

# 清解扶正颗粒体外抑制血管新生的作用机制研究\*

曹治云<sup>1,2</sup> 余旋<sup>1</sup> 魏丽慧<sup>1,2</sup> 曾建伟<sup>1,2</sup> 赵锦燕<sup>1,2</sup> 黄彬<sup>1,2</sup> 林久茂<sup>1,2#</sup>

(1 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122;

2 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室 福州 350122)

**摘要:**目的:探讨清解扶正颗粒(Qingjiefuzheng Granules, QFG)对体外人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)新生的影响及可能的作用机制。方法:以 HUVEC 为研究对象,给予不同浓度 QFG 后观察细胞形态变化,MTT 检测细胞活力,划痕实验检测细胞迁移能力,管腔形成实验检测细胞成血管能力,蛋白免疫印迹检测促血管新生因子、血管内皮生长因子 A、血管内皮生长因子受体 2、基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶 9 的蛋白表达。结果:QFG 对 HUVEC 形态与细胞生长没有明显影响,但可显著抑制 HUVEC 的活力、迁移及体外成血管能力;QFG 显著抑制血管内皮生长因子 A、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 等蛋白表达。结论:QFG 在体外具有抑制血管新生的作用,其作用机制与其抑制血管内皮生长因子 A、基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶 9 的表达有关。

**关键词:**清解扶正颗粒;人脐静脉内皮细胞;血管新生;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶

## The Antiangiogenic Effect of the Qingjiefuzheng Granules on HUVEC in Vitro\*

CAO Zhi-yun<sup>1,2</sup>, YU Xuan<sup>1</sup>, WEI Li-hui<sup>1,2</sup>, ZENG Jian-wei<sup>1,2</sup>, ZHAO Jin-yan<sup>1,2</sup>, HUANG Bin<sup>1,2</sup>, LIN Jiu-mao<sup>1,2#</sup>

(1The Institute of Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou350122;

2Fujian Provincial Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fuzhou350122)

**Abstract:** Objective: To investigate the effect of the Qingjiefuzheng granules on the regeneration of HUVEC in vitro and the possible antiangiogenic mechanism. Method: HUVEC was used as the research object, and the morphological changes were observed after different concentrations of QFG. The cell viability was detected by MTT, the cell migration ability was detected by scratch test, and the angiogenic ability of cells was detected by lumen formation test, and the protein expression of pro-angiogenic factor, VEGFR-2, VEGF-A, MMP-2, MMP-9 in treated HUVEC was evaluated by western blot. Results: QFG had no significant effect on HUVEC morphology and cell growth, but significantly inhibited the HUVEC viability, migration ability and in vitro angiogenic ability. Furtherly, QFG significantly inhibited the expression of VEGF-A, MMP-2, MMP-9. Conclusion: QFG has an inhibitory effect on angiogenesis of HUVEC in vitro, and its mechanism is related to its inhibition of expression of VEGF-A, MMP-2 and MMP-9.

**Key words:** The Qingjiefuzheng granules; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase

中图分类号: R979.1

文献标识码: B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2019.01.002

肿瘤的发生发展与机体正气不足、脏腑功能失调及热毒积聚密切相关,多因气滞、血瘀、痰凝、毒聚而形成<sup>[1]</sup>。中医药在肿瘤的治疗中发挥着独特的作用,已经证实有些中药具有通过调控肿瘤血管生成从而达到抗肿瘤的功效。清解扶正颗粒(Qingjiefuzheng Granules, QFG)是临床验方,由白花蛇舌草、半枝莲、炙黄芪、炒麦芽等组成,其中白花蛇舌草为君,具有清热解毒、消痈散结、利尿除湿的功效;半枝莲为臣,具有清热解毒、活血祛瘀、消肿止痛的作用,辅助君药,增强清热解毒之功效;黄芪为佐,具有补气健脾、益卫固表、利尿消肿、生津的功效,调和君臣的寒凉之性;麦芽为使,具有行气消食、健脾开胃、退乳消胀的功效,在增强君臣作用之时,调和脾胃运化,兼顾后天之本。清解扶正颗粒临床辅助化疗药物治疗多种恶性消化道肿瘤,具有改善患者

的生活质量、减轻胃肠不良反应等作用。我们的实验研究表明 QFG 对大肠细胞具有抑制增殖和诱导凋亡的作用<sup>[2]</sup>,但治疗大肠癌等恶性肿瘤的作用机制尚不清楚。故本研究在前期研究的基础上,探讨了 QFG 对血管新生的调控作用,以期为 QFG 的临床应用提供实验依据。现报道如下:

### 1 材料与方法

1.1 药物与细胞株 清解扶正颗粒(QFG)由福建中医药大学药学院制剂室提供,用磷酸盐缓冲液(PBS)配成 200 mg/ml 储存溶液,超声 30 min 助溶,用 0.45 μm 过滤器过滤,再用培养基配成所需要的浓度。人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)购自中科院上海细胞库。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养基、双抗(青霉素-链霉素)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、0.25%胰

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81873166);

福建省自然科学基金项目(编号:2017J01542);

福建省中医药科研课题(编号:2017FJZYZY203);

福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(编号:2016-ZQN-67)

# 通讯作者:林久茂, E-mail:jiumaolin@hotmail.com

蛋白酶、二甲亚砜 (DMSO) 均购自美国 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝 [3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT] 干粉购自北京索莱宝科技有限公司; PBS 购自美国 Hyclone 公司; 管腔形成试剂盒购于德国 Merck Millipore 公司, VEGF-A、VEGFR-2 购于美国 Proteintech 公司, MMP-2、MMP-9 抗体购自中国 BBI Life Sciences 公司。

1.3 仪器 超净工作台 (苏州净化设备公司); 二氧化碳培养箱、-80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); 倒置显微镜系统 (德国 Leica 仪器有限公司); 形态学显微图像分析系统 LAS V4.1、Countes 全自动细胞计数仪 (美国 Life 公司)。

1.4 细胞培养 将 HUVEC 分别培养于含 10% FBS、1% 双抗 (含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素) 的 RPMI 1640 完全培养基中, 并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的细胞培养箱中培养, 待细胞单层贴壁生长至汇合度为 80%~90% 时, 加入 1 ml 的胰蛋白酶消化 1~3 min, 随后加入 2 ml 完全培养基终止消化, 于离心机中以 1 000 r/min 的转速离心 3 min 后, 吸弃上清并收集沉淀细胞用于后续实验。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 收集 HUVEC 细胞, 加入完全培养基, 分别制备密度为  $1.0 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 并按 100 μl/孔的原则均匀地接种于 96 孔培养板中, 培养于细胞培养箱中, 当每孔细胞的汇合度达到 50%~60% 时, 轻轻吸走原孔中培养基, 随后每孔分别加入 100 μl 不同浓度的 QFG (终浓度分别为 0、0.125、0.25、0.5、0.75、1 mg/ml, 其中 0 mg/ml 为对照组), 干预 24 h 或 48 h 后再次吸走原孔中溶液, 并加入等体积的 MTT 溶液 (100 μl/孔, 0.5 mg/ml), 继续培养 4 h 后吸弃各孔中的液体, 每孔加入等体积 DMSO 并振荡混匀, 于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光度值 (A 值), 计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 (%) =  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.6 细胞形态观察 收集 HUVEC 细胞, 加入完全培养基, 分别制备密度为  $2.0 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 并按 2 ml/孔的原则接种于 6 孔板中, 培养于细胞培养箱, 待每孔细胞汇合度达到 50%~60% 时, 吸弃孔中原培养基, 并重新加入等体积不同浓度的 QFG (终浓度分别为 0、0.125、0.25、0.5、0.75、1 mg/ml, 其中 0 mg/ml 为对照组) 干预 24 h, 并在倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

1.7 划痕实验 收集 HUVEC 细胞, 加入完全培养

基, 分别制备密度为  $1.0 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 并按 2 ml/孔的原则接种于 6 孔板中, 培养到铺满单层, 用无菌枪头在单层细胞上划出一字痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入含有 QFG 的培养液后放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24 h, 于 6 h、18 h、24 h 不同时间点测量并拍照。

1.8 管腔形成实验 收集 HUVEC 细胞, 加入完全培养基, 分别制备密度为  $2.0 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 并按 2 ml/孔的原则接种于 6 孔板中, 培养于细胞培养箱, 待每孔细胞汇合度达到 50%~60% 时, 吸弃孔中原培养基, 并重新加入等体积不同浓度的 QFG (分别为 0、0.25、0.5、0.75 mg/ml), 干预 24 h 后, 将细胞收集并配制成  $2 \times 10^5$  细胞悬液, 以 1:1 比例加入基质胶中孵育 3 h 后观察成血管情况并拍照。

1.9 Western-blot 检测蛋白表达 总蛋白提取后, 约 50 μg 总蛋白进行 10% 和 12% 的 SDS-PAGE 胶电泳, 转膜后与稀释一抗 (浓度是 1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 切膜后缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温下摇床二抗孵育 1 h, 显影并拍照。

1.10 统计学分析 实验数据均用 SPSS22.0 统计学软件进行处理, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用 *t* 检验。计数资料用率表示, 采用卡方检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 QFG 对 HUVEC 形态的影响 倒置显微镜观察结果显示 HUVEC 经不同浓度的 QFG (0.25、0.5、0.75 mg/ml) 干预 24 h 后, 与对照组 (0 mg/ml) 比较, 各浓度药物均对 HUVEC 的形态和细胞密度无明显影响。该结果表明浓度  $\leq 0.75$  mg/ml 的 QFG 对 HUVEC 的生长没有影响。见图 1。

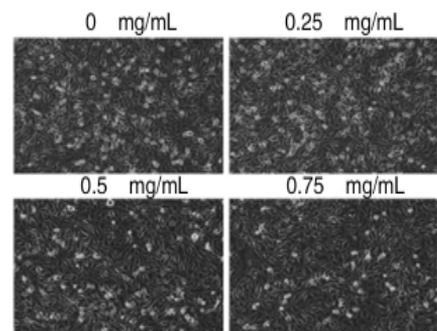


图 1 QFG 对 HUVEC 形态的影响 ( $\times 100$ )

2.2 QFG 对 HUVEC 活力的影响 MTT 检测结果显示, HUVEC 经不同浓度的 QFG 分别干预处理 24 h 和 48 h 后, HUVEC 的活力受到不同程度的影响,

当浓度  $\geq 0.75$  mg/ml 时, QFG 对 HUVEC 活力具有明显的抑制作用, 这种作用具有一定的剂量依赖性, 但无明显的时间依赖性。见表 1。

表 1 QFG 对 HUVEC 活力的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	浓度 (mg/ml)	HUVEC 抑制率 (%)	
		24 h	48 h
对照组	0.000	100.00 $\pm$ 3.51	100.00 $\pm$ 3.87
实验组	0.125	99.23 $\pm$ 2.26	92.43 $\pm$ 5.22
	0.250	91.42 $\pm$ 6.57	93.90 $\pm$ 4.01
	0.500	89.72 $\pm$ 5.63 $\Delta$	93.47 $\pm$ 5.14
	0.750	81.56 $\pm$ 3.11 $\Delta$	81.38 $\pm$ 2.55 $\Delta$
	1.000	59.27 $\pm$ 2.47 $\Delta$	54.21 $\pm$ 5.39 $\Delta$

注: 与对照组比较,  $\Delta P < 0.05, \Delta P < 0.01$ 。

2.3 QFG 对 HUVEC 迁移的影响 划痕实验结果显示 QFG 具有抑制 HUVEC 损伤修复能力的作用。划痕损伤 24 h 后, 对照组 HUVEC 的划痕已经铺满细胞, 而随着 QFG 给药浓度的不断增大, 给药组 HUVEC 细胞划痕中间的距离不断增大, 呈浓度依赖性。该结果证实 QFG 对 HUVEC 细胞迁移能力具有显著的抑制作用。见图 2。

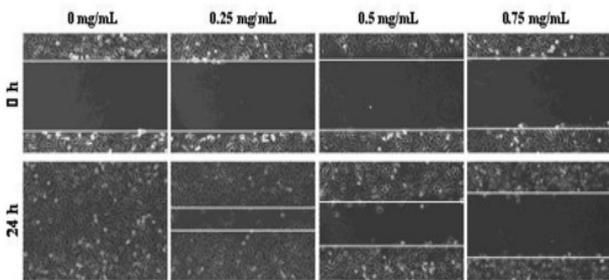


图 2 QFG 对 HUVEC 迁移能力的影响 ( $\times 100$ )

2.4 QFG 对 HUVEC 成血管能力的影响 体外成血管实验结果表明, 与对照组比较, QFG 处理后的 HUVEC 成血管能力随着给药剂量的增加而逐渐降低, 表现出显著的剂量依赖关系, 表明 QFG 具有抑制血管新生的作用。见图 3。

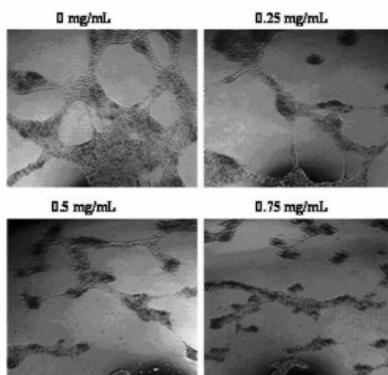


图 3 QFG 对 HUVEC 成血管能力的影响 ( $\times 100$ )

2.5 QFG 对 HUVEC 细胞中 VEGF-A、VEGFR-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 蛋白表达检测结

果显示, QFG 对 HUVEC 细胞中 VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白表达具有显著调控作用。与对照组比较, 随着给药浓度增加, VEGF-A、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平逐渐降低, 呈现显著浓度依赖关系。见图 4。

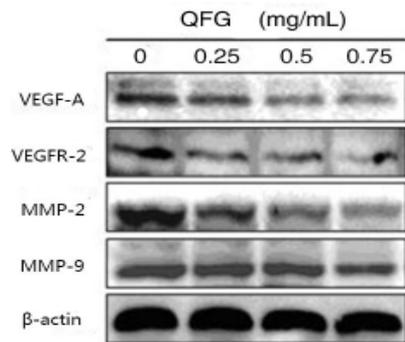


图 4 QFG 对 HUVEC 中 VEGF-A、VEGFR-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

### 3 讨论

实体肿瘤内部血管生成与促血管生长因子的分泌和表达直接相关。目前, 研究得较多而又透彻的促血管生长因子是血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)。其中, VEGF-A 在多种正常组织器官如肺、肾、心、卵巢等中均有表达, 同时它也是促进肿瘤血管生长的主要因子。VEGF-A 通过增加血管通透性, 导致血浆蛋白外漏, 大量纤维蛋白酶原聚集后形成临时基质, 使血管内皮细胞 (Vascular Endothelial Cell, VEC) 在血管外得以生存。VEC 细胞的增殖和迁移是血管新生的核心, 这与多种促血管生成因子有直接相关性, 如 VEGF-A、b-FGF、TGF- $\alpha$ 、PDGF、IL-8 等<sup>[3-4]</sup>。本研究结果发现 QFG 具有抑制 HUVEC 细胞活力的作用, 细胞形态学观察进一步佐证 QFG 可诱导 HUVEC 凋亡, 同时抑制 HUVEC 的迁移及体外成血管能力, 初步证实了 QFG 具有抑制肿瘤血管新生的作用, 这可能是 QFG 抗肿瘤作用的机制之一。

当 VEGF-A、VEGFR-2 与 VEC 表面整合素  $\alpha V \beta_3$  黏合后促进 VEC 增殖, 而后在激活基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMP) 作用下, 向胞外域迁移<sup>[5]</sup>。基质金属蛋白酶对基底膜及壁细胞的降解起调控作用, MMPs 会释放一些胞外基质中缺乏的促血管生长因子, 降解血管基底膜, 促进内皮细胞迁移及肿瘤血管的生成。MMP-2 和 MMP-9 是 MMP 家族中重要的 2 个因子, 血管新生启动过程的重要成员, 可通过促进 VEGF 的释放及其他血管形成因子的表达促进肿瘤血管的新生, 上调肿瘤的血管化<sup>[6]</sup>。有多篇报道证实中药通(下转第 160 页)

自护能力和社会能力,效果优于常规护理。

参考文献

[1]张红妹,王莹,王丽娜.协同护理模式对糖尿病住院患者自护能力及生活质量的影响[J].山西医药杂志,2016,45(15):1832-1834

[2]王卫,妮赵楠.自我管理体系对经皮肾穿刺射频激光治疗患者自护能力及复发率的影响[J].实用医学杂志,2016,32(11):1873-1876

[3]陈雪,史媛媛,李溪晶,等.Orem 自理护理模式对老年股骨近端骨折患者围术期应激反应及整体功能恢复的影响[J].中华现代护理杂志,2017,23(21):2764-2768

[4]郝翠英,温玉萍,柳关欣.合理情绪疗法联合疾病管理护理教育对尘

肺患者自护能力的影响[J].海南医学,2017,28(17):2918-2920

[5]龚宝玉.PDCA 循环结合阶梯式健康教育护理对 2 型糖尿病患者自护能力及疾病知识水平的影响[J].山西医药杂志,2017,46(12):1499-1501

[6]陈禧,孙乐.Oream 自理护理模式对放射性食管炎患者负性情绪及自理能力的影响[J].河北医药,2017,39(21):3340-3344

[7]沈慧,杨丽,沈丽.Orem 自理理论在鼻咽癌放疗患者口腔黏膜炎防治中的应用[J].广西医学,2016,38(12):1784-1786

[8]付莲英,杨海兰,廖爱民.基于 Orem 自护理论的更衣训练对脑卒中偏瘫患者日常生活活动能力的影响[J].现代临床护理,2017,16(7):25-29

(收稿日期: 2018-09-08)

(上接第 6 页)过调控 MMPs 及 VEGF、VEGFR 的作用抑制肿瘤血管生成,单体如大黄素、姜黄素、长春碱、喜树碱、苦参碱、去甲斑蝥素、小檗碱、丹参酮、川芎嗪等<sup>[7-13]</sup>,复方如六神丸、薏苡仁注射液、参麦注射液、泽泻饮、鳖甲煎丸等<sup>[14-18]</sup>。中药抑制肿瘤血管新生的机制主要是通过抑制血管生成因子及其受体的表达如 VEGF、b-FGF、VEGFR 等,抑制基质金属蛋白酶及其抑制物的表达如 MMP、TIMP,抑制黏附及趋化因子的表达如 ICAM、CXCR 等,抑制血管新生相关信号转导通路后降低微血管密度。本研究在明确 QFG 抑制肿瘤血管新生的作用后,进一步检测其对促血管生成因子 VEGF-A、VEGFR-2 及基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的表达调控,实验结果显示,QFG 显著抑制 VEGF-A、MMP-2、MMP-9 核心血管生成因子蛋白的表达。MMP-2 和 MMP-9 是血管新生启动过程的重要成员,活化的 MMP-2 定位于细胞穿透基质的突出部位,MMP-9 是以酶原的形式从胞内分泌到胞外,在酶解细胞间基质成分及基底膜的主要成分中起重要作用<sup>[19]</sup>。综上所述,QFG 可能是通过影响血管生成核心因子的表达进而影响相关信号通路的调控,从而达到抑制肿瘤血管新生作用,相关结果还需进一步实验验证。

参考文献

[1]陶旭辉,唐德才.肿瘤血管生成及中药抗肿瘤血管生成研究进展[J].中药材,2003,26(5):379-381

[2]杨弘,李煌,林露敏,等.清解扶正颗粒对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J].实用中西医结合临床,2018,18(4):181-183

[3]D'Alessio A,Moccia F,Li JH,et al.Angiogenesis and vasculogenesis in health and disease[J].Biomed Res Int,2015,2015:126582

[4]Guo D,Wang Q,Li C,et al.VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions [J].Oncotarget,2017,8(44):77020-77027

[5]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

[6]Zhang C,Wang N,Tan HY,et al.Targeting VEGF/VEGFRs Pathway in the Antiangiogenic Treatment of Human Cancers by Traditional Chinese Medicine[J].Integr Cancer Ther,2018,17(3):582-601

[7]Lin ML,Chung JG,Lu YC,et al.Rhein inhibits invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cells in vitro by down-regulation of matrix metalloproteinases-9 and vascular endothelial growth factor[J].Oral Oncol,2009,45(6):531-537

[8]Ribatti D,Nico B,Mangieri D,et al.In vivo inhibition of human hepatocellular carcinoma related angiogenesis by vinblastine and rapamycin[J].Histol Histopathol,2007,22(3):285-289

[9]Xiao D,Tan W,Li M,et al.Antiangiogenic potential of 10-hydroxycamptothecin[J].Life Sci,2001,69(14):1619-1628

[10]Lin SS,Lai KC,Hsu SC,et al.Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)[J].Cancer Lett,2009,285(2):127-133

[11]Yu P,Liu Q,Liu K,et al.Matrine suppresses breast cancer cell proliferation and invasion via VEGF-Akt-NF-kappaB signaling[J].Cytotechnology,2009,59(3):219-229

[12]杨菁,林菁.小檗碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(10):881-883

[13]Jin UH,Suh SJ,Chang HW,et al.Tanshinone II A from Salvia miltiorrhiza BUNGE inhibits human aortic smooth muscle cell migration and MMP-9 activity through AKT signaling pathway[J].J Cell Biochem,2008,104(1):15-26

[14]张春荣,姜伟,齐元富.六神丸对鼠 S180 生长的抑制作用与抑制血管生成的关系[J].中国预防医学杂志,2005,6(4):327-330

[15]刘钧,赵永年,张翔,等.泽泻饮对鸡胚绒毛尿囊膜血管的抑制作用[J].中华医药卫生,2003,1(1):62-64

[16]陈达理,张绪慧.鳖甲煎丸抗肿瘤血管生成的实验研究[J].浙江中医杂志,2004,39(12):535-537

[17]徐莉,丁志山,魏颖慧,等.参麦注射液对胃癌中 bFGF、PCNA 基因表达的影响[J].中成药,2006,28(4):530-532

[18]姜晓玲,张良,徐卓玉,等.薏苡仁注射液对血管生成的影响[J].肿瘤,2000,20(4):313-314

[19]Song G,Li Y,Jiang G.Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review) [J].Oncol Rep,2012,28(6):1935-1944

(收稿日期: 2018-09-01)