

## 【药效学评价】

## 王不留行黄酮苷激活 bFGFR 及下游通路促进创伤愈合机制研究

侯豹<sup>1</sup>, 谭方根<sup>2</sup>, 史学林<sup>2</sup>, 蔡维维<sup>1</sup>, 邱丽颖<sup>1,2\*</sup>

1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

2. 江南大学药学院天然药物研究室, 江苏 无锡 214122

**摘要:** 目的 考察王不留行黄酮苷促创伤愈合作用, 并探讨其作用机制。方法 构建 SD 大鼠皮肤开放性创伤模型, 创伤部位分别涂抹 0.02 g 空白软膏剂基质 (模型组)、0.02 g 含 0.1% 王不留行黄酮苷的软膏剂 (王不留行黄酮苷组)、0.02 g 美宝润湿烧伤膏 (阳性药)。观察创伤愈合速率, 并取创伤部位皮肤制作石蜡切片, 通过 HE 染色进行组织病理学评估, 通过免疫组化染色观察增殖细胞核抗原 (PCNA)、p-碱性成纤维细胞生长因子受体 (p-bFGFR)、p-血管内皮细胞生长因子受体 (p-VEGFR)、CD31、p-Akt、p-Erk 表达, Western blotting 法分析 Erk 和 Akt 蛋白的磷酸化水平、bFGFR 磷酸化水平。结果 与模型组比较, 创伤后 3、6、9 d, 王不留行黄酮苷组显著促进开放性创伤愈合 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 随着时间的延长, 与模型组比较, 王不留行黄酮苷组中成纤维细胞和内皮细胞大量增殖, 炎症细胞增殖减少, 微血管密度显著增加 ( $P < 0.01$ ); 免疫组化及 Western blotting 结果显示, 与模型组比较, 王不留行黄酮苷组内皮细胞膜受体中 bFGFR 的磷酸化程度明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), p-VEGFR 磷酸化程度无明显变化, PI3K/Akt 与 MAPK/Erk 信号通路的节点蛋白 Akt 和 Erk 磷酸化程度均明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 王不留行黄酮苷促进开放性创伤愈合, 机制可能与激活 bFGFR 及其下游 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路相关。

**关键词:** 王不留行黄酮苷; 创伤愈合; bFGFR; 细胞增殖; 血管再生; MAPK/Erk; PI3K/Akt

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 06- 1006 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.012

## Mechanism of *Vaccaria segetalis* combined with bFGFR in promoting wound healing

HOU Bao<sup>1</sup>, TAN Fanggen<sup>2</sup>, SHI Xuelin<sup>2</sup>, CAI Weiwei<sup>1</sup>, QIU Liying<sup>1,2</sup>

1. Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. The Natural Medicine Laboratory, School of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of vaccarin on wound healing and to explore the mechanism of vaccarin promoting wound healing. **Methods** The open wound model of SD rat skin was constructed, and the wound sites were smeared with 0.02 g blank cream matrix (model group), 0.02 g containing 0.1% vaccarin (vaccarin group) or 0.02 g MEBO wetting burn ointment (positive drug). The rate of wound healing was observed and paraffin sections were made from the skin of the wound. Histopathological evaluation was performed by HE staining. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p-Akt, p-Erk P-basic fibroblast growth factor receptor (p-bFGFR), p-vascular endothelial cell growth factor receptor (p-VEGFR), and CD31 were observed by immunohistochemical staining. Western blotting method were used to analyze the phosphorylation level of Erk, Akt, and bFGFR protein. **Results** Compared with model group, 3, 6, and 9 d after trauma, vaccarin significantly promoted the healing of open wound healing ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). Compared with model group, the fibroblasts and endothelial cells in vaccarin group were proliferating, the proliferation of the inflammatory cells decreased and the microvessel density increased significantly ( $P < 0.01$ ); The results of immunohistochemistry and Western blotting showed that the degree of phosphorylation of bFGFR in the endothelial cell membrane receptor of vaccarin group was significantly higher than that in model group ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), and the degree of p-VEGFR

收稿日期: 2018-01-04

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (JUSRP51412B)

第一作者: 侯豹 (1989—), 硕士, 研究方向为中药药理。Tel: 15961867218 E-mail: houbao2015@163.com

\*通信作者: 邱丽颖, 教授, 主要从事中药药理研究。Tel: 13861690781 E-mail: qiulydoc@sina.com

phosphorylation was not significantly changed, and the degree of Akt and Erk phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathway were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Vaccarin could promote open wound healing, and may be related to activation of bFGFR and its downstream MAPK/Erk and PI3K/Akt signaling pathways.

**Keywords:** vaccarin; wound healing; bFGFR; cell proliferation; angiogenesis; MAPK/Erk; PI3K/Akt

王不留行 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 是一种广泛遍布于世界各地的一年生草本植物。如《神农本草经》所述,王不留行是一种常见中药,其根、茎、叶、花与种子皆可药用,目前对其种子的利用比较广泛<sup>[1]</sup>。王不留行的种子作为中药,传统上用于调经去肿、利尿和乳汁分泌、活血化瘀和活血消痈。王不留行黄酮苷(vaccarin)是从王不留行中提取出来的一种黄酮糖苷,为淡黄色颗粒状结晶,易溶于甲醇、甲醇-水、乙醇、乙醇-水、正丁醇等,难溶于氯仿、乙酸乙酯、石油醚等<sup>[2]</sup>,结构如图1所示。

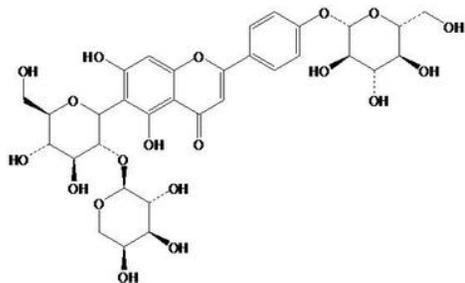


图1 王不留行黄酮苷结构式

Fig. 1 Structural formula of vaccarin

随着王不留行黄酮苷药用价值被广大学者认可,其提取和检测方法也不断被优化。在通过超法提取上,付起凤等<sup>[3]</sup>通过正交方法进行了工艺上的优化。但对其应用方面的研究甚少,实验室邱玉宇和邱丽颖等<sup>[4]</sup>前期研究发现,将王不留行黄酮苷涂于生物膜材料上用于开放性创伤的治疗取得了一定的成效;谢凤珊等<sup>[5]</sup>发现,王不留行黄酮苷对促进内皮细胞的增殖和迁移具有良好的效果。创伤愈合过程可以简单的分为炎症阶段、增生阶段和组织修整3个阶段<sup>[6-10]</sup>,血管再生是创伤愈合过程中不可缺少的阶段,也是增生阶段的主要部分。因此推测王不留行黄酮苷对促创伤愈合可能有良好的效果。本研究将王不留行黄酮苷应用于开放性创伤模型,并探讨其促创伤愈合机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与主要试剂

王不留行黄酮苷对照品,批号 53452-16-7,上海士峰生物科技有限公司,质量分数 98%;美宝润

湿烧伤膏(阳性药),购自汕头市美宝制药有限公司,产品批号 211937,规格 40 g 装。

无水乙醇、氯化钠、甘氨酸、Tris 碱、十二烷基硫酸钠、氢氧化钠、盐酸、吐温 20、脱脂奶粉、甲醛、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠,均购自国药集团化学试剂有限公司; p-Akt (ab66138)、p-Erk (ab76165)、 $\beta$ -tublin 抗体,购自 Abcam 公司; CD31 抗体,购自上海生物工程技术有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒,购自南京建成生物工程技术有限公司;苏木素染液、伊红染液,购自武汉博士德生物工程有限公司;ECL 超敏显色试剂盒、DAB 显色试剂盒,购自碧云天生物技术研究;增殖细胞核抗原(PCNA)抗体,购自万类生物有限公司; p-血管内皮细胞生长因子受体(p-VEGFR)抗体,购自 Affinity 公司; p-碱性成纤维细胞生长因子受体(p-bFGFR)抗体,购自 Abcam 公司。

### 1.2 实验仪器

AL104 型分析天平、电子天平[梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司];电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); Milli-Q 纯水仪(Millipore 公司);低速离心机(上海医疗器械厂生产);高速冷冻离心机(SIGMA 公司); pH 计(上海精密科学仪器有限公司); Nikon ECLIPSE Ti-U 正置荧光显微镜(Olympus 公司); Multiskankan Mk3 自动酶标仪(Labsystem 公司)。

### 1.3 实验动物

32 只 200~220 g 雄性 SD 大鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2014-0002。

## 2 方法

### 2.1 SD 大鼠开放性创伤模型的制备

32 只大鼠在动物房饲养 1 周适应环境,分为两组,麻醉后用提前消毒的剃毛刀将大鼠背部两侧的毛发剃除,用无菌水擦拭剃除毛发的背部<sup>[11]</sup>。在大鼠脊背两侧进行直径为 1 cm 的圆形皮肤全层切除,两处圆形创伤的距离在 2 cm 以上,防止产生干扰。

在一半造模成功的大鼠背部,将 0.02 g 的空白软膏剂基质涂抹于左侧开放性创伤部位作为模型

组,含0.1%王不留行黄酮苷的软膏剂0.02 g涂抹于右侧开放性创伤部位作为王不留行黄酮苷组;在另一组造模成功的大鼠背部,将0.02 g的空白软膏剂基质涂抹于左侧开放性创伤部位作为模型组,将0.02 g美宝润湿烧伤膏涂抹于右侧开放性创伤部位作为美宝润湿烧伤膏组。每天检测创伤部位恢复情况,在创伤后的3、6、9、11 d,每组处死4只SD大鼠,取创伤部位皮肤存放于-20℃的冰箱中备用。

第*N*天创伤愈合率=(第0天创伤面积-第*N*天创伤面积)/第0天创伤面积

为了考察王不留行黄酮苷促创伤愈合的效果,在预实验中设计了1.0%、0.2%、0.1%和0.05%4个给药浓度剂量组,发现0.1%浓度给药对促开放性创伤愈合的速度较其它组快。故选取0.1%浓度给药对创伤愈合进行评价。

## 2.2 HE染色对组织病理学评估

首先将蜡块中皮肤组织切成5 μm厚度的石蜡切片,在60℃的恒温箱中贴片2 h左右,然后依次放入新配制的60℃的二甲苯溶液中脱蜡2至3次,每次脱蜡的时间长为10~15 min,再按照顺序依次放入梯度酒精中确保彻底水化。最后,用双蒸水冲洗皮肤组织2次,每次冲洗时间为3~5 min。

在苏木素中染色10 min,伊红染色1 min,根据实验染料的具体特性使用梯度酒精脱水,在每个梯度酒精的中保留10~15 min,在二甲苯I和II中进行组织透明,最后选择用中性树脂封片,等片子将要干后于显微镜下拍照。通过Image-Pro Plus 6.0实验软件计数。

## 2.3 免疫组织化学检测PCNA、p-bFGFR、p-VEGFR、CD31、p-Akt、p-Erk的表达

将皮肤组织制成5 μm厚度的石蜡切片,依次脱水、脱蜡、水化。用3%过氧化氢对内源性过氧化物酶进行灭活。放入沸腾的枸橼酸缓冲液中25 min,然后预敷相应的一抗抗体,最后再敷二抗,经过DAB染色、脱水、透明、用中性树脂封片。在镜下观察,随机选取6个视野,高倍镜(400×)下拍照。

免疫组织化学中微血管密度测定法:参照WEIDNER的微血管计数方法<sup>[11]</sup>测定微血管密度。p-Akt、p-bFGFR2、PCNA、p-Erk、p-VEGFR2的表达测定法:染色成功后,在400倍的显微镜下进行拍照分析,用Image-Pro Plus 6.0分析所染蛋白表达

的累积光密度(Integrated Optical Density, IOD)值。平行分析10组切片中所关注蛋白的IOD值,取平均值作为各种蛋白的表达水平,模型组设为100%。

## 2.4 Western blotting分析相关靶蛋白的表达

首先提取皮肤组织蛋白,加样品缓冲液煮沸5 min,各取20 μL加样;采用质量分数为10%聚丙烯酰胺凝胶,在120 V、25 mA条件下电泳1.5 h;100 mA条件下NC膜转膜2 h。质量分数为5%山羊血清(PBS稀释)封闭,室温孵育60 min;分别加入不同浓度的一抗抗体稀释液和β-actin一抗,4℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔)进行显色。条带显色后拍照,然后用Image Lab软件对条带中目的蛋白进行灰度值分析,以目的蛋白与内参β-tubulin蛋白灰度比值代表目的蛋白表达水平,模型组设为100%。

## 2.5 统计方法

采用SPSS 20.0统计软件进行数据处理,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用*t*检验。所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 3 结果

### 3.1 对大鼠背部创伤愈合率的影响

皮肤的创伤愈合率是由伤口表面表皮再生的面积与创伤面积之比决定的。如图1A所示,王不留行黄酮苷组创伤愈合速度明显比模型组快。如图1B所示,与模型组比较,创伤后3、6、9 d,王不留行黄酮苷组显著促进开放性创伤愈合( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),在创伤后第6天王不留行黄酮苷组创伤愈合率达到86%,而模型组为69%。在创伤后第9天王不留行黄酮苷组创伤接近愈合,而模型组创伤依旧明显。

### 3.2 对创伤部位炎症细胞的影响

PCNA与细胞周期中DNA复制的S期有关,如图3A所示,在创伤后第6天,模型组和王不留行黄酮苷组中均有大量的炎症细胞增殖;另外王不留行黄酮苷组中成纤维细胞也有显著的增殖,内皮细胞有少量的增殖。在创伤后第9天,王不留行黄酮苷组中成纤维细胞和内皮细胞大量增殖,炎症细胞增殖减少;模型组成纤维细胞和内皮细胞也有少量增殖,但是炎症细胞仍有大量增殖。在创伤后第11天,王不留行黄酮苷组中内皮细胞增殖明显,在模型组中成纤维细胞和内皮细胞也展现出大量的增殖。结果表明,王不留行黄酮苷可以促使开放性创伤愈合过程,提前进入创伤愈合的增生阶段,缩短了局部炎症阶段时长。

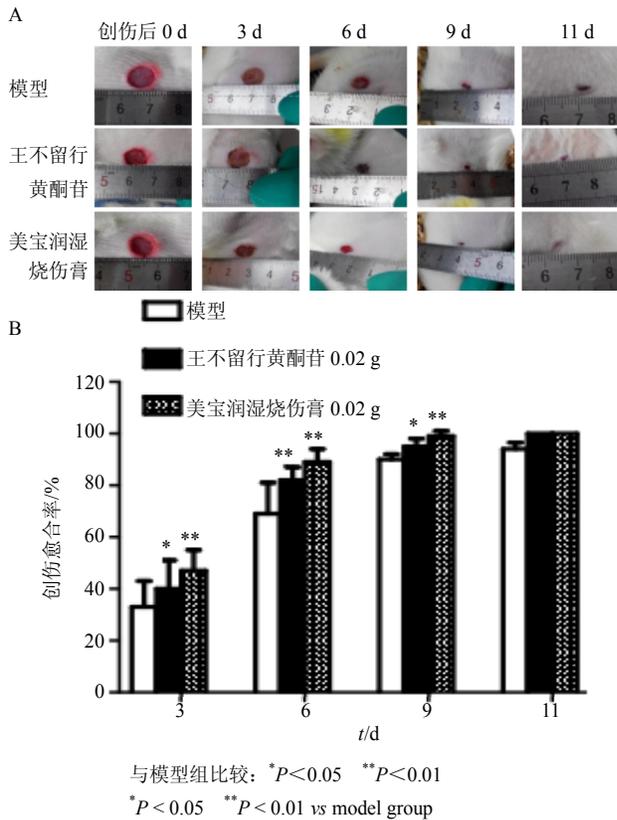


图2 大鼠背部创伤愈合率统计 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Statistics of wound healing rate on back of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

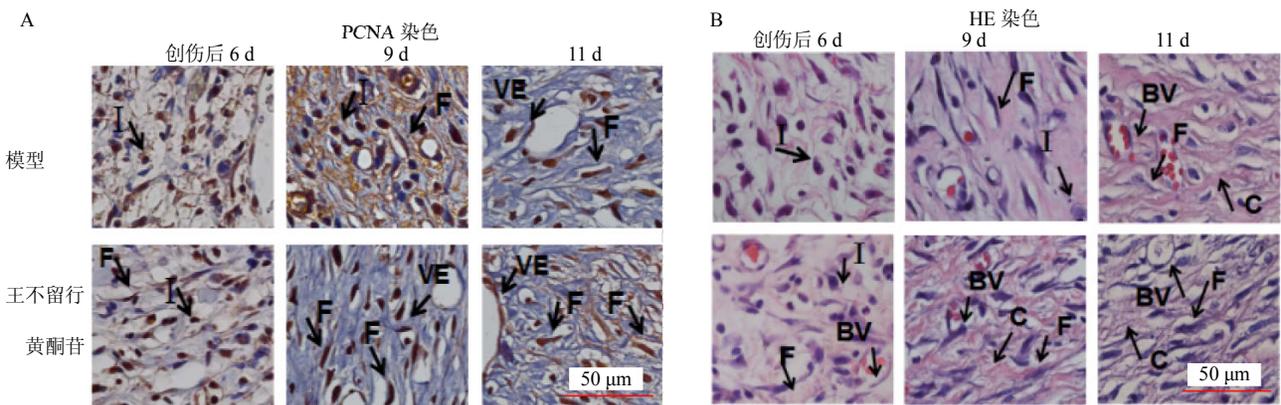
### 3.3 HE 染色进行组织病理学评估

如图 3B 所示, 在创伤后第 6 天, 王不留行黄酮苷组出现统一的厚的肉芽组织, 且产生胶原蛋白沉积, 与模型组比较, 成纤维细胞显著增殖, 创伤部位炎症细胞数量明显减少; 模型组仍然存在大量炎症细胞。在创伤后第 9 天, 王不留行黄酮苷组由于纤维细胞的大量增殖和胶原蛋白大量沉积使肉芽组织变的更厚; 模型组也开始出现一些成纤维细胞, 但仍有一些炎症细胞存在。在创伤后第 11 天, 王不留行黄酮苷组和模型组均生长出大量血管, 其中王不留行黄酮苷组皮肤组织中, 创伤部位的血管内皮细胞和成纤维细胞的增殖伴随着胶原蛋白的沉积, 并且创伤部位形成良好的肉芽组织。

### 3.4 对创伤部位微血管密度的影响

皮肤中新血管形成的活性指标测量, 是通过检测 CD31 的表达来检测微血管密度实现的, 在皮肤组织中微血管密度越大表明血管增殖速率越快。如图 4 所示, 通过免疫组织化学对 CD31 进行染色, 与模型组比较, 创伤后 6、9 d, 王不留行黄酮苷组中微血管密度显著增加 ( $P < 0.01$ )。

结果进一步说明, 王不留行黄酮苷可以促进血管再生、促内皮细胞增殖。但其促内皮细胞的增殖,



I-炎症细胞; F-成纤维细胞; BV-血管; C-胶原蛋白; VE-血管内皮细胞

I - inflammatory cells; F - fibroblasts; BV - blood vessels; C - collagen; VE - vascular endothelial cell

图3 创伤部位组织病理学评估

Fig. 3 Histopathological assessment of site of trauma

是由于促进创伤愈合提前进入增生阶段间接导致的? 还是直接促进内皮细胞增殖? 本实验进行了进一步研究。

### 3.5 对 p-VEGR 和 p-bFGFR 表达水平的影响

VEGF 在血管再生和成纤维细胞增殖的过程中起着重要作用, 当 VEGF 与 VEGFR 结合使 VEGFR

磷酸化, 随后激活下游负责内皮细胞迁移、增殖和分化的各种信号通路<sup>[12]</sup>。如图 5A、C 所示, 模型组和王不留行黄酮苷组中 p-VEGFR 的表达水平没有明显差异。结果表明, 王不留行黄酮苷可能不是通过作用于 VEGF/VEGFR 信号通路, 调节内皮细胞和皮肤组织中成纤维细胞的增殖, 进而促进血管再生的。

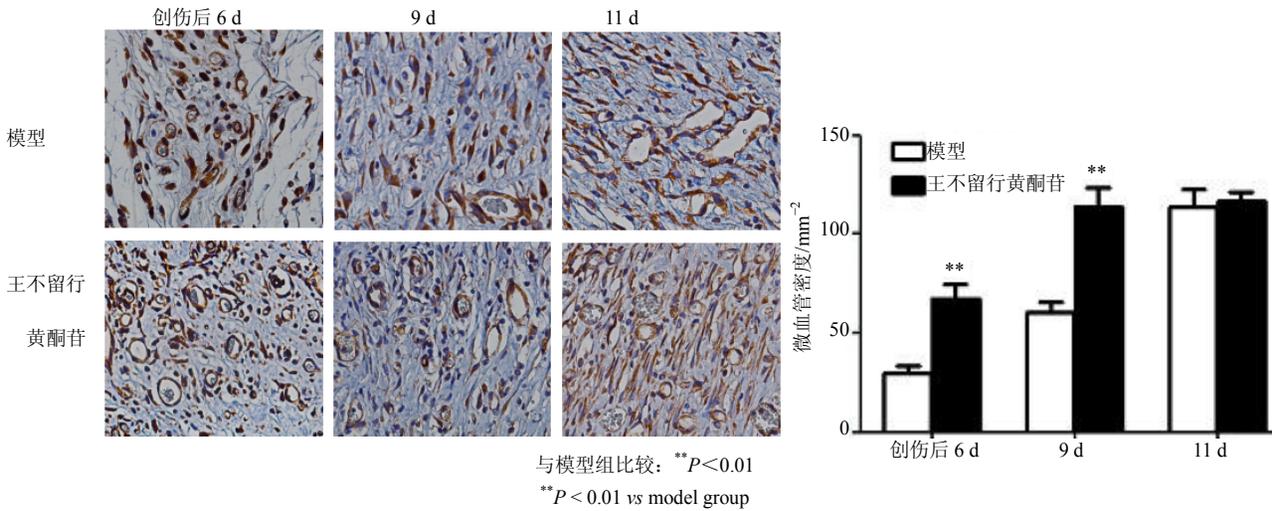


图 4 创伤部位微血管密度统计 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Statistics of microvascular density at site of trauma ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

bFGF 是一个强有力的血管生长因子，与复杂的生物学转运相关，由巨噬细胞释放，可以促内皮细胞和肌细胞增殖。bFGF 不仅在新血管再生通路中起着重要作用，在促进成纤维细胞增殖和迁移，合成纤连蛋白、胶原蛋白、蛋白聚糖和整合透明质酸方

面也有重要作用<sup>[13]</sup>。如图 5B、D 所示，与模型组比较，王不留行黄酮苷组 p-bFGFR 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明，王不留行黄酮苷可以通过作用于 bFGF/bFGFR 信号通路促使内皮细胞增殖，促进血管再生。

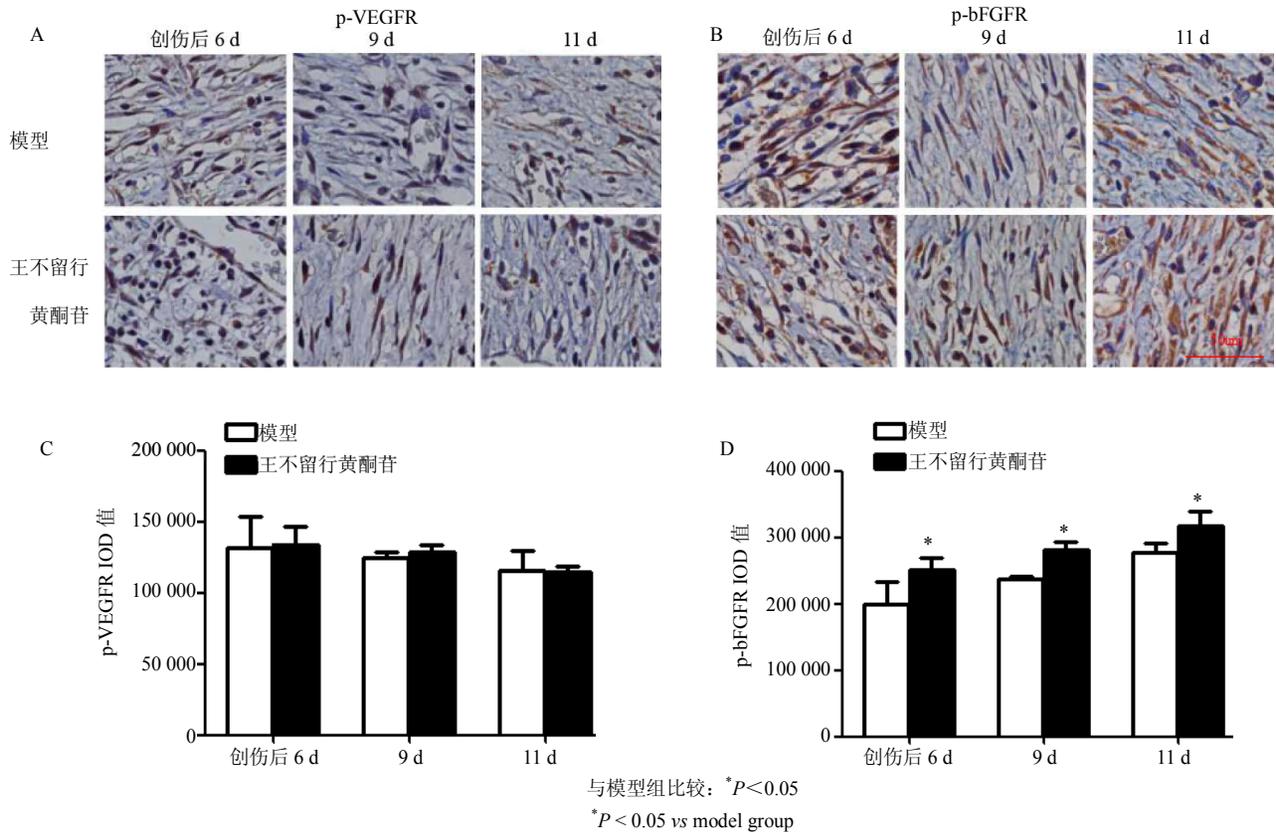


图 5 王不留行黄酮苷对 p-VEGR 和 p-bFGFR 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 5 Effects of vaccarin on expression of p - VEGR and p - bFGFR ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 3.6 对 p-Akt、p-Erk 靶蛋白表达水平的影响

PI3K 及其下游丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 在血管再生中发挥重要作用, 包括内皮细胞的迁移、增殖和生存。此外, 激活 MAPK/ERK 级联反应, 也可促进内皮细胞的增殖和迁移<sup>[14]</sup>。PI3K/Akt 通路是传递多种重要细胞功能信号的中心枢纽, 已有研究报道多种重要的生长因子可能通过上调 p-Akt 发挥其促血管生成的功能。如图 6A、C 所示, 与模型组比较, 创伤 6、9 d 后, 王不留行黄酮苷组中 p-Akt 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 表明 PI3K/Akt 信号通路可能被激活。

MAPK 信号传导主要包括 3 条通路, 其中 ERK1/2 信号传导通路是最常见的<sup>[13]</sup>。MAPK/ERK

信号传导通路的激活途径: 配体 (VEGF、FGF 等) - 受体 (RTK) - Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-核内转录因子。在此通路中 ERK1/2 是 MAPK 信号传导通路中的关键蛋白, 被磷酸活化的 ERK 不仅可以调节包浆内蛋白, 还可以进入细胞核与 c-fos、c-jun、Elk-1、c-myc 等转录因子结合, 调节细胞内的转录和翻译, 从而促进细胞有丝分裂和分化, 促进细胞增殖<sup>[15]</sup>。如图 6B、D 所示, 创伤 6、9 d 后, 王不留行黄酮苷组中 p-Erk 的表达水平显著高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 表明 MAPK/ERK 信号通路可能被激活, 王不留行黄酮苷可能是通过激活 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路促血管再生。

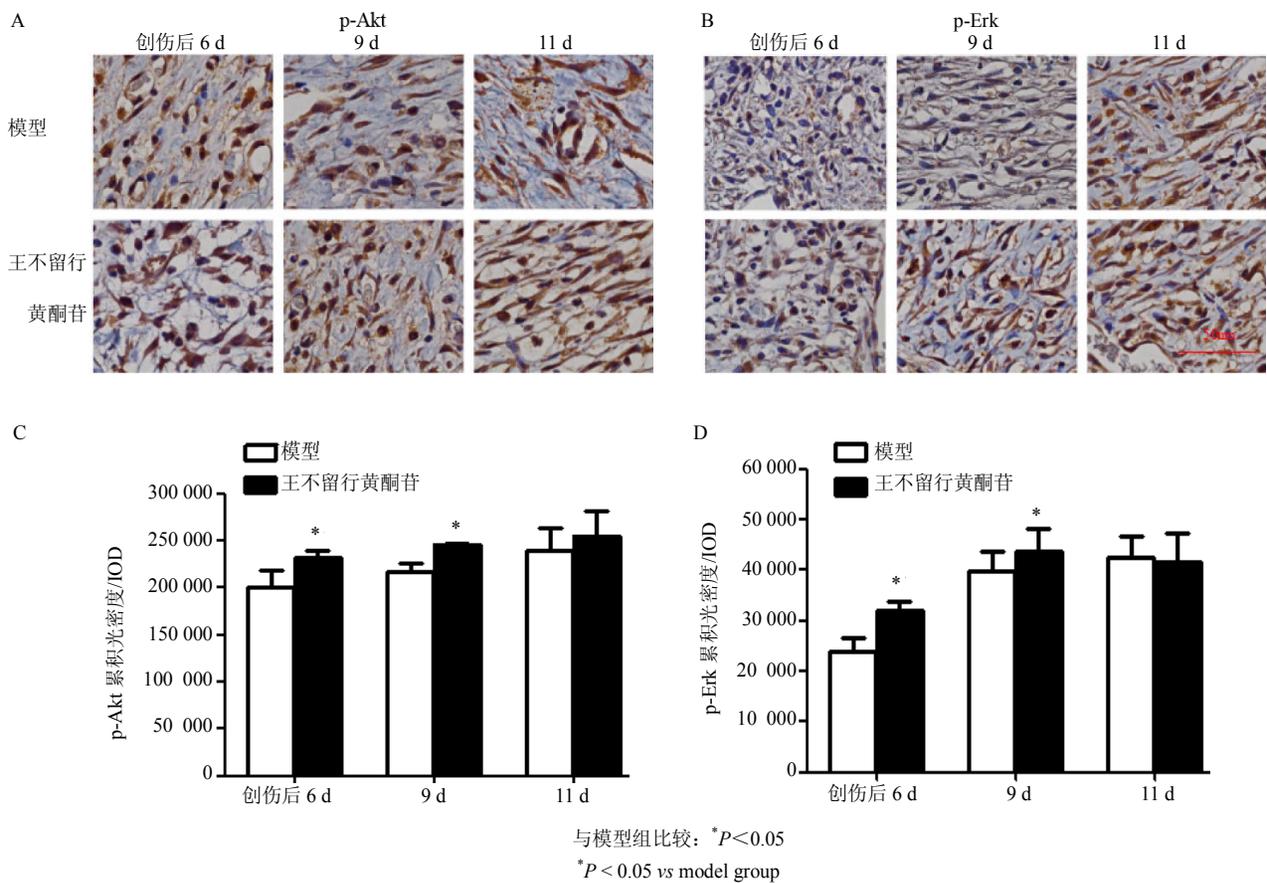


图 6 王不留行黄酮苷对 p-Akt、p-Erk 靶蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Fig. 6 Effects of vaccarin on target protein level of p-Akt and p-Erk ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 3.7 Western blotting 实验

如图 7 所示, 创伤 6、9 d 后, 在王不留行黄酮苷的作用下, 与模型组比较, Erk 和 Akt 蛋白的磷酸化水平、bFGFR 磷酸化水平明显上调 ( $P < 0.05$ ), 与上述免疫组化结果相结合, 说明王不留行黄酮苷可能是通过促进细胞增殖信号通路中 Erk 和 Akt 蛋白磷酸化, 使之活化, 从而促进皮肤组织中内皮

细胞的生长、增殖和迁移。

### 4 讨论

在创伤部位止血后, 一般情况下创伤愈合过程可分为 3 个阶段, 首先是局部炎症阶段: 在该阶段创伤部位聚集大量炎症细胞, 目的是清除损伤或坏死组织, 为修复创造条件; 然后是组织增生阶段: 在该阶段细胞增殖分化、血管再生、肉芽组织形成;

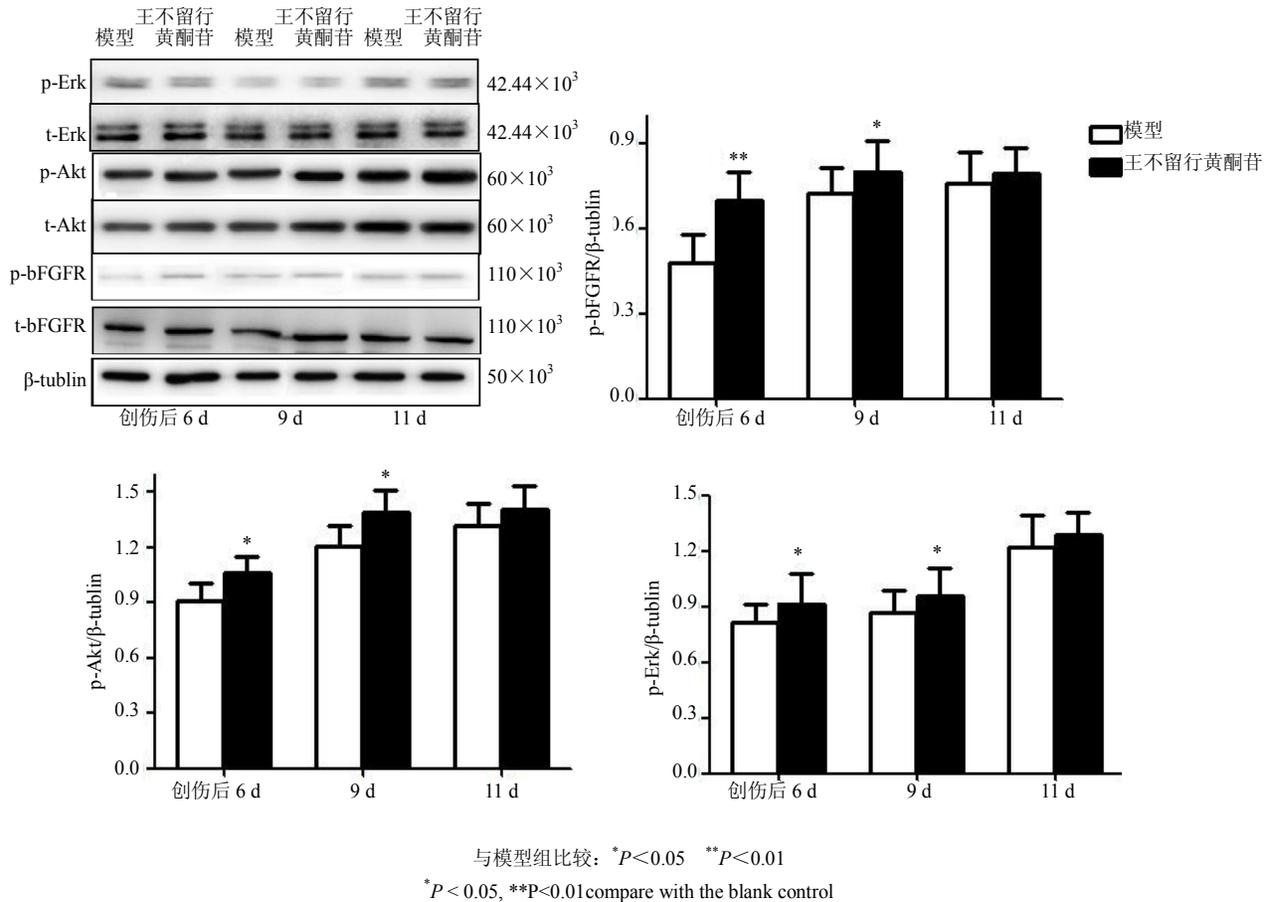


图 7 王不留行黄酮苷对创伤愈合过程皮肤组织中相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 7 Effects of vaccarin on expression of related proteins in skin of wound healing ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

最后是组织修复阶段：在该阶段成纤维细胞快速大量增殖、创伤部位疤痕形成、恢复皮肤的各种正常功能<sup>[8-9]</sup>。因此为探讨王不留行黄酮苷促创伤愈合途径，首先对创伤部位炎症阶段的各种炎细胞进行染色计数，进行统计分析。然后对大鼠皮肤组织增生阶段的成纤维细胞和内皮细胞进行计数统计分析。

经 HE 染色发现，王不留行黄酮苷组创伤愈合的炎症阶段的周期缩短，增生阶段提前。同时成纤维细胞的大量增殖也为研究王不留行黄酮苷促创伤愈合的机制指明了方向。

经过 HE 染色，发现成纤维细胞的大量增殖和胶原蛋白的大量沉积使肉芽组织变得更厚。而经过对 p-bFGFR 染色发现，王不留行黄酮苷组中 p-bFGFR 的表达水平更高，说明 bFGFR 被活化的程度加强，因此这与 HE 染色结果相符，表明王不留行黄酮苷促进成纤维细胞的大量增殖是通过激活 bFGFR 发挥作用的。CD31 染色发现，内皮细胞大量增殖，但是 VEGFR 并没有被激活，因此可以确定促进内

皮细胞再生，是由于王不留行黄酮苷促进创伤愈合提前进入增生阶段间接导致的。磷酸化的 ERK 可以转移到细胞核内，激活不同的转录因子，导致转录基因和细胞增殖发生变化。因此经过对大鼠皮肤创伤愈合组织中 p-Akt、p-Erk 的表达水平研究发现，血管新生过程中的关键蛋白 Akt 和 Erk 蛋白的磷酸化水平显著上调。

免疫组织化学实验和 Western blotting 实验结果表明，血管新生过程中的关键蛋白 Akt 和 Erk 蛋白的磷酸化水平显著上调，bFGFR 的磷酸化水平也显著上调，说明王不留行黄酮苷诱导血管再生、加速创伤愈合，可能是通过激活 bFGFR，然后激活其下游 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
[2] 孟 贺, 陈玉平, 秦文杰, 等. 王不留行中黄酮苷的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 874-876.  
[3] 付起凤, 薛 娟, 张万鹏, 等. 正交法优化王不留行中

- 王不留行黄酮苷的超声提取工艺 [J]. 哈尔滨医药, 2016, 1: 69-70, 73.
- [4] Qiu Y, Qiu L, Cui J, et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 59: 303-309.
- [5] Xie F, Feng L, Cai W, et al. Vaccarin promotes endothelial cell proliferation in association with neovascularization *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 1131-1136.
- [6] Li J, Chen J, Kirsener R. Pathophysiology of acute Wound healing [J]. Clin Dermatol, 2007, 25: 9-18.
- [7] Chen X, Peng L H, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139: 721-727.
- [8] Gould L, Abadir P, Brem H, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research [J]. J Am Geriatr Soc, 2015, 63(3): 427-438.
- [9] He H, Xia D L, Chen Y P, et al. Evaluation of a two-stage antibacterial hydrogel dressing for healing in an infected diabetic wound [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017, 105 (7): 1808-1817.
- [10] Zhu X, Sun Y, Mu X, et al. Phospholipase Cepsilon deficiency delays the early stage of cutaneous wound healing and attenuates scar formation in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(1): 144-151.
- [11] Chen X, Peng L H, Li N, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(3): 721-727.
- [12] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36 (2): 169-180.
- [13] Dai X, Liu D, Liu M, et al. Anti-metastatic efficacy of Traditional Chinese Medicine (TCM) ginsenoside conjugated to a VEGFR-3 antibody on human gastric cancer in an orthotopic mouse model [J]. Anticancer Res, 2017, 37(3): 979-986.
- [14] Pranjol M Z I, Gutowski N J, Hannemann M, et al. Cathepsin D non-proteolytically induces proliferation and migration in human omental microvascular endothelial cells via activation of the ERK1/2 and PI3K/AKT pathways [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1865(1): 25-33.
- [15] Takeuchi K, Yanai R, Kumase F, et al. EGF-like-domain-7 is required for VEGF-induced Akt/ERK activation and vascular tube formation in an *ex vivo* angiogenesis assay [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): 91849.
- [16] Li B, Qiu T, Zhang P, et al. IKVAV regulates ERK1/2 and Akt signalling pathways in BMMSC population growth and proliferation [J]. Cell Prolif, 2014, 47 (2): 133-145.