

血府逐瘀汤对人脐静脉内皮细胞一氧化氮适度刺激作用的研究

林 凡¹ 刘林梅² 练祝明² 刘如玉¹ 吴世代¹

(1 福建中医药大学中西医结合学院,福州,350122; 2 福建中医药大学药学院,福州,350122)

摘要 目的:探讨血府逐瘀汤对人脐静脉内皮细胞一氧化氮(Nitric oxide, NO)产生的影响。方法:以人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell-12, HUVEC-12)为材料,采用不同血府逐瘀汤含药血清浓度和干预时间处理 HUVEC-12,检测细胞培养上清液中 NO 浓度的变化。结果:与空白对照组对比,血府逐瘀汤可在一定干预时间段,适度诱导 HUVEC-12 胞外 NO 的产生($P < 0.05$)。结论:血府逐瘀汤可能通过适度刺激人内皮细胞 NO 产生,发挥促进血管新生作用,又避免增生过度的不良反应。

关键词 血府逐瘀汤;人内皮细胞;一氧化氮;适度刺激

Study on Moderate Stimulation Function of Xuefu Zhuyu Decoction on Levels of Nitric Oxide Released from Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Lin Fan¹, Liu Linmei², Lian Zhuming², Liu Ruyu¹, Wu Shidai¹

(1 College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2 College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract **Objective:** To investigate effects of Xuefu Zhuyu Decoction (XFZYD) on levels of Nitric oxide (NO) released from Human Umbilical Vein Endothelial cells. **Methods:** Endothelial cells HUVEC-12 were incubated with blank serum or XFZYD containing serum (XFZYD-CS) at different concentrations and different times. Thereafter, the NO concentrations in the culture supernatant liquid were determined. **Results:** Compared with the control group, XFZYD-CS has a moderate stimulatory effect on NO production of this endothelial cell line in a period of time. **Conclusion:** Xuefu Zhuyu Decoction moderately increases the endothelial NO concentration to promote angiogenesis without causing overgrown blood vessels.

Key Words Xuefu Zhuyu Decoction; Endothelial cell; Nitric oxide; Moderate stimulation

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.11.023

血府逐瘀汤出自清代名医王清任的《医林改错》,由桃红四物汤合四逆散而成。因瘀阻于胸,妨碍肝之疏泄,舒畅肝气有利于祛瘀,故配四逆散。方中牛膝能祛瘀血、通经脉,并有引瘀血下行的作用;桔梗与枳壳相配,一升一降,行气宽胸,有使气行血畅之功。在中医药现代临床上,该方常用于缺血性心脑血管疾病的治疗,如心绞痛、冠心病等^[1]。近年来,血府逐瘀汤对血管新生的促进作用成为该方应用研究的一个新热点^[2-5]。NO 是一个重要的血管新生调控分子,有报道表明血府逐瘀汤可影响内皮细胞 NO 的产生^[6]。但血府逐瘀汤对人内皮细胞产生 NO 的影响是短效行为还是长期效应,这尚无明确研究。本研究旨在探讨血府逐瘀汤影响人内皮细胞产生 NO 的模式,为该药物在血管新生方面的研究提供一定的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物 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。以上药材购于福建省中医药大学国医堂。该方水煎两次,煎液过滤,混合后浓缩至含生药量 1.3 g/mL,4℃ 保存备用。

1.1.2 含药血清制备 根据文献^[7]制备,主要步骤如下:SD 大鼠,6 周龄,体重(200 ± 20)g,SPF 级,雌雄各半,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。适应性喂养 3d 后,随机分为对照组和药物组(血府逐瘀汤组)。药物组按 13 g/kg(相当于 10 倍的人临床用量)剂量灌胃,对照组采用等量生理盐水,每天 2 次,连续灌胃 7 d。末次灌胃 2 h 后,采血并分离血清,灭活补体并过滤除菌后,-70℃ 保存备用。

1.1.3 试剂及设备 胰蛋白酶(Trypsin)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和 DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;一氮化氮检测试剂盒(S0021)购自碧云天生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯;IX70 倒置相差显微镜及数码摄像装置为 OLYMPUS 公司产品,二氧化碳培养箱产于 Heraeus 公司,ELX800

全自动酶标仪为 BioTek 公司产品,细胞培养瓶、培养板购于 Corning 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVEC-12 的培养 HUVEC-12 细胞株由本实验室保存,培养。采用 DMEM 高糖培养液(含 10% FBS),置于 5% CO₂ 37℃ 培养箱中培养。

1.2.2 细胞分泌 NO 浓度的检测 将对数生长期的 HUVEC-12 以 2×10^5 个/mL 的密度接种于细胞培养 6 孔板。同步化处理后,随机分组,分别用含有不同浓度的含药血清或空白对照血清干预。到达干预培养时间时,收集各组培养上清液,按照试剂盒说明书所述方法进行测定。

1.3 统计分析 利用 SPSS 11.5 软件对实验所得数据作 Duncan(Duncan's multiple range test)多重检验。

2 实验结果

2.1 血府逐瘀汤含药血清对 HUVEC-12 产生 NO 的刺激作用 与相应浓度的空白对照组相比较,不同浓度(1.25%,2.5%和 5%)含药血清干预 24 h 均刺激内皮细胞 NO 的分泌($P < 0.01$)。其中,2.5%含药血清干预效果最为明显,见表 1。这一结果提示,血府逐瘀汤含药血清对内皮细胞 NO 的产生具有刺激作用,这种刺激作用存在最适药物作用浓度。

表 1 不同浓度(%)血府逐瘀汤含药血清对 HUVEC-12 分泌 NO 的刺激作用($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清浓度/%	胞外 NO 浓度/($\mu\text{mol/L}$)
血府逐瘀汤	4	1.25	$16.52 \pm 2.35^{**}$
含药血清组	4	2.5	$22.64 \pm 6.31^{**}$
	4	5	$14.17 \pm 2.01^{**}$
空白对照组	4	1.25	5.34 ± 0.07
	4	2.5	5.31 ± 0.83
	4	5	5.64 ± 0.51

注:与空白对照组相同血清浓度比较,** $P < 0.01$ 。

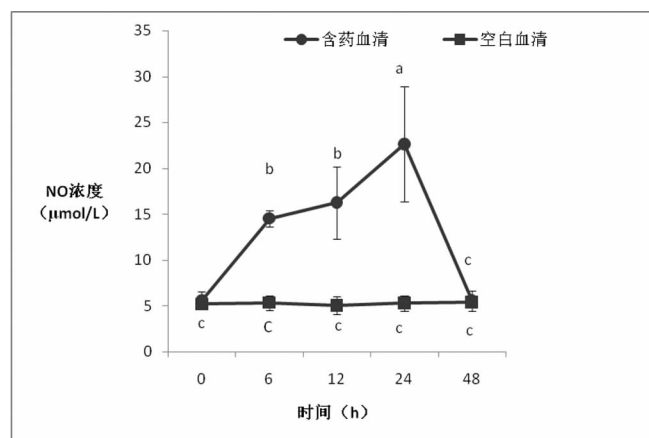


图 1 2.5% 血府逐瘀汤含药血清干预时间对 HUVEC-12 产生 NO 的影响

注:图中字母不同者表示 $P < 0.05$; $n = 4$ 。

2.2 血府逐瘀汤含药血清干预时间对 HUVEC-12 产生 NO 的影响 2.5% 的空白对照血清干预 48 h 内,细胞分泌的 NO 含量无显著变化。而 2.5% 含药血清处理能引起内皮细胞胞外 NO 浓度的显著上升,此刺激作用是一个温和、短期效应。具体而言,2.5% 含药血清可诱导细胞 NO 产生,在干预 6 h 后,细胞培养上清液中的可检测 NO 浓度有显著上升($P < 0.05$),24 h 时达到高峰,随即开始下降,48 h 时药物诱导效应消失,如图 1 所示。

3 讨论

NO 主要是由细胞内一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)催化底物 L-精氨酸形成的一种气体信号分子。在血管内皮细胞中,内皮型一氧化氮合酶(endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS)被证明参与调节内皮细胞迁移与血管生成^[8]。本研究表明,含药血清(1.25%,2.5%和 5%)处理人脐静脉内皮细胞(24 h),能显著刺激 NO 的产生。这同其他研究者的报道相吻合^[6]。这一结果表明,血府逐瘀汤促血管新生的效果可能与激活内皮细胞 eNOS 产生 NO 有关。一系列研究表明,NO 调节血管新生的作用与血管内皮生长因子(Vascular Endothelial growth Factor, VEGF)信号途径密切相关。VEGF 作用于其受体 VEGFR-2 后,通过 PI3K/Akt-PKB^[9]或 PKA 途径^[10-11],改变 eNOS 磷酸化水平^[12],调节 eNOS 活性,刺激内皮细胞 NO 的产生。另一方面,内皮调节型一氧化氮合酶(inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)也可受缺氧等条件诱导,参与 VEGF 的表达调控^[13]。NO 还可通过诱导内皮细胞表面的血管舒张来调节血管生成因子的作用,使内皮细胞层在血管生成因子或促细胞迁移因子的作用下呈现出正常的响应,调节血管生成^[14]。有报道证实 VEGF 持续的促血管新生作用会加快动脉粥样硬化^[15-17],增加肿瘤形成和转移的风险,提高其他血管生成源性疾病的风险^[18-19]。而血府逐瘀汤在临床实践中则未有相关不良反应的报道。这提示血府逐瘀汤在诱导血管新生的过程中,不是单纯、持续式刺激 NO 产生,可能存在较为复杂的模式,具体行为必需描述明确。

本研究结果表明,血府逐瘀汤对血管内皮细胞 NO 产生的诱导作用是一种温和、短期的模式。具体而言,在含药血清干预一段时间后促进内皮细胞 NO 的产生,刺激效应在 24 h 后开始下降,48 h 时回复至空白对照组水平。血府逐瘀汤对内皮细胞 NO 产生的适度刺激效应,可能使其在促进血管新生的同时,避免了血管过度增生。这可能是其没有西药治疗所产生的不良

反应的因素之一。

参考文献

- [1] 董文尧, 李先强. 血府逐瘀汤的现代研究及临床应用[J]. 中西医结合研究, 2011, 3(1): 34-35.
- [2] 陈文元, 吴立娅, 陈岩, 等. 中药影响血管新生作用机制研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(3): 237-239.
- [3] 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.
- [4] 高冬, 陈文元, 林薇, 等. 血府逐瘀汤促血管新生中 VEGF 通路的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2622-2625.
- [5] 张秋雁, 王权礼, 李雅, 等. 超微血府逐瘀汤对急性心肌缺血大鼠血管新生及 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 中医药导报, 2011, 29(5): 82-84.
- [6] 高冬, 陈文元, 吴立娅, 等. 血府逐瘀汤诱导内皮细胞血管新生中一氧化氮的作用[J]. 中医杂志, 2011, 52(21): 1852-1855.
- [7] 林凡, 练祝明, 刘林海, 等. 血府逐瘀汤干预时间对人内皮细胞分泌 VEGF 影响的研究[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(2): 30-31.
- [8] Fraisl P. Crosstalk between oxygen- and nitric oxide-dependent signaling pathways in angiogenesis[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(9): 1331-1339.
- [9] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis[J]. Circ Res, 2007, 100(6): 782-794.
- [10] Shyamal C, Bir, Yan Xiong, Christopher g, Kevil, et al. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(1): 7-18.
- [11] Kolluru gK, Sinha S, Majumde S, et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis[J]. Nitric Oxide, 2012, 22(4): 304-315.

- [12] Gentile C, Muise - Helmericks RC, Drake CJ. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation[J]. Dev Biol, 2013, 373(1): 163-175.
- [13] Branco - Price N, Zhang M, Schnelle C, et al. Endothelial cell HIF-1alpha and HIF-2alpha differentially regulate metastatic success[J]. Cancer Cell, 2012, 21(1): 52-65.
- [14] Shibuya M. Vascular Endothelial growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies[J]. Genes Cancer, 2011, 2(12): 1097-1105.
- [15] Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T, et al. Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis[J]. Circulation, 2004, 109(23): 2826-2831.
- [16] Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression[J]. Nat Med, 2001, 7: 425-429.
- [17] Zhang J, Razavian M, Tavakoli, et al. Molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptors in graft arteriosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012, 32(8): 1849-1855.
- [18] 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.
- [19] Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, et al. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease[J]. Ophthalmology, 2013, 120(1): 106-114.

(2013-03-12 收稿)

(上接第 1331 页)

能托毒, 疗久溃, 止痛。报道, 蜂房提取物在体外对多种肿瘤细胞存在抗增殖活性, 其可以通过降低 Bcl-2 蛋白细胞内表达, 诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞。但是蜂房提取物在高浓度下对造血干细胞具有毒性作用, 低浓度确促进正常造血干细胞的增殖。^[11]

炮山甲为鲛鲤科鲛鲤属动物鲛鲤的鳞片。经过锅内砂子武火炒热, 拌炒至鼓起并呈金黄色而成。咸, 微寒。归肝、胃经。《本草纲目》: 通经络。下乳汁, 消痈肿, 排脓血。《本草再新》: 解热败毒。炮山甲抗肿瘤作用的现代研究较少, 多为临床经验报道。

在本研究中, 紫杉醇组设置为阳性对照, 具有较好的抑瘤率, 但是进行统计发现, 与空白对照组相比较, 差异无统计学意义。考虑为样本量尚偏小所导致。单纯从抑瘤率角度进行分析, 可以看到, 具有炮山甲的药组与除炮山甲外其余药物均相同的药物组, 其抑瘤作用均为明显。炮山甲是否能够作为抗肿瘤生长中药复方中的增效单味药, 值得继续深入研究。结合现有文献报道, 对于益气活血药单味中药抗肿瘤作用的研究, 如黄芪、苏木等, 具有学者发现剂量依赖等关系。因此, 对于

益气活血药物复方组合是否具有剂量依赖的抗肿瘤作用, 仍然需要做大量的工作。

参考文献

- [1] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 511.
- [2] 王笑民, 郁仁存, 王禹堂. 晚期非小细胞肺癌患者气虚血瘀证的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(12): 724-726.
- [3] 徐咏梅, 郁仁存. 益气活血法治疗肿瘤经验[J]. 中医杂志, 2010, 51(6): 110-111.
- [4] 李东涛, 吴志奎, 孙桂芝等. 益气、活血软坚、解毒法对荷瘤小鼠肿瘤生长抑制的实验研究[J]. 江苏中医药, 2010, 42(4): 74-75.
- [5] 郝钰, 徐泊文, 王伊光等. 益气活血解毒方体内外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(10): 632-634.
- [6] 李萍萍, 吕桂芝, 孙红等. 益气活血中药复方对肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 113-115.
- [7] 任美萍, 刘明华, 李蓉, 等. 黄芪多糖抗肿瘤活性研究[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(3): 221-224.
- [8] 张喜林, 李文虎, 李路勇, 等. 黄芪总提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国现代药物运用, 2010, 4(4): 29-31.
- [9] 陈坤, 高献书, 卢付河, 等. 黄芪、参芪促肿瘤生长作用的观察[J]. 河北医科大学学报, 2004, 25(1): 33-34.
- [10] 徐建华, 郭素堂, 乔丽娟, 等. 苏木提取液抑制肿瘤作用的研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 11(8): 726-727.
- [11] 张坤, 魏金荣, 关一夫. 蜂房提取物中抗肿瘤成分的活性研究[J]. 中医杂志, 2010, 51(S2): 246-248.

(2013-10-30 收稿)