

血府逐瘀胶囊调控血管新生中 Jagged1/Notch 信号的作用机制

王一铮, 林凡, 蔡飞, 胡雅琼, 高冬*
(福建中医药大学, 福州 350122)

[摘要] **目的:**探讨 Jagged1/Notch 信号通路在血府逐瘀胶囊调控血管新生中的作用。**方法:**以 2.5% 的血府逐瘀胶囊含药血清和空白血清分别干预人微血管内皮细胞(HMEC-1),通过实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测药物处理细胞 12,24,36,48 h 时 Jagged1 mRNA 水平的表达,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测药物处理细胞 12,24,48 h 时 Jagged1 在蛋白质水平的表达;在血府逐瘀胶囊促血管新生最佳药效条件下,使用 γ -分泌酶抑制剂(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT)阻断 Notch 信号通路,设置 DAPT 处理组,二甲基亚砜(DMSO)溶剂组和空白组,通过体外成血管实验检测抑制 Jagged1/Notch 信号对药物诱导 HMEC-1 体外成血管能力的影响。**结果:**血府逐瘀胶囊含药血清干预内皮细胞 12 h 能上调 Jagged1 在 mRNA 水平表达($P < 0.01$),药物干预细胞 24 h 能同时上调 Jagged1 在 mRNA 和蛋白水平表达($P < 0.05$);DAPT 阻断 Notch 信号后,药物促体外成血管能力下降。**结论:**血府逐瘀胶囊可通过调控 Jagged1 表达,影响 Jagged1/Notch 信号通路,从而调控血管新生。

[关键词] 血府逐瘀胶囊; 血管新生; Jagged1; Notch

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220132

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1126.060.html>

[网络出版时间] 2017-08-09 11:26

Effect of Xuefu Zhuyu Capsule in Regulating Jagged1/Notch Signal in Angiogenesis

WANG Yi-zheng, LIN Fan, CAI Fei, HU Ya-qiong, GAO Dong*
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Xuefu Zhuyu capsule (XZC) in regulating Jagged1/Notch signal in angiogenesis. **Method:** XZC-containing serum and blank serum were used respectively to treat human microvascular endothelial cell-1 (HMEC-1). The mRNA expression of Jagged1 was detected by Real-time quantitative (PCR) at 12, 24, 36, 48 h, and the protein expression of Jagged1 was detected by Western blot at 12, 24, 48 h. The γ -secretase inhibitor DAPT was used to block the Notch signaling pathway under the optimal condition of promoting angiogenesis by XZC. The cells were randomly divided into 3 groups, namely DAPT processing group, solvent control group and blank control group. The angiogenesis effect was tested by an *in vitro* angiogenesis assay. **Result:** XZC up-regulated the mRNA expression of Jagged1 after culturing HMEC-1 cells for 12 h ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of Jagged1 were up-regulated at 24 h ($P < 0.05$). The ability of angiogenesis *in vitro* was inhibited after the Notch signaling pathway was blocked by DAPT. **Conclusion:** XZC can regulate the expression of Jagged1, and Jagged1/Notch signaling pathway may be correlated with XZC's effect on regulating angiogenesis.

[Key words] Xuefu Zhuyu capsule; angiogenesis; Jagged1; Notch

[收稿日期] 20170624(004)

[基金项目] 福建省教育厅中青年教育科研项目(JA15244);福建省自然科学基金项目(2016J01389);福建中医药大学校管课题项目(X2014030-学科)

[第一作者] 王一铮, 硕士, 讲师, 从事中西医结合基础及中药药理学研究, Tel:0591-22861151, E-mail: carrotwyz@sina.com

[通讯作者] *高冬, 硕士, 教授, 从事中西医结合基础及中药药理学研究, Tel:0591-22861151, E-mail: gd1026@yahoo.com.cn

血管新生能改善机体局部缺血状态,在缺血性疾病的治疗中起重要作用^[1]。目前促血管新生的西药以各类生长因子为主,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为促血管新生的第一个临床试验药物被广泛用于各类缺血性实验研究,但由于 VEGF 具有持续的促血管新生作用,在缺血性疾病的治疗中可能带来动脉粥样斑块扩张生长、肿瘤形成与转移、视网膜病变等副作用^[2-4]。这些生长因子在促血管新生治疗中带来的副作用使其临床应用处于一种相当尴尬的局面。

血府逐瘀汤为清代名医王清任所著《医林改错》中具有代表性的一个活血化瘀方剂,该方在临床上可用于缺血性疾病防治、抗动脉粥样硬化以及治疗经皮冠状动脉成形术后的血管再狭窄^[5],长期的临床和基础研究至今未见其明显副作用的报道。前期的基础研究表明,该方剂具有显著的促血管新生作用^[6-8],而且与西药不同的是,血府逐瘀汤诱导血管新生的作用与药物反应时间及浓度不成线性关系,而是存在一个最佳药物浓度和作用时间点^[9],这可能与其适度调节血管新生作用有关,体现出中药治疗缺血性疾病的优势,但其机制尚未完全阐明。Jagged1 是存在于哺乳动物细胞膜上 Notch 受体的主要配体之一,Jagged1/Notch 信号通路在血管新生过程中起到重要调控作用^[10-11]。本研究通过检测血府逐瘀胶囊含药血清对人微血管内皮细胞 HMEC-1 中 Jagged1 表达的影响,以及观察阻断 Notch 信号通路后,血府逐瘀胶囊诱导 HMEC-1 体外成血管能力的变化,探讨 Jagged1/Notch 信号通路在血府逐瘀胶囊调控血管新生中的作用,进一步揭示药物促血管新生作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 12 只,6 周龄,体重(150 ± 20)g,雌雄各半,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪)2012-0002,由福建中医药大学实验动物中心饲养。动物饲养条件为温度 21 ~ 25 °C,湿度 50% ~ 60%,除给药时间外均正常摄食饮水。动物实验过程均遵守福建中医药大学关于动物实验伦理学的相关规定。

1.2 细胞株 人微血管内皮细胞 HMEC-1 由中科院上海药物研究所丁健院士惠赠。

1.3 药物 血府逐瘀胶囊(天津宏仁堂药业有限公司,国药准字 Z12020223)。

1.4 试剂 戊巴比妥钠,MCDB-131 细胞培养基,

二甲基亚砜 DMSO(美国 Sigma 公司,批号分别为 1030001, M8537, D2650); γ -分泌酶抑制剂(DAPT, 美国 Selleck 公司,批号 S221501); *In vitro* Angiogenesis Assay Kit(美国 Millipore 公司,批号 2658909); trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 1011105); PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR Premix Ex Taq™(日本 Takara 公司,批号分别为 AK3102, AK7803); RIPA 裂解液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013B, P0010S, A0208); 兔抗 β -肌动蛋白(β -actin), 兔抗 Jagged1(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 4970S, 2155S); ECL 化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 20130)。

1.5 仪器 IX70 型倒置相差显微镜及摄像装置(日本 Olympus 公司); ABI7500 型 PCR 基因扩增仪(美国 ABI 公司); Power Pac™ Basic 型电泳仪, Mini Trans-blot 转印槽, Universal Hood III 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备^[9] 将大鼠随机分为药物组和空白组,每组 6 只,血府逐瘀胶囊用生理盐水溶解,参照人和动物间用药剂量的换算,药物组经预实验确定最优剂量为每天给药剂量为正常成人单位体重剂量的 12 倍,即 0.96 g·kg⁻¹·d⁻¹,空白组给予等剂量的生理盐水,每天 2 次,连续灌胃 7 d。末次灌胃 2 h 后,3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,4 000 r·min⁻¹,离心 30 min 分离血清,56 °C 灭活补体 30 min,0.22 μ m 微膜过滤除菌后,-20 °C 保存备用。

2.2 细胞培养及含药血清处理 HMEC-1 采用含 5% 胎牛血清的 MCDB 培养液,以 2.5 × 10⁵ 个/mL 的密度接种,于 37 °C 5% CO₂ 条件下培养,待细胞贴壁后经同步化处理,随机分成药物组和空白组,分别换含 2.5% 含药血清和空白血清的 MCDB 培养液诱导处理,2.5% 含药血清为药物促血管新生最佳药效浓度^[9,12]。

2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 Jagged1 表达水平 血府逐瘀胶囊含药血清或空白血清分别处理 HMEC-1 细胞 12, 24, 36, 48 h 后,收集各组细胞,trizol 法提取总 RNA,应用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度、浓度和完整性;逆转录反应按 PrimerScript RT reagent Kit 说

说明书方法操作,反应参数如下:去除基因组 DNA 反应 42 °C 2 min,反转录反应 37 °C 15 min,反转录酶失活反应 85 °C 5 s。PCR 反应引物由 Takara 公司设计合成,引物序列见表 1。PCR 反应在 ABI7500 Fast Real-time PCR 仪上进行,反应条件按 SYBR premix Ex Taq™ 试剂盒操作,预变性 95 °C 30 s,1 个循环,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环。反应结束后,使用 ABI7500 Fast 软件分析每个检测样本 C_t 值,结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示各处理组目的基因表达变化。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primers for Real-time PCR

基因名称	引物序列	片段长度/ bp
β -actin	上游 5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'	186
	下游 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'	
Jagged1	上游 5'-GATTGCTGCCGTTGCAGAAGTA-3'	110
	下游 5'-AGCAACAGATCCAAGCCACAGTTA-3'	

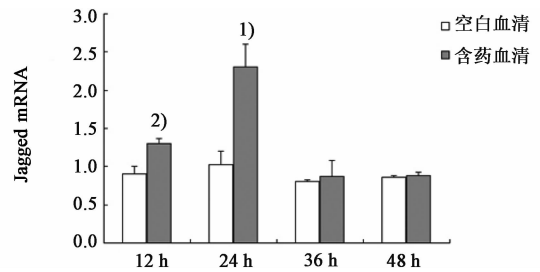
2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Jagged1 蛋白表达水平 血府逐瘀胶囊含药血清或空白血清分别处理 HMEC-1 细胞 12,24,48 h 后,收集各组细胞,提取总蛋白,BCA 法定量后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,Jagged1 抗体(1:500), β -actin 抗体(1:1000)孵育,4 °C 过夜。洗膜后以辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000)孵育 1 h 后洗膜,ECL 化学发光法显影,化学发光成像系统 Universal Hood III 获取图像,Image Lab 3.0 软件分析蛋白条带灰度值。

2.5 DAPT 对 HMEC-1 细胞成血管能力的影响 含药血清和空白血清组培养液中分别加入 γ -分泌酶抑制剂 DAPT(终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),即 DAPT 处理组,并设溶剂组(往含药血清或空白血清组培养液中加入与 DAPT 等体积的 DMSO,并使其体积分数 $\leq 0.1\%$)和空白组(只用含药血清或空白血清组培养液处理细胞)。以上各组细胞培养 48 h 后,收集细胞,参考 *In vitro* Angiogenesis Assay 试剂盒说明书进行体外成血管实验,于 4 °C 预冷的 96 孔培养板中铺匀预混好的 ECMatrix™ solution $50 \mu\text{L}$,37 °C 放置 2 h 凝固后,每孔分别接种 3×10^4 个细胞,体积为 $150 \mu\text{L}$,37 °C 培养 6 h 后随机选择 6 个高倍视野($\times 200$),计算形成的管腔总数。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血府逐瘀胶囊对 HMEC-1 中 Jagged1 mRNA 水平表达的影响 实时定量 PCR 结果显示,血府逐瘀胶囊含药血清处理 12,24 h 时,含药血清组 Jagged1 mRNA 表达与空白血清组比较有所提高,变化有统计学意义。见图 1。

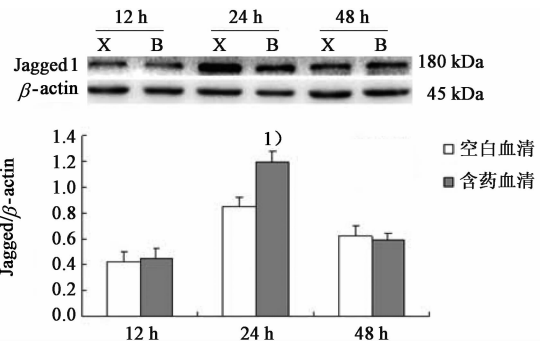


与空白血清组相同处理时间比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

图 1 血府逐瘀胶囊对 HMEC-1 中 Jagged1 mRNA 水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.1 Effect of XZC on mRNA expression of Jagged1 in HMEC-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 血府逐瘀胶囊对 HMEC-1 中 Jagged1 的蛋白表达水平的影响 Western blot 结果显示,血府逐瘀胶囊含药血清处理 HMEC-1 细胞 24 h 时,Jagged1 较空白血清组蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

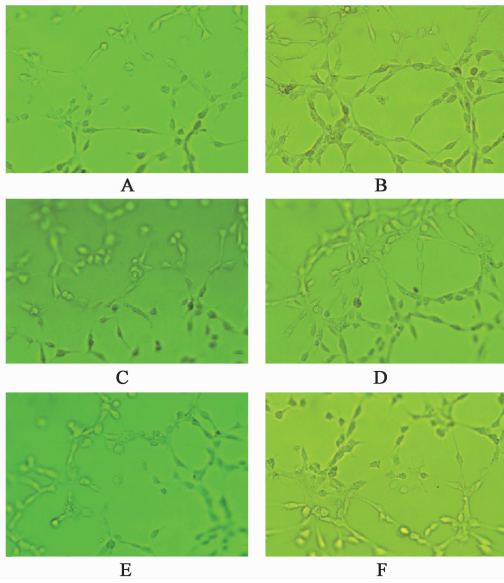


注: X. 含药血清组; B. 空白血清组; 与空白血清组相同处理时间比较¹⁾ $P < 0.05$

图 2 血府逐瘀胶囊对 HMEC-1 中 Jagged1 的蛋白质水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.2 Effect of XZC on protein expression of Jagged1 in HMEC-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

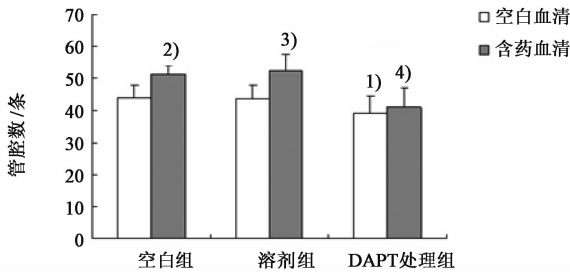
3.3 不同处理方式对 HMEC-1 体外成血管能力的影响 与空白血清组比较,含药血清组体外成血管数量明显增多;与空白组比较,添加 DMSO 的溶剂组成血管能力无显著差异,DAPT 处理组中空白血清组和含药血清组成血管数量都显著减少。见图 3,4。



A, C, E. 分别为空白组, 溶剂组, DAPT 处理组中的空白血清组; B, D, F. 分别为空白组, 溶剂组, DAPT 处理组中的含药血清组

图 3 各处理方式对体外成血管能力的影响(光镜, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of different treatment methods on *in vitro* angiogenesis (LM, $\times 200$)



与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与溶剂组中的空白血清组比较³⁾ $P < 0.01$; 与空白组中的含药血清组比较⁴⁾ $P < 0.01$

图 4 各处理组体外成血管能力比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 4 Comparison of ability of *in vitro* angiogenesis between different treatment groups($\bar{x} \pm s, n = 9$)

4 讨论

血管新生是指在原已存在的毛细血管网基础上,通过内皮细胞增殖、迁移和出芽形成新的毛细血管的过程。它不仅是机体正常发育、生殖和组织修复等生理过程的基础,也对缺血性疾病治疗起重要作用。血府逐瘀胶囊为活血化瘀之经典方,该方中桃红四物汤为补血活血祛瘀的基本方,四逆散是疏肝理气和营之主方,桔梗载药上行,牛膝引药下行,各药合用起到理气活血之功效。前期研究表明血府逐瘀汤诱导血管新生的作用与药物反应时间及浓度不成线性关系,在非缺氧条件下,血府逐瘀胶囊 2.5% 含药血清处理 HMEC-1 细胞 48 h 能显著促进血管新生,而 2.5% 含药血清处理细胞 24, 72 h 以及

用 1.25% 含药血清处理 24, 48, 72 h 对血管新生的影响都不显著;并发现 5% 含药血清处理细胞 48, 72 h 反而会抑制血管新生^[12]。以上现象表明,血府逐瘀汤能调控血管适度生长,药物促血管新生作用存在最佳药效条件,即 2.5% 含药血清处理细胞 48 h。因此实验选用该最佳药效条件研究药物对 HMEC-1 体外成血管能力影响,以及研究在最佳药效浓度下 Jagged1 基因表达的变化。

Notch 信号通路是影响细胞命运的保守而重要的信号通路,可参与血管新生过程中的多个步骤,如顶细胞的分化、内皮细胞的增殖、成熟血管结构的形成等^[13]。在卵黄囊和胎盘 Notch 受体纯合子缺失小鼠,可发生严重血管塑形缺陷而导致胚胎早期致死^[14];在体外基质胶实验中, γ 分泌酶抑制剂的应用能显著减少新生血管的形成^[15];LI 等^[16]发现,应用 γ 分泌酶抑制剂阻断 Notch 信号能破坏大血管并消除肿瘤对 VEGF 抑制剂贝伐单抗的抵抗。本实验结果显示, γ 分泌酶抑制剂 DAPT 在体外能显著抑制血府逐瘀汤促 HMEC-1 细胞体外成血管能力,进一步证明了 Notch 信号通路在血管新生中的重要作用,也表明血府逐瘀胶囊很可能通过 Notch 信号通路发挥调控血管新生的作用。

在血管内皮细胞中,主要表达 Notch1, Notch4 两种受体和 Jagged1, Dll1 和 Dll4 3 种配体,其中 Jagged1 的表达能促进血管出芽和增加血管密度^[17]。在前期研究中,利用实时定量 PCR 芯片研究发现,用 2.5% 血府逐瘀汤含药血清处理 HMEC-1 细胞 24 h 时 Jagged1 的表达上调,而处理 48, 72 h 时 Jagged1 表达不变^[18];本实验中 Real-time PCR 和 Western blot 结果显示,该浓度含药血清处理 HMEC-1 细胞 24 h 能显著增加 Jagged1 表达,而处理 48 h 时 Jagged1 表达与空白血清处理组比较无显著差异,这些结果与前期 Real-time PCR 芯片研究结果一致,但是药物上调 Jagged1 表达的时间点(24 h)与前期研究发现的药物促血管新生最佳药效作用时间点(48 h)存在差异。这可能与细胞信号转导过程中从信号浓度发生变化到细胞作出应答存在的时间差有关,而且药物调控血管新生的过程受到多条信号通路共同调节, Jagged1 对血管新生的影响主要发生在药物作用的早期阶段,血府逐瘀汤可能先通过上调 Jagged1 表达,促进血管出芽、分支,促进血管新生;而随作用时间延长,对 Jagged1 表达影响减弱,有利于控制新生血管的数量,也有利于血管的成熟化,增强其灌注能力。

综上所述,血府逐瘀胶囊很可能通过 Jagged1/Notch 信号通路调控血管新生。但在此过程中 Jagged1 究竟与哪种 Notch 受体相互作用,其他 Notch 配体是否也参与血府逐瘀胶囊调控血管新生的过程?要回答这两个问题还需进一步的研究,以完善对血府逐瘀胶囊调控血管新生机制的认识,为活血化瘀药物的临床应用提供现代的科学理论依据。

[参考文献]

[1] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(4):273-286.

[2] Epstein S E, Stabile E, Kinnaird T, et al. Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis [J]. Circulation, 2004, 109(23):2826-2831.

[3] Masuda K, Teshima-Kondo S, Mukaijo M, et al. A novel tumor-promoting function residing in the 5' non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA [J]. PLoS Med, 2008, 5(5):805-822.

[4] Schwarz E R, Speakman M T, Patterson M, et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(5):1323-1330.

[5] 施伟丽,张静思,胡雅琼,等.血府逐瘀汤防治血管相关性疾病临床应用及作用机制研究进展[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):712-716.

[6] 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.

[7] GAO D, WU L Y, JIAO Y H, 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.

[8] 高冬,焦雨欢,武一曼,等.血府逐瘀汤诱导内皮祖细胞参与缺血区血管新生的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):224-228.

[9] LIN F, CHEN B L, WANG Y Z, et al. *In vitro* angiogenesis effect of Xuefu Zhuyu decoction and

vascular endothelial growth factor: a comparison study [J]. Chin J Integr Med, 2015, doi: 10.1007/s11655-015-2289-9.

[10] Zimrin B, Pepper S, McMahon A, et al. An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vitro* [J]. J Biol Chem, 1996, 271(51):32499-32502.

[11] Tattersall W, Du J, Cong Z, et al. *In vitro* modeling of endothelial interaction with macrophages and pericytes demonstrates Notch signaling function in the vascular microenvironment [J]. Angiogenesis, 2016, 19(2):201-215.

[12] ZHANG J S, WANG Y Z, HU Y Q, et al. Effect of EphB4/EphrinB2 reverse signal on angiogenesis induced by Xuefu Zhuyu capsule containing serum in human microvascular endothelial cell 1 [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(8):605-610.

[13] Hofmann J J, Iruela-Arispe M L. Notch signaling in blood vessels; who is talking to whom about what? [J]. Circ Res, 2007, 100(11):1556-1568.

[14] Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, et al. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10):5643-5648.

[15] WANG X, HE Z, XIA T, et al. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus promotes angiogenesis through targeting notch signaling effector Hey1 [J]. Cancer Res, 2014, 74(7):2026-2037.

[16] LI J L, Sainson R C, Oon C E, et al. Dll4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy *in vivo* [J]. Cancer Res, 2011, 71(18):6073-6083.

[17] Benedito R, Roca C, Sørensen I, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis [J]. Cell, 2009, 137(6):1124-1135.

[18] SONG J, CHEN W Y, WU L Y, et al. A Microarray analysis of angiogenesis modulation effect of Xuefu Zhuyu decoction on endothelial cells [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(7):502-506.

[责任编辑 邹晓翠]