

凉血活血中药含药血清对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

马 珊¹⁾, 马 俊²⁾, 彭 华¹⁾, 王明芳³⁾, 代自超⁴⁾

- (1) 云南中医学院第一附属医院眼科, 云南昆明 650032; 2) 红河卫生职业学院, 云南红河 661100;
3) 成都中医药大学附属医院眼科, 四川成都 610072; 4) 昆明医科大学口腔学院, 云南昆明
650031)

[摘要] **目的** 以血清药理学方法观察凉血活血中药对人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 增殖的影响, 从体外实验角度研究, 为临床对新生血管类眼病的治疗寻找相应的干预靶点. **方法** 设立空白血清组对照应用 MTT 法检测不同浓度的凉血活血含药血清对血管内皮细胞 ECV304 细胞毒性考察及增殖影响, 并检测 VEGF 含量的变化. **结果** 20%浓度凉血活血含药血清组既可抑制细胞增殖又对细胞无毒性作用. **结论** 凉血活血中药抑制血管新生可能与其通过抑制 ECV304 细胞增殖及降低 VEGF 的表达有关.

[关键词] 凉血活血; ECV304; 新生血管; VEGF

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 11 - 0038 - 04

The Effect of Medicated Serum with Liangxuehuoxue Traditional Chinese Medicines on the Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

MA Shan¹⁾, MA Jun²⁾, PENG Hua¹⁾, WANG Ming - fang⁴⁾, DAI Zi - chao⁴⁾

- (1) Dept. of Ophthalmology, The 1st Affiliated Hospital of Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan; 2) Honghe Health Occupation School, Honghe Yunnan; 3) Dept. of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Chengdu university of TCM, Chengdu Sichuan; 4) School of Stomotology, Kuming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effect liangxuehuoxue traditional Chinese medicines on the supression of ECV304 by serum pharmacological method, and to explore the interventional target for treatment of neovessels related eye diseases. **Methods** ECV304cells were cultured with medicated serum with different concentrations of liangxuehuoxue medicines. The proliferation rate of endothelial cells was assayed with MTT methods, the level of VEGF was tested. **Result** Medicated serum with liangxuehuoxue medicines at concentration of 20% could inhibit the proliferation of ECV304 cells and the expression of VEGF. **Conclusion** Liangxuehuoxue traditional Chinese medicines inhibit the ECV304 cells proliferation and the expression of VEGF, and this may be related to inhibition of neo vessels.

[Key words] Liangxuehuoxue; ECV304; Neovessels; VEGF

新生血管性眼病包括有年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、病理性近视、糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变等. 新生血管 (neovessels, NV) 因其发

育不完全, 管壁薄而脆, 易渗漏, 最终形成出血、渗出、增殖等病理改变而导致视力的丧失, 是一类主要的致盲性眼病. 目前尚没有一种较为满意的治疗方法. 内皮细胞 (endothelial cell, EC) 在 NV

[基金项目] 云南省科技厅基金资助项目 (2011FZ257)

[作者简介] 马珊 (1979~), 女, 云南建水县人, 医学博士, 副教授, 主要从事中医药对眼底病的研究工作.

[通讯作者] 王明芳. E-mail:mashanyn@126.com

发生、形成过程中发挥着重要的作用^[1]。本实验选用 ECV304 人脐静脉内皮细胞株作为体外研究对象, 从“热、瘀”认识 NV, 采用凉血活血含药血清对 ECV304 干预, 探讨凉血活血中药抑制新生血管生成的作用及机制, 为临床眼新生血管性疾病的治疗提供理论依据和治疗途径。

1 实验仪器及试剂

1.1 实验仪器

MillQ 型超纯水系统 (Millipore 公司); Herzeusvarifuge3.0RS 型离心机: (Kendro 公司); MCO-15 型 CO₂ 培养箱 (Sanyo); MDF-382E 型低温冰箱 (Sanyo 公司); HBO-50 型倒置相差显微镜 (OLYMPUS); DP12 型显微镜数码相机系统 (OLYMPUS); SW-CJ-1F 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); FA1104 分析天平 (上海天平仪器厂); 电热恒温干燥箱 (湖北黄石市医疗器械厂); 细胞培养瓶及培养板离心管 (Corning 公司); BIO-RAD 型酶标仪 (Bio-Rad 公司); 微量取液器 (德国 eppendorf); 电热恒温水箱 (北京长源实验设备厂)。

1.2 主要试剂及其配置

RPMI-1640 培养液 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (民海生物公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); PBS (北京中杉公司); 兔抗人 VIII 因子抗体 (晶美公司分装); DMSO (Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 血管内皮细胞 ECV304 的复苏、培养、传代、鉴定

人脐静脉内皮细胞株 (human umbilical vein endothelial cell, ECV304) 由四川大学华西医学中心基础医学院免疫学教研室提供。将 ECV304 细胞的冻存液在 37 °C 水浴锅内快速融化, 1 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀细胞用培养液重悬并轻轻吹打混匀, 形成细胞悬液, 而后接种于培养瓶中, 置入恒温 CO₂ 培养箱 (5% CO₂, 37 °C) 孵育。第 2 天换液, 以后每 2~3 d 换液 1 次。待细胞长至融合状态时, 细胞用 PBS 清洗两遍, 然后加入 0.25% 胰蛋白酶 1~2 mL, 在倒置显微镜下观察, 待细胞间隙增大, 立即将胰蛋白酶吸去, 加入培养液终止消化, 用弯头吸管反复吹打瓶壁细胞, 使大部分细胞脱落形成细胞悬液, 倒置显微镜下计数, 以 1.0×10^5 /mL 密度接种于新的培养瓶, 恒温培养箱培养。在 6 孔培养板内放置无菌盖玻片 (0.8 cm × 0.8 cm), 明胶铺板, 每孔种植浓度为 1

$\times 10^5$ 个 /mL 的 ECV304 (第 3 代) 悬液 2 mL。待细胞生长至近融合状态时, 取出盖玻片, PBS 冲洗, 多聚甲醛固定, H₂O₂ 的甲醇溶液作用 10 min, 封闭液 37 °C 封闭 4 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 同时以不加一抗作阴性对照; 二抗 37 °C 孵育 30 min, 显色剂显色, 苏木素复染, 封片, 观察摄片。

1.3.2 含药血清的制备及分组

Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只, 体重 170~190 g, 雌雄各半, 由成都中医药大学动物实验中心提供。符合国家医用动物使用标准, 清洁级。随机分为含药血清组、空白血清对照组。实验前动物在标准实验动物房适应喂养 1 周, 自由饮食饮水。给药剂量^[2]为 2 mL/200 g (为人临床剂量的 10 倍, 相当于原生药的 13.7 g/(kg·d) 空白对照组给予等容蒸馏水。每日灌胃 2 次, 连续 3 d。灌药前禁食不禁水 12 h, 在末次给药后 1 h, 腹主动脉采血, 采集的血液 4 °C 静置 24 h, 离心 3 000 r/min 10 min, 分离血清; 56 °C、30 min 灭活, 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌分装, -20 °C 保存备用。

细胞实验分为 3 组: 各浓度组设 6 个复孔, 加药组分别加入倍比稀释后终浓度不同的凉血活血药物的含药血清。组 1: 含 20% 胎牛血清 RPMI-1640 液的正常对照组; 组 2: 含不同浓度大鼠血清的 RPMI-1640 液的空白对照组 (分设 5 个浓度: 血清体积含量为总培养体系的 40%、20%、10%、5%、2.5%); 组 3: 含不同浓度凉血活血药物血清的 RPMI-1640 液的含药血清组 (分设 5 个浓度: 血清体积含量为总培养体系的 40%、20%、10%、5%、2.5%)。

1.3.3 MTT 检测细胞活力

将培养至第 3 代的 ECV304 细胞消化吹打, 形成单细胞悬液, 倒置显微镜下计数, 接种于 96 孔板上, 200 μL/孔。每孔细胞数约 1×10^5 , 用含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养, 至细胞融合成单层后, 吸去原有培养液, 用无血清培养液同步化培养 12 h 后, 随机进行实验分组, 作用 24 h 后, 按不同浓度分组给药, 每组设 6 个复孔, 作用 24 h 后, 每孔加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h 后, 小心吸弃培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 间歇轻度震荡 8~10 min 使结晶充分溶解后, 于全自动酶标仪按参比波长 490 nm 测各孔吸光度 (A) 值 [旧称光密度值 (OD)], 记录数据进行处理。A 值与活细胞成正比。

$$\text{细胞增殖抑制率 } I = \frac{A_{\text{正常对照}} - A_{\text{实验}}}{A_{\text{正常对照}}}$$

1.3.4 对细胞上清液中 VEGF 含量的测定

采用

酶联免疫吸附法检测 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 具体步骤照说明书进行, 用酶标仪在参比波长 490 nm 下测定吸光度值, 建立校正曲线, 计算出各组上清液中 VEGF 水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理。多组间计量资料比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 多组间两两比较采用 q 检验 (S-N-K 法) 以及 LSD (方差齐) 或 Tamhane (方差不齐)。数据采用均数 \pm 标准 ($\bar{x} \pm s$) 差表示。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

倒置相差显微镜下见细胞呈梭形或圆形上皮样贴壁生长 (见图 1); HE 染色可见细胞为菱形或扁平多角形, 胞浆丰富, 核呈圆形或椭圆形 (见图 2); 免疫细胞化学染色结果显示细胞胞质中有棕黄色颗粒 (见图 3)



图 1 倒置相差显微镜下 ($\times 200$)

Fig. 1 Morphology under inverted phase contrast microscope ($\times 200$)

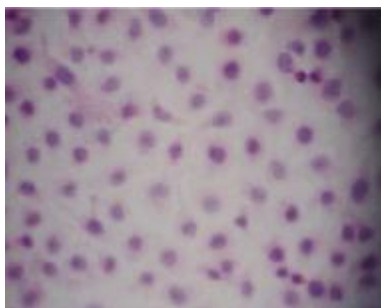


图 2 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 2 HE staining ($\times 200$)

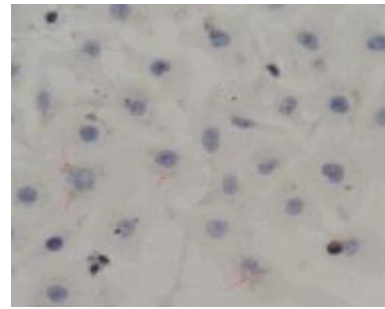


图 3 免疫细胞化学染色 ($\times 200$)

Fig. 3 Immunocytochemistic staining ($\times 200$)

2.5% ~ 20% 凉血活血含药血清干预 ECV304 细胞 24 h 后, 细胞的形态未见明显改变 (细胞未见脱壁及悬浮), 视野内仅见细胞数目减少, 间隙增大, 分布稀疏, 增殖减慢。40% 含药血清组可见细胞变圆, 中央扁平。5% ~ 20% 空白血清组随浓度增大, 细胞的形态未见明显改变, 视野内细胞数目增多, 增殖良好。2.5%、40% 浓度组细胞形状变细、数目减少。

2.2 凉血活血含药血清对细胞毒性考察及增殖影响

实验结果 (见表 1) 可见凉血活血含药血清组随浓度的增加 A 值降低, 10% ~ 40% 与正常对照组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示凉血活血含药血清对细胞增殖有抑制作用。2.5% ~ 10% 含药血清组与相应空白对照比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。由此可见 20% 浓度凉血活血含药血清组既可抑制细胞增殖又对细胞无毒性作用。

表 1 不同浓度含药血清作用 ECV304 细胞 MTT 结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The MTT results of ECV304 cells treated by medicated serum with different concentrations ($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 I (%)
正常对照组	0.2523 \pm 0.0070	-
2.5% 空白对照组	0.2283 \pm 0.0193 [▲]	9.52
5% 空白对照组	0.2358 \pm 0.0181	6.54
10% 空白对照组	0.2363 \pm 0.0334	6.34
20% 空白对照组	0.2420 \pm 0.0154	9.04
40% 空白对照组	0.1897 \pm 0.0145 ^{▲▲}	24.81
2.5% 含药血清组	0.2352 \pm 0.0061	6.78
5% 含药血清组	0.2337 \pm 0.0116 ^{▲▲}	7.37
10% 含药血清组	0.2277 \pm 0.0102 ^{▲▲△△}	9.75
20% 含药血清组	0.1647 \pm 0.0124 ^{▲▲△△}	34.72
40% 含药血清组	0.1467 \pm 0.0118	41.85

与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与相应空白对照比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

实验结果, 凉血活血含药血清组随浓度的增加 VEGF 的含量降低. 10% ~ 40% 与正常对照组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示凉血活血含药血清组可降低 VEGF 的含量, 见表 2.

表 2 细胞上清液中 VEGF 的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The levels of VEGF in supernatants of cell culture ($\bar{x} \pm s$)

组 别	VEGF (pg/mL)
正常对照组	128.938 ± 12.821
2.5%空白对照组	91.481 ± 6.771 ^{▲▲}
5%空白对照组	97.398 ± 6.229 ^{▲▲}
10%空白对照组	107.098 ± 11.528 ^{▲▲}
20%空白对照组	115.029 ± 10.921 [▲]
40%空白对照组	72.325 ± 7.447 ^{▲▲}
2.5%含药血清组	102.157 ± 10.257 ^{▲▲▲}
5%含药血清组	99.289 ± 8.293 ^{▲▲}
10%含药血清组	97.581 ± 9.151 ^{▲▲}
20%含药血清组	77.877 ± 7.879 ^{▲▲▲}
40%含药血清组	58.782 ± 6.839 ^{▲▲▲}

与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与相应空白对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$.

3 讨论

眼部新生血管形成是眼科临床常见的致盲率很高的眼部并发症, 其发病机制复杂、治疗困难成为眼科研究热点. 血管内皮细胞是覆盖在血管内表面的单层细胞, EC 的增殖是血管生成过程中的关键环节之一^[3]. 血管内皮细胞目前已成为研究血管新生的理想细胞模型^[4], 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 具有的内皮细胞的特征, 稳定的贴近人体生理条件^[5]. 因此, 本实验选用该细胞株作为体外研究对象. 临床发现新生血管多发生于出血性眼病的中、后期, 从祖国医学理论认识 NV, 体现了“久病多瘀”、“瘀久化热”等理论, 新生血管出血的特点是: 反复、急剧, 结合眼科血证中出血的病因病机, 认识新生血管出血的病因为虚火灼络, 瘀血阻滞. 因此治疗原则宜凉血活血, 既可清虚火, 散瘀血, 又防止其反复出血. 实验用凉血活血药物为导师王明芳教授临床常用凉血活血药物牡丹皮、赤芍药、白茅根、紫草等. 用含药血清可进行细胞培养, 有利于从细胞分子水平阐明中药作用机制. 中药血清药理学方法^[6]排除了中药制剂杂质成分、不同酸碱度、电解质等的影响, 克服了中药粗制剂直接加入反应体系所带来的干扰, 可以真实地反映体内血药浓度及变化, 反映

药物的整体作用, 提高中药药效实验的可信度; 需要确定最佳给药剂量、给药方法、采血时间、采血方式和血清处理方法, 血清量及种属同源性等进行研究^[7,8]. 此外, 空白血清本身具有一定的生物活性, 如果没有对照, 就可能使实验结果出现假阳性或假阴性, 因此在中药血清药理学研究中, 应进行常规制备正常血清及含药血清的细胞毒实验, 以确定适当的给药血清浓度, 尽量减少血清本身带给实验的影响.

本实验结果显示 5% ~ 20% 浓度空白组大鼠血清有促细胞生长作用, 提示大鼠血清基本能够维持细胞的生长需要, 但较胎牛血清作用偏弱. 当空白对照组大鼠血清浓度达到及超过 40% 时, 对细胞具有一定的毒性作用, 形态学上可见的细胞损伤. 所以大鼠血清对细胞的促增殖作用不呈现剂量依赖关系. 凉血活血含药血清组随浓度的增加 A 值降低, 提示凉血活血含药血清对细胞增殖有抑制作用. 2.5% ~ 10% 含药血清组与相应空白对照比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 20% 浓度凉血活血含药血清组既可抑制细胞增殖又对细胞无毒性作用, 可见凉血活血中药抑制血管新生可能与其通过抑制 ECV304 细胞增殖有关.

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 又被称作血管渗透因子 (vascular permeability factor, VPF). 其主要生物学功能有促进内皮细胞增殖. VEGF 是一种血管内皮细胞的特异性有丝分裂原, 在体外培养中可促进内皮细胞生长, 在体内可诱导血管生长. VEGF 在肝素作用下与其受体结合, 诱导受体自身磷酸化, 激活丝裂原活化的 MAPK, 实现 VEGF 的丝裂原特性, 诱导内皮细胞增殖; 增加血管渗透性, 改变细胞外基质, 促进血管生成, 其所具有的血管渗透性比组胺作用还要强 5 万倍. VEGF 的这种作用可能和调节内皮细胞小囊泡器之间窗口开启有关, 并且凝血酶和组胺的抑制剂对它的作用没有影响. VEGF 使血管内皮细胞通透性增加, 同时导致血浆蛋白溢出, 进入细胞外基质, 纤维蛋白成分在血管外凝结, 形成促进血管生成的新的良好基质环境, 支持细胞迁移, 为进一步的血管新生奠定基础. 以上作用有利于血管新生^[9].

实验结果可见随凉血活血含药血清浓度的增加 VEGF 含量下降, 表明凉血活血含药血清可降低 VEGF 表达, 2.5%、20%、40% 浓度组与相应空白对照组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 结合上一实验结果, 可见 20% 凉血活血含药血清可降低

(下转第 52 页)

学意义 ($P < 0.05$) 结论还有待扩大样本量进行进一步的研究。

HBV 感染的疾病谱和自然史是多样和多变的, 这种复杂多变也为临床上的慢性乙型肝炎患者的治疗带来了一定的困难。在对慢性乙型肝炎患者所感染的乙型肝炎病毒基因型与干扰素治疗疗效之间关系的探究中, 要注意控制其他变量。诸如所选取患者的年龄, 台州市立医院感染科有研究^[9]表明年龄因素是慢性乙型肝炎患者疾病的独立预测因素。对于年龄 > 30 岁的慢性乙型肝炎患者进行肝穿活检对明确肝脏病变程度、指导临床治疗具有重要意义。对慢性乙肝患者进行乙肝病毒基因型测定, 根据 HBV 基因型与干扰素治疗效果之间的关系, 选择契合患者病情实际的治疗方案, 这对慢性乙型肝炎患者治疗效果的提升是大有裨益的。综上所述, HBV DNA 既是 IFN 疗效的判定指标, 又是良好的疗效预测因素, 能从本质上反应患者的感染状态及治疗反应。

[参考文献]

- [1] 刘俊人, 高嘉宏. 乙型肝炎病毒基因型流行病学和临床意义[J]. 肝脏杂志, 2006, 11(1): 39-42.
- [2] 赵鸿, 李俊, 李兴丰, 等. 感染乙肝病毒不同基因型亚型患者的临床特点分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(1): 74-77.
- [3] 周友乾, 尹凤鸣, 冯经华. 干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效的预测分析 [J]. 华南国防医学杂志, 2007, 21(1): 20-22.
- [4] 何卫平, 胡瑾华, 王慧芬. 慢性乙型肝炎病毒基因型与临床病理相关性分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(2): 116-118.
- [5] 汪莉萍, 陈明, 封波, 等. 慢性乙型肝炎病毒基因型与血清病毒载量的关系[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(2): 81-83.
- [6] 谢红东, 于盈, 金茜, 等. 慢性乙型肝炎患者临床病理与年龄的关系研究[J]. 中国医师杂志, 2010, 12(12): 1639-1642.

(2012-08-04 收稿)

(上接第 41 页)

VEGF 的表达。

研究结果提示凉血活血药物可作为潜在的早期干预新生血管及其相关疾病的研究靶点, 但其具体作用机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] CASEY R, LI W W. Factors controlling ocular angiogenesis[J]. Am Ophthalmol, 1997, 124(4): 521-529.
- [2] 叶勇, 张雯娟, 雍雪莲, 等. MTT法检测化痰活血方含药血清对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 江汉大学学报, 2006, 6(2): 69.
- [3] 田牛. 微血管生成和血管退化[J]. 微循环学杂志, 2000, 10(3): 1-5.
- [4] GERBER H P, CONDLORELLI F, PARK T, et al. Differential transcription regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes, Fit-1, but not Fit-1/KDR is up-regulated by hypoxia [J]. J Biol Chem, 1997, 272(38): 23659-23667.

lial growth factor receptor genes, Fit-1, but not Fit-1/KDR is up-regulated by hypoxia [J]. J Biol Chem, 1997, 272(38): 23659-23667.

- [5] 吴其夏, 邱劲. ECV30细胞可作为一般模型、工具或靶用于生物医学和药学研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 139-142.
- [6] 田代真一. “血清药理学”と“血清药化学”—汉方の药理学方かじ 药物血中浓度测定の新しい协世界 [J]. TDM 研究, 1988, (5): 54.
- [7] 刘平, 王宁生, 雷燕, 等. 关于血清药理学的若干思考 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 10(5): 263-266.
- [8] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 2(10): 95-98.
- [9] 何庆源, 陈诗书. 血管内皮生长因子与血管生成 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1997, 19(5): 236-239.

(2012-06-21 收稿)