

· 论著 ·

骨科祛痰逐瘀方经 MAPK/ERK 通路诱导血管内皮细胞迁移与血管管腔形成

陈镇秋^{1,2} 洪郭驹^{2,3} 韩晓蕊⁴ 何伟^{1,2} 张庆文^{1,2} 魏秋实^{1,2*}

1. 广州中医药大学第一附属医院关节骨科, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学岭南医学中心国家重点学科中医骨伤科学实验室, 广东 广州 510405

3. 加拿大阿尔伯塔省埃德蒙顿阿尔伯塔大学医学院外科部, T6G 2R3

4. 广州市第一人民医院/华南理工大学第二附属医院放射科, 广东 广州 510006

中图分类号: R247 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 06-0747-06

摘要: **目的** 探究祛痰逐瘀方(Qutan Zhuyu Decoction, QZD)经 MAPK/ERK 通路诱导血管内皮细胞迁移与血管管腔形成的作用, 明确 QZD 在骨血管化重建中的机制。 **方法** 对大鼠进行 QZD 灌胃, 并采集和分离获得含药血清; 培养 SVEC 和 10T1/2 细胞, 分别将二者分为空白组、bFGF 组(阳性对照组)、QZD 中药组(实验组), 其中实验组为将 QZD 含药血清加入细胞培养基中。对干预后的 SVEC 进行迁移实验, 另外对 SVEC 进行管腔形成实验, 对 10T1/2 进行免疫荧光染色观察中药促管腔形成效果, 运用 Western blot 检测 ERK1/2、p38 等蛋白表达, 研究 QZD 对 SVEC 的作用机制。 **结果** (1) QZD 含药血清较空白组促进 SVEC 细胞的迁移($P < 0.05$); (2) QZD 含药血清较空白组可促进 SVEC 血管管腔形成, 包括管腔面积($P < 0.05$)和管腔腔周长度($P < 0.05$); (3) 荧光染色实验提示, QZD 含药血清较空白组促进 10T1/2 细胞呈规律性聚集, 并形成管腔状状态; (4) Western blot 实验提示, QZD 含药血清可促进 SVEC 中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化($P < 0.05$)。 **结论** QZD 经 MARK/ERK 通路调控和诱导血管内皮细胞的迁移和血管官腔的形成, 提示其可运用于骨血管化重建中。

关键词: 中医中药; 祛痰逐瘀方; 血管内皮细胞; 管腔形成; MARK/ERK; 周细胞

Orthopedic Qutan Zhuyu Decoction induces vascular endothelial cell migration and lumen formation via MAPK/ERK pathway

CHEN Zhenqiu^{1,2}, HONG Guojun^{2,3}, HAN Xiaorui⁴, HE Wei^{1,2}, ZHANG Qingwen^{1,2}, WEI Qiushi^{1,2*}

1. Department of Orthopedic, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405

2. Lab of Orthopedics and Traumatology of Chinese Medicine of Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405

3. Department of Surgery, University of Alberta, Edmonton T6G 2R3, Canada

4. Department of Radiology, Guangzhou First People's Hospital, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

* Corresponding author; WEI Qiushi, Email: weiqshi@126.com

Abstract: Objective Qutan Zhuyu Decoction (QZD) is an important prescription for the treatment of orthopedic diseases. The purpose of our study is to investigate the role of QZD in inducing vascular endothelial cell migration and vascular lumen formation via MAPK/ERK pathway, and to clarify the mechanism of QZD in bone vascularization. **Methods** QZD was administered to rats, and serum containing QZD was collected and isolated. SVEC and 10T1/2 cells were cultured and divided into blank group, bFGF group (positive control group) and QZD group (test group). QZD containing serum was added into the cell culture medium of the test group. The migration experiment was carried out on the SVEC after intervention; the SVEC was subjected to lumen formation experiment; the immunofluorescence staining of 10T1/2 was used to observe the effect of QZD on lumen formation; the expression of ERK1/2, p38 was detected by Western blot for measuring its mechanism. **Results** (1) QZD containing serum

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573996, 81473697, 81873327)

* 通信作者: 魏秋实, Email: weiqshi@126.com

promoted the migration of SVEC cells compared with the blank group ($P < 0.05$); (2) QZD-containing serum could promote the formation of SVEC vascular lumen, including lumen area ($P < 0.05$) and length of cavity ($P < 0.05$); (3) Fluorescence staining experiment suggested that QZD-containing serum promotes regular aggregation of 10T1/2 cells and forms a luminal state compared with the blank group; (4) Western blot test suggested that QZD containing serum promoted phosphorylation of ERK1/2 and p38 in SVEC ($P < 0.05$). **Conclusion** QZD regulates and induces vascular endothelial cell migration and lumen formation via MARK/ERK pathway, indicating that it can be used in bone vascular remodeling.

Key words: Chinese traditional medicine; Qutan Zhuyu Decoction; vascular endothelial cells; lumen formation; MARK/ERK; pericyte

血管形成与组织内血管化由多种细胞协同作用,主要包括血管内皮细胞(endothelial cell, EC)和周细胞(pericyte)^[1]。血管内皮细胞是组织表面的单层扁平上皮,具有构成血管腔结构、吞噬异物、集体免疫等功能^[2-3]。周细胞又称 Rouget 细胞,它通常存在于血管内皮细胞的基膜中,通过直接接触或者旁分泌信号,与内皮细胞发生细胞间的生物学反应,进而监视和稳定内皮细胞的成熟过程^[4]。血管化在骨组织重建中发挥重要作用,血管网通过激活骨内细胞,诱导破骨细胞吸收,促进成骨细胞生成新骨,从而维持骨稳态平衡^[5]。成功的药物运用,可透过血管内皮细胞和周细胞,在骨组织中发挥重要作用。然而,在目前的药物研发中,化学类药物能够发挥这一作用的较为局限,且副作用较多^[6]。

活血化痰类中药运用于临床由来已久,且作用显著,可用于增强骨血管化治疗效果。其中,祛痰逐瘀方(Qutan Zhuyu Decoction, QZD)由经典方剂四物汤和二陈汤有机组合而成,已被证明具有多项临床药理作用,如心脑血管等疾病^[7-8]。在既往的研究中,本团队已经从细胞层面和病理层面报道了QZD可以保护骨髓间充质干细胞脂肪化,从而提高移植后骨髓间充质干细胞的存活率^[9-10]。然而,QZD在血管的修复重建、血管内皮细胞的迁徙和增殖作用上知之甚少,限制了QZD在骨血管化的进一步深入拓展。在本研究中,研究团队证明了QZD通过激活类丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)促进血管内皮细胞迁移和血管管腔形成。QZD可能是增加干细胞替代疗法中细胞迁移的有希望的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究采用C57BL/6小鼠共30只。性别:雄性;级别:SPF级。体质量230~250 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格编号为(SCXK(粤)2014-0035);所有动物实验在广州中医药大学动物实验中心执行,编号为(SCXK(粤)2013-0001),并进行

标准饲养,标准鼠粮适应性饲养,室温(23 ± 2)℃,自由饮水,间隔光照12 h,并保持定期消毒、通风,各组小鼠按照单笼培养原则执行。临床和动物伦理审查:动物实验经过广州中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 复方QZD含药血清制作

QZD组成:熟地10 g、芍药10 g、当归10 g、川芎10 g、半夏10 g、陈皮10 g、茯苓10 g、甘草10 g,实验用中药均统一购自广州中医药大学第一附属医院。按照人与小鼠的剂量换算公式计算小鼠的每日灌胃剂量。上述药物水煎加热浓缩为浓度1 g/mL的药液,4℃保存备用。给药前将小鼠禁食6 h后采用QZD药液灌胃。1次/d,连续7 d。末次灌胃1 h后,水合氯醛0.5 mL/100 g腹腔注射麻醉后,腹主动脉取血。室温静置30 min后取上清液,3 000 r/min离心,分离血清,取上清液。冰冻保存备用。

1.3 细胞培养和处理

培养SVEC细胞(内皮细胞系,来自猿猴病毒转化小鼠)和10 T1/2细胞(周细胞前体细胞,来自小鼠间充质细胞系)(由University of Western Australia徐家科教授馈赠)。细胞维持在DMEM液中进行培养。在标准培养箱中,在5% CO₂和95%空气的湿润气氛下及37℃下培养。将3~5次传代的细胞用于实验。

1.4 划痕迁徙实验

将SVEC细胞在24孔板中在DMEM(Sigma公司,美国)中培养。在划痕前将细胞单层在无血清Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司,美国)中血清饥饿过夜。24 h后用移液管尖端刮擦融合细胞单层以产生划痕伤口。然后用Opti-MEM洗涤细胞两次以除去细胞碎片。在细胞中加入QZD含药血清或bFGF蛋白(Thermo Fisher Scientific公司,美国)的Opti-MEM作为阳性对照在37℃温育16 h。使用Nikon Eclipse TE2000-5显微镜在所选位置的0和16 h时间点捕获时间流逝图像,并且通过Image J软件估计伤口区域。

1.5 管腔形成实验

在开始实验之前,将 SVEC 细胞在无血清 DMEM 中血清饥饿过夜。将 Matrigel Matrix (Corning 公司,美国)在 4℃ 下解冻过夜,然后使用。24 h 后,将基质胶加入 24 孔板 (300 μ L/孔) 的孔中。将板在 37℃ 下孵育 30 min 以进行聚合。然后将 SVEC 细胞 (血清饥饿过夜) 接种到基质胶层上,并使其与 Opti-MEM 在 37℃ 下连接 30 min。然后除去培养基并用 QZD 含药血清或 bFGF 蛋白的 Opti-MEM 替换作为阳性对照。将细胞在 37℃ 下孵育 24 h。使用显微镜捕获 5 个随机选择的视野。使用 Image J 软件量化管长度和管覆盖面积。

1.6 免疫荧光染色

将 10T1/2 细胞接入六孔板中,汇合度达到 70%,在细胞中加入 QZD 含药血清或 bFGF 作为阳性对照。用 2% 多聚甲醛固定 10T1/2 细胞。PBS 洗 3 遍。用 0.2%~0.5% triton X-100 对细胞透化处理;PBS 洗 3 遍。2% BSA 封闭 30 min, PBS 洗两遍。加入一抗 α -SMA,室温孵育 1 h;加入二抗,室温孵育 30~45 min;PBS 洗 4 遍,每次 5 min。加入 0.5 μ g/mL DAPI (PBS 配制) 染色;用 PBS 洗 3 遍;加入 20 μ L 封片剂封片。使用显微镜进行观察 10T1/2 状态。

1.7 Western blot

将 SVEC 进行培养,在细胞中加入 QZD 含药血

清或 bFGF 作为阳性对照,经过 30 min 后停止反应,将 SVEC 细胞进行裂解备用。分别制备 SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶后,放入电泳的缓冲液。细胞裂解液与上样缓冲液充分混匀,置沸水浴中加热,冷却后用微量移液器吸取样品与预染蛋白并电泳。转膜缓冲液中制作滤纸、凝胶、PVDF 膜,350 mA 转膜。取出 PVDF 膜置于盛有脱脂奶粉的封闭液的平皿中,置于摇床上室温封闭 1 h。倾倒封闭液,加入一抗 (p-ERK1/2 和 p-p38 按 1:1000 稀释, β -actin 按 1:1000 稀释, Cell signaling technology 公司,美国),摇床上室温振荡孵育 2~4 h,孵育过夜。回收一抗,用 TBST 洗涤 5 次。加入相应鼠源二抗 (1:1000)。TBST 洗涤 3 次, TBS 洗涤 1 次。将发光显色试剂盒材料混合后,加在膜上接触反应后,放入凝胶成像系统中进行成像分析。使用 Image J 软件进行半定量分析。

2 结果

2.1 QZD 含药血清诱导 SVEC 细胞迁移

为了研究 QZD 含药血清对内皮细胞迁徙的生物学作用,使用 SVEC 细胞进行划痕迁徙试验进行测定。结果提示,与 PBS 对照相比,加入 QZD (100 ng/mL 和 200 ng/mL) 对 SVEC 细胞进行干预后可显著增强 SVEC 细胞迁移 (图 1)。bFGF (50 ng/mL) 用作阳性对照。

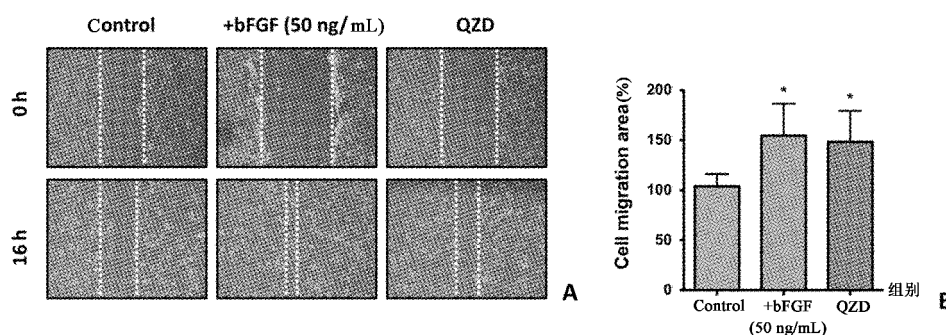


图1 QZD 含药血清诱导 SVEC 细胞迁徙 A: 实验组 (QZD)、阳性对照组 [+bFGF (50 ng/mL)] 较正常对照组均有促进 SVEC 迁徙; B: 细胞迁徙实验计数结果 (* $P<0.05$)。

Fig.1 QZD-containing serum induces migration of SVEC cells. A: Test group (QZD) and positive control group [+bFGF (50 ng/mL)] promoted SVEC migration compared with normal control group; B: Counting result of cell migration experiment (* $P<0.05$).

2.2 QZD 含药血清诱导管腔结构形成

为明确 QZD 含药血清对 SVEC 形成血管结构的作用,结果提示 QZD 含药血清可刺激 SVEC 细胞中管状结构的形成 (图 2A); 与 PBS 对照相比,加入

QZD 的实验组管腔腔周长度 ($P<0.05$) 和管腔面积 ($P<0.01$) 显著增强 (图 2B、2C)。bFGF (50 ng/mL) 用作阳性对照。

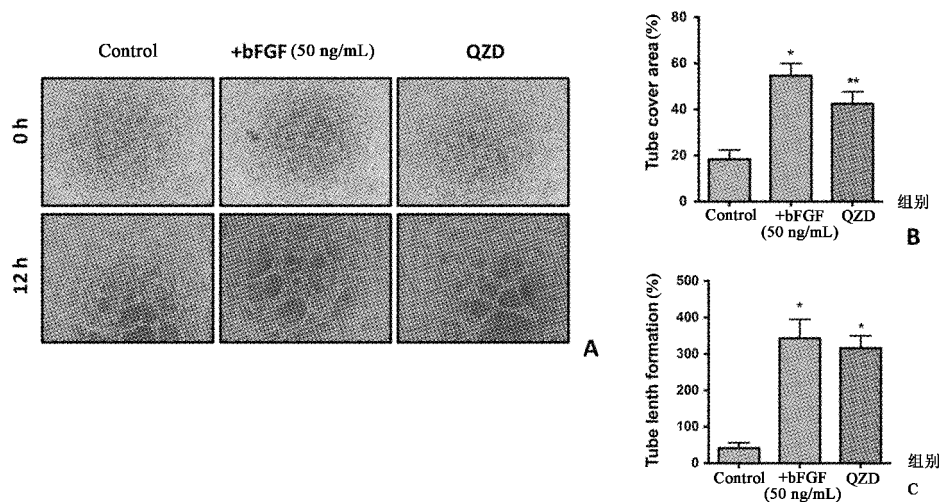


图 2 QZD 含药血清诱导管腔结果形成 A:实验组(QZD)、阳性对照组[+bFGF(50 ng/mL)]较正常对照组均有促进 SVEC 管腔结构形成;B:管腔面积计数结果(* $P<0.05$, ** $P<0.01$);C:管腔腔周长度计数结果(* $P<0.05$)。

Fig.2 QZD-containing serum induces lumen formation. A: Test group (QZD) and positive control Group [+bFGF (50 ng/mL)] promoted the formation of SVEC luminal structure compared with the normal control group; B: Counting result of tube area (* $P<0.05$, ** $P<0.01$); C: Counting results of cavity length (* $P<0.05$).

2.3 QZD 含药血清促进 10T1/2 细胞聚集

为了明确 QZD 含药血清对周细胞的作用,采用 QZD 对 10T1/2 细胞进行干预。结果提示,QZD 可促进 10T1/2 细胞聚集。与 PBS 对照相比,加入 QZD 的实验组绿色荧光增强,细胞聚集,并呈管腔状规律性排列(图 3)。bFGF(50 ng/mL)用作阳性对照。

2.4 QZD 含药血清经 MAPK/ERK 通路介导 SVEC

分化

为了明确 QZD 含药血清的作用机制,采用 QZD 对 SVEC 细胞进行干预,在 15 min 后收集细胞并进行 Western blot 检测。结果提示,在加入 QZD 含药血清后的 30 min 时,pERK1/2($P<0.01$)和 p-p38($P<0.05$)的表达量较空白对照组高,但较阳性对照组弱(图 4)。bFGF(50 ng/mL)用作阳性对照。

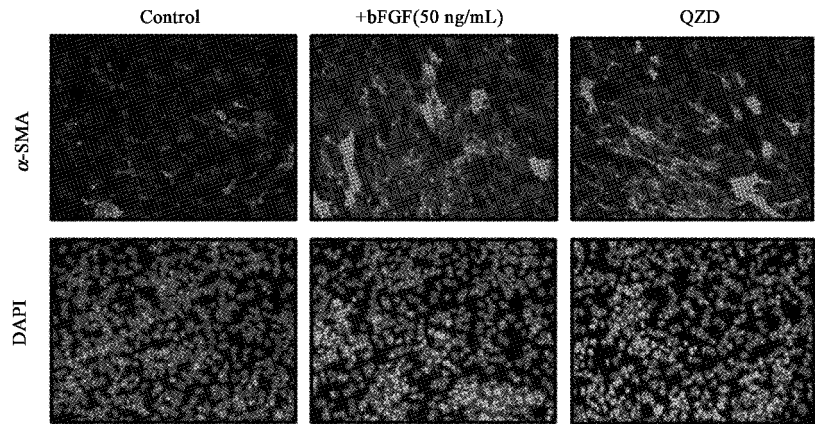


图 3 QZD 含药血清诱导管腔结果形成。实验组(QZD)、阳性对照组[+bFGF(50 ng/mL)]较正常对照组均促进 10T1/2 细胞的聚集、荧光表达增强和管腔状有序性排列

Fig.3 QZD containing serum induces lumen formation. Test group (QZD) and positive control Group [+bFGF (50 ng/mL)] promoted the aggregation and fluorescence expression of 10T1/2 cells compared with the normal control group. The lumens are arranged in an orderly manner.

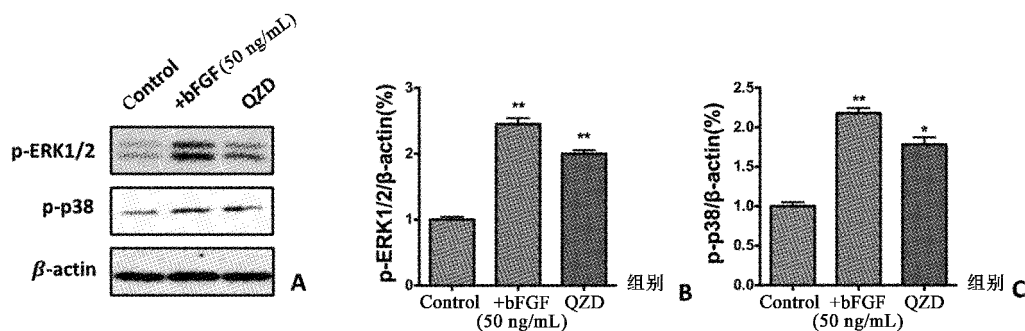


图4 QZD含药血清经MAPK/ERK通路介导SVEC分化 A:实验组(QZD)和阳性对照组[+bFGF(50 ng/mL)]的p-ERK1/2和p-p38的表达水平较空白对照组增高;B:p-ERK1/2与β-actin比值(** $P<0.01$);C:p-p38与β-actin比值(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。

Fig.4 QZD containing serum mediates SVEC differentiation via MAPK/ERK pathway. A: Expression of p-ERK1/2 and p-p38 in test group (QZD) and positive control group [+bFGF (50 ng/mL)] increased compared with normal control group; B: p-ERK1/2 and β-actin ratio (** $P<0.01$); C: p-p38 and β-actin ratio (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

3 讨论

血管内皮细胞和周细胞在骨代谢中血管重建具有重要作用,当血管内皮细胞受损时,与周细胞结合并塑造血管的能力降低,骨代谢受到极大的限制,而恢复细胞活性目前仍受到药物的限制^[3,11]。中药复方QZD是“祛瘀逐瘀法”的代表方,由二陈汤和四物汤组合而成,在临床上广泛运用于股骨头坏死、创伤后骨不愈合等多种骨科疑难疾病。前期研究表明,QZD具有显著促进BMSCs的增殖及促成骨转化能力,进而验证了“祛瘀逐瘀法”在预防激素性ONFH可能与调控BMSCs成骨分化有关^[9-10]。然而,QZD在血管内皮细胞和周细胞分化,以及血管重建的作用知之甚少。

本研究表明,QZD含药血清可以促进SVEC的迁移,说明QZD含药血清对于血管内皮细胞的分化具有重要的积极性。同时也间接说明了QZD促血管化的潜力可以运用于骨修复及血管重建的。但是,血管重建的过程是复杂的。在多种血管激活物和促进因子的作用下,血管内皮细胞的聚集和组合,形成了血管的基本构架^[12]。周细胞毗邻血管内皮细胞的基底部,通常以粘附或者连接的方式进行接触。特别是在逐渐成熟的新生血管中,周细胞从基底部向顶端迁徙和成熟,填补了血管内皮细胞之间的空隙,使血管趋于稳定^[13]。因此,在尝试验证QZD含药血清对于血管内皮细胞的血管管腔形成作用的同时,更需要验证QZD含药血清对于周细胞是否具有积极作用。

本研究表明,QZD含药血清不仅可以促进血管

管腔形成、增大管腔的面积和腔面周长,同时还能增加周细胞的聚集。由此说明,QZD对于血管重建的作用具有多方面、立体化、复合性的特点。如上所述,血管内皮细胞和周细胞的构建关系影响血管化重建的效果。二者的协同作用对于需要修复的组织或器官是非常关键的步骤,在骨组织中同样存在^[14-15]。在不加干预的骨血管化重建治疗期间,只有一小部分细胞能够获得有效的活性恢复和重构^[16]。在机能相对下降的慢性病患者或者老年性患者则更加缓慢,甚至导致进一步的骨坏死扩张和不愈合出现。因此,借助QZD提高多细胞的血管重构和修复能力是合理的。

另外,QZD含药血清干预血管内皮细胞的内在机制也值得关注。目前,已报道多种细胞信号传导途径与血管内皮细胞迁移分化的调节有关^[17-19]。据报道,细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)和P38丝裂原活化蛋白激酶(p38)在其中起关键作用,并参与增强血管内皮细胞的迁移^[20-21]。在本研究中,QZD含药血清处理30 min后,ERK1/2和p38磷酸化水平显著增加。这些数据表明,对于QZD含药血清所诱导的血管内皮细胞迁移与分化,ERK1/2和p38磷酸化的激活是必需的,这也是QZD促进血管化的机制之一。

本研究使用划痕迁徙实验和血管形成试验探究了QZD对SVEC分化的影响,以及对10T1/2对血管管腔成形的作用。结果提示,QZD可促进血管内皮细胞的迁移和管腔重建,且基于激活的ERK1/2和p38活化通路。尽管这一作用仍需要在活体中进行论证,但是QZD卓越的促血管化重建能力为未来

的中药精准化治疗奠定了坚实的理论基础和微观实证依据。

【参 考 文 献】

- [1] Domigan CK, Iruela-Arispe ML. Recent advances in vascular development[J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(3):176-183.
- [2] Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, et al. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7):1231-1244.
- [3] Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair[J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(3):224-228.
- [4] Schrimpf C, Teebken OE, Wilhelmi M, et al. The role of pericyte detachment in vascular rarefaction[J]. *J Vasc Res*, 2014, 51(4):247-258.
- [5] Stegen S, van Gestel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration[J]. *Bone*, 2015, 70:19-27.
- [6] Segar CE, Ogle ME, Botchwey EA. Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(19):3403-3419.
- [7] 杨建军.祛瘀逐瘀汤治疗不稳定型心绞痛的疗效观察[J].*中国医药指南*, 2012, 10(23):311-312.
- [8] 曹银洲,赵敏.祛瘀逐瘀汤治疗血管性痴呆临床研究[J].*中医学报*, 2015, 30(1):127-129.
- [9] 陈镇秋,何伟,魏秋实,等.祛瘀逐瘀法对激素性股骨头坏死兔骨髓基质干细胞生物活性的影响[J].*中华中医药杂志*, 2016, 31(11):2732-2735.
- [10] 陈镇秋,魏秋实,吴淮,等.祛瘀逐瘀法预防家兔激素性股骨头坏死的病理学评价[J].*中医正骨*, 2011, 23(7):17-19.
- [11] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492):323-328.
- [12] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. *Nature*, 2014, 507(7492):376-380.
- [13] Stratman AN, Davis GE. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization[J]. *Microsc Microanal*, 2012, 18(1):68-80.
- [14] Udagawa A, Sato S, Hasuike A, et al. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2013, 24(7):787-792.
- [15] Chim SM, Tickner J, Chow ST, et al. Angiogenic factors in bone local environment[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3):297-310.
- [16] Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2013, 99(3):170-191.
- [17] Wang S, Amato KR, Song W, et al. Regulation of endothelial cell proliferation and vascular assembly through distinct mTORC2 signaling pathways[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(7):1299-1313.
- [18] Chao CY, Lii CK, Ye SY, et al. Docosahexaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced cell migration via the GPR120/PP2A/ERK1/2/eNOS signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(18):4152-4158.
- [19] Li P, Guo X, Lei P, et al. PI3K/Akt/uncoupling protein 2 signaling pathway may be involved in cell senescence and apoptosis induced by angiotensin II in human vascular endothelial cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(10):6931-6937.
- [20] Chim SM, Kuek V, Chow ST, et al. EGFL7 is expressed in bone microenvironment and promotes angiogenesis via ERK, STAT3, and integrin signaling cascades[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1):82-94.
- [21] Kuek V, Yang Z, Chim SM, et al. NPNT is expressed by osteoblasts and mediates angiogenesis via the activation of extracellular signal-regulated kinase[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36210.

(收稿日期:2018-10-07;修回日期:2018-10-31)