

# 血管内皮生长因子通路在血府逐瘀汤影响内皮祖细胞功能中的作用研究

高冬<sup>1</sup>, 吴立娅<sup>1</sup>, 焦雨欢<sup>1</sup>, 陈文元<sup>1</sup>, 陈岩<sup>2</sup>, 逯波<sup>2</sup>, 宋军<sup>2\*</sup>, 陈可冀<sup>3</sup>

(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350108; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** **目的:** 观察血府逐瘀汤对内皮祖细胞(EPC)功能以及血管内皮生长因子-血管内皮生长因子受体(VEGF-VEGFR)的影响。**方法:** 血府逐瘀汤含药血清和空白对照血清诱导处理内皮祖细胞后, 采用MTT, Boyden小室、黏附试验和RT-PCR技术分别观察药物对EPCs增殖、迁移、黏附以及VEGF-VEGFR转录的影响。**结果:** 与空白对照组相比, 10%含药血清对EPC增殖和黏附均有明显促进作用; 药物对细胞迁移的影响表现为从5%含药血清的显著抑制到10%和15%含药血清的显著促进作用, 且10%和15%含药血清均可明显上调VEGF和VEGFR的转录。**结论:** 血府逐瘀汤通过上调VEGF-VEGFR通路, 影响内皮祖细胞功能, 具有诱导内皮祖细胞参与血管新生的作用。

**[关键词]** 血府逐瘀汤; 内皮祖细胞; 血管新生; 血管内皮生长因子通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0104-04

## Effect of VEGF-VEGFR Pathway on EPCs Function Induced by Xuefu Zhuyu Tang

GAO Dong<sup>1</sup>, WU Li-ya<sup>1</sup>, JIAO Yu-huan<sup>1</sup>, CHEN Wen-yuan<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>, LU Bo<sup>2</sup>, SONG Jun<sup>2\*</sup>, CHEN Ke-ji<sup>3</sup>  
(1. Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, Chia)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of VEGF-VEGFR pathway on EPCs function induced by Xuefu Zhuyu Tang. **Method:** After induced by serial concentrations of Xuefu Zhuyu Decoction-contained serum (XZDCS) and blank serum, EPCs proliferation, migration, adhesion ability and VEGF, VEGFR expression were detected by MTT, Boyden chamber, adhesion test and RT-PCR respectively. **Result:** Compared to the control group, 10% XZDCS could elevate the cell regeneration and adhesion ability. The EPCs migration ability was inhibited by 5% XZDCS and improved by 10%, 15% XZDCS. The higher two concentrations could up-regulate VEGF and VEGFR transcription significantly. **Conclusion:** Xuefu Zhuyu Tang could induce EPCs into angiogenesis by up regulating VEGF-VEGFR pathway to promote its proliferation, migration and adhesion function.

**[Key words]** Xuefu Zhuyu Tang; EPCs; angiogenesis; VEGF-VEGFR

**[收稿日期]** 2010-02-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30772877); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ2006039); 福建中西医结合研究院科研基金项目(3000-905010805)

**[第一作者]** 高冬, 教授, 硕士; 研究方向: 血管新生, Tel: 0591-22861151, E-mail: gd1026@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 宋军, 副主任医师, 医学博士; 研究方向: 活血化痰中药作用机理, Tel: 010-64014411-3325, E-mail: junsong86@sohu.com

自从 1997 年 Asahara<sup>[1]</sup> 从外周血中分离出能分化成为内皮细胞、参与血管形成的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 以来, 有关 EPC 与血管新生或血管发生的关系研究日益受到重视<sup>[2-5]</sup>, 本课题组前期工作发现, 临床常用的活血化瘀经典方剂血府逐瘀汤具有动员 EPC 释放进入外周血参与血管新生的作用<sup>[6]</sup>, 本试验研究进一步观察该方剂对 EPC 功能的影响, 并对其机制进行初探。

### 1 材料与方

**1.1 药物和试剂** 血府逐瘀汤中各药量分别为当归 9 g, 生地黄 9 g, 桃仁 12 g, 红花 9 g, 枳壳 6 g, 赤芍 6 g, 柴胡 3 g, 甘草 6 g, 桔梗 4.5 g, 川芎 4.5 g, 牛膝 9 g, 购自福建中医学院中医药研究院。水煎两次, 煎液过滤, 混合后加热浓缩至含生药 1.3 g·mL<sup>-1</sup>, 4 ℃ 保存备用。明胶、戊巴比妥钠和大鼠淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司; DMEM 和 PBS 购自 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FCS) 和牛脑垂体提取物 (BPE) 分别购自 PAA 公司和 Gibco 公司; 人血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维生长因子 (bFGF) 为 PeproTech 公司; Dil-acLDL 出自 Molecular probe 公司。

**1.2 动物分组及含药血清制备** SD 大鼠, 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, 动物批号 0037614, 由福建中医学院实验动物中心普通饲料喂养, 随机分为血府逐瘀汤药物组和空白对照组, 每组 8 只。药物组按 13 g·kg<sup>-1</sup> (相当于成人临床日用量的 10 倍) 剂量 ig, 空白对照组用等量生理盐水, 2 次/d, 连续 ig 7 d。于末次药后 2 h, 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 离心分离, 经灭活和微膜过滤除菌后, 将制备的含药血清及空白对照血清 -20 ℃ 保存备用。

**1.3 仪器** 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS, 配备有数码摄像装置); 超净工作台 (苏州净化设备公司); 低温低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); Boyden 小室 (江苏海门麒麟医用仪器厂); 全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

**1.4 EPC 的分离、培养与药物处理** 无菌分离大鼠胫骨和股骨, DMEM 培养液冲洗骨髓, 收集细胞以 1:2 比例置于淋巴细胞分离液上, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min 分离单核细胞, 洗涤后以 1 × 10<sup>6</sup> cell·mL<sup>-1</sup> 的密度接种于包被有明胶的培养皿中, 采用 DMEM 完全培养基 (含 15% FCS, VEGF10 ng·mL<sup>-1</sup>, bFGF4 ng·mL<sup>-1</sup>, BPE4 μg·mL<sup>-1</sup>) 培养 4 d, 用 PBS 洗掉非

贴壁细胞后继续培养, 每 3 d 换液 1 次, 连续培养至 11 d, 部分细胞随机分组, 换用含药血清和空白对照血清分别培养 24, 48, 72 h 后, 以 5 × 10<sup>4</sup> 个/孔密度重新接种到预包被明胶的 96 孔板中, 进行黏附和吞噬试验; 另一部分细胞以同样密度先接种到预包被明胶的 96 孔板中, 贴壁 12 h 后换含不同浓度的含药血清或空白对照血清培养液 100 μL, 分别培养 24, 72 h, 进行增殖能力的检测。

**1.5 EPC 增殖能力的检测** 采用 MTT 法, 酶标仪检测波长 570 nm, 参比波长 630 nm。

**1.6 EPC 迁移能力的检测** 吸取药物诱导后再接种的各组细胞培养上清液 150 μL, 移入 Boyden 小室的下室, 以孔径 8 μm 的聚碳酸酯膜封盖后, 在上室植入含 1 × 10<sup>4</sup> 个 EPCs 的悬液 100 μL, 于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 常规培养 12 h, 取出滤膜, 经中性甲醛固定, HE 染色后, 随机选择 6 个视野 (200 ×), 显微镜下计数迁移到滤膜下的细胞。

**1.7 EPC 黏附能力的检测** 接种的 EPCs 继续培养 40 min, 随机选择 6 个视野 (×100) 在倒置显微镜下计数贴壁细胞。

**1.8 VEGF 及其受体表达的检测** 采用 RT-PCR 法, Trizol 提取细胞内总 RNA, 取总 RNA 1 μg 进行逆转录反应, 操作按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。引物序列见表 1。

表 1 引物序列及产物长度

名称	序列	产物
		长度
大鼠 VEGF	上游 5'-CAGAAAGCCCATGAAGTGGCT-3'	250 bp
	下游 5'-CTATGTGCTGGCTTTGCTGA-3'	
大鼠 VEGFR-2	上游 5'-CGTCTCAAAGCATCAGCAT-3'	404 bp
	下游 5'-CGTGTAGTTTCCCGCATCTC-3'	
大鼠 GAPDH	上游 5'-TTT AAG CTC TCA GAA GAC ATG-3'	363 bp
	下游 5'-TGT TGA AGT ACA GAC AGT ACC CCC-3'	

PCR 体系为 1 u·μL<sup>-1</sup> recombinant Taq 酶 1 μL, 10 × Taq buffer 5 μL, 模板 4 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 引物各 1.5 μL, 10 mmol dNTP 1 μL, 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3 μL, 无核酸酶超纯水补至 33 μL。94 ℃ 预变性 3 min, 变性 30 s 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 经 35 个循环, 72 ℃ 补齐 10 min 后电泳检测。

**1.9 统计学处理** 试验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验分析, 以 *P* < 0.05 为显著水平。

## 2 结果

**2.1 血府逐瘀汤对 EPC 增殖功能的影响** 结果 (表 2) 表明, 与空白血清组相比, 仅 10% 含药血清能

显著促进 EPC 的增殖 ( $P < 0.05$ ), 而其他 2 个药物浓度对细胞的增殖功能没有显著影响。

**2.2 血府逐瘀汤对 EPC 迁移功能的影响** 结果(表 2)显示, 与相同血清浓度的空白对照组相比, 5% 含药血清显著抑制细胞的迁移行为 ( $P < 0.05$ ), 而 10% 和 15% 的含药血清作用结果正好相反, 可极显著促进细胞的迁移能力 ( $P < 0.01$ )。

**2.3 血府逐瘀汤对 EPC 黏附能力的影响** 检测结

表 2 血府逐瘀汤对 EPCs 功能和 VEGF 及 VEGFR-2 受体基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	血清含量/%	细胞增殖/ $\times 10^{-1}$	迁移细胞数/个	黏附细胞数/个	VEGF 灰度/ $\times 10^{-1}$	VEGFR-2 灰度/ $\times 10^{-1}$
药物	5	1.58 ± 0.22	26.50 ± 1.87 <sup>2)</sup>	46.33 ± 3.98	5.30 ± 0.32	6.58 ± 0.97
	10	1.86 ± 0.21 <sup>1)</sup>	54.67 ± 4.32 <sup>1)</sup>	82.17 ± 4.45 <sup>2)</sup>	7.67 ± 0.74 <sup>2)</sup>	8.08 ± 0.58 <sup>1)</sup>
	15	1.85 ± 0.29	57.00 ± 2.10 <sup>2)</sup>	44.33 ± 3.88	7.68 ± 0.55 <sup>2)</sup>	8.75 ± 0.39 <sup>1)</sup>
空白	5	1.59 ± 0.09	37.67 ± 4.50	47.17 ± 2.79	5.62 ± 0.75	6.38 ± 0.64
	10	1.46 ± 0.17	48.83 ± 2.86	53.00 ± 3.35	5.48 ± 0.31	7.25 ± 0.34
	15	1.52 ± 0.12	40.17 ± 1.94	42.00 ± 2.10	5.23 ± 0.27	7.12 ± 0.80

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

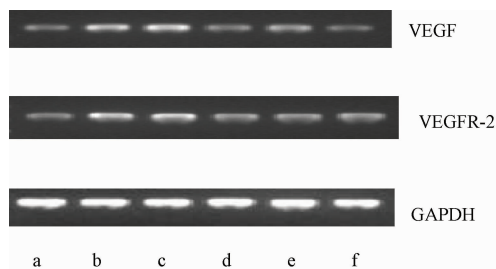


图 1 血府逐瘀汤对 VEGF 及受体表达的影响  
a. 5% 含药血清; b. 10% 含药血清; c. 15% 含药血清;  
d. 5% 空白血清; e. 10% 空白血清; f. 15% 空白血清

### 3 讨论

以血府逐瘀汤为代表的活血化瘀中药, 长期以来广泛用于冠心病、缺血性脑血管病及外周血管病等缺血性疾病的治疗且临床疗效较好。本课题组系列工作发现该方不仅在血管发生中具有促进鸡胚绒毛尿囊膜血管形成的作用<sup>[7]</sup>, 而且能动员大鼠骨髓内皮祖细胞<sup>[6]</sup>参与成年人体内的血管新生过程, 加速内皮祖细胞形成血管管腔的速度<sup>[8]</sup>和分化成内皮细胞的能力<sup>[9]</sup>。在此基础上, 本试验结果显示血府逐瘀汤特别是 10% 的含药血清, 对内皮祖细胞参与血管新生的一系列环节包括迁移、黏附和增殖能力均有显著影响, 不仅进一步提示药物具有明显的诱导内皮祖细胞促血管新生的功效, 补充并深化了前期工作, 为药物的临床使用效果提供更加完善的理论支持; 而且, 反映出药物的作用效果与剂量关系密切, 值得注意的是药物对内皮祖细胞迁移能力的影

响(表 2)表明, 与相同血清浓度的空白对照组相比, 3 个浓度的含药血清中, 只有 10% 含药血清能极显著促进 EPC 的黏附能力 ( $P < 0.01$ )。

**2.4 血府逐瘀汤对 VEGF 及其受体的影响** RT-PCR 的检测结果(图 1, 表 2)表明, 与相同血清浓度的空白对照组相比, 10% 和 15% 的含药血清不仅极显著地提高 VEGF 的转录水平 ( $P < 0.01$ ), 同时可显著提高 VEGF 受体 VEGFR-2 的转录水平 ( $P < 0.05$ )。

响, 由低剂量的抑制作用转变高剂量的促进作用, 体现出中药双向调节的特点。

VEGF 是血管新生最重要的调控因子, 小鼠体内 VEGF 等位基因只要缺失任意一个就会导致胚胎血管形成出现多种缺陷, 从而死亡<sup>[10-11]</sup>; VEGF 还参与了胚胎后的血管新生过程, 它不仅诱导 EPC 向成熟内皮细胞分化<sup>[12]</sup>, 促进血管内皮细胞分裂增殖, 还是 EPC 的重要趋化因子, 在组织缺血情况下, 通过升高外周血中 VEGF 水平, 刺激大量 EPC 进入外周循环<sup>[13-14]</sup>, 并趋化到达缺血部位, 直接参与血管生长。Kalka 等<sup>[14]</sup>利用这一特性, 通过给予外源性的 VEGF 升高外周血中 EPC 的数量, 达到了促进血管生长的目的。VEGF 促血管形成作用是通过受体 VEGFR-2 所介导的<sup>[15]</sup>, 本试验结果表明, 血府逐瘀汤显著上调了信号因子 VEGF 及受体 VEGFR-2 的转录水平, 可能是药物显著提高 EPC 增殖、黏附和迁移能力的机制之一。

复方血府逐瘀汤含有十几种单味中药, 成分和作用复杂, 本项目组的研究发现药物动员 EPC 参与血管新生作用就呈多途径、多靶点的现象<sup>[6, 16]</sup>, 加上血管新生的调控因子繁多, 不仅作用途径多样化且部分形成交叉调控的网络化, 不易全面分析。本试验结果虽然从上调 VEGF 和 VEGFR-2 转录水平的角度, 部分说明了药物影响 EPC 功能的机制, 并对其促血管新生的药效机制进行了初探。但 5% 含药

血清显著抑制细胞迁移行为的机制与 VEGF 和 VEGFR-2 的转录无关,也提示可能有其他的调控因子参与反应,今后尚需要深入地进一步研究,——明确药物所影响的调控因子,有助于建立其影响 EPC 促血管新生的调控机制。

### [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.

[ 2 ] Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(3): C572.

[ 3 ] 徐清波. 血管再生中的内皮祖细胞[J]. 生理学报, 2005, 57(1): 1.

[ 4 ] Hunting C B, Noort W A, Zwaginga J J. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization[J]. Vox Sang, 2005, 88(1): 1.

[ 5 ] Ishikawa M, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture for vascular regeneration[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(4): 344.

[ 6 ] 高冬,林薇,郑良朴,等. 血府逐瘀汤动员大鼠骨髓内皮祖细胞的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(9): 829.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] Gao Dong, Wu Li-ya, Jiao Yu-huan, 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.

[ 9 ] 高冬,吴立娅,焦雨欢,等. 血府逐瘀汤影响内皮祖细胞分化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 15(12): 917.

[ 10 ] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele[J]. Nature, 1996, 380, 435.

[ 11 ] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene[J]. Nature, 1996, 380, 439.

[ 12 ] Aicher A, Zeiher A M, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells[J]. Hypertension, 2005, 45(3): 321.

[ 13 ] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow [J]. J Clin Invest, 2002, 109: 337.

[ 14 ] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia and cytokine induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization [J]. Nat Med, 1999, 5: 434.

[ 15 ] Walter D H, Rittig K, Bahlmann F H, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. Circulation, 2002, 105: 3017.

[ 16 ] 高冬,吴立娅,焦雨欢,等. 血府逐瘀汤动员骨髓内皮祖细胞的因素分析[J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 457.

[责任编辑 何伟]