

## 注射用丹参多酚酸对氧糖剥夺/复氧复糖小鼠脑微血管内皮细胞血管生成的影响及机制研究

姚宇晴<sup>1</sup>, 薛子卓<sup>2</sup>, 陈璐<sup>1</sup>, 梅雨航<sup>3</sup>, 万梅绪<sup>4, 5</sup>, 李智<sup>4, 5</sup>, 李德坤<sup>4, 5</sup>, 张燕欣<sup>4, 5\*</sup>, 鞠爱春<sup>4, 5\*</sup>

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

4. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

5. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

**摘要:** 目的 研究注射用丹参多酚酸(SAFI)对氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)损伤后小鼠脑微血管内皮细胞(BEND3)增殖、迁移、成管能力的影响及机制。方法 CCK-8法检测SAFI对正常BEND3细胞活力的影响, 筛选出安全作用浓度。取正常生长的对数期BEND3细胞, 分为对照组、模型组、SAFI(0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )组, 模型组与SAFI组建立OGD/R模型, 缺氧缺糖4 h、复氧复糖24 h; CCK-8法检测BEND3细胞活力; 划痕实验检测BEND3细胞迁移能力; 基质胶成管实验检测BEND3细胞成管能力; Western blotting法检测BEND3细胞血管内皮生长因子A(VEGFA)、血管生成素-1(Ang-1)、Ang-2蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组细胞活力、细胞迁移率及细胞成管血管网络的交叉点数、节点数、分支点数、血管总长度均显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组比较, SAFI浓度为2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞活力、细胞迁移率及细胞成管血管网络的交叉点数、节点数、分支点数、血管总长度、网眼总面积和VEGFA和Ang-1、Ang-2蛋白表达量均显著上升( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 且作用呈浓度相关性。结论 SAFI可提高BEND3细胞OGD/R损伤后的增殖能力、迁移能力、成管能力, 机制可能与上调VEGFA和Ang-1、Ang-2蛋白表达相关。

**关键词:** 注射用丹参多酚酸; 脑微血管内皮细胞; 细胞迁移; 血管生成; 血管内皮生长因子; 血管生成素; 氧糖剥夺/复氧复糖

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)08-1645-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.08.003

## Effect and mechanism of Salvianolic Acids for Injection on angiogenesis of BEND3 after hypoxia/reoxygenation

YAO Yuqing<sup>1</sup>, XUE Zizhuo<sup>2</sup>, CHEN Lu<sup>1</sup>, MEI Yuhang<sup>3</sup>, WAN Meixu<sup>4, 5</sup>, LI Zhi<sup>4, 5</sup>, LI Dekun<sup>4, 5</sup>, ZHANG Yanxin<sup>4, 5</sup>, JU Aichun<sup>4, 5</sup>

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

4. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

5. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

**Abstract:** **Objective** To study the effects of Salvianolic Acid for Injection (SAFI) on proliferation, migration and tubulation of BEND3 after hypoxia injury and its mechanism. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the effect of SAFI on the activity of normal BEND3 cells and screen for safe concentrations. Normal growth of logarithmic BEND3 were divided into control group, model group and SAFI (0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group. Model group and SAFI administration group established oxygen-glucose deprivation/reoxygenation/reglycation (OGD/R) model, hypoxia and glucose deficiency for 4 h, reoxygenation/reglycation for 24 h. CCK-8 method was used to detect the viability of BEND3 cells. The effect of SAFI on the migration ability of

收稿日期: 2023-05-24

第一作者: 姚宇晴, 男, 硕士, 研究方向为中药学。E-mail: 17803332269@163.com

\*共同通信作者: 鞠爱春, 男, 正高级工程师, 从事中药注射剂工艺及质量控制研究。E-mail: juach@tasly.com

张燕欣, 女, 高级工程师, 从事中药药理及药物警戒研究。E-mail: zhangyanxin2013@tasly.com

BEND3 cells injured by hypoxia was detected by scratch test. Matrix colloidal tube test was used to detect the effect of SAFI on tube formation ability of BEND3 cells injured by hypoxia. The effect of SAFI on the expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), angiopoietin-1 (Ang-1) and Ang-2 proteins after hypoxia injury was detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the cell viability, cell mobility, the number of crossings, nodes, branches, and total length of vessels in the model group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ). Compared with the model group, the cell viability, cell mobility, the number of crossings, nodes, branches, total length of vessels, total area of meshes and the expression of VEGFA, Ang-1, and Ang-2 proteins increased when the concentration of SAFI was 2.50, 5.00, and 10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ), and the effect was concentration dependent. **Conclusion** SAFI can improve the proliferation, migration and tubation of BEND3 cells after hypoxia injury, and the mechanism may be related to upregulating the expression of VEGFA and Ang-1 and Ang-2 proteins.

**Key words:** Salvianolic Acid for Injection; brain microvascular endothelial cells; cell migration; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; angiopoietin; hypoxia/reoxygenation

脑卒中是由于血管意外造成的脑血液循环障碍和脑组织功能受损的疾病,作为一种常见的脑部疾病,与其他脑部疾病相比伤害性更大<sup>[1]</sup>。血管新生与胚胎发育、组织修复、心室重构、肿瘤等密切相关。目前,对缺血性血管疾病的预防治疗已由单纯改善病变血管血流供应转变为如何促进侧支循环,因此,促血管新生已成治疗的新方向<sup>[2]</sup>。许多中药都能促进血管新生、促进侧支循环,在治疗缺血性心脑血管疾病方面具有良好的应用前景<sup>[3]</sup>。

注射用丹参多酚酸(SAFI)是以丹参水溶性活性成分丹参多酚酸为主要成分制成的冻干粉针剂,主要化学成分为水溶性酚酸类成分,主要包括丹酚酸B、丹酚酸D等,被广泛应用于轻、中度脑卒中的治疗<sup>[4-5]</sup>。脑微血管内皮细胞是生物体内分布最广泛、功能最复杂的一类细胞,既是血脑屏障的组成,又是机体内重要的代谢及内分泌器官<sup>[6]</sup>,它能够合成、分泌多种血管活性物质,对脑血管功能进行调节<sup>[7]</sup>。已有研究证实,SAFI可促进大鼠脑缺血后血管生成<sup>[8]</sup>,但其是否通过促进内皮细胞增殖与血管新生而发挥治疗缺血性脑血管病的作用,尚未获得直接的证据。因此,本研究拟采用体外培养小鼠脑微血管内皮细胞(BEND3),建立氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)损伤模型,观察SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞增殖及体外血管新生能力的影响,并初步探讨其可能的作用机制,为其在临床治疗脑卒中、发挥促血管生成及改善侧支循环作用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞

BEND3细胞,购于中国科学院细胞库(上海)。

### 1.2 药物与主要试剂

SAFI(天津天士力之骄药业有限公司,批号20210304,规格:每支装0.13 g,含丹参多酚酸

100 mg); DMEM高糖培养基(批号11965-084)、DMEM无糖培养基(批号11966-025)、磷酸缓冲液(PBS,批号1897215)、胰酶(批号1742078),购自美国Gibco公司;胎牛血清(批号DB10194785)购自美国Hyclone公司;青-链双抗(批号C0222)购自碧云天生物技术公司;CCK-8检测试剂盒(批号CB45525049)购自日本同仁化学研究所;Matrigel基质胶(批号2237002)购自美国Corning公司;血管内皮生长因子A(VEGFA)单克隆抗体(货号66828-1-Ig)购自美国Proteintech公司;血管生成素-1(Ang-1)多克隆抗体(货号23302-1-AP)购自美国Proteintech公司;血管生成素-2(Ang-2)抗体(货号ab153934)购自英国Abcam公司; $\beta$ -actin多克隆抗体(货号20536-1-AP)抗体购自美国Proteintech公司;羊抗兔IgG抗体-HRP、羊抗小鼠IgG抗体-HRP、特超敏ECL化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.3 主要仪器

细胞培养箱,美国Thermo Fisher公司;多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;倒置显微镜,日本Olympus公司;细胞计数仪,美国Thermo Fisher公司;高速离心机,美国Thermo公司;小型WB电泳设备,美国Bio-Rad公司;化学发光成像系统,美国Bio-Rad公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

BEND3细胞培养采用含10% FBS、1%青霉素-链霉素溶液的高糖DMEM培养基(完全培养基),于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中静置培养,待细胞达到80%~90%融合时,胰蛋白酶-EDTA消化传代,接种于细胞培养瓶或培养板,选取对数生长期细胞进行实验。

## 2.2 SAFI对正常BEND3细胞活力的影响

取对数生长期的BEND3细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔100  $\mu\text{L}$ 接种于96孔板。24 h后吸弃培养液,加入含SAFI(0.63、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的完全培养基,对照组不加药。继续培养24 h,将各孔培养基更换为含10% CCK-8的完全培养基,放入培养箱避光孵育1.5 h后,使用酶标仪检测450 nm波长处吸光度( $A$ )值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

## 2.3 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞活力的影响

取对数生长期的BEND3细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔100  $\mu\text{L}$ 接种于96孔板。完全贴壁生长后,共分为7组:对照组、模型组(OGD/R)、SAFI(0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )组。对照组细胞使用DMEM完全培养基培养;模型组及SAFI组均建立OGD/R模型:PBS溶液洗涤3次,模型组更换为无糖无血清DMEM培养基,SAFI组更换为含0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI的无糖无血清DMEM培养基,置于缺氧小室(95% $\text{N}_2$ -5% $\text{CO}_2$ )缺氧4 h后,模型组更换为DMEM完全培养基,SAFI组更换为含相应浓度SAFI的DMEM完全培养基,复氧培养24 h。CCK-8法检测细胞存活率。

## 2.4 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞迁移能力的影响

使用马克笔在6孔板板后沿着水平方向平均画6条直线,BEND3以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于6孔板,每孔3 mL。待细胞生长成为完全融合的单层贴壁细胞,用10  $\mu\text{L}$ 无菌枪头于每个孔内按着马克笔画线垂直划1条竖线,用PBS洗去划下的细胞碎片,确保划出的细胞划痕无细胞残留。对照组加入不含血清DMEM高糖培养基,模型组及SAFI组均建立OGD/R模型,方法同“2.3”项,在孵育24、48 h后,固定检测点取样拍照。用Image J图像软件测量划痕面积,计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{初始划痕面积} - \text{残存划痕面积}) / \text{初始划痕面积}$$

## 2.5 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞成管能力的影响

进行成管实验时,因基质胶在室温下会快速固化,故实验所需材料需提前预冷,实验准备及操作需在冰上进行。将基质胶与无血清DMEM高糖培养基按1:1比例混合制成基质胶工作液。将基质胶

工作液按每孔250  $\mu\text{L}$ 加入预冷的24孔板中,随后放入培养箱内放置30 min,待基质胶固化后继续加入150  $\mu\text{L}$ 基质胶工作液并轻晃使胶面平整均匀,之后继续放入培养箱30 min。各组细胞按照“2.3”项处理,消化各组细胞并使用无血清高糖培养基制成细胞悬液,将各组细胞悬液密度调整一致为 $8 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,每孔加入300  $\mu\text{L}$ 细胞悬液,放入细胞培养箱,4 h后取出,显微镜下观察拍照。使用Image J图像软件对生成血管网络进行分析,通过统计分析节点数、交叉点数、分支数、血管总长度等指标检测成管能力。

## 2.6 Western blotting检测SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞促血管新生蛋白表达的影响

取处于对数生长期的BEND3细胞,以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种至培养皿中,待细胞生长至对数生长期后进行分组、OGD/R、给药处理,方法同“2.3”项。收集细胞,加入RIPA裂解液,冰浴超声裂解,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清液,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。取等量蛋白样品经10% SDS-PAGE凝胶电泳,转至PVDF膜,于5% BSA中室温封闭1.5 h,分别使用VEGFA、Ang-1、Ang-2抗体于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗涤3次后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(1:10 000)或山羊抗鼠抗体(1:10 000),室温孵育1 h,TBST洗涤3次加入ECL发光液显影进行发光检测。ImageLab 3.0系统成像软件采集凝胶成像图片,Image J分析条带灰度值,分析各目的蛋白与内参 $\beta$ -actin灰度值的比值,表示目的蛋白的含量。

## 2.7 数据统计分析

用GraphPad Prism 9.5软件处理数据,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行方差齐性检验,再采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。若方差齐进行两组间比较LSD检验,若方差不齐,采用Tamhane's  $T^2$ 检验。

## 3 结果

### 3.1 SAFI对正常BEND3细胞活力的影响

如表1所示,BEND3细胞在0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI的作用下,细胞存活率无明显变化,与对照组比较无统计学意义。SAFI质量浓度为20.00、40.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与对照组比较,BEND3细胞存活率显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结果表明质量浓度为0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的SAFI对BEND3细胞的增殖无明显抑制作用,因此认为以上质量浓度安全。

表1 SAFI对正常BEND3细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Table 1 Effect of SAFI on BEND3 cell vitality ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别   | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 细胞存活率/%                       |
|------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| 对照   | —                                         | 100.0 $\pm$ 5.30              |
| SAFI | 0.63                                      | 104.4 $\pm$ 4.23              |
|      | 1.25                                      | 102.7 $\pm$ 6.46              |
|      | 2.50                                      | 102.4 $\pm$ 7.15              |
|      | 5.00                                      | 100.8 $\pm$ 7.19              |
|      | 10.00                                     | 102.2 $\pm$ 8.38              |
|      | 20.00                                     | 88.5 $\pm$ 5.76 <sup>#</sup>  |
|      | 40.00                                     | 82.0 $\pm$ 8.13 <sup>##</sup> |

与对照组比较:<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group

## 3.2 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞活力的影响

如表2所示,与对照组比较,模型组的细胞活力显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI组细胞活力均显著升高( $P < 0.05, 0.01$ ),且作用呈浓度相关性。

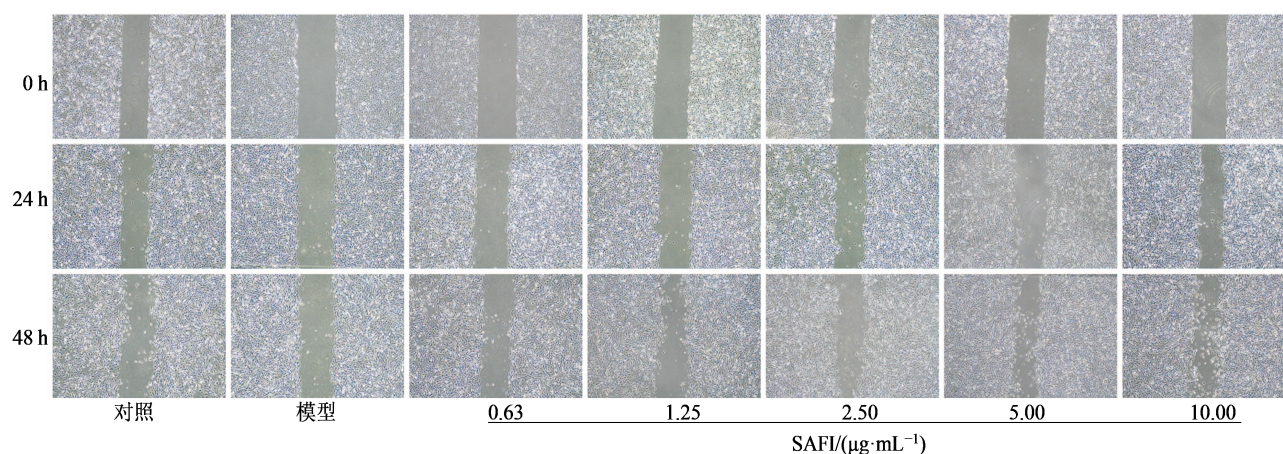
表2 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Table 2 Effect of SAFI on OGD/R damage BEND3 cell vitality ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别   | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 细胞存活率/%                        |
|------|-------------------------------------------|--------------------------------|
| 对照   | —                                         | 100.00 $\pm$ 5.30              |
| 模型   | —                                         | 58.71 $\pm$ 7.41 <sup>##</sup> |
| SAFI | 0.63                                      | 65.16 $\pm$ 3.97 <sup>*</sup>  |
|      | 1.25                                      | 69.28 $\pm$ 2.29 <sup>*</sup>  |
|      | 2.50                                      | 69.90 $\pm$ 5.84 <sup>*</sup>  |
|      | 5.00                                      | 71.48 $\pm$ 6.97 <sup>**</sup> |
|      | 10.00                                     | 83.39 $\pm$ 5.20 <sup>**</sup> |

与对照组比较:<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

## 3.3 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞迁移能力的影响

如图1、表3所示,在24 h时间点,与对照组相比,模型组细胞迁移率显著降低( $P < 0.05$ );与模型组相比,2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI组细胞划痕

图1 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞迁移能力的影响( $\times 40$ )Fig. 1 Effect of SAFI on ability of BEND3 cells to migrate impaired by OGD/R ( $\times 40$ )表3 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞迁移能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 3 Effect of SAFI on ability of BEND3 cells to migrate impaired by OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 组别   | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 24 h 划痕愈合率/%                   | 48 h 划痕愈合率/%                    |
|------|-------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 对照   | —                                         | 23.46 $\pm$ 4.28               | 53.25 $\pm$ 4.93                |
| 模型   | —                                         | 13.28 $\pm$ 2.36 <sup>#</sup>  | 32.21 $\pm$ 8.85 <sup>##</sup>  |
| SAFI | 0.63                                      | 15.91 $\pm$ 1.75               | 37.57 $\pm$ 3.70                |
|      | 1.25                                      | 17.92 $\pm$ 5.69               | 51.61 $\pm$ 5.94 <sup>**</sup>  |
|      | 2.50                                      | 22.65 $\pm$ 2.19 <sup>*</sup>  | 55.86 $\pm$ 6.97 <sup>**</sup>  |
|      | 5.00                                      | 24.47 $\pm$ 4.67 <sup>**</sup> | 56.72 $\pm$ 5.25 <sup>**</sup>  |
|      | 10.00                                     | 27.21 $\pm$ 4.03 <sup>**</sup> | 58.99 $\pm$ 10.27 <sup>**</sup> |

与对照组比较:<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

愈合率显著升高( $P < 0.05, 0.01$ );在48 h时间点,与对照组相比,模型组细胞划痕愈合率明显降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI组细胞划痕愈合率显著升高( $P < 0.01$ )。结果显示,0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI均能提高BEND3缺氧损伤后细胞迁移能力,且呈质量浓度、时间相关性。

## 3.4 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞成管能力的影响

如图2、表4所示,与对照组比较,模型组细胞形成血管网络的交叉点数、节点数、分支点数、血管总长度均显著降低( $P < 0.05, 0.01$ );与模型组相比,2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI组细胞血管网络的交

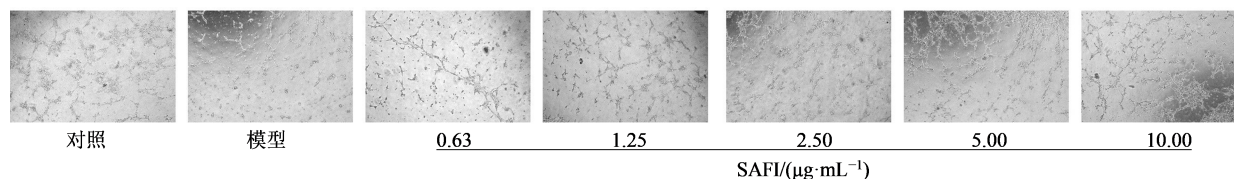


图2 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞成管能力的影响(×40)

Fig. 2 Effect of SAFI on ability of BEND3 cells damaged by OGD/R (×40)

表4 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞成管能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 4 Effect of SAFI on ability of BEND3 cells to be formed by OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 组别   | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 交叉点数/个                     | 节点数/个                      | 分支点数/个                     | 血管总长度/像素                   | 网眼总面积/像素                      |
|------|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 对照   | —                                         | 93.30±9.07                 | 315.70±13.50               | 69.00±11.14                | 15 173±513.6               | 52 409±10 660                 |
| 模型   | —                                         | 25.60±10.21 <sup>#</sup>   | 139.00±51.03 <sup>#</sup>  | 42.00±16.70 <sup>#</sup>   | 6 493±1 693 <sup>##</sup>  | 12 627±3 333                  |
| SAFI | 0.63                                      | 74.00±24.52                | 231.00±65.02               | 88.70±5.69 <sup>**</sup>   | 14 700±573.5 <sup>**</sup> | 57 780±8 601                  |
|      | 1.25                                      | 91.60±9.71                 | 301.00±53.51               | 103.70±7.57 <sup>**</sup>  | 18 290±3 004 <sup>**</sup> | 96 553±39 775                 |
|      | 2.50                                      | 112.70±27.30 <sup>**</sup> | 394.00±89.44 <sup>**</sup> | 116.30±6.43 <sup>**</sup>  | 22 091±3 188 <sup>**</sup> | 262 190±64 729 <sup>**</sup>  |
|      | 5.00                                      | 128.30±30.44 <sup>**</sup> | 432.70±77.57 <sup>**</sup> | 144.70±10.69 <sup>**</sup> | 25 750±1 592 <sup>**</sup> | 436 827±115 250 <sup>**</sup> |
|      | 10.00                                     | 194.70±53.98 <sup>**</sup> | 647.00±102.4 <sup>**</sup> | 163.30±7.51 <sup>**</sup>  | 27 073±1 026 <sup>**</sup> | 550 554±52 616 <sup>**</sup>  |

与对照组比较:<sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ <sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group

叉点数、节点数、分支点数、血管总长度、网眼总面积显著升高( $P<0.01$ )。结果显示,SAFI能提高BEND3细胞OGD/R损伤后细胞血管网络的建立,且作用呈浓度相关性。

### 3.5 SAFI对OGD/R损伤BEND3细胞促血管新生蛋白表达的影响

VEGF与Ang是调节血管生成的重要因子,VEGF主要促进早期血管网络形成,而Ang则对随后血管网络的扩张和成熟起促进作用<sup>[9-10]</sup>。如图3所示,与对照组比较,模型组VEGFA、Ang-1、Ang-2蛋白表达呈上升趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,0.63、1.25、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAFI可上调VEGF、Ang-1、Ang-2蛋白表达,其中2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组均差异显著( $P<0.05$ 、0.01)。结果表明,SAFI能明显提高BEND3缺氧损伤后VEGF和Ang-1、Ang-2促血管生成因子的蛋白表达。

## 4 讨论

脑血管病是一类常见的临床疾病,其主要发病原因为脑部血液循环障碍,导致脑血管意外、脑卒中等,并对脑组织造成不同程度的损害,急性非外伤性发病居多。中医认为,该病因人体正气虚弱、脏腑功能失调,导致血液淤滞、痰湿热邪阻滞,进而导致气血逆行,上冲至脑部,引发此病症<sup>[11]</sup>。脑卒中患者中有60%~70%为缺血性脑卒中,发病率、致

残率、死亡率和复发率高<sup>[12]</sup>。侧支循环可以有效地减小梗死体积,降低出血转化的风险,为患者提供更及时有效的救治。因此,增加侧支血管密度可以提高缺血区域的血流供应量,这是治疗该疾病的关键<sup>[13]</sup>。SAFI是由丹参的水溶性酚酸类有效部位制成的冻干粉针,可以改善脑缺血,保护脑神经,明显提升脑卒中患者的生存质量<sup>[14]</sup>。SAFI中的活性成分在细胞水平可以提高内皮细胞与内皮祖细胞的增殖、迁移、分化及血管生成能力,促进血管新生<sup>[15-18]</sup>。

血管生成是一个复杂过程,根据生成步骤又主要包括收到激活信号后,血管内皮基底膜降解;之后血管内皮细胞激活,进行增殖、迁移、成管等一系列生理活动最后形成新的血管和血管网络<sup>[19]</sup>。缺血性脑卒中后的血管新生过程中有多种活性因子的参与,最主要的因子是VEGF与Ang。VEGF对血管内皮细胞特异性最高,促血管生成作用最强,是在血管发生和形成中起关键调节作用的影响因子<sup>[20]</sup>,能直接刺激内皮细胞,促进细胞增殖迁移和形成管腔结构,调节机体体内血管新生<sup>[21]</sup>;Ang通过向血管周围的平滑肌细胞传递信号来作用于血管系统,通过调节血管的扩张和收缩来控制血管的发育和稳定。其中最具特征性的是Ang-1<sup>[22]</sup>和Ang-2<sup>[23]</sup>,2种因子共同作用促进血管形成。

本研究观察SAFI对体外培养BEND3细胞增

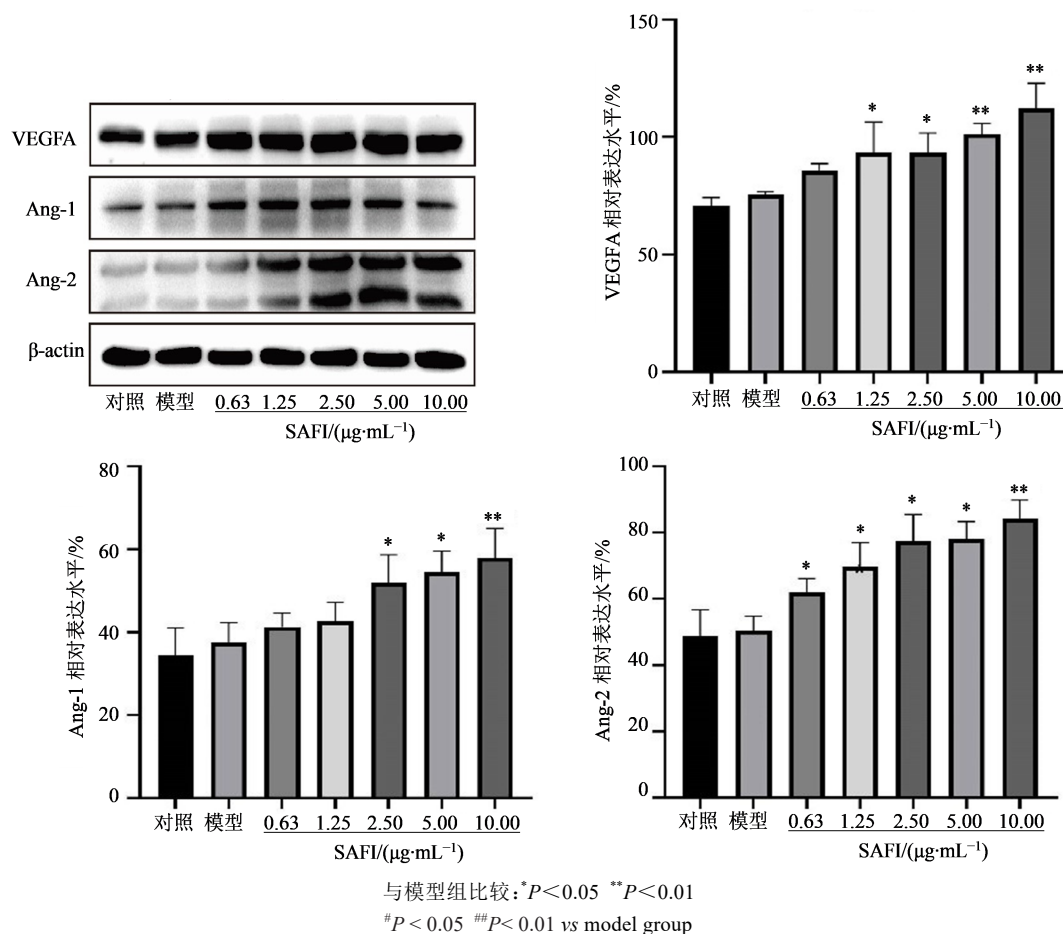


图3 SAFI对OGD/R损伤BEND3促血管新生蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
 Fig. 3 Effect of SAFI on angiogenesis protein expression of OGD/R damage BEND3 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

殖、迁移及血管样管腔形成的影响;同时检测与血管生成密切相关的 VEGF、Ang-1、Ang-2 蛋白表达情况,评价SAFI体外促血管新生的能力及机制。实验结果提示,SAFI具有显著促进BEND3细胞增殖、迁移和成管的药效,且药效随着质量浓度的增加而增强,能明显增加缺氧损伤后BEND3细胞活力,细胞迁移率和细胞血管网络结构的节点数、交叉点数、分支点数及血管长度,表明其能提高BEND3细胞的增殖、迁移和管腔形成的能力。此外,SAFI还可明显上调缺氧损伤后细胞 VEGF、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达,且蛋白表达量能随质量浓度的增加而升高。综上,可以推测SAFI通过提高细胞增殖能力为新生血管提供物质基础,促进迁移和成管能力能将生成细胞输送到相应部位并形成血管网络;同时,SAFI能够刺激内皮细胞促血管新生因子蛋白的表达,发挥其促进内皮细胞增殖、迁移、成管过程的作用。

本研究通过建立体外细胞模型对SAFI促进血管生成的药效及作用机制进行探索,但有一定局限性,未来将通过建立动物模型,进一步全面研究

SAFI对缺血性脑卒中后促血管生成的药效及机制,为SAFI的临床用药提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Hashmi M, Khan M, Wasay M. Growing burden of stroke in Pakistan: A review of progress and limitations [J]. Int J Stroke, 2013, 8(7): 575-581.
- [2] Fong G H. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia [J]. Angiogenesis, 2008, 11(2): 121-140.
- [3] 郭浩, 李磊, 侯金才, 等. 中药促治疗性血管新生防治缺血性心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 24-28.  
 Guo H, Li L, Hou J C, et al. Research progress of Chinese medicine in promoting therapeutic angiogenesis and preventing ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40 (1): 24-28.
- [4] 李德坤, 苏志刚, 苏小琴, 等. 注射用丹参多酚酸化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42 (2): 362-368.

- Li D K, Su Z G, Su X Q, et al. Research progress on chemical composition and quality control of Salvianolic Acids for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 362-368.
- [5] 苏小琴, 张磊, 李海燕, 等. 基于Q-marker的中药注射剂质量控制研究思路: 以注射用丹参多酚酸为例 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4663-4672.
- Su X Q, Zhang L, Li H Y, et al. Quality control of Chinese materia medica injection based on Q-marker: Taking Salvianolic Acids for Injection as an example [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4663-4672.
- [6] Chen F Y, Lee T J. Role of nitric oxide in neurogenic vasodilation of porcine cerebral artery [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1993, 265(1): 339-345.
- [7] Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995, 35: 235-255.
- [8] 李耀汝. 注射用丹参多酚酸通过JAK2/STAT3信号通路促进脑缺血小鼠血管生成及改善行为功能 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- Li Y R. Salvianolic acid for injection promotes angiogenesis and improves behavioral function in mice with cerebral ischemia through JAK2/STAT3 signaling pathway [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.
- [9] Karamysheva A F. Mechanisms of angiogenesis [J]. Biochemistry Moscow, 2008, 73(7): 751-762.
- [10] Holash J, Maisonpierre P C, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF [J]. Science, 1999, 284(5422): 1994-1998.
- [11] 喻腾云, 吴艳华, 孙寒静, 等. 缺血性脑卒中中医病因病机的层次关系 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(4): 328-331.
- Yu T Y, Wu Y H, Sun H J, et al. Hierarchical relationship between etiology and pathogenesis of ischemic stroke in TCM [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2016, 36(4): 328-331.
- [12] Wang W Z, Jiang B, Sun H X, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. Circulation, 2017, 135(8): 759-771.
- [13] Liu D Z, Scalzo F, Rao N M, et al. Fluid-attenuated inversion recovery vascular hyperintensity topography, novel imaging marker for revascularization in middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2016, 47(11): 2763-2769.
- [14] 张燕欣, 梁佳威, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中的药理作用及机制研究概述 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1469-1479.
- Zhang Y X, Liang J W, Wan M X, et al. Research outlines on pharmacology and pharmacological mechanism of Salvianolic Acids for Injection in treatment of ischemic stroke [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1469-1479.
- [15] 许波华, 沈祥春, 张良, 等. 丹酚酸B对血管内皮细胞迁移及管腔形成的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(4): 496-500.
- Xu B H, Shen X C, Zhang L, et al. Effect of salvianolic acid B on vascular endothelial cell migration and lumen formation [J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(4): 496-500.
- [16] 陈飞, 乔祺, 王张生, 等. 丹参酮II<sub>A</sub>磺酸钠在缺血性斑马鱼模型中的促血管新生作用 [J]. 中国临床医学, 2017, 24(2): 166-170.
- Chen F, Qiao Q, Wang Z S, et al. The angiogenic effect and potential mechanism of sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate in ischemic zebrafish model [J]. Chin J Clin Med, 2017, 24(2): 166-170.
- [17] Yuan Q, Wang J X, Li R L, et al. Effects of salvianolate lyophilized injection combined with Xueshuantong injection in regulation of BBB function in a co-culture model of endothelial cells and pericytes [J]. Brain Res, 2021, 1751: 147185.
- [18] 陈宗军, 陈政雄, 蔡杨靖. 丹参多酚酸对脑梗死小鼠血管微循环的影响 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 761-766.
- Chen Z J, Chen Z X, Cai Y J, et al. Effect of salvianolic acid on vascular microcirculation in cerebral infarction mice [J]. Drugs Clin, 2023, 38(4): 761-766.
- [19] Kalkunte S, Brard L, Granai C O, et al. Inhibition of angiogenesis by vitamin D-binding protein: Characterization of anti-endothelial activity of DBP-maf [J]. Angiogenesis, 2005, 8(4): 349-360.
- [20] Yang J P, Liu H J, Liu X F. VEGF promotes angiogenesis and functional recovery in stroke rats [J]. J Invest Surg, 2010, 23(3): 149-155.
- [21] Peach C J, Mignone V W, Arruda M A, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1264.
- [22] Davis S, Aldrich T H, Jones P F, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning [J]. Cell, 1996, 87(7): 1161-1169.
- [23] Maisonpierre P C, Suri C, Jones P F, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis [J]. Science, 1997, 277(5322): 55-60.

[责任编辑 兰新新]