

活血定眩胶囊对小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 基因表达谱的影响及生物信息学分析

宋敏¹, 刘涛^{1*}, 巩彦龙¹, 周灵通¹, 董万涛², 刘建鸿¹

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730020

摘要: **目的** 探讨活血定眩胶囊含药血清对体外培养小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 基因表达谱的影响及作用的分子机制。**方法** 将 30 只大鼠随机分为对照组和活血定眩胶囊组, 2 组分别 ig 给予 7.5 g/kg 活血定眩胶囊和等量生理盐水, 连续 7 d, 采集 2 组大鼠血清。将 bEnd.3 细胞分为对照组、模型组、10%活血定眩胶囊含药血清组, 给药后, bEnd.3 细胞缺氧 6 h。激光显微镜下观察细胞骨架, 运用 Affymetrix U133 plus2.0 基因组表达芯片检测活血定眩胶囊对 bEnd.3 细胞基因表达谱的影响, 应用分子注释系统 MAS3.0 软件进行聚类分析。**结果** 根据 $P < 0.01$, $|\text{Fold Change}| > 3$ 筛选差异基因, 对照组与模型组之间共有 405 个差异基因, 其中表达上调的有 176 个, 表达下调的有 229 个。活血定眩胶囊含药血清组与模型组之间共有 368 个差异基因, 其中表达上调的有 146 个, 表达下调的有 222 个。这些共同的差异基因生物功能包括内皮细胞迁移的正调控、含氧酸代谢过程、血管内皮生长因子的产生、核转录因子- κB (NF- κB) 活性的正向调节等, 参与的信号通路包括氧化应激诱导的衰老、有丝分裂前期、血小板聚集 (堵塞形成)、血管内皮生长因子信号通路、白细胞介素信号通路、p53 通路、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路、凋亡信号通路等信号通路。**结论** 活血定眩胶囊对缺氧所致 bEnd.3 细胞的损伤具有明显的对抗作用, 其机制与氧化应激、抑制细胞凋亡、促进血管内皮新生、炎症及免疫反应有关, 活血定眩胶囊在基因水平通过多条通路调节血管内皮细胞功能。

关键词: 活血定眩胶囊; 小鼠脑微血管内皮细胞; 基因芯片; 抗氧化; bEnd.3 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)08-1617-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.021

Effect of Huoxue Dingxuan Capsule on gene expression profile in mice brain microvascular endothelial cell bEnd.3 and analysis in bioinformatics

SONG Min¹, LIU Tao¹, GONG Yan-long¹, ZHOU Ling-tong¹, DONG Wan-tao², LIU Jian-hong¹

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. The Second Affiliated Hospital of Gansu University of TCM, Lanzhou 730020, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Huoxue Dingxuan Capsule (HDC) containing serum on gene expression profile in mice brain microvascular endothelial cell bEnd.3 and its molecular mechanism. **Methods** Thirty rats were randomly divided into control group and HDC group, each group had 15 rats, and the serum was collected in two groups of rats. BEnd.3 was divided into blank serum group, hypoxia model group, and 10% HDC containing serum group. The cells were intervened in different conditions, and after oxygen deprivation for 6 h, the cytoskeleton was observed under laser microscope. And to detect the effect of HDC containing serum on gene expression profile in mice brain microvascular endothelial cell bEnd.3 by Affymetrix U133 plus2.0 gene expression microarray, and for clustering analysis by molecular annotation system MAS3.0. **Results** Differentially expressed genes were identified based on $P < 0.01$, $|\text{Fold Change}| > 3$. There were 405 differentially expressed genes between blank group and model group, in which 176 genes were up-regulated and 229 genes were down-regulated. There were 368 differentially expressed genes between HDC sero group and model group, in which 146 genes were up-regulated and 222 genes were down-regulated. These differentially expressed genes had the functions of positive regulation of endothelial cell migration, process of acid metabolism,

收稿日期: 2016-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360554); 甘肃省中药现代制造工程研究院项目 (YWW-2015049)

作者简介: 宋敏 (1964—), 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中医药防治颈肩腰腿痛的研究。E-mail: sm@gszy.edu.cn

*通信作者 刘涛 (1990—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中医药防治骨关节疾病。E-mail: 1216294256@qq.com

production of vascular endothelial growth factors, positive regulate activity of NF- κ B transcription factors, oxidative stress-induced senescence, mitosis prophase, platelet aggregation (blockage formation), ect. And many signaling pathways were regulated by these genes including vascular endothelial growth factor signaling pathway, interleukin signal pathway, p53 pathway, TNF-signal pathway, PPAR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, apoptosis signal pathway etc. **Conclusion** HDC has significant inhibitory effects on damage of bEnd.3 cells induced by hypoxia. Its mechanism is related to oxidative stress, inhibition of apoptosis, promotion of angiogenesis, inflammation, and immune response. Huoxue Dingxuan Capsule can regulate the function of vascular endothelial cell on gene level by several signaling pathways.

Key words: Huoxue Dingxuan Capsule; mouse brain microvascular endothelial cells; gene chip; anti-oxidant; bEnd.3 cells

椎动脉型颈椎病是指由于颈椎发生病变引起椎动脉血流障碍,从而导致脑供血不足,临床上出现以眩晕、耳鸣、头痛等为主要症状的一系列症候群^[1]。目前,西医治疗以对症处理为主要原则,缺乏针对椎动脉型颈椎病进行治疗的特异性药物。而中药因其“治病求本”的原则,其治疗椎动脉型颈椎病的优势逐渐突显出来,许多中药还具有保护血管内皮细胞、降低胞内 Ca^{2+} 、扩血管、降低血液黏度的作用^[2-3]。其中,活血定眩胶囊的疗效已得到大量动物实验及临床试验的验证^[4-5],能够改善血管微循环、抑制自由基损伤、抗脑细胞凋亡、提高椎动脉血流量,降低血清纤溶酶原激活物抑制因子(PAI)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)的量^[6-7],但其具体机制仍需进一步研究。血管内皮细胞具有维持管壁通透性,抗血栓形成,调节血管张力、血压和血流速度的生理功能,干预多种与血管有关疾病的生理病理过程^[8]。bEnd.3 细胞是人工改造而获得的一种血管内皮细胞株,具备一系列微血管内皮细胞(microvascular endothelial cell, MVEC)的特征。近年来,随着 DNA 芯片技术的发展,成为研究中药复方作用机制有力而可靠的工具^[9]。本研究应用 DNA 芯片技术研究活血定眩胶囊对培养小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 基因表达谱的影响,从差异基因、蛋白功能、信号通路等层次探讨活血定眩胶囊的分子机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

活血定眩胶囊(组方药材包括炙黄芪、丹参、粉葛、白芷、菊花、石决明、天麻、钩藤、白芍、鸡血藤、白蒺藜、地龙、槲寄生、甘草等),每粒 0.5 g,甘肃中医药大学附属医院生产,批准文号为甘药制字 Z20130010,批号 140816;胎牛血清(批号 FB15011)购于 CLARK 公司;DMEM 高糖培养基(批号 SH3002201)购于 HyClone 公司;胰蛋白酶(批号 25200-056)购于 Gibco 公司;

TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒及扩增试剂盒(日本 Toyobo 公司);Affymetric Human GenomeU133 plus 2.0 芯片(美国 Affymetrix 公司)。

1.2 动物及细胞株

10 月龄 SPF 级健康 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,体质量(300 ± 20) g,许可证号为 SCXK(甘)2015-0021,由甘肃中医药大学实验动物中心提供。小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 为和元生物技术有限公司提供(HYC3339)。

1.3 仪器

Vision 全自动细胞荧光计数分析仪(美国 Cellometer 公司);LSM510META 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss Axioplan Microscope 公司);CKX41 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本三洋电机公司);MCO-5M 三气培养箱(日本三洋电机公司)。

2 方法

2.1 活血定眩胶囊含药血清的制备

将 30 只 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,随机分为对照组和活血定眩胶囊组,根据人与大鼠的剂量折算系数^[10]得出活血定眩胶囊组大鼠的给药剂量为生药 7.5 g/kg(相当于人临床等效剂量^[11]);活血定眩胶囊组 ig 相应剂量的药物(胶囊内容物以生理盐水溶解),对照组 ig 相同体积的生理盐水,每日 2 次,连续给药 7 d,末次给药 2 h 后 10%水合氯醛 ip 麻醉大鼠,腹主动脉采集血液,3 000 r/min 离心 15 min,取血清,滤过除菌后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 bEnd.3 细胞的培养

复苏小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd.3,将其用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基转移至细胞培养瓶中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中继续传代培养,等待 bEnd.3 细胞生长至融合状态后,用 0.5%胰蛋白酶消化传代备用。

2.3 分组、给药与造模

经 MTT 实验确定活血定眩胶囊含药血清的细胞毒性剂量范围(含药血清体积分数 30%以下对 bEnd.3 细胞增殖无影响),预试验确定眩胶囊含药血清的体积分数为 10%。取长成致密单层的 bEnd.3 细胞,分为对照组、模型组、活血定眩胶囊组,每组 5 个复孔。给药前轻轻吸去 6 孔板里培养基, PBS 洗 1 遍,对照组加入 10%空白血清+无血清 DMEM 培养基,模型组加入 10%空白血清+无血清 DMEM 培养基,给药组加入无血清 DMEM 培养基+10%活血定眩胶囊含药血清。对照组 37 °C、5% CO₂ 培养箱内静置培养 6 h;其他各组均置于 37 °C 的缺氧的三气培养箱中,持续通入 95% N₂+5% CO₂ 的混合气体 6 h^[7]。

2.4 微丝绿色荧光探针观察细胞骨架微丝

按照 1×10⁶ 个/L 将细胞种植在激光共聚焦培养皿,干预方法同“2.3”项,终止干预后 37 °C 的 PBS 清洗细胞 2 次,4%多聚甲醛固定 10 min,后用 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗 2 次, PBS 清洗后加入微丝绿色荧光探针,避光室温放置 40 min,再用 0.1% TritonX-100 的 PBS 洗 2 次,放置激光共聚焦显微镜下观察细胞骨架变化。

2.5 总 RNA 提取和 RNA 质量检测

收集各组对数生长期的 bEnd.3 细胞,采用 TRIZOL 方法进行总 RNA 提取。使用紫外分光光度计测定 RNA 在 260、280 和 230 nm 的吸光度(A)值,计算并且评估总 RNA 的浓度和纯度,进而通过变性甲醛凝胶电泳验证总 RNA 的完整性和纯度。经变性甲醛凝胶电泳检测, RNA 样品电泳条带清晰,28 S 与 18 S 条带亮度接近 1:1, A₂₆₀/A₂₈₀≥1.80, RNA 总量≥10 μg。

2.6 基因芯片检测

北京博奥晶典生物技术有限公司提供基因芯片检测技术支持,按照 Affy-metrix 基因表达芯片操作指南进行:纯化 RNA 并进行质检,保证 RNA 的紫外定量 A₂₆₀/A₂₈₀≥1.80,将 RNA 均定量为 5 μg,然后以 RNA 为模板,逆转成纯化 cDNA,转录成 cRNA,并进一步纯化;紫外分光光度计定量检测 cRNA 探针,与 Affymetric Human Ge-nome U133 plus 2.0 芯片进行杂交;清洗工作站对芯片进行洗脱后荧光扫描芯片图像;AGCC 软件(Affy-metrix GeneChip Command Console Software)将图像信号转为数字信号。

2.7 统计学处理

所有基因表达数据的分析均采用 Affymetrix 公司的 GCOS 1.2 软件对获得的各杂交点的信号值进行数据处理和分析。将有显著表达差异的基因,上传到 Affymetrix 分析中心 MAS 平台(Molecule Annotation System, <http://bioinfo.capitalbio.com/mas/>)进行资料分析,获取每个探针的信息。利用 KEGGpathway 和 Gene Ontology (Go) (<http://www.Gene-ontology.org>)分析差异基因在信号通路上的富集程度及分子功能和生物学过程的分类。

3 结果

3.1 含药血清对缺氧损伤后细胞骨架微丝的影响

对照组细胞骨架微丝分布规则,彼此连接,附着在细胞内特定部位,呈丝网状有序排列;模型组可见细胞外形皱缩,间隙加大,微丝断裂,排列紊乱,微丝收缩变短或移向周边,丝网状有序排列消失,少部分微丝缺失出现空隙;活血定眩胶囊含药血清组可见细胞间隙小,微丝连接,排列紧密,形态成长梭形。说明活血定眩胶囊含药血清能减轻在缺氧条件下 bEnd.3 的细胞骨架微丝紊乱。见图 1。

3.2 差异基因分析

各基因的杂交信号强度分布见图 2,该图中每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号,X 轴、Y 轴分别代表 Cy3 和 Cy5 的信号强度,基因表达的差异性经过基因表达谱分析筛选,利用 Gene Spring 11.0 软件绘制芯片数据矩阵图,见图 3。根据 $P<0.01$, |Fold Change|>3 筛选差异基因,结果显示,对照组与模型组之间共有 405 个差异基因,其中表达上调的有 176 个,表达下调的有 229 个。活血定眩胶囊组与模型组之间共有 368 个差异基因,其中表达上调的有 146 个,表达下调的有 222 个。

3.3 GO 分析

使用 DAVID 对模型组与对照组、活血定眩胶囊组与模型组比较获取的差异基因进行 GO 分析($P<0.01$),结果显示,对照组与模型组总共 120 个 GOs 差异基因调节,其中包括 GO_BP (biological process) 80 条,GO_CC (cellular componen) 4 条,GO_MF (molecular function) 16 条。活血定眩胶囊含药血清组与模型组总共 60 个 GOs 差异基因调节,其中包括 GO_BP 54 条,GO_CC 10 条,GO_MF 6 条。在此分析中,主要针对 GO_BP 进行分析,同时认为 P 值越

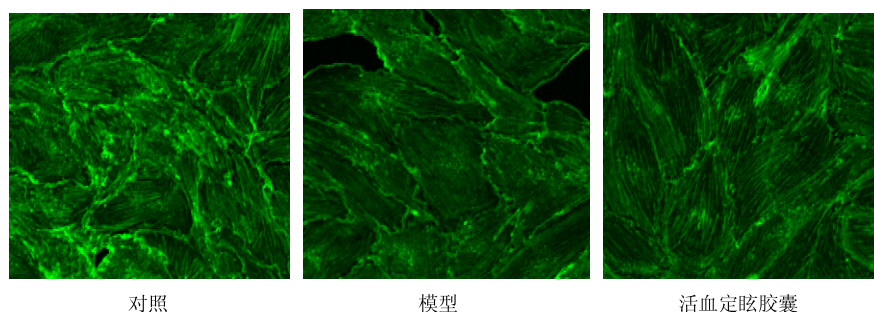


图 1 活血定眩胶囊含药血清对 bEnd.3 细胞骨架微丝的影响 (×100)

Fig. 1 Effect of HDC-drug containing serum on cytoskeleton of bEnd.3 cells (×100)

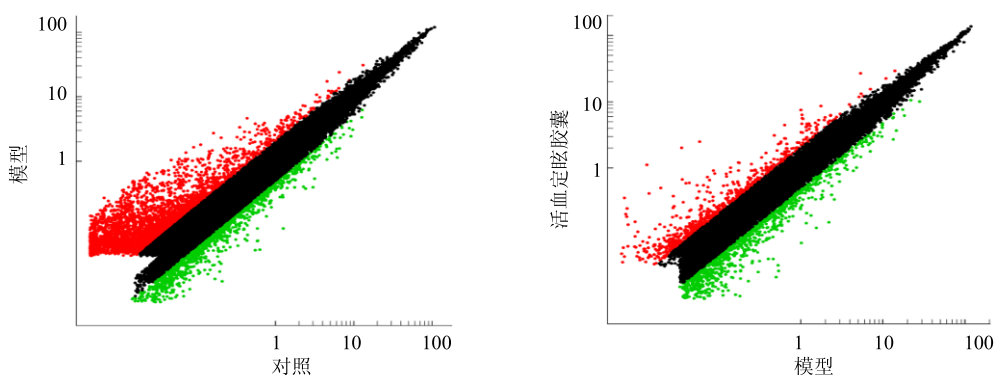


图 2 表达谱芯片杂交信号强度散点图

Fig. 2 Signal intensity log-log scatter plot of microarray

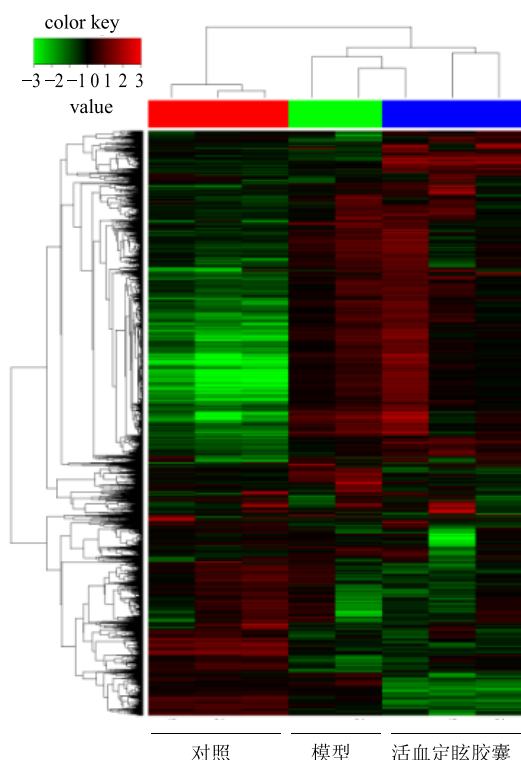


图 3 3 组基因表达谱的聚类图

Fig. 3 Cluster map of gene expression profiles of three groups

小, 该条 GO Term 越有意义, 2 张芯片共同差异基因 GO Term 分析的可能相关包括内皮细胞迁移的正调控、含氧酸代谢过程、有机羟基化合物的代谢过程、钙离子结合、细胞迁移的正调控、血管发育的调控、血管形态、ATP 酶活性的负调控、细胞增殖、白细胞介素-6 (IL-6) 产生、血管内皮生长因子的产生、核转录因子- κ B (NF- κ B) 活性的正向调控等。表 1 列出了最为有意义的部分差异基因所参与的 GO 功能及注释。

3.4 信号通路分析

通过比对 KEGG、Reactome、PANTHER、Biocyc 数据库进行差异基因的途径分析表明, 2 张芯片 (对照组 vs 模型组; 活血定眩胶囊含药血清组 vs 模型组) 共同差异基因的可能相关途径见表 2。其中, 影响较大的包括氧化应激诱导的衰老、有丝分裂前期、血小板聚集 (堵塞形成)、血管内皮生长因子信号通路、白细胞介素信号通路、p53 通路、TNF- α 信号通路、PPAR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、凋亡信号通路、Fas 信号通路、转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路、缺氧反应通过低氧诱导因子 (HIF-1) 活化、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)

表 1 差异基因 GO 功能注释结果

Table 1 Results of functional annotation of differentially expressed genes GO

Go Term	生物过程	数目	P 值	部分基因
GO:0010595	内皮细胞迁移的正调控	8	0.000 6	Plcb1, Inhba, Aurka, Plb1, Oxt, Sele, Bcas3, Alox12
GO:0001525	血管发育调控	23	0.007 7	Aqp1, Ereg, Arhgap24, Itgb3, Col8a1, Ccbe1, Acker3, Ppp1r16b
GO:0045123	细胞增殖	5	0.009 3	Plcb1, Gcnt1, Ripk3, Cxcl12, Sele
GO:0072593	活性氧代谢过程	15	0.002 9	Xdh, Fbln5, Clu, Vimp, Mycn, Ogt, Insr, Duoxa1
GO:0045766	NF-κB 活性的正向调控	9	0.009 9	5430435G22Rik, Clu, Cth, Cat, Prkch, Ikbkg, Ltf, Ripk3
GO:0005509	钙离子结合	45	0.000 3	Tc2n, C1s2, Vldlr, Ccbe1, Fbln1, Cabp2, Enpp2, Eltd1, Icium ion binding

表 2 差异基因通路注释

Table 2 differential gene pathway annotation

信号通路	数目	P 值	部分基因
TNF-α 信号通路	11	0.004 8	Fas, Cxcl2, Pik3r5, Sele, Pik3r3, Nod2, Ptgs2
PPAR 信号通路	7	0.046 2	Acsbg1, Acs16, Rxra, Cpt1a, Scd2, Apoa2, Fabp3
PI3K-Akt 信号通路	20	0.050 8	Insr, Pik3r5, Mtor, Csf3, Itgb3, Figf, Ddit4
VEGF 信号通路	5	0.041 2	Pik3r5, Ptgs2, Pik3r3, Nfatc2, Plcgl
凋亡信号通路	7	0.043 5	Ccnd2, Insr, Pik3r5, Pik3r3, Bnip3, Cat, Irs1
mTOR 信号通路	7	0.044 1	Pik3r5, Pik3r3, Mtor, Irs1, Braf, Ddit4, Eif4e

信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号转导通路、代谢途径等信号通路。

4 讨论

活血定眩胶囊由炙黄芪、菊花、天麻、桑寄生、钩藤、丹参、葛根、鸡血藤、甘草等组成，具有活血、定眩、通络、补益等功效。大量动物实验及临床试验证实，该药能有效改善椎动脉型颈椎病动物模型或患者的血液流变学、降低全血黏度及血浆黏度，抑制 NF-κB、PAI、内皮素（ET）及血栓素 B₂（TXB₂）等因子的表达，促进 t-PA、NO 及 6-酮-前列腺素 F_{1α}（6-keto-PGF_{1α}）等因子的表达。目前针对缺氧所致内皮细胞损伤的致病机制研究大部分仍局限在少数几个基因、蛋白的比较分析范畴内，对血管保护作用的探索也较局限，一般仅在通路水平上进行探讨^[12-13]，这样所提供的信息单一，难以较全面地认识相关基因的表达状况。大量研究证明，基因和蛋白质较少单独起作用，它们往往通过复杂的网络交互作用共同影响生物系统的功能，这些功能高度相关的基因构成基因群。bEnd.3 细胞损伤的发生发展过程中存在着极其复杂的调控网络。基因芯片是一项高通量筛选技术，具有高通量、自动化、高效率、平行等优点，通过少量标本的分析，能够全面地反映疾病基因表达谱^[14-15]。

为了进一步探讨活血定眩胶囊促血管内皮细胞新生的分子机制，本研究采用全基因组芯片技术，从生物信息学角度对其机制进行阐释。差异基因表达谱分析结果显示，活血定眩胶囊组与模型组比较，共有 368 个差异表达的基因，其中表达上调的有 146 个，表达下调的有 222 个（ $P < 0.01$ ，|Fold Change| > 3），差异基因所调控的 GO Term 主要包括内皮细胞迁移的正调控、含氧酸代谢过程、有机羟基化合物的代谢过程、细胞迁移的正调控、血管发育的调控、血管形态、ATP 酶活性的负调控、细胞增殖、IL-6 产生、血管内皮生长因子的产生、NF-κB 转录因子活性的正向调节等。IL-6 升高是脑血管炎性损害的标志，IL-6 刺激前列腺素（PGE）、血小板活化因子的产生，诱导一氧化氮合酶（NOS）的表达，进而促进炎症的发展和血管内皮损害^[16]。VEGF 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，慢性脑缺血后，激活 VEGF/VEGFR 受体系统，促使缺血区 VEGF 高表达，VEGF 诱导内皮细胞增殖，促进大量新生血管形成，促进侧支循环建立，增加受累脑组织的灌注及供养，较少神经元坏死及凋亡，从而减轻缺血性脑组织损伤^[17-18]。在椎-基底动脉供血不足 CSA 模型中 NF-B 被激活，NF-κB 能结合到参与炎症反应的大量基因的启动子上，如细

胞间黏附分子 (ICAM)、E-选择素、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、IL-1、IL-8、IL-6、TNF- α 、环氧合酶 (COX-2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 提示 NF- κ B 活化是许多黏附分子和细胞活素上调的上游共同通路^[19]。这提示活血定眩胶囊治疗内皮细胞损伤机制可能是多途径、多靶点的, 尤其与血管新生、凋亡相关、信号转导相关、免疫相关和细胞周期相关。

参与的信号通路主要包括氧化应激诱导的衰老、有丝分裂前期、血小板聚集 (堵塞形成)、血管内皮生长因子信号通路、白细胞介素信号通路、p53 通路、TNF- α 信号通路、PPAR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、凋亡信号通路、Fas 信号通路、TGF- β 信号通路、缺氧反应通过 HIF 活化、mTOR 信号通路、MAPK 信号转导通路、代谢途径等。这提示活血定眩胶囊可能通过上述信号通路对缺氧损伤 bEnd.3 细胞进行保护, PI3K/Akt 通路广泛存在于细胞中, 作为联系胞外信号与细胞应答效应的桥梁, 作用于下游信号分子, 参与细胞生长、增殖、分化。活化的 Akt 通过磷酸化进一步激活/抑制 Bad、Caspase-9、NF- κ B、Tuberin、mTOR 等下游因子, 介导多种生长因子诱发的细胞增殖、迁移等, 是重要的抗凋亡因子^[20]。MAPK 是细胞内促增殖和传递应激信号的转导通路的核心环节, 该家族包括 ERK、JNK、p38 等亚族。MAPK 可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等底物参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡及细胞间的功能同步等细胞生理过程^[21]。MAPK 磷酸酶激活多种转录因子, 影响基因表达, 调节细胞增殖。PPARs 是核受体超家族中的一类配体依赖的核转录因子, 包括 α 、 β/δ 和 γ 3 种亚型, 大量研究证明 α 和 γ 亚型在调节过氧化物酶体增殖、能量代谢、细胞分化及炎症反应等过程中发挥重要作用^[22]。以上信号通路主要与氧化应激、炎症、血管新生等密切相关, 因此在椎动脉型颈椎病的发生过程中起重要作用。

目前, 大量动物实验及临床试验已充分证实了活血定眩胶囊的有效性, 本研究从 mRNA 角度对活血定眩胶囊治疗缺氧损伤 bEnd.3 细胞的分子机制进行了探讨, 研究方法较为新颖, 对阐明活血定眩胶囊治疗椎动脉型颈椎病的机制及临床实际具有一定的指导意义。本研究通过细胞实验再一次证实活血定眩胶囊能显著改善缺氧损伤 bEnd.3 细胞损伤, 同时基因芯片分析结果显示, 活血定眩胶囊能

改善缺氧损伤 bEnd.3 细胞基因表达谱, 这些基因改变可能参与了细胞凋亡、氧化应激和凝血纤溶等过程, 今后可进一步研究活血定眩胶囊作用的信号通路。然而, 关于活血定眩胶囊治疗椎动脉型颈椎病的具体机制仍需要进一步的研究, 需要将中医药与网络药理学技术相结合, 找出具有重要意义的调控靶点, 同时可进行复方组分的相关分析研究, 更加深入探讨活血定眩胶囊改善椎动脉型颈椎病的机制, 为活血定眩胶囊的有效性提供科学依据。

参考文献

- [1] Sultan M J, Hartshorne T, Naylor A R. Extracranial and transcranial ultrasound assessment in patients with suspected positional vertebrobasilar ischaemia [J]. *Eur J Vasc Surg*, 2009, 38(1): 10-13.
- [2] 马桂鑫, 赵文文, 陈修平. 血管内皮细胞损伤模型及中药保护作用研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 276-283.
- [3] 张丽心, 孙涛, 曹永孝. 钩藤碱的降压及舒张血管作用 [J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(5): 39-41.
- [4] 宋敏, 温孝明, 郭成龙, 等. 活血定眩丸对治疗椎动脉型颈椎病血液流变学的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(9): 2167-2168.
- [5] 董万涛, 宋敏, 吕泽斌, 等. 活血定眩胶囊治疗椎动脉型颈椎病临床疗效评价 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(1): 33-35.
- [6] 李清林, 宋敏, 孙定平, 等. 活血定眩胶囊对 CSA 模型大鼠椎动脉血流量及血浆 PAI、t-PA 水平的影响 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2016, 47(6): 862-865.
- [7] 宋敏, 董万涛. 活血定眩丸对 CSA 大鼠血液流变学及小脑 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2012, 20(8): 6-9.
- [8] 刘涛, 宋敏, 巩彦龙, 等. 中药对脑微血管内皮细胞影响的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(6): 1461-1463.
- [9] Fan X, Shi M, Wang Y, et al. Transcriptional profiling analysis of HMP-treated rats with experimentally induced myocardial infarction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 199-204.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [11] 刘涛, 宋敏, 巩彦龙, 等. 活血定眩胶囊含药血清减轻小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 缺氧损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(3): 552-556.
- [12] 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.

- [13] 周 鹏, 周惠芬, 何 昱, 等. 丹红注射液对乳鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2727-2731.
- [14] 李建平, 何 轩, 姜 蓉, 等. 人参多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 940-943.
- [15] Yu H, Venkatesha S H, Moudgil K D. Microarray-based gene expression profiling reveals the mediators and pathways involved in the anti-arthritis activity of celastrol-derived celastrol [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(4): 499-506.
- [16] Capozzi M E, Mc Collum G W, Cousins D B, *et al*. Linoleic acid is a diabetes-relevant stimulator of retinal inflammation in human retinal muller cells and microvascular endothelial cells [J]. *J Diab Metabol*, 2016, 7(12): 718-727.
- [17] E G Cao Y, Bhattacharya S. Endogenous vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) maintains endothelial cell homeostasis by regulating VEGF receptor-2 transcription [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(5): 3029-3041.
- [18] Ikhapoh I A, Pelham C J, Agrawal D K. Synergistic effect of angiotensin II on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 4-17.
- [19] 孙定平. 活血定眩胶囊对 CSA 模型大鼠血管功能影响的实验研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2016.
- [20] Usatyuk P V, Fu P, Mohan V, *et al*. Role of c-Met/Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3k)/Akt signaling in hepatocyte growth factor (HGF)-mediated lamellipodia formation, reactive oxygen species (ros) generation, and motility of lung endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(19): 13476-13491.
- [21] Sheikh A Q, Taghian T, Hemingway B, *et al*. Regulation of endothelial MAPK/ERK signalling and capillary morphogenesis by low-amplitude electric field [J]. *J Royal Soc Interface*, 2013, 10(78): 20120548.
- [22] Xu L, Wang S, Li B, *et al*. A protective role of ciglitazone in ox-LDL-induced rat microvascular endothelial cells via modulating PPAR γ -dependent AMPK/eNOS pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(1): 92-102.