

白芷提取物促糖尿病溃疡新生血管成熟作用及机制研究

雷思思¹, 胡志波¹, 郭俊¹, 闫凤娟¹, 张晓娜², 翟仰魁¹, 吴晓明¹, 孙蓓¹, 潘从清^{1*}

1. 天津医科大学 卫生部激素与发育重点实验室, 天津代谢病重点实验室, 天津医科大学朱宪彝纪念&代谢病医院, 天津 300134

2. 天津医科大学总医院 内分泌代谢科, 天津 300052

摘要: **目的** 研究白芷提取物对自发 2 型糖尿病 db/db (C57BLKS/J) 小鼠皮肤溃疡新生血管成熟的影响与机制。**方法** 选取 8 周龄雄性 db/db 小鼠随机分为模型组及白芷提取物组, 同窝雄性 db/m 小鼠作为对照组。背部打孔法制备糖尿病溃疡小鼠模型。白芷提取物组以白芷提取物 1.8 g/kg ig 给药, 对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 连续给药 21 d。记录创伤后 2、4、7、11、14、21 d 小鼠创面大致情况; 对创伤后 11 d 各组小鼠创面进行 HE、免疫组化、免疫荧光染色观察创面组织形态、新生血管数量与成熟情况以及创面叉头转录因子 (FOXO1)、血管生成素-2 (Ang-2) 在创面组织中的定位表达; 体外根据不同干预条件, 将内皮细胞分为正常糖浓度缺氧组、高糖缺氧组、高渗缺氧组、高糖缺氧+白芷提取物组。并将不同干预条件下内皮细胞与周细胞共培养, 观察白芷提取物干预高糖缺氧下内皮细胞对周细胞趋化作用及体外管状结构形成的影响。**Western blotting** 法检测各组创面组织及内皮细胞中 FOXO1、p-FOXO1、Ang-2 蛋白水平及其上游蛋白激酶 B (Akt) 蛋白及磷酸化蛋白水平。**结果** 创伤后 4、7、11、14、21 d, 白芷提取物组创面愈合速率、创面恢复大致情况、创面组织中血管形成数量及新生血管成熟情况明显优于模型组 ($P<0.05$); 白芷提取物组中 FOXO1 和 Ang-2 蛋白表达水平明显高于模型组 ($P<0.05$), 白芷提取物组中 p-Akt、p-FOXO1 蛋白表达均低于模型组 ($P<0.05$); 体外实验中白芷提取物干预高糖缺氧下内皮细胞后, 细胞中 FOXO1 和 Ang-2 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), p-Akt, p-FOXO1 蛋白表达明显增加 ($P<0.05$); 此外, 白芷提取物能提高高糖缺氧下内皮细胞对周细胞的趋化作用, 促进高糖缺氧下内皮细胞与周细胞体外管状结构形成。**结论** 白芷提取物能促进新生血管形成与成熟, 从而提高 db/db 小鼠创面愈合速率和质量, 其作用机制可能与下调 FOXO1/Ang-2 通路, 实现内皮细胞对周细胞募集及管状结构形成有关。

关键词: 白芷提取物; 糖尿病; 溃疡; 新生血管成熟; 叉头转录因子; 血管生成素-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3223-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.014

Effect and mechanism of *Angelica dahurica* extract on promoting neovascularization maturation of diabetic ulcer

LEI Si-si¹, HU Zhi-bo¹, GUO-Jun¹, YAN Feng-juan¹, ZHANG Xiao-na², ZHAI Yang-kui¹, WU Xiao-ming¹, SUN Bei¹, PAN Cong-qing¹

1. NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital & Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China

2. Department of Endocrinology and Metabolism, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of *Angelica dahurica* extract (AD) on neovascularization maturation in db/db mice. **Methods** Forty-eight 8-week-old male db/db mice were randomly divided into model group and *A. dahurica* extract-treated group, and 24 littermate male db/m mice were set as control group. A mouse model of diabetic ulcer was prepared by punching the back. The *A. dahurica* extract-treated group was administered with AD 1.8 g/kg ig, and control group and model group were ig administered with the same amount of normal saline for 21 d. The healing condition of mouse wounds was recorded at 2, 4, 7, 11, 14 and 21 d after trauma. The number and maturation of new blood vessels in wound tissues was observed by HE,

收稿日期: 2020-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NSFC 81873304)

作者简介: 雷思思 (1993—) 女, 在读硕士研究生。Tel: 15522027706 E-mail: 15522027706@163.com

*通信作者 潘从清 (1965—), 男, 博士生导师, 主任医师, 主要从事中西医结合防治糖尿病及其并发症的基础与临床研究。

Tel: (022)59560951 E-mail: cq.pan@163.com

immunohistochemistry and immunofluorescence staining at 11 d after trauma. Expression of fork head transcription factor (FOXO1) and angiopoietin-2 (Ang-2) in wound tissues were detected by Western blotting and immunohistochemistry. According to different intervention conditions *in vitro*, endothelial cells were divided into normal glucose and hypoxia group, high glucose and hypoxia group, hypertonic and hypoxic group, high glucose and hypoxia + *A. dahurica* extract-treated group. Endothelial cells were co-cultured with pericytes under different intervention conditions, and the effects of *A. dahurica* intervention on endothelial cells' chemotaxis and tubular structure formation *in vitro* under high glucose and hypoxia were observed. Western blotting was used to detect the levels of FOXO1, p-FOXO1 and Ang-2 proteins and their upstream protein kinase B (Akt) and phosphorylation protein changes in wound tissues and endothelial cells. **Results** The wound healing rate of the *A. dahurica* extract-treated group, the general recovery of the wound, the number of blood vessels and the maturation of new blood vessels in the wound tissue were significantly better than the model group ($P < 0.05$). FOXO1 and Ang-2 protein expression levels in the *A. dahurica* extract-treated group were significantly higher than the model group ($P < 0.05$); p-Akt and p-FOXO1 protein expression in the *A. dahurica* extract-treated group were lower than model group ($P < 0.05$). After *A. dahurica* intervention in endothelial cells under high glucose and hypoxia *in vitro*, the expression levels of FOXO1 and Ang-2 protein in the cells were significantly reduced ($P < 0.05$), p-Akt and p-FOXO1 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$); In addition, *A. dahurica* extract could increase the chemotaxis of endothelial cells to pericytes under high glucose and hypoxia and promote the formation of tubular structures of endothelial cells and pericytes *in vitro* under high glucose and hypoxia. **Conclusion** *A. dahurica* extract can promote the formation and maturation of neovascularization, so as to improve the rate and quality of wound healing in db/db mice. The mechanism may be related to the down-regulation of FOXO1/Ang-2 pathway, the recruitment of endothelial cells to pericytes, and the promotion of the maturation of wound new blood vessels.

Key words: *Angelica dahurica* extract; diabetic wound; neovascularization maturation; FOXO1; Ang-2

糖尿病皮肤创面的新生血管减少及新生血管壁基底部周细胞缺失, 新生血管向成熟表型发展受阻, 从而使创面微循环血流量、微血管通透性异常, 不能满足创面及周围组织氧气与营养需要, 是糖尿病创面难以愈合修复的主要原因^[1-2]。虽然糖尿病皮肤创面治疗研究开发了很多新的治疗手段, 如生长因子治疗、干细胞治疗、基因治疗等^[3-4], 但这些治疗手段因长期大量使用一些外源性生长因子或干细胞聚集分泌大量生长因子, 过度刺激血管不稳定, 血管内皮细胞出芽, 并不适用于糖尿病视网膜病、糖尿病肾病患者, 甚至异常不稳定血管新生会增加致癌风险^[5]。正常创面血管生成, 包括血管内皮细胞的出芽和进一步的血管成熟。对于治疗创面血管生成障碍, 不仅要考虑血管生成的早期即内皮细胞向创面募集形成血管芽, 还要考虑血管成熟的过程, 以建立缺血组织的功能血管网。研究表明^[6], 叉头转录因子 (FOXO1) 与血管生成素-2 (Ang-2) 与新生血管成熟密切相关。近年来众多研究表明在使用中医药治疗或标准治疗的基础上加用中医药辅助治疗能够明显促进新生毛细血管形成与成熟, 改善创面血液循环, 促进肉芽组织形成, 提高创面愈合速率和质量^[7-11]。

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根, 《景岳全书》云: “其气辛香达表, 故治疮疡排脓止痒定痛, 托痈疽肺痈癰癰痔瘻, 长肉生肌”。强调了白芷

对难愈溃疡痔瘻创面的生肌愈合作用。欧前胡素、异欧前胡素等香豆素类化合物是白芷中主要有效成分^[12-14], 现代药理研究表明白芷具有抗炎、抗氧化应激、促血管形成等作用^[15-16]。课题组前期研究发现白芷给药后能有效促进链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠创面愈合^[17]。但其对糖尿病创面血管形成的影响与作用机制尚未清楚。本研究给予 db/db 小鼠白芷提取物, 观察给药后 db/db 小鼠皮肤创面愈合及创面血管形成情况, 同时体外以白芷提取物干预高糖缺氧下内皮细胞, 并将干预后的内皮细胞与周细胞共培养, 旨在探讨白芷提取物对糖尿病溃疡新生血管形成及成熟的影响及其相关作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

自发 2 型糖尿病 C57BLKS/J db/db 小鼠 (db/db) 72 只, 雄性, 8 周龄, 体质量 (44.37 ± 0.46) g; 同遗传背景的 C57BLKS/J db/+ 小鼠 (db/m) 36 只, 雄性, 8 周龄, 体质量 (22.86 ± 0.28) g, 购自南京大学模式动物研究所, 许可证号 SCXK (苏) 2018-0008。

1.2 药物与试剂

白芷饮片 (广东一方制药有限公司, 批号 CG1802003)。兔抗磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、蛋白激酶 B (Akt)、FOXO1 多克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 兔抗 CD31、p-FOXO1、

Ang-2 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);鼠抗 α -SMA 多克隆抗体(武汉塞维尔生物公司), β -actin 兔单克隆抗体(武汉 ABclonal 公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L) (天津三箭生物技术有限公司);内皮细胞培养基(ECM),周细胞培养基(PM),胎牛血清(FBS),青链霉素混合液(Penicillin-Streptomycin),美国 Sciencell 公司);CoCl₂ (北京红星化工厂)。

1.3 仪器

卓越纤巧型血糖仪及试纸,罗氏诊断产品有限公司;3K30 型高速台式冷冻离心机,美国 Sigma 公司;BioTek Synergy2 多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;Bio-Rad 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Syngene G BOX 凝胶成像系统,英国 Syngene 公司;电热恒温金属浴(杭州奥盛仪器有限公司);恒温 CO₂ 孵育箱(德国 Heraeus 公司)。

2 方法

2.1 白芷提取物的制备

取白芷饮片 3 000 g,加入 5 倍量水煎煮,煮沸 30 min 后滤过,滤液浓缩成浸膏(干浸膏出膏率为 20%~33%),4 °C 保存。实验时稀释,最终得生药质量浓度为 10 mg/mL 的白芷提取物(高效液相色谱法分析欧前胡素质量分数为 0.12%)。

2.2 动物模型制备与分组

所有小鼠在温度(22±2) °C,相对湿度(60±10)%,保持 12 h 光照/12 h 黑暗交替的 SPF 级动物房中进行饲养,适应性喂养 1 周后,称量体质量并检测血糖,苯巴比妥麻醉,利用直径 6 mm 打孔器在背部皮肤上打孔 2 个,制备皮肤溃疡动物模型,db/db 小鼠随机分为模型组与白芷提取物组,db/m 小鼠为对照组,每组各 27 只,以取材时间点不同每组又分为 3 个亚组,分别为对照(4、7、21 d)组,模型(4、7、21 d)组,白芷提取物(4、7、21 d)组,每组各 9 只小鼠。

2.3 给药及取材

白芷提取物组小鼠 ig 给予白芷提取物水溶液 1.8 g/kg(根据《中国药典》2015 年版中白芷临床成人给药量为 0.2 g/kg,通过小鼠与人体表面积法换算确定)。对照组和模型组小鼠 ig 给予等量生理盐水,各组每天给药 1 次,连续给药 21 d。分别于创伤 2、4、7、11、14、21 d 观察创面溃疡愈合状态,计算创面愈合率。使用直径 8 mm 的皮肤打孔器取材,其中背部左侧组织用于病理学检测,右侧

组织用于 Western blotting 法检测,备用。

创面愈合率=(原始创面面积-未愈创面面积)/原始创面面积

2.4 组织病理学检查

将已固定的溃疡组织标本分别经梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片(约 4 μ m 厚)。脱蜡至水,进行 HE 染色、免疫组织化学法及免疫荧光双染,观察并评价创面血管形成、组织修复、新生血管数量和成熟情况,及与新生血管成熟障碍密切相关的 FOXO1 与 Ang-2 在创面组织中的定位表达情况。

2.5 白芷提取物对高糖缺氧下内皮细胞活性的影响

人脐静脉内皮细胞(HUVEC),购自美国 Sciencell 公司,使用糖浓度均为 5.5 mmol/L 的 ECM 完全培养基培养。将细胞放置于 37 °C 和 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。为模拟糖尿病创面血管内皮细胞缺氧环境,给予 100 μ mol/L CoCl₂ 使内皮细胞化学缺氧,建立体外内皮细胞缺氧模型^[18]。其中内皮细胞根据不同干预条件分为正常糖浓度缺氧组:5.5 mmol/L 糖浓度 ECM+100 μ mol/L CoCl₂;高糖缺氧组:33.3 mmol/L 糖浓度 ECM+100 μ mol/L CoCl₂;高渗缺氧组:5.5 mmol/L 糖浓度 ECM+27.8 mmol/L 甘露醇+100 μ mol/L CoCl₂;高糖缺氧+白芷提取物组:33.3 mmol/L 糖浓度 ECM+100 μ mol/L CoCl₂+白芷提取物,通过 CCK-8 实验结果确定白芷提取物给药质量浓度为 100 ng/ μ L。细胞实验中,使用无菌去离子水溶解白芷提取物后,使用 0.22 μ m 滤膜滤过除菌,细胞实验时现配现用。

2.6 Transwell 共培养观察白芷提取物干预高糖缺氧内皮细胞后对周细胞的趋化作用

为检测白芷提取物干预后的高糖缺氧下内皮细胞对周细胞趋化作用。使用 Transwell 小室对内皮细胞与周细胞共培养,其中周细胞为人脑血管周细胞(HBVP),购自美国 Sciencell 公司;调整内皮细胞、周细胞均为 5×10⁵ 个/mL 后,通过 Transwell 小室共培养,24 孔板 Transwell 小室下室分别加入 500 μ L 的内皮细胞悬液,取 100 μ L 周细胞悬液加入 24 孔 Transwell insert 中,两室通过 Transwell insert 膜交通,建立内皮细胞-周细胞共培养体系。根据下室内培养液的不同分为正常糖浓度缺氧、高糖缺氧组、高渗缺氧组及高糖缺氧+白芷提取物组,处理方法同“2.5”项。共培养 12 h 后,吸弃 Transwell insert 内培养液,用棉签轻轻擦除 Transwell insert 内侧面

贴壁细胞,漂洗,固定,风干后,每孔加 200 μL 0.1% 结晶紫染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置 20 min。轻轻甩去染液并用蒸馏水洗涤各孔,置于倒置显微镜上观察染色情况并拍照计数。

2.7 白芷提取物对高糖缺氧下内皮细胞与周细胞体外管状结构形成的影响

为检测白芷提取物干预后高糖缺氧下内皮细胞与周细胞体外管状结构形成能力的影响,使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜融化的 matrigel 胶包被预冷的 96 孔板,每孔 50 μL ,置于细胞培养箱中 30 min 促使其凝固。细胞重悬后,调整细胞密度,内皮细胞为 1×10^5 个/mL,周细胞为 1×10^4 个/mL。并使用 Dio 荧光探针(绿色)对周细胞进行荧光染色。将内皮细胞和周细胞悬液接种在 matrigel 胶上,加入含有不同干预的无血清培养液,各干预组(与“2.6”项实验分组及处理一致)设置 3 个复孔,放入细胞培养箱中培养 2~12 h,倒置显微镜拍照,观察细胞管样结构上荧光情况,使用 Image J 软件分析小管样结构的长度与节点数。

2.8 Western blotting 法检测创面组织及细胞中相关蛋白表达

组织总蛋白提取:称取相同大小的创面组织放入 EP 管中,加入 RIPA 裂解液(PMSF-磷酸酶抑制剂-RIPA 1:1:100)后,研磨,冰上静置后,4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心机 12 000 $\times g$,离心 10 min。吸取上清,即组织总蛋白。细胞蛋白提取:细胞干预结束,冰 PBS 漂洗后,向各干预孔中分别加入 120 μL RIPA 裂解液,于冰上反复吹打后数次使细胞充分裂解后,吸取各孔液体即为细胞蛋白。BCA 法测蛋白浓度,蛋白变性,测定浓度,变性,电泳,转膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 漂洗后加入二抗,室温孵育 1 h;TBST 漂洗后 ECL 化学发光,显影,化学发光成像仪曝光。Image J 进行灰度分析。

2.9 统计学方法

所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 统计软件进行实验相关数据的分析,采用 Graph Pad Prism 7.0 进行作图。各组之间比较采用单因素方差分析,若方差齐性不成立,则选取 Tamhane T2 检验;若方差齐性成立,选取 LSD 检验。

3 结果

3.1 皮肤溃疡模型建立后小鼠生存情况

制作小鼠皮肤溃疡模型时,由于麻醉意外及糖尿病急性并发症等原因,自造模后至实验终点,对

照组共死亡 4 只小鼠,模型组共死亡 6 只小鼠,白芷提取物组共死亡 6 只小鼠。创伤后各时间点取材时情况为:创伤后 4 d 取材时,对照组 8 只,模型组 8 只,白芷提取物组 9 只;创伤后 7 d 取材时,对照组 9 只,模型组 8 只,白芷提取物组 6 只;创伤后 11 d 取材时,对照组 7 只,模型组 6 只,白芷提取物组 6 只;创伤后 21 d 取材时,对照组 8 只,模型组 8 只,白芷提取物组 9 只。

3.2 白芷提取物给药后 db/db 小鼠创面大体形态改变

创伤后 2 d,对照组小鼠创面呈鲜红色并开始明显收缩变小;模型组及白芷提取物组创面呈粉红色,未见明显收缩。创伤后 4 d,模型组创面黄白色渗出明显,创面面积未见明显改变;对照组与白芷提取物组无明显渗出,可见红色肉芽组织生长,创面面积收缩明显。创伤后 7 d,对照组创面表皮自创面外周向中心爬行,创面面积明显缩小,创面中心暴露的开放创面呈鲜红色;模型组仍有少许液体渗出,创面面积未见明显改变;白芷提取物组创面面积明显缩小,创面由红色肉芽组织覆盖。创伤后 11 d,对照组小鼠创面接近愈合,新生表皮较薄并向创面中心靠拢;模型组创面较之前收缩,创面呈现鲜红色;白芷提取物组创面收缩明显,表皮自创面外周向中心爬行。创伤后 14、21 d,对照组小鼠创面基本愈合,创面浅薄新生表皮进一步成熟加厚,由浅红色变为白色,与周围组织一致;模型组直至 21 d 创面仍较大,表皮有向创面中心爬行趋势;白芷提取物组创面基本封闭,创面呈粉红色。见图 1。

自创伤后 2 d 起,模型组创面愈合速率均明显低于对照组与白芷提取物组($P < 0.05$);创伤后 4~14 d,白芷提取物组创面愈合速率低于对照组($P < 0.05$),创伤后 21 d,白芷提取物组创面愈合率与对照组无明显差异。见图 2。

3.3 白芷提取物给药后 db/db 小鼠创面组织病理形态改变

从 4、7、11 d 不同时间点观察创面组织病理形态改变:对照组创面肉芽组织填充,创面修复明显快于模型组,白芷提取物干预后能加快 db/db 小鼠肉芽组织形成。选取各组创口修复最佳处肉芽组织高倍镜下观察:创伤后 4 d 各组创面均有不同程度炎症,伴坏死组织、渗出;其中模型组炎症浸润严重,新生血管稀少;对照组和白芷提取物组炎症反应轻,对照组新生血管多,白芷提取物组相对较少,结果见图 3。

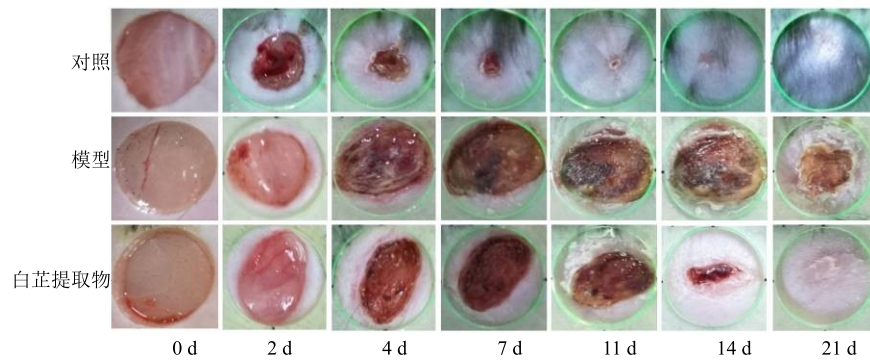
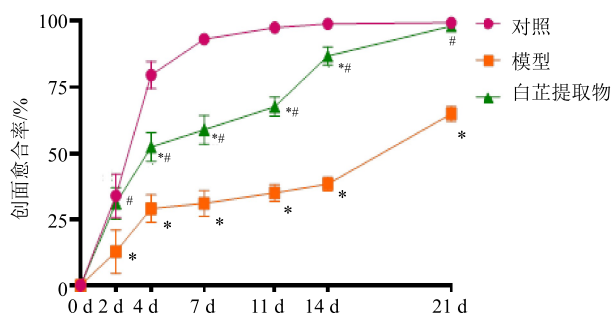


图 1 各组小鼠不同时间点创面愈合情况

Fig. 1 Wound healing of mice in each group at different time points



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 2 各组小鼠不同时间点创面愈合率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Wound healing rate of mice in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

创伤后 7 d 各组创面炎症反应均减轻, 对照组新生血管丰富, 血管管腔较大; 模型组新生血管数量较少, 血管管腔小; 白芷提取物干预后的 db/db 小鼠新生血管数量明显增加, 血管管腔较小。创面新生血管数量及胶原基质沉淀均明显增加。结果见图 4。

创伤后 11 d, 对照组创面新生血管较多, 管腔大, 各细胞排列紧密, 创面修复佳; 模型组创面新生毛细血管数量增加, 但血管管腔较小, 细胞间质较稀疏, 创面修复较差; 白芷提取物干预后的 db/db 小鼠创面毛细血管较多, 管腔大, 细胞排列较紧密, 创面修复状态明显好转。结果见图 5。

3.4 白芷提取物对 db/db 小鼠创面新生血管数量的影响

正常创后 7~10 d 血管新生会达高峰, 为了进一步观察白芷提取物干预后新生血管形成的影响。对 11 d 各组创面肉芽组织血管内皮细胞特异性标记物 CD31 进行免疫组化染色, 评估肉芽组织增生期新生血管密度, 对照组新生血管旺盛, 血管密度高, 管腔较大, CD31 呈强阳性; 模型组肉芽组织中新血管数量均少于对照组和白芷提取物组, 且管径小, CD31 呈弱阳性, 白芷提取物干预后的 db/db 小鼠创面毛细血管数量明显增加, 血管管腔大, CD31 呈强阳性表达。结果见图 6。

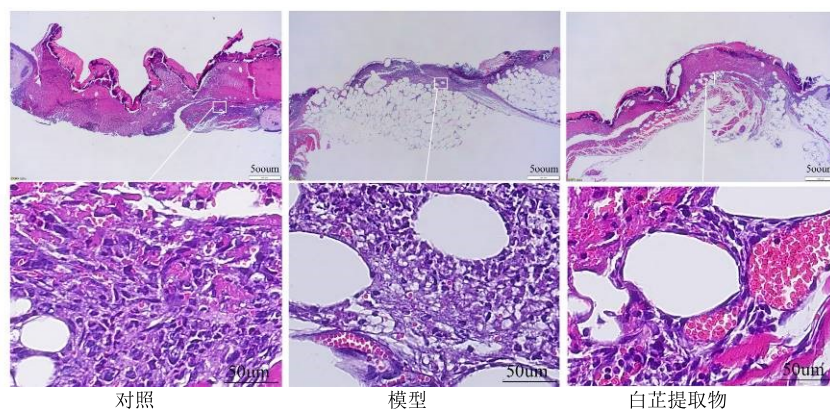


图 3 创伤后 4 d 各组小鼠创面 HE 染色

Fig. 3 HE staining of mouse wounds in each group 4 d after trauma

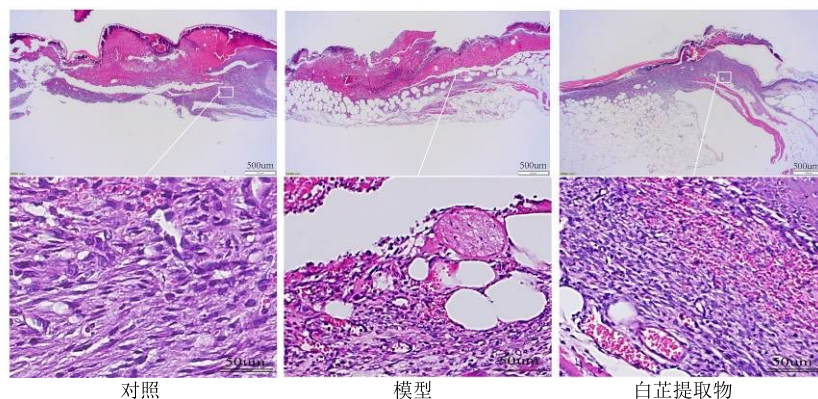


图 4 创伤后 7 d 各组小鼠创面 HE 染色

Fig. 4 HE staining of mouse wounds in each group 7 d after trauma

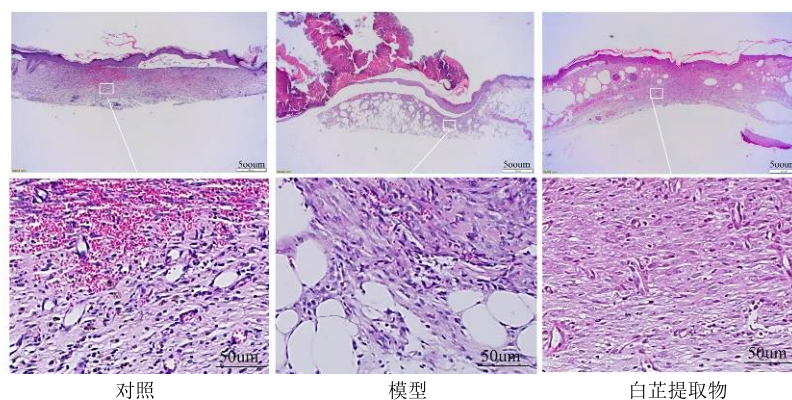


图 5 创伤后 11 d 各组小鼠创面 HE 染色

Fig. 5 HE staining of mouse wounds in each group 11 d after trauma

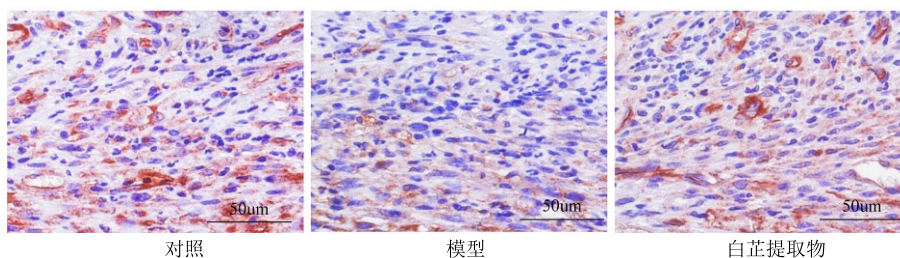


图 6 创伤后 11 d 各组小鼠创面组织新生血管数量

Fig. 6 Number of neovascularization in wound tissue of mice in each group 11 d after trauma

3.5 白芷提取物对 db/db 小鼠创面新生血管成熟的影响

同时为了观察白芷提取物干预后对创面新生血管的成熟影响,对 7、11 d 各组小鼠创面组织的新生血管中血管内皮细胞特异性标记物 CD31 和周细胞特异性标记物 α -SMA 进行免疫荧光双染,其中 CD31 为绿色荧光, α -SMA 为红色荧光,通过周细胞对内皮细胞的覆盖情况来评估

肉芽组织增生期血管的成熟状态。镜下可见,对照组新生血管管壁上标记为内皮荧光周围均有标记为周细胞的绿色荧光覆盖。提示周细胞包裹在新生血管内皮细胞周围,血管成熟情况较好,而模型组组织中,CD31 阳性血管内皮细胞周围 α -SMA 染色明显减少,如图中白色箭头所示;而白芷提取物干预后 α -SMA 和 CD31 双阳性血管含量增加。结果见图 7。

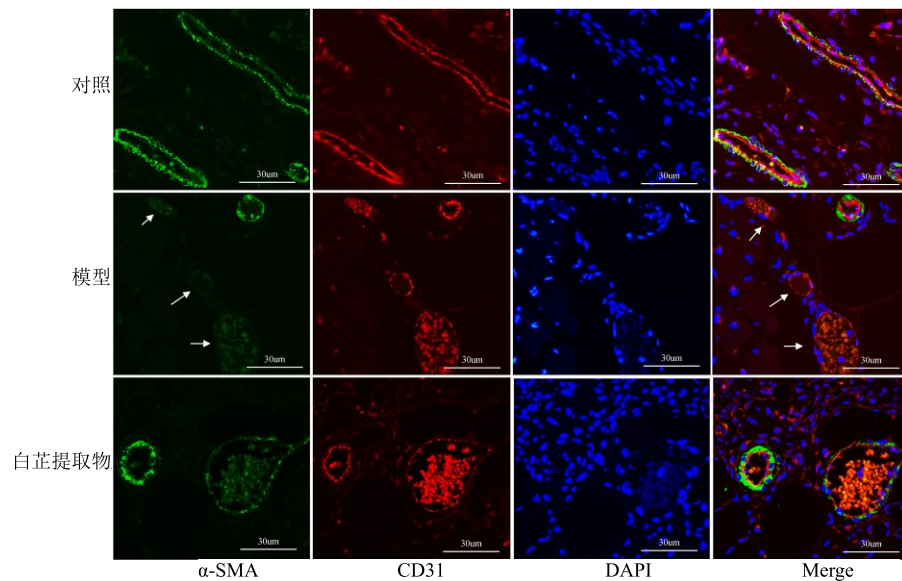


图 7 创伤后 11 d 各组小鼠创面组织新生血管 CD31/ α -SMA 荧光双染

Fig. 7 CD31/ α -SMA fluorescence double staining of neovascularization in wound tissue of mice in each group 11 d after trauma

3.6 白芷提取物对 db/db 小鼠创面 FOXO1、Ang-2 表达的影响

FOXO1、Ang-2 与创面新生血管形成与成熟密切相关,为进一步探讨白芷提取物促进 db/db 小鼠创面新生血管形成与成熟的机制,使用免疫组化染色与 Western blotting 检测创伤后 11 d 各组创面组织中 FOXO1、Ang-2 表达情况。对创面 FOXO1、Ang-2 进行免疫组化染色发现,FOXO1 阳性物质呈棕黄色,分布于细胞胞核,对照组 FOXO1 阳性表达较少;模型组 FOXO1 呈强阳性表达,白芷提取物干预后 FOXO1 阳性表达明显较模型组明显减少。

Ang-2 阳性物质呈棕黄色分布于血管内皮细胞周围,对照组 Ang-2 弱阳性表达;模型组 Ang-2 呈强阳性表达;白芷提取物组 Ang-2 表达较少。结果见图 8。

模型组小鼠创面 p-Akt、p-FOXO1 蛋白表达水平明显低于对照组和白芷提取物组 ($P < 0.05$);而模型组小鼠创面 FOXO1、Ang-2 蛋白表达水平均高于对照组和白芷提取物组 ($P < 0.05$)。提示白芷提取物促进 db/db 小鼠创面新生血管成熟的机制可能与影响 Akt/FOXO1/Ang-2 相关通路有关。结果见图 9。

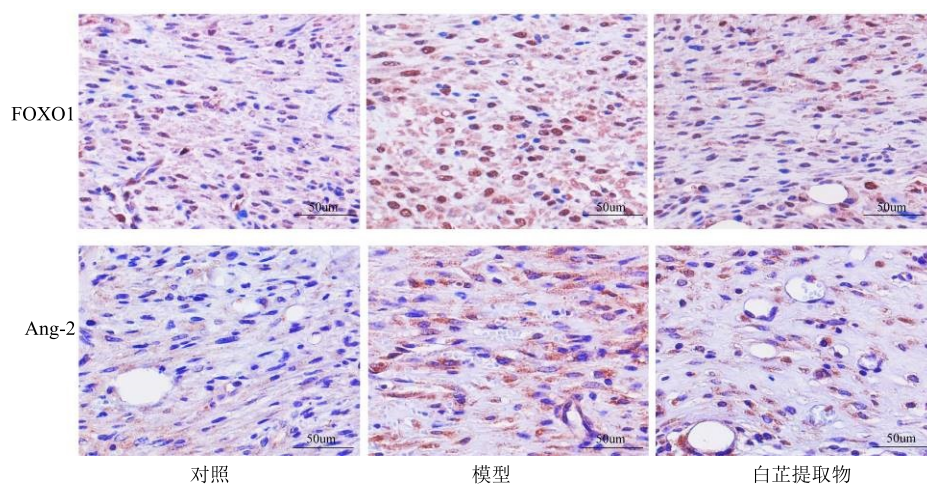
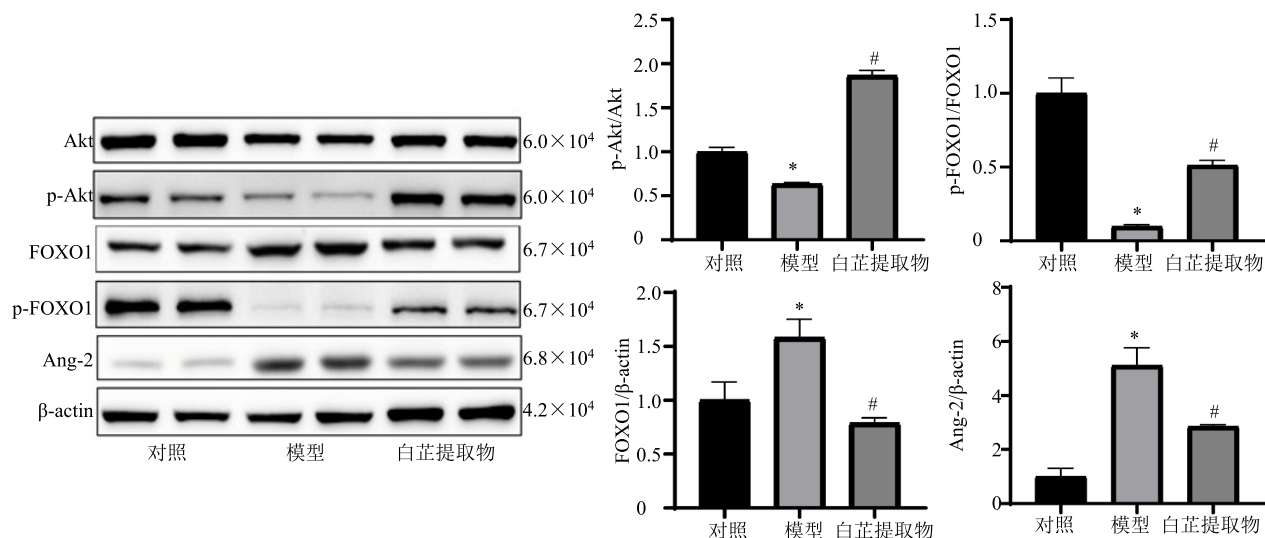


图 8 创伤后 11 d 各组小鼠创面组织 FOXO1 与 Ang-2 表达情况

Fig. 8 Expression of FOXO1 and Ang-2 in in wound tissue of mice in each group 11 d after trauma



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 9 创伤后 11 d 各组小鼠创面组织 p-Akt、p-FOXO1、FOXO1、Ang-2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

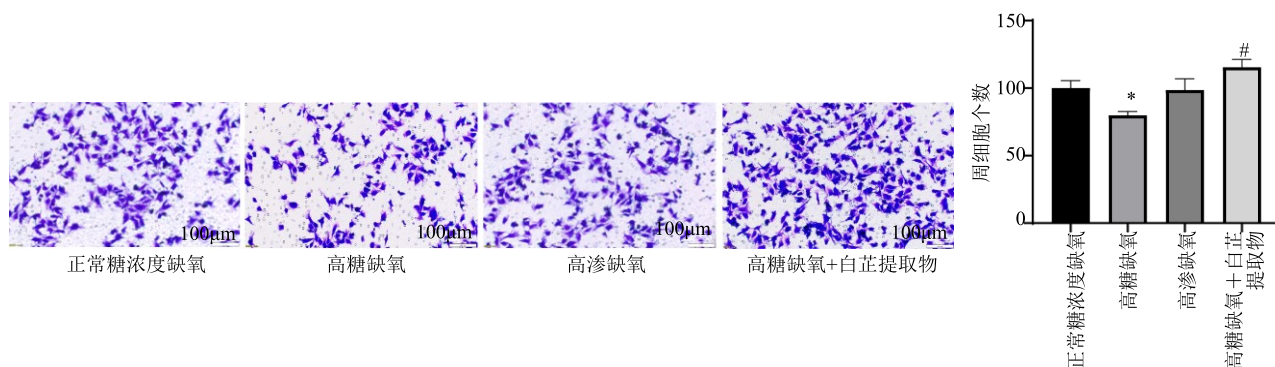
Fig. 9 Expression levels of p-Akt, p-FOXO1, FOXO1 and Ang-2 proteins in wound tissue of mice in each group 11 d after trauma ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 白芷提取物干预后的高糖缺氧下内皮细胞对周细胞的趋化作用

将各干预条件下的内皮细胞与周细胞通过 Transwell 小室共培养, 通过对 Transwell insert 外侧面周细胞计数评价不同条件下内皮细胞对周细胞的趋化作用。发现高糖缺氧明显抑制了内皮细胞对周细胞趋化作用 ($P < 0.05$); 而使用白芷提取物处理后能显著提高高糖缺氧下内皮细胞对周细胞的趋化作用 ($P < 0.05$)。结果见图 10。

3.8 白芷提取物干预后的高糖缺氧下内皮细胞与周细胞成管情况

内皮细胞与周细胞成管实验结果表明, 高糖缺氧下, 高糖缺氧组内皮细胞-周细胞管状结构中平均成管长度及平均节点数明显低于其他组 ($P < 0.05$), 管状结构中标记周细胞的绿色荧光也明显少于其他各组; 白芷提取物处理后的高糖缺氧内皮细胞-周细胞管状结构平均成管长度及平均节点数明显增加 ($P < 0.05$), 管状结构中标记周细胞的绿色荧光明显增加。结果见图 11。



与正常糖浓度缺氧组比较: * $P < 0.05$; 与高糖缺氧组比较: # $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs normal glucose and hypoxia group; # $P < 0.05$ vs high glucose and hypoxia group, same as below figures

图 10 白芷提取物干预后的高糖缺氧下内皮细胞对周细胞的趋化作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Chemotactic effect of high glucose and hypoxic endothelial cells on pericytes after AD intervention ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

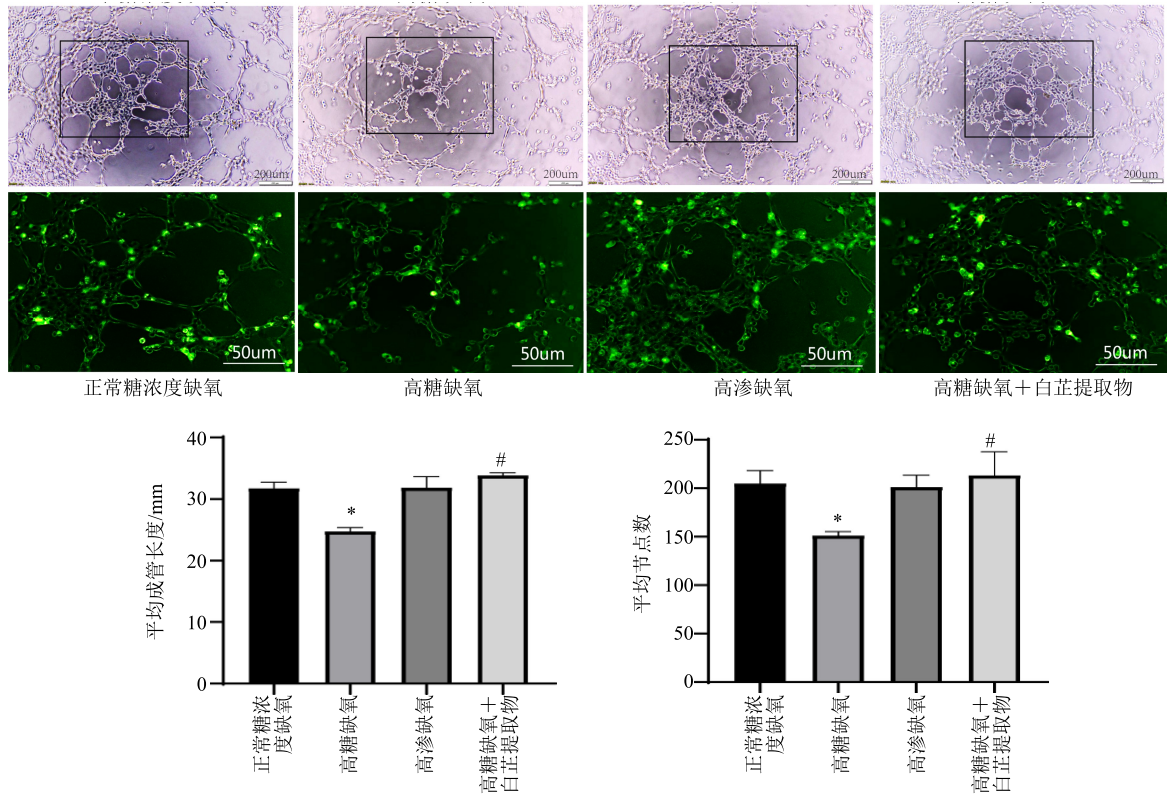


图 11 白芷提取物干预后的高糖缺氧内皮细胞与周细胞成管情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Angiogenesis of endothelial cells under high glucose and hypoxia and pericytes after AD intervention ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 白芷提取物干预后对高糖缺氧下内皮细胞中 FOXO1、Ang-2 等相关因子表达影响

高糖缺氧组细胞中 p-Akt、p-FOXO1 蛋白表达水平明显低于正常糖浓度缺氧组与高渗缺氧组 ($P < 0.05$), 高糖缺氧组细胞中 FOXO1、Ang-2 蛋白表达

水平均高于正常糖浓度缺氧组与高渗缺氧组 ($P < 0.05$); 而白芷提取物干预后能显著逆转此趋势, 提示白芷提取物促进高糖缺氧内皮细胞对周细胞趋化作用及成管可能与影响 Akt/FOXO1/Ang-2 相关通路有关。结果见图 12。

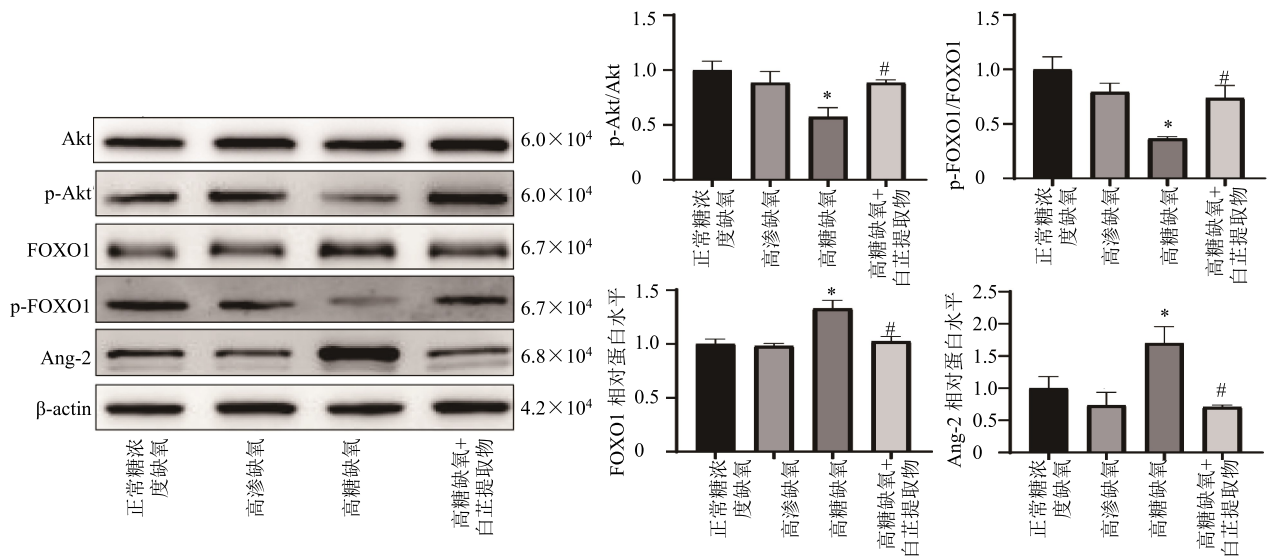


图 12 白芷提取物干预后的高糖缺氧内皮细胞中 p-Akt、p-FOXO1、FOXO1、Ang-2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Expression levels of p-Akt, p-FOXO1, FOXO1 and Ang-2 protein in high glucose and hypoxic endothelial cells after AD intervention ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

创面血管形成异常是糖尿病创面难愈的关键,创面血管形成依赖于血管内皮细胞和周细胞的相互作用^[19]。正常创面中,内皮细胞出芽、增殖、迁移成管并通过旁分泌和近分泌机制使周细胞不断向新生血管芽端趋化、包裹内皮细胞以形成稳定的血管^[20-21]。周细胞嵌在微血管的血管基底膜内,对新生血管起到支持作用,对新生血管的结构和功能十分重要^[22-23]。而在糖尿病溃疡面中,新生血管减少,新生血管中周细胞缺失,缺失周细胞的血管管壁间隙较大,不能形成正常功能性血管,创面及周围组织缺氧及营养物质,创面胶原沉淀稀少,愈合速率减慢,创面愈合预后不佳^[1,24-25]。因此,成功实现周细胞的募集是促进糖尿病创面新生血管形成及稳定,促进糖尿病创面愈合的关键。本研究结果发现,糖尿病 db/db 小鼠相较于同窝对照组,创面的新生血管量明显减少,并且新生血管周围周细胞缺失,创面愈合速率减慢,愈合质量较差。但经过白芷提取物治疗后不仅能促进创面新生血管形成,同时能促进内皮细胞对周细胞募集及成管,抑制促血管失稳因子如 Ang-2, FOXO1 对新生血管的作用,促进新生血管进入成熟阶段,从而加快创面愈合速率,提高创面愈合质量。

在新生血管成熟过程中,内皮细胞与周细胞之间会分泌很多生长因子,Ang-2 便是其中重要因子之一,Ang-2 主要由内皮细胞分泌,并储存在 Weibel palade 小体中,在各种刺激的作用下迅速释放,在毛细血管生长和重构中发挥关键作用^[26]。Ang-2 能破坏内皮细胞与周细胞的连接,从而破坏毛细血管样结构的形成和受损血管生成^[27]。此外,Ang-2 是 Ang-1/Tie-2 信号的天然拮抗体,Ang-1 与 Tie-2 受体结合后,能激活内皮细胞内多条通路,促进血管形成和成熟。而 Ang-2 竞争性地抑制 Ang-1 对 Tie-2 的作用,并通过抑制 Tie-2 信号促进血管失稳^[28]。早已有众多研究发现糖尿病小鼠与患者创面在血管成熟阶段会表达较高水平 Ang-2,影响创面血管成熟及愈合^[26,29]。而 Ang-2 的表达及释放主要受 FOXO1 的影响^[30-31]。FOXO1 存在于内皮细胞细胞核中,FOXO1 转录激活会刺激内皮细胞生成 Ang-2 及 Weibel palade 小体中贮存的 Ang-2 释放到细胞外,此外 FOXO1 还能调控其他参与血管不稳定的基因表达如装饰蛋白,光蛋白聚糖等^[32]。FOXO1 的磷酸化能下调 FOXO1 的表达,使 FOXO1 作用失

效,这一过程涉及到 Akt 对 FOXO1 的调节作用^[33]。在本研究结果中发现白芷提取物能有效降低 db/db 小鼠创面组织中 FOXO1 与 Ang-2 蛋白水平,上调 p-Akt 与 p-FOXO1 蛋白水平,且体外实验也有类似结果,提示白芷提取物对 db/db 小鼠创面新生血管成熟的促进作用及对体外高糖缺氧下内皮细胞与周细胞成管的积极作用,可能与上调 p-Akt 促进叉头蛋白 FOXO1 磷酸化,抑制 FOXO1 激活,降低 Ang-2 表达有关。

综上所述,研究表明,白芷提取物既能在体内通过促进创面新生血管形成与成熟提高 db/db 小鼠创面愈合速率和质量,又能在高糖缺氧下内皮细胞对周细胞的趋化作用并促进高糖缺氧下内皮细胞与周细胞管形结构形成,且其作用机制可能与下调 FOXO1/Ang-2 通路有关。

参考文献

- [1] Dulmovits B M, Herman I M. Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(11): 1800-1812.
- [2] Ferland-Mccollough D, Slater S, Richard J, et al. Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 171: 30-42.
- [3] Veith A P, Henderson K, Spencer A, et al. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 97-125.
- [4] Chu H, Gao J, Chen C W, et al. Injectable fibroblast growth factor-2 coacervate for persistent angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13444-13449.
- [5] Papanas N, Maltezos E. Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers [J]. *Drug Saf*, 2010, 33(6): 455-461.
- [6] Daly C. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1) [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(9): 1060-1071.
- [7] Hozzein W N, Badr G, Badr B M, et al. Bee venom improves diabetic wound healing by protecting functional macrophages from apoptosis and enhancing Nrf2, Ang-1 and Tie-2 signaling [J]. *Mol Immunol*, 2018, 103: 322-335.
- [8] Yang W T, Ke C Y, Wu W T, et al. Effects of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* extracts on excisional wound healing in rats [J]. *Evid-Based Complementary Altern Med*, 2017, 2017: 1583031.
- [9] Zhang X N, Ma Z J, Wang Y, et al. The four-herb Chinese medicine formula tuo-Li-Xiao-du-San accelerates cutaneous wound healing in streptozotocin-induced

- diabetic rats through reducing inflammation and increasing angiogenesis [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 1-11.
- [10] 李玉珠, 张晓娜, 王 颖, 等. 托里消毒散精简方对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的影响及其机制 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1560-1566.
- [11] 陈志刚. 益气活血生肌法联合三氧水疗治疗糖尿病足溃疡 60 例临床观察 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 28(7): 176-177.
- [12] Hao A H, Zhang Y B, Yang X W. Simultaneous determination and pharmacokinetics of sixteen Angelicae dahurica coumarins *in vivo* by LC-ESI-MS/MS following oral delivery in rats [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(10): 1029-1036.
- [13] 王正帅. 白芷化学成分及质量标准研究 [D]. 开封: 河南大学, 2008.
- [14] 刘晓昱, 赖 瑛. 白芷香豆素储库型贴剂的研制及其体外评价 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 313-317.
- [15] Wu X F, Yu Y J, Ying L M, *et al.* Hot compress with Chinese herbal salt packets reducing PICC catheter complications: A randomized controlled trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(11): 809-814.
- [16] Wang J Y, Wang H L, Zhang H L, *et al.* Immunomodulation of ADPs-1a and ADPs-3a on RAW264.7 cells through NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 1024-1030.
- [17] Hang X N, Ma Z J, Wang Y, *et al.* Angelica Dahurica ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177862.
- [18] 王君妍, 叶洁瑜, 梁恩瑜, 等. 血小板生成素通过 PI3K/AKT 通路防止 CoCl₂ 诱导内皮细胞凋亡 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(2): 528-534.
- [19] Okonkwo U, DiPietro L. Diabetes and wound angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1419.
- [20] Reinke J M, Sorg H. Wound repair and regeneration [J]. *Eur Surg Res*, 2012, 49(1): 35-43.
- [21] Sorg H, Tilkorn D J, Mirastschijski U, *et al.* Panta rhei: Neovascularization, angiogenesis and nutritive perfusion in wound healing [J]. *Eur Surg Res Eur Chir Forschung Recherches Chir Eur*, 2018, 59(3/4): 232-241.
- [22] Fiedler U, Augustin H G. Angiopoietins: A link between angiogenesis and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(12): 552-558.
- [23] Minoshima A, Kabara M, Matsuki M, *et al.* Pericyte-specific Ninjurin1 deletion attenuates vessel maturation and blood flow recovery in hind limb ischemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(10): 2358-2370.
- [24] Ma Z J, Li Z H, Shou K Q, *et al.* Negative pressure wound therapy: Regulating blood flow perfusion and microvessel maturation through microvascular pericytes [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(5): 1415-1425.
- [25] Zheng Z F, Wan Y, Liu Y S, *et al.* Sympathetic denervation accelerates wound contraction but inhibits reepithelialization and pericyte proliferation in diabetic mice [J]. *J Diabetes Res*, 2017, doi: 10.1155/2017/7614685
- [26] Scholz A, Plate K H, Reiss Y. Angiopoietin-2: A multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1347(1): 45-51.
- [27] Saharinen P, Leppänen V M, Alitalo K. SnapShot: angiopoietins and their functions [J]. *Cell*, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.10.009.
- [28] Teichert M, Milde L, Holm A, *et al.* Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms16106.
- [29] Qiao L, Lu S L, Dong J Y, *et al.* Abnormal regulation of neo-vascularisation in deep partial thickness scalds in rats with diabetes mellitus [J]. *Burns*, 2011, 37(6): 1015-1022.
- [30] Choi H J, Zhang H Y, Park H, *et al.* Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiopoietin-2 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6943.
- [31] Kim M, Allen B, Korhonen E A, *et al.* Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3511-3525.
- [32] Nelimarkka L, Salminen H, Kuopio T, *et al.* Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(2): 345-353.
- [33] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: Navigating downstream [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274.