

黄芪丹参提取物配伍对大鼠骨髓源性 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS 表达的影响

张璪方, 刘暖, 杨雷, 王倩, 毛秉豫*

(南阳理工学院 河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室, 河南 南阳 473004)

[摘要] **目的:**探讨黄芪丹参提取物配伍对骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体 KDR(kinase insert domain receptor, KDR), 血管生成素 I(angiotensin I, Ang I)及内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)表达的影响及其可能的作用机制。**方法:**将离体培养、鉴定后的骨髓源性 EPCs, 使用黄芪提取物、丹参提取物、黄芪丹参提取物配伍($10, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 各 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)分别处理, 并设置空白组, 使用逆转录 PCR(RT-PCR)及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测各处理组 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS mRNA 的表达水平; 用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS 蛋白的表达情况。并使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养液上清中 VEGF 的含量。**结果:**PCR 结果显示, 与空白组比较, 丹参提取物、黄芪提取物组及黄芪丹参提取物配伍组的 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS mRNA 的表达水平均有显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与空白组比较, 丹参提取物、黄芪提取物组 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS 蛋白表达均有显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而黄芪丹参提取物配伍组中的表达量显著高于其他 3 组($P < 0.01$), 尤其是 EPCs 细胞培养液上清中的 VEGF。ELISA 结果显示, 黄芪丹参配伍组 EPCs 中 VEGF 蛋白含量显著高于其他 3 组($P < 0.01$)。**结论:**以“益气化瘀通络生脉”为治则的黄芪丹参提取物配伍可显著调控 EPCs 促血管新生作用, 其作用可能与上调 VEGF 密切相关。

[关键词] 黄芪; 丹参; 血管新生; 离体骨髓源性内皮祖细胞; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5; R22; R24; R274 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0150-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180832

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1520.005.html>

[网络出版时间] 2018-01-24 16:06

Effect of Combined Administration of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma Extract on Expressions of VEGF, KDR, Ang I and eNOS in Rat Bone Marrow-Derived EPCs

ZHANG Li-fang, LIU Nuan, YANG Lei, WANG Qian, MAO Bing-yu*

(Henan Provincial Key Laboratory of ZHANG Zhongjing's Formulae and Herbs for Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the combined administration of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract on the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor kinase insert domain receptor (KDR), angiotensin I (angiotensin I, Ang I) and endothelial nitric oxide synthase (ENOS) in bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs), and its possible mechanism. **Method:** The bone marrow-derived EPCs after *in vitro* culture and identification were treated with Astragali Radix extract, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae

[收稿日期] 20171011(023)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473438)

[第一作者] 张璪方, 硕士, 讲师, 从事仲景方药研究工作, Tel:0377-62071302, E-mail:297951877@qq.com

[通信作者] *毛秉豫, 博士, 教授, 从事心血管疾病的气血并治方药研究工作, Tel:0377-62071301, E-mail:maobingyu2005@126.com

Radix et Rhizoma extract separately (10, 10 mg·L⁻¹, 5 mg·L⁻¹ for each). The control group was set up. Reverse transcription PCR and quantitative Real-time PCR were used to detect VEGF, KDR, Ang I and eNOS mRNA expressions in EPCs of each treatment group. Western blot was used to detect VEGF, KDR, Ang I and eNOS protein expressions in EPCs. The content of VEGF in the supernatant of culture fluid was detected by ELISA. **Result:** PCR results showed that compared with the control group, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract group, Astragali Radix extract group and Astragali Radix and combined Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract group showed significant increases in VEGF, KDR, Ang I and eNOS expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$). According to Western blot results, compared with the control group, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract group and Astragali Radix extract group showed significant increases in VEGF KDR, Ang I and eNOS protein expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas the expressions of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract combination group was significantly higher than that of the other three groups ($P < 0.01$), especially VEGF in the culture supernatant of EPCs cells. The results of ELISA showed that the content of VEGF in EPCs of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract combination group was significantly higher than that in the other three groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** The combination of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract can significantly regulate the angiogenic effect of EPCs, which may be closely related to the up-regulation of VEGF.

[**Key words**] Astragali Radix; Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; angiogenesis; endothelial progenitor cell; vascular endothelial growth factor

心肌梗死的修复和预后与心肌组织血管的状态密切相关,迅速有效的建立侧支循环对改善梗死区心肌和供血具有重要的意义。“治疗性血管新生”已成为治疗心肌缺血最受关注的理论和方法之一,代表着心肌梗死治疗研究的新方向。在近年研究中利用骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)为靶标的研究已经成为临床治疗心肌梗死的新热点,为血管新生治疗策略的典型方法之一,为心血管疾病的治理提供了新的思路和方法^[1-4]。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号级联反应在血管新生过程中发挥着极为重要的作用,VEGF是目前公认最具特异性的强大的促新生血管形成的生长因子。课题组在前期研究中发现 VEGF 在心肌组织生理或病理状态下都可发挥促血管新生的重要调节作用^[5],可以诱导 EPCs 的增殖、迁移、调节黏附分子的表达,促进血管发生^[6],研究还证实了黄芪与丹参两药配伍使用对于气虚血瘀类的心血管疾病,如心绞痛、心肌梗死、心功能衰竭等具有显著的协同增效作用^[7-9]。有关于黄芪与丹参两药配伍使用对大鼠骨髓源性 EPCs 的促血管新生作用少见报道,基于此,本研究将在前期实验研究基础上进一步通过观察黄芪提取物、丹参提取物及两者配伍对骨髓源性 EPCs 处理后 VEGF 的表达变化,探讨黄芪丹参配伍体外促血管

新生的可能作用机制,为黄芪丹参治疗心肌梗死等心血管系统疾病提供新的理论依据,为 EPCs 治疗的临床应用提供实验支持。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 240 g,购自河南省实验动物中心,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。实验动物操作均在郑州大学动物伦理委员会批准下进行(批准号 2016DW-021)。

1.2 仪器 3111 型生物安全柜(Thermo Fisher 公司);IX73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);CB160 型二氧化碳培养箱(德国宾得公司);FACSCelesta 型流式细胞仪(美国 BD 公司);T25 型组织匀浆机(德国 IKA 公司);M200 型酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司);ViiA7 型实时荧光定量 PCR 仪,2720 型普通 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪,Mini Trans-Blot Cell 转膜仪, Gel Doc XR + 全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);LYNX4000 高速冷冻离心机(美国赛默飞公司);Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.3 试剂 Dulbecco's PBS(上海美季生物技术有限公司,批号 20X500 m);EBM-2 培养基(瑞士 Lonza 公司,批号 CC-3156);VEGF 试剂盒,VEGF 受体 KDR 试剂盒,血管生成素 I (Ang I)试剂盒(上海冠导生物工程有限公司,批号分别为 SBJ-ROBO,

SGD018363, SGD018364); GoTaq Green Master Mix 荧光定量试剂盒(美国 Promega 公司,批号 A1250); VEGF 抗体, KDR 抗体, Ang I 抗体, 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抗体(武汉博士德公司,批号分别为 EK0541, 10R-1869, BA0188, EK0697); trizol 试剂(美国赛默飞公司,批号 103105); Dulbeccos PBS(上海浩然生物技术有限公司,批号 BSS-1005-A)。

2 方法

2.1 EPCs 的体外分离、培养与鉴定 SD 大鼠颈椎脱臼处死后, 75% 乙醇浸泡 10 min, 无菌环境下取出胫腓骨, 用含肝素和 DNA 酶 I 的 Dulbecco's PBS 反复冲洗骨髓, 收集骨髓液, 小心置于等量的淋巴细胞分离液之上, 以 $1\ 700\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 无菌细吸管吸取分离液中的白膜层, $5\times\text{FBS}$ 和 single quotes 等多种因子的 EBM-2 培养基重悬, 1×10^5 个/ cm^3 接种于培养板中, 1 d 后将未贴壁的细胞悬液预先用 FN($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 包被的 6 孔细胞培养板中培养, 3 d 后换第 1 次液, 之后每隔 3 d 换液 1 次, 倒置显微镜下进行细胞形态学观察, 7~10 d 后, 待测细胞融合 80% 后, 采用胶原酶消化后传代培养。对培养的内皮细胞观察其生长状态, 分别在 4, 7, 10, 14 d 拍照并记录。对新分离的骨髓单核细胞进行滴片, 于第 4, 7, 10, 14 天取生长良好的原代细胞, 重悬于 PBS 中, 分别与 EPCs 细胞表面标记物 CD133, CD34, VEGFR-2 结合, 应用流式细胞仪检测阳性细胞比例。

2.2 黄芪丹参提取物的分离与纯化 黄芪丹参提取物本课题组在前期国家自然科学基金课题项目“黄芪丹参配伍提取物对心肌梗死后心室重构中 PKD-AP-1/C-Jun-MMPs 信号传导通路影响的研究(81173372)”等的支持基础上已经提取纯化完毕^[10], 黄芪丹参提取物均由南阳理工学院方药研究所提供, 系经水提、大孔吸附树脂纯化所得, 纯化后的黄芪提取物(黄芪总苷的含量为 66.9%), 含生药 $32.21\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 纯化后的丹参提取物(丹参总酚酸的含量为 63.7%), 含生药 $15.46\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[10]。

2.3 分组与给药 实验分为 4 组, EPCs 培养空白组(EPCs 正常培养, 未加入任何干预药物), 黄芪提取物组(黄芪提取物终质量浓度 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 丹参提取物组(丹参提取物终质量浓度 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 黄芪丹参提取物配伍组(黄芪丹参提取物 1:1 添加, 各 $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 质量浓度参照本课题前期研究^[11]。

2.4 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 EPCs

中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS mRNA 表达水平 Trizol 法提取各实验组处理 24 h 后的骨髓源性 EPCs 中总 RNA, 每组细胞取总 RNA $4\ \mu\text{g}$, 根据 Promega 反转录试剂盒说明步骤操作合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。VEGF 上游 5'-ATGA ACTTTCTGCTCTCTTGGG-3', 下游 5'-CTCTCCTA TGTGCTGGCTTTG-3', 产物长度 354 bp; KDR 上游 5'-TCACGGTTGGGCTACTGG-3', 下游 5'-AGACCT TCTGCCATCAG-3', 产物长度 418 bp; Ang I 上游 5'-GCTAGCTATTCGGATCG-3', 下游 5'-TTAGCG GGACCCTTTATAGC-3', 产物长度 238 bp; eNOS 上游 5'-ATCGGTACGCTAAAGCCTAT-3', 下游 5'-CATGCTTATTGGACGCTAGC-3', 产物长度 312 bp; β -actin 上游 5'-CCTGAGAG CATTGAGGTGG-3', 下游 5'-GAGCT ACGAGCTGCCTGACG-3', 产物长度为 316 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。扩增条件为 $94\ ^\circ\text{C}\ 5\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $55\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, 35 循环; $72\ ^\circ\text{C}\ 5\ \text{min}$ 。取反应产物 $10\ \mu\text{L}$ 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后使用 Bio-Rad 凝胶电泳成像系统观察条带并拍照, 使用 Image J 图像分析软件分析各指标与 β -actin 的灰度值比值计算。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS mRNA 表达 取上述实验中反转录得到的 cDNA 母液 $2\ \mu\text{g}$ 以 3 的倍数递减稀释成 5 个梯度。利用待测 VEGF, KDR, Ang I, eNOS 引物和 β -actin 引物进行定量 PCR 扩增, 观察溶解曲线并调整模板浓度和反应条件使两对引物的扩增效率保持一致或接近。按下列体系混匀待测样品 GoTaq Green Master Mix $2\times$, $10\ \mu\text{L}$; 上下游引物($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 各 $0.4\ \mu\text{L}$; cDNA 模板, $5\ \mu\text{L}$; 无核酸酶的水, $4.2\ \mu\text{L}$ 。每组进行 3 次重复。按如下程序使用 Applied Biosystems FAST 荧光定量 PCR 进行基因扩增 $95\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$; $95\ ^\circ\text{C}$, $15\ \text{s}$; $55\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$, 40 循环按 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS 蛋白水平的表达 用 IKA 组织破碎仪加入 RIPA 细胞裂解液, 并用超声波破碎仪充分裂解细胞, $4\ ^\circ\text{C}\ 12\ 000\times g$ 离心 10 min, 提取总蛋白后使用 BCA 法测定蛋白浓度, 取蛋白 $20\ \mu\text{g}$ 进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转 4.5 h 至 PVDF 膜上。用 TBST $10\ \text{mL}$, 室温 $50\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\ 5\ \text{min}$ 漂洗 PVDF 膜。

倒出 TBST 加入 10% 脱脂奶粉, 60 r·min⁻¹ 4 °C 封闭过夜。用抗体孵育液 10 mL 将 VEGF 一抗按 1:1 000 稀释, 室温 60 r·min⁻¹ 1.5 h 孵育 PVDF 膜。用 TBST 10 mL, 室温 60 r·min⁻¹ 10 min, 重复洗涤 PVDF 膜 5 次。用抗体孵育液 10 mL 按 1:1 万稀释二抗, 室温 60 r·min⁻¹ 孵育 2 h。用 TBST 10 mL, 室温 60 r·min⁻¹ 10 min。重复洗涤 PVDF 膜 3 次。将 PVDF 膜用镊子提起, 在滤纸上稍稍淋干, 将发光底物和反应液各吸取 1 mL 混合后将 PVDF 膜放入, 室温孵育 5 min。将 PVDF 膜放入曝光暗室曝光, 用 β -actin 作为内参, 以各蛋白与 β -actin 的灰度值比值表示各组的蛋白表达水平。

2.7 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定分泌型 VEGF 蛋白水平 每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。取鉴定后的骨髓源性 EPCs, 分别加入对应的提取物处理 48 h 后, 按照 ELISA 试剂盒操作步骤检测培养上清液中分泌型可溶性 VEGF, 在酶标仪 450 nm 吸光度 A。

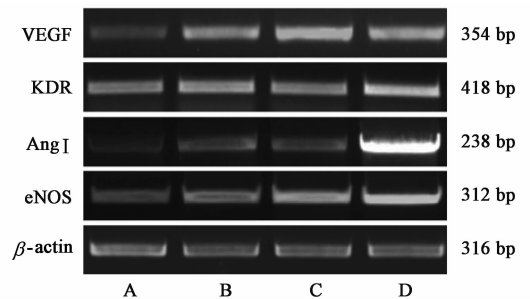
2.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计分析软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 骨髓源性 EPCs 的鉴定 EPCs 呈卵圆形、纺锤形或者不规则状, 培养 7 d 的 EPCs 用流式细胞仪鉴定细胞表型, CD133 表达率为 26.21%, CD34 表达率为 36.72%, KDR 表达率为 18.04%。

3.2 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I

及 eNOS mRNA 表达影响 与 EPCs 培养空白组比较, 黄芪处理组、丹参处理组及黄芪丹参配伍组 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 黄芪组较低于其他两处理组。RT-PCR 与 Real-time PCR 中各基因的表达量稍有不同, 但整体趋势一致。其中 VEGF mRNA 水平的表达在黄芪提取物组、丹参提取物组与黄芪丹参提取物配伍组 3 组之间的差异无统计学意义; KDR, Ang I 和 eNOS mRNA 水平的表达结果表明, 黄芪提取物及丹参提取物的单独处理均能显著提高表达水平, 而黄芪丹参配伍组的处理显著高于两单独处理组的表达量。见图 1, 表 1, 2。



A. 空白组; B. 黄芪提取物组; C. 丹参提取物组; D. 黄芪丹参提取物配伍组 (图 2 同)

图 1 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS mRNA 表达电泳

Fig.1 Expression of VEGF, KDR, Ang I and eNOS mRNA in endothelial progenitor cells by Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract

表 1 RT-PCR 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract on expression of VEGF, KDR, Ang I and eNOS mRNA in EPCs (RT-PCR, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	VEGF/ β -actin	KDR/ β -actin	Ang I/ β -actin	eNOS/ β -actin
空白	-	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
黄芪提取物	10	4.83 ± 0.30 ¹⁾	1.51 ± 0.40 ¹⁾	2.16 ± 0.28 ¹⁾	2.57 ± 0.19 ¹⁾
丹参提取物	10	4.52 ± 0.44 ¹⁾	1.12 ± 0.37 ¹⁾	3.82 ± 0.29 ¹⁾	2.06 ± 0.23 ²⁾
黄芪丹参提取物配伍	5 + 5	4.21 ± 0.54 ¹⁾	2.16 ± 0.48 ¹⁾	6.27 ± 0.41 ²⁾	3.02 ± 0.40 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

表 2 Real-time PCR 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract on expression of VEGF, KDR, Ang I and eNOS mRNA in EPCs (Real-time PCR, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	VEGF	KDR	Ang I	eNOS
空白	-	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
黄芪提取物	10	3.34 ± 0.29 ¹⁾	1.82 ± 0.41 ¹⁾	3.13 ± 0.28 ¹⁾	2.51 ± 0.17 ¹⁾
丹参提取物	10	3.52 ± 0.25 ¹⁾	1.71 ± 0.32 ¹⁾	3.42 ± 0.25 ¹⁾	2.87 ± 0.34 ¹⁾
黄芪丹参提取物配伍	5 + 5	4.30 ± 0.55 ¹⁾	2.57 ± 0.44 ²⁾	12.26 ± 0.81 ²⁾	4.61 ± 0.38 ²⁾

3.3 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS 蛋白水平的表达影响 与空白组比较, 黄芪处理组、丹参处理组及黄芪丹参配伍组 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I, eNOS 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中黄芪丹参配伍组 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 蛋白表达量高于两单独处理组, eNOS 在配伍组与黄芪丹参两提取物单独处理组并无显著差异。可见黄芪提取物与丹参提取物均对血管内皮生长因子 VEGF 的产生起到促进作用, 两者配伍可加强这种促进作用。见图 2, 表 3。

3.4 黄芪丹参提取物配伍对 EPCs 中分泌型 VEGF 蛋白水平的影响 与空白组比较, 黄芪处理组、丹参

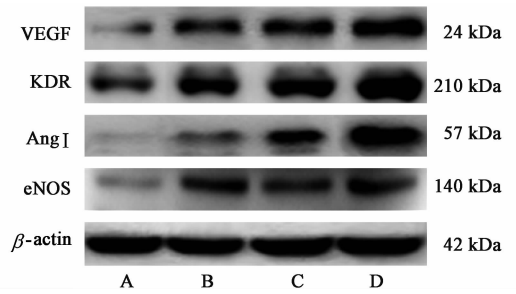


图 2 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 和 eNOS 蛋白水平的表达电泳

Fig. 2 Expression of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract in proteins of VEGF, KDR, Ang I and eNOS in endothelial progenitor cells

表 3 黄芪丹参提取物对 EPCs 中 VEGF, KDR, Ang I 及 eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract on expression of VEGF, KDR, Ang I and eNOS protein in EPCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF/ β -actin	KDR/ β -actin	Ang I / β -actin	eNOS/ β -actin
空白	-	1.00 \pm 0	1.00 \pm 0	1.00 \pm 0	1.00 \pm 0
黄芪提取物	10	2.83 \pm 0.25 ¹⁾	3.51 \pm 0.39 ¹⁾	2.16 \pm 0.23 ¹⁾	2.57 \pm 0.26 ¹⁾
丹参提取物	10	3.22 \pm 0.35 ¹⁾	3.82 \pm 0.43 ¹⁾	3.83 \pm 0.21 ²⁾	2.06 \pm 0.25 ¹⁾
黄芪丹参提取物配伍	5 + 5	5.90 \pm 0.57 ²⁾	5.15 \pm 0.48 ²⁾	6.44 \pm 0.43 ²⁾	3.02 \pm 0.23 ²⁾

处理组及黄芪丹参配伍组 EPCs 培养液上清中 VEGF 的蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$), 其中黄芪丹参配伍组 EPCs 中 VEGF 蛋白含量显著高于其他 3 组, 见表 4。黄芪丹参提取物配伍组可显著促进 VEGF 蛋白的分泌, 分泌量分别高于两单独处理组时分泌量的 67% 和 73%。

表 4 黄芪丹参提取物对 EPCs 中分泌型 VEGF 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Quantitative analysis of secretory type VEGF in supernatant of EPCs culture by ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	54.4 \pm 5.12
黄芪提取物	10	87.7 \pm 3.67 ¹⁾
丹参提取物	10	91.2 \pm 4.92 ¹⁾
黄芪丹参提取物配伍	5 + 5	124.8 \pm 6.60 ^{1,2)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与黄芪、丹参提取物单独处理组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

《神农本草经》记载黄芪味甘, 性微温, “治一切气衰血虚之证”可补中益气, 贯通心肺, 舒经活络而消瘀血。研究报道表明黄芪具有促血管新生和促进造血的功效^[12-13]。丹参味苦, 性微寒, 是一种颇具

活血化瘀代表性的中药, 素有“一味丹参饮, 功同四物汤”的美誉。研究证实, 丹参有促进心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用, 其机制可能与促进 VEGF, bFGF 等表达有关^[14]。黄芪、丹参, 两药配伍, 气旺则血行, 通过补益胸中之气, 贯通心肺, 疏通经络从而起到活血化瘀之功效, 临床常用于心脑血管病的治疗。基于以往的实验研究发现, 黄芪、丹参配伍提取物对心血管疾病具有显著的疗效^[15-16]。

骨髓源性内皮祖细胞 EPCs 可在炎症因子、缺氧等作用下, 由骨髓进入损伤部位分化成血管内皮细胞, 参与血管修复与生成。在本研究中, 使用丹参提取物、黄芪提取物及黄芪丹参提取物配伍对 EPCs 进行处理后与空白组比较, VEGF mRNA 水平上的表达均显著升高。但 3 组之间表达量差异并不明显。这表明黄芪、丹参可以有效地促进 VEGF 基因在转录水平上的表达。KDR 主要作用于内皮细胞有丝分裂过程, 引起大量增殖, 参与 VEGF 的生物效应, 是 VEGF 促血管生成的主要受体, 是血管内皮细胞分化不可缺少的。研究证实 VEGF 及其受体 KDR 在血管形成中起重要作用^[17]。本研究结果同样显示, 各组骨髓源性 EPCs 中 KDR 表达均有不同程度的增高, 且表达结果与 VEGF 呈正相关。作为血管成熟的重要肽类生长因子之一的 Ang I, 在机

体组织中表达广泛,具有强大的趋化作用,可有效促进内皮细胞增殖、分化、迁移,在血管新生和血管完整性中发挥重要作用。刘翔等^[18]研究表明 VEGF 联合 Ang I 治疗心肌梗死大鼠,改善左心室收缩功能。本研究中使用黄芪丹参提取物配伍干预后,Ang I 表达明显高于其他各组,表明黄芪丹参提取物配伍可有效促进血管新生。eNOS 主要存于血管的内皮细胞,是内皮组织特异性蛋白,在维持血管稳定和调节血管张力等方面发挥着重要作用。既往文献研究表明丹参等活血化瘀类中药可以通过上调 eNOS 生物活性从而起到改善内皮细胞的作用^[19]。本研究显示黄芪丹参提取物配伍可明显上调 eNOS 表达,推测在 VEGF/KDR 介导下进而上调 Ang I 的表达,发挥其在骨髓源性 EPCs 中促血管新生的作用。本研究应用 Western blot 检测不同处理组 EPCs 细胞中 VEGF 蛋白的相对表达量,并应用 ELISA 的方法检测不同处理组 EPCs 培养液中释放的 VEGF 的含量。与空白组比较,丹参提取物、黄芪提取物及两者配伍组 EPCs 细胞中 VEGF 的表达量及分泌量均明显升高,且黄芪丹参配伍组较黄芪提取物或者丹参提取物处理组表达量和分泌量更高,这表明两者配伍对 EPCs 细胞中 VEGF 的表达与分泌的调节效果更佳。

本次实验研究表明,以“益气化瘀通络生脉”为治则的黄芪丹参提取物配伍可显著调控 EPCs 促血管新生作用,其作用可能与上调 VEGF 密切相关。

[参考文献]

[1] Smadja D M. Bone marrow cell therapy in cardiovascular disease drives us slowly to a better identification of the active cell component[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(1):16-17.

[2] HUANG B Q, QIAN J Y, MA J Y, et al. Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 α and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(1): 22-23.

[3] 刘暖,杨雷,毛秉豫,等. 蛋白激酶 D1 在大鼠骨髓源性内皮祖细胞中的促血管新生作用[J]. 中国药理学通报,2015,31(9):1259-1264.

[4] 刘暖,毛秉豫,杨雷,等. 黄芪提取物对大鼠骨髓源性内皮祖细胞的作用[J]. 天津医药,2015,43(10): 1093-1096,1217.

[5] 杨雷,刘暖,毛秉豫,等. 蛋白激酶 D1 促血管新生的

体内实验分析[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(1):146-150,155.

[6] Blasio L D, Droetto S, Norman J, et al. Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced $\alpha v \beta 3$ integrin trafficking and endothelial cell migration[J]. Traffic, 2010, 11(8):1107-1118.

[7] 毛秉豫,茹永新. 芪参益气滴丸对模型大鼠心肌梗死后左室结构及心功能的影响[J]. 中医杂志,2011,52(2):151-154.

[8] 杨雷,毛秉豫,徐国昌,等. 黄芪提取物对大鼠心肌梗死后心肌组织 PKD1 蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(4):535-539.

[9] 杨雷,毛秉豫. 芪参益气滴丸对心肌梗死大鼠心肌的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5): 167-171.

[10] 杨雷,毛秉豫,徐国昌,等. 黄芪和丹参提取物配伍对大鼠心肌梗死后心肌组织病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):175-179.

[11] 高红莉,王德才,曲晓兰,等. 黄芪丹参配伍对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(5):95-98.

[12] 张玲. 芪参益气方促血管新生机制及抗心肌缺血作用研究[D]. 杭州:浙江大学,2011.

[13] 王振涛,韩丽华,朱明军,等. 丹参注射液促心肌梗塞后大鼠缺血心肌血管新生作用及对相关生长因子的影响研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(6): 1315-1318.

[14] 苏懿,王磊,张敏州. 急性心肌梗死的流行病学研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(4):467-469.

[15] 毛秉豫,茹永新. 芪参益气滴丸对模型大鼠心肌梗死后左室结构及心功能的影响[J]. 中医杂志,2011,52(2):151.

[16] 谢东霞,毛秉豫. 芪参益气滴丸对心肌梗死后气虚血瘀证患者心室重构及心功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):192-196.

[17] DENG Q, HU B, CAO S, et al. Improving the efficacy of therapeutic angiogenesis by UTMD-mediated Ang-1 gene delivery to the infarcted myocardium[J]. Int J Mol Med,2015,36(2):335-344.

[18] 刘翔,陈亦江,张馥敏,等. VEGF165 和 Ang-1 协同改善急性心梗大鼠心功能[J]. 中华胸心血管外科杂志,2005,21(5):295-297.

[19] 李永胜,王照华,严丽,等. 丹参酮 II A 对大鼠肥厚心肌 NO 产生及 eNOS 基因表达的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):1446-1450.

[责任编辑 全燕]