

• 实验研究 •

血府逐瘀汤诱导内皮细胞血管新生中
一氧化氮的作用高冬¹ 陈文元¹ 吴立娅¹ 郑良朴² 林薇² 宋军^{3*} 陈可冀⁴(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建省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)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072933); 福建省自然科学基金资助项目(2007J0101);

福建省“中西医结合基础与临床”创新团队项目(CKJ2008001)

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

[摘要] 目的 研究血府逐瘀汤促进内皮细胞参与血管新生的作用机制。方法 选择 SD 大鼠 12 只, 随机分为血府逐瘀汤组和空白对照血, 每组 6 只。分别制备血府逐瘀汤含药血清和空白对照血清, 采用 1.25%、2.5%、5.0% 不同浓度血府逐瘀汤含药血清和空白对照血清诱导内皮细胞 48h, 检测不同浓度血清对内皮细胞 ECV304 增殖、迁移和体外成血管的影响, 并检测细胞培养上清液中一氧化氮(NO)浓度、胞内 NO 浓度和内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)活性及表达。结果 与空白对照组相同血清含量比较, 1.25%、2.5% 药物浓度下细胞增殖明显增加($P < 0.05$), 2.5%、5.0% 药物浓度下迁移细胞数明显增加($P < 0.01$), 各药物浓度下管腔个数均明显增加($P < 0.01$); 各浓度药物均可显著提高内皮来源的胞内、胞外 NO 浓度及 eNOS 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 1.25%、2.5% 浓度药物还可显著提高 eNOS 的活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 血府逐瘀汤通过促进 eNOS 的表达和活性, 提高胞内、外气体分子 NO 水平发挥促血管新生作用。

[关键词] 血府逐瘀汤; 血管新生; 一氧化氮; 内皮型一氧化氮合成酶; 内皮细胞

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on the Nitric oxide in the Endothelial Angiogenesis

GAO Dong¹, CHEN Wenyuan¹, WU Liya¹, ZHENG Liangpu², LIN Wei², SONG Jun³, CHEN Keji⁴

(1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108; 2. Academy of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 3. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences; 4. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction (Decoction for removing blood stasis in the chest) in promoting the endothelia-derived angiogenesis. **Methods** Twelve SD rats were randomized into Xuefu Zhuyu Decoction group and blank control group with 6 in each. The medicine-containing serum with the Xuefu Zhuyu Decoction ingredients in it and the blank control serum were prepared respectively. By using a serum pharmacology technique, the 1.25%, 2.5%, and 5% concentrations of Xuefu Zhuyu Decoction containing serum and the blank control serum were adopted for endothelial cell incubation for 48h. The effect on the reproduction, migration, and in vitro vasoformation of endothelial cells ECV304 were examined. Moreover, the nitric oxide (NO) concentration in the cultured supernate was evaluated, the intracellular NO concentration and endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) activity were studied, and the eNOS expression was determined. **Results**

Compared with the same concentration serum of the blank control group, the reproduction of cells under the condition of low (1.25%) and medium (2.5%) concentrations of medicine-containing serum was significantly increased ($P < 0.05$), the migration of cells under the condition of medium (2.5%) and high (5%) concentrations of medicine-containing serum was significantly increased ($P < 0.01$). The lumens under the condition of all concentrations of medicine-containing serum were significantly increased ($P < 0.01$). All concentrations of medicinal serum could increase the endothelia-derived intracellular and extracellular NO concentrations and the eNOS expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And the 1.25% and 2.5% concentrations of medicine-containing serum could enhance the eNOS activity as well ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Xuefu Zhuyu Decoction increases the intracellular and extracellular NO concentration of gas to promote angiogenesis through improving the eNOS expression and activity.

Key Words Xuefu Zhuyu Decoction (Decoction for removing blood stasis in the chest); angiogenesis; nitric oxide (NO); endothelial nitric oxide synthetase (eNOS); endothelial cell

血管新生是指在原有血管网络基础上通过内皮细胞增殖、迁移,最终形成血管管腔结构的过程。本课题组前期分别以血管新生的体内、外模型,包括内皮祖细胞、内皮细胞和鸡胚绒毛尿囊膜为研究对象,开展活血化瘀经典方剂血府逐瘀汤影响血管新生的作用研究,结果表明血府逐瘀汤具有显著的促血管新生作用,且作用机制呈多途径、多靶点的现象^[1-7]。由于血管内皮细胞与血管新生直接相关,且一氧化氮(NO)是血管新生重要调控信号之一,本研究通过观察血府逐瘀汤含药血清对内皮细胞 ECV304 合成和分泌 NO 的影响,进一步揭示其促血管新生的作用机理,为该药物临床治疗缺血性疾病提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药物与细胞

SD 大鼠 12 只,SPF 级,体重(150g±20)g,雌雄各半,由福建斯莱克实验动物有限公司提供(实验动物许可证号:SYXK(闽)2009-0001,在福建中医药大学实验动物中心饲养。

血府逐瘀汤,药物组成为当归 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,购自福建中医药大学中西医结合研究院中药房。水煎 2 次,煎液过滤,混合后加热浓缩至含生药量 1.3g/ml,4℃ 保存备用。

内皮细胞 ECV304 购于武汉大学生命科学院中国典型培养物保藏中心。

1.2 试剂与仪器

戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司);GIBCO™ M199 培养基干粉,Trizol、引物(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、胰蛋白酶-EDTA(美国 Hyclone 公司);体外成血管检测试剂盒(ECM625,美国 Millipore 公司);一氧化氮合成酶(NOS)活性检测试剂盒、NO 检测试剂盒、蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);3-氨基-4-氨基-2',7'-二荧光黄乙酰乙酸盐(DAF-FM-DA,江苏碧云天生物技术研究);RT-PCR 试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司);IX70 倒置相差显微镜及摄像装置(日本 Olympus 公司);流式细胞仪 FACS-Calibur(美国 BD 公司);PE9600 基因扩增仪(美国 PE 公司);电泳仪、凝胶成像系统及配套软件 QuantityOne(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 含药血清制备

参考文献[3]的方法进行。采用随机数字表法

将 SD 大鼠分为血府逐瘀汤组和空白对照组,每组 6 只。血府逐瘀汤组以 13g/kg 剂量灌胃给药,空白对照组采用等量生理盐水灌胃,每天 2 次,连续灌胃 7 天,于第 8 天灌胃 2h 后腹主动脉取血,静置 1h 后,4000r/min 离心 30min 分离血清,经 56℃ 灭活 30min,0.22μm 过滤除菌后,置-20℃ 保存。

1.4 血管内皮细胞培养及含药血清处理

参考文献[5]的方法进行。ECV304 培养体系为含 5%FBS 的 M199 培养液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱,生长汇合后同步化处理,以 2.5×10⁵ 个/ml 的密度接种,培养 4h 待细胞贴壁后弃去培养液,分别更换血府逐瘀汤含药血清和空白对照血清,每组血清以 1.25%、2.5%和 5.0%低、中、高 3 个药物浓度添加于无血清 M199 培养液中,继续培养 48h 后开展实验。

1.5 增殖实验

参考文献[3]的方法进行。96 孔培养板每孔接种 100μl 同步化的 ECV304,经药物处理 48h 后加入 20μl 5mg/ml 噻唑蓝(MTT),孵育 4h 后弃去培养液,每孔加入 200μl 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10min 后于 ELX800 全自动酶标仪上 570nm 波长(参比波长 630nm)检测吸光度值。

1.6 迁移实验

参考文献[3]的方法进行。收集各组细胞培养上清液将其置于 boyden 小室的下室,室间覆盖孔径 8μm 的聚碳酸酯膜,上室加入对应组别的细胞 2×10⁴ 个,继续培养 1h,用棉签轻轻刮去膜上室面的细胞后以中性甲醛固定,苏木素常规染色,400× 视野下随机计数 6 个视野细胞数。

1.7 管腔形成实验

参考文献[3]的方法进行。稀释 ECMatrix™ solution,于预冷的 96 孔板中每孔均匀铺 50μl。37℃、2h 使其凝固。每孔接种处理后的细胞 10⁴ 个,培养 12h 后随机计算 6 个视野下(200×)的管腔个数。

1.8 上清液 NO 浓度检测

取各组细胞培养上清液,采用硝酸还原酶法,具体步骤按照试剂盒说明书操作。

1.9 细胞内 NO 浓度检测

PBS 洗涤细胞 3 次去除残余血清和酚红,按 1ml 5μM DAF-FM-DA/10cm² 面积的比例添加荧光探针,37℃ 孵育 20min, PBS 重新洗涤 3 次,消化收集细胞后于流式细胞仪上以 495nm 为激发波长,

515nm 发射波长的参数检测荧光强度。

1. 10 内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)活性检测

各组细胞经 PBS 反复冻融法裂解,取 100 μ l 裂解液用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,另取 100 μ l 裂解液测定 NOS 活性,按试剂盒说明书操作并计算 eNOS 活性。

1. 11 eNOS 表达检测

eNOS 引物上游序列 5'-CCA GCT AGC CAA AGT CAC CAT-3',下游序列 5'-GTC TCG GAG CCC AGG ATT-3',产物长度为 354bp;内参 β -actin 引物上游序列 5'-ATC ATG TTT GGG ACC TTC AACA-3',下游序列 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3',产物长度为 318bp。采用 50 μ l 反应体系,在无核酸酶的 0.2ml PCR 反应管中相继加入 10X Taq buffer 5 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, 25mM MgCl₂ 3 μ l, 10 μ M 的上下游引物各 1.5 μ l, cDNA 2 μ l, 1u/ μ l 的 recombinant Taq 酶 1 μ l, 灭菌超纯水 35 μ l。预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 后染色、电泳,应用凝胶成像系统拍照并进行电泳条带光密度分析,靶基因条带光密度与内参基因条带光密度之比值作为 mRNA 表达水平参数。

1. 12 统计学方法

采用 Excel 数据分析软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2. 1 两组不同浓度血清含量对细胞增殖、迁移细胞数、管腔个数的影响

表 1 示,与空白对照组相同血清含量比较,1.25%和 2.5% 药物浓度下细胞增殖明显增加($P < 0.05$),2.5%和 5% 药物浓度下迁移细胞数明显增加($P < 0.01$),3 个药物浓度下管腔个数均明显增加($P < 0.01$),提示 3 个药物浓度下均有显著的促血管形成作用($P > 0.05$)。

表 1 两组不同浓度血清含量对细胞增殖、迁移细胞数、管腔个数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	血清含量 (%)	样本数	细胞增殖 ($\times 10^{-1}$)	迁移细胞数 (个)	管腔个数 (个)
血府逐瘀汤组	1.25	6	2.29 $\pm$ 0.04*	28.50 $\pm$ 2.59	16.67 $\pm$ 2.25**
	2.5	6	2.53 $\pm$ 0.14*	39.67 $\pm$ 2.07**	18.83 $\pm$ 1.72**
	5.0	6	2.14 $\pm$ 0.14	37.00 $\pm$ 2.83**	17.00 $\pm$ 3.10**
空白对照组	1.25	6	2.19 $\pm$ 0.08	29.17 $\pm$ 1.94	8.33 $\pm$ 1.03
	2.5	6	2.08 $\pm$ 0.30	29.00 $\pm$ 2.83	9.33 $\pm$ 2.50
	5.0	6	2.15 $\pm$ 0.06	27.67 $\pm$ 3.01	6.33 $\pm$ 2.25

注:与空白对照组相同血清含量比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2. 2 两组不同浓度血清含量对胞外 NO 浓度、胞内 NO 浓度、eNOS 活性、eNOS 表达的影响

表 2 示,与空白对照组相同血清含量比较,3 个药物浓度均可显著提高内皮来源的胞内、胞外 NO 浓度、eNOS 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),1.25%、2.5% 两个药物浓度还可显著提高 eNOS 的活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示药物通过提高 eNOS 的表达和活性,进而显著提高胞内、外 NO 的水平。

3 讨论

血管新生研究的立足点在于血管管腔的形成,从本研究结果来看,1.25%、5.0% 两个药物浓度对细胞迁移和增殖功能影响并不全面,但这两个药物浓度与中等浓度(2.5%)一样,都具有促进血管管腔形成的功效,说明血府逐瘀汤具有显著的促血管新生作用,与本项目组前期研究结果一致。值得注意的是,虽然不同检测项目药物浓度影响趋势各不相同,但 2.5% 含药血清不仅对所有检测指标皆产生显著影响,且其检测数值基本上都是最高的,提示血府逐瘀汤体外促血管新生作用存在最佳的药物浓度。

内皮细胞产生的气体信号分子 NO,是由管家基因产物 eNOS 催化底物 L-精氨酸形成的,最初在研究乙酰胆碱舒张动脉平滑肌过程被外界所知后,其针对血管系统多方面的生理活性包括抑制平滑肌细胞增殖、血管重塑和血管新生等功能逐渐被揭

表 2 两组不同浓度血清含量对胞外 NO 浓度、胞内 NO 浓度、eNOS 活性、eNOS 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	血清含量 (%)	样本数	胞外 NO 浓度 (μ M)	胞内 NO 浓度 (AU)	eNOS 活性 (U/ml)	eNOS 表达 (相对光强)
血府逐瘀汤组	1.25	6	8.26 $\pm$ 0.97**	51.37 $\pm$ 6.94**	2.52 $\pm$ 0.94*	0.41 $\pm$ 0.01**
	2.5	6	18.56 $\pm$ 0.81**	58.00 $\pm$ 6.25**	4.47 $\pm$ 0.96**	0.40 $\pm$ 0.02*
	5.0	6	7.54 $\pm$ 1.93**	55.80 $\pm$ 1.57**	3.12 $\pm$ 0.97	0.41 $\pm$ 0.02*
空白对照组	1.25	6	3.45 $\pm$ 1.17	17.04 $\pm$ 6.92	0.90 $\pm$ 0.21	0.35 $\pm$ 0.01
	2.5	6	2.57 $\pm$ 0.89	14.05 $\pm$ 0.52	1.60 $\pm$ 0.36	0.38 $\pm$ 0.01
	5.0	6	2.99 $\pm$ 1.04	18.02 $\pm$ 4.94	1.37 $\pm$ 0.46	0.36 $\pm$ 0.02

注:与空白对照组相同血清含量比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

示^[8], Ziche 及其合作者的实验结果为 NO 具有促血管新生作用提供了最早线索^[9], 随后 Papapetropoulos 等直接证实了这方面作用^[10-11]。内皮来源的 NO 不仅能促进胚胎细胞参与血管的形成^[12], 在心脏缺血动物模型中还可通过提高 NO 诱导血管新生, 增加冠状动脉的侧枝循环^[13], NO 能提高侧枝血管数量的作用在下肢缺血的 eNOS 高表达转基因小鼠中同样得到验证^[14]。抑制血管新生的 Angiostatin 等也可通过抑制 eNOS 活性, 降低 NO 浓度进而发挥作用^[15]。NO 水平取决于 eNOS 活性, 近年来逐渐发现存在一个复杂而精准的调节系统, 在各种机械、药物和化学因素包括钙离子, 氧自由基和 VEGF 等刺激下, 均可使该酶在特定的多个丝氨酸和苏氨酸位点发生磷酸化修饰^[16]。

本研究中, 与空白对照组比较血府逐瘀汤对内皮细胞增殖、迁移和成血管能力均有显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 从细胞角度说明药物促血管新生存在多途径现象, 而且药物能显著提高 eNOS 表达 ($P < 0.05$), 升高 eNOS 活性和胞内外 NO 浓度 ($P < 0.01$), 从分子角度提示药物通过影响 NO 水平发挥作用。本课题组曾开展的该药物在体实验结果也表明^[2], 药物能提高体内 NO 水平, 与本体外实验结论一致, 进一步说明血府逐瘀汤通过提高 NO 水平, 进而发挥促血管新生的调节作用。另外, 本研究中的 3 个药物浓度皆可显著影响 NO 水平, 但对细胞功能的影响结果却不一致, 提示在众多的血管新生调控因子中, 不同的药物浓度除影响 NO 外, 还能影响不同的调控信号, 各信号之间综合作用效果不同, 表现出细胞行为上的差异。

本实验仅对血府逐瘀汤提高 NO 水平发挥促血管新生作用展开初步的研究, 但药物对 eNOS 活性的影响机制以及磷酸化位点尚未明确, 更为重要的是揭晓该药物影响的所有调控因子以及各因子相互作用的调控模式, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 高冬, 林薇, 郑良朴, 等. 血府逐瘀汤动员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.
- [3] 高冬, 吴立娅, 焦雨欢, 等. 血府逐瘀汤影响内皮祖细胞分化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(12): 917-919.
- [4] Cao D, WU LY, Jiao YH, et al. The Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on in vitro endothelial progenitor cell tube formation[J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(1): 50-53.
- [5] 高冬, 陈文元, 吴立娅, 等. 血府逐瘀汤诱导内皮细胞促血管新生的基因调控研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(2): 153-156.
- [6] 高冬, 吴立娅, 焦雨欢, 等. 血府逐瘀汤对内皮祖细胞功能的影响[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1129-1132.
- [7] 高冬, 吴立娅, 焦雨欢, 等. VEGF 及受体在血府逐瘀汤影响内皮祖细胞功能中的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 104-107.
- [8] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling[J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 731-736.
- [9] Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P[J]. J Clin Invest, 1994, 94(5): 2036-2044.
- [10] Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta1-stimulated capillary organization in vitro[J]. Am J Pathol, 1997, 150(5): 1835-1844.
- [11] Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1997, 100(12): 3131-3139.
- [12] Balasubramaniam V, Maxey AM, Fouty BW, et al. Nitric oxide augments fetal pulmonary artery endothelial cell angiogenesis in vitro[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(6): 1111-1116.
- [13] Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, et al. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide[J]. Circulation, 2000, 102(25): 3098-3103.
- [14] Amano K, Matsubara H, Iba O, et al. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression[J]. Hypertension, 2003, 41(1): 156-162.
- [15] Koshida R, Ou J, Matsunaga T, et al. Angiostatin: a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation[J]. Circulation, 2003, 107(6): 803-806.
- [16] Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation[J]. Vascul Pharmacol, 2008, 49(4-6): 134-140.

(收稿日期: 2011-03-01; 修回日期: 2011-07-20)

[编辑: 侯建春]