

## · 基础研究 ·

# 黄芪与当归对体外培养糖尿病骨髓干细胞增殖和血管内皮生长因子表达的影响

沈斌<sup>1</sup>, 陈雷<sup>2</sup>, 周凯<sup>2</sup>, 金可可<sup>3</sup>

(1. 温州第八人民医院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院附属第一医院骨科; 3. 温州医学院病理生理学教研室)

**【摘要】**目的: 观察黄芪、当归及二者合用对体外培养大鼠骨髓干细胞增殖的影响, 并探讨其可能机制。方法: 自 2009 年 7 月至 2010 年 2 月, 选择 5 只雄性 200~220 g SD 大鼠高糖高脂饲料喂养 4 周后, 给予链脲佐菌素 (STZ) 按照 30 mg/kg 腹腔内注射 2 次诱发 2 型糖尿病, 1 周后检测血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 为 2 型糖尿病造模成功。密度梯度法分离 5 只大鼠骨髓干细胞, 分为空白对照组 (A 组)、黄芪组 (B 组)、当归组 (C 组)、黄芪当归组 (D 组)。空白对照组加入无血清 DMEM 100  $\mu$ l, 黄芪组、当归组、黄芪当归组分别加入等量的用无血清 DMEM 配制的黄芪煎液、当归煎液、黄芪当归合煎液, 终浓度分别为黄芪 1 100 mg/L, 当归 1 100 mg/L, 黄芪当归组含黄芪 1 100 mg/L, 当归 220 mg/L。各组细胞培养 14 d 后, 采用 MTT 法测定细胞增殖, ELISA 法检测细胞培养上清液 VEGF 蛋白浓度, Western-Blot 检测骨髓干细胞 VEGF 蛋白表达。结果: 与空白对照组比较, 黄芪组和黄芪当归组的骨髓干细胞增殖水平、上清液 VEGF 蛋白浓度、骨髓干细胞 VEGF 蛋白表达水平均明显增高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且黄芪当归组的以上作用均较黄芪组明显增强 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论: 单用黄芪或与其与当归合用均具有刺激体外培养骨髓干细胞增殖的作用, 可能与其促进 VEGF 蛋白表达增加有关, 但单用当归无上述作用。

**【关键词】** 黄芪; 当归; 血管内皮细胞生长因子类; 细胞增殖; 骨髓

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.08.009

**Effects of Astragalus and Angelica on bone marrow stem cells proliferation and VEGF protein expression in vitro**  
SHEN Bin, CHEN Lei, ZHOU Kai, JIN Ke-ke\*. \* Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effects of Astragalus and Angelica on bone marrow stem cells (BMSC) proliferation in vitro and investigate its possible mechanism. **Methods:** Five 200 to 220 g SD rats were fed with a high fat diet for 4 weeks and given 30 mg/kg streptozotocin (STZ) twice develop type II diabetes from July 2009 to February 2010. The rats with blood glucose concentrations of 16.7 mmol/L or more were considered diabetic. Bone Marrow Stem Cells (BMSC) were collected and isolated by density gradient centrifugation. The BMSC were divided into 4 groups, including empty control group, Astragalus group, Angelica group and Astragalus plus Angelica group. DMEM of 100  $\mu$ l was added in empty control group. DMEM of 100  $\mu$ l containing Astragalus (1 100 mg/L), Angelica (1 100 mg/L) and Astragalus (1 100 mg/L) combine with Angelica (220 mg/L) were added in Astragalus group, Angelica group and Astragalus plus Angelica group respectively. The cell proliferation was detected by MTT method, and the concentration of VEGF in the supernatant was determined by ELISA. The VEGF expression was analyzed by Western Blot after 14 days incubation. **Results:** The BMSC proliferation and the VEGF concentration in the supernatant and the BMSC VEGF protein expression significantly increased in Astragalus group and Astragalus plus Angelica group compared to those of empty control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The above effects were more strong in Astragalus plus Angelica group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Astragalus with Angelica or used separately could promote BMSC proliferation. The mechanism might induce the VEGF protein expression in BMSC. And the independent use of Angelica has no above effect.

**KEYWORDS** Astragalus membranaceus; Angelica sinensis; Vascular endothelial growth factors; Cell proliferation; Bone marrow

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(8): 652-655 www.zggszz.com

基金项目: 浙江省中医药项目 (编号: Y2007CA081); 温州市科技局项目 (编号: Y0090127)

Fund programs: Traditional Chinese Medicine Program of Zhejiang (No. Y2007CA081)

通讯作者: 金可可 Tel: 0577-86689817 E-mail: jkk6996@yahoo.com.cn

干细胞移植技术是目前最先进的医疗技术之一, 研究表明骨髓干细胞 (bone marrow stem cells, BMSC) 移植可促进缺血组织新生血管形成, 但由于从干细胞植入至新的毛细血管生成需要经历一定的时间, 有时影响组织血流的及时恢复, 因此寻求更为

有效的方法,以加快干细胞移植后血管生成速度及密度,为目前亟待解决的问题之一。黄芪与当归是中医学中的“甘温补气”和“补血活血”的要药,可促进细胞代谢,使细胞生长旺盛,有促进软骨细胞合成Ⅱ型胶原和糖胺多糖的作用<sup>[1]</sup>,可促进血管内皮细胞增殖<sup>[2]</sup>。本研究旨在观察中药黄芪、当归及二者合用对体外培养骨髓干细胞增殖和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响,为临床骨髓干细胞移植联合中药治疗慢性缺血性疾病提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 药物制备** 按常规方法将黄芪、当归分煎或合煎,配制黄芪煎剂(1 g/ml 生药黄芪),当归煎剂(1 g/ml 生药当归),黄芪、当归合煎剂(生药黄芪 1 g/ml,当归 0.2 g/ml),过滤,调节 pH 值为 7.0~7.4,高压蒸汽灭菌,4℃冰箱中保存备用。

**1.2 试剂** DMEM 细胞培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),四氮唑盐(MTT),胰蛋白酶(Sigma 公司),VEGF 定量 ELISA 试剂盒(上海卓康生物科技有限公司),VEGF 单抗(Santa Cruz 公司)。

**1.3 建立糖尿病大鼠模型** 5 只雄性 200~220 g SD 大鼠高糖高脂饲料喂养 4 周,予链脲佐菌素(STZ,购自 Sigma 公司)按 30 mg/kg 腹腔内注射 2 次诱发糖尿病,1 周后检测血糖 $\geq 16.7$  mmol/L 即为 2 型糖尿病造模成功<sup>[3]</sup>。

**1.4 骨髓干细胞分离与培养** 常规采集糖尿病大鼠股骨和胫骨骨髓,以 DMEM 培养液加用 10% 胎牛血清冲洗骨髓腔获得骨髓细胞,密度梯度法分离单个核细胞。在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 孵箱内培养,细胞贴壁并达 90% 以上融合后,以胰蛋白酶消化传代,实验选用第 3 代细胞。

**1.5 分组方法** 细胞随机分为 4 组,包括空白对照组(A 组)、黄芪组(B 组)、当归组(C 组)、黄芪当归组(D 组),空白对照组加入无血清 DMEM 100  $\mu$ l,黄芪组、当归组、黄芪当归组分别加入等量的用无血清 DMEM 配制的黄芪煎液、当归煎液、黄芪当归合煎液,终浓度分别为黄芪 1 100 mg/L,当归 1 100 mg/L,黄芪当归组含黄芪 1 100 mg/L、当归 220 mg/L。

## 1.6 观察项目与方法

**1.6.1 MTT 比色法测定骨髓干细胞的增殖活性** 取对数生长期细胞常规消化,调整细胞为  $5 \times 10^4$  个/ml,以每孔  $10^4$  个细胞密度接种于 96 孔培养板中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。细胞贴壁后随机分成 4 组(空白对照组、黄芪组、当归组、黄芪当归组),于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 14 d,吸出培养液,各孔加 20  $\mu$ l 的 MTT 液(以不含血清的 DMEM 高糖培养基配置,

浓度为 5 mg/ml),继续培养 4 h。小心吸弃培养液,加入 150  $\mu$ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。应用酶标仪 490 nm 处测定各孔的光吸收度(A 值)。

**1.6.2 酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定细胞培养上清液 VEGF 蛋白浓度** 分组同上,培养 14 d 后收集上清液备用,严格按照试剂盒说明进行操作。

**1.6.3 Western-Blot 检测 VEGF 蛋白表达水平** 各组细胞培养 14 d 后,按照说明书提取总蛋白,Bradford 比色法测定蛋白质浓度。蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h。加入 VEGF、 $\beta$ -actin 抗体,4℃孵育过夜。TBST(10 mmol/L Tris 碱、150 mmol/L 氯化钠、0.05% Tween-20,pH 8.0)洗膜。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜。化学发光剂显色,凝胶成像系统分析扫描结果, $\beta$ -actin 作为内参照。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间比较用 One-Way ANOVA 分析后,采用 Student-Newman-Keuls 检验。结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 骨髓干细胞的增殖活性** 单用黄芪或黄芪当归合用均能明显促进体外培养的骨髓干细胞增殖,与空白对照组比较,差异有统计学意义,且黄芪当归合用的增殖效应较单用黄芪显著,而单用当归组的细胞增殖水平与空白对照组比较无明显变化。各组的光吸收度(A 值)见表 1。

**2.2 细胞培养上清液 VEGF 蛋白浓度** 与空白对照组比较,当归组 VEGF 浓度无明显变化( $P > 0.05$ ),黄芪组和黄芪当归组 VEGF 浓度均明显升高,且黄芪当归组的 VEGF 浓度较黄芪组升高显著,见表 1。

**2.3 VEGF 蛋白表达水平** 与空白对照组比较,当归组 VEGF 表达无明显变化( $P > 0.05$ ),黄芪组和黄芪当归组 VEGF 蛋白表达明显增强,且黄芪当归组 VEGF 蛋白表达明显高于黄芪组,见图 1 和表 1。



图 1 各组的 VEGF 蛋白表达水平

Fig.1 Level of VEGF expression among different groups

## 3 讨论

骨髓干细胞是具有高度自我复制和多向分化潜能的原始细胞,在特定条件下,可定向分化形成各种组织细胞,目前主要应用于心肌缺血、肢体缺血等缺血性疾病的治疗和研究<sup>[4-5]</sup>。VEGF 是一种近年受关注的血管因子,具有较强的有丝分裂活性,能刺激血管内皮细胞、骨髓间充质干细胞的增殖以及多种血

表 1 各组光吸收度、VEGF 蛋白浓度及 VEGF 蛋白表达水平 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab.1 Results of absorbance value, concentration and level of VEGF expression among different groups ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	光吸收度 (A 值)	VEGF ( $\mu\text{g/L}$ )	VEGF/ $\beta$ -action (%)
空白对照组	0.119 $\pm$ 0.034	314.08 $\pm$ 100.90	50.67 $\pm$ 14.51
黄芪组	0.253 $\pm$ 0.086*	466.01 $\pm$ 94.40*	79.67 $\pm$ 20.57*
当归组	0.148 $\pm$ 0.065 $\Delta$	337.66 $\pm$ 94.29 $\Delta$	53.17 $\pm$ 19.58 $\Delta$
黄芪当归组	0.337 $\pm$ 0.070** $\Delta$ #	589.93 $\pm$ 116.81** $\Delta$ #	104.17 $\pm$ 20.51** $\Delta$ #

注:4 组比较,  $F_A=13.743, F_{VEGF}=9.378, F_{VEGF/\beta\text{-action}}=10.591, P$  均 $<0.05$ 。与空白对照组比较, \* $P<0.05, **P<0.01$ ;与黄芪组比较,  $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$ ;与当归组比较, # $P<0.05, ##P<0.01$

Note: Comparison among 4 groups,  $F_A=13.743, F_{VEGF}=9.378, F_{VEGF/\beta\text{-action}}=10.591, P$  均 $<0.05$ . Compared with empty control group, \* $P<0.05, **P<0.01$ ; compared with Astragalus group,  $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$ ; compared with Angelica group, # $P<0.05, ##P<0.01$

管活性物质的合成<sup>[4,6-8]</sup>。

中药黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,主要含有黄芪皂苷、黄芪多糖、氨基丁酸、微量元素等<sup>[9]</sup>。当归为伞形科植物当归的干燥根,含有阿魏酸、多种磷脂、人体必需氨基酸和微量元素等成分。现代药理学研究表明,两种药物均具有抗氧化、增强机体免疫功能、促进微循环、降低耗氧量、抑制血小板聚集等作用<sup>[10]</sup>。

本研究显示,在相同药物浓度下(1 100 mg/L),黄芪能促进体外培养的骨髓干细胞增殖,而当归未能发挥相似的作用,且黄芪能诱导骨髓干细胞 VEGF 蛋白的表达和分泌,而相同浓度的当归也不具有此作用。有研究报道,黄芪当归组方可能是通过促进 VEGF 表达而促进人脐静脉内皮细胞的增殖<sup>[2]</sup>。黄芪的主要有效成分黄芪甲甙能促进骨髓间充质干细胞的增殖及诱导分化<sup>[11]</sup>,VEGF 可由骨髓间充质干细胞分泌<sup>[12]</sup>,因此提示本研究中黄芪可能通过刺激骨髓干细胞中 VEGF 表达而促进细胞增殖。但据目前的报道,当归对于不同细胞的增殖作用具有不同的结论,当归单用可促进内皮细胞生长<sup>[2]</sup>;当归注射液能刺激细胞周期蛋白 D2 的表达,促进造血细胞的增殖,能促进辐射损伤小鼠骨髓细胞增殖<sup>[13]</sup>;当归提取物可促进胃上皮细胞移动和增殖而加速溃疡愈合<sup>[14-15]</sup>;但当归抑制主动脉平滑肌细胞增殖<sup>[16]</sup>。以上关于当归的不同实验结果也可能与研究者使用不同的当归浓度有关,近期研究表明,当归活性成分当归挥发油对人脐静脉内皮细胞增殖具有双向调节作用,低浓度时促进细胞增殖,减少 G0/G1 期细胞而显著增加 S 期细胞,并降低凋亡率;高浓度时则抑制增殖,显著增加 G0/G1 期细胞而减少 S 期细胞,并增加凋亡率<sup>[17]</sup>。

本研究还发现,虽然单用当归未能促进骨髓干细胞增殖,但当黄芪与当归以 5:1 含量配伍(生药黄芪 1 g/ml,当归 0.2 g/ml)使用时,其促进骨髓干细胞增殖的作用明显较单用黄芪时加强,同时 VEGF 蛋白表达和分泌也显著增强。研究也表明,黄芪与当归

配伍应用时,具有协同效应<sup>[2]</sup>。当归补血汤组方中黄芪量 5 倍于当归,可使黄芪中黄芪甲甙、黄芪多糖,当归中阿魏酸等有效成分的协同效应充分发挥<sup>[18]</sup>。

因此,本研究表明一定浓度的黄芪能诱导骨髓干细胞 VEGF 蛋白的表达和分泌,促进体外培养的骨髓干细胞增殖。若黄芪与当归合用,则上述作用明显增强,这为提高骨髓干细胞移植的疗效提供新的思路。

参考文献

- [1] 张宇明,卫小春.兔关节软骨细胞体外培养的生物特性及中药黄芪对其的影响[J].中国骨伤,2005,18(5):275-277.  
Zhang YM,Wei XC. Biological characteristics of rabbit articular chondrocytes cultured in vitro and effects of Chinese herbal Astragalus membranaceus on them[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2005,18(5):275-277. Chinese with abstract in English.
- [2] 雷燕,高倩,李悦山,等.黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究[J].中国中西医结合杂志,2003,23(10):753-756.  
Lei Y,Gao Q,Li YS,et al. Study on effects of astragalus,angelica and their combination on vascular endothelial cell proliferation in vitro[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi,2003,23(10):753-756. Chinese.
- [3] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等.2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J].临床和实验医学杂志,2009,8(4):5-6.  
Yan J,Guo WW,Liang ZQ,et al. Type 2 diabetes rat model and its verification[J]. Lin Chuang He Shi Yan Yi Xue Za Zhi,2009,8(4):5-6. Chinese.
- [4] Pons J,Huang Y,Arakawa-Hoyt J,et al. VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,376(2):419-422.
- [5] Kubo M,Li TS,Suzuki R,et al. Short-term pretreatment with low-dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,292(6):H2582-2588.
- [6] Ng YS,Krilleke D,Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis[J]. Exp Cell Res,2006,312(5):527-537.
- [7] Zachary I,Mathur A,Yla-Herttuala S,et al. Vascular protection;a novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(6):1512-1520.

- [8] Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: the basis of a cytoprotective effect[J]. Cardiovasc Res, 1999, 41(3): 509-510.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 212.  
China pharmacopeia committee. Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 212. Chinese.
- [10] 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 439-998.  
Wang YS, Deng WL, Xue CS. Pharmacology and application of Chinese materia medica[M]. 2nd Edition. Beijing: People Health Press, 1998: 439-998. Chinese.
- [11] 谭艳芳, 殷小成, 熊玉娟, 等. 黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞多种造血相关因子表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10): 1817-1820.  
Tan YF, Yin XC, Xiong YJ, et al. Effect of Astragaloside on hematopoietic growth factors expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2010, 14(10): 1817-1820. Chinese.
- [12] Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation[J]. J Cell Biochem, 2005, 95(4): 827-839.
- [13] 石清照, 汪晖, 徐之良, 等. 当归注射液对辐射损伤小鼠骨髓细胞黏附分子表达及增殖周期的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(4): 358-360.
- Shi QZ, Wang H, Xu ZL, et al. Influence of angelica sinensis injection on expression level of adherent molecule and proliferating cycle of bone marrow cells in irradiated mice[J]. Zhonghua Fang She Yi Xue Yu Fang Hu Za Zhi, 2006, 26(4): 358-360. Chinese.
- [14] Ye YN, So HL, Liu ES, et al. Effect of polysaccharides from angelica sinensis on gastric ulcer healing[J]. Life Sci, 2003, 72(8): 925-932.
- [15] Ye YN, Liu ES, Shin VY, et al. A mechanistic study of proliferation induced by Angelica sinensis in a normal gastric epithelial cell line[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(11): 1439-1448.
- [16] 李自成, 李庚山, 黄从新. 当归提取物对培养的兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(1): 28-30.  
Li ZC, Li GS, Huang CX. The effects of angelica extracts on the proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells in vitro[J]. Zhong Yao Yao Li Yu Lin Chuang, 1998, 14(1): 28-30. Chinese.
- [17] 刘凯, 张选奋, 张瑾, 等. 当归挥发油对人脐静脉内皮细胞增殖、凋亡及Ⅲ型胶原合成的影响[J]. 中华整形外科杂志, 2007, 23(3): 248-250.  
Liu K, Zhang XF, Zhang J, et al. Effect of angelicanaphtha on proliferation, apoptosis, collagen synthesis of human umbilical vein endothelial cells[J]. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2007, 23(3): 248-250. Chinese.
- [18] Zheng M, Liu wL, Sun HY, et al. Study on the effects of *Guiqi* oral liquid in promoting recovery of hematopoiesis in acute irradiation injured mice[J]. Chin J Integr Med, 2005, 11(4): 283-286.  
(收稿日期: 2010-11-09 本文编辑: 王宏)

## 《中国骨伤》编辑委员会名单

名誉主编: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

陈可冀(中国科学院院士) 葛宝丰(中国工程院院士) 沈自尹(中国科学院院士)  
王澍寰(中国工程院院士) 吴咸中(中国工程院院士) 钟世镇(中国工程院院士)

顾问: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

陈渭良 丁继华 冯天有 顾云伍 胡兴山 蒋位庄 孔繁锦 黎君若 李同生 梁克玉 刘柏龄 孟和  
沈冯君 施 杞 时光达 石印玉 孙材江 袁 浩 赵 易 朱惠芳 朱云龙 诸方受

主 编: 董福慧

副主编: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

敖英芳 白人骁 金鸿宾 李为农(常务) 吕厚山 邱 勇 孙树椿 王 岩 王满宜 卫小春

编委委员: (按首字汉语拼音字母顺序为序)

敖英芳 白人骁 毕大卫 陈仲强 董 健 董福慧 董清平 杜 宁 樊粤光 范顺武 郭万首 郭 卫  
何 伟 胡良平 金鸿宾 雷仲民 蒋 青 蒋协远 李盛华 李为农 李无阴 刘兴炎 刘亚波 刘 智  
刘忠军 刘仲前 罗从凤 吕厚山 吕 智 马远征 马真胜 邱 勇 阮狄克 沈 霖 孙常太 孙树椿  
孙天胜 谭明生 谭远超 童培建 王 岩 王爱民 王和鸣 王坤正 王满宜 王序全 王拥军 韦贵康  
卫小春 肖鲁伟 徐荣明 徐向阳 姚共和 姚树源 俞光荣 余庆阳 袁 文 詹红生 张 俐 张保中  
张春才 张功林 张英泽 赵 平 赵建宁 赵文海 郑忠东 周 卫 朱立国 朱振安 邹 季  
顾 华(美国) John W. McDonald(美国)