新生,则可能导致出现耐药性^[15]。中药抗肿瘤治

疗具有多成分、多途径、多靶点的特点,筛选中药抗肿瘤血管新生的有效成分,并研究相关作用机制,也有助于中药抗肿瘤作用的深入研究。

参考文献

- [1] 陈冀胜. 中国有毒植物[M]. 北京:科学出版社,1987:371-376.
- [2] 高汉云,王翠雪,黄宇如,等. 钩吻配伍玉叶金花对大鼠脏器组织病理形态改变及扭体镇痛实验研究[J]. 药学研究,2020,39(1):7-10.
- [3] 刘道荣,黄文斌,杨鹏,等. 钩吻应用研究的进展[J]. 时珍国药研究,1995,6(1):41-43.
- [4] 李高攀,王文义,任丽,等. 常绿钩吻碱抑制人神经胶质瘤U251细胞增殖的体内外作用特征[J]. 药学报,2021,56(3):786-792.
- [5] 陈亮,聂平平. 常绿钩吻碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. 中国民族民间医药,2024,33(6):20-24.
- [6] Luo QX, Wang J, Zhao WY, et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 19.
- [7] 何伟,张亚密,胡勇,等. 肿瘤微环境新生血管的病络机制[J]. 天津中医药,2021,38(12):1553-1556.
- [8] 闫旭,郭影,孙冬琳,等. 肿瘤抗血管生成治疗耐药机制[J]. 遗传,2024,46(11):911-919.
- [9] 苗琴,刘亚敏. 血清肿瘤异常蛋白与碱性成纤维细胞生长因子在宫颈癌中的表达水平及临床意义探讨[J]. 系统医学,2023,8(16):30-33.
- [10] 刘志敏,张君利,牟忠颜,等. 中药单体抗肿瘤血管生成及机制研究进展[J]. 中医药导报,2019,25(8):44-47.
- [11] 赵方. 不同病理类型非小细胞肺癌的VEGF-A和VEGFR-2表达[J]. 实用癌症杂志,2024,39(12):1949-1952.
- [12] 陈亮. 基于抗血管生成作用探讨中药抗肿瘤作用[J]. 中国医学创新,2025,22(1):170-174.
- [13] 曹赛雅,陈超,王杰. 肿瘤血管新生在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 肿瘤,2023,43(7):626-634.
- [14] 王映荷,李明奇,赵晓璐,等. 常见中药生物碱药理作用及临床应用的研究进展[J]. 华西药学杂志,2025,40(1):95-99.
- [15] 蒋伶俐,毛启远,李道睿. 通络活血虫类中药在抗恶性肿瘤血管生成中的研究现状[J]. 世界中医药,2024,19(6):910-915.

(收稿日期:2025-03-28)

透骨血竭散内服治疗关节炎的作用机制分析

程倩倩¹,张亚丽²

(1.南阳市第八人民医院药房,河南 南阳 473000;2.河南中医药大学第三附属医院药学部,河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨透骨血竭散内服对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠炎症因子的调控作用及对JAK/STAT、NF- κ B信号通路的干预机制。**方法** 将48只斯泼累格-多雷(SD)大鼠随机分为正常对照组(NC)、模型对照组(Model)、甲氨蝶呤组(MTX, 1mg·kg⁻¹)及透骨血竭散高剂量组(TGS-H, 10g·kg⁻¹),建立CIA模型后干预28 d。检测关节肿胀度、血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-17A(IL-17A)水平,采用游标卡尺测量关节肿胀度,通过酶联免疫法检测血清炎症因子水平,借助 HE 染色观察滑膜组织病理变化,运用Western Blot技术分析JAK/STAT、NF- κ B 通路蛋白磷酸化水平。**结果** 与 Model组相比,TGS-H组造模后28~42 d关节肿胀度显著降低($P<0.05$),血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17A 水平分别下降 43.7%、43.4%、45.0%、34.3%(均 $P<0.01$),其中 IL-17A 水平低于 MTX 组($P<0.05$)。病理显示 TGS-H 组滑膜细胞增生减轻,炎症细胞浸润减少,病理评分(4.12 $\pm$ 0.78 vs Model 组7.23 $\pm$ 1.05, $P<0.01$)。机制上,TGS-H 组显著抑制 p-STAT3/STAT3、p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 蛋白磷酸化($P<0.05$),对p-I κ B α /I κ B α 的抑制作用强于MTX组($P<0.05$)。**结论** 透骨血竭散通过抑制 JAK/STAT、NF- κ B 信号通路磷酸化级联反应,下调 TNF- α 、IL-17A等促炎因子表达。