DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.14.017

养心通脉方含药血清对家兔骨髓内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力的影响

卢健棋[1*]，林露南[2]，李苏依[1]，温志浩[1]，杨清华[1]，何新兵[1]，韩景波[1]，张振千[1]，刘靖[3]

(1. 广西中医药大学第一附属医院，广西壮族自治区南宁市东葛路 89 - 9 号，530023；2. 玉林市中医院；3. 广西中医药大学)

［摘要］ **目的** 探讨养心通脉方治疗冠心病的可能作用机制。 **方法** 4 只家兔随机分为含药血清组［养心通脉方 8ml/（kg·d）］和空白血清组（等体积生理盐水），每组连续灌胃 5 天，末次给药 0.5 h 后颈总动脉取血，制备养心通脉方含药血清和空白血清。观察不同剂量（1.25%、2.5%、5%、10%）和干预时间（12 h、24 h、48 h、72 h、96 h）的含药血清对家兔骨髓内皮祖细胞（EPCs）线粒体活性的影响，确定养心通脉方含药血清最佳干预剂量和时间。EPCs 调整细胞密度至 5×10^5 个/ml，分为治疗组和对照组，两组分别用最佳剂量的养心通脉方含药血清和空白血清培养，干预最佳时间后，观察两组 EPCs 增殖、迁移、黏附能力。 **结果** 与对照组同浓度比较，治疗组 2.5%、5%、10% 浓度含药血清均能明显增强 EPCs 线粒体活性，且治疗组随浓度升高 EPCs 线粒体活性越高（$P<0.05$），故 10% 浓度为最佳干预浓度。与对照组同时间点比较，治疗组在 48 h、72 h、96 h 时 EPCs 线粒体活性均明显升高，治疗组与本组前一时间点比较，72 h 较 48 h 及 96 h 较 72 h 时 EPCs 线粒体活性明显升高（$P<0.05$），故最佳干预时间为 96 h。两组分别用 10% 养心通脉方含药血清和 10% 空白血清培养 96 h，治疗组 EPCs 的增殖、迁移、黏附能力均明显高于对照组（$P<0.05$）。 **结论** 养心通脉方含药血清能明显提升 EPCs 的增殖、迁移、黏附能力，进而促进缺血心肌血管新生，这可能是其治疗冠心病的作用机制之一。

［关键词］ 冠心病；内皮祖细胞；养心通脉方；线粒体活力；细胞增殖；细胞迁移；细胞黏附

内皮祖细胞（endothelial progenitorcells，EPCs）是出生后修复损伤血管内皮细胞和建立缺血区侧支循环的关键，故其在冠心病等缺血性疾病领域受到广泛关注[1-3]。EPCs 的数量及功能易受机体病理因素影响，所以通过药物或其他途径改善 EPCs 的数量和功能是应用 EPCs 治疗缺血性疾病的前提[4-7]。养心通脉方是治疗冠心病的有效验方，其临床疗效显著[8]。前期研究表明，养心通脉方对心肌缺血大鼠模型有显著保护作用[9]。本研究观察养心通脉方含药血清不同量效和时效下对体外培养兔骨髓 EPCs 线粒体活性的影响以及其最佳量效和时效条件下对 EPCs 增殖、迁移和黏附功能的影响，进而探讨其治疗冠心病的可能作用机制。现报告如下。

基金项目：国家自然科学基金（81260522）；广西自然科学基金（2013GXNSFAA019193）

* 通讯作者：lujiangqi666@163.com，（0771）5848501

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性家兔 8 只，体质量 2.0 ~ 2.2 kg，12 周龄，由广西医科大学动物实验中心提供，实验动物合格证号：SCXK（桂）2009 - 0002。

1.2 药物、试剂及仪器

养心通脉方组成：红参、麦冬、五味子、当归、川芎、白术、桂枝、炙甘草各 10 g，黄芪、白芍、丹参各 15 g，木香、檀香各 3 g，购于广西中医药大学第一附属医院，以传统工艺煎煮浓缩，最终生药浓度为 1.66 g/ml。兔骨髓淋巴细胞分离液（天津灏洋公司，批号：2013LRA），DIL 标记乙酰化低密度脂蛋白（DIL-AC-LDL，Gibco 公司，批号：3484），FITC 标记荆豆凝集素（FITC-UEA-I，Sigma 公司，批号：9006），PBS 缓冲液（维森特公司，批号：311-010-CL），人纤维连接蛋白（HFN，美国 Roche 公司，批号：1105140700），胎牛血清（FBS，Hyclone 公司，批号：

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SV30087.01)，EPCs 专用培养基（EGM-2，Lonza 公司，批号：CC-3202），胰酶（HyClone 公司，批号：SH30042.01B），戊巴比妥钠（Serve 公司，批号：201505），CCK-8 试剂盒（日本同仁公司，批号：EJ875）。Transwell 迁移小室（Corning 公司），96 孔板（Corning 公司），全波长酶标仪（Thermo Fisher 公司，型号：1510）。

1.3 含药血清的制备

4 只家兔按体重应用随机数字表分为含药血清组和空白血清组，每组 2 只。含药血清组给予养心通脉方 8 ml/（kg·d）灌胃（剂量为人等效剂量的 5 倍）[10]，每日分 2 次灌胃，空白血清组以等体积生理盐水灌胃，连续 5 天。末次给药后 0.5 h 颈总动脉无菌取血，静置凝固后离心分离血清，用 56℃水浴 30 min 灭活，-20℃保存。

1.4 EPCs 的培养和鉴定

取 2 只家兔，以 3% 戊巴比妥钠（35 mg/kg）耳缘静脉麻醉后，股骨干抽取骨髓组织，密度梯度离心法[11]获取单个核细胞（MNC），并逐步离心洗涤 MNC，将 MNC 以含 10% FBS 的 EGM-2 培养基悬起，并参考文献［12］的方法调整细胞密度至 2×10^6 个/ml 后将其接种到预先用 HFN（包被浓度为 5 μg/cm^2）包被的 25 cm^3 培养瓶中，放于 37℃、5% CO_2 浓度培养箱培养。培养 48 h 后首次半量换液，以后 3 天换全液 1 次，每日倒置显微镜下观察细胞生长情况。培养到第 20 天的细胞行 DIL-AC-LDL 和 FITC-UEA-I 荧光染色鉴定。

1.5 EPCs 线粒体活性的量效观察

培养到第 20 天的 EPCs 用无血清培养基培养 24 h 使细胞同步化，消化重悬并调整细胞密度至 5×10^5 个/ml，应用随机数字表法分为：1）空白组：用含 10% FBS 的 EGM-2 培养基培养；2）对照组：分别用添加了 1.25%、2.5%、5%、10% 空白血清的含 10% FBS 的 EGM-2 培养基培养；3）治疗组：分别用添加了 1.25%、2.5%、5%、10% 养心通脉方含药血清的含 10% FBS 的 EGM-2 培养基培养。各组细胞接种到 96 孔培养板，每孔接种 100 μl，各组每个浓度设 5 个复孔。各组细胞继续培养 48 h，避光下每孔加 CCK-8 试剂 10 μl，避光孵育 2 h 后酶标仪于 450 nm 处测定各孔吸光度（OD）值，确定最佳干预剂量，并进行下一步实验。

1.6 EPCs 线粒活性的时效观察

实验分为对照组和治疗组，观察不同干预时间（分为 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h）养心通脉方含药血清（最佳剂量）及含对照血清干预下的 EPCs 线粒体活力，每孔 100 μl 接种到 96 孔板，每个时间点设 5 个复孔，酶标仪于 450 nm 处测定各孔 OD 值，确定最佳干预时间。

1.7 养心通脉方含药血清对 EPCs 增殖、迁移和黏附能力的影响

1.7.1 养心通脉方最佳量效和时效条件下对 EPCs 增殖能力的影响 对照组和治疗组分别用最佳剂量的空白血清和养心通脉方含药血清培养，根据 1.6 结果干预最佳时间后，PBS 液洗涤，胰酶消化收集贴壁细胞，调整细胞浓度至 5×10^5 个/ml，每孔 100 μl 等量接种到预先用 HFN 包被的 96 孔板，每组设 5 个复孔，37℃、5% CO_2 浓度培养箱中孵育 4 h后，避光环境中每孔加 CCK-8 试剂 10 μl，避光孵育 2 h 后酶标仪测 450 nm 处各孔 OD 值。

1.7.2 养心通脉方最佳量效和时效条件下对 EPCs 迁移能力的影响 对照组和治疗组分别用最佳剂量的空白血清和养心通脉方含药血清培养，干预最佳时间后，消化收集贴壁细胞，用无 FBS 的 EGM-2 培养基重悬，各组细胞等量注入到 Transwell 迁移小室上室，下室添加含血管内皮生长因子、10% FBS 的 EGM-2 培养基，37℃、5% CO_2 浓度培养箱中培养 24 h 后，取出小室用干燥棉签轻轻拭去多孔滤膜上面的细胞，PBS 浸洗后 4% 多聚甲醛固定 30 min，超纯水浸洗，吉姆萨染液染色 30 min，超纯水漂洗后晾干，将多孔滤膜完整刮下，滤膜下面朝上放置载玻片上，中性树脂封片，倒置显微镜下观察染色细胞，200 倍下随机取 5 个视野计数并计算平均值。

1.7.3 养心通脉方最佳量效和时效条件下对 EPCs 黏附能力的影响 对照组和治疗组分别用最佳剂量的空白血清和养心通脉方含药血清培养，干预最佳时间后，消化收集贴壁细胞，EGM-2 培养基重悬，计数后等量接种到预先用 HFN 包被的 96 孔板，每组设 5 个复孔，37℃、5% CO_2 浓度培养箱中孵育 4 h 后，倒置显微镜下观察贴壁细胞，随机取 5 个视野计数并计算平均值。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件，数据均以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较方差齐用单因素方差分析，方差不齐用秩和检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 的培养和鉴定结果

原代培养第 3 天形成数个细胞集落，内有单个核细胞呈半悬浮生长，集落边缘细胞呈纺锤形生

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 各组不同浓度血清干预下内皮祖细胞线粒体活性比较（OD 值，$\bar{x} \pm s$）

组别	样本数	0	1.25%	2.5%	5%	10%
空白组	5	0.39 ± 0.11	—	—	—	—
对照组	5	—	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.02
治疗组	5	—	0.40 ± 0.04*	0.44 ± 0.02*△▲	0.48 ± 0.01*△▲	0.51 ± 0.06*△▲

注：与空白组比较，* $P<0.05$；与对照组同浓度比较，△$P<0.05$；与本组前一浓度比较，▲$P<0.05$

表 2 两组不同时间血清干预下内皮祖细胞线粒体活性比较（OD 值，$\bar{x} \pm s$）

组别	样本数	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	5	0.45 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.56 ± 0.07	1.51 ± 0.01	2.11 ± 0.05
治疗组	5	0.35 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.59 ± 0.01*	1.66 ± 0.02*△	2.40 ± 0.04*△

注：与对照组同时间点比较，* $P<0.05$；与本组前一时间点比较，△$P<0.05$

长；第 4 天见大量梭形细胞从集落中心向外周长出；第 5 天见梭形细胞从集落中央以放射状向外周生长，结构类似胚胎时期的“血岛”，激光共聚焦显微镜观察贴壁细胞呈 DIL-AC-LDL 和 FITC-UEA-I 双荧光染色阳性，认为是正在分化的 EPCs。

2.2 各组不同浓度血清干预下 EPCs 线粒体活性比较

表 1 示，与空白组比较，对照组各浓度 EPCs 线粒体活性差异无统计学意义（$P>0.05$），而治疗组各浓度含药血清的线粒体细胞活性均显著升高（$P<0.05$）；与对照组同浓度比较，治疗组 2.5%、5%、10% 浓度含药血清能明显增强 EPCs 线粒体活性（$P<0.05$），且治疗组随浓度升高 EPCs 线粒体活性越高（$P<0.05$）。说明养心通脉方能改善 EPCs 的活性，且具有剂量依赖性，故 10% 浓度的养心通脉方为最佳干预浓度。

2.3 两组不同时间血清干预下 EPCs 线粒体活性比较

表 2 示，与对照组同时间点比较，治疗组在 48 h、72 h、96 h 时 EPCs 线粒体活性均明显升高（$P<0.05$）；与本组前一时间点比较，治疗组 72 h 及 96 h 时 EPCs 线粒体活性明显升高（$P<0.05$）。说明养心通脉方含药血清增强 EPCs 线粒体活性的作用具有时间依赖性，故最佳干预时间为 96 h。

2.4 两组 EPCs 增殖、迁移、黏附能力比较

根据以上结果，对照组和治疗组分别用 10% 养心通脉方含药血清和 10% 空白血清培养 96 h。表 3 示，与对照组比较，治疗组 EPCs 的增殖能力、迁移能力、黏附能力均明显升高（$P<0.05$）。

表 3 两组内皮祖细胞增殖、迁移、黏附能力比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	样本数	增殖能力（OD 值）	迁移能力（个）	黏附能力（个）
对照组	5	0.480 ± 0.035	24.33 ± 4.04	19.2 ± 4.38
治疗组	5	0.629 ± 0.036*	37.66 ± 5.50*	28.6 ± 5.63*

注：与对照组比较，* $P<0.05$

3 讨论

当机体缺血、缺氧时，骨髓中的 EPCs 动员进入血液循环，并在一些黏附分子的趋化下，迅速向损伤局部归巢，随后 EPCs 通过整合、融合以及旁分泌的方式参与新生血管生成和内皮细胞的更新[13-16]。EPCs 是建立毛细血管网和修复损伤血管的关键，但 EPCs 在外周循环数量稀少[4]，动员、迁移能力有限，且易受病理因素如高龄、吸烟、高血压、糖尿病等影响[5-6,17-18]。冠心病冠状动脉弥漫性病变、多支病变无法通过经皮冠状动脉介入（PCI）治疗恢复血运，而移植 EPCs 可使缺血心肌重建侧支循环、保护冠状动脉内皮细胞、减轻心室重构、保护梗死区细胞岛、改善左室功能[19-20]，故提高 EPCs 的增殖、迁移能力对于治疗冠心病等缺血性疾病具有重要意义。

中医药防治冠心病已有多年历史，多数学者认为血瘀是冠心病的重要病理基础，但也有学者认为冠心病的根本病因是气虚[21]。血为气之母，气为血之帅，血液的运行有赖于气的推动，气不足则血行迟滞，脉道不利，胸痹内生；而气虚日久，气损及阳，阳损及阴，脉道失养，拘急作痛；病久则血脉空虚，脉失荣养，进一步加重经脉失养。因此，益气养阴、活血通脉成为冠心病的重要治疗法则。养心通脉方是名老中医李锡光治疗冠心病心绞痛的经验方，方中红参大补元气，为君药；黄芪、白术甘温，助红参以补肺健脾，白芍、麦冬、五味子、炙甘草酸甘化阴，养阴敛肺，助红参以益心复脉，同为臣药；当归、丹参、川芎养血活血、祛瘀通脉，檀香、木香、桂枝芳香温通、行气活血，同为佐使药。诸药配伍，具有益气养阴、活血祛瘀、养

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心通脉之功效。前期研究表明，该方能提高心肌抗缺血能力，修复损伤的心肌细胞，对缺血心肌具有明显的保护作用[9]。

本研究结果显示，养心通脉方含药血清可显著改善兔骨髓 EPCs 线粒体活性，并且改善作用与含药血清浓度和干预时间呈正相关，在血清浓度为 10% 和干预时间为 96 h 时线粒体活性最强。养心通脉方含药血清在最佳量效和时效条件下，EPCs 的增殖、迁移、黏附能力均有显著提升。提示养心通脉方改善冠心病症状和减少心血管不良事件发生的机制有可能与其促进缺血心肌血管新生有关，这部分解析了养心通脉方在临床心血管疾病中的应用机制，同时也为临床从改善 EPCs 功能角度治疗冠心病提供了新的思路。

参考文献

[1] ASAHARA T,MUROHARA T,SULLIVAN A,et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science,1997,275(5302):964-967.

[2] XU Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis [J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med,2006,39(2): 94-101.

[3] SILVESTRE JS. Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases [J]. Thromb Res, 2012, 130(Suppl 1):S90 - S94 .

[4] PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIVA D, et al. Expressive of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34$^+$ cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. Blood,2000,95(5):952-958.

[5] MICHAUD SE,DUSSAUL IS,HADDAD P,et al. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities [J]. Atherosclerosis, 2006,187(2):423-432.

[6] VASA M,FICHTLSCHERER S,AICHER A,et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res,2001,89(1):256-263.

[7] VAUGHAN EE, LIEW A, MASHAYEKHI K, et al. Pretreatment of endothelial progenitor cells with osteopontin enhances cell therapy for peripheral vascular disease [J]. Cell Transplant, 2012, 21(6): 1095-1107.

[8] 覃裕旺,朱智德,卢健棋,等. 养心通脉方治疗气阴两虚挟血瘀型冠心病心绞痛临床研究 [J]. 中医学报,2015,30(3):428-432.

[9] 韩景波,朱智德. 养心通脉方对异丙肾上腺素诱导的大鼠急性心肌缺血组织病理学的影响 [J]. 广西中医药,2009,32(1):49-50.

[10] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社,2005:202-203.

[11] 刘锟,李坤,董国华,等. 补阳还五汤对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(6):1044-1049.

[12] 王盛,管珩. 兔血管内皮祖细胞的分离及诱导分化 [J]. 心肺血管病杂志,2008,27(5):297-300.

[13] SHI Q,RAFII S,WU MH,et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells [J]. Blood,1998,92(2):362-367.

[14] KALKA C,MASUDA H,TAKAHASHI T,et al. Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects [J]. Circ Res,2000,86(12):1198-1202.

[15] JAYASANKAR V,WOO YJ,PIROLLI TJ,et al. Induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis by hepatocyte growth factor effectively treats post isehemia heart failure [J]. Card Surg,2005,20(1):93-101.

[16] YU JX, HUANG XF, LV WM, et al. Combination of stromal derived fatctor-1 alpha and vascular endothelial growth factor enemodified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization [J]. J Vase Surg,2009,50(5):608-616.

[17] WU Y,IP JE,HUANG J,et al. Essential role of lCAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infracted myocardium [J]. Cite Res,2006,99(3):315-322.

[18] 杨波,张钲,潘明,等. 2 型糖尿病患者外周血内皮祖细胞数量和功能的变化 [J]. 中国分子心脏病学,2008,8(2):78.

[19] KOCHE AA, SCHUSTE MD, SZABOLCS MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-derived angioblasts prevents candionyocyte apoptosnis,reduces remodeling and improves cardiac function [J]. Nat Med,2001,7(4):430-436.

[20] KAWAMOTO A,IWASAKI H,KUSANO K,et al. CD34$^-$ positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells [J]. Circulation, 2006,107 (3):461-468.

[21] 胡少红. 浅谈气虚为冠心病之本 [J]. 吉林中医药,2005,25(11):5-6.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Impact of Serum Containing *Yangxin Tongmai Decoction*（养心通脉方） on Multiplication, Migration and Adhesion Ability of Rabbits´ Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells

LU Jianqi[1], LIN Lunan[2], LI Suyi[1], WEN Zhihao[1], YANG Qinghua[1], HE Xinbing[1], HAN Jingbo[1], ZHANG Zhenqian[1], LIU Jing[3]

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530023; 2. Yulin Traditional Chinese Medicine Hospital; 3. Guangxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Yangxin Tongmai Decoction*（养心通脉方）in the treatment of coronary heart disease. **Methods** Four rabbits were randomized into the serum containing medicine [8 ml/(kg·d) of Yangxin Tongmai Decoction] group and the blank serum group (equivoluminal normal saline). Both groups were given intragastric administration for 5 days. After 0.5 hour of the last administration, blood in common carotid artery was sampled to prepare serum containing *Yangxin Tongmai Decoction* and blank serum. Impact of serum containing medicine with different doses (1.25%, 2.5%, 5%, or 10%) and different intervening time (12 h, 24 h, 48 h, 72 h, or 96 h) on the mitochondrial activity of rabbits´bone marrow endothelial progenitor cells (EPCs) was examined. The optimal intervening dose and time of serum containing *Yangxin Tongmai Decoction* was tested. After the cell density was regulated to 5×10^5 cells/ml, EPCs were divided into the treatment group and the control group. The two groups were cultured with the optimal dose of serum containing *Yangxin Tongmai Decoction* and blank serum respectively. After inventing for the optimal time, the multiplication, migration and adhesion ability of EPCs in both groups were examined. **Results** Compared with the control group at the same concentration, serum containing medicine at the concentration of 2.5%, 5% and 10% could enhance the mitochondrial activity of EPCs. With the increasing concentration, the mitochondrial activity was enhanced in the treatment group ($P < 0.05$). Thus 10% was the best intervening concentration. Compared with the control group at the same time point, the mitochondrial activity of EPCs was enhanced in the treatment group at 48 h, 72 h and 96 h. Compared the treatment group at previous time points, the mitochondria of EPCs was more active at 72 h than that at 48 h, and more active at 96 h than that at 72 h ($P < 0.05$). Thus the best intervening time was 96 h. The two groups were cultured with serum containing10% of *Yangxin Tongmai Decoction* and 10% blank serum for 96 h, respectively. The multiplication, migration and adhesion ability of EPCs in the treatment group was superior to that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum containing *Yangxin Tongmai Decoction* might enhance the multiplication, migration and adhesion ability of EPCs. Then ischemic myocardial blood vessel angiogenesis might be promoted. This might be one of the mechanisms of *Yangxin Tongmai Decoction* in the treatment of coronary heart disease.

Keywords coronary heart disease; endothelial progenitor cells; *Yangxin Tongmai Decoction*; mitochondrial activity; cells multiplication; cells migration; cells adhesion

(收稿日期: 2015-09-21; 修回日期: 2016-03-16)

[编辑: 邓 媛]

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net