

· 基础研究 ·

非缺氧条件下血府逐瘀汤促内皮细胞血管形成中 bFGF 作用的实验研究

高 冬¹ 张静思² 胡雅琼¹ 林 凡¹ 王一铮¹ 宋 军² 陈可冀³

摘要 目的 探讨在非缺氧条件下血府逐瘀汤对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)促血管新生中的作用。方法 运用血清药理学方法,在常规 95% O₂ 培养条件下,以 1.25%、2.50%、5.00% 浓度的血府逐瘀汤含药血清和空白血清干预血管内皮细胞 ECV304 48 h,通过体外成血管实验、酶联免疫法和逆转录 PCR 法分别检测不同浓度血府逐瘀汤含药血清对管腔形成、bFGF 的含量和转录水平的影响。结果 1.25%、2.50%、5.00% 含药血清均可明显促进内皮细胞参与管腔形成,尤以 1.25%、2.50% 含药血清诱导形成的管腔形态规整,而且能显著提高细胞培养上清液中 bFGF 的含量和其转录水平。结论 在非缺氧条件下血府逐瘀汤通过上调 bFGF 的表达,发挥促血管新生作用。

关键词 血府逐瘀汤;非缺氧;血管新生;碱性成纤维细胞生长因子

Roles of bFGF in Endothelial Cell Tube Formation Induced by Xuefu Zhuyu Decoction under Non-anoxia Condition GAO Dong¹, ZHANG Jing-si², HU Ya-qiong¹, LIN Fan¹, WANG Yi-zheng¹, SONG Jun², and CHEN Ke-ji³ 1 Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional 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), China

ABSTRACT Objective To explore the roles of basic fibroblast growth factor (bFGF) on tube formation induced by Xuefu Zhuyu Decoction (XZD) under non-anoxia condition. Methods Using serum pharmacology technique, endothelial cell line ECV304 cells were incubated in routine 95% O₂. ECV304 cells were intervened by 1.25%, 2.50%, and 5.00% XZD containing serums and the vehicle serum for 48 h. The effects of XZD on tube formation, bFGF contents and its transcription levels were assessed by *in vitro* tube formation assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. Results Three concentrations of XZD containing serums could not only obviously promote the tube formation bFGF level, but also up-regulate bFGF contents in the supernate and its transcription levels. The shapes of lumens were more regular in those induced by 1.25% and 2.50% XZD containing serums. Conclusion XZD induced angiogenesis via up-regulating the bFGF expression under non-anoxia condition.

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Decoction; non-anoxia condition; angiogenesis; basic fibroblast growth factor

鉴于血管新生在缺血性疾病的治疗和预后中发挥

重要作用,使之成为该领域药物筛选的靶标^[1],研究血管新生还有助于推动治疗性血管新生临床应用的发展^[2]。血府逐瘀汤是临床上治疗缺血性疾病行之有效的经典方,前期研究表明该方剂具有显著的促血管新生作用^[3-6],但其机制不甚明了。内皮细胞管腔形成是血管新生的重要步骤和具体表现,本实验以血管内皮细胞 ECV304 为模型,运用血清药理学方法,研究血府逐瘀汤对内皮细胞管腔形成的影响及其对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth fac-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072933; No. 81173431);福建省自然科学基金资助项目(No. 2011J01213);陈可冀中西医结合发展基金项目(No. CKJ2011009)

作者单位: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)

通讯作者:宋 军, Tel: 010 - 64014411 转 3325, E-mail: jun-song86@sohu.com

tor, bFGF) 的作用, 为药物治疗缺血性疾病提供初步的实验依据和机制探讨。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠 12 只, 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 (No. 0037614), 由福建中医药大学实验动物中心 [许可证号: SYXK (闽) 2009-0001] 饲养。

2 细胞株 血管内皮细胞株 ECV304 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心, 细胞序列号: GDC023。

3 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 3 g 桔梗 4.5 g 川芎 4.5 g 牛膝 9 g), 由福建中西医结合研究院提供。该方水煎两次, 煎液过滤, 混合后加热浓缩至每毫升含生药量 1.3 g, 4 ℃ 保存备用。

4 试剂及仪器 戊巴比妥钠 (美国 Sigma 公司), M199 培养基 (美国 GIBCO 公司), Trizol 引物 (美国 Invitrogen 公司), *In Vitro* Angiogenesis Assay Kit (ECM625, 美国 Millipore 公司), 人 bFGF ELSIA 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司), Rever-taid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒和 recombinant Taq 酶 (立陶宛 Fermentas 公司), IX70 倒置相差显微镜及数码摄像装置 (日本 Olympus 公司), PE 9600 基因扩增仪 (美国 PE 公司), Power Pac Basic 电泳仪、Gel Doc XR 加凝胶成像系统及配套软件 Quantity One (美国 Bio-Rad 公司)。

5 方法

5.1 含药血清制备 将大鼠随机分为药物组和空白对照组, 每组 6 只, 参照人和动物间用药剂量的换算 (人剂量 × 大鼠换算系数), 分别采用 13 g/kg 剂量 (相当于临床口服剂量 10 倍) 的药物和等量生理盐水灌胃, 2 次/天, 连续灌胃 7 天, 于第 8 天灌胃 2 h 后 3% 戊巴比妥钠麻醉、腹主动脉取血, 静置 1 h 后, 4 000 r/min 离心 30 min 分离血清, 经 56 ℃ 灭活 30 min 后, 0.22 μm 过滤除菌, 置 -20 ℃ 保存。

5.2 细胞培养及含药血清处理 内皮细胞株 ECV304 采用含 5% FBS 的 M199 培养液于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, 生长汇合后经同步化处理, 以 2.5 × 10⁵ 个/mL 的密度接种, 随机分成药物组和空白组, 待细胞贴壁后分别换含 1.25%、2.50%、5.00% 血府逐瘀汤含药血清和空白血清的培养液, 继续培养 48 h 开展各项实验。

5.3 成血管能力实验 参考 *In Vitro* Angiogenesis Assay 试剂盒说明书进行。于 4 ℃ 预冷的 96 孔培养板中铺匀 50 μL 混合好的 ECMatrix™ solution。37 ℃ 放置 2 h 凝固后, 每孔分别接种 150 μL, 各组细胞 10⁴ 个, 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。

5.4 上清液中 bFGF 浓度检测 取各组细胞培养上清液, 采用酶联免疫法, 参照试剂盒说明书步骤检测 bFGF 的含量。

5.5 RT-PCR 检测 bFGF 表达 采用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 取 RNA 1 μg 参照试剂盒说明书进行逆转录反应。引物序列 (表 1) 由 Primer Premier 5.0 设计, 并经 BLAST 验证。反应体系为 10 × Taq buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 1.5 μL, cDNA 2 μL, 1 U/μL 的 Taq 聚合酶 1 μL, 灭菌超纯水补至 50 μL。94 ℃ 预变性 3 s, 变性 30 s、58 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 ℃ 补齐 10 min 后电泳检测。应用凝胶成像分析系统拍照并进行电泳条带光密度分析, 靶基因与内参条带的光密度参数之比作为该基因 mRNA 的表达水平参数。

表 1 引物序列

名称	引物序列	产物长度
bFGF	5'-GGCTGTACTGCAAAAACG-3' 5'-GTGCCACATACCAACTGG-3'	288 bp
β-actin	5'-ATCATGTTTGGGACCTTCAACA-3' 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	318 bp

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

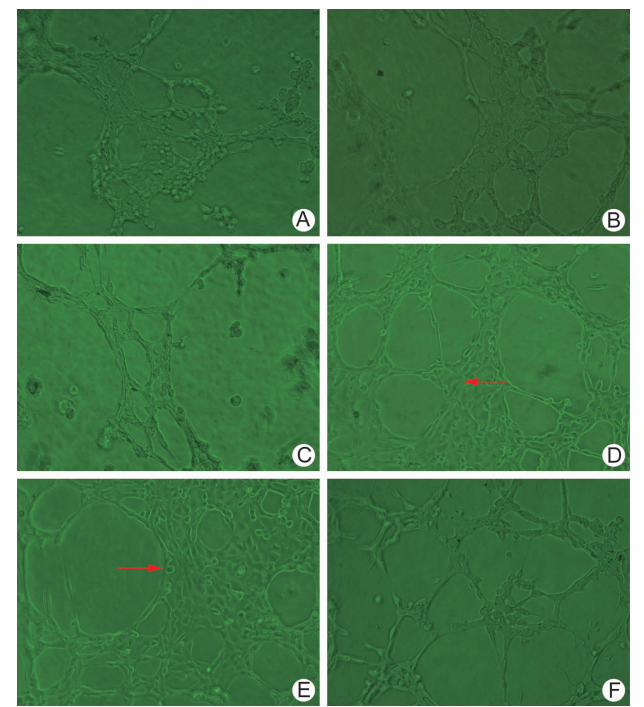
结 果

1 不同浓度含药血清对成血管能力的影响 (表 2, 图 1) 体外成血管检测的结果显示, 与同浓度空白血清组比较, 1.25%、2.50%、5.00% 浓度含药血清组的体外成血管数量明显增多, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。从所形成的管腔形态来看, 1.25%、2.50% 含药血清组所形成的管腔形态较规整, 部分管腔壁较厚。

2 不同浓度含药血清对上清液中 bFGF 浓度的影响 (表 2) 与同浓度空白血清组比较, 1.25%、2.50%、5.00% 含药血清组均能提高上清液中 bFGF 的浓度 (*P* < 0.01)。

3 不同浓度含药血清对内皮细胞 bFGF 转录的

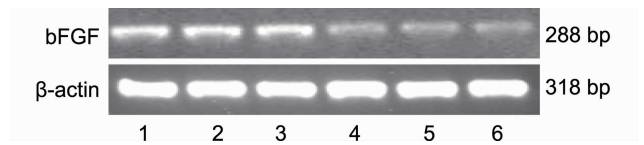
影响(表 2,图 2) 与同浓度空白血清组比较,1.25%、2.50%、5.00%含药血清组的条带较亮,灰度值统计结果表明,1.25%、2.50%、5.00%含药血清可提高 bFGF 的转录水平($P<0.01$)。



注:A~C 分别为 1.25%、2.50%、5.00% 含药血清组;D~F 分别为 1.25%、2.50%、5.00% 空白血清组
图 1 不同浓度含药血清影响成血管的结果 (×200)

表 2 不同浓度含药血清对血管形成及 bFGF 表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	血清含量 (%)	管腔数量 (个)	bFGF 浓度 (pg/mL)	bFGF 表达灰度值($\times 10^{-1}$)
含药血清	6	1.25	15.83 $\pm$ 1.72 *	170.00 $\pm$ 14.32 *	0.55 $\pm$ 0.03 *
	6	2.50	18.83 $\pm$ 1.47 *	198.67 $\pm$ 19.91 *	0.57 $\pm$ 0.02 *
	6	5.00	16.17 $\pm$ 2.79 *	173.67 $\pm$ 13.14 *	0.59 $\pm$ 0.03 *
空白血清	6	1.25	7.00 $\pm$ 2.83	83.83 $\pm$ 7.28	0.44 $\pm$ 0.03
	6	2.50	11.33 $\pm$ 2.66	49.67 $\pm$ 3.39	0.41 $\pm$ 0.01
	6	5.00	4.17 $\pm$ 1.94	101.50 $\pm$ 8.60	0.42 $\pm$ 0.02

注:与同浓度空白血清组比较, * $P<0.01$



注:1~3 分别为 1.25%、2.50%、5.00% 含药血清组;4~6 分别为 1.25%、2.50%、5.00% 空白血清组
图 2 不同浓度含药血清影响 bFGF 转录的 RT-PCR 结果

讨 论

体外培养的内皮细胞在合适的细胞外基质环境下均可形成管腔样结构,因此管腔形成实验已成为体外研究血管新生的常用方法^[7]。本研究结果表明,1.25%、2.50%、5.00% 3 种浓度的含药血清均能明显提高血管管腔数量,且从所形成的管腔形态来看,尤以两个较低浓度的药物诱导形成的效果为佳,说明血府逐瘀汤具有显著的促血管新生作用,与本项目组以鸡胚绒毛尿囊膜和内皮祖细胞为模型的实验结论相一致^[3,5]。虽然有实验结果显示血府逐瘀汤通过抑制内皮细胞增殖和迁移,具有抑制血管新生的作用^[8],但该实验中表现出显著抑制作用的含药血清浓度 $\geq 10\%$,均高于本实验所采用的药物浓度,与本实验结果并不矛盾。上述有关血府逐瘀汤影响血管新生的研究结果,提示较低浓度的血府逐瘀汤具有显著的促内皮细胞血管新生作用,而高浓度的药物抑制血管新生,体现出中医药独特的双向调控特点。

血管新生受到多种正向和负向因子的调节,组成复杂的调控体系^[9],其中 bFGF 作为最有效的促血管生长因子之一^[10],在治疗性血管新生领域具有较大的探索价值和应用前景^[11,12]。细胞内合成的 bFGF 通过自分泌和旁分泌到细胞外,与靶细胞上的受体结合发挥作用。本实验结果显示低、中、高三种浓度的含药血清均能显著提高 bFGF 的表达和胞外水平,表明药物促血管形成的作用与 bFGF 这个正向调控因子直接相关。由于血府逐瘀汤同时还可影响其他血管新生调控因子的表达^[13],故其促血管新生机制呈多途径、多靶点的现象,但各调控因子之间是否具有相互作用以及具体的作用机制,尚需要进一步的实验加以明确。

活血化瘀是中医所独有的治法之一,具有“活血化瘀,去瘀生新”作用的血府逐瘀汤作为代表方剂,广泛适用于各类气滞血瘀证的治疗。祛瘀是血瘀证治疗之首要,唐容川在《血证论》中阐述了“旧血不去,新血断然不生”的论点,强调祛瘀生新的作用。按现代医学的观点,“血瘀”除静止之血外,还包括一切由血循环障碍所致的各种病变,因此血瘀证与局部缺血缺氧直接相关。针对这个认识,现代药理在整体水平上探讨血府逐瘀汤的药效机制时,可以检索到的大量研究采用缺血动物模型;在细胞水平则采用缺氧条件培养细胞以模拟病症环境^[14,15]。本项目组曾在下肢缺血大鼠中发现,血府逐瘀汤可促进损伤修复时肉芽组织的血管生长^[6],该模型属于血瘀证范畴,部分体现出药物“去瘀生新”的作用。而本项目组前期内皮祖细

胞动员所采用的正常 SD 大鼠^[4]和经典的鸡胚绒毛尿囊膜^[3]这两个整体模型,不属于中医学“血瘀证”的范畴,加上内皮祖细胞^[5]和包括本实验在内的血管内皮细胞^[13]两个细胞模型的体外培养条件,氧含量均在正常范围,在这些非缺血缺氧条件下药物都有促血管新生的作用,提示除了经典的“祛瘀生新”以外,药物还存在“活血生新”的功效。活血即可生新,是本项目组系列实验结果最引人注目的发现,提示活血化瘀药物在临床应用上不仅适用于血瘀证患者,我们希望能有越来越多的实验结果,为进一步扩大血府逐瘀汤的应用,乃至于活血化瘀理论认识,进而为扩大其临床适用范围提供更坚实的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(4): 273-286.
- [2] Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: microvascular therapies coming of age [J]. Circulation, 2008, 118(1): 9-16.
- [3] 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.
- [4] 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): 457-459.
- [5] Gao D, Wu LY, Jiao YH, et al. Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on *in vitro* endothelial progenitor cell tube formation [J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(1): 50-53.
- [6] 高冬, 焦雨欢, 武一曼, 等. 血府逐瘀汤诱导内皮祖细胞参与缺血区血管新生的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 239-243.
- [7] Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro* [J]. Nature, 1980, 288 (5791): 551-556.
- [8] 丁志山, 高承贤, 程东庆, 等. 血府逐瘀汤对牛内皮细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中成药, 2003, 25(5): 423-424.
- [9] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [10] Murakami M, Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization [J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(3): 215-220.
- [11] Sedighiani F, Nikol S. Gene therapy in vascular disease [J]. Surgeon, 2011, 9(6): 326-335.
- [12] Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, et al. Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness [J]. J Artif Organs, 2004, 7(2): 58-61.
- [13] 高冬, 陈文元, 吴立娅, 等. 血府逐瘀汤诱导内皮细胞促血管新生的基因调控研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(2): 153-156.
- [14] 沃兴德, 丁志山, 吉瑞瑞, 等. 血府逐瘀汤对缺氧诱导心肌凋亡的干预作用研究 [J]. 中医药学刊, 2002, 20(11): 6-7.
- [15] 徐粟, 丁志山, 楼兰花, 等. 血府逐瘀汤对缺氧条件下肺动脉平滑肌细胞增殖及培养液中 NO 水平的影响 [J]. 中草药, 2007, 37(9): 1379-1381.

(收稿:2012-07-27 修回:2013-01-15)

第十七次全国中西医结合儿科学术会议征文通知

中国中西医结合学会儿科专业委员会拟于2013年9月4-6日在杭州萧山召开第十七次全国中西医结合儿科学术会议,届时将邀请知名专家进行中西医结合专题报告和学术交流,现征文如下。

征文内容 (1)中西医结合、中医、西医防治儿童呼吸系统疾病的临床论著、实验研究和专题综述;(2)中西医结合、中医、西医防治儿童常见病的临床、实验研究;(3)临床疑难、重症、少见病例报道;(4)中西医结合理论及方法研究等;(5)对儿科中西医结合工作的建议等。

征文要求 (1)尚未公开发表的论文;(2)稿件应有全文及400~800字摘要;(3)稿件一律采用Microsoft Word文档格式;(4)稿件请注明作者单位、详细通信地址、邮政编码、电话及E-mail等信息;(5)稿件及参会者信息请发至电子信箱:dingxiangnr@yahoo.com.cn;(6)截稿日期:2013年8月10日。

联系人 吴慧芬,电话:18072737877,13867135533;杨惠静,电话:010-63138554,13621146657。