

血府逐瘀胶囊调控 EphB4/EphrinB2 促血管适度生长的实验研究

胡雅琼¹ 张静思² 林 凡¹ 王一铮¹ 高 冬¹ 宋 军²

摘要 **目的** 研究血府逐瘀胶囊适度促血管新生的作用及其对 EphB4/EphrinB2 表达的影响。**方法** 通过检测血府逐瘀胶囊含药血清对人微血管内皮细胞 (human microvascular endothelial cell line 1, HMEC-1) 活性、细胞周期、迁移、黏附和体外成血管的影响,明确药物具有适度促血管新生的作用,并运用实时定量 PCR、Western blot 技术检测药物对 EphB4/EphrinB2 表达的影响。**结果** 血府逐瘀含药血清对内皮细胞活性及 S 期细胞比例均无影响。细胞迁移方面,1.25% 含药血清作用 24、48、72 h 均显著增加细胞迁移能力;但 2.50% 含药血清在最初 24 h 抑制细胞迁移,随后显著促进迁移,与 5.00% 含药血清的影响趋势正好相反。细胞黏附方面,1.25% 含药血清作用 72 h 时显著减少黏附细胞数;2.50% 药物血清在前两个时间段增加细胞黏附数,随后在 72 h 抑制细胞黏附;5% 含药血清在 24 h 表现出抑制作用,而在 48 h 转为促进,随后作用消失。成血管方面,仅 2.50% 含药血清表现出促进作用,而 5.00% 含药血清作用 48 h 和 72 h 均出现抑制现象。2.50% 含药血清组的实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示,药物作用 12 h 上调 EphB4 的表达,作用 24 h 下调 EphB4 表达的同时上调 EphrinB2 的表达。**结论** 仅 2.50% 含药血清作用 48 h 对 HMEC-1 的迁移、黏附和体外成血管均有促进作用,为最佳促血管生长条件,提示血府逐瘀胶囊促血管新生作用具有一定的条件限制,而药物调控 EphB4/EphrinB2 的表达是其重要因素之一。

关键词 血府逐瘀胶囊;血管新生;EphB4;EphrinB2

Moderate Angiogenic Effect of Xuefu Zhuyu Capsule by Regulating EphB4/EphrinB2 HU Ya-qiong¹, ZHANG Jing-si², LIN Fan¹, WANG Yi-zheng¹, GAO Dong¹, and SONG Jun² 1 College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 2 Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700)

ABSTRACT **Objective** To observe moderate angiogenic effect of Xuefu Zhuyu Capsule (XFZYC) on human microvascular endothelial cell line 1 (HMEC-1), and its regulation effect on expression of EphB4/EphrinB2. **Methods** The moderate angiogenic effect of XFZYC was clarified by detecting XFZYC containing serum on cell viability, cell cycle, migration, adhesion and *in vitro* angiogenesis. Its effects on expressions of EphB4/EphrinB2 were detected by Real-time quantitative PCR and Western blot. **Results** XFZYC containing serum (XFZYC-CS) had no effect on the cell viability or cell ratio in phase S endothelial cells. Cell migration was significantly improved by 1.25% XFZYC-CS after 24, 48, and 72 h of action. 2.50% XFZYC-CS inhibited cell migration at the primary 24 h, but it significantly promoted cell migration at 48 and 72 h afterwards. It showed just an opposite tendency to 5.00% XFZYC-CS. Cellular adhesion number was significantly reduced by 1.25% XFZYC-CS at 72 h. Cellular adhesion number was significantly increased by 2.50% XFZYC-CS at 24 and 48 h, but inhibited at 72 h. 5.00% XFZYC-CS showed inhibition at 24 h, but turned to promotion, and disappeared afterwards. In vessel formation aspect, only 2.50% XFZYC-CS showed vessel formation promotion. 5.00% XFZYC-CS showed inhibition on vessel formation at 48 and 72 h. Results of Real-time quantitative PCR and Western blot in 2.50% XFZYC-CS showed EphB4 expression was up-regulated at 12 h; EphB4 expression was down-regulated while EphrinB2 expression

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81171431;No.81102844)

作者单位:1.福建中医药大学中西医结合学院(福州 350122);2.中国中医科学院医学实验中心(北京 100700)

通讯作者:高 冬, Tel:0591-22861151, E-mail:976558160@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0209

was up-regulated at 24 h. Conclusions Only 2.50% XFZYC-CS at 48 h had promotion of migration, adhesion, and *in vitro* angiogenesis of HMEC-1, which was the optimal condition for vessel growth. These results suggested XFZYC promoted angiogenesis in certain conditional limitations. But it regulated the expression of EphB4/EphrinB2, which might be one of important factors.

KEYWORDS Xuefu Zhuyu Capsule; angiogenesis; EphB4; EphrinB2

EphB4 及其配体 EphrinB2 之间独特的双向信号转导功能,以及在血管新生过程中的重要作用,使它们在血管新生领域受到人们的日益关注^[1-6]。本课题组前期的研究结果提示血府逐瘀汤控制血管适度生长的作用与 EphrinB2 有关^[7],因此本实验进一步探讨 EphB4/EphrinB2 与血府逐瘀胶囊调控血管生长的关系。

材料与方法

1 药物 血府逐瘀胶囊由天津宏仁堂药业有限公司生产(药品批号:A03149),主要成分为柴胡、当归、甘草、川芎、牛膝、桔梗、地黄、赤芍、红花、炒桃仁、麸炒枳壳,每粒 0.4 g,成人口服每次 6 粒,每日 2 次。

2 试剂 MCDB-131 细胞培养基(美国 Sigma 公司),胎牛血清 FBS(美国 GIBCO 公司),表皮细胞生长因子(EGF,美国 Peprotech 公司),氢化可的松[生工生物工程(上海)有限公司],0.25%胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),MTT(美国 Sigma 公司),DM-SO(北京索莱宝科技有限公司),*In Vitro* Angiogenesis Assay Kit(美国 Millipore 公司),CycletestTM Plus DNA Reagent Kit(美国 BD 公司),逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(日本 Takara 公司),兔抗人 EphrinB2 抗体(美国 Santa Cruz 公司),兔抗人 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒(均为上海碧云天生物技术有限公司)。

3 仪器设备 酶标仪(Bio-TEK ELx 800,美国宝特公司),流式细胞仪(FACS Calibur,美国 BD 公司),倒置生物显微镜系统(DMILLED,德国 Leica 公司),实时定量 PCR 检测仪(7500 FAST,美国 AB 公司),PAC 电泳仪(PowerPac Basic,美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像分析系统(Universal Hood II,美国 Bio-Rad 公司)。

4 方法

4.1 含药血清制备 随机将健康成年男性志愿者 6 名分为空白组和药物组,每组各 3 名,经知情同意,并获得福建中医药大学附属人民医院伦理委员会通过。空白组不做任何处理,药物组每人每天给予正

常服用剂量 2 倍的血府逐瘀胶囊,连续服用 7 天,在第 8 天给药后 2 h 左臂静脉采血 100 mL,4 ℃ 静置 2 h 后离心,分离出空白血清和含药血清,经 56 ℃ 水浴 30 min 灭活补体,过滤分装后置于 -20 ℃ 冰箱冻存备用。

4.2 细胞培养与分组处理 人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell line 1, HMEC-1)由中科院药物所丁健院士惠赠,采用 MCDB-131 培养液(含 10% FBS, 10 ng/mL EGF, 1 μ g/mL 氢化可的松),于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养。取对数生长期的细胞接种于 96 孔板、6 孔板或直径 10 cm 培养皿,接种密度分别为每孔 3×10^3 个/孔、 20×10^4 个/孔、 50×10^4 个/皿。细胞经同步化后随机分为含药血清组和空白对照组,含药血清组分别以 1.25%、2.50%、5.00% 含药血清干预,空白对照组以等量空白血清处理,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72 h 备用。

4.3 细胞活性检测 96 孔板的细胞培养 24、48、72 h 后,每孔加入 20 μ L、5 mg/mL 浓度的 MTT 溶液,37 ℃ 孵育 4 h 后,弃去培养液,每孔加 150 μ L DMSO,快速振荡 10 min,待蓝紫色结晶充分溶解后,在酶标仪上以 570 nm 为主波长,630 nm 为参比波长,测定各孔的 OD 值。

4.4 细胞周期检测 培养皿中的细胞干预后,弃去培养液,经 0.25% 胰蛋白酶消化,离心收集后,按 Cycle Test Plus DNA Reagent Kit 试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪检测 S 期细胞的比例,以 Cell Quest 软件获取数据,ModiFit Version 3.0 软件分析。

4.5 细胞迁移实验 接种于 6 孔板的各组细胞干预后,用不含胎牛血清的培养液吹打收集细胞,在 Transwell 嵌套小室中加入密度为 20×10^4 个/mL 细胞悬液 100 μ L,Transwell 下室加入 600 μ L 10% FBS 培养液,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中,12 h 后终止迁移,用棉签将嵌套小室聚碳酸酯膜上室面的细胞擦除,保留膜下室面的细胞,固定染色后,于 200 倍倒置显微镜随机取 6 个视野拍照,计数迁移到膜下的细胞数。

4.6 细胞黏附实验 各组细胞干预后,以 0.25%胰蛋白酶消化,用 5% FBS 培养液收集细胞,以 2×10^4 个/mL 的细胞密度,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,去上清液,固定染色后在 100 倍倒置显微镜下随机选取 6 个视野拍照,并计数细胞。

4.7 体外成血管实验 按 *In Vitro Angiogenesis Assay Kit* 试剂盒说明书操作。将干预后的各组细胞按每孔 2.4×10^4 个接种于铺有成血管基质胶的 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,在 200 倍倒置显微镜下随机选取 6 个视野拍照,计数管腔形成数。

4.8 实时定量 PCR 检测 各组细胞干预后,用 Trizol 裂解细胞,提取总 RNA,逆转录获得各组 cDNA;根据实时定量 PCR 试剂盒说明操作,使用美国 AB 公司 7500 PCR 系统,检测各组 EphB4、EphrinB2 和内参基因 β -actin 的 Ct 值,所用引物均由 Takara 公司设计合成(引物序列: β -actin 上游:5'-GAACATCACAGCCAGACCC-3',下游:5'-CAT-CACAATCCCGTAACTCC-3',产物长度 186 bp; EphB4 上游:5'-TCTCCTCAACTGTGCCAAAC-3',下游:5'-CCTTAGCGGGATGATAATGT-3',产物长度 89 bp; EphrinB2 上游:5'-ACGAACTACCT-TCAACTCC-3',下游:5'-CAATGTGCAATCAAAGTCC-3',产物长度 194 bp)。PCR 程序:holding stage:95 $^{\circ}$ C 30 s;cycling stage:95 $^{\circ}$ C 3 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;melt curve stage:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s。

4.9 Western blot 检测 各组细胞干预后,分别提取总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分离浓缩后得到目的蛋白,并转至 PVDF 膜上,封闭后,加入一抗(兔抗人 EphrinB2 多克隆抗体 1:1 000;兔抗人 β -actin 多克隆抗体 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床摇晃过夜,漂洗后,加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,再漂洗,最后按 ECL 试剂盒说明书操作,用凝胶成像分析系统成像,分析蛋白条带灰度值。

4.10 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实时定量 PCR 检测数据分析采用 $\Delta\Delta Ct$ 法, ΔCt 和 $\Delta\Delta Ct$ 通过以下公式进行计算: ΔCt = 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; $\Delta\Delta Ct$ = 含药血清组 ΔCt - 空白血清组 ΔCt 。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算药物组与对照组之间相对应基因的表达差异, $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$ 或 < 0.5 差异为显著水平,其他项目实验数据两组间比较,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组不同时段 HMEC-1 细胞活性检测结果比较(表 1) 在 24、48、72 h 3 个时间点,含药血清组与同血清含量的空白对照组比较,OD 值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两组不同时段 HMEC-1 细胞活性检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	人血清含量 (%)	细胞活性 (OD $\times 10^{-1}$)		
			24 h	48 h	72 h
含药血清	6	1.25	2.40 $\pm$ 0.08	3.68 $\pm$ 0.09	5.43 $\pm$ 0.50
		2.50	2.15 $\pm$ 0.10	3.39 $\pm$ 0.19	6.10 $\pm$ 0.24
		5.00	1.27 $\pm$ 0.06	3.07 $\pm$ 0.37	6.33 $\pm$ 0.85
空白对照	6	1.25	2.17 $\pm$ 0.29	3.64 $\pm$ 0.24	6.13 $\pm$ 0.76
		2.50	2.26 $\pm$ 0.15	3.32 $\pm$ 0.10	6.34 $\pm$ 0.61
		5.00	1.39 $\pm$ 0.17	2.87 $\pm$ 0.20	6.29 $\pm$ 0.41

2 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞增殖的影响比较(表 2) 在 24、48、72 h 3 个时间点,含药血清组与同血清含量的空白对照组比较,S 期细胞所占比例差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞增殖的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	人血清含量 (%)	细胞 S 期比例 (%)		
			24 h	48 h	72 h
含药血清	3	1.25	35.10 $\pm$ 4.33	31.85 $\pm$ 0.90	28.81 $\pm$ 0.58
		2.50	34.65 $\pm$ 5.02	32.22 $\pm$ 3.81	28.28 $\pm$ 0.51
		5.00	38.34 $\pm$ 2.55	33.28 $\pm$ 2.11	28.20 $\pm$ 1.33
空白对照	3	1.25	34.44 $\pm$ 5.12	31.22 $\pm$ 3.08	27.88 $\pm$ 0.53
		2.50	34.18 $\pm$ 3.92	31.35 $\pm$ 2.52	28.90 $\pm$ 0.79
		5.00	37.08 $\pm$ 2.12	30.21 $\pm$ 3.31	28.40 $\pm$ 1.29

3 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞迁移能力的影响比较(表 3) 与同等血清含量的空白对照组比较,1.25%含药血清在 3 个作用时间点上,均明显增加细胞迁移数;2.50%含药血清组,在 24 h,细胞

表 3 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞迁移能力的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	人血清含量 (%)	细胞迁移个数(个)		
			24 h	48 h	72 h
含药血清	6	1.25	18.83 $\pm$ 1.17 *	59.00 $\pm$ 2.90 *	49.83 $\pm$ 2.31 *
		2.50	24.83 $\pm$ 1.17 *	63.33 $\pm$ 4.97 *	47.17 $\pm$ 2.99 *
		5.00	22.83 $\pm$ 1.83 *	26.33 $\pm$ 1.86 *	36.00 $\pm$ 1.67 *
空白对照	6	1.25	13.00 $\pm$ 1.67	29.67 $\pm$ 1.63	18.50 $\pm$ 1.64
		2.50	41.50 $\pm$ 1.64	32.83 $\pm$ 3.06	30.00 $\pm$ 1.41
		5.00	14.83 $\pm$ 1.17	44.00 $\pm$ 2.10	56.67 $\pm$ 4.27

注:与同血清含量的空白对照组同期比较,* $P < 0.01$

迁移数明显减少,在 48、72 h,细胞迁移数均明显增加;5.00% 含药血清组,在 24 h,细胞迁移数明显增加,在 48、72 h,细胞迁移数均明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞黏附能力的影响比较(表 4) 与同血清含量的空白对照组比较,1.25% 含药血清作用 72 h 使细胞黏附数明显减少($P < 0.01$);2.50% 含药血清组在 24、48 h 细胞黏附数均显著增加($P < 0.01$),在 72 h 时差异无统计学意义($P > 0.05$);5.00% 含药血清组细胞黏附数在 24 h 时明显减少($P < 0.01$),至 48 h 时增加($P < 0.05$),72 h 时差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞黏附能力的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	人血清含量(%)	细胞黏附个数(个)		
			24 h	48 h	72 h
含药血清	6	1.25	42.56 $\pm$ 3.83	47.09 $\pm$ 1.69	32.26 $\pm$ 1.47 **
		2.50	50.33 $\pm$ 1.93 **	66.28 $\pm$ 2.20 **	31.27 $\pm$ 3.82
		5.00	29.69 $\pm$ 2.63 **	54.19 $\pm$ 2.01 *	37.64 $\pm$ 5.21
空白对照	6	1.25	37.56 $\pm$ 6.75	46.20 $\pm$ 6.12	52.53 $\pm$ 2.74
		2.50	35.00 $\pm$ 2.40	48.54 $\pm$ 1.25	36.07 $\pm$ 3.52
		5.00	49.39 $\pm$ 3.31	45.17 $\pm$ 2.72	45.36 $\pm$ 2.22

注:与同血清含量的空白对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

5 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞体外成血管作用的影响比较(表 5) 与同血清含量的空白对照组比较,1.25% 含药血清组的血管管腔数在 3 个作用时间点上差异均无统计学意义($P > 0.05$);2.50% 含药血清组的血管管腔数在 48 h 时显著增加;5.00% 含药血清组血管管腔数在 48、72 h 时间点均显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

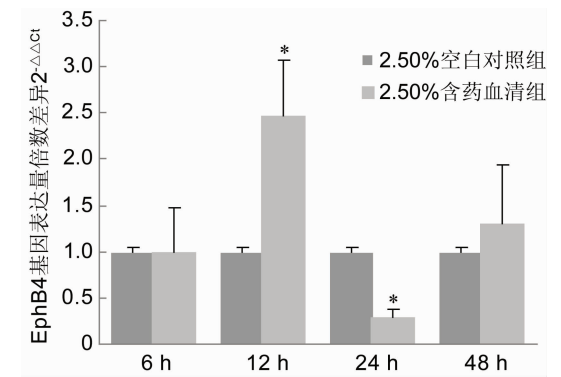
表 5 两组不同浓度血清含量对 HMEC-1 细胞体外成血管作用的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	人血清含量(%)	血管管腔数(个)		
			24 h	48 h	72 h
含药血清	6	1.25	5.17 $\pm$ 0.75	6.50 $\pm$ 2.07	3.83 $\pm$ 0.41
		2.50	7.00 $\pm$ 1.26	7.83 $\pm$ 1.17 *	4.33 $\pm$ 0.82
		5.00	6.83 $\pm$ 0.41	3.33 $\pm$ 0.52 *	2.17 $\pm$ 1.60 *
空白对照	6	1.25	4.33 $\pm$ 1.03	5.17 $\pm$ 1.83	3.50 $\pm$ 0.55
		2.50	7.67 $\pm$ 1.51	5.00 $\pm$ 0.89	5.50 $\pm$ 1.05
		5.00	5.50 $\pm$ 0.55	8.00 $\pm$ 0.89	5.67 $\pm$ 1.03

注:与同血清含量的空白对照组同期比较,* $P < 0.01$

6 两组不同时段 EphB4 /EphrinB2 表达比较(图 1-5) 与 2.50% 空白对照组比较,实时定量 PCR 检测结果显示:用 2.50% 含药血清诱导细胞 12 h 后,EphB4 基因表达上调,干预 24 h 后明显下

调,48 h 时 EphB4 基因表达无变化(图 1);在 6、12、24、48 h,用 2.50% 含药血清诱导细胞,EphrinB2 基因表达未出现明显的上调或下调趋势(图 2)。Western blot 检测结果显示:与 2.50% 空白对照组比较,诱导细胞 12 h 后,含药血清组 EphB4 蛋白表达量明显上调,24 h 显著下调(图 3、5);2.50% 含药血清组 EphrinB2 蛋白表达量在 24 h 显著上调,在 12、48 h 时无明显改变(图 4、5)。



注:与 2.5% 空白对照组比较,*为 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$ 或 < 0.5 ;n=3;图 2 同

图 1 两组 EphB4 基因表达比较

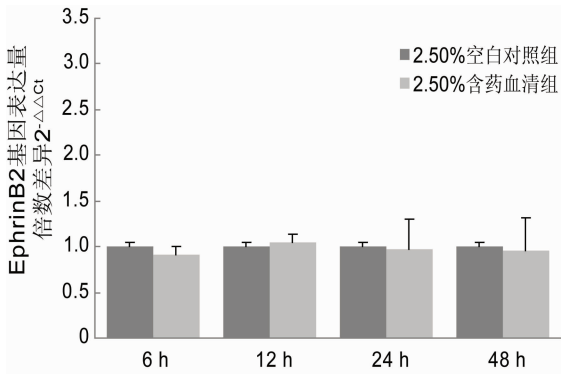
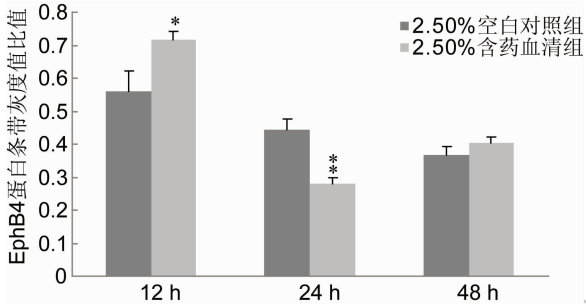


图 2 两组 EphrinB2 基因表达比较



注:与同浓度空白对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;图 4 同

图 3 两组 EphB4 蛋白表达比较

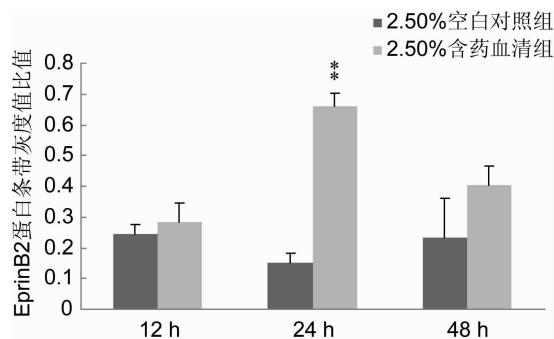
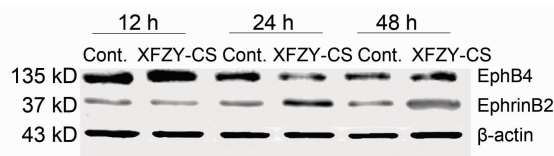


图4 两组 EphrinB2 蛋白表达比较



注:cont.为 2.50%空白对照组;XFZY-CS 为 2.50%含药血清组

图5 两组 HMEC-1 EphB4/EphrinB2 蛋白表达比较

讨 论

目前国内外血管新生研究的细胞模型多数采用大血管如人脐静脉内皮细胞开展的,但是血管新生的过程却是发生在微血管水平,而微血管内皮细胞与大血管内皮细胞之间存在的差异^[8,9],使得在微血管内皮细胞基础上研究血管新生更具有意义。选用 HMEC-1 进行血府逐瘀胶囊促血管新生的研究正是基于上述考虑完成的。

实验结果显示,在血管新生涉及的多个环节,包括迁移、黏附和管腔形成,不同浓度含药血清作用不同时间对各环节的影响不尽相同。1.25%和 5.00%含药血清能够在某些时间点促进细胞迁移或黏附,但两者均未能促进血管管腔的形成,只有 2.50%含药血清作用 48 h 对内皮细胞迁移、黏附和管腔形成均有促进作用。表明 2.50%浓度含药血清诱导细胞 48 h 为促血管新生的最佳药物反应条件,与本课题组前期以 ECV304 内皮细胞为模型的研究结论一致^[7,10]。另外,药物作用时间延长至 72 h,除了两个较低浓度组能够促进细胞迁移外,药物对其他环节的促进作用消失,甚至表现出抑制作用,这种在非缺氧情况下表现出的短暂促血管生长作用与本课题组前期缺氧模型的在体研究结论相符^[11]。因此本课题组认为,血府逐瘀汤促血管新生作用的非持续性,是其适度控制血管生长,避免持续性作用诱发血管源性疾病的重要原因之一^[12-14]。

国外已有文献证实,EphB4/EphrinB2 在血管新生中意义重大,EphrinB2 基因失活会导致小鼠早期发育过程中内皮细胞增殖能力下降,血管芽生变短,血管网的大小和复杂性减弱^[15]。有趣的是,EphB4/EphrinB2 还具有独特的双向信号传导作用,EphB4 与邻近细胞膜表面配体 EphrinB2 结合后,启动下游多条信号途径的效应^[1,2],这种传统模式被称为正向信号。同时配体 EphrinB2 也可以被 EphB4 激活,引发自身残基磷酸化而传导信号^[3,4],与经典途径相反,被称为反向信号。该双向通路显示出对血管新生的双向调节作用。Fuller T 等^[5]研究发现,激活正向信号会产生抗内皮细胞黏附、迁移和抗血管出芽等抑制血管新生的作用;而激活反向信号会产生促内皮细胞黏附、迁移和促血管出芽等促进血管新生的作用。本实验结果显示,2.50%含药血清作用 12 h 上调 EphB4,24 h 下调 EphB4 并上调 EphrinB2,48 h 时药物作用消失。可见血府逐瘀胶囊对 EphB4/EphrinB2 表达的影响并不是持续性的,说明药物短暂促血管新生与 EphB4/EphrinB2 直接相关。由于 EphB4 和 EphrinB2 均属于膜结合型蛋白,是上游信号,其基因表达改变需要一段时间引发一系列信号通路后才能形成相应的细胞效应。因此,我们推测血府逐瘀胶囊在早期(12 h)上调 EphB4 的表达,引发负向信号,促使细胞在 48 h 产生血管生长的生理效应;然后药物在 24 h 时下调 EphB4 并上调 EphrinB2,刺激正向信号的负性作用,使得促血管新生作用消失,以控制血管持续生长。

该推断尚需要进一步的实验证明,且无法说明为何 2.50%药物血清作用到 72 h 仍具有促细胞迁移的正性作用,提示 EphB4/EphrinB2 并不是药物控制血管生长的唯一因素,由于经典复方血府逐瘀汤促血管新生作用呈现多途径、多靶点相互综合的复杂特点^[7,10,16],该正性作用应该是由其他血管新生调控因子的影响造成的。因此,要完整地认识药物适度促血管新生的作用机制,除了进一步明确药物对 EphB4/EphrinB2 双向信号的影响,还需要更加全面地了解其他众多血管新生调控因子在药物促血管新生调控模式中的功效。

参 考 文 献

- [1] Steinle JJ, Meininger CJ, Forough R, et al. EphB4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. J Biol Chem, 2002, 277(46): 43830-43835.

- [2] Kim I, Ryu YS, Kwak HJ, et al. EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells [J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1126–1128.
- [3] Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, et al. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase [J]. Mol Cell, 2002, 9(4): 725–737.
- [4] Su Z, Xu P, Ni F. Single phosphorylation of Tyr304 in the cytoplasmic tail of Ephrin B2 confers high-affinity and bifunctional binding to both the SH2 domain of Grb4 and the PDZ domain of the PDZ-RGS3 protein [J]. Eur J Biochem, 2004, 271(9): 1725–1736.
- [5] Fuller T, Korff T, Kilian A, et al. Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells [J]. J Cell Sci, 2003, 116(12): 2461–2470.
- [6] Hamada K, Oike Y, Ito Y, et al. Distinct roles of Ephrin-B2 forward and EphB4 reverse signaling in endothelial cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(2): 190–197.
- [7] Song J, Chen WY, Wu LY, et al. A microarray analysis of angiogenesis modulation effect of Xue-fu Zhu-yu Decoction on endothelial cells [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(7): 502–506.
- [8] Grau GE, Lou J. TNF in vascular pathology: The importance of platelet endothelium interactions [J]. Res Immunol, 1993, 144(5): 355–363.
- [9] Beekhuizen H, Van Fruth R. Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells [J]. J Vasc Res, 1994, 31(4): 230–239.
- [10] 高冬, 陈文元, 吴立娅, 等. 血府逐瘀汤诱导内皮祖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.
- [11] 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): 224–228.
- [12] Chang E, Yang J, Nagavarapu U. Aging and survival of cutaneous microvasculature [J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(5): 752–758.
- [13] Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(5): 1323–1330.
- [14] Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, et al. Inducible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment [J]. Am J Pathol, 2002, 160(2): 711–719.
- [15] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Nature, 2010, 465(7297): 483–486.
- [16] 高冬, 吴立娅, 焦雨欢, 等. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 104–107.

(收稿: 2015-05-07 修回: 2016-11-23)

《中国中西医结合杂志》获 2015 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号

中国科技信息研究所(简称中信所)2016 年 10 月 21 日公布了最新的中国科技论文统计结果。《中国中西医结合杂志》再次获得 2015 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号。自 2002 年中信所评选此荣誉称号以来,共计十四次评选中,我刊第十三次获得此荣誉称号。同时,我刊继续获评为“中国科技核心期刊”,并有 22 篇文章入选“中国精品科技期刊顶尖学术论文”(F5 000)。