

# 当归补血汤调控缺氧血管内皮细胞增殖及其分子机制研究

杨鹏<sup>1</sup>, 冯蓓<sup>2</sup>, 杨苗<sup>2</sup>, 曾宇<sup>2</sup>, 张三印<sup>2\*</sup>

(1. 成都市第五人民医院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:**通过当归补血汤对缺氧血管内皮细胞增殖及分子表达的研究,探讨当归补血汤调控缺氧血管内皮细胞增殖的可能分子机制。**方法:**应用连二亚硫酸钠溶液建立缺氧血管内皮细胞(EA.hy926)模型(以下简称缺氧模型),不同剂量当归补血汤干预 24 h 后,CCK-8 法观察缺氧血管内皮细胞的增殖;ELISA 法检测血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1, sVEGFR2)的表达。**结果:**与正常血管内皮细胞比较,缺氧后血管内皮细胞增殖能力显著下降( $P < 0.01$ );当归补血汤能够促进正常血管内皮细胞及缺氧血管内皮细胞的增殖,其中高、中剂量组促进缺氧血管内皮细胞增殖的幅度明显大于促正常血管内皮细胞增殖的幅度( $P < 0.01$ )。当归补血汤各剂量组均能促进缺氧血管内皮细胞 VEGF, VEGFR1, VEGFR2 的表达,且与剂量呈正相关,抑制缺氧血管内皮细胞 sVEGFR1, sVEGFR2 的表达。**结论:**当归补血汤能够促进缺氧血管内皮细胞的增殖,其机制可能与其调节 VEGF 与 VEGFR 和 sVEGFR 两种受体的结合有关。

**[关键词]** 当归补血汤; 血管内皮细胞; 细胞增殖; 分子机制

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0178-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013220178

## Effect of Danggui Buxue Decoction on Proliferation and its Molecular Mechanism in Hypoxic Vascular Endothelial Cells

YANG Peng<sup>1</sup>, FENG Pei<sup>2</sup>, YANG Miao<sup>2</sup>, ZENG Yu<sup>2</sup>, ZHANG San-yin<sup>2\*</sup>

(1. The Fifth People's Hospital of Chengdu, Chengdu 611137, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Danggui Buxue decoction on proliferation in the hypoxic vascular endothelial cells and to explore the mechanism of angiogenesis. **Method:** CCK-8 assay was used for the proliferation of vascular endothelial cells; ELISA assay was used for vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR1, VEGFR2, sVEGFR1, sVEGFR2) expression of vascular endothelial cells. **Result:** Compared with normal group, the hypoxic endothelial cell proliferative capacity was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Danggui Buxue decoction could promote the proliferation of normal endothelial cells and hypoxic endothelial cells with dose-response relationship compared with model group ( $P < 0.01$ ). Danggui Buxue decoction could promote expression of VEGF in hypoxic vascular endothelial. Compared with model group, Danggui Buxue decoction could significantly up-regulate VEGF, VEGFR1, VEGFR2 expression, and showed a dose relationship, but could inhibit sVEGFR1, sVEGFR2 expression. **Conclusion:** Danggui Buxue decoction can promote proliferation of the hypoxic vascular endothelial cells, The mechanism might be related to regulation of VEGF and its receptors.

**[Key words]** Danggui Buxue decoction; the hypoxic vascular endothelial cells; cell proliferation; molecular mechanism

**[收稿日期]** 20130709(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81001497);国家教育部博士点新教师基金项目(20095132-120008);四川省科技厅杰出青年学术技术带头人培育计划(2011JQ0030)

**[第一作者]** 杨鹏, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合临床和基础研究工作, Tel:028-81622161, E-mail: cdyzsy@126.com

**[通讯作者]** \* 张三印, 博士, 副教授, 从事中西医结合基础研究工作, Tel:028-61800157, E-mail: tcmzsy@126.com

当归补血汤出自金元时期《内外伤辨惑论》,组成为炙黄芪一两、当归二钱。功效补气生血,为治疗血虚的名方,主治劳倦内伤,气血虚弱,以及妇人经行、产后血虚发热、头痛,或疮疡溃后久不愈合等症。临床和实验研究显示当归补血汤能通过明显改善患者的心功能,减小缺血面积,治疗心肌缺血,其机制主要与其促进缺血区周围血管生成有关<sup>[1]</sup>,实验研究显示,当归补血汤能诱导正常血管内皮细胞白介素-6(IL-6)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的分泌<sup>[2-3]</sup>及血管内皮生长因子血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 的表达<sup>[4]</sup>,抑制血管内皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>,促进内皮细胞增殖、迁移,本课题组研究显示,当归补血汤能够双向调节不同状态下血管内皮细胞的增殖作用,能够促进正常血管内皮细胞及缺氧血管内皮细胞的增殖,但能通过调节 VEGF 与 VEGF 受体(VEGFR)和 sVEGFR 两种受体的结合而抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞增殖<sup>[6-7]</sup>,但对缺氧内皮细胞作用 VEGFR 和 sVEGFR 的调节作用还未见报道,本研究拟通过当归补血汤调控缺氧血管内皮细胞的增殖及分子表达的研究,探讨其促进缺血心肌血管生成的可能机制。

## 1 材料

**1.1 试剂** RPMI1640 细胞培养基(Gibco,美国);标准胎牛血清(FBS,Booster,中国);0.25%胰酶消化液(Hyclone,美国);HAT Supplement(GIBCO,美国);双抗(Penicillin-Streptomycin Solution,Hyclone,美国);DMSO(二甲基亚砷,Sigma,美国);VEGF ELISA 试剂盒(欣博盛,中国);VEGFR1 ELISA 试剂盒,VEGFR2 ELISA 试剂盒(均为Booster,武汉);sVEGFR1 ELISA 试剂盒;sVEGFR2 ELISA 试剂盒(均为Bio-Swamp,中国);Cell Counting Kit-8 试剂盒(CCK-8,博士德,武汉)。

**1.2 仪器设备** 恒温孵育箱 MCO-15AC(日本三洋);超净工作台(中国苏州);多功能酶联免疫检测仪(美国 Thermo);倒置显微镜(日本奥林巴斯)。

**1.3 细胞** 人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 细胞,由四川电子科技大学生物物理学实验室提供。

## 2 方法

### 2.1 液体的配制

**2.1.1 5 mmol·L<sup>-1</sup>连二亚硫酸钠溶液的配制** 称取 87 mg 连二亚硫酸钠置于 100 mL 烧杯中;将 100 mL RPMI1640 加入烧杯中,充分混匀溶解;以 0.22 μm 滤器将充分溶解后的连二亚硫酸钠溶液过滤至 100 mL 的玻璃瓶中,4 ℃ 冰箱保存。

**2.1.2 当归补血汤药液的配制** 当归(Angelica Sinensis Radix,批号 110517)、黄芪(Astragali Radix,批号 110509691)均购自成都中医药大学附属医院中药房,经成都中医药大学鉴定教研室王光志副教授鉴定。取黄芪、当归适量(黄芪:当归 5:1),依照传统方法,水煎煮 3 次混合加热浓缩成 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 的当归补血汤,以 5 000 r·min<sup>-1</sup>,反复离心 3 次,每次 10 min,小心吸取上清液,置于 4 ℃ 冰箱中保存,长期保存置于 -20 ℃ 冰箱中待用。用时将浓缩后的当归补血汤以 0.22 μm 滤网过滤除菌,以 1640 培养基稀释。

**2.2 人脐静脉内皮细胞系(EA.hy926)的培养、传代和鉴定** 在含 10% 胎牛血清(FBS)、2 mL 双抗(青霉素 10 U·mL<sup>-1</sup>,链霉素 10 mg·L<sup>-1</sup>)和 2 mL HAT Supplement 的 RPMI-1640 培养基中于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 混合空气的恒温孵箱中常规培养,隔天换液 1 次。采用 SABC 免疫组化法经第八因子鉴定为内皮细胞。

**2.3 缺氧血管内皮细胞模型的建立** 将生长融合后的 EA.hy926 细胞以 0.25% 的胰酶消化,收集,离心后,调整密度为 1 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,每孔给予 5 mmol·L<sup>-1</sup> 连二亚硫酸钠溶液 1 mL,培养 24 h,建立缺氧血管内皮细胞模型。

**2.4 对正常及缺氧血管内皮细胞增殖的影响** 实验分为正常内皮细胞组(以下简称正常组)、正常细胞给当归补血汤高、中、低剂量组(15,7.5,3.75 g·L<sup>-1</sup>)、缺氧内皮细胞组,细胞接种密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,24 孔板每孔接种 500 μL,每组 6 个复孔,各组按照前述方法进行培养,24 h 后各组分别给予含有相应浓度当归补血汤药液的培养基,24 h 后,弃培养液,每孔加入 200 μL 1640 培养基后,再加入 CCK-8 溶液 20 μL(避光),37 ℃ 孵育 2 h,将 24 孔板中液体移出 100 μL 至 96 孔板中,450 nm 波长下,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度(A)。

**2.5 对缺氧血管内皮细胞 VEGF 及其受体表达的影响** 根据 2.3 方法进行细胞培养及给药,收集各组细胞及培养上清液于已灭菌的 1.5 mL EP 管中,将培养上清以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 后,小心吸取上清液于已灭菌的 1.5 mL EP 管中用 ELISA 方法测定 VEGF 含量;将收集的细胞先以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,弃去上清液,使用细胞破碎仪破碎细胞 2 min,离心,收集上清液用 ELISA 方法测定受体的表达。

**2.6 统计分析** 采用 SPSS 17.0 统计程序包对计

量资料进行统计分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析比较多组均数间差异的显著性,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对正常及缺氧血管内皮细胞增殖的影响** 与正常细胞比较缺氧血管内皮细胞增殖能力明显下降, ( $P < 0.01$ );当归补血汤能够促进正常血管内皮细胞及缺氧血管内皮细胞的增殖,其中  $15, 7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  当归补血汤促进缺氧血管内皮细胞增殖的幅度明显大于促正常血管内皮细胞增殖的幅度 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 当归补血汤对正常及缺氧血管内皮细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A
正常细胞	-	$0.442 \pm 0.007$
正常细胞 + 当归补血汤	15	$0.592 \pm 0.032^{1)}$
	7.5	$0.503 \pm 0.006$
	3.75	$0.450 \pm 0.012$
缺氧模型	-	$0.258 \pm 0.007^{1)}$
缺氧细胞 + 当归补血汤	15	$0.851 \pm 0.042^{1,2)}$
	7.5	$0.643 \pm 0.017^{1,3)}$
	3.75	$0.411 \pm 0.069$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与正常细胞当归补血汤  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与正常细胞当归补血汤  $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 对缺氧血管内皮细胞 VEGF 表达的影响** 在 VEGF 的表达上,当归补血汤各剂量组均能促进缺氧血管内皮细胞 VEGF 的表达,与缺氧模型组比较,  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  当归补血汤组有差异性 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 当归补血汤对缺氧血管内皮细胞 VEGF 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常细胞	-	$14.748 \pm 1.377$
缺氧模型	-	$2.160 \pm 0.091^{1)}$
缺氧细胞 + 当归补血汤	15	$5.631 \pm 0.354^{2)}$
	7.5	$4.021 \pm 0.190$
	3.75	$2.691 \pm 0.194$

注:与正常细胞比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与缺氧模型比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.3 对缺氧血管内皮细胞 VEGFR1, VEGFR2 表达的影响** 在 VEGFR 的表达上,与正常细胞比较,缺氧模型组在 VEGFR1, VEGFR2 表达上略为增加,但

无统计学差异,而当归补血汤各剂量组均能促进缺氧模型 VEGFR1, VEGFR2 的表达,且与剂量呈正相关,见表 3。

表 3 当归补血汤对缺氧血管内皮细胞

VEGFR 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGFR1	VEGFR2
正常细胞	-	$1303.1 \pm 68.0$	$1326.9 \pm 58.1$
缺氧模型	-	$1431.1 \pm 65.6$	$1347.7 \pm 213.1$
缺氧细胞 +	15	$2203.1 \pm 189.2^{2,4)}$	$1615.1 \pm 53.5^{1)}$
当归补血汤	7.5	$2124.4 \pm 86.0^{2,4)}$	$1466.2 \pm 69.1$
	3.75	$1813.1 \pm 167.1^{2,3)}$	$1389.5 \pm 165.0$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,与缺氧模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 4 同)。

**3.4 当归补血汤对缺氧血管内皮细胞在 sVEGFR1, sVEGFR2 表达上的影响** 在 sVEGFR 的表达上,与正常组比较,缺氧模型组 sVEGFR1, sVEGFR2 的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ),而当归补血汤各剂量组均能抑制缺氧模型 sVEGFR1, sVEGFR2 的表达。见表 4。

表 4 当归补血汤对缺氧血管内皮细胞

sVEGFR 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	sVEGFR1	sVEGFR2
正常细胞	-	$1425.1 \pm 57.9$	$1406.9 \pm 56.1$
缺氧模型	-	$2203.1 \pm 203.2^{2)}$	$1872.7 \pm 112.1^{2)}$
缺氧细胞 +	15	$1798.1 \pm 125.5^{2,3)}$	$1395.3 \pm 151.4^{4)}$
当归补血汤	7.5	$1508.1 \pm 74.7^{2,4)}$	$1493.0 \pm 78.1^{4)}$
	3.75	$2028.4 \pm 87.1^{1)}$	$1736.1 \pm 48.6^{1,3)}$

### 4 结论

血管生成是在多种细胞因子影响下的一个复杂而有序的过程,其主要过程为:缺血、缺氧等诱发因素→缺血缺氧细胞被活化分泌可溶性血管生成刺激因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)→激活内皮细胞和金属蛋白酶→基底膜被破坏,内皮细胞收缩、趋化、迁移、增殖,形成血管芽→血管芽吻合成血管。因此,内皮细胞是血管生成过程中的关键细胞,内皮细胞增殖是血管生成过程中的关键环节。吴岩<sup>[8]</sup>等在研究中发现当归补血汤能够促进正常人脐静脉内皮细胞的增殖,从而发挥补气生血的作用。笔者研究中发现,当归补血汤对正常细胞和缺氧细胞的增殖均有促进作用,对缺氧细胞的作用尤为明显,可见当归补血汤可

通过促进血管内皮细胞(尤其是缺氧内皮细胞)的增殖而促进血管生成。

纵观血管生成过程中的诸多影响因素,VEGF无疑是其中最具特征性的关键因子<sup>[9]</sup>,是内皮细胞分化和新生血管形成过程中必不可少的生长因子<sup>[9]</sup>。VEGF(又称血管通透性因子)的主要作用是促进内皮细胞增殖和迁移,增加血管通透性。VEGF在生理情况下表达水平较低,而在血管生长需要的组织内皮细胞的VEGF表达水平较高<sup>[10]</sup>。因此VEGF的表达对研究疾病状态下血管生成作用十分重要。VEGF促血管生成作用的发挥,还需要通过与其受体结合<sup>[11]</sup>。VEGF的受体主要包括两类:①VEGFR(血管内皮细胞生长因子受体)此类受体为血管生成中的关键性促血管生成因子,与VEGF结合后,促进内皮细胞增殖和血管生成<sup>[12]</sup>。②sVEGFR(可溶性血管内皮生长因子受体)是VEGF跨膜受体的剪接变体,有很强的抗血管生成作用,它能竞争性与VEGF结合,阻断VEGF发挥生物学效应,从而抑制血管内皮细胞增殖,阻挠血管生成<sup>[13-14]</sup>。本实验通过不同剂量当归补血汤对缺氧血管内皮细胞增殖及VEGF及其受体表达的研究表明:当归补血汤各剂量组均能促进VEGF及VEGFR1、VEGFR2的表达;抑制VEGFR1和sVEGFR2的表达,表现出促进血管生成作用。由此可见当归补血汤能够促进缺氧状态下血管内皮细胞的增殖和血管生成,其分子机制可能与其调控VEGF与VEGFR、sVEGFR两种受体的结合有关。

#### [参考文献]

[1] 雷燕,王培利,林燕林,等. 当归补血汤煎剂对实验性心肌梗死衰老大鼠缺血心肌的促血管生成作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(12):892.

[2] 吴岩,祝彼得,黄秀深,等.“当归补血汤”对人脐静脉内皮细胞的增殖及分泌IL-6和GM-CSF的影响[J]. 成都中医药大学学报,2000,23(4):20.

[3] 吴岩,祝彼得. 当归补血汤对内皮细胞增殖和黏附分

子表达的影响[J]. 华西医科大学学报,2001,32(4):593.

[4] 王培利,雷燕,林燕林,等. 当归补血汤含药血清对培养内皮细胞生长因子受体表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(3):209.

[5] 张志斌,陆曙,周春刚,等. 当归补血汤对大鼠动脉内皮细胞凋亡的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):215.

[6] 张三印,冯蓓,杨苗. 当归补血汤抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):150.

[7] 张三印,冯蓓,杨苗. 当归补血汤对不同状态下血管内皮细胞增殖及超微结构影响的实验研究[J]. 成都中医药大学学报,2013,36(1):21.

[8] 吴岩,毕立夫,龚莉. 当归补血汤对内皮细胞和骨髓造血细胞的增殖和分化的作用[J]. 内蒙古医学院学报,2005,27(3):169.

[9] Tuomas Tammela, Berndt Enholm, Kari Alitalo, et al. The biology of vascular endothelial growth factors [J]. Cardiovasc Res, 2005,65:550.

[10] Ian Zachary, Georgia gliki. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family [J]. Cardiovasc Res, 2001,49:568.

[11] 韩文峰,魏素菊. VEGF-A在肿瘤中的研究进展[J]. 河北医药,2010,32(2):214.

[12] Gera Neufeld, Tzafra Cohen, Stela Gengrinovitch, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. FASEB J, 1999,13:9.

[13] 李然伟,刘禄成,李哲,等. 可溶性血管内皮生长因子受体2片段的表达及其对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(2):85.

[14] Tsatsaris V, Goffin F, Minaut C. Overexpression of the soluble vas-cular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003,88(1):5555.

[责任编辑 聂淑琴]