

# 炙甘草汤与右归饮对脐静脉内皮细胞表面 EPO 受体及 FLT3 表达的影响研究

马鹏<sup>1</sup>, 张泽渊<sup>2</sup>, 刘渊<sup>1</sup>

1. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 610075

**[摘要]** 目的: 探讨炙甘草汤、右归饮及右归饮+炙甘草汤组对脐静脉内皮细胞促红细胞生长素受体 (EPOR) 及 FLT3 表达的影响。方法: 脐静脉内皮细胞设空白对照组、炙甘草汤组、右归饮组、右归饮+炙甘草汤组, 每组分别加入相应的中药液, 于培养 3 天后采用免疫组化方法检测细胞表面 EPOR 及 FLT3 表达情况。结果: 在调节 EPOR 表达方面, 与空白对照组比较, 3 个给药组细胞表面 EPOR 表达均有所上调, 但右归饮组 EPOR 表达, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 3 个给药组之间比较, 差异不明显。炙甘草汤组能极大下调细胞表面 FLT3 的表达, 与空白对照组比较, 差异有非常显著性意义 ( $P < 0.001$ ); 右归饮+炙甘草汤组、右归饮组与空白对照组比较也下调了 FLT3 的表达, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 3 个给药组比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 中药刺激细胞表面 EPOR 与 FLT3 表达表现出相反效果, 炙甘草汤、右归饮调节作用存在特异性, 两个方剂作用机制存在差异。

**[关键词]** 炙甘草汤; 右归饮; 脐静脉内皮细胞; EPO 受体; FLT3

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 11-0203-03

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2014.11.080

关于血液生成的机理, 中医学认为以脾肾为主, 同时也与其它脏腑有关。其中心“主血脉”, 经过“奉心化赤”、“注之于脉, 化以为血”的过程, 参与血的生成。现代医学发现心血管内膜(主要是内皮细胞)参与了造血调控过程, 这与中医学的认识有惊人的相似之处。深入研究“心主血脉”理论, 认识心脏在生血过程中的具体作用, 既能深化脾肾生血理论, 也会进一步提高中医药对慢性再生障碍性贫血、肿瘤恶病质、慢性心衰、慢性肾衰等疾病过程中出现的“难治性血虚”证的辨证精度和治疗效果, 以及在外周血干细胞移植后骨髓造血重建的临床实践中进一步发挥作用。炙甘草汤作为《伤寒论》中治疗“脉结代, 心动悸”的主方, 广泛运用于临床冠心病、心律失常等心血管疾病, 并在血液系统、肿瘤等方面有大量研究<sup>[1]</sup>。右归饮出自《景岳全书》, 属于阴阳互济法的代表方剂, 为“阴中之阳药”。在临床有广泛应用, 如血证、火证、痰病等病症<sup>[2]</sup>。两方合用, 有温补肾阳、滋肾填精、健脾益气、养血复脉的效果。本实验拟比较两个方剂对脐静脉内皮细胞表面造血调控因子受体的影响, 探讨两个方剂在造血调控方面的作用, 比较分析两个方剂生血机制有无差异。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 购于中科院上海细胞库。

**1.2 主要药物与试剂** 炙甘草汤: 炙甘草、桂枝、人参、生地、麦冬、麻子仁、大枣、生姜、阿胶; 右归饮: 熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、甘草、杜仲、肉桂、制附子。所有中药均购自北京同仁堂。中药煎煮后进行过滤除渣、高温灭菌, 每毫升药液含生药 0.2g。DMEM 培养基(GIBCO), FBS (GIBCO), 谷氨酰胺(GIBCO), 六孔培养板(Corning), 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO), 盖玻片, 免疫组化试剂盒(中杉金桥), 人促红细胞生长素受体(EPOR)、FLT3 表达(博奥森生物技术公司)。

**1.3 实验分组** 细胞分为空白对照组(只加基本培养基, 不加中药液)、右归饮组、炙甘草汤组及右归饮+炙甘草汤组。

**1.4 免疫组化检测** 培养 3 天后取出六孔培养板, 吸弃原有培养基, HBSS 洗板 2 次, 4%多聚甲醛固定, 加入免疫组化试剂 A, 一抗 4℃孵育过夜, 加入免疫组化试剂 B、C, DAB 完全显色后中性树脂封片, 显微镜下观察分析。

**1.5 图像采集与处理** 采用同样的显微镜环境与拍摄条件来拍摄样品照片, 每组样品拍摄 9 张, 放大倍数 400 倍。在拍摄照片时, 要保持显微镜光源亮度的稳定, 用同样的曝光时间拍摄照片。在更换视野或切片时, 除了对焦距这个操作外, 其他所有的操作都不变化。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS19.0 统计软件, 计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )

**[收稿日期]** 2013-04-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81072728)

**[作者简介]** 马鹏 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 难治性血液病的临床思维及经验研究。

**[通讯作者]** 刘渊, E-mail: liuy60s@sina.com。

表示,采用  $t$  检测。

## 2 结果

2.1 各组细胞表面 EPOR 表达比较 见表 1。平均光密度分析发现,与空白对照组比较,3 个给药组细胞表面 EPOR 表达均有所上调,但仅有右归饮组 EPOR 表达变化具有差异( $P < 0.05$ )。

表 1 各组细胞表面 EPOR 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	平均光密度
空白对照组	9	0.2191 ± 0.0114
右归饮 + 炙甘草汤组	9	0.2284 ± 0.0067
右归饮组	9	0.2486 ± 0.0078
炙甘草汤组	9	0.2418 ± 0.0058

与空白对照组比较,① $P < 0.05$

2.2 各组脐静脉内皮细胞表面 FLT3 表达比较 见表 2。炙甘

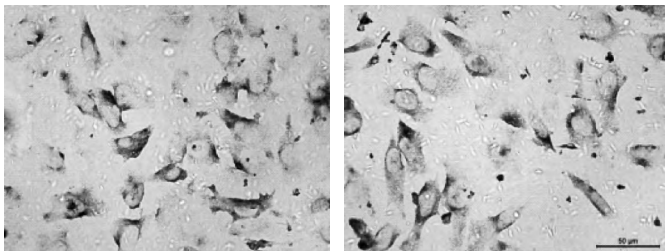


图 1 空白对照组( $\times 400$ ) 图 2 右归饮+炙甘草汤组( $\times 400$ )

草汤组能极大下调细胞表面 FLT3 的表达,与空白对照组比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.001$ );右归饮 + 炙甘草汤组、右归饮组与空白对照组比较也下调了 FLT3 的表达,但差异无显著性意义( $P > 0.05$ );3 个给药组比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组脐静脉内皮细胞表面 FLT3 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	平均光密度
空白对照组	9	0.2615 ± 0.0078
右归饮 + 炙甘草汤组	9	0.2555 ± 0.0074
右归饮组	9	0.2410 ± 0.0076
炙甘草汤组	9	0.2104 ± 0.0049

与空白对照组比较,① $P < 0.001$

2.3 免疫组化检测 EPOR 表达 见图 1~4。

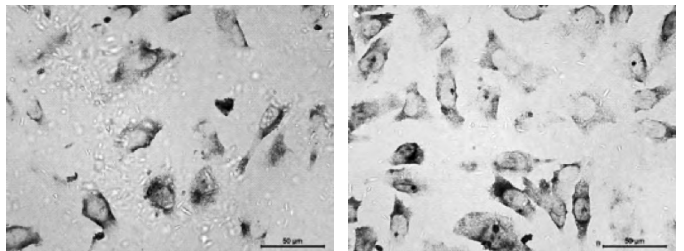


图 3 右归饮组( $\times 400$ ) 图 4 炙甘草汤组( $\times 400$ )

## 3 讨论

人的 EPOR 基因位于 19 号染色体,它编码的蛋白质 EPOR 是细胞因子受体超家族的一员,由 507 个氨基酸组成,其结构可分为 3 部分:细胞外部分,跨膜区域,胞质部分。EPOR 是通过与 EPO 结合形成二聚体而被活化的。活化后诱导 Jak2 磷酸化,磷酸化后的 Jak2 进而激活下游信号通路分子而发挥作用<sup>[9]</sup>。EPOR 的净效应是刺激靶细胞增殖,抑制凋亡和分化。以往认为,EPOR 仅存在于早期红细胞,而近年来大量研究发现,在很多非造血组织和细胞中,如神经系统、心血管系统、内皮细胞、胰腺、肺、肝脏、肾脏、子宫、实质瘤等也有 EPOR 的表达。可广泛促进细胞增殖、参与机体多种反应<sup>[4-5]</sup>。在以往的研究中,FLT3 作为造血调控因子 FL 的受体而受到重视,研究也主要集中在造血领域。FLT3 主要表达于早期造血祖细胞和各系造血定向干细胞的表面,在部分白血病细胞的表面也发现有 FLT3 的表达。

实验发现,中药制剂刺激脐静脉内皮细胞后对两种细胞表面受体产生相反作用,中药成分刺激细胞表面 EPOR 表达上调而另一方面刺激 FLT3 表达下调。在对 EPOR 的调节作用中,尤以右归饮作用效果最好,刺激 EPOR 上调效果最明显。因 EPOR 主要作用是与游离 EPO 相结合进而促进目的细胞增殖,所以 EPOR 表达上调最终将有利于目的细胞的扩增。3 个

给药组均能下调 FLT3 在细胞表面的表达,其中炙甘草汤下调效果最明显。综合实验结果可以发现,两个方剂虽然发挥着类似的作用,但针对不同目的调节时其效力却表现出差异,说明两个方剂的具体作用机制存在差异,关于两个方剂的作用机制还需进一步实验研究进行探讨。

## [参考文献]

- [1] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国医药出版社, 2003: 31-33.
- [2] 李克松. 右归饮抑制脑缺血糖皮质激素损伤海马神经元的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [3] 尹晓东, 徐建凯, 吴衍昌, 等. EPO/EPOR-JAK2-STAT5 信号传导通路在成釉细胞瘤中表达意义的研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(6): 1009-1014.
- [4] 马沐雅, 杨泽敏, 冯玫. 重组人促红细胞生成素对卵巢癌细胞 EPOR 表达及肿瘤增殖的影响[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(6): 11-13.
- [5] 葛全兴, 陈垦, 龙友明. EPO/EPOR 及其信号转导机制研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(5): 416-420.

(责任编辑: 马力)