

芪黄疽愈方对下肢动脉硬化闭塞症大鼠VEGF蛋白表达及相关信号通路的影响

张敏妹¹, 张欣², 葛建立², 张静¹, 何建明², 马云龙², 孙云朝², 楚信强², 苏坤²

(¹河北中医学院, 石家庄 050011; ²河北省中医院, 石家庄 050011)

摘要: 目的: 探讨芪黄疽愈方对下肢动脉硬化闭塞症(ASOLE)大鼠血管内皮生长因子(VEGF)及相关信号通路的影响。方法: 高脂饮食联合隐动脉内膜损伤法制作大鼠ASOLE模型。芪黄疽愈方处理12周。ELISA检测血清VEGF。Western Blot检测肌肉组织VEGF、细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、p-ERK、p38、p-p38。结果: 模型组、芪黄疽愈方处理组大鼠血清VEGF显著低于空白组($P<0.01$); 与模型组比较, 各剂量芪黄疽愈方处理显著增加了ASOLE大鼠血清VEGF蛋白水平($P<0.01$), 其中芪黄疽愈方高、中浓度组显著高于低浓度组($P<0.01$)。模型组、芪黄疽愈方各剂量组大鼠肌肉组织VEGF、ERK、p-ERK、p38、p-p38蛋白水平显著低于空白组($P<0.05$); 与模型组比较, 芪黄疽愈方处理均有效升高了病变肌肉组织VEGF、ERK、p-ERK、p38、p-p38蛋白水平($P<0.05$), 与药物浓度呈相关性。结论: 芪黄疽愈方可促进VEGF分泌, 激活ERK、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路, 这可能参与了其治疗ASOLE的机制。

关键词: 芪黄疽愈方; 下肢动脉硬化闭塞症; 血管内皮生长因子; 细胞外信号调节蛋白激酶; p38丝裂原活化蛋白激酶; 方剂; 药理

基金资助: 河北省科技支撑计划项目(No.14277760D), 河北省中医药管理局项目(No.2018046, No.2019004)

Effects of Qihuang Juyu Formula on the expression of vascular endothelial growth factor and its related signaling pathways in arteriosclerosis obliterans of lower extremities rats

ZHANG Min-mei¹, ZHANG Xin², GE Jian-li², ZHANG Jing¹, HE Jian-ming², MA Yun-long², SUN Yun-chao², CHU Xin-qiang², SU Kun²

(¹Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China; ²Hebei Provincial TCM Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Qihuang Juyu Formula on vascular endothelial growth factor (VEGF) and its related signal pathway in rats with arteriosclerosis obliterans (ASOLE). Methods: ASOLE model was established by high-fat diet combined with intimal injury of saphenous artery. Rats were treated with Qihuang Juyu Formula for 12 weeks. Serum VEGF level was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). VEGF, extracellular regulated protein kinases (ERK), p-ERK, p38 and p-p38 were detected by Western Blot. Results: Compared with the model group, the serum VEGF level of model group and Qihuang Juyu Formula treatment group was significantly lower than that of control group ($P<0.01$); compared with the model group, Qihuang Juyu Formula treatment significantly increased the serum VEGF protein level of ASOLE rats ($P<0.01$), among which the levels of high and middle concentration groups of traditional Chinese medicine were significantly higher than that of low concentration group ($P<0.01$). The protein levels of VEGF, ERK, p-ERK, p38 and p-p38 in muscle tissue of model group and Qihuang Juyu Formula treatment group were significantly lower than those of control group ($P<0.05$); Compared with model group, Qihuang Juyu Formula treatment effectively increased the protein levels of VEGF, ERK, p-ERK, p38 and p-p38 in pathological muscle tissue ($P<0.05$), and the effect was correlated with drug concentration. Conclusion: Qihuang Juyu Formula can promote VEGF secretion and activate ERK and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, which may be involved in the mechanism of its treatment of ASOLE.

Key words: Qihuang Juyu Formula; Arteriosclerosis obliterans; Vascular endothelial growth factor (VEGF); extracellular regulated protein kinases (ERK); p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK); Formula; Pharmacology

Funding: Science and Technology Support Program of Hebei Province (No.14277760D), Project of Chinese Medicine Administration Bureau of Hebei Province (No.2018046, No.2019004)

通讯作者: 葛建立, 河北省石家庄市市长安区中山东路389号河北省中医院, 邮编: 050011, 电话: 0311-69095023

E-mail: gejianli591107@sohu.com

动脉硬化性闭塞症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) 是指由于动脉硬化造成的内膜增厚、管腔狭窄或闭塞, 导致相应区域供血不足的一系列疾病^[1]。腹主动脉与下肢中小动脉是ASO最常见的病变血管^[1]。ASO主要累及下肢动脉时, 表现为下肢皮温降低、间歇性跛行、疼痛, 乃至发生溃疡或坏死等的慢性进展性疾病, 称为下肢动脉硬化闭塞症 (arteriosclerosis obliterans of the lower extremities, ASOLE)^[1]。既往临床研究证实, 芪黄疽愈方有效改善了ASOLE患者肢体缺血症状, 但分子生物学机制尚不完全清楚^[2]。本研究以ASOLE大鼠为模型, 探讨了芪黄疽愈方治疗ASOLE的作用及可能机制。发现芪黄疽愈方显著提高了大鼠下肢肌肉血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、p38丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)、细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 及血清VEGF蛋白水平。

材料

1. 动物 清洁级雄性Wistar大鼠58只, (9±1)个月龄、体重(200±20)g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: 1704031。

2. 饲料制备 高脂饲料(83.5%基础饲料、5%猪油、1%胆固醇、0.5%胆酸钠及10%蛋黄粉^[3])。

3. 药物与试剂 芪黄疽愈方组成: 红花12g, 鸡血藤15g, 海藻12g, 浙贝母12g, 鬼箭羽12g, 土鳖虫9g, 延胡索12g, 黄芪20g, 黄精12g, 牛膝9g, 河北省中医院药剂科统一购买饮片, 由河北省中医院煎药室煎制4℃冰箱保存, 1周内使用。按原方的组方比例, 并根据体表面积的比例折算出200g大鼠的等效用药剂量作为其用量(0.4g生药/mL), 另取其1/2剂量和2倍剂量作为低浓度和高浓度组(低、高浓度分别为0.2、0.8g生药/mL); 维生素D3针剂(上海通用药业股份有限公司, 批号: 150804); ELISA试剂盒(上海纪宁实业有限公司, 货号: A05264); ECL试剂盒(Thermo, 货号: 34094); VEGF抗体(ab53465, 1:1 000)、ERK抗体(ab184699, 1:3 000)、p-ERK抗体(ab76299, 1:3 000)、p38抗体(ab182453, 1:1 000), 均购自Abcam公司; p-p38(AM063, 1:1 000)购自碧云天公司; 二抗购自Easybio公司。

4. 仪器 电子天平(Sartorius公司, 德国); 移液枪(Eppendorf公司, 法国); 微量加样吸头(北京中衫金桥生物有限公司); -80℃低温冰箱、4℃低温冰箱(青岛海尔); 去离子水仪(PALL, Purelab Plus, 美国); PVDF膜(Millipore, 美国); 通用显影粉、酸性定影粉(天津天陆海感光材料厂); 低温离心机(Eppendorf公司, 德国); 转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司); 电泳仪、凝胶玻璃板、固定夹、垂直电泳槽、转移槽(北京六一仪器厂)。

方法

1. 分组 采用随机数字表法将ASOLE大鼠分为模型组, 芪黄疽愈方高、中、低浓度组, 每组12只, 另设空白组10只。

2. ASOLE模型制作 采用高脂饮食加隐动脉内膜损伤的方法^[4]制作大鼠ASOLE模型。适应性喂养1周后, 1%戊巴比妥钠(1mL/200g)腹腔注射麻醉, 左后肢消毒, 从腹股沟中点向后肢内侧纵行切开皮肤, 分离并暴露隐动脉, 用动脉夹阻断隐动脉远、近端约(1.8±0.1)cm, 取胰岛素注射器1支, 沿隐动脉血管长轴由远端向近端刺入血管腔, 将0.25mL注射用无菌蒸馏水缓慢注入阻断部位血管, 5min后取下针头和动脉夹, 压迫止血, 缝合切口。造模过程中, 模型组、芪黄疽愈方低浓度组各死亡1只。

3. 给药方法 空白组: 普通饮食喂养, 自由饮水。模型组: 高脂饲料喂养, 在实验开始时在大鼠右下肢肌肉注射维生素D3针剂(3×10⁵U/kg体重), 每隔30天重复1次, 共计12周。造模成功后, 给予0.9%氯化钠溶液(1mL/100g大鼠)灌胃, 每日1次, 连续12周, 自由饮水。芪黄疽愈方低、中、高浓度组: 高脂饲料喂养, 在实验开始时在大鼠右下肢肌肉注射维生素D3针剂(3×10⁵U/kg体重), 每隔30天重复1次; 造模成功后, 各组给予相应浓度中药灌胃, 每日1次, 连续12周, 自由饮水。

4. 标本采集及处理方法 10%水合氯醛溶液(0.3mL/100g)腹腔麻醉处死。腹主动脉采血2mL, 血液自然凝固10min, 离心半径: 6cm, 4℃ 2 000r/min离心20min, 取上清液为血清。取隐动脉造模血管段内收肌, 装入冻存管, 液氮浸泡后, -80℃保存。

5. 检测指标

5.1 一般状态 观察大鼠的一般状态, 包括精神状态、毛色、活动灵敏度、饮食、饮水及体质量。

5.2 血清VEGF检测 利用ELISA试剂盒检测血清VEGF。取40μL样品稀释液、10μL样品、100μL酶标试剂, 上样于酶标板孔底部。37℃温育60min。弃去液体, 甩干, 洗涤5次。加入显色剂A与B各50μL, 37℃避光显色15min。加终止液50μL, 终止反应。450nm波长测量吸光度(OD值)^[5]。

5.3 Western Blot检测肌肉组织VEGF、ERK、p-ERK、p38、p-p38 冰浴条件下, 利用匀浆机, 将肌肉组织在预先加入蛋白酶抑制剂[1mmol/L PMSF, 5μg/mL亮抑酶肽(leupeptin), 2μg/mL天冬氨酸蛋白酶抑制剂(pepstatin), 4μg/mL胰蛋白酶抑制剂(aprotinin)]和磷酸化酶[(10mmol/L NaF, 1mmol/L Na₃VO₄, 10mmol/L β-甘油磷酸二钠盐五水合物(β-Glycerophosphate disodium salt pentahydrate)的RIPA Buffer [50mmol/L Tris base, 150mmol/L NaCl, 1%乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40), 0.25%脱氧胆酸钠(Na-deoxycholate), 1mmol/L EDTA]中裂解60s; 4℃ 10 000g离心15min。取上清液; -80℃保存^[6]。

样品与5×蛋白凝胶电泳上样缓冲液混合, 95℃变性10min, 冷却后加样。90V稳压电泳120min; 蛋白250mA稳压湿转60min至NC膜。封闭; 4℃孵化一抗过夜; 洗涤; 37℃孵化二抗1h。ECL试剂盒化学发光法显色^[6]。

6. 统计学方法 用SPSS 11.0进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 各组大鼠一般状态 空白组大鼠毛色光泽, 活动灵敏, 饮食、饮水量正常, 体质量随饲养时间延长而增加; 模型组、给药组大鼠在最初1个月增长迅速, 后增长速度减缓, 其精神萎靡, 活动欠灵敏, 毛色暗淡, 食量相对空白组也减少。

2. 芪黄疽愈方对ASOLE大鼠血清中VEGF水平的影响 见表1。模型组、各给药组大鼠血清VEGF水平显著低于空白组 ($P < 0.01$)。各给药组血清VEGF显著高于模型组 ($P < 0.01$); 中药处理效果与浓度呈一定相关性, 芪黄疽愈方中、高浓度组较芪黄疽愈方低浓度组效果显著 ($P < 0.01$), 但芪黄疽愈方中、高浓度组间差异无统计学意义。

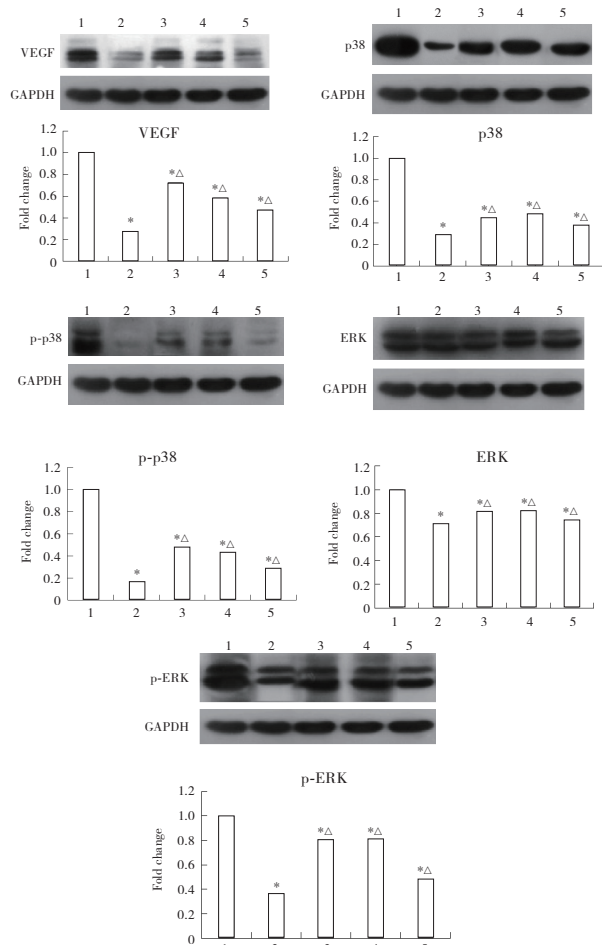


图1 Western Bolt检测大鼠肌肉组织中相关蛋白的表达

注: 1. 空白组; 2. 模型组; 3. 芪黄疽愈方高浓度组; 4. 芪黄疽愈方中浓度组; 5. 芪黄疽愈方低浓度组。与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表1 各组大鼠血清中VEGF水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	VEGF
空白组	10	200.20 ± 10.93
模型组	11	78.92 ± 10.95**
芪黄疽愈方低浓度组	11	107.79 ± 20.47** $\Delta\Delta$
芪黄疽愈方中浓度组	12	161.23 ± 35.06** $\Delta\Delta\Delta\Delta$
芪黄疽愈方高浓度组	12	164.46 ± 22.73** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与芪黄疽愈方低浓度组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3. 芪黄疽愈方对ASOLE大鼠肌肉VEGF蛋白水平的影响 见图1。模型组与各给药组VEGF显著低于空白组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组显著升高了肌肉VEGF的表达 ($P < 0.05$), 且与中药浓度有相关性。

4. 芪黄疽愈方对ASOLE大鼠肌肉p38、ERK活性的影响 见图1。模型组与各给药组p38、p-p38、ERK、p-ERK显著低于空白组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组能够显著升高肌肉p38、p-p38、ERK、p-ERK的表达 ($P < 0.05$), 且升高p-p38、p-ERK的作用较升高p38、ERK作用明显; 且与中药浓度有相关性。

讨论

治疗ASO是一个复杂的过程, 改善组织缺血区域血液灌注对促进血管新生起着重要作用^[7]。对于ASOLE而言, 血管新生同样具有指导意义^[7-8]。血管新生通过形成新生动脉血管改善缺血区域的灌注达到治疗目的^[9]。虽然实验室结果显示出血管新生的可能性与有效性, 但鲜有西药在临床实验中表现出证据确凿的、疗效确切的促血管新生作用^[8,10]。

促进血管新生的因子众多^[8]。其中, VEGF是特异性最高、功能最强的调控因子之一^[8,11]。VEGF能特异性地作用于血管内皮细胞, 诱导内皮细胞增殖、出芽、迁移并形成管腔^[12]。研究发现, 芪黄疽愈方处理有效升高了血清及病变组织VEGF蛋白水平, 且随中药浓度的增加而上升, 与中药浓度呈一定的相关性。结合笔者既往临床研究结果^[2], 芪黄疽愈方有效改善了ASOLE患者肢体循环指标。提示, VEGF促进血管新生是芪黄疽愈方治疗ASOLE的机制之一。

VEGF的调节作用与多个信号转导通路相关^[13]。研究证明, VEGF与内皮细胞生长因子受体 (VEGF-R) 结合后, 能够激发内皮细胞的有丝分裂活动, 促进内皮细胞增殖。MAPK是参与VEGF调节血管新生的重要途径^[13], 在促进内皮细胞增殖、转移及管道形成方面发挥着重要作用^[14]。MAPKs家族成员p38与ERK是参与VEGF调节血管生成的重要蛋白^[15]。MAPK中的p38可通过调节VEGF发挥血管新生的作用^[14]; MAPK信号转导通路中的ERK既可受到VEGF的调节, 又可调节VEGF^[16]。笔者发现, 芪黄疽愈方有效提高了ASOLE病变组织内p38、ERK的活性,

各给药组均显著高于模型组,且同样与中药浓度呈一定的相关性。结合前面的结果证明,通过调节p38、ERK、VEGF相关信号传导通路或网络可能是芪黄疽愈方治疗ASOLE的机制之一。

本病属中医学“脱疽”范畴。中医认为癥积阻络不通,气血周流受阻是导致ASOLE的病机关键。本课题组根据中医“气血津液”“标本虚实”及“久病入络”等理论,突破“阳虚寒凝”的固化思维,提出“癥积阻络”的发病观,确立“消癥通络”基本治疗大法,自拟芪黄疽愈方。方中以红花、鸡血藤活血化瘀通络,浙贝母、海藻化痰散结,四药合用消癥通络为君药;以鬼箭羽、土鳖虫、延胡索协助主药增强活血化瘀之效为臣药;黄芪、黄精益气养阴固本为佐药;使以牛膝引血下行。临床多用于ASOLE的治疗,诸药合用,标本兼治,使癥积得化,经络畅通。既往临床研究^[2]表明,其治疗ASOLE取得较好疗效,证实芪黄疽愈方能够改善ASOLE患者下肢缺血症状,促进下肢血液循环。本研究在前期临床研究的基础^[2]上,以ASOLE大鼠为模型,进一步检测芪黄疽愈方组方药效,观察芪黄疽愈方对ASOLE大鼠血清中VEGF及病变肌肉VEGF、ERK、p-ERK、p38、p-p38的表达影响,发现芪黄疽愈方处理显著升高了血清VEGF及病变肌肉VEGF、ERK、p-ERK、p38、p-p38的表达,且与中药浓度呈一定的相关性。

参 考 文 献

- [1] Zhang K, Song W, Li D, et al. The association between polymorphism of CARD8 rs2043211 and susceptibility to arteriosclerosis obliterans in Chinese Han male population. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1):173-180
- [2] 葛建立, 李晓东, 张欣, 等. “芪黄疽愈方”治疗糖尿病肢体动脉闭塞症80例临床研究. *江苏中医药*, 2016, 48(9):49-52
- [3] 石鹤坤, 张宏, 杜青云, 等. 三种高脂乳剂诱导实验性大鼠高脂血症模型的比较. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(9):55-57
- [4] 车兆义, 宋清斌, 张继文, 等. 大鼠动脉硬化闭塞模型两种构建方法的比较. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(50):9841-9844
- [5] 张惠洁, 郭卫东, 屈振杰. TACE联合索拉菲尼治疗原发性肝癌的疗效观察及血清VEGF、bFGF水平的变化. *现代肿瘤医学*, 2015, 21(23):3164-3168
- [6] He J, Shin H, Wei X, et al. NPC1L1 knockout protects against atherosclerosis associated tumorigenesis in mice. *BMC Cancer*, 2015, 15:189
- [7] Hou L, Yang G, Tang S, et al. Small molecule derived from carboxyethylpyrrole protein adducts promotes angiogenesis in a mouse model of peripheral arterial disease. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(18):e009234
- [8] Inampudi C, Akintoye E, Ando T, et al. Angiogenesis in peripheral arterial disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 39:60-67
- [9] 沈俊逸, 赵智明, 刘春丽, 等. 人参皂苷对大鼠脑血管内皮细胞MEG3表达的干预作用及促进血管新生的研究. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8):3418-3421
- [10] Gorenoi V, Brehm M U, Koch A, et al. Growth factors for angiogenesis in peripheral arterial disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 6:CD011741
- [11] Huang H, Salavaggione O, Rivalan L, et al. Woodchuck VEGF (wVEGF) characteristics: Model for angiogenesis and human hepatocellular carcinoma directed therapies. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 661:97-106
- [12] Cheng J, Yang H L, Gu C J, et al. Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2):945-955
- [13] Yamaguchi K, Sudo H, Imai K. Vascular endothelial growth factor signaling in VE-cadherin expression and tube-like formation by rheumatoid arthritic synovial fibroblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2):405-409
- [14] Sakai G, Tokuda H, Fujita K, et al. Heat shock protein 70 negatively regulates TGF- β -stimulated VEGF synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(3):1133-1145
- [15] Luo X, Gu S, Zhang Y, et al. Kinsenoside ameliorates oxidative stress-induced RPE cell apoptosis and inhibits angiogenesis via ERK/p38/NF- κ B/VEGF Signaling. *Front Pharmacol*, 2018, 9:240
- [16] Xu Z, Zhu C, Chen C, et al. CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-1/HIF-1 α /VEGF-A pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):974

(收稿日期: 2019年3月18日)