

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.09.015

实验研究

活血益气方及其拆方对缺氧人脐静脉内皮细胞增殖和凋亡的影响

成文堃¹, 祁轶斐¹, 陈萌², 姜利霞¹, 董玢¹, 赵一舟¹, 金秋硕¹, 任学娇¹, 朱珂¹, 张冬梅^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京中医药大学基础医学院)

摘要 目的 探讨活血益气方及其拆方促进血管新生的可能作用机制。方法 建立人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 缺氧损伤模型, 分为模型组、活血益气方组、活血方组及益气方组。另设正常对照组常规培养。活血益气方组、活血方组及益气方组给予含 10% 相应药物血清培养, 模型组及正常对照组给予生理盐水血清培养, 干预 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞增殖, Annexin V-FITC/PI 双染法检测 HUVEC 凋亡, WST-1 法测定细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 微板法测定丙二醛 (MDA) 含量及细胞培养上清乳酸脱氢酶 (LDH) 含量, 实时荧光定量 PCR 法检测细胞蛋白激酶 C (PKC)、Ras、Raf-1 mRNA 水平。结果 与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 增殖明显减少, SOD 活力及 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 均显著下降, 细胞凋亡及 MDA、LDH 含量明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 活血益气方组、活血方组及益气方组 HUVEC 增殖均显著增加, LDH 含量均显著降低, 活血益气方组 SOD 活力显著提高, 活血益气方组、活血方组细胞凋亡显著减少, 活血益气方组、益气方组 MDA 含量显著降低, PKC、Ras、Raf-1 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 活血益气方及其拆方可不同程度地促进缺氧后 HUVEC 增殖并抑制其凋亡, 可能与增强细胞抗氧化能力和调节 PKC/Ras/Raf-1 信号通路有关; 活血益气方对细胞的保护作用优于活血方和益气方, 二者发挥协同作用。

关键词 缺血性心脏病; 细胞缺氧损伤; 活血益气方; 人脐静脉内皮细胞; 血管新生; 增殖; 凋亡

近年来, 血管新生已成为实现缺血性心脏病心肌缺血区“自我搭桥”的关键手段^[1]。血管新生是在原有的脉管系统基础上形成新的血管的复杂过程, 血管内皮细胞在此过程中发挥了重要作用, 包括动员骨髓中的内皮祖细胞诱导分化成内皮细胞, 促进内皮细胞增殖并穿过血管壁发生迁移, 在原有的毛细血管基础上形成血管芽后, 通过进一步构建血管结构建立起有效的侧支循环^[2]。由此可见, 血管内皮细胞的增殖是新生血管形成的物质基础, 内皮细胞的增殖、迁移及其完整性是血管新生的必要条件之一。

活血益气方是针对缺血性心脏病尤其是冠心病气虚血瘀病机而构建的临床经验方, 前期研究证实本方可促进大鼠心肌梗死后血管新生, 改善心肌缺

血^[3]。本研究通过建立人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 缺氧模型, 观察活血益气方及其拆方对缺氧 HUVEC 增殖和凋亡的影响, 以揭示活血益气方促进血管新生的可能细胞机制及配伍规律。

1 材料

1.1 细胞和动物

原代 HUVEC (货号: 8000) 购自 ScienCell 研究实验室。SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠 32 只, 7 周龄, 体重 230 ~ 250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2012-0001。

1.2 药物

活血益气方组成: 黄芪 60 g, 党参 60 g, 丹参 10 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g, 红花 10 g; 益气方组成: 黄芪 60 g, 党参 60 g; 活血方组成: 丹参 10 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g, 红花 10 g。所有药物均采用免煎颗粒, 由北京康仁堂医药有限公司生产。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273694), 北京中医药大学 2016 年度校级课题在读研究生项目 (2016 - JYB - XS139)

* 通讯作者: chaweto@126.com, (010) 84013229

1.3 主要试剂和仪器

ECM 培养基 (批号: 1001)、胰酶/EDTA 消化液 (批号: 0103)、胰酶中和液 (批号: 0113)、牛源纤维粘连蛋白 (批号: 8248), 均由 ScienCell 研究实验室提供; 磷酸盐缓冲液 (DPBS, 批号: D1040-500, Solarbio 科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (批号: CK04, 日本同仁化学研究所); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒 (批号: KGA107, 南京凯基生物科技发展有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: A001-3)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: A003-4)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (批号: A020-2), 均由南京建成生物工程研究所提供; Trizol 试剂 (批号: 15596026, Ambion 公司); 反转录试剂盒 (批号: K1662, ThermoFisher Scientific); SYBR Select Master Mix (批号: 4472908, Applied Biosystems)。EQR/GL-41A 超净工作台 (ESCO 公司), IMT-2 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), MCO-20AIC CO₂ 细胞培养箱 (SANYO 公司), MiniGalaxy A 三气培养箱 (RS biotech 公司), Varioskan Flash 多功能微孔板检测仪 (Thermo Scientific 公司), Cytomics FC 500 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司), GeneAmp PCR system 9700 基因扩增仪 (美国 AB 公司), Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦科技公司), Gene Quant 紫外分光光度计 (Pharmacia Biotech 公司)。

2 方法

2.1 药物血清制备

将 32 只大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、活血益气方组、活血方组和益气方组, 每组 8 只。参考文献 [6], 按照活血益气方组 16.086 g/(kg·d), 活血方组 4.0164 g/(kg·d), 益气方组 12.0492 g/(kg·d) 的剂量给予大鼠相应药物灌胃, 正常对照组灌服等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 7 天。采血前 12 h 禁食不禁水, 末次给药后 1 h 无菌腹主动脉取血, 3000 r/min 离心 10 min 分离血清, 合并同组血清, 56℃ 灭活 30 min, 分装, -20℃ 冻存备用。

2.2 细胞培养、造模及分组

将 HUVEC 复苏至纤维粘连蛋白预包被的 75 cm² 培养瓶中, 加入 15 ml 完全 ECM 培养基 (含 5% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长添加物、10 000 U/ml 青霉素、10 000 μg/ml 链霉素), 37℃、5% CO₂ 培养箱常规培养, 2 天换液 1 次, 待细胞融合至 80% ~

90% 时传代, 实验用第 4 代细胞。

取对数生长期的 HUVEC, 用完全 ECM 培养基制成相应浓度的单细胞悬液, 均匀接种于培养板中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养 24 h 使细胞贴壁, 换用含 0.5% 胎牛血清的 ECM 培养基同步化 24 h。将细胞分为正常对照组、模型组、活血益气方组、活血方组、益气方组。参考文献 [4], 将模型组、活血益气方组、活血方组、益气方组细胞置于 37℃、1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 缺氧培养箱中培养 24 h, 建立缺氧 HUVEC 细胞模型。正常对照组细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。造模后各给药组换用含 10% 活血益气方、活血方、益气方药物血清的 ECM 培养基, 正常对照组和模型组换用含 10% 生理盐水血清的 ECM 培养基干预 24 h。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖情况

将细胞按 5×10^3 个/孔均匀接种于 96 孔板中, 按 2.2 所述方法造模及干预后, 吸弃上清, 将 CCK-8 溶液按 1: 10 的比例与不含血清的 ECM 培养基混匀后以 100 μl/孔加入细胞中, 培养箱中孵育 2.5 h, 多功能微孔板检测仪测定 450 nm 波长处各组的吸光度值。每组设 6 个复孔。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

将细胞按 3×10^5 个/孔均匀接种于 3.5 cm² 的培养皿中, 按 2.2 所述方法造模及干预后, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒说明书, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, DPBS 洗涤细胞两次, 每个样本收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 细胞, 用 500 μl Binding Buffer 重悬细胞后, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀, 再加入 5 μl PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测各组细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率, 并计算细胞总凋亡率。每组设 3 个复孔。

2.5 WST-1 法测定细胞内 SOD 活力, 微板法测定 MDA 含量及细胞培养上清 LDH 含量

将细胞按 1×10^5 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按 2.2 所述方法造模及干预后, 吸取各组细胞培养上清液测定 LDH 含量, 每组设 6 个复孔。将细胞刮下, 按照试剂盒说明书进行操作, 测定细胞中 SOD 活力及 MDA 含量, 每组设 3 个复孔。

2.6 实时荧光定量 PCR 法检测细胞蛋白激酶 C (PKC)、Ras、Raf-1 mRNA 水平

将细胞按 1×10^5 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 按 2.2 所述方法造模及干预后, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 紫外分光光度计测定吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀,

计算其浓度及纯度。按照反转录试剂盒说明书将所提取的 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。每组设 5 个复孔。循环参数: 预变性 95℃ 10 min, 变性 95℃ 1 min, 退火 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 20 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参照。目的基因引物由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成, 引物序列: PKC, 上游: 5'-CACGAGGTGAAGGACCACAA-3', 下游: 5'-CAAACCTTGGCACTGGAAGCC-3'; Ras, 上游: 5'-TCAAACGGGTGAAGGACTCG-3', 下游: 5'-TTGTGCTGCGTCAGGAGAG-3'; Raf-1, 上游: 5'-CCGC-CCGAGAGTCTTAATCG-3', 下游: 5'-AAAAAG-GCAGCAGAAAGCCG-3'; GAPDH, 上游: 5'-CTC-CAAAATCAAGTGGGGCG-3', 下游: 5'-TGGTTCA-CACCCATGACGAA-3'。所得 CT 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法均一化处理。

2.7 统计学方法

采用 SAS 9.13 统计软件进行分析, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 HUVEC 增殖及上清 LDH 含量比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 增殖显著减少, LDH 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 活血益气方组、活血方组及益气方

表 1 各组 HUVEC 增殖及上清 LDH 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	HUVEC 增殖 (OD 值)	LDH (U/L)
正常对照组	6	1.282 ± 0.045	275.068 ± 61.370
模型组	6	0.550 ± 0.088*	346.362 ± 24.425*
活血益气方组	6	0.761 ± 0.045*△△	247.738 ± 35.651△△
活血方组	6	0.686 ± 0.090*△△	298.575 ± 33.194△△
益气方组	6	0.705 ± 0.033*△△	276.291 ± 20.504△△

注: HUVEC, 人脐静脉内皮细胞; LDH, 乳酸脱氢酶; 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与活血益气方组比较, ▲ $P < 0.05$

组 HUVEC 增殖均显著增加, LDH 含量均显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且活血益气方组 LDH 含量明显低于活血方组 ($P < 0.05$)。

3.2 各组 HUVEC 凋亡比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 晚期凋亡率及总凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 活血方组、益气方组 HUVEC 早期凋亡率显著降低, 活血益气方组、活血方组 HUVEC 晚期凋亡率及总凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 各组 HUVEC SOD 活力及 MDA 含量比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组 SOD 活力显著下降, MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 活血益气方组 SOD 活力显著提高, 活血方组和益气方组 SOD 活力显著降低, 且活血方组和益气方组 SOD 活力显著低于活血益气方组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 活血益气方组、益气方组 MDA 含量显著降低, 且益气方组显著低于活血益气方组, 活血方组显著高于活血益气方组 ($P < 0.01$)。

3.4 各组 HUVEC 中 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 水平比较

表 3 示, 与正常对照组比较, 模型组细胞 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 均显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 活血益气方组、益气方组细胞 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 水平显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 活血方组细胞 Raf-1 mRNA 显著上升 ($P < 0.01$)。活血益气方组 PKC、Ras mRNA 显著高于活血方组和益气方组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

冠心病在中医中属“胸痹”“心痛”“真心痛”范畴。《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证治》云“阳微阴弦, 即胸痹而痛。”心肌梗死初期表现为以血瘀为主的损伤, 瘀久伤正则易致心气虚, 最终形成以气虚血瘀为特点的本虚标实之证^[8]。

表 2 各组 HUVEC 凋亡及细胞中 SOD 活力、MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	早期凋亡率 (%)	晚期凋亡率 (%)	总凋亡率 (%)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
正常对照组	3	22.067 ± 1.106	10.167 ± 1.716	32.233 ± 1.762	165.175 ± 12.804	0.455 ± 0.027
模型组	3	24.100 ± 2.568	26.600 ± 2.691**	50.367 ± 6.127**	143.512 ± 7.201*	0.706 ± 0.059**
活血益气方组	3	19.900 ± 3.451	19.433 ± 4.552***△△	39.333 ± 5.700△	171.442 ± 13.807△△	0.569 ± 0.022***△△
活血方组	3	17.667 ± 4.216△	15.367 ± 4.55*△△	33.033 ± 8.000△△	120.333 ± 4.583***△△▲	0.705 ± 0.036***△▲
益气方组	3	16.467 ± 0.945△	25.167 ± 1.124***▲	41.633 ± 0.208	105.090 ± 2.741***△△▲	0.350 ± 0.033***△△▲

注: HUVEC, 人脐静脉内皮细胞; SOD, 超氧化物歧化酶; MDA, 丙二醛; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与活血益气方组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 3 各组 HUVEC 中 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 水平比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PKC	Ras	Raf-1
正常对照组	5	1.057 ± 0.420	1.006 ± 0.056	1.023 ± 0.251
模型组	5	0.551 ± 0.142 [*]	0.344 ± 0.013 ^{**}	0.393 ± 0.081 ^{**}
活血益气方组	5	1.636 ± 0.686 ^{*△△}	0.897 ± 0.166 ^{△△}	0.605 ± 0.096 ^{**△}
活血方组	5	0.854 ± 0.218 [▲]	0.461 ± 0.062 ^{*▲▲}	0.639 ± 0.153 ^{*△△}
益气方组	5	1.077 ± 0.106 ^{△▲▲}	0.634 ± 0.033 ^{*△}	0.644 ± 0.084 ^{*△△}

注: PKC, 蛋白激酶 C; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与活血益气方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

活血益气方是基于活血益气法构建的临床经验方, 方中黄芪、党参益气生血, 丹参、川芎、赤芍、红花活血祛瘀, 全方具有扶正祛邪、标本兼顾的特点。研究表明, 活血益气方及其拆方对心肌梗死后心力衰竭大鼠的心脏功能和左室重构均有明显的改善作用^[6-7], 作用机制可能与促进心肌梗死后的血管新生有关。

SOD 是生物体内重要的天然抗氧化酶, 是清除氧自由基的首要物质, 其活性是反映机体抗氧化能力的指标^[8]。MDA 作为自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物, 能导致蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合造成细胞毒性^[9]。细胞受损时细胞膜破坏, 导致 LDH 从细胞内溢出, 故其含量可反映细胞膜的完整性及细胞损伤程度^[10]。本研究发现, 活血益气方及其拆方均可明显减少不同时期的缺氧 HUVEC 凋亡。活血益气方组 SOD 活力明显较模型组增加, 活血益气方组、益气方组 MDA 含量明显减少, 活血益气方组、活血方组、益气方组 LDH 含量均明显减少, 提示活血益气方及其拆方均可不同程度地减轻缺氧对细胞造成的氧化损伤, 提高抗氧化能力, 从而减轻血管内皮细胞的凋亡。活血方可明显改善细胞凋亡, 但对 SOD 活力及 MDA 含量并没有明显的影响, 其具体机制有待进一步明确。有研究表明, 黄芪、人参总皂苷、赤芍总苷、川芎总酚酸、丹酚酸等对血管内皮细胞缺氧损伤均具有显著的保护作用^[8-11], 为我们的研究结果提供了一定的依据。

PKC 是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物, 广泛分布于多种组织、器官和细胞中。研究表明, 血管内皮生长因子 (VEGF) 能够诱导 PKC ϵ 亚型在 HUVEC 中进行重新分配, 同时 PKC 参与调控了 VEGF 激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的过程^[12], 采用化学抑制剂抑制 PKC 活性可阻断 VEGF 诱导的血管生长^[13], 提示 PKC 可被 VEGF 激活进而对促进内皮细胞增殖发挥重要作用。有研究表明, 由 VEGF 激活的血管新生关键酶一氧化氮

合成酶 (NOS) 影响内皮细胞的应答也依赖于 PKC 的活性^[14]。我们的前期研究发现, 活血益气方不仅可以增加大鼠心梗边缘区微血管密度及 VEGF mRNA 和蛋白的表达^[15], 还可促进转染 VEGF 165 基因的 HUVEC 分泌 NO 及内皮型一氧化氮合成酶 (eNOS)^[16]。本实验结果显示, 活血益气方及其拆方可显著促进缺氧 HUVEC 增殖, 并明显上调 PKC、Ras、Raf-1 mRNA 水平, 提示活血益气方及其拆方可能是通过调控 PKC 活性, 激活 Ras/Raf-1 信号通路, 进而促进 NO 及 eNOS 的合成来参与 VEGF 诱导的内皮细胞增殖及血管新生的过程。

综上所述, 活血益气方及其拆方可促进缺氧后 HUVEC 增殖与存活, 减少细胞凋亡, 其机制可能与减轻细胞氧化损伤及调控 PKC/Ras/Raf-1 信号通路有关, 这可能是活血益气方促进治疗性血管新生的作用机制之一。从综合角度来看, 活血益气方对血管内皮细胞的保护作用要优于活血方和益气方, 活血方和益气方具有协同配伍的作用。

参考文献

- 王培利, 雷燕, 陈可冀. 血管新生: 治疗心血管疾病的新策略 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(2): 173-176.
- FERRARA N, KERBEL RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature, 2005, 438(7070): 967-974.
- 郑瑞玲, 陈萌, 吴爱明, 等. 活血益气方及其拆方对大鼠心肌梗死边缘区血管内皮生长因子及其上游调控因子 miR-426 的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(12): 1061-1064.
- 李娜, 吴世政, 张淑坤. 脉络宁注射液对血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(11): 1273-1277.
- 吴爱明, 赵明镜, 张冬梅, 等. 心梗后心力衰竭模型大鼠中医证候特点及心脏的超声评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 227-230.
- 陈金星, 王硕仁, 朱陵群, 等. 心肌梗死后心力衰竭大鼠心脏基因表达谱及活血益气方药对其心脏的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(1): 45-48.
- 赵明镜, 王硕仁, 李敏, 等. 早期应用活血和益气中药抑

- 制心衰大鼠左室重构和凋亡的对比研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 710-714.
- [2] 顾俊菲, 封亮, 袁嘉瑞, 等. 赤芍总苷、川芎总酚酸组分组成结构对缺氧损伤人脐静脉内皮细胞的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 920-926.
- [3] 张晶, 王大新, 何胜虎, 等. 卡托普利与黄芪对氧化损伤人脐静脉内皮细胞保护作用的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(8): 891-895.
- [4] 黄琦, 邓雯雯, 许家鸾, 等. 人参总皂苷对波动性高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 500-504.
- [5] 韩秀娟, 刘丹, 封亮, 等. 丹酚酸组分中 7 种酚酸类成分对缺氧损伤的人脐静脉内皮细胞保护作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1107-1112.
- [6] WU LW, MAYO LD, DUNBAR JD, et al. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induc-

- tion of endothelial cell proliferation [J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 5096-5103.
- [7] FRIEDLANDER M, BROOKS PC, SHAFFER RW, et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins [J]. Science, 1995, 270(5241): 1500-1502.
- [8] SEYMOUR LW, SHOAIBI MA, MARTIN A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates protein kinase C-dependent phospholipase D activity in endothelial cells [J]. Lab Invest, 1996, 75(3): 427-437.
- [9] 张冬梅, 吴爱明, 姜利霞, 等. 活血益气方对心梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(8): 1602-1604, 1630.
- [10] 张冬梅, 陈萌, 吴爱明, 等. 活血益气方药物血清对转染 VEGF165 脐静脉内皮细胞分泌 NO、eNOS 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(10): 1225-1227.

Effect of *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方) and Its Decomposed Recipes on Proliferation and Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Hypoxia

CHENG Wenkun¹, QI Yifei¹, CHEN Meng², LOU Lixia¹, DONG Bin¹, ZHAO Yizhou¹, JIN Qiushuo¹, REN Xuejiao¹, ZHU Ke¹, ZHANG Dongmei¹

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. Preclinical Medical School of Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To discuss the potential mechanism of *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方) and its decomposed recipes in promoting angiogenesis. **Methods** The model of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) in hypoxia was built and divided into the model group, *Huoxue Yiqi Fang* (HYF) group, *Huoxue Fang* (HF) group and *Yiqi Fang* (YF) Group. There was also a control group set in conventional cultivation. The three Chinese medicine groups were cultivated by 10% serum containing corresponding herbs, while the model group and the control group were by serum containing normal saline. They were all intervened for 24 hours. The cell proliferation was detected by CCK-8 method, the HUVEC apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining, and the super oxide dismutase (SOD) activity was detected by WST-1 method, the malondialdehyde (MDA) volume and the lactate dehydrogenase (LDH) volume in cell culture supernatant were detected by microplate test, and the mRNA levels of protein kinase C (PKC), Ras and Raf-1 were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, in the model group, the HUVEC proliferation, the SOD activity and the PKC, Ras, Raf-1 mRNA declined significantly, and the apoptosis and MDA and LDH volume increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, in the HYF group, HF group and YF group, HUVEC proliferation increased significantly, LDH volume decreased significantly; SOD activity in HYF Group improved significantly; the apoptosis in HYF group and HF group descended significantly; the MDA volume in HYF group and YF group reduced significantly, while the PKC, Ras and Raf-1 mRNA volume ascended significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** HYF and its decomposed recipes could promote the proliferation of HUVEC in hypoxia and inhibit its apoptosis in varying degrees. The mechanism may be enhancing the cellular antioxidant activity and regulating PKC/Ras/Raf-1 signaling pathway. HQF could protect cells better than HF and YF, so HF and YF coordinate together.

Keywords ischemic heart disease; cellular hypoxia injury; *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方); human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); angiogenesis; proliferation; apoptosis

(收稿日期: 2016-11-05; 修回日期: 2017-02-10)

编辑: 王利芬