

血府逐瘀汤动员骨髓内皮祖细胞的影响因素分析

高 冬¹ 吴立娅¹ 焦雨欢¹ 陈文元¹ 郑良朴² 宋 军³ 陈可冀⁴

(1. 福建中医药大学中西医结合系, 福州市闽侯上街华佗路 1 号, 350108; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院;
3. 中国中医科学院医学实验中心; 4. 中国中医科学院西苑医院)

[摘 要] **目的** 探讨血府逐瘀汤影响血管新生的相关因素。**方法** 将 24 只 SD 大鼠随机分成血府逐瘀汤高、中、低剂量组和空白对照组, 分别检测各组大鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)、促红细胞生成素(EPO)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)和一氧化氮(NO)的含量, 观察血府逐瘀汤对内皮祖细胞动员因素的影响。**结果** 与空白对照组比较, 血府逐瘀汤高剂量组对血清 VEGF、血府逐瘀汤中剂量组对血清 SDF-1 和 GM-CSF, 3 个药物剂量组对血清 NO 的水平均有显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但高、中剂量组均能降低血清 G-CSF 的含量($P < 0.05$)。**结论** 血府逐瘀汤可通过提高 VEGF、SDF-1、GM-CSF 和 NO 的水平动员骨髓内皮祖细胞参与血管新生, 动员途径呈现多样性和复杂性。

[关键词] 血府逐瘀汤; 内皮祖细胞; 动员因素; 血管新生

Influencing Factors of Xuefu Zhuyu Decoction in Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Bone Marrow

GAO Dong¹, WU Liya¹, JIAO Yuhuan¹, CHEN Wenyuan¹, ZHENG Liangpu², SONG Jun³, CHEN Keji⁴

(1. College of Integrated Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 350108; 2. Academy of Integrated Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 3. Experimental Center, China Academy of Chinese Medicine Sciences; 4. Xiyuan hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences)

ABSTRACT **Objective** To study the related factors of Xuefu Zhuyu Decoction (Decoction for removing blood stasis in chest) on angiogenesis. **Methods** Totally 24 SD rats were equally divided into Xuefu Zhuyu Decoction high, middle, low dosage group and a control group at random. Serum level of vascular endothelial growth factor(VEGF), erythropoietin(EPO), stromal-cell derived factor-1(SDF-1), granulocyte colony stimulating factor(G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulation factor(GM-CSF), and netric oxide(NO) were determined to observe the effect of Xuefu Zhuyu Decoction on mobilization of endothelial progenitor cells(EPC). **Results** Compared to the control group, high dosage of Xuefu Zhuyu Decoction could elevate serum level of VEGF; middle dosage of Xuefu Zhuyu Decoction raised serum level of SDF-1 and GM-CSF; three dosage of Xuefu Zhuyu Decoction raised serum level of NO respectively($P < 0.05$ or $P < 0.01$). High and middle dosage of Xuefu Zhuyu Decoction lowered serum level of G-CSF significantly($P < 0.05$). **Conclusion** Xuefu Zhuyu Decoction could mobilize EPC to promote angiogenesis by elevating VEGF, SDF-1, GM-CSF and NO level. The mechanism of EPC mobilization was complicated and deversified.

Key Words Xuefu Zhuyu Decoction(Decoction for removing blood stasis in chest); Endothelial progenitor cells; Mobilization; Angiogenesis

内皮祖细胞(EPC)参与血管新生, 需经历从骨髓动员到外周血这一过程, 我们前期工作已经发现血府逐瘀汤具有动员骨髓内皮祖细胞参与和促血管新生^[1-2], 这可能是该方剂治疗缺血性疾病的作用机理之一。由于内皮祖细胞的动员因子较多, 本研究针对常见的血管内皮生长因子(VEGF)、促红细胞生成素(EPO)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)和一氧化氮(NO)等 6 种因素, 分析血府逐瘀汤动员内皮祖细胞的机制, 有助于进一步阐明该方治疗缺

血性疾病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物制备

血府逐瘀汤由当归 9g、生地黄 9g、桃仁 12g、红花 9g、枳壳 6g、赤芍 6g、柴胡 3g、甘草 6g、桔梗 4.5g、川芎 4.5g、牛膝 9g 组成, 药材购自福建省中医药研究院。该方水煎两次, 每次各 30min, 煎液过滤, 浓缩至含生药量 1.3g/ml, 4℃ 保存备用。

1.2 实验动物分组

SD 大鼠 24 只, 6 周龄, 体重(150±20)g, 雌雄各半, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物许可证号: 0037614, SPF 级, 由福建中医药大学实验动物中心普通饲料喂养, 自由饮水, 经 3 天适应性喂养后按随机数字表法随机分为血府逐瘀汤高、中、低剂量组和空

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772877); 中国中医科学院基本科研业务费自选课题资助项目(ZZ2006039); 福建中医药大学中西医结合研究院科研基金资助项目(3000-905010805)

通讯作者: 宋军, junsong86@sohu.com, (010) 64014411 转 3325

白对照组, 每组各 6 只。

1.3 血清样本的制备

血府逐瘀汤高、中、低剂量组分别按照 13g/kg、6.5g/kg(相当于成人临床日用量的 5 倍)和 3.25g/kg 剂量灌胃, 空白对照组用等容量生理盐水, 每天灌胃 2 次, 连续 7 天。各组大鼠于第 8 天灌胃 2h 后, 经 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 4000r/min 离心 30min 分离血清, -20℃ 保存备用。

1.4 试剂及设备

大鼠 SDF-1、G-CSF 酶联免疫试剂盒购自上海亿唐生物有限公司(批号为 F1676 和 F1524); 大鼠 VEGF、GM-CSF 和 EPO 酶联免疫试剂盒购自美国 RD 公司(批号分别为 0702148、20040901、FA00279); NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号 A012); 全自动酶标仪为美国 Bio-Tech 公司生产。

1.5 指标测定

采用酶联免疫法, 分别检测血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF、GM-CSF 和 EPO 等 5 种指标的含量。利用硝酸还原酶法测定 NO 含量, 在酶标仪 550nm 标度检测各管吸光度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件进行统计分析。计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 血府逐瘀汤对血管生长因子 VEGF 的影响

表 1 示, 与空白对照组比较, 血府逐瘀汤高剂量组可显著提高血清 VEGF 水平($P < 0.05$), 虽然血府逐瘀汤低、中剂量的药物对血清 VEGF 影响并不显著, 却呈抑制趋势。

2.2 血府逐瘀汤对趋化因子 SDF-1 的影响

表 1 示, 与空白对照组比较, 血府逐瘀汤中剂量组可明显提高血清 SDF-1 的浓度($P < 0.05$)。

2.3 血府逐瘀汤对集落刺激因子的影响

表 1 示, 药物对血清 EPO、GM-CSF 和 G-CSF 的影响各不相同, 表现出复杂性。除药物对血清 EPO 浓度无显著影响之外, 与空白对照组比较, 中剂量药物可显

著升高血清 GM-CSF 的浓度($P < 0.05$), 而高、中剂量药物对血清 G-CSF 的作用相反, 明显降低了血清 G-CSF 的含量($P < 0.05$)。

2.4 血府逐瘀汤对信号分子 NO 的影响

表 1 示, 药物对气体信号 NO 的影响最为显著, 与空白对照组比较, 高、中、低 3 种剂量药物均可显著升高血清 NO 浓度($P < 0.01$), 且随着药物浓度的提高, 血清 NO 浓度相应升高, 呈明显的量效关系。

3 讨论

大量研究表明, EPCs 的动员受多种因素调控^[3-12], 如缺血和损伤的刺激、促血管生长因子、趋化因子、集落刺激因子和 NO 的影响。其中趋化因子 SDF-1 及其唯一受体 CXCR4 在 EPC 动员、迁移及归巢过程中起重要作用^[5-7]; 受造血干细胞骨髓动员启发发现的集落刺激因子 GM-CSF、G-CSF 和 EPO 同样可动员 EPCs 进入外周血^[7-10]; NO 虽是一种血管舒张因子, 但在动员骨髓 EPC 释放进入外周血, 提高循环血中 EPC 数量这个过程中起到至关重要的作用^[7, 11-12]。本实验分析的 6 种动员因子中, 血府逐瘀汤对血清 NO 浓度的影响最为显著, 低、中、高 3 个剂量的药物均可明显升高 NO 的浓度, 说明 NO 是药物动员内皮祖细胞最重要的因素。此外, 中、高剂量药物可分别显著提高血清中 SDF-1、GM-CSF 和 VEGF 浓度, 表明 NO 并不是药物动员 EPCs 参与血管新生的唯一途径, 药物作用呈多途径的特点。

在众多促血管生长因子中, VEGF 与 EPC 的关系最为密切, 是 EPCs 重要的动员因子之一, 缺血和损伤也可通过刺激 VEGF 的分泌发挥其促血管新生的作用, 如心肌梗死患者外周血 EPCs 较正常人显著增多, 且 EPCs 的增长水平与血浆中 VEGF 的水平呈正相关^[8-9]。本实验结果显示了药物对 VEGF 影响的复杂性, 高剂量药物可显著提高血清中 VEGF 的水平, 中、低剂量药物的影响虽无统计学意义, 但却呈抑制趋势。中、低剂量药物影响的变化趋势与前期工作相一致^[1], 而前期工作采用同样方法进行检测时, 高剂量药物使血清 VEGF 浓度下降的变化, 与本次结果相反, 当时推测药物的作用趋势可能与样本不是缺血病理模型有

表 1 各组大鼠血清 VEGF、SDF-1、EPO、G-CSF、GM-CSF 及 NO 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF (pg/ml)	SDF-1 (ng/ml)	EPO (pg/ml)	G-CSF (pg/ml)	GM-CSF (pg/ml)	NO (μmol/L)
空白对照组	6	13.20±7.08	10.61±1.40	26.26±6.48	42.67±4.65	2.78±0.88	3.75±2.16
血府逐瘀汤高剂量组	6	18.39±4.98*	11.61±3.16	29.33±11.43	38.49±3.20*	3.58±1.23	36.77±11.08**
血府逐瘀汤中剂量组	6	6.65±7.26	14.48±2.17*	23.12±6.29	35.14±2.94*	5.96±3.03*	25.76±8.59**
血府逐瘀汤低剂量组	6	8.01±6.66	11.84±3.13	29.98±19.13	39.00±3.76	2.54±1.37	14.60±3.61

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

关。本实验采用不同厂家产品重新检测,虽然两次实验样本不同,采用试剂盒的来源不同,但推测试剂质量上的差异可能是导致这个现象的主要原因。该推测存在一个佐证,两次实验均采用同一家产品检测 NO,变化趋势完全一致,这个结果有助于排除样本差异的因素,能否彻底排除样本的差异以及是否还存在其他原因,尚需多次实验,进一步扩大样本量加以明确。

EPCs 与造血干细胞起源相同,对造血干细胞具有骨髓动员作用的集落刺激因子 GM-CSF、G-CSF 和 EPO 同样可动员 EPCs 进入外周血^[7-10],肢体缺血模型实验证实,缺血缺氧环境诱导循环中 EPCs 数量明显增加,若同时给予 GM-CSF 和 G-CSF, EPCs 数量能够进一步增加,缺血肢体的血管形成过程明显改善^[8-10]。本课题组前期工作表明,血府逐瘀汤具有激活造血干细胞的作用,提示该药物可能对集落刺激因子有影响^[13]。本研究显示,虽然血府逐瘀汤对 EPO 无明显影响,但可显著升高 GM-CSF 的浓度,且药物降低血清中 G-CSF 浓度是本研究最有趣的现象,加上药物影响血清 VEGF 浓度变化由抑制到促进的趋势提示我们,血府逐瘀汤为经典的活血化瘀方剂,由 10 余种单味中药组成,成分的复杂性导致其多靶点的作用机制,各动员因素间可能存在相互协同或制约的关系,为今后相关研究提供线索。除本实验的 6 种动员因子以外,是否还有其他因子受药物影响,其作用方式及具体路径都还有待进一步研究证实。

参考文献

[1]高冬,林薇,郑良朴,等.血府逐瘀汤动员大鼠骨髓内皮祖细胞的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(9):829-831.

[2]高冬,宋军,胡娟,等.活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[J].中国中西医结合杂志,2005,25(10):912-915.

[3]Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization[J]. Nat Med, 1999, 5(4):434-438.

[4]Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal cell-derived factor¹ on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy [J]. Lancet, 2003, 362(9385): 675-676.

[5]Satoshi S, Toyoaki M, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2001, 103(6): 897-903.

[6]Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization

[J]. Circulation, 2003, 107(9): 1322-1328.

[7]Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells[J]. Hypertension, 2005, 45(3): 321-325.

[8]Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiological stimulus for endothelial progenitor cell mobilization[J]. Blood, 2003, 102(4): 1340-1346.

[9]Natori T, Sata M, Washida M, et al. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow derived endothelial progenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297(4): 1058-1061.

[10]Cho HJ, Kim HS, Lee MM, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation [J]. Circulation, 2003, 108(23): 2918-2925.

[11]Goldstein LJ, Gallagher KA, Bauer SM, et al. Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide[J]. Stem Cells, 2006, 24(10): 2309-2318.

[12]Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. Nat Med, 2003, 9(11): 1370-1376.

[13]高冬,林久茂,郑良朴,等.血府逐瘀汤影响小鼠骨髓造血干细胞的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2007,27(6): 527-530.

(收稿日期:2009-09-16;修回日期:2010-01-16)

[编辑:行 之]

《当代中国特色医疗名医》征稿通知

为宣传优秀的特色医疗名医,北京聚医杰医药科学研究院将编辑出版本大型彩色宣传画册,2010 年卷特征稿如下。

1. 入编对象:各级医疗机构中的中医、中西医结合或乡村医生、民间中医中具有特色疗法或一技之长、享誉一方者均可入编;2. 稿件要求:需提供 2 寸登记彩照和 2 张工作或生活彩照 1~2 张,500 字以内的技术简介(包括姓名、出生年月、技术职务、技术特长、通讯地址、邮编、电话);3. 有关说明:此书为大 16 开精装画册,拟于 2010 年 11 月出书后向入编者送样书 1 本和入编证书、名医奖牌,同时在中国医疗卫生信息网作宣传;邀请入编者出席 11 月在桂林市召开的首发式大会,并参加“中华特色医疗名医考察团”去越南参观考察;来稿经评审合格者即发入编通知,详细内容见入编通知。来稿请于 2010 年 7 月 15 日寄至北京 100036-98 信箱编委会江玲收,邮编 100036,电话 010-63772051、87013859、13366499730,详情见 www.ylwsxx.com“通知及公告”栏目。

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有 0 号、1 号、2 号等多种型号、多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒 135 元(含邮资)。

地址:浙江新昌县一诺胶囊有限公司,邮政编码:312500,电话:(0575) 86061888,013706852676,联系人:潘炎锋