文章编号:1000-5404(2007)02-0121-04

论著

三棱、莪术含药血清对培养的人脐静脉血管内皮细胞生长和VEGF表达的影响

叶 兰[1],徐晓玉[2],李荣亨[3],何正光[4],陈 刚[5] ([1]贵阳医学院药理学教研室,贵州 550004;[2]西南大学药学与中医药学院,重庆 400075;重庆医科大学:[3]附属第一医院中医科,[4]药学院,重庆 400016;[5]重庆工商大学药物化学与化学生物学研究中心,重庆 400067)

提 要:目的 探讨三棱、莪术含药血清对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的血管内皮细胞增殖和VEGF表达影响。**方法** 以三棱、莪术含药血清作用于VEGF诱导的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell-1, HUVEC-1),倒置相差显微镜观察细胞形态学改变,MTT法观察细胞增殖情况,Western blot和RT-PCR方法分别检测内皮细胞VEGF蛋白和mRNA的表达。**结果** 三棱、莪术5.0 g·kg^{-1}·d^{-1}、2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}大鼠含药血清可使正常人脐静脉血管内皮细胞排列紊乱,明显梭形化。5.0 g·kg^{-1}·d^{-1}大鼠10%、5%、2.5%含药血清组和2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}大鼠10%含药血清组HUVEC-1细胞的增殖显著低于空白血清相同浓度组($P<0.05$)。5.0 g·kg^{-1}·d^{-1}、2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}大鼠5%的含药血清使HUVEC-1细胞VEGF蛋白、VEGF mRNA表达均显著降低。**结论** 三棱、莪术含药血清可抑制VEGF诱导的血管内皮细胞增殖,其机制与抑制血管内皮生长因子表达密切相关。

关键词: 三棱;莪术;含药血清;人脐静脉血管内皮细胞;VEGF
中图法分类号: R285.5;R322.123;R392.11 **文献标识码:** A

Effect of medicated serum of Sangleng and Eshu on human umbilical vein vascular endothelial growth factor and vascular endothelial cells

YE Lan[1], XU Xiao-yu[2], LI Rong-heng[3], HE Zheng-guang[4], CHEN Gang[5] ([1]Department of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004; [2]College of Chinese Traditional Medicine and Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715; [3]Department of Traditional Medicine, The First Affiliated Hospital, [4]College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [5]Research Center of Pharmaceutical Chemistry & Chemobiology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: Objective To explore the effect of medicated serum of Sangleng and Eshu on the expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial cell proliferation induced by VEGF *in vitro*. **Methods** Medicated serum of Sangleng and Eshu was used to culture human umbilical vein endothelial cell (HUVEC-1) induced by VEGF. The morphologic changes of HUVEC-1 were observed with phase contrast microscope, and cell proliferation was detected by MTT method, and the expression of vascular endothelial growth factor protein and mRNA in endothelial cells was detected by Western blotting and RT-PCR. **Results** The medicated serum of 5.0, 2.5 g·kg^{-1}·d^{-1} Sangleng and Eshu could cause arrangement disorder in the normal umbilical vein endothelial cells. The medicated serum of 5.0 g·kg^{-1}·d^{-1} Sangleng and Eshu (10%, 5%, 2.5%) and medicated serum of 2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}(10%) could inhibit vascular endothelial cell proliferation remarkably ($P<0.05$), as compared with the blank serum of identical concentration. The medicated serum of 5 g·kg^{-1}·d^{-1}and 2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}(5%) could reduce significantly the expression of vascular endothelial growth factor protein and mRNA of HUVEC-1. **Conclusion** The medicated serum of Sangleng and Eshu could inhibit vascular endothelial cell proliferation induced by VEGF *in vitro*, and its mechanism might be associated with inhibited expression of vascular endothelial growth factor.

Key words: Sanleng; Eshu; medicated serum; human umbilical vein endothelial cell; vascular endothelial growth factor

基金项目: 重庆市科委应用基础研究项目[(2002)18号-99]
Supported by the Research Project for Basic Research and Application of Chongqing Scientific Committee [(2002)18-99]

作者简介: 叶 兰(1975-),女,四川省巴县人,博士,讲师,主要从事血管生成中药药理学方面的研究。电话:13110201331,E-mail: frogyl266@163.com
通讯作者: 徐晓玉,E-mail: xxy0618@sina.com

收稿日期: 2006-02-20;**修回日期:** 2006-05-28

三棱、莪术两味活血化淤中药组方——莪术丸最早见于《经验良方》,用于淤血经闭,行经腹痛,癥瘕积聚,食积腹痛。莪术和三棱在很多抗癌中药配方中均有出现,在治疗方面的作用主要表现为增强人的免疫力,抑制癌细胞,使其不易在血液中停留、聚集,改善症状,缓解病情[1-4]。本研究主要采用血清药理学方法,探讨三棱、莪术含药血清对人脐静脉血管内皮的增殖和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达是否具有抑制作用,其研究结果对于深入研究其抗血管生成机制,为临床应用活血化淤药治疗病理性血管增生疾病(肿瘤、子宫内膜异位症、类风湿关节炎、银屑病、动脉粥样硬化、糖尿病微血管病变等)提供科学依据,对进一步指导临床合理用药等方面均具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物与试剂 三棱,购自四川欣康中药饮片有限公司(批号:050104)。莪术,购自四川省中药饮片有限责任公司(批号:050219)。药材经重庆医科学大学药学系中药教研室刘新副教授鉴定。硫酸鱼精蛋白注射液,上海第一生化药业公司,规格:5 ml∶50 mg(批号:010302)。BPMI1640,Gibco 公司。新生小牛血清,中美合资兰州民海生物工程有限公司。四氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、胰酶等均为美国 Sigma 公司产品。VEGF, 深圳晶美生物工程公司。抗 VEGF 抗体,二抗均购自 Santa Cruz。RT-PCR 试剂盒,大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 主要仪器 多功能倒置相差显微镜(XDS-1B),重庆光学仪器厂。CO_2 培养箱(2001-13 型号),上海常思工贸有限公司。全自动酶标仪(MK3),芬兰雷勃。超低温冰箱(MDF-382E),日本三洋。高速冷冻离心机(eppendorf centrifuge 5415D)德国。微型印迹电泳转移系统,美国 Bio-Rad 公司。PCR 仪,美国 Pharmacia biotech 公司。垂直板蛋白电泳槽(DYY-3),北京六一仪器厂。可见光/紫外凝胶扫描分析系统,美国 UVP。

1.1.3 药品制备 三棱、莪术打成粉末,过 10~20 目筛,等量配方,30 ℃水浸泡 2 h,煎熬 2 次,每次 60 min,合并水煎液浓缩,醇沉(70% 乙醇)24 h,3 000 r/min 离心 10 min,上清液过滤,终浓度为生药 1.6 g/ml,真空干燥,粉末放置于干燥器内,临用时按需配制药液。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 雄性 Wistar 大鼠 50 只,体质量(200±20) g,由本校实验动物中心提供。平均分为 5 组,空白对照组(生理盐水)、阳性对照组(鱼精蛋白 50 mg·kg^{-1}·d^{-1})、三棱、莪术合煎高、中、低剂量组(5.0、2.5、1.25 g·kg^{-1}·d^{-1}分别为临床给药剂量 20 倍、10 倍、5 倍)。给药组,每天灌胃给药 2 次,连续 7 d;对照组,每天灌服等量生理盐水。末次给药 1 h 后,股动脉取血,4 ℃静置 4 h,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,微孔滤膜除菌,灭活补体,低温冰箱保存备用。用时,用 RPMI1640 按体积比稀释三棱、莪术高中、低剂量组含药血清至 3 个浓度(10%、5%、2.5%)。

1.2.2 细胞培养与实验分组 人脐静脉内皮细胞(HUVEC-1,购于上海细胞生物研究所)培养,分为空白血清对照组,鱼精蛋白阳性对照组,三棱、莪术合煎高、中、低剂量组。

1.2.3 MTT 法观察三棱、莪术含药血清对 VEGF 诱导的 HUVEC-1 细胞增殖的影响 按 2.0×10^4/孔接种细胞于 96 孔板,培养 24 h 细胞贴壁,用 Hanks 液冲洗 2 次。换成含 0.5% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养 24 h 后,分别加入三棱、莪术合煎高、中、低剂量组 10%、5%、2.5% 含药血清,VEGF 100 ng/ml,每组均设复孔 3 个,培养 48 h,倒置相差显微镜观察含药血清对 HUVEC-1 细胞形态及排列的影响。弃原培养液,每孔加入 200μl 无血清培养液,20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),培养 4 h。200 μl DMSO 溶解,振荡混匀。在自动酶标仪上波长 492 nm 处检测吸光度值[D(492)]。

1.2.4 Western blot 检测 取贴壁生长的单层细胞,换用无血清 RPMI1640 培养液培养 4 h,加入含药血清,终浓度为 5%,VEGF 100 ng/ml。待细胞贴壁长满 10 cm^3 培养瓶时,0.01 mol/L PBS 冲洗细胞 2 次,裂解液裂解细胞,超声粉碎 2 次,每次 30 s,4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清。Lowry 法检测蛋白浓度。加入等体积 2×SDS 加样缓冲液(125 mmol/L Tris-HCl、20% 甘油,0.01% 溴酚蓝、4% SDS、200 mmol/L DTT),沸水浴中加热 10 min,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜(PVDF 膜),含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液封闭,抗 VEGF 抗体、Ⅱ抗分别与膜孵育,显色。试验重复 3 次,取均值。

1.2.5 RT-PCR 检测 取贴壁生长的单层细胞,换用无血清 RPMI1640 培养液培养 4 h,加入含药血清,终浓度为 5%,VEGF 100 ng/ml。待细胞贴壁长满 10 cm^3 培养瓶时,按试剂盒说明书提取总 RNA。以 5 μl RNA 作为模板进行逆转录,PCR 扩增,以 β-actin 作为内参照。VEGF165 引物序列:上游 5′-CAGGCTGCTGTAACGATGAA -3′,下游 5′-AAATGCTTTCTCCGCTCTGA -3′,扩增产物为 280 bp;β-actin 引物序列:上游 5′-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3′,下游 5′-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3′,扩增产物为 208 bp。PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,持续 35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描,将 VEGF mRNA 扩增条带的光密度值与 β-actin 的光密度值之比作为衡量参数,分析 VEGF mRNA 的表达。

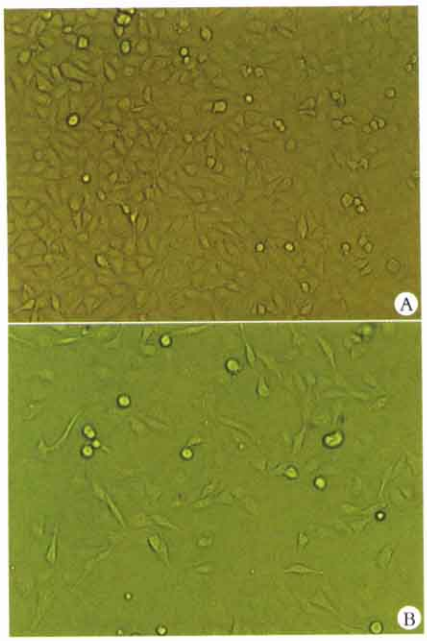
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析,组间均值两两比较用 SHK 法。

2　结果

2.1　三棱、莪术含药血清对HUVEC-1细胞形态影响

正常HUVEC-1细胞贴壁生长，融合成片，细胞呈铺路石放射状排列。活细胞透亮，胞体肥厚，呈梭形或椭圆形，细胞质丰富，胞核呈圆形或椭圆形。三棱、莪术含药血清高、中剂量组作用48 h，培养液由橙红色变成砖红色，与正常细胞比较形态发生明显改变，表现为细胞排列紊乱，明显梭形化，细胞数量减少。三棱、莪术含药血清低剂量组作用细胞后，细胞形态、排列和数量均无明显变化。见图1。



A：空白血清对照组；B：高剂量组

图1　HUVEC-1细胞经三棱、莪术含药血清处理后形态变化
（倒置相差显微镜×200）

2.2　三棱、莪术含药血清对VEGF诱导的HUVEC-1细胞增殖的影响

空白血清对照组各血清不同浓度组间差异无显著性，中剂量（5%、2.5%）、低剂量（10%、5%、2.5%）含药血清与空白血清对照组比较差异无显著性。高剂量含药血清和中剂量（10%）含药血清对HUVEC-1细胞的增殖抑制作用显著高于空白血清相同浓度组（$P<0.05$）（表1）。

2.3　三棱、莪术含药血清对HUVEC-1表达VEGF mRNA的影响

高、中剂量组大鼠5%含药血清作用于HUVEC-1细胞，其VEGF mRNA表达均显著降低，吸光度值从（1.136±0.154）下降至（0.405±0.075）和（0.473±0.044），差异有显著性（$P<0.01$）。低剂量组对VEGF的表达量无明显改变。见表2，图2。

表1　三棱、莪术含药血清对VEGF诱导的HUVEC-1细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

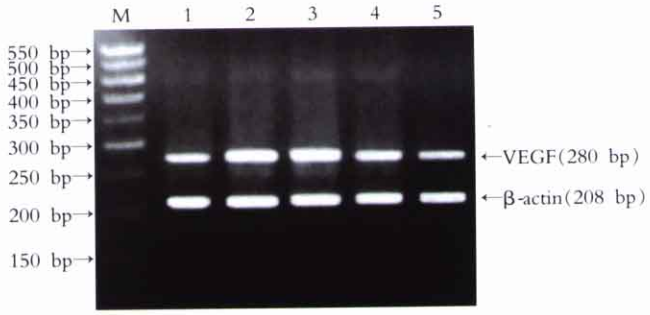
组别	三棱、莪术剂量	大鼠血清浓度（%）	D(492)
空白血清对照组	—	10.0	0.573±0.059
		5.0	0.598±0.070
		2.5	0.606±0.103
鱼精蛋白组	50 mg·kg^{-1}·d^{-1}	10.0	0.328±0.091[a]
		5.0	0.346±0.135[a]
		2.5	0.603±0.056
高剂量组	5.0 g·kg^{-1}·d^{-1}	10.0	0.129±0.013[b]
		5.0	0.294±0.071[b]
		2.5	0.341±0.045[a]
中剂量组	2.5 g·kg^{-1}·d^{-1}	10.0	0.324±0.030[b]
		5.0	0.473±0.067
		2.5	0.493±0.059
低剂量组	1.25 g·kg^{-1}·d^{-1}	10.0	0.591±0.044
		5.0	0.509±0.075
		2.5	0.546±0.083

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空白血清对照组比较

表2　三棱、莪术含药血清（5%）对HUVEC-1细胞表达VEGF mRNA和VEGF蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	三棱、莪术剂量（g·kg^{-1}·d^{-1}）	VEGF mRNA［D(492)］	VEGF［D(492)］
空白血清对照组	—	1.136±0.154	1.060±0.152
鱼精蛋白组	0.05	0.473±0.044[b]	0.547±0.150[a]
高剂量组	5.0	0.405±0.075[b]	0.350±0.128[b]
中剂量组	2.5	0.693±0.102[a]	0.603±0.211[a]
低剂量组	1.25	1.109±0.080	0.786±0.144

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空白血清对照组比较



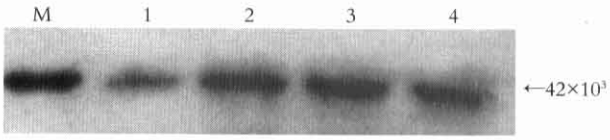
M：标准；1：鱼精蛋白组；2：空白对照组；3：低剂量组；4：中剂量组；5：高剂量组

图2　HUVEC-1细胞经三棱、莪术含药血清处理后VEGF mRNA的表达

2.4　三棱、莪术含药血清对HUVEC-1表达VEGF蛋白的影响

用Western blot检测三棱、莪术含药血清对VEGF蛋白的表达。结果显示，高、中剂量组大鼠5%的含药血清均使HUVEC-1

细胞 VEGF 蛋白表达显著降低，高剂量组降低最为显著（$P < 0.01$）。见图3，表2。



M：空白对照组；1：鱼精蛋白组；2：低剂量组；3：中剂量组；4：高低剂量组

图3 HUVEC-1 细胞经三棱、莪术含药血清处理后 VEGF 蛋白的表达

3 讨论

莪术味辛、苦，性温，归脾肝经，其中含有 β-榄香烯、莪术醇、莪二酮、姜黄素成分等，其在肿瘤治疗领域的意义受到人们的广泛研究[5]。三棱味苦、性平、归肝、脾经，是临床上常用的抗肿瘤药物，具有确切的抗肿瘤作用[4,6]，常与莪术配伍使用，但其作用机制尚不明确。本实验显示三棱、莪术含药血清可以抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞增殖，可使正常人脐静脉血管内皮细胞排列紊乱，明显梭形化。

血清药理学方法，由日本学者田代真一提出，历经10余年的发展，逐渐完善和规范，受到广泛的使用与认可。经口服给药的剂量是血清药理实验方法中一大难题，目前仍无定论，因为含药血清加入体外反应体系以后，浓度被稀释，使反应体系浓度达不到在体条件下的药物浓度，在这种情况下，如反应体系出现假阴性，则不能排除由于药物浓度过低而出现的假阴性结果。李义奎[7]提出加大剂量（给药剂量 = 在体实验动物的给药剂量 × 反应体系中被稀释的倍数）。按上述公式计算，MTT 法药物被稀释了 10 倍，我们实验设计的 5、10、20 倍，由于受到灌胃药物浓度和体积的限制，虽然未能达到公式要求的给药剂量，但药效已经呈现出良好的剂量依赖关系。

VEGF 家族包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 及胎盘生长因子（PIGF）。VEGF-A 即为通常所称的 VEGF，人 VEGF-A 基因位于染色体 6p21.3，全长 14 kb，由 8 个外显子、7 个内含子组成。编码产物为（34 ~ 35）$\times 10^3$ 的同源二聚体糖蛋白，亚基之间通过二硫键相连。VEGF 是一种选择性促血管内皮细胞有丝分裂原，以旁分泌方式特异性的促进血管内皮细胞分裂增殖，促进血管形成。另外，VEGF 可增加毛细血管后静脉和小静脉的通透性，是已知最强的血管通透剂[8]。本实验结果显示，三棱、莪术含药血清可以抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达，提示三棱、莪术含药血清抑制血管内皮细胞增殖，可能是通过抑制 VEGF 表达而实现。

实验结果还表明，阳性对照鱼精蛋白作用于 HUVEC-1，可以抑制 VEGF 诱导的 HUVEC-1 增殖，抑制 HUVEC-1 表达 VEGF mRNA 及其蛋白，这与既往的研究报道是一致的。鱼精蛋白作为一种抗血管生成剂，其机制可能是通过阻碍 VEGF 与其受体结合而抑制 VEGF 的生物功能而实现的[9]。

VEGF 刺激内皮细胞 DNA 合成的作用，主要是通过 VEGF 受体（VEGFR-2）有效激活细胞外信号调节激酶 1/2（external-signal regulated kinase，ERK）[10] 而实现的。三棱、莪术是否对 VEGF 受体及 ERK 有进一步的作用将是我们实验下一步需要探讨的问题，以期为三棱、莪术在临床上用于病理性血管增生疾病的治疗提供科学依据。

参考文献：

[1] 李宁隆. 张锡纯临证用三棱、莪术经验浅探[J]. 现代中医药，2004，24(1)：19 - 20.

[2] 叶建红. 三棱、莪术的药理作用与临床运用体会[J]. 现代中西医结合杂志，2003，12(23)：2559.

[3] 彭慧敏. 复方莪术汤对肿瘤和免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床，1991，7(特刊)：87 - 89.

[4] 王 喆，张瑾峰，付桂芳. 莪术、三棱对人肺癌细胞凋亡的影响[J]. 首都医科大学学报，2001，22(4)：304 - 305.

[5] 石灵春，汪 波，张维彬. 中草药有效成分 β-榄香烯在肿瘤防治中的运用[J]. 现代中西医结合杂志，2001，10(14)：1397 - 1398.

[6] 徐立春，孙振华，陈志琳，等. 三棱、莪术提取物修饰的肿瘤细胞疫苗的非特异性抗瘤实验研究[J]. 癌症，2001，20(12)：1380 - 1382.

[7] 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，1999，10(2)：95 - 98.

[8] Ferrara N，Houck K，Jakeman L，*et al*. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins[J]. Endocr Rev，1992，13(1)：18 - 32.

[9] Vaisman N，Gospodarowicz D，Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor[J]. J Biol Chem，1990，265(32)：19461 - 19466.

[10] Takahashi T，Ueno H，Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent，but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells[J]. Oncogene，1999，18(13)：2221 - 2230.

（编辑 王小寒）