

川芎嗪与黄芪甲苷配伍对人脐静脉内皮细胞血管生成的作用及机制探讨

李玉梅, 杨辛欣, 韩旭, 谢聪聪, 韩光雪, 张大方, 王楚盈*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘要: **目的** 研究川芎嗪与黄芪甲苷配伍对缺氧诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的增殖的影响及机制。**方法** 建立HUVECs缺氧损伤模型,将细胞分为5组,对照组、模型组、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)组、黄芪甲苷(40 $\mu\text{g/mL}$)组及川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$) + 黄芪甲苷(40 $\mu\text{g/mL}$)组,MTT法检测川芎嗪、黄芪甲苷及其配伍对缺氧损伤HUVECs增殖的影响;免疫组化法检测缺氧损伤HUVECs细胞VEGF、Ang-II蛋白表达,Western blotting检测VEGF和Ang-II蛋白的表达,RT-PCR检测VEGF和Ang-II mRNA表达。**结果** 与模型组相比,川芎嗪与黄芪甲苷均能提高细胞存活率,川芎嗪与黄芪甲苷配伍组具有极显著差异($P < 0.001$);川芎嗪与黄芪甲苷配伍提高VEGF、Ang-II蛋白表达。同时,川芎嗪与黄芪甲苷配伍组能上调VEGF和Ang-II mRNA的表达($P < 0.001$)。**结论** 川芎嗪与黄芪甲苷配伍可能通过增加血管生成靶向因子VEGF和Ang-II的表达发挥促进血管生成的作用。

关键词: 川芎嗪; 黄芪甲苷; 人脐静脉内皮细胞; 血管内皮生长因子; 血管紧张素-II

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0722-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.018

Protective effect and mechanism of ligustrazine combined with astragaloside IV on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

LI Yu-mei, YANG Xin-xin, HAN Xu, XIE Cong-cong, HAN Guang-xue, ZHANG Da-fang, WANG Chu-ying
Pharmacy College, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of ligustrazine combined with astragaloside IV on hypoxia injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** The model of hypoxia injury was established, and the cells for pharmacodynamics study were divided into five groups: control group, model group, ligustrazine group (80 $\mu\text{g/mL}$), astragaloside IV group (40 $\mu\text{g/mL}$), and compatibility of astragaloside IV and ligustrazine group. The effects of ligustrazine, astragaloside IV, and their compatibility on cell proliferation in each group after hypoxia injury were detected by MTT assay. Immunohistochemical method was used to observe the expression of proteins VEGF and Ang-II in HUVECs with hypoxia injury, and Western blotting was used to observe the expression of proteins VEGF and Ang-II. RT-PCR was used to observe the mRNA expression of VEGF and Ang-II. **Results** Compared with those in the model group, cell viability of ligustrazine group, astragaloside IV group, and compatibility group significantly increased, and the best group was ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$) + astragaloside IV (40 $\mu\text{g/mL}$) group. Ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$) + astragaloside IV (40 $\mu\text{g/mL}$) group could up-regulate the protein expression levels of VEGF and Ang-II and the levels of VEGF and Ang-II mRNA. **Conclusion** Ligustrazine combined with astragaloside IV may be targeted by increasing angiogenesis factor, and the expression of VEGF and Ang-II plays the role of promoting angiogenesis.

Key words: ligustrazine; astragaloside IV; HUVECs; VEGF; Ang-II

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)是由于冠状动脉循环改变引起冠状血流和心肌需求之间不平衡而导致的心肌损害^[1]。治疗性血管新生能够促进缺血局部新生血管的形成和开放新的侧支循环通路,完成心肌缺血区域血管的自我搭桥,增加缺

血区的血流供应,从而减少心肌的损伤。黄芪为传统的补气药,川芎为血中气药,专行血中之气,黄芪配伍川芎补气行气、化瘀通络,针对气虚血瘀之胸痹标本同治。川芎有效单体川芎嗪具有抗心肌缺血及再灌注损伤、保护血管内皮细胞、抗血小板聚集等

收稿日期: 2016-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173597); 吉林省卫生计生青年科研课题(2014Q046)

作者简介: 李玉梅(1985—),女,在读博士,讲师,研究方向为中药复方药效物质基础及机制研究。

Tel: 15714305933 E-mail: liyumei_10@163.com

*通信作者 王楚盈(1982—),女,博士,讲师,研究方向为中药复方药效物质基础及机制研究。

Tel: 15714305933 E-mail: chuying820713@126.com

作用^[2]。黄芪中的黄芪甲苷可能具有促进血管生成的作用,从而有利于冠心病侧支循环的形成,减轻心肌缺血缺氧^[3]。川芎嗪注射剂与黄芪甲苷注射剂在临床中常被合用治疗缺血性心脏病^[4-5],研究表明,两药合用一方面可通过减少再灌注过程中超氧化物歧化酶(SOD)的消耗,清除氧自由基,减少心肌损伤后心肌酶释放,保护再灌注损伤的心肌,另一方面还可促进缺血区域局部新生血管的形成^[6]。然而二药配伍促进新生血管机制尚不明确,因此本实验通过体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),采用缺氧损伤模型,探讨二药配伍促缺血心肌新生血管的作用及其机制,为二药临床联合应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

HUVECs 购自上海澳赛尔斯生物技术有限公司。

1.2 仪器

Thermo Electron Corporation 法国生物安全柜; MCO-18AIC 二氧化碳培养箱(日本三洋公司); 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 酶标仪(美国伯乐公司); Power Pac Basic 电泳仪(美国 Bio-rad 公司); 荧光定量 PCR(RT-PCR)仪(韩国 BIONEER 公司); 缺氧小室(billups-rothenberg)。

1.3 药品与试剂

川芎嗪,质量分数 $\geq 98\%$,批号 GR-133-150103,南京广润生物制品有限公司; 黄芪甲苷,质量分数 $\geq 98\%$,批号 150202,成都锦泰和医药化学技术有限公司; 二甲亚砜(DMSO),批号 DH105-2,美国 Sigma 公司; 完全培养基,批号 H-004160411,澳赛尔斯生物技术有限公司; 基础培养基,批号 H-004B160418,澳赛尔斯生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS),批号 1082763, Gibco 公司; 胰蛋白酶 1:250,批号 42H10121,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 噻唑蓝(MTT),美国 Sigma 公司; 台盼蓝,上海恒远生物科技有限公司; EDTA- Na_2 ,批号 37H13064,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 血管内皮生长因子(VEGF)抗体,批号 WL0009, Wanleibio 公司,血管紧张素-II(Ang-II)抗体,批号 bs-0587, RBioss 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测川芎嗪与黄芪甲苷配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞增殖的影响

HUVECs 以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 200 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中

培养,48 h 后分别加入不同的药物: DMSO(模型组),川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$),黄芪甲苷(40 $\mu\text{g/mL}$),川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$) + 黄芪甲苷(40 $\mu\text{g/mL}$),缺氧小室(1% O_2 -5% CO_2 -94% N_2)培养 24 h,对照组(细胞加培养液)在培养箱中培养 24 h。每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率(细胞存活率=给药组 A 值/对照组 A 值)。

2.2 激光共聚焦检测川芎嗪与黄芪甲苷配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞形态的影响

HUVECs 以 1×10^5 /mL 孔接种于 24 孔板(多聚赖氨酸处理过的细胞爬片置于其中),5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 孵育 48 h 后,按“2.1”项方法处理后使用 4%多聚甲醛溶液进行细胞固定,室温固定 10 min,取 200 μL 配制好的 FITC 标记鬼笔环肽工作液(浓度 100 nmol/L),覆盖住盖玻片上的细胞,室温避光孵育 30 min,用 PBS 清洗盖玻片 3 次,每次 5 min,使用 200 μL DAPI 溶液(浓度 100 nmol/L)对细胞核进行复染,约 30 s,共聚焦显微镜下进行荧光观察。

2.3 免疫组化法检测川芎嗪与黄芪甲苷配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达的影响

将 HUVECs 按 1×10^5 个/孔铺于 24 孔板中(多聚赖氨酸处理过的细胞爬片置于其中),按照“2.1”项方法处理后,PBS 清洗,4%多聚甲醛固定 20 min、脱水和冲洗后,先后加入过氧化酶阻断溶液,非免疫山羊血清等孵育,冲洗后加入羊抗人 VEGF、Ang-II 的第一抗体,4 $^\circ\text{C}$ 湿盒过夜孵育后,PBS 清洗标本,再根据试剂盒说明书加入生物素标记二抗室温孵育,加 DAB 溶液显色,苏木素复染,常规梯度乙醇(70%、80%、90%乙醇 5 min $\times$ 1,95%乙醇 5 min $\times$ 2,100%乙醇 5 min $\times$ 3)脱水之后,二甲苯透明,50%明胶封片。取片观察,并采用 Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统进行灰度扫描,计算灰度值以分析其表达。

2.4 Western blotting 法检测 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达

将 HUVECs 按 1×10^5 个/孔铺于 6 孔板中,按照“2.1”方法处理后,弃去上清,每孔加入 100 μL 蛋白裂解液,混合均匀 2 000 r/min,4 $^\circ\text{C}$,离心 10 min。调整总蛋白含量一致后,取上清后加入 5 $\times$

Loading Buffer 蛋白上样缓冲液,沸水煮 5 min 使充分变性。电泳分离蛋白后,转膜至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,经 TBS-T 漂洗后,4 °C 孵育 VEGF (1:500)、Ang-II (1:500) 和 β -actin, 12 h 后使用 TBS-T 漂洗。加入二抗羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 2 h, TBST 漂洗后进行化学发光。

2.5 RT-PCR 法检测 VEGF 和 Ang-II mRNA 的表达

将 HUVECs 按 1×10^5 个/孔铺于 6 孔板中,按照“2.1”项方法处理后,按照 Simply P 总 RNA 提

取试剂盒说明书方法提取总 RNA; 用 BioSpec-nano 检测浓度; 从基因库 Gene Bank 中查出 β -actin 引物序列、VEGF mRNA 引物序列、Ang-II mRNA 引物序列,由奥科鼎盛生物合成相应引物(表 1),将 RNA 逆转录成 cDNA 按照两步法 BioRT 逆转录扩增试剂盒说明书方法; 采用 3 步法程序按照 BioEasy SYBR Green I RT-PCR Kit Manual 说明书进行荧光定量 PCR 扩增。目标基因表达相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer pairs used in RT-PCR

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
VEGF	CCAATAATCAGAGTGGCAGTG	ATAGACATAAATGACCGAGGC
Ang-II	AGTCCACCTGAGGAAGTGTCT	GATGTTTAGGGTCTTGCTTTG
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT

2.6 统计学处理

本实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间数据比较。

3 结果

3.1 对缺氧损伤 HUVECs 细胞增殖的影响

模型组细胞存活率显著低于空白对照组 ($P < 0.001$)。川芎嗪、黄芪甲苷组细胞存活率明显增加。二药配伍后较单独给药组细胞存活率明显增加,有极显著差异 ($P < 0.001$),由此显示川芎嗪与黄芪甲苷二药配伍有协同作用。结果见表 2。

3.2 对缺氧损伤 HUVECs 细胞形态的影响

空白对照组细胞贴壁良好,细胞呈梭形,边缘光滑清晰。模型组细胞呈现萎缩状态,细胞数较对照组明显减少,可见大量细胞悬浮和细胞碎片;川芎嗪组、黄芪甲苷组、二者配伍组细胞形态似对照组,细胞数量增加,细胞碎片和悬浮细胞显著减少。见图 1。

3.3 对缺氧损伤 HUVECs 细胞 VEGF、Ang-II 蛋白表达的影响

VEGF 与 Ang-II 主要在血管内皮细胞胞浆中表达,阳性反应为产生棕黄色颗粒。灰度扫描将纯黑色定义为灰度值为 0,把白色定义为 255。结果显示,模型组 VEGF 与 Ang-II 在缺氧条件下阳性表达程度强于对照组 ($P < 0.05$),黄芪甲苷与配伍组均可进一步提高 VEGF 与 Ang-II 阳性表达 ($P < 0.001$)。结果见图 2 和表 3。

表 2 川芎嗪、黄芪甲苷及二者配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of ligustrazine, astragaloside IV, and their combination on proliferation of HUVECs injured by hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	存活率/%
对照	—	0.34 ± 0.02	100.1 ± 2.2
模型	—	$0.31 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	$91.4 \pm 3.2^{\Delta\Delta\Delta}$
川芎嗪	80	$0.37 \pm 0.05^{**}$	$108.5 \pm 6.0^*$
黄芪甲苷	40	$0.40 \pm 0.05^{**}$	$116.4 \pm 12.2^{**}$
川芎嗪+黄芪甲苷	80+40	$0.42 \pm 0.04^{***}$	$123.0 \pm 13.2^{***}$

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$

$\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$

$***P < 0.001$ vs model group

3.4 Western blotting 检测 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达结果

Western blotting 结果显示,模型组在缺氧条件下与对照组相比,VEGF 蛋白表达无明显变化,Ang-II 蛋白表达增加,但无显著差异。各给药组 VEGF 蛋白表达明显增加,川芎嗪与黄芪甲苷配伍组差异极显著 ($P < 0.001$)。川芎嗪与黄芪甲苷配伍组 Ang-II 蛋白表达较模型组进一步增加,差异极显著 ($P < 0.001$)。结果表明,川芎嗪与黄芪甲苷配伍保护缺氧损伤内皮细胞,可能与增加 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达相关。结果见图 3。

3.5 对 VEGF 和 Ang-II mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,模型组与对照组相比,

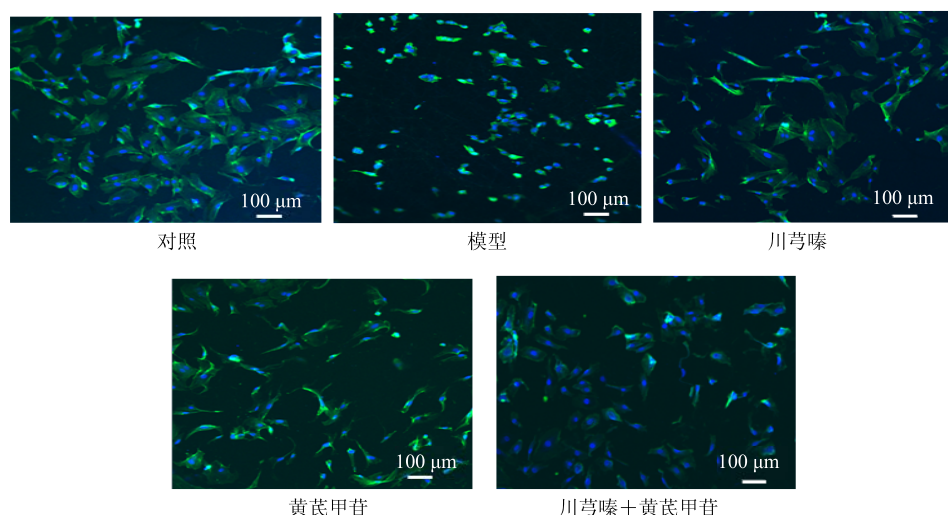


图 1 川芎嗪、黄芪甲苷及二者配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of ligustrazine, astragaloside IV, and their combination on morphology of HUVECs injured by hypoxia

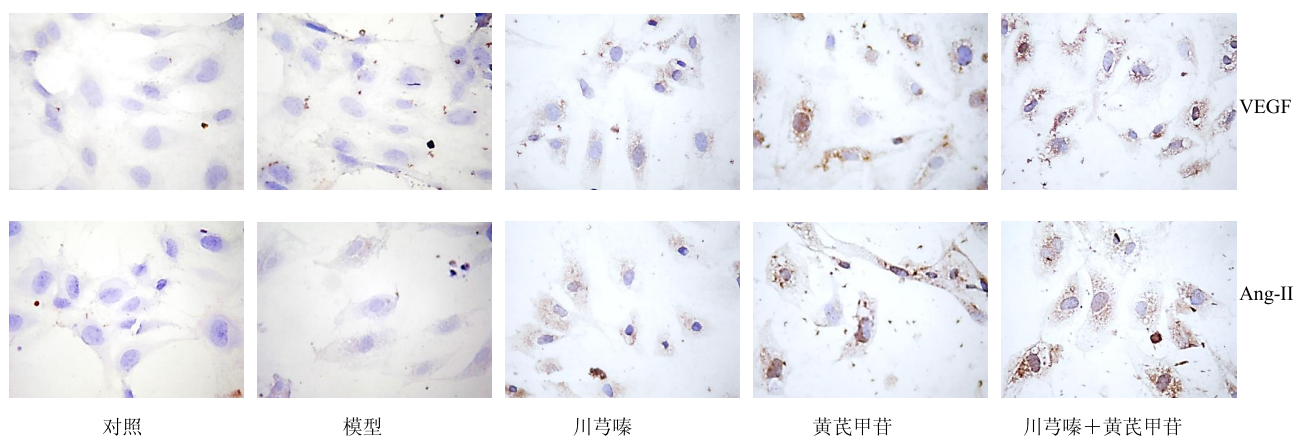


图 2 川芎嗪、黄芪甲苷及二者配伍对缺氧损伤 HUVECs 细胞 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达的影响 (免疫组化法)

Fig. 2 Effects of ligustrazine, astragaloside IV, and their combination on protein expression of VEGF and Ang-II in HUVECs injured by hypoxia (immunohistochemical staining)

表 3 各组 VEGF、Ang-II 蛋白表达灰度分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Results of levels of VEGF and Ang-II in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	VEGF	Ang-II
对照	—	179.87 ± 2.53	180.44 ± 1.39
模型	—	$175.67 \pm 2.14^{\Delta}$	$176.96 \pm 2.36^{\Delta}$
川芎嗪	80	174.67 ± 2.31	176.35 ± 2.72
黄芪甲苷	40	$100.28 \pm 4.37^{***}$	$90.15 \pm 2.08^{***}$
川芎嗪+黄芪甲苷	80+40	$90.45 \pm 2.14^{***}$	$60.28 \pm 2.99^{***}$

与对照组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组比较: $^{***}P<0.001$

$^{\Delta}P<0.05$ vs control group; $^{***}P<0.001$ vs model group

VEGF 和 Ang-II mRNA 表达增加, 但是无显著差异。黄芪甲苷与配伍组 VEGF mRNA 表达明显增加 ($P<0.01$), 各给药组 Ang-II mRNA 表达显著增加 ($P<0.001$)。结果见图 4。以上实验表明, 川芎嗪与黄芪甲苷配伍保护缺氧损伤内皮细胞, 可能与上调 VEGF 和 Ang-II mRNA 表达相关。

4 讨论

朱丹溪曰: “新血生则瘀血滑而易去”; 清代唐容川谓 “盖瘀血去新血已生, 新血生瘀血自去, 其间初无间隔……”。“生新祛瘀” 作为治疗胸痹的治则治法在临床应用中之是行之有效的。“生新” 既代表了新的血液, 生新祛瘀是机体的正常生理功能,

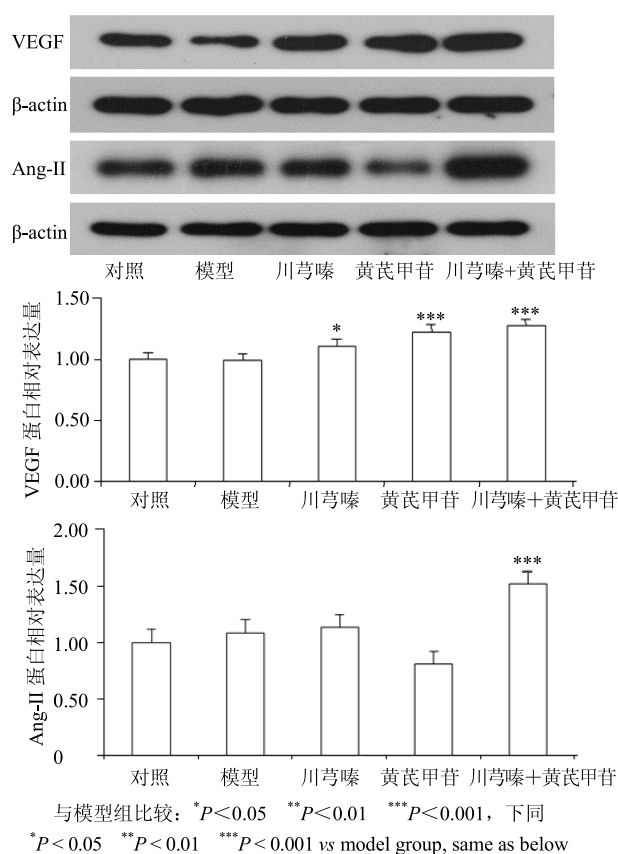


图 3 各组缺氧损伤 HUVECs 细胞 VEGF 和 Ang-II 蛋白表达水平 (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Protein expression of VEGF and Ang-II in HUVECs injured by hypoxia of each group (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

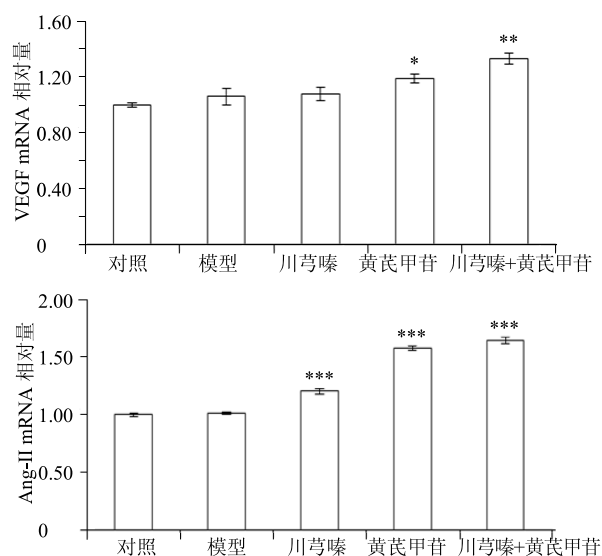


图 4 川芎嗪、黄芪甲苷及二者配伍对缺氧损伤的 HUVECs 细胞 VEGF 和 Ang-II mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effect of ligustrazine, astragaloside IV, and their combination on mRNA expression of VEGF and Ang-II in HUVECs injured by hypoxia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

相当于血液系统的新陈代谢,从现代医学角度也可以理解为新的血管的再生。血管生成是一个复杂的病理生理过程,血管内皮细胞是“祛瘀生新”作用的主要执行者之一。同时受到多种促进和抑制血管生成的因子调控,以调节血管功能以及发“祛瘀生新”作用。活血化癥方药具有较好的促进血管新生的作用,可能对冠状动脉血管侧支形成有比较理想的药理效应。益气活血法是治疗冠心病的基本法则。研究者^[3]提出某些益气活血中药可能具有促进血管生成的作用,从而有利于冠心病侧支循环的形成,减轻心肌缺血缺氧。黄芪为传统的补气药,川芎为血中气药,黄芪伍川芎补气行气、化癥通络。本实验采用缺氧诱导 HUVECs 损伤,按照前期活性筛选结果^[7],优选川芎嗪与黄芪甲苷最佳浓度,考察二药配伍对缺氧损伤细胞的保护作用,MTT 与细胞形态实验结果表明,川芎嗪组、黄芪甲苷组、配伍组均能提高细胞存活率,保护受损细胞,且川芎嗪与黄芪甲苷配伍有协同作用。

在缺血性心脏病的研究中,VEGF 和血管生成素 (angiopoietin, Ang) 家族是目前发现参与血管生成发挥重要作用的两个因子,二者在多种病理过程中有协同作用,共同参与血管生成的调节。VEGF 是一类具有特异性促内皮细胞有丝分裂作用的生长因子,主要通过与血管内皮细胞上的 VEGF 受体结合而发挥促进内皮细胞增殖的作用,促进血管新生^[8]。VEGF 除由血管内皮细胞分泌外,缺血和缺氧是诱导其表达上调的强烈因素之一^[9]。Ang 是一族能刺激新血管生长的蛋白分子,研究表明,Ang 对血管生成的影响和局部微环境有关,当 VEGF 等促血管生成因子存在时,Ang-II 竞争抑制 Ang-I 效应,促进血管结构松解,消除血管基底膜和周围细胞对血管形成的限制,并增加内皮细胞对 VEGF 等的敏感性,形成新的毛细血管^[10-13]。因此考察 VEGF 与 Ang-II 在缺氧内皮细胞的表达,对研究缺血性心脏病具有重要意义^[14]。本研究免疫组化、Western blotting 法和 RT-PCR 法,从蛋白及 mRNA 水平上检测缺氧细胞内 VEGF、Ang-II 的表达情况,结果显示 VEGF、Ang-II 在正常血管内皮细胞中仅有少量的表达,在缺氧条件下有明显的增高,启动细胞内源性保护机制,有利于缺氧细胞增殖,川芎嗪与黄芪甲苷给药后可进一步提高蛋白 VEGF 及 Ang-II 在缺氧细胞中的表达,而促血管生成因子 VEGF 及 Ang-II 蛋白表达增高,可能是药物通过激活相应的

信号传导通路减少内皮细胞凋亡,促进内皮细胞增生,促进血管新生,利于侧枝循环的建立,改善组织供血,是川芎嗪与黄芪甲苷保护血管内皮细胞的机制之一。

参考文献

- [1] Shohet R V, Gareia J A. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia [J]. *J Mol Med*, 2007, 85(12): 1309-1315.
- [2] 王振涛, 韩丽华, 朱明军, 等. 川芎嗪注射液促心肌梗后大鼠缺血心肌血管新生作用及对相关生长因子影响的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(7): 888-890.
- [3] 戴瑞鸿, 李 勇. 冠心病心肌缺血的治疗性血管生成与中药 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(3): 163-164.
- [4] 孙秀梅, 张立永, 张 燕. 川芎嗪和黄芪注射液对家兔急性心肌缺血心电图的影响 [J]. 河北北方学院学报, 2010, 26(5): 47-51.
- [5] 宋丽华, 汤碧娥, 张 宁, 等. 黄芪配伍川芎嗪抗心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 金华职业技术学院学报, 2007, 7(6): 45-48.
- [6] 杨 珍, 周惠芬, 周 鹏, 等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1326-1332.
- [7] 李玉梅, 杨欣欣, 韩 旭, 等. 川芎嗪与黄芪甲苷配伍对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用及机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(1): 18-23.
- [8] Amano H, Kato S, Ito Y, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in the recovery from ischemia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): 503-509.
- [9] Greenberg J I, Shields D J, Barillas S G, *et al.* A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation [J]. *Nature*, 2008, 456(7223): 809-813.
- [10] Sinnathamby T, Yun J, Clavetlanthier M É, *et al.* VEGF and angiopoietins promote inflammatory cell recruitment and mature blood vessel formation in murine sponge/matrigel model [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(1): 45-57.
- [11] Brudno Y, Ennettshepard A B, Chen R R, *et al.* Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(36): 9201-9209.
- [12] Timke C, Zieher H, Roth A. Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves the antiangiogenic efficacy for advanced stage mouse corneal neovascularization [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(10): 1493-1501.
- [13] Lobov I B, Brooks P C, Lang R A, *et al.* Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11205-11210.
- [14] 李 娜, 吴世政, 张淑坤, 等. 脉络宁注射液对人血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(11): 1273-1277.