

● 论著 ●

血府逐瘀汤影响慢性粒细胞白血病 VEGF 表达的体外研究 *

张还珠¹ 邝枣园² 谭获¹ 黄振倩¹

(广州医学院第一附属医院 广东广州 510230; 2 广州中医药大学 广东广州 510405)

摘要:目的:体外研究血府逐瘀汤含药血清对慢性粒细胞白血病细胞 VEGF 表达的影响。方法:采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 20 例初治 CML 患者、20 例正常人骨髓细胞以及人慢性粒红白血病急性变 K562 细胞上清液的 VEGF 含量,并测定 CML 原代细胞和 K562 细胞加入不同浓度血府逐瘀汤含药血清共同培养后上清液的 VEGF 含量。结果:CML 原代细胞上清液 VEGF 浓度为 (389.27 ± 65.77) pg/mL、K562 细胞 VEGF 浓度为 (461.24 ± 137.57) pg/mL,均比正常人 (125.45 ± 28.24) pg/mL 显著增高 ($P < 0.05$),加入不同浓度的含药血清,在中、高浓度范围,CML 原代细胞、K562 细胞 VEGF 表达均明显下降,分别为 (152.43 ± 26.29) pg/mL、 (80.31 ± 19.73) pg/mL 和 (188.86 ± 32.77) pg/mL、 (114.81 ± 14.16) pg/mL ($P < 0.05$)。结论:异常血管新生可能参与 CML 发病,血府逐瘀汤含药血清在体外能显著抑制 CML 原代细胞和 K562 白血病细胞表达 VEGF,该方有参与抑制 CML 异常血管形成的作用。

关键词:慢性髓细胞性白血病;血府逐瘀汤;血管内皮生长因子

Abstract: Objectives To study the role of XUE FU ZHU YU TANG on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in K562 cell line. Methods: VEGF level was assessed by ELISA in the cultural supernatants of bone marrow mononuclear cells from 20 chronic myeloid leukemia (CML) patients and 20 normal persons, and also of K562 cells. CML cells and K562 cells were respectively treated with serum containing of XUE FU ZHU YU TANG in different concentrations, the VEGF level in the cultural supernatants of the cells was detected by the same way. Result: The supernatants of cultured bone marrow cells from 20 CML patients and K562 cells contained significantly higher VEGF levels (389.27 ± 65.77) pg/mL, (461.24 ± 137.57) pg/mL, respectively than that in 20 normal control samples (125.45 ± 28.24) pg/mL ($P < 0.05$). CML cells and K562 cells treated with serum containing of XUE FU ZHU YU TANG in different concentrations resulted in significant reduction of VEGF levels (152.43 ± 26.29) pg/mL, (80.31 ± 19.73) pg/mL and (188.86 ± 32.77) pg/mL, (114.81 ± 14.16) pg/mL, respectively ($P < 0.05$). Conclusion: Abnormal angiogenesis might play a role in the pathogenesis of CML. The serum containing of XUE FU ZHU YU TANG suppresses significantly VEGF expression of K562 cells. It is probably an additional anticancer mechanism for XUE FU ZHU YU TANG to inhibit abnormal angiogenesis in CML.

Key Words: chronic myeloid leukemia; xue fu zhu yu tang; vascular endothelial growth factor

中图分类号: R 733.72

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2007)04-0001-02

慢性粒细胞性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种骨髓干细胞克隆性增殖性疾病。血管内皮生长因子 (vascular endo-thelial growth factor, VEGF) 作为血管新生正调控因子,是重要的促血管生长因子之一,参与血管发生和生成的各种生理及病理过程,如胚胎形成、伤口愈合、肿瘤生长,VEGF 在肿瘤的发生、侵袭和转移过程中形成新生血管,以供肿瘤生长所需要的营养。已有大量研究报道其参与 CML 的发生发展^[1-3]。慢性粒细胞白血病证属中医的“血证”、“症积”、“虚劳”等范畴,瘀血是最重要的致病因素,气滞血瘀是发病的关键。近年来,国内对活血化瘀法治疗慢粒的一些作用已达成共识,活血化瘀方药在 CML 病人可以通过改善血液流变性和凝固性,降低血液黏度,消除微循环障碍而发挥作用^[4-5]。但关于活血化瘀方药与 CML 血管生成的关系的研究未见报道。本研究拟通过观察血府逐瘀汤对人慢性粒红白血病急性变 K562 细胞 VEGF 表达的影响,初步探讨血府逐瘀汤在 CML 抗血管生成中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 20 例 2004~2005 年门诊确诊的初诊慢性粒细胞白血病患者,年龄 18~60 岁;男 12 例,女 8 例;不伴有其他肿瘤病史;按 FAB 诊断标准,均经临床、外周血、骨髓细胞学检查确诊为 CML 慢性期, bcr-abl(+). 另取 20 例同期正常人的骨髓作对照。K562 细胞株,购自中山大学细胞库,人血管内皮细胞生长因子 ELISA 试剂盒 (批号: EK0539), 购自武汉博士德生物工程有限公司。

* 广东省中医药局课题 (课题编号 2040038)

1.2 处方组成 莪术 15g, 当归 9g, 生地 9g, 桃仁 12g, 红花 9g, 枳壳 6g, 赤芍 6g, 柴胡 3g, 甘草 6g, 桔梗 4.5g, 川芎 4.5g, 牛膝 9g。

1.3 实验动物 8 周龄 SD 大鼠 24 只, 均为雄性, 体重 (200 ± 20) g, 自由摄食饮水, 动物房保持通风。

1.4 煎剂制备 按 60kg 正常人每天口服血府逐瘀汤 93g 的 20 倍剂量, 常规水煮 2 次后 70℃ 恒温水浴浓缩, 无菌过滤器过滤, 4℃ 保存。

1.5 大鼠含药血清的制备 24 只大鼠随机分为 2 组, A 组为血府逐瘀汤组, B 组为空白对照组, A 组每天按上述剂量 1mL 灌胃, B 组给予同等剂量生理盐水, 连续 10d, 最后一次灌药 1h 后, 腹主动脉采血, 分离血清, 56℃ 水浴 30min 灭活, 过滤, -70℃ 保存。

1.6 CML 原代细胞、K562 细胞和正常人骨髓细胞 VEGF 水平测定 无菌采集的 CML 和正常人的骨髓标本, 常规肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 按 1×10^6 /mL 浓度, 在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养 24h 后, 离心收集上清液。贮存于 -20℃ 待测。取对数生长期 K562 细胞, 以 1×10^6 cells/mL 接种于上述培养基, 24h 后离心收集上清液, 贮存于 -20℃ 待测。按照 VEGF ELISA 试剂盒操作要求依次加样、孵育、洗涤、酶标仪 450nm 比色, 每个标准品和样本的 OD 值减去零孔 (对照) 的 OD 值, 把样本的 OD 值代入标准曲线, 得到相应的 VEGF 浓度 (pg/mL)。

1.7 含药血清对 K562 细胞株 VEGF 水平的影响 取对数

生长期 CML 原代细胞、K562 细胞, 分别以 1×10^5 cells/mL 接种于 24 孔板。采用血清对倍稀释, 把含药血清设高、中、低三个浓度, 同时设空白对照组血清, 每一浓度设 6 个平行孔, 分别加入 0.1mL 上述血清, 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养 24h, 离心收集上清液, 贮存于 -20°C 待测。按照 VEGF ELISA 试剂盒操作要求测定样本的 OD 值, 代入标准曲线, 得到相应的 VEGF 浓度(pg/mL)。

1.8 统计学分析 所有结果均采用 SPSS11.5 统计软件包分析, 计量资料用($\bar{X} \pm S$) 表示, 各组均数的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 标准曲线 取随试剂盒提供的标准品, 对等稀释, VEGF 浓度分别为 0、62.5、125、250、500、1 000、2 000pg/mL, 以 OD 值为纵坐标, 标准品浓度(pg/mL)为横坐标, 绘制出标准曲线, 求出标准曲线方程($y = 0.0007x + 0.0598, R^2 = 0.970$)。

2.2 CML 原代细胞、K562 细胞 VEGF 表达 均比正常人显著增高。对数生长期的 K562 细胞上清液 VEGF 浓度为 $(461.24 \pm 137.57)\text{pg/mL}$, CML 原代细胞上清液 VEGF 浓度为 $(389.27 \pm 65.77)\text{pg/mL}$, 而正常人的骨髓细胞上清液 VEGF 浓度为 $(125.45 \pm 28.24)\text{pg/mL}$ ($P < 0.05$)。

2.3 SD 大鼠血清对 K562 细胞 VEGF 浓度影响 无明显影响。对数生长期的 K562 细胞上清液 VEGF 浓度为 $(461.24 \pm 137.57)\text{pg/mL}$, 对数生长期的 K562 细胞接种后, 加入空白对照组血清按上述条件培养 24h VEGF 浓度为 $(406.24 \pm 80.73)\text{pg/mL}$ ($P > 0.05$)。

2.4 血府逐瘀汤含药血清对 CML 原代细胞、K562 细胞 VEGF 浓度影响 一定浓度的血府逐瘀汤含药血清能显著降低 CML 原代细胞和 K562 细胞 VEGF 表达。对数生长期的两种细胞接种后, 加入不同浓度的含药血清, 在中、高浓度范围, VEGF 表达均明显下调 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 含药血清对 CML 原代、K562 细胞 VEGF 浓度的影响 ($\bar{X} \pm S$) pg/mL

组别	VEGF 浓度	
	K562 细胞	CML 原代细胞
细胞上清液组	461.24 ± 137.57	389.27 ± 65.77
空白对照血清组	$406.24 \pm 80.73^*$	$362.34 \pm 55.46^*$
低浓度含药血清组	$369.57 \pm 39.90^*$	$308.55 \pm 37.39^*$
中浓度含药血清组	$188.86 \pm 32.77^{**}$	$152.43 \pm 26.29^{**}$
高浓度含药血清组	$114.81 \pm 14.16^{**}$	$80.31 \pm 19.73^{**}$

注: 与空白对照组比较, $*P > 0.05$, $**P < 0.05$ 。

3 讨论

血管新生是影响肿瘤生物学行为和转移潜能的重要因素, 新生血管一方面给肿瘤组织提供氧气及营养物质, 促进肿瘤细胞生长; 另一方面因其管壁薄弱, 易被肿瘤细胞穿透, 导致肿瘤细胞向远处移转。VEGF 作为一种最重要的血管生成因子, 已有多项研究报道在白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等患者的骨髓中均存在高表达, 表明血管新生与血液肿瘤的发生、演变及预后有不可分割的相关性^[6-8]。Alvaro 等检测了 417 例急性粒细胞白血病(AML)、CML、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、ALL 和 MDS 患者血浆 VEGF 水平, 结果显示均有明显增高, 其中以 CML 最高^[3]。本研究结果亦显示 CML 原代细胞、K562 细胞 VEGF 表达均比正常人显著增高, 提示异常血管新生可能参与 CML 发病。与文献报道相符。目前研究认为, 慢性粒细胞白血病是与血管增生相关的肿瘤, 存在高水平 VEGF 的表达, 而且表达过高常提示慢性期 CML 患者生

实用中西医结合临床 2007 年 8 月第 7 卷第 4 期
存期较短^[9]。VEGF 通过与内皮细胞结合促进内皮细胞增生, 为白血病细胞的增生提供必要的物质准备, 从而促进白血病细胞的生长。因此, 抗 VEGF 的治疗, 将成为白血病治疗的一个新靶点。

早在《黄帝内经》中即有“结者散之”的论述, 基于肿瘤与血瘀的关系, 应用活血化瘀法治疗慢性粒细胞白血病符合中医辨证论治的治疗原则。国内王笑民等认为活血化瘀中药具有类似肝素的作用, 而肝素可增强血液中抑制血管生成的类固醇的活性, 可能引起正在生长的毛细血管退化, 因此, 活血化瘀中药可能会阻止血管生成而起到防治恶性肿瘤血行转移的作用^[10]。

血府逐瘀汤以莪术破气消瘀为主药, 配合桃红四物汤(桃仁、红花、当归、川芎、生地、赤芍)合四逆散(柴胡、枳壳、甘草、赤芍)加桔梗、牛膝而成。方中桃红四物汤活血化瘀而养血, 防化瘀之伤正; 四逆散疏理肝气, 使气行则血行; 加桔梗引药上行达于胸中(血府); 牛膝引瘀血下行而通利血脉。诸药相合, 构成理气活血养血之剂, 具有活血化瘀而不伤正、疏肝理气而不耗气的特点, 达到行气、活血、祛瘀的功效。我们用该方不同浓度的含药血清处理人慢性粒红白血病急性变 K562 细胞株后, 检测细胞上清液 VEGF 的表达量, 同时排除了单纯动物血清对 K562 细胞 VEGF 表达的影响, 结果提示血府逐瘀汤含药血清在体外能显著抑制 K562 白血病细胞表达 VEGF, 提示该方参与抑制 CML 异常血管形成。因此, 我们认为血府逐瘀汤在慢性粒细胞白血病抗血管生成治疗方面将有广阔的应用前景。

参考文献

[1]Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies[J].Cancer Research,1999,59: 728~733
[2]Fusetti L, Pruneri G, Gobbi A, et al. Human myeloid and lymphoid malignancies in the non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mouse model:frequency of apoptotic cells in solid tumors and efficiency and speed of engraftment correlate with vascular endothelial growth factor production [J].Cancer Research, 2000, 60: 2 527~2 534
[3]Alvaro A , Hagop K, Taghi M,et al . Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes [J] . Blood , 2000,96(6): 2 240~2 245
[4]吴顺杰,颜美心. 活血化瘀法治疗慢性粒细胞白血病临证浅识[J]. 中医药学刊,2001, 19(4): 343~344
[5]郑瑾,刘强,王宗仁,等.活血化瘀中药复方诱导 K562 细胞凋亡[J]. 第四军医大学学报,2003, 24(5): 427~429
[6]Padro T, Rios S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [J]. Blood,2000,95 (8): 2 637~2 644
[7]Spiekermann K, Faber F, Voswinckel R, et al. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF - induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of ckit in AML cells[J]. Exp Hematol, 2002,30(7): 767~773
[8]Hussong JW, Rodgers gM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2000,95(1): 309~313
[9]Verstovsek S, Lunsin S, Kantar jian H, et al. Clinical relevance of VEGF receptors 1 and 2 in patients with chronic myelogenous[J]. leukemia reserach, 2003, 27(7): 571~573
[10]王笑民,郁仁存,胡玉芳,等.益气活血法对癌症血瘀证影响的临床与实验研究[J].实用中西医结合杂志,1996,9(5): 318

(收稿日期: 2006-12-28)