

· 基础研究 ·

血府逐瘀汤诱导内皮细胞促血管新生的基因调控研究

高冬¹ 陈文元¹ 吴立娅¹ 郑良朴² 林薇² 宋军³

摘要 **目的** 研究血府逐瘀汤促进内皮细胞参与血管新生的机制。**方法** 通过血府逐瘀汤含药血清对内皮细胞 ECV304 增殖、细胞周期、迁移和体外成血管的影响,明确药物具有显著的促血管新生作用,并运用基因芯片技术分析药物对血管新生各调控因子的作用。**结果** 2.5% 血府逐瘀汤含药血清作用 48 h 能显著促进 ECV304 细胞活性、增加 S 期细胞数目,诱导内皮细胞迁移和促体外成血管作用。在此药物作用条件下,血府逐瘀汤上调 4 个,下调 10 个血管新生调控基因的表达。**结论** 血府逐瘀汤促 ECV304 参与血管新生的机制复杂,呈多途径、多靶点现象。

关键词 血府逐瘀汤;血管新生;基因芯片

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction in Inducing Angiogenesis Gene Regulation of Endothelial Cell Line ECV304 GAO Dong, CHEN Wen-yuan, WU Li-ya, et al *Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108)*

ABSTRACT **Objective** To study the acting mechanism of endothelial cell line ECV304 in regulating angiogenesis induced by Xuefu Zhuyu Decoction (XFZY). **Methods** The angiogenesis effect of XFZY-contained serum (XFZY-CS) was confirmed by observing its impact on proliferation, cell cycle, migration of ECV304 and on vascular neogenesis *in vitro*. Then the effect of XFZY on various angiogenesis controlling factors was analyzed with gene chip microarray technique. **Results** Treatment of XFZY-CS in 2.5% concentration for 48 h showed evident actions of enhancing ECV304 activity, increasing cell numbers of S phase, inducing cell migration and promoting the *in vitro* angiogenesis. Meanwhile, expressions of four angiogenesis controlling genes were up-regulated and 10 were down-regulated. **Conclusion** The angiogenesis mechanism of ECV304 induced by XFZY is complex, it shows a multi-pathway and multi-target feature.

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Decoction; angiogenesis; gene chip microarray

血管新生在缺血性疾病治疗和预后中意义重大,我们前期工作表明,活血化瘀的经典方剂血府逐瘀汤具有显著地促鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的效果^[1],且具有动员骨髓内皮祖细胞参与血管新生的作用^[2]。由于血管内皮细胞与血管新生直接相关,故本实验以内皮细胞为模型,探讨血府逐瘀汤诱导血管内皮细胞促血管新生的功能及其作用机制。

材料与方法

1 药物制备 血府逐瘀汤组成:当归 9 g 生地 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,该方水煎两次,煎液过滤,混合后加热浓缩至含生药量 1.3 g/mL,4 ℃ 保存备用。药物购自福建中医学院中医药研究院。

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,SPF 级,经福建中医学院实验动物中心清洁级动物房常规饲养,3 天适应性喂养后随机分为血府逐瘀汤组(药物组)和对照组,每组 4 只。药物组按 13 g/kg(相当于人临床用量的 10 倍)剂量即 10 mL/kg 灌胃,对照组用等剂量生理盐水,每天 2 次,连续灌胃 7 天。于末次灌胃 2 h

基金项目:福建省自然科学基金资助(No. 2007J0101);福建省“中西医结合基础与临床”创新团队项目(No. CKJ200801);福建省科技厅项目(No. 2005K052)

作者单位:1. 福建中医学院中西医结合系(福州 350108);2. 福建中医学院中西医结合研究院;3. 中国中医科学院医学实验中心

通讯作者:宋 军, Tel:010-64014411 转 3325, E-mail: junsong86@sohu.com

后,采用 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,4 000 r/min,离心 30 min 分离血清,56 ℃ 灭活 30 min,0.22 μm 微膜过滤除菌后,置 -20 ℃ 保存备用。

3 试剂及设备 明胶(美国 Sigma 公司),M199 培养基,Trizol 和 SuperScript. III Reverse Transcriptase (均为美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS;美国 Hyclone 公司),In Vitro Angiogenesis Assay Kit (ECM625)(美国 Millipore 公司),Cycle TEST™ plus DNA REAGENT KIT(美国 BD 公司),Boyden 小室(江苏省海门市麒麟医用仪器厂),IX70 倒置相差显微镜及数码摄像装置(日本 Olympus 公司),ELX800 全自动酶标仪(美国 BioTek 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD 公司)。RNeasy® MinElute™ 纯化试剂盒(美国 Qiagen 公司),Real time PCR Array (美国 SuperArray 公司),ABI PRISM7700 system (美国 Applied Biosystems)。

4 内皮细胞培养及药物诱导处理 内皮细胞 ECV304 购于武汉大学生命科学院中国典型培养物保藏中心,采用含 5% FBS 的 M199 培养液,于 37 ℃、5% CO₂ 常规培养。经同步化处理以后以 2.5 × 10⁵ 个/mL 的密度进行接种,96 孔板的接种量为每孔 100 μL,25 cm² 培养瓶接种量为每瓶 1 mL,待 4 h 细胞贴壁后弃去培养液,随机分成药物组和对照组,药物组换 1.25%、2.5% 和 5% 含药血清的 M199 培养液,对照组分别换含等量对照血清的 M199 培养液,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 备用。

5 MTT 实验 培养在 96 孔板内的细胞经药物干预 48 h 后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT,孵育 4 h 后弃去培养液,每孔加入 DMSO 200 μL,振荡 10 min 后于酶标仪检测 570 nm 波长的 OD 值,参比波长 630 nm。

6 细胞周期检测 培养瓶中各组细胞经胰酶消化后,离心收集,参照 Cycle TEST™ plus DNA REAGENT KIT 试剂盒使用说明书进行操作,采用流式细胞仪检测 S 期细胞比例。利用 Cell Quest 软件获取数据,ModiFit Version 3.0 软件分析。

7 迁移实验 收集各组细胞培养上清液置于 Boyden 小室的下室,室间置以孔径 8 μm 的聚碳酸酯膜,上室加入对应组别的细胞 2 × 10⁴ 个,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1 h。聚碳酸酯膜经棉签轻轻刮去上室面的细胞,中性甲醛固定,苏木素常规染色后,高倍视野(200 ×)随机计数下室面 6 个视野下的 ECV304 细胞个数。

8 体外成血管实验 按 In Vitro Angiogenesis As-

say Kit 说明书操作。每孔接种 10⁴ 个细胞,培养 12 h 后高倍视野(200 ×)随机计算 6 个视野下形成的管腔个数。

9 实时定量 PCR 芯片的检测 按试剂盒说明常规提取 RNA 并逆转录成 cDNA 后,采用 2X SuperArray PCR master mix 稀释 cDNA 样品,在 PCR Array 的每个孔中加入 25 μL cDNA 混合液,实时定量 PCR 程序设置 10 min 95 ℃,15 s 95 ℃,1 min 60 ℃,40 个循环后检测芯片上所固定的 89 个基因的荧光强度,其中 84 个基因编码血管新生促进或抑制因子,5 个基因为参比的管家基因,具体的相关基因参见芯片说明。

10 数据分析和统计处理 实时定量 PCR Array 的数据分析采用 ΔΔCt 方法,ΔCt = average Ct - average of HK genes' Ct; ΔΔCt = ΔCt (药物组) - ΔCt (对照组);以 2^{-ΔΔCt} 计算药物组与对照组之间相对应基因的表达差异,荧光变化倍数 > 2 或 < 2 为显著水平。其他项目的数据采用 t 检验比较均数。

结 果

1 两组细胞活力检测结果(表 1) 与同血清含量的对照组比较,2.5% 含药血清干预处理 48 h,能显著影响 ECV304 细胞线粒体的代谢能力,提高细胞活力。

2 两组细胞周期比较结果(表 1) 与同血清含量的对照组相比,2.5% 和 5% 的含药血清干预处理 48 h,能显著增加 ECV304 细胞中 S 期细胞所占比例,具有增加细胞增殖能力的作用。

3 两组细胞迁移能力比较结果(表 1) 与同血清含量的对照组比较,2.5% 含药血清诱导细胞 48 h 可显著增加聚碳酸酯膜下室面的细胞数,而 5% 含药血清的作用显著,二者均可提高 ECV304 细胞的迁移能力。

4 体外成血管实验结果(表 1) 与同血清含量的对照组相比,1.25%、2.5% 和 5% 的含药血清诱导细胞 48 h 均可极显著增加血管管腔数量。

5 血府逐瘀汤对血管新生调控因子表达的影响(表 2) 血府逐瘀汤可提高 ID3、干扰素 α1 (IFN-α1)、转化生长因子 β2 (TGFβ2) 和血管表皮生长因子 C (VEGFC) 4 个血管新生相关因子的表达,下调了包括趋化因子 5、6、10、11 (CXCL5、6、10、CCL11) 和表皮生长因子 (EGF)、血小板反应素 (ITGB3)、胶原蛋白 IV (COL4A3)、凝血酶敏感蛋白 (THBS2)、血管内皮 - 钙黏附素 (CDH5) 和酪氨酸激酶受体 Eph 亚族 (EFNA1) 在内的 10 个血管新生调控因子的表达。在这些基因

表 1 两组 ECV304 细胞活力、内皮细胞增殖、迁移和成血管能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清含量	细胞活力 ($OD \times 10^{-1}$)	S 期 (%)	细胞 (个)	血管腔 (个)
药物	6	1.25%	1.89 ± 0.09	32.33 ± 4.32	27.00 ± 3.85	23.17 ± 2.93**
	6	2.5%	2.34 ± 0.09**	45.67 ± 2.25**	39.83 ± 3.71**	21.33 ± 3.01**
	6	5%	2.02 ± 0.11	44.50 ± 2.59**	36.67 ± 3.56*	24.33 ± 6.35**
对照	6	1.25%	1.85 ± 0.03	32.00 ± 1.41	28.17 ± 2.32	12.17 ± 3.06
	6	2.5%	1.84 ± 0.06	33.17 ± 2.23	28.67 ± 3.33	10.50 ± 2.59
	6	5%	1.94 ± 0.20	32.00 ± 2.90	27.67 ± 3.01	8.17 ± 3.06

注:与对照组同血清含量比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 血府逐瘀汤对血管新生调控因子表达的影响

缩写	全称及说明	基因	n	变化倍数
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	HEIR-1	3	2.89
IFN α 1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN	3	2.93
TGF β 2	Transforming growth factor, beta 2	TGF β 2	3	2.19
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Flt4-L/VRP	3	3.01
EFNA1	Ephrin-A1	B61/ECKLG	3	-2.03
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	SCYA11	3	-2.09
CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	7B4/CD144	3	-6.13
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	TUMSTATIN	3	-2.35
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/IF110	3	-5.93
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CKA-3/GCP-2	3	-2.39
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5	3	-3.63
EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	HOMG4/URC	3	-2.01
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A	3	-3.52
THBS2	Thrombospondin 2	TSP2	3	-7.60

中,以药物对 THBS2 的下调影响最为显著,变化倍数达 7.6,其次为 CDH5 和 CXCL10,抑制倍数分别为 6.13 和 5.93,其余基因的变化情况均在 2~3 倍。

讨 论

血管新生涉及到血管内皮细胞增殖,从基底膜分离、迁移到血管周围间隙,黏附、增殖,形成管腔结构这一系列过程,本实验结果提示药物具有促血管新生的作用,但不同药物浓度影响的环节有异,1.25% 含药血清只能影响管腔的形成能力,5% 的含药血清对细胞的活力没有影响,而 2.5% 含药血清处理 48 h 这一药物作用条件对增殖、迁移等多个环节均有影响,其促血管新生作用最为显著。上述结果从体外证实了药物的促血管新生作用,与前期鸡胚绒毛尿囊膜在体实验结论^[1]不仅一致,而且是在体实验的一个重要补充;由此,我们挑选出这一最佳促血管新生作用的药物反应条件,并开展进一步的基因调控分析。血管新生的开关受促血管新生因子和抑制血管新生因子相互作用的调节,虽然调控血管新生开关的分子机制尚未明确,但调控血管新生的因子超过 20 种^[3],开启血管新生需要上调促血管新生因子,下调抑制血管新生因子的表达,本实验涉及的与血管新生相关的 84 个调控因子中,药物从转录水平上调了 ID3、IFN α 1、TGF β 2 和 VEGFC 4

个血管新生调控因子,下调了包括 THBS2、CDH5 和趋化因子等 10 个血管新生调控因子。上调的 4 个因子中,促血管新生因子和抑制血管新生因子各占两个,提示药物促血管新生的作用机制十分复杂,并不是简单地通过上调有关的所有促血管新生因子,下调相关的所有抑制因子发挥作用。这个现象也表现在药物对趋化因子超家族的影响,该家族的不同成员对血管新生的作用不同^[4],其中 CXCL5、6 经血管内皮组织上 CXCR2 介导,CCL11 通过 CCR3 介导发挥血管新生促进作用;而 CXCL10 趋化因子通过血管内皮组织上 CXCR3 介导血管新生抑制作用,血府逐瘀汤对上述两方面的调控因子皆为抑制作用,并以对 CXCL10 的抑制作用最强,最终使得调控平衡趋向血管新生的促进作用。

受血府逐瘀汤影响最为显著的凝血酶敏感蛋白(TSPS)是一类最早被发现的血管新生调控因子,TSP1 和 TSP2 均可抑制内皮细胞的生存和迁移^[5],在胚胎发育期缺失 TSPS 可提高血管密度^[6],在后肢缺血动物模型中,TSPS 的表达和释放抑制血小板的形成和骨髓微脉管系统的重建,进而抑制血管新生。在 TSP1、2 双基因敲除的小鼠中,骨髓抑制导致的小板形成有显著改善,加快了骨髓内和缺血区的血管新生^[7]。所以,TSPS 是血管新生的开关之一,通过结合 MMP-9 和 SDF-1 抑制促血管新生的信号传递,从而限

制了血管生长的程度^[7]。本实验结果表明,血府逐瘀汤通过明显下调 TSP2 的表达,提高了内皮细胞的活力、增殖和迁移能力,进而发挥促血管新生的作用。

对内皮细胞增殖、迁移有影响的调控因子还包括 ITGB3 和 VE-cadherin,VE-cadherin 介导的细胞-细胞间的黏附以及整合素(ITG)介导的细胞-胞外基质间的黏附对维持内皮单层细胞的稳定发挥重要作用^[8,9]。血府逐瘀汤抑制 ITGB3 和 VE-cadherin 的表达,导致细胞易变形迁移。特别值得一提的是整合素中的 ITGB3 在血管新生中具有双向调控作用,ITGB3 抗血管新生或促血管新生作用取决于它结合的是 Tumstatin 抑或是 Vitronectin^[3,10] 玻璃粘连蛋白膜受体,本实验结果说明药物可下调 ITGB3 和 Tumstatin 的表达,抑制 ITGB3 介导的抗血管新生作用。

上述实验结果说明血府逐瘀汤诱导内皮细胞促血管新生作用呈多环节、多靶点的现象,鉴于其作用机制复杂,提示该药物促血管新生的作用效果有异于单纯使用单一的促血管新生调控因子。要明确血府逐瘀汤对各类血管新生因子的调控模式,仅靠本实验结果远远不够,调控因子在信号通路上的多样化和网络化,使得单一调控因子的研究还存在空白,更何况多个调控因子的协调化作用了。另外,本实验采用的基因芯片只检测了大部分已知的血管新生调控因子,除此之外,药物还影响了 NO 这个血管新生调控信号^[2],甚至于其他未知的调控信号,因此尚需要大量进一步的实验论证,以助完整认识血府逐瘀汤促血管新生的作用机制。

参 考 文 献

[1] 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.

Gao D, Song J, Hu J, et al. Angiogenesis promoting effects of Chinese herbal medicine for activating blood circulation to remove stasis on chick embryo chorio-allantoic membrane[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2005,25

(10):912-915.

[2] 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): 829-831.

Gao D, Lin W, Zheng LP, et al. Effect of Xuefuzhuyu decoction on endothelial progenitor cells migrating from rat marrow[J]. Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovas Dis, 2007,5(9):829-831.

[3] Mundel TM, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors[J]. Microvasc Res, 2007,74(2-3): 85-89.

[4] Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(11):1928-1936.

[5] Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis[J]. Matrix Biol, 2003, 22(1):63-71.

[6] Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, and increased vascular density, and a bleeding diathesis [J]. J Cell Biol, 1998, 140(2):419-430.

[7] Kopp HG, Hooper AT, Broekman MJ, et al. Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization[J]. J Clin Invest, 2006, 116(12):3111-3113.

[8] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability[J]. J Cell Sci, 2008, 121 (pt13):2115-2122.

[9] Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma[J]. Nat Med, 1998, 4(4):408-414.

[10] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines[J]. Cell, 2002,110(6):673-687.

(收稿:2009-07-15 修回:2009-11-10)

更正:本刊 2009 年 12 月第 29 卷第 12 期第 1098 页图 2 中注释,应为:A 为谷氨酰胺组;B 为芪黄煎剂组;C 为假手术组;D 为 I/R 组。

本刊 2010 年第 1 期第 110 页“中国中西医结合学会 2009 年学术活动计划”,应为“中国中西医结合学会 2010 年学术活动计划”,谨向读者致歉。