

· 实验研究 ·

黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究 \*

雷 燕<sup>1</sup> 高 倩<sup>2</sup> 李悦山<sup>3</sup> 陈可冀<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨黄芪、当归及其组方对人脐静脉内皮细胞增殖和细胞周期的影响。方法 以离体培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为模型,采用 MTT 法测定细胞增殖、流式细胞仪分析其细胞周期、SABC 法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,对黄芪、当归及其组方的促 HUVEC 增殖作用进行了观察研究。结果 黄芪、当归单用或合用均可促进内皮细胞生长,增加细胞周期中 S 期细胞的数目,尤以复方作用明显( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。同时,各给药组均能上调 VEGF 的表达,而对照组 VEGF 仅有微弱表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 黄芪、当归有促进血管内皮细胞增殖及 DNA 合成的作用,两药配伍应用时具有协同效应,提示在缺血心肌新生血管的发生和发展中可能具有一定作用。

**关键词** 黄芪 当归 内皮细胞 细胞增殖 细胞周期 血管内皮细胞生长因子

**Study on Effects of Astragalus, Angelica and Their Combination on Vascular Endothelial Cell Proliferation in vitro** LEI Yan, GAO Qian, LI Yue-shan, et al *Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

**Objective** :To study the effects of Astragalus membranaceus (AM), Angelica sinensis (AS) and their combination on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation and cells cycle. **Methods** :The effects were observed and studied by means of taking the cultured HUVECs as model to determine the cell proliferation with MTT method, cell cycle was analyzed with cytometry, and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression with SABC method. The regulatory effects of AM, AS and their combination on the HUVEC proliferation promoting were observed and studied. **Results** :AM and AS, used singly or in combination, could promote the growth of endothelial cells, increase the cell population in S phase, the effects showed more significant when used in combination ( $P < 0.05$  or  $P < 0.001$ ). Meanwhile, VEGF expression in all the medicated group was up-regulated, but in the PBS control group, it showed only weak expression ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** :AM and AS have effect in promoting vascular endothelial cell proliferation and DNA synthesis, and showed synergistic effect when they were used in combination, suggesting that these two Chinese herbs could have certain effect on the genesis and development of neogenetic vascularization in ischemic myocardium.

**Key words** Astragalus membranaceus, Angelica sinensis, endothelial cell, cell proliferation, cell cycle, vascular endothelial cell growth factor

益气活血是冠心病的重要治法。由黄芪、当归等药组成的气血注射液(黄芪、红参、当归)、当归补血汤、以及抗心梗合剂即是其代表方剂,均具有改善心肌缺血和防治冠心病的作用。其作用机理是否与促

进缺血区血管新生有关,值得研究。本实验通过建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)体外培养,利用细胞计数、MTT 测定、免疫细胞化学及流式细胞技术观察了黄芪、当归及其组方对内皮细胞生长、DNA 合成与复制,以及对血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,旨在探讨益气活血药是否有促血管生成作用,从而为临床治疗提供实验依据。

\* 国家重大基础研究“973”课题(No. 2000057010)  
1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091) 2. 河南省新乡医学院  
2001 级研究生 3. 新疆石河子大学医学院  
通讯作者 雷燕, Tel 010-64013948, E-mail leiyan@public.bta.net.cn  
万方数据

## 材料与方法

1 主要材料及设备 DMEM 细胞培养基(美国 GIBCO 公司)、胎牛血清(美国, Hyclone 公司)、表皮细胞生长因子(EGF)、I 型胶原酶、胰酶、EDTA、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠(美国, Sigma 公司)和肝素(北京邦定公司), SABC 试剂盒(武汉, 博士德公司), MILLIQ A-CADEMIC 水机(Millipore 公司)、倒置相差显微镜(德国, Leica)、CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱(REVCO, 美国)、流式细胞仪(FACScan, 美国 BD 公司), 酶标仪(Sunrise, 奥地利), 图像分析软件(美国, Met Morph 公司)。

## 2 实验方法

2.1 细胞培养及鉴定 细胞培养参照 Jaffe<sup>[1]</sup> 方法。取人新鲜脐带, 采用胶原酶脐静脉灌流消化法, 分离 HUVEC, 培养于含有 20% 胎牛血清(FBS)、青霉素 10<sup>5</sup>U/L、链霉素 100mg/L 的 DMEM 液中, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 待细胞汇合后, 用胰蛋白酶消化传代, 实验选用第 3~5 代细胞。台盼蓝染色细胞活性在 95% 以上, 经 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学鉴定阳性, 倒置显微镜下观察细胞呈鹅卵石状排列, 证实所培养细胞为内皮细胞。

2.2 药物制备及实验分组 试验用黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge]、当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels], 均系干品, 由中国中医研究院中药研究所黄璐琦研究员鉴定为正品。按常规方法将黄芪、当归分煎或合煎, 并浓缩至含生药 1g/ml, 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌, 4℃ 保存备用。实验最大浓度为 24h 细胞半数致死量的 1/4。

将培养的细胞随机分为 4 组:(1)黄芪组、(2)当归组、(3)黄芪当归合用组, 分别于 DMEM 培养液中加入黄芪煎液、当归煎液、黄芪当归合煎液, 终浓度均 500mg/L;(4)对照组, 采用等量 PBS 加入培养基中作为对照。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 48h 后收获细胞。

2.3 细胞生长曲线测定 取生长良好的血管内皮细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 96 孔培养板中, 常规培养 24h 后, 按不同分组给药。分别于孵育 1、3、5、7 天后常规消化各孔细胞, 按白细胞计数法, 于低倍镜下计数, 然后计算每毫升细胞数, 取均值, 以平均每孔细胞数作纵坐标, 培养时间作横坐标绘制细胞生长曲线。

2.4 MTT 法检测细胞增殖 选用生长良好的内皮细胞悬液, 调整细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml, 接种于 96 孔培养板, 生长培养液(80% DMEM + 20% FBS), 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养至融合状态, 按不同分组给药。药物作用达预定时间后, 每孔加入四唑盐(MTT)

溶液(5mg/ml) 20μl, 37℃, 继续孵育 4h, 终止培养, 弃去培养液, 加入 DMSO 150μl/孔, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解。选择 490nm 波长, 在酶标仪上测各孔光吸收值(OD), 结果以 OD<sub>490</sub> 值表示细胞增殖水平, 每组 8 复孔。试验重复 2 次。

2.5 免疫细胞化学分析 VEGF 表达 将内皮细胞接种于 6 孔培养板, 每孔内置一大一小为 1.5cm<sup>2</sup> 的盖玻片, 每组 3 张玻片, 培养 48h 细胞长至融合, 密闭无菌条件下, 培养板内灌注 99.99% N<sub>2</sub>, 流量 6~8L/min, 持续 10min 后, 按不同分组给药, 再孵育 24h 后取出盖玻片, PBS 洗 3 次, 丙酮室温固定 8min, -20℃ 保存备测。按博士德公司推荐的免疫细胞化学 SABC 法检测 VEGF 表达, 一抗为 VEGF 兔抗血清, 二抗为山羊抗兔 IgG, DAB 室温显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤。以 PBS 代替一抗作阴性对照。显微镜下, 细胞胞浆中具有棕褐色颗粒者为阳性细胞。应用美国 Met Morph 图像分析软件对 EC 阳性染色玻片进行半定量分析, 在相同放大倍率(×200)下, 通过摄像机摄取图像显示于荧光屏上, 选择颜色喷枪确定阳性表达细胞, 经主机读取阳性染色区域所占的像素点, 平均计值后换算为面积(μm<sup>2</sup>)。

2.6 流式细胞术检测细胞周期 取融合生长良好的内皮细胞, 换不含胎牛血清的 DMEM 培养 24h, 给予分别含有黄芪、当归或其合煎液的 DMEM 培养基, 终浓度均 5%, 继续培养 48h。对照组加等体积的 PBS, 常规消化离心细胞, PBS 洗 3 次, 以预冷的 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, RNA 酶消化, 37℃, 30min, 碘化丙啶(PI)染色后上流式细胞仪检测各组细胞中 DNA, 了解个体细胞的分化增殖情况。每个样品至少测定 8 000 个细胞以上。试验重复 2 次。

3 统计学方法 数据处理采用 STATE 4.0 统计软件, 多组资料用 ANOVA 进行分析。

## 结 果

1 黄芪、当归及其组方对 HUVEC 生长的影响 各组细胞生长曲线, 见图 1。可见随着培养时间的延长, 各组均显示出不同程度的促生长效应, 尤以合用组作用最强。

2 黄芪、当归及其组方对 HUVEC 增殖及 VEGF 水平的影响 细胞增殖实验结果表明, 黄芪当归合用组促血管内皮细胞(EC)增殖的作用好于单纯的黄芪组或当归组, 与 PBS 对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。正常情况下, 内皮细胞上 VEGF

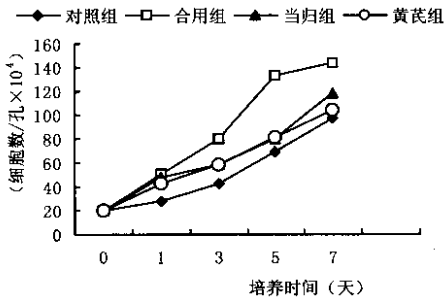


图1 黄芪、当归及其组方对血管内皮细胞生长的刺激作用的表达较弱,缺氧可刺激 VEGF 的表达。经黄芪、当归处理后对传代内皮细胞上 VEGF 的表达均有明显的促进作用,与 PBS 对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而黄芪与当归二药合用后的促进作用优于单纯黄芪组和当归组 ( $P < 0.01$ )。

表1 黄芪、当归及其组方对 HUVECs 增殖及 VEGF 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | EC 增殖(OD 值)   | n | VEGF 阳性面积( $\mu\text{m}^2$ ) |
|----|---|---------------|---|------------------------------|
| 对照 | 8 | 0.18 ± 0.04   | 5 | 362.92 ± 178.14              |
| 黄芪 | 8 | 0.24 ± 0.05   | 5 | 1371.95 ± 362.73 * △         |
| 当归 | 8 | 0.22 ± 0.02   | 5 | 1491.88 ± 676.98 ** △        |
| 合用 | 8 | 0.29 ± 0.04 * | 5 | 1598.05 ± 443.68 **          |

注 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与合用组比较, △  $P < 0.01$

3 黄芪、当归及其组方对细胞周期的影响 见表 2。给予黄芪当归组方干预后,内皮细胞周期各时相的细胞数占细胞总数的百分比与对照组比较有明显的不同。S 期细胞显著增多,而  $G_0/G_1$  期细胞相对比例减少,提示两药合用可明显促进内皮细胞 DNA 的合成,加快细胞增殖 ( $P < 0.001$ ),当归组也有增加 S 期细胞数目的作用 ( $P < 0.05$ ),黄芪组有此趋势,但与 PBS 对照组比较差异无显著性。

表2 黄芪、当归及其组方诱导的血管内皮细胞周期改变 ( $\%, \bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | $G_0/G_1$ 期     | S 期             | $G_2 + M$ 期 |
|----|---|-----------------|-----------------|-------------|
| 对照 | 6 | 72.49 ± 0.97    | 22.32 ± 0.70    | 5.18 ± 0.40 |
| 黄芪 | 6 | 71.46 ± 0.58    | 23.64 ± 0.88    | 4.90 ± 0.42 |
| 当归 | 6 | 70.07 ± 1.12 *  | 25.25 ± 1.29 *  | 4.67 ± 1.03 |
| 合用 | 6 | 54.68 ± 0.56 ** | 41.50 ± 0.55 ** | 3.82 ± 0.78 |

注 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$

讨 论

血管生成 (angiogenesis) 是指毛细血管从原血管床以出芽方式生长的过程,以毛细血管增生开始,以形成新的微血管床而告终,故又名血管新生<sup>[2]</sup>。目前对冠脉病变弥漫而严重的心肌缺血、高龄或有多种合并症的冠心病患者尚无满意疗法。治疗性血管生成为其治疗提供了新思路。由于血管新生的过程包括内皮细胞分裂、增殖、迁移、血管基底膜降解及管腔形

成等几个复杂的步骤,因此凡体外实验证实能促进内皮细胞增殖、迁移和蛋白水解酶产生的物质,即可确定为促血管生成剂,而活化的内皮细胞是血管生成的首要靶标。已知黄芪、当归对缺血性心脏病具有明确的治疗作用,其机理是否与血管生成有关,这是我们建立 HUVEC 模型的目的所在。

VEGF 是近年来倍受关注的一种新生血管因子,为目前发现的对血管内皮细胞最具选择性的有丝分裂原<sup>[3,4]</sup>,具有强烈的促进内皮细胞增殖作用,能增加细胞外基质合成和促进血管生成。其受体 VEGFR 与 VEGF 特异结合,亲和力强。已有研究结果表明<sup>[5,6]</sup>, VEGF 的生物学效应是通过内皮细胞表面的两个酪氨酸受体 flt-1 和 KDR 来发挥作用的。

我们的研究结果提示,黄芪当归组方具有促进人脐静脉内皮细胞增殖的作用,其机理可能是通过促进 VEGF 表达、增强人脐静脉内皮细胞周期中的 S 期而发挥作用,而细胞的增殖必然伴有 DNA 的合成与复制。同时,本研究还表明,黄芪与当归配伍应用时,具有协同效应。这一结果为研究益气养血活血中药对新生血管的作用提供了参考。

黄芪与当归是中医学中的‘甘温补气’和‘补血活血’的要药。二药合用具有气血双调、补心益气、养血活血、改善血行之功,使补中有动,行中有补,临床上常配合应用于劳力性心绞痛和心肌梗死后正虚邪恋、气血双亏、心失所养等症的治疗。现代药理研究表明<sup>[7]</sup>,两药均有增强机体免疫功能、抗氧化、抗缺氧、扩张冠脉、促进微循环、改善心肌缺血、降低耗氧量、抑制血小板聚集、减轻心肌损伤等作用。戴瑞鸿等<sup>[8]</sup>曾提出某些具有行气活血作用的中药可能具有促进血管生成的作用,从而有利于冠心病患者心脏侧枝循环的形成,减轻心肌缺血缺氧。本研究通过观察中药黄芪、当归及其组方对内皮细胞生长和细胞周期的调控,以及对 VEGF 表达的影响,初步证实本方参与了血管生成的过程,推测这可能是益气活血中药防治冠心病的重要机制。

参 考 文 献

1 Jaffe EA. Culture of human endothelial cells. Transplant Proc 1980 ;12(3 suppl 1):49—53.

2 盛琴慧,周爱儒,高 炜,等.多肽生长因子与血管生成.中国介入心脏病学杂志 1999 7(2):90—92.

3 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989 246 (4935):1306—1309.

4 Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, et al. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration

- in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1998 ;95 (12) : 7086—7091.
- 5 Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 1990 ;265(32):19461—19466.
- 6 Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants

by site-directed mutagenesis. J Biol Chem 1996 ;271 (10) : 5638—5646.

- 7 王浴生,邓文龙,薛春生.中药药理与应用.第2版.北京:人民卫生出版社,1998:982—998,439—447.
- 8 戴瑞鸿,李 勇.冠心病心肌缺血的治疗性血管生成与中医药.中国中西医结合杂志 2002 ;20(3):163—164.

(收稿 2003-03-03 修回 2003-07-10)

## 猕猴桃治疗慢性萎缩性胃炎 60 例

王建菊

慢性萎缩性胃炎,尤其伴有不典型增生和肠上皮化生是胃癌前病变,为消化系疑难病之一。近几年,笔者采用猕猴桃治疗本病,疗效满意,现报告如下。

**临床资料** 观察病例均符合《3200 个内科疾病诊断标准》(贝政平.北京:科学技术出版社,1996:226),100 例均为我院胃镜检查 and 病理活检确诊的住院患者及门诊患者。治疗组 60 例,男 38 例,女 22 例;年龄 36~78 岁,平均 57 岁;病程 1~25 年,伴肠上皮化生和不典型增生 30 例。对照组 40 例,男 26 例,女 14 例;年龄 35~76 岁,平均 55 岁;病程 10 个月~23 年,伴肠上皮化生和不典型增生 20 例。胃镜下粘膜形态特征改变:治疗组 粘膜平薄型 30 例,粘膜粗糙型 18 例,扁平隆起型 12 例;对照组依次为 20、12、8 例。病理诊断按 2000 年 5 月全国慢性胃炎研讨会共识意见标准。治疗组 肠上皮化生 21 例,完全小肠型 10 例,不完全小肠型 7 例,不完全大肠型 4 例;不典型增生 9 例。对照组 肠上皮化生 15 例,完全小肠型 7 例,不完全小肠型 5 例,不完全小肠型 3 例,不典型增生 5 例。所有病例均排除占位性病变。

**中医辨证** 所有患者均有胃脘疼痛、纳差、痞满、嘈灼、饥而不食,时有恶心、口干、大便干燥,舌质红,无苔或少苔(镜面舌多见),脉细,证属胃阴虚型。

**治疗方法** (1)治疗组 猕猴桃 猕猴桃干果 150g 白芍 150g 生山楂 150g 桃仁 100g 生地 60g 麦冬 60g 生石膏 60g 知母 60g 枳壳 60g 当归 50g 鸡内金 50g 白花蛇舌草 90g 黄连 30g 升麻 30g 牛膝 30g 甘草 30g。制法 研细末,过 120 目筛,做成蜜丸(本院制剂室制作,约 10g 1 丸,此为 1 个月量),1 次 1 丸,日 3 次温开水空腹送服。(2)对照组:胃蛋白酶合剂(新乡医学院三附院制剂室制作)10ml,吗丁啉片 15mg,叶酸片 10mg,均每日 3 次。两组均 3 个月为 1 个疗程。治疗 2 个疗程(6 个月)复查胃镜并活检(活检标本尽可能在原有病变部位钳取),并且作组织化学染色(HID-AB-PAS)。

### 结果

1 **疗效标准** 参照慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准。显效 临床症状消失,饮食正常,胃镜复查粘膜急性炎症基本消失,活检病理证实胃镜所见腺体萎缩、肠上皮化生(IM)和不典型增生(ATP)复常或减轻 2 个级度以上(含 2 个级

度)有效 临床症状明显减轻,食欲改善,胃镜检查病变有所减轻,病理活检减轻 1 个级度以上;无效 临床症状、胃镜、活检均无改变。恶化 临床症状加重,胃镜、活检发现癌细胞或肠化生、增生加重。

2 **两组疗效比较** 治疗组 60 例,显效 21 例(35.0%),有效 29 例(48.3%),无效 10 例(16.7%),总有效率 83.3%;对照组 40 例,显效 9 例(22.5%),有效 16 例(40.0%),无效 14 例(35.0%),恶化 1 例(2.5%),总有效率 62.5%。两组总有效率比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

3 **IM、ATP 两组疗效比较** 治疗组 30 例 IM 21 例,显效 10 例,有效 9 例,无效 2 例;ATP 9 例,显效 2 例,有效 4 例,无效 3 例,总有效率 83.3%。对照组 20 例 IM 15 例,显效 3 例,有效 7 例,无效 5 例;ATP 5 例,显效 0 例,有效 2 例,无效 2 例,恶化 1 例,总有效率 60%。两组总有效率比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。

**讨论** 慢性萎缩性胃炎属中医“胃脘痛”、“痞满”、“嘈杂”范畴,而阴亏血瘀为致病关键,胃为阳土、喜润恶燥,故易被辛辣炙、劳倦情志所伤,久则耗气伤津入络,阴津亏损,胃络失养,渐成瘀阻之变。方中猕猴桃(张民庆,张名伟,唐德才.现代临床中药学.上海:上海中医药大学出版社,2002:683)具有健胃消食功能,现代药理研究能阻断二甲基硝胺的合成,使之不能致突变起到防癌作用,猕猴桃中所含丰富的抗坏血酸物质(AH<sub>2</sub>)有直接和间接抑制癌变的作用,还能促进干扰素产生,提高细胞内 cAMP 和 cGMP 含量,促进免疫功能。桃仁抗炎消肿、增加胃粘膜血供,有利于胃粘膜转复,抑制肉芽形成,还有明显抗癌、润便、调节免疫功能作用;玉女煎(生地、麦冬、石膏、知母、牛膝)具有镇痛消炎作用;生山楂、鸡内金、枳壳消食开胃,行气除胀,改善胃粘膜循环;白芍、甘草酸甘化阴,缓急止痛;白花蛇舌草具有清热解毒,防变抗癌作用,诸药合用具有滋阴清热、养血活血、消炎抗癌、增加胃蛋白酶,改善胃腺体萎缩,有利于肠化生、增生消失,防治萎缩性胃炎恶变。

(收稿 2003-03-24 修回 2003-06-15)