

# 活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF<sub>165</sub> 转染 脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9, MMP-2 的影响

陈萌<sup>1</sup>, 娄利霞<sup>2</sup>, 吴爱明<sup>2</sup>, 柴立民<sup>2</sup>, 吕晞滢<sup>2</sup>, 张冬梅<sup>2\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029;

2. 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部暨北京市重点实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨活血益气方及其拆方含药血清对含有血管内皮生长因子(VEGF)165 的重组质粒 pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分泌基质金属蛋白酶(MMP)2,9 的影响。方法:构建 pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 重组质粒,采用 Eugene HD 将质粒瞬时转染至 HUVEC 中。制备活血益气方及其拆方含药大鼠血清、生理盐水正常血清,以 5% 药物血清作用于转染后的 HUVEC,Western blot 法检测 VEGF 的表达,ELISA 法测定 MMP-2, MMP-9 的表达。结果:(1)活血益气方组 VEGF 蛋白表达高于生理盐水组,与之比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。拆方各组则低于活血益气方组,与之比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。(2)活血益气方组、活血方组 MMP-2 含量高于生理盐水组,与之比较有统计学差异( $P < 0.05, P < 0.01$ )。拆方各组中仅益气方组 MMP-2 含量低于活血益气方组,与之比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。(3)活血益气方及其拆方各组 MMP-9 含量均高于生理盐水组,仅活血益气方组、活血方组与之比较有统计学差异( $P < 0.01, P < 0.05$ )。拆方各组 MMP-9 含量均低于活血益气方组,与之比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。结论:活血益气方可以促进转染后 HUVEC 表达 VEGF 及分泌 MMP-2, MMP-9,活血方药在这方面起主要作用。推测其治疗性血管生成作用机制可能与促进内皮细胞分泌 MMP,从而促进内皮细胞迁移,提高血管通透性有关。

**[关键词]** 活血益气方;人脐静脉内皮细胞;血管内皮生长因子 165 质粒;转染;基质金属蛋白酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0156-05

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20111116.1424.007 **[网络出版时间]** 2011-11-16 14:24

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111116.1424.007.html>

**[收稿日期]** 20110418(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30701117)

**[第一作者]** 陈萌,博士,副教授,从事方剂配伍规律的研究, Tel:010-64287073, E-mail:cmazy@126.com

**[通讯作者]** \*张冬梅,博士,副研究员,从事中西医结合应用基础研究, Tel:010-84013190, E-mail:chaweto@126.com

体瘤模型小鼠抑瘤作用明显增强,在有效剂量下,对荷瘤小鼠的免疫系统影响较小,生命延长作用明显,值得进一步的研究开发。

## [参考文献]

- [1] 冯永红. 白藜芦醇药理作用进展[J]. 国外医药:植物药分册,1996,11(4):155.
- [2] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275 (5297):218.
- [3] Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase[J]. FEBS Lett,1998,421(3):277.
- [4] Sun N J, Woo S H, Cassady J M, et al. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from Psoralea corylifolia [J]. J Nat Prod,2003,66(5):734.

- [5] Delmas D, Jannin B, Malki M C, et al. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines[J]. Oncol Rep,2000,7(4):847.
- [6] 陈易彬,孙宝祥,陈佳希,等. 虎杖中白藜芦醇的稳定性研究[J]. 中药材,2007,30(7):805.
- [7] 王影,李京京,陆兵. 固体脂质纳米粒的制备及应用研究进展[J]. 生物技术通讯,2006,17(3):471.
- [8] 张强华,熊清平,石莹莹. 虎杖中 Res 的提取、纯化工艺研究[J]. 中国药房,2009,20(12):909.
- [9] 熊清平,张强华,石莹莹. 虎杖中白藜芦醇罐组式动态逆流提取的中试工艺研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(10):901.
- [10] 张强华,熊清平,石莹莹,等. 白藜芦醇固体脂质纳米粒的制备表征与体外抗肿瘤作用研究[J]. 中药材,2010,33(12):1929.

[责任编辑 聂淑琴]

## Effects of Qi Supplement and Blood Activation Prescription and its Disassembled Prescriptions Medicated Serum on the Secretion of MMP-9, MMP-2 by Human Umbilical Vein Endothelial Cell Post-transfected VEGF<sub>165</sub>

CHEN Meng<sup>1</sup>, LOU Li-xia<sup>2</sup>, WU Ai-ming<sup>2</sup>, CHAI Li-min, LV Xi-ying<sup>2</sup>, ZHANG Dong-mei<sup>2\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[ Abstract ] Objective:** To observe the effects of Qi supplement and blood activation prescription (QB) and its disassembled prescriptions medicated serum on the secretion of matrix metalloproteinase (MMP) 9 and MMP-2 by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) post-transfected pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub>. **Method:** Constructing pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> restructuring plasmid, then it was transiently transfected in HUVEC with Fugene HD transfection reagent. Prepare QB and its disassembled prescriptions medicated rat serum, saline normal serum. Seed the post-transfected HUVEC with 5% serum. The expression of VEGF was detected by using Western Blot. The expression of MMP-2 and MMP-9 were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay. **Result:** (1) The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the QB group is higher than the saline group. There is a significant difference between the two groups ( $P < 0.01$ ). The expression of VEGF in the Blood Activation (BA) group and the Qi supplement (QS) group are lower than the QB group. Both groups have statistically significant difference when compared with the whole group ( $P < 0.01$ ). (2) Either the secretion of MMP-2 in the QB group or in the BA group is higher than the saline group. Both groups have statistically significant difference when compared with the Saline group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The secretion of MMP-2 in the QS group is lower than the QB group. There is a significant difference between the two groups ( $P < 0.01$ ). (3) The secretion of MMP-9 in the QB group and its disassembled prescriptions group are higher than the Saline group. Only the whole group and the BA group have significant with it ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). The secretion of MMP-9 in the disassembled prescriptions groups is lower than the whole group. Both groups have significant with the whole group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** QB can not only promote the expression of VEGF, but also increase the secretion of MMP-9 and MMP-2. BA plays a main role in this. The therapeutic angiogenesis mechanisms of QB may be related to increase the secretion of MMP, accordingly promote endothelial cell migration, and improve vascular permeability.

**[ Key words ]** Qi supplement and blood activation prescription; human umbilical vein endothelial cells; pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> plasmid; transfection; matrix metalloproteinase

近年来,应用血管生长因子的治疗性血管新生机制成为治疗严重缺血性疾病尤其是冠心病的新方法。气虚血瘀是冠心病的基本病机,活血益气法已被广泛的用于冠心病的治疗当中<sup>[1]</sup>。大量研究显示,以活血益气法为指导思想而构建的经验方活血益气方(由黄芪、党参、丹参、川芎、赤芍等药物组成)不仅在临床观察中防治心梗后心衰有效,而且在多项动物实验研究中也证实有逆转心梗后心室重构的作用<sup>[2-3]</sup>。促进梗死边缘区血管新生是活血益

气方治疗缺血性心脏病的作用机制之一,其促血管新生作用可能与其诱导缺血心肌局部血管内皮生长因子(VEGF)表达有关<sup>[4]</sup>。VEGF<sub>165</sub>是VEGF家族中发挥生物学效应的主要成分,是VEGF-A最丰富的异构体<sup>[5]</sup>。因此,我们通过构建含有VEGF<sub>165</sub>的重组质粒pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub>,转染至人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中,构建HUVEC细胞VEGF信号通路激活细胞模型,离体观察活血益气方及其拆方药物血清对VEGF<sub>165</sub>基因转染HUVEC细胞分泌MMP-

2, MMP-9 的影响, 以期揭示活血益气方对缺血性心脏病治疗性血管生成的部分分子学机制。

## 1 材料

**1.1** HUVEC-2 人脐静脉内皮细胞 HUVEC-2 (Cat No. 200t-5n, Cell application) 购自北京清源浩生物科技有限公司。

**1.2** 动物 成年健康雄性 Sprague Dawley 大鼠, 体重 250 ~ 270 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)2009-0080。

**1.3** 仪器 超净工作台(北京半导体一厂), 二氧化碳培养箱(Heraeus GBB16, 德国), IMT-2 倒置显微镜(Olympus, 日本), LDZ5-2 型低速自动平衡离心机(北京雷勃尔), HHW21-420 型电热恒温水浴箱(天津泰斯特), THZ-C 型恒温振荡器(北京太仓), PHS-3B 型精密 pH 计(上海雷磁), 酶标仪(Clinic Bio, 美国), GeneQuant 紫外分光光度计(Pharmacia, 美国), DYCZ-24DN 型电泳仪和 DYCZ-40D 型电泳仪(北京六一厂)。

**1.4** 药物和试剂 活血益气方由黄芪 60 g, 党参 60 g, 丹参 10 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g 组成; 益气方由黄芪 60 g, 党参 60 g 组成; 活血方由丹参 10 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g 组成。所有药物均采用免煎颗粒, 由北京未名天人中药有限公司生产。常温干燥保存。培养基 Medium200 (M200) (货号 M-200-500, GIBCO), 生长因子 LSGS (货号 S-003-10, GIBCO), 购自北京清源浩生物科技有限公司。pcDNA3.1 空质粒购自 Invitrogen life technologies 公司, pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 质粒 (Bam HI/sal I fragment of VEGF<sub>165</sub> encoding, Region (ORF) in pcDNA3.1 Bam HI/Not I site) 的构建及测序鉴定由北京泛基诺科技有限公司完成。TIAN pure Midi Plasmid Kit (dp107-02), 由天根生化科技北京有限公司提供。BCA 法蛋白定量试剂盒 (货号 P1511), RIPA 裂解液 (货号 P1053), 5 × loading buffer (货号 B1007), NC 硝酸纤维素膜 (货号 2110), Super ECL Plus 超敏发光液 (货号 P1010), 蛋白 Marker (货号 P1100) 均购自北京普利莱基因技术有限公司。Fugene HD transfection reagent (货号 04709705001, Roche), 兔抗人 VEGF 抗体、羊抗兔 IgG, 人 MMP-2 ELISA 试剂盒 (货号 EK0459), 人 MMP-9 ELISA 试剂盒 (货号 EK0465), 购自武汉博士德生物工程有限公司。

## 2 方法

**2.1** 药物血清的制备 参照文献[6]换算出大鼠等效剂量。按照活血益气方组 15.86 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,

活血方组 3.17 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 益气方组 12.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 的剂量给正常 SD 大鼠 ig 中药制剂, 每日 1 次, 持续给药 1 周, 末次给药后 1 h, 无菌条件下由腹主动脉取血, 离心取血清, 56 °C 灭活 30 min, 分装, -80 °C 冻存储用。另选正常大鼠 ig 等量生理盐水, 以同样方法制备生理盐水正常血清。

**2.2** pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 质粒的提取和纯化 将构建的 pcDNA3.1-hVEGF<sub>165</sub> 质粒转化至感受态大肠杆菌中, 经氨苄青霉素抗性筛选, DNA 测序验证后, 大量扩增阳性克隆。按照 TIAN pure Midi Plasmid Kit 说明书抽提、纯化质粒重组体。收集质粒溶液后, Genequant 紫外分光光度计测得溶液 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, 计算质粒的浓度和纯度。

**2.3** pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 质粒的瞬时转染 M200 与 LSGS 按比例添加。常规培养 HUVEC, 至 95% 融合后, 按照 2 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度种入 6 孔板, 培养 24 h。根据 Fugene HD transfection reagent 说明书操作, 转染 pcDNA3.1-hVEGF<sub>165</sub> 质粒。质粒: Fugene HD 按照 2:3 (g:L) 以 M200 配制, 室温静置孵育 15 min 后, 加入细胞长至 80% ~ 90% 融合的 6 孔板中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。转染 4 h 后, 以添加血清的新鲜 M200-LSGS 培养基终止转染。转染后 HUVEC 细胞常规培养于 6 孔板中, 加入 5% 活血益气方及其拆方含药动物血清、5% 生理盐水动物血清培养 48 h, 阴性对照组不加药物血清, 仅加入 M200-LSGS 培养基。空白对照组 HUVEC 既不进行质粒转染、也不加入药物血清, 仅以 M200-LSGS 常规培养。取细胞上清, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 后, 分装于 1.5 mL Eppendorf 管中, 每管 500 μL, 冻存于 -80 °C 冰箱中备用。

**2.4** 转染后 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白的表达 以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 轻轻洗涤细胞 3 次, 每孔加入 100 μL RIPA 裂解液, 置冰上裂解 20 min 后, 用干净的细胞刮刷将细胞刮至孔的一侧, 用移液器将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL Eppendorf 管中, 4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清。取 2 μL 样品, 按照说明书, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测样品浓度。剩余样品按比例加入 5 × loading buffer, 100 °C 煮 20 min, 分装后 -80 °C 保存。取 100 μg 样品置于 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳分离, 4 °C 条件下转移至 NC 膜上。室温, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。VEGF 抗体按照 1:1 000 的比例稀释, 与 NC 膜一起封闭在杂交袋中 4 °C 旋转过夜后, 与 1:6 000 比例稀释的羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h。用 Super ECL Plus 超敏发光液

显影、曝光。Quantity one 分析图片上每个特异条带灰度值。以目的蛋白的灰度值除以内参  $\beta$ -actin (1:2 000) 的灰度值以校正误差, 所得结果即为样品中 VEGF 蛋白相对表达量。

## 2.5 转染后 HUVEC 细胞 MMP-2, MMP-9 的分泌

每孔加入 100  $\mu$ L 相应的对照品或细胞上清。密封酶标板, 37  $^{\circ}$ C 反应 90 min。甩去酶标板内液体, 对着吸水纸扣干, 不洗。每孔加入 100  $\mu$ L 生物素抗人 MMP-2/MMP-9 抗体工作液, 37  $^{\circ}$ C 反应 60 min。0.01 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> PBS 洗涤 1 min  $\times$  3 次。每孔加入 100  $\mu$ L ABC 工作液, 37  $^{\circ}$ C 反应 30 min。同时, 将 TMB 显色液置 37  $^{\circ}$ C 平衡。0.01 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> PBS 洗涤 1 min  $\times$  5 次。每孔加入 100  $\mu$ L TMB 显色液, 37  $^{\circ}$ C 避光反应 20~25 min。每孔加入 100  $\mu$ L 终止液, 此时蓝色立即转为黄色。酶标仪 450 nm 处测定吸光度(A)。根据标准曲线计算相应样品浓度。

**2.6 统计学处理** 全部计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS Ver11.5 统计软件进行数据统计分析。两组之间的比较采用 *t* 检验, 组间差异的比较采用单因素方差分析方法,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 pcDNA3.1-VEGF 质粒的提取和纯化** 所提取的 pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 质粒  $A_{260}/A_{280}$  在 1.7~1.8, 质量浓度约为 0.7 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>。

**3.2 含药血清对转染后 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白表达的影响** 阴性对照组、各含药血清组可促进 HUVEC 细胞表达 VEGF, 与空白对照组比较具有统计学差异。活血益气方及其拆方各组 VEGF 蛋白表达虽高于阴性对照组、生理盐水组, 但仅活血益气方组与阴性对照组或生理盐水组比较具有统计学差

异。拆方各组 VEGF 蛋白表达低于活血益气方组, 与之比较均具有统计学差异(表 1)。

表 1 含药血清对转染后 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	VEGF/ $\beta$ -actin
空白对照	0.603 $\pm$ 0.048 <sup>2)</sup>
阴性对照	0.892 $\pm$ 0.061 <sup>1)</sup>
5% 活血益气药物血清	1.172 $\pm$ 0.055 <sup>1,2,3)</sup>
5% 活血方药物血清	0.942 $\pm$ 0.025 <sup>1,4)</sup>
5% 益气方药物血清	0.929 $\pm$ 0.027 <sup>1,4)</sup>
5% 生理盐水正常血清	0.867 $\pm$ 0.048 <sup>1,4)</sup>

注:与空白对照比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与阴性对照比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 5% 生理盐水正常血清比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与 5% 活血益气药物血清比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 含药血清对转染后 HUVEC 细胞分泌 MMP-2, MMP-9 的影响** 活血益气方组、活血方组能促进 HUVEC 细胞分泌 MMP-2, 分别与空白对照组、阴性对照组和生理盐水组比较, 均具有统计学差异。益气方组 MMP-2 含量低于活血益气方组, 与之比较具有统计学差异。活血方组 MMP-2 含量虽高于活血益气方组, 但与之比较, 未见统计学差异(见表 2)。

阴性对照组及各药物血清组, 均能促进 HUVEC 细胞分泌 MMP-9, 与空白对照组比较, 具有统计学差异。活血益气方组、活血方组 MMP-9 含量高于阴性对照组, 与之比较有统计学差异。活血益气方组及其拆方各组 MMP-9 含量高于生理盐水组, 仅活血益气方组、活血方组与之比较, 具有统计学差异。拆方各组 MMP-9 含量均低于活血益气方组, 与之比较, 具有统计学差异(表 2)。

表 2 含药血清对转染后 HUVEC 细胞分泌 MMP-2, MMP-9 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	MMP-2	MMP-9
空白对照	6 934.7 $\pm$ 495.8 <sup>5)</sup>	58.3 $\pm$ 12.54 <sup>6)</sup>
阴性对照	6 289.4 $\pm$ 466.5	111.2 $\pm$ 3.74 <sup>1)</sup>
5% 活血益气药物血清	7 596.1 $\pm$ 823.2 <sup>1,4,7)</sup>	252.0 $\pm$ 68.0 <sup>2,4,8)</sup>
5% 活血方药物血清	8 012.9 $\pm$ 611.5 <sup>2,4,8)</sup>	177.7 $\pm$ 32.9 <sup>2,3,6,7)</sup>
5% 益气方药物血清	6 677.8 $\pm$ 462.9 <sup>6)</sup>	157.2 $\pm$ 52.8 <sup>2,6)</sup>
5% 生理盐水正常血清	6 893.7 $\pm$ 375.6 <sup>5)</sup>	127.4 $\pm$ 22.6 <sup>2,6)</sup>

注:与空白对照比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与阴性对照比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与 5% 活血益气药物血清比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ;与 5% 生理盐水正常血清比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>8)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

VEGF 是一种特异性的、与血管生长有关的生长因子。它可以特异性的促进血管内皮细胞进行有

丝分裂, 具有诱导新生血管生成的作用, 是目前发现的最重要的血管生长因子之一<sup>[7]</sup>, 被广泛应用于缺血性疾病的治疗。VEGF 对心肌缺血侧支循环的建

立有重要作用<sup>[8]</sup>,外源性给予这些生长因子可以有效地促进新生血管形成及缺血组织的侧支循环建立,改善组织缺血。VEGF 信号转导途径在生理性和病理性血管新生中起中心调节作用<sup>[9]</sup>,不仅起始血管新生,而且在其后的血管形成、稳定过程中发挥着关键作用<sup>[10]</sup>。

VEGF 由血管平滑肌细胞产生,并通过自分泌和旁分泌的方式作用于存在 VEGF 受体的血管内皮细胞,具有促进内皮细胞生长、增殖、迁移、细胞外基质降解、血管管型结构的形成等作用。血管内皮细胞既是血管形成的结构基础,也是 VEGF 作用的靶细胞。由于内皮细胞自身 VEGF 表达水平很低,无法形成有效浓度。因此,本实验通过构建 pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 重组质粒,外源性转染 VEGF<sub>165</sub> 基因,使之在内皮细胞中高表达、高分泌。Western blot 结果显示, HUVEC 在转染 pcDNA3.1-VEGF<sub>165</sub> 质粒后,细胞 VEGF 蛋白表达明显增加。活血益气方药物血清具有促进转染后 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白表达的作用。现代药理研究也表明,本方及其所含川芎的主要有效成分川芎嗪对脑梗后大鼠缺血心肌 VEGF mRNA 的表达具有促进作用<sup>[4,11]</sup>。这为我们进一步研究 VEGF 对血管新生的影响及活血益气方的作用机制打下了基础。

血管新生是一个复杂的过程。实验证明,细胞外基质是新生血管形成必须突破的屏障,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一簇能降解细胞外基质成分和基底膜的含锌蛋白酶<sup>[12]</sup>,MMP-2 和 MMP-9 是其重要成员,又称明胶酶,主要降解 IV 型胶原纤维,使基质膜完整性丧失。MMPs 和 VEGF 均为血管新生相关基因,VEGF 可诱导 MMPs 的表达,改变细胞外基质,有利于新生血管的生芽与生长。MMPs 对 VEGF 诱导的内皮细胞迁移起必要的作用<sup>[13]</sup>。因此,本实验通过重组质粒基因转染,观察 VEGF 过表达时对 HUVEC 细胞分泌 MMP-2, MMP-9 的影响。结果发现,VEGF 过表达时对 HUVEC 细胞分泌 MMP-9 有促进作用,活血益气方、活血方可以促进 VEGF 过表达的 HUVEC 细胞分泌 MMP-2、MMP-9。提示,活血益气方治疗性血管生成作用机制可能与促进内皮细胞分泌 MMP,从而促进内皮细胞迁移,提高血管通透性有关。活血方药在这方面起主要作用。但其具体机制尚不明

确,有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 孟华,朱妙章,黄晨. 中药在治疗性血管生成中的应用进展及前景[J]. 心脏杂志,2005,17(4):395.
- [2] 李敏,王硕仁,赵明镜,等. 活血、益气方药对心肌梗死后心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(7):37.
- [3] 王振涛,王硕仁,赵明镜. 活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(5):376.
- [4] 张冬梅,吴爱明,娄利霞,等. 活血益气方对脑梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(8):1602.
- [5] Sugihara T, Wadhwa R, Kaul S C, et al. A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor VEGF<sub>165</sub> [J]. J Biol Chem, 1998, 273(5):3033.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社. 2002:202.
- [7] Yan C, Davis G. Vascular specific growth factor and blood vessel formation [J]. Nature, 2000,407:242.
- [8] Safi J, DiPaula A F, Riccioni T, et al. Adenovirus mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rat bit heart [J]. Microvasc Res,1999,58:238.
- [9] Li J, Brown L F, Hibberd M G, et al. These findings suggest that the VEGF, VEGF receptor system plays an important role in the angiogenesis and stromal deposition associated with myocardial infarction [J]. Am J Physiol, 1996,270(5Pt2):H1803.
- [10] Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors [J]. Nat Rev Cancer, 2002,2(10):795.
- [11] 张淑娟,王振涛,韩丽华,等. 川芎嗪注射液对脑梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):170.
- [12] Massova I, Kotra L P, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversion [J]. J Faseb,1998,8(12):1075.
- [13] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoitin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. Stroke, 2005, 36(7):1533.

[责任编辑 聂淑琴]