

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.11.012

实验研究

银杏蜜环口服溶液对氧糖剥夺/复氧复糖模型小鼠脑微血管内皮细胞增殖及体外血管新生的影响

姚明江¹, 韩笑¹, 任建勋¹, 任钧国¹, 王益民², 赫少清², 刘建勋^{1✉}

1. 中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091; 2. 西安步长中医心脑血管医院

摘要 目的 探讨银杏蜜环口服溶液促进血管新生的能力及可能的作用机制。方法 银杏蜜环口服溶液取 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 mg/ml 浓度, CCK-8 法检测细胞活力, 筛选出银杏蜜环口服溶液有效且安全的剂量进行后续实验。实验分为正常组、模型组、尼莫地平组及银杏蜜环高、低剂量组。除正常组外, 其余各组采用缺氧缺糖 (4 h) /复氧复糖 (24 h) 法建立 bEnd.3 细胞体外氧糖剥夺/复氧复糖模型。造模前尼莫地平组给予尼莫地平 10 μ mol, 银杏蜜环高、低剂量组给予筛选浓度的银杏蜜环口服溶液。细胞划痕法评价内皮细胞迁移能力; 基质胶 Matrigel 微管形成实验检测内皮细胞的体外血管形成能力; Western blot 法检测细胞血管新生相关指标血管内皮生长因子 (VEGF)、CD31、血管生成素 (Ang)、缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、血管性假血友病因子 (vWF) 的蛋白表达。结果 筛选出银杏蜜环口服溶液 0.6、1.2 mg/ml 用于后续试验。与正常组相比, 模型组内皮细胞活力明显降低, 细胞迁移率下降, 形成微管的节点数、交叉点数、网眼数、总长度、分支长度及主干长度明显增加 ($P < 0.05$), VEGF、CD31、HIF-1 α 及 Ang 表达上调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 银杏蜜环高剂量组细胞活力和迁移率升高, VEGF、CD31、HIF-1 α 、Ang 及 vWF 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 银杏蜜环口服溶液可以促进血管内皮细胞的增殖, 提高内皮细胞迁移率, 其作用可能与上调多种血管生长因子的表达、促进血管新生相关。

关键词 脑梗死; 脑卒中; 银杏蜜环口服溶液; 氧糖剥夺/复氧复糖; 血管新生; 细胞迁移

脑卒中是我国第一位致死与致残性疾病, 常伴有严重的并发症^[1]。急性缺血性脑卒中, 又称脑梗死, 是最常见的卒中类型, 占全部卒中的 60% ~ 80%^[2]。研究^[3-4]证实, 促进损伤区的血管新生及脑血流能有效增加氧气与营养供应, 有利于改善脑缺血损伤和促进神经修复。银杏蜜环口服溶液为临床上市药, 其主要成分为银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 和天麻蜜环菌 (gastrodia tuder halimasch, GTH), 用于急性缺血性脑卒中、冠心病、高脂血症、血管性痴呆等心脑血管疾病的治疗, 疗效较好^[5-6]。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永生化小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3, 建立氧糖剥夺/复氧复糖 (OGD/R) 损伤模型, 观察银杏

蜜环口服溶液对 OGD/R 损伤脑微血管内皮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。

1 材料与方法

1.1 细胞

永生化小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3, 购于北京北纳创联生物技术研究院, 来源于美国模式培养物集存库 (ATCC)。

1.2 药物

银杏蜜环口服溶液, 10 ml/支 (每支约含 30 mg 银杏叶提取物和 1000 mg 蜜环菌提取物), 邳崧天银制药有限公司, 批号: 190721。尼莫地平注射液 (尼立苏, 批号 0901001), 2 mg : 10 ml/支, 山东新华制药股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

DMEM 培养基 (高糖, 批号 8119352)、DMEM 培养基 (无糖, 批号 1951286); 青链霉素

基金项目: 国家自然科学基金 (81873040)

✉ 通讯作者: liujx0324@sina.com, (010) 62835601

(双抗)混合液(100×,批号1894156),GIBCO公司;胎牛血清(FBS,批号FBS00219-1),德国Nobimpex公司;细胞增殖/毒性检测试剂盒(CCK-8,批号NW595),日本同仁化学研究所;Matrigel基质胶(批号:9112015),美国康宁公司;考马斯亮蓝(Bradford)蛋白定量试剂盒(批号:L010206B),Bio-Rad公司;CD31兔多克隆抗体(批号ab124432),Abcam公司;血管性假血友病因子(vWF)兔多克隆抗体(批号11778-1-AP)、血管生成素(Ang)兔多克隆抗体(批号18302-1-AP)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)兔多克隆抗体(批号20960-1-AP),Proteintech公司;血管内皮生长因子(VEGF)兔多克隆抗体(批号A3098),Abclonal公司; β -actin兔多克隆抗体(批号bs-0061R),北京博奥森生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(批号127760),YUABIO公司。

BHC-1300 II A/B3型生物安全柜(苏净集团安泰公司);371型CO₂培养箱(Thermo公司);SYNERGYTM 4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);ICE-CL31R型低温离心机(美国Thermo公司);BSA224S-CW型电子天平(Sartorius公司);DW-86L628型超低温冰箱(海尔公司);IX51型倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司);Power Pac Universal型电泳仪、Chem DocTM XRS+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.4 细胞培养

bEnd.3细胞生长于含10% FBS,青霉素、青链霉素各100 U/ml的高糖DMEM培养基(完全培养基)中,于37℃、5% CO₂、饱和湿度恒温培养箱中静置培养,待细胞达到80%融合时,胰蛋白酶-EDTA消化液消化传代,完全培养基重悬,调节细胞浓度至 0.75×10^5 个/ml,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。

1.5 细胞 OGD/R 损伤模型的建立

参照文献[7]建立内皮细胞 OGD/R 损伤模型,细胞以 0.75×10^5 个/ml的浓度接种于96孔板(100 μ l)、24孔板(500 μ l)、6孔板(2 ml),贴壁24 h后,细胞以预热至37℃的PBS溶液洗涤2次,更换成无糖DMEM培养基,将细胞置于改良密闭缺氧罐内,通以95% N₂-5% CO₂混合气体,通气15 min后,将缺氧罐置于37℃培养箱内继续培养。经4 h氧糖剥夺后,将细胞从缺氧罐中取出,并按体积比1:10添加4.95 g/L葡萄糖溶液,

置于37℃培养箱内继续常规培养24 h,实现复氧复糖再灌注。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 细胞活力检测 进行正常细胞实验时,实验分为正常组及银杏蜜环0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mg/ml组。细胞以 0.75×10^5 个/ml的浓度接种于96孔板,每孔100 μ l,待细胞充分贴壁后(24 h),正常组用正常培养基培养。银杏蜜环各剂量组分别加入终浓度为0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mg/ml银杏蜜环口服溶液。终浓度为0.6 mg/ml含药培养基内含17.48 μ g/ml银杏叶提取物和0.583 mg/ml蜜环菌提取物。每组设6个复孔,实验重复3次。采用CCK-8法检测细胞活力,将正常组细胞活力设定为100%,其余各组细胞活力表示为与正常组相比的百分率值。

进行 OGD/R 损伤实验时,实验分为正常组、模型组、尼莫地平组及银杏蜜环0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mg/ml组。细胞以 0.75×10^5 个/ml的浓度接种于96孔板,每孔100 μ l,待细胞充分贴壁后(24 h),正常组用新鲜的正常高糖培养基培养。其余各组制备 OGD/R 损伤模型,造模前尼莫地平组加入终浓度为10 μ mol的尼莫地平注射液,银杏蜜环各剂量组分别加入终浓度为0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mg/ml银杏蜜环口服溶液,培养箱常规培养。24 h后取出,加入CCK-8溶液10 μ l/孔,继续培养4 h后,酶标仪测定450 nm处的吸光度OD值,OD值大小与活细胞的数量成正比。实验经过3次重复,每组设6个复孔。细胞增殖率(%)=(给药组OD值-对照组OD值)/对照组OD值 $\times$ 100%。筛选出银杏蜜环口服溶液有效且安全的剂量进行后续实验。

1.6.2 内皮细胞迁移能力检测 实验分为正常组、模型组、尼莫地平组及银杏蜜环高、低剂量组。bEnd.3细胞以 0.75×10^5 个/ml密度接种于12孔板内,每孔1 ml,放入培养箱培养,待形成完全融合的单层细胞层后,用200 μ l无菌枪头比着直尺,在孔中画“十”字型划痕,即水平画一条横线,然后再垂直画一条竖线。无菌PBS润洗细胞2次,去除划下的脱落细胞碎片,确保划线后留下的间隙清晰可见。此时,正常组更换正常高糖DMEM培养基,尼莫地平组及银杏蜜环低、高剂量组分别更换成含尼莫地平10 μ mol及银杏蜜环口服溶液筛选浓度的无糖DMEM培养基。尼莫地平组、银杏蜜环低、高剂量组及模型组制备 OGD/R 损伤模型。于划痕后即刻造模,采用显微镜观察横竖划痕交叉

点四周的固定检测点,拍照,Image J 1.52a 软件测量划痕面积,计算细胞迁移率(%)。细胞迁移率(%)=(原划痕面积-残留面积)/原划痕面积×100%。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.6.3 内皮细胞体外微管形成能力检测 实验分为正常组、模型组、尼莫地平组及银杏蜜环高、低剂量组。将 Matrigel 基质胶、24 孔板、移液吸头提前置于 4℃ 冰箱过夜。向预冷的 24 孔板中加入 Matrigel 基质胶 (250 μl/孔),室温放置 5 min,随后再放入培养箱中 30 min 固化成胶。bEnd.3 细胞以 0.75×10^5 个/ml 密度接种于 6 孔板内,每孔 2 ml,待细胞充分贴壁后 (24 h),弃旧培养基,正常组加入新鲜的正常高糖培养基,尼莫地平组及银杏蜜环低、高剂量组分别更换成含尼莫地平 10 μmol、银杏蜜环口服溶液筛选浓度的无糖 DMEM 培养基,2 ml/孔,制备 OGD/R 损伤模型。复氧复糖 24 h 后,采用 Trypsin-EDTA 消化各孔细胞,并将密度调整一致 (1.0×10^5 个/ml),随后按 1 ml/孔接种于 Matrigel 基质胶包被好的 24 孔板中,放回培养箱继续培养 3 h。倒置显微镜下观察细胞成管情况,每孔随机选取 5 个视野拍照。Image J 1.52a 图像分析软件分析,以节点数、交叉点数、网眼数、血管分支数、总长度、分支长度、主干长度、总管长等指标表示各组细胞的成管能力。将正常组设定为 1 (100%),其余各组数据为与正常组相比的倍率值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。每孔拍摄 5 个不同视野。

1.6.4 Western blot 法检测血管新生相关蛋白 VEGF、CD31、HIF-1α、Ang 及 vWF 表达 实验分为正常组、模型组、尼莫地平组及银杏蜜环高、低剂量组。bEnd.3 细胞以 0.75×10^5 个/ml 密度接种于 6 孔板内,每孔 2 ml,待细胞充分贴壁后 (24 h),弃旧培养基,正常组加入新鲜的正常高糖培养基,尼莫地平组及银杏蜜环低、高剂量组分别更换成含尼莫地平 10 μmol,银杏蜜环口服溶液筛选浓度的无糖 DMEM 培养基,2 ml/孔,随后进行 OGD/R 处理,另设正常对照组。复氧复糖 24 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞刮下,经蛋白裂解液处理后,4℃、12 000 r/min,离心半径 84 mm,离心 15 min,取上清,采用考马斯亮蓝法进行蛋白含量测定,调整蛋白浓度至同一水平,与等体积上样缓冲液 (×5) 混合,95℃ 加热 5 min 后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),湿转法进行转膜,5% 脱脂牛奶封闭,加入相应一抗,于 4℃ 冰箱孵

育过夜,次日加入相应二抗,室温孵育 60 min,增强化学发光法显色,以 β-actin 作为内参,对比分析各标本蛋白表达水平。采用 Image J 1.52a 图像分析软件对各条带灰度值进行分析。每组检测 3 例样品,实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用 Tukey 法,方差不齐者两两比较采用 Dunnett's T^3 法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度银杏蜜环干预正常 bEnd.3 细胞活力比较

表 1 示,与正常组比较,银杏蜜环 0.6、1.2、2.4 mg/ml 组细胞活力升高,银杏蜜环 9.6 mg/ml 组细胞活力降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。因此,0.6、1.2、2.4、4.8 mg/ml 浓度是安全的。

表 1 各组 bEnd.3 细胞活力比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	正常细胞活力
正常组	6	100.00 ± 2.49
银杏蜜环 0.6 mg/ml 组	6	104.30 ± 2.40 ^{b)}
银杏蜜环 1.2 mg/ml 组	6	105.00 ± 2.73 ^{b)}
银杏蜜环 2.4 mg/ml 组	6	103.50 ± 1.98 ^{a)}
银杏蜜环 4.8 mg/ml 组	6	102.50 ± 3.61
银杏蜜环 9.6 mg/ml 组	6	90.78 ± 5.21 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 不同浓度银杏蜜环干预 OGD/R 损伤 bEnd.3 细胞活力比较

表 2 示,与正常组比较,模型组细胞活力明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,除银杏蜜环 9.6 mg/ml 组外,其余各组细胞活力均明显升高

表 2 正常组、模型组及银杏蜜环各剂量组 OGD/R 损伤 bEnd.3 细胞活力比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞活力
正常组	6	100.00 ± 3.17
模型组	6	52.05 ± 5.45 ^{a)}
尼莫地平组	6	57.43 ± 1.44 ^{b)}
银杏蜜环 0.6 mg/ml 组	6	60.97 ± 1.67 ^{b)}
银杏蜜环 1.2 mg/ml 组	6	63.57 ± 2.63 ^{b)}
银杏蜜环 2.4 mg/ml 组	6	60.63 ± 3.78 ^{b)}
银杏蜜环 4.8 mg/ml 组	6	59.74 ± 1.87 ^{b)}
银杏蜜环 9.6 mg/ml 组	6	44.37 ± 4.06 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与尼莫地平组比较, $P < 0.05$; d) 与尼莫地平组比较, $P < 0.01$ 。

($P < 0.01$)，其中银杏蜜环口服溶液 0.6、1.2 mg/ml 浓度效果较好且剂量较低，并成剂量依赖性。与尼莫地平组比较，银杏蜜环口服溶液 1.2 mg/ml 组细胞活力显著升高 ($P < 0.05$)。

依据上述 2 项实验结果，银杏蜜环口服溶液 0.6、1.2 及 2.4 mg/ml 剂量组细胞活力均分别高于正常组与模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；对细胞活力数据进一步分析，0.6、1.2 mg/ml 两个浓度有一定的剂量依赖性，且 2.4、4.8 mg/ml 剂量组较 1.2 mg/ml 浓度组细胞活力呈现下降趋势。因此选定银杏蜜环口服溶液 0.6、1.2 mg/ml 浓度（即低剂量组、高剂量组）进行后续试验。

2.3 各组 bEnd.3 细胞迁移率比较

表 3 示，与正常组比较，模型组细胞迁移率明显下降 ($P < 0.05$)；与模型组比较，尼莫地平组及银杏蜜环高剂量组细胞迁移率明显升高 ($P < 0.05$)。

表 3 各组 bEnd.3 细胞迁移率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞迁移率
正常组	3	69.25 ± 5.25
模型组	3	48.07 ± 6.50 ^{a)}
尼莫地平组	3	70.02 ± 8.77 ^{b)}
银杏蜜环低剂量组	3	62.31 ± 5.63
银杏蜜环高剂量组	3	71.90 ± 4.73 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。

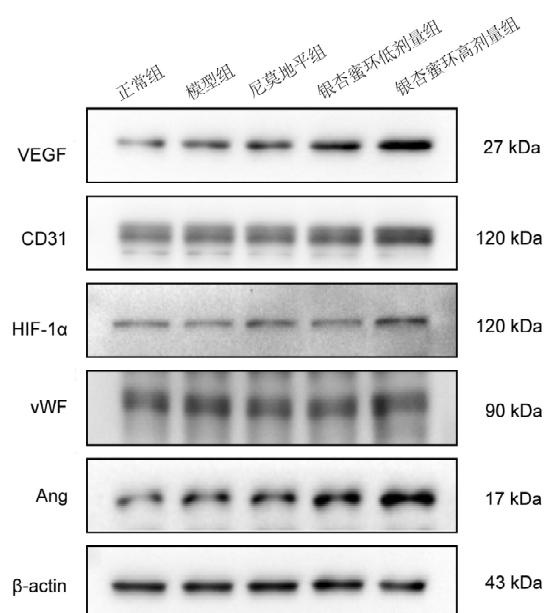
2.4 各组 bEnd.3 细胞微管形成指标比较

表 4 示，与正常组比较，模型组细胞形成微管的节点数、交叉点数、网眼数、总长度、分支长度及主干长度均明显增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，尼莫地平组节点数、交叉点数明显增加 ($P < 0.05$)，银杏蜜环高、低剂量组对微管形成各指标

有一定增加趋势，但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组 bEnd.3 细胞血管新生相关蛋白表达比较

图 1、表 5 示，与正常组比较，模型组 VEGF、CD31、HIF-1 α 及 Ang 表达呈上升趋势，vWF 呈下降趋势，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组、尼莫地平组、银杏蜜环低剂量组比较，银杏蜜环高剂量组可显著上调 VEGF、CD31、HIF-1 α 、Ang 及 vWF 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；而模型组、尼莫地平组、银杏蜜环低剂量组各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注：VEGF，血管内皮生长因子；HIF-1 α ，缺氧诱导因子 1 α ；vWF，血管性假血友病因子；Ang，血管生成素。

图 1 各组 bEnd.3 细胞血管新生相关蛋白电泳图

表 4 各组 bEnd.3 细胞微管形成指标比较

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	节点数	交叉点数	网眼数	血管分支数
正常组	3	100.0 ± 5.4	100.0 ± 5.3	100.0 ± 12.1	100.0 ± 3.9
模型组	3	149.8 ± 12.7 ^{a)}	147.3 ± 12.2 ^{a)}	228.4 ± 33.7 ^{a)}	98.51 ± 4.2
尼莫地平组	3	196.4 ± 12.9 ^{b)}	190.8 ± 12.59 ^{b)}	322.7 ± 41.6	106.4 ± 7.1
银杏蜜环低剂量组	3	183.6 ± 14.3	171.3 ± 14.8	267.1 ± 40.9	111.8 ± 5.1
银杏蜜环高剂量组	3	184.3 ± 15.4	183.2 ± 15.06	304.3 ± 43.8	101.8 ± 5.3

组别	样本数	总长度	分支长度	主干长度	总管长
正常组	3	100.0 ± 2.4	100.0 ± 4.2	100.0 ± 6.5	100.0 ± 4.1
模型组	3	119.3 ± 4.6 ^{a)}	124.8 ± 6.6 ^{a)}	154.4 ± 14.5 ^{a)}	94.74 ± 4.2
尼莫地平组	3	134.0 ± 4.2	145.1 ± 6.3	193.9 ± 15.0	95.77 ± 5.9
银杏蜜环低剂量组	3	130.0 ± 5.8	143.1 ± 8.3	182.7 ± 18.1	103.0 ± 4.6
银杏蜜环高剂量组	3	129.3 ± 5.8	139.5 ± 8.9	182.0 ± 17.8	96.1 ± 3.9

注：a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。

表 5 各组 bEnd. 3 细胞 VEGF、CD31、HIF-1 α 蛋白表达比较

($1/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	VEGF	CD31	HIF-1 α	vWF	Ang
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.04
模型组	3	1.35 $\pm$ 0.07	1.26 $\pm$ 0.13	1.55 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.14	1.14 $\pm$ 0.05
尼莫地平组	3	1.12 $\pm$ 0.08	2.53 $\pm$ 1.24	1.13 $\pm$ 0.15	1.12 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.07
银杏蜜环低剂量组	3	1.57 $\pm$ 0.14	3.74 $\pm$ 0.42	2.14 $\pm$ 0.37	1.15 $\pm$ 0.10	1.05 $\pm$ 0.11
银杏蜜环高剂量组	3	2.59 $\pm$ 0.16 ^{a) b) d)}	6.89 $\pm$ 0.37 ^{a) b) c)}	5.41 $\pm$ 0.54 ^{a) b) d)}	2.13 $\pm$ 0.33 ^{a) b) c)}	1.66 $\pm$ 0.08 ^{a) b) d)}

注: VEGF, 血管内皮生长因子; HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; vWF, 血管性假血友病因子; Ang, 血管生成素。

a) 与模型组比较, $P < 0.01$; b) 与尼莫地平组比较, $P < 0.01$; c) 与银杏蜜环低剂量组比较, $P < 0.05$; d) 与银杏蜜环低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

急性缺血性脑卒中归属于中医学“中风病”范畴, 本病总属本虚标实。中风病患者多年老体衰, 肾精不足, 气血运行无力为根本, 进而导致血行涩滞而为瘀, 湿气久留不去而化为痰浊, 痰瘀伤肝血则出现肝风内动, 因此, 中风病治疗上当以化痰、祛瘀、熄风为重点^[8]。依据以上理论研制而成的银杏蜜环口服溶液, 在治疗风痰瘀血型缺血性脑卒中方面具有肯定的疗效^[5,9]。银杏蜜环口服溶液是由银杏叶提取物、天麻蜜环菌组成的复方制剂, 其中银杏叶具有活血化瘀、通络化浊止痛之功, 尤其适用于瘀血阻络之证。现代药理研究^[10]表明, 银杏叶制剂有一定的促进血管新生作用。蜜环菌可通过抗炎、抑制血小板活化及抑制细胞凋亡等发挥抗血栓效应^[11], 而血管新生与血栓形成之间的相关性较为明确^[12]。天麻蜜环菌因与天麻是共生关系, 因而具有与天麻相似的药理作用和临床疗效^[13], 具有定惊、熄风的功效, 对眩晕头痛、惊风癫痫、肢体麻木等有较好的治疗作用。

前期临床研究^[14]发现, 在缺血性脑卒中常规治疗基础上加用银杏蜜环口服溶液, 可有效改善患者的神经功能缺损症状, 并降低血清淀粉样蛋白 A (SAA)、白细胞介素 6 (IL-6) 等免疫因子水平; 相关实验研究^[15]也表明, 银杏蜜环口服溶液具有减小缺血再灌注大鼠模型脑梗死范围、减轻神经功能损伤的作用。

缺血性脑卒中后的血管新生过程中有多种活性因子与蛋白的参与。HIF-1 α 是维持氧自稳平衡的核心调控因子, 通过调控缺氧相关基因的表达, 从而在感受氧、传递缺氧信号的过程中发挥重要作用^[16], 在缺氧条件下 HIF-1 α 可促进血管的新生^[17], 且 HIF-1 α 被缺氧信号激活后, 与 VEGF5' 端增强子相互作用, 从而促进 VEGF 的表达^[8,18]。VEGF 是迄今为止发现最强的、最为特异性的促血

管形成和分化的重要调节因子, 与受体作用后能够有效刺激血管内皮前体细胞的成熟和分化, 并促进血管内皮细胞的黏附和迁移^[19-20]。CD31 是内皮前体细胞的特异性标志物, 在血管内皮细胞、血小板、白细胞内均有稳定表达, 其与血管生成过程密切相关, 能反映心脑血管疾病损伤的修复程度, 同时也能被用于判定血管新生的程度^[21]。vWF 存在于血浆、内皮细胞的表面, 与血栓性疾病密切相关, 同时因其能诱导血小板的黏附与聚集, 对于维持血管壁的完整性、促进血管损伤的修复十分重要。近年研究发现, vWF 与血管新生密切相关^[22], 其常作为血管内皮细胞标记物用来检测血管新生^[23]。Ang 属于特异性血管新生作用因子, 能够抵抗血管渗漏, 在缺血再灌注早期其表达升高具有促进血管新生作用, 并对 VEGF 促血管新生的功能有促进和互补作用, 能稳定内皮细胞功能^[24-25]。

本研究结果显示, 体外模拟缺血缺氧 (OGD/R), 模型组细胞活力较正常组明显降低 ($P < 0.01$), 提示出现明显的细胞损伤, 说明该模型建立成功。此外, 模型组细胞迁移能力以及形成微管的节点数、交叉点数、网眼数、总长度、分支长度及主干长度均明显增加, 提示缺氧复氧损伤对内皮细胞迁移能力与管腔形成有刺激与促进作用, 体现出一定的代偿性血管新生能力。银杏蜜环口服溶液可提高小鼠脑微血管内皮细胞 OGD/R 模型细胞活力, 显示出促进细胞增殖作用, 同时银杏蜜环口服溶液高剂量组还能显著提高细胞迁移率, 显著上调 VEGF、HIF-1 α 、Ang、CD31、vWF 等多种血管生长因子蛋白表达。与银杏蜜环低剂量组、尼莫地平组相比, 银杏蜜环高剂量组 VEGF、HIF-1 α 、Ang、CD31、vWF 表达均显著上调, 提示银杏蜜环口服溶液能剂量依赖性地促进血管生长因子表达, 发挥其促进缺血性脑卒中后血管新生的作用, 其作用优于尼莫地平。

综上, 本研究在细胞水平上模拟内皮细胞缺血

环境,探讨银杏蜜环口服溶液促进血管新生的相关机制,发现可诱导血管新生与促进多种血管生成相关因子的表达。但本研究仅为体外细胞实验,且仅针对血管新生机制进行探讨,有一定的局限性。在后续研究中,课题组将通过动物实验进一步阐明银杏蜜环口服溶液对血管新生的作用及其机制,同时针对缺血性脑损伤后的其他机制开展相关研究,为该药临床治疗脑梗死提供依据。

参考文献

- [1] GAO Y, JIANG B, SUN H, et al. The burden of stroke in China: results from a nationwide population-based epidemiological survey [J]. PLoS One, 2018, 13 (12): e0208398.
- [2] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组,急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2019 [J]. 中华神经科杂志, 2019, 43 (2): 146 - 152.
- [3] NAVARRO-SOBRINO M, ROSELL A, HERNÁNDEZ-GUILLAMON M, et al. A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke [J]. Atherosclerosis, 2011, 216 (1): 205 - 211.
- [4] SHI FP, WANG XH, ZHANG HX, et al. MiR-103 regulates the angiogenesis of ischemic stroke rats by targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21 (3): 318 - 324.
- [5] 徐立,宋文婷,姚明江,等. 银杏蜜环口服溶液对多发性脑梗死大鼠模型的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13 (1): 25 - 30.
- [6] 任建勋,郭浩,李磊,等. 银杏蜜环口服溶液改善犬急性心肌缺血的研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13 (1): 21 - 24, 30.
- [7] 韩笑,徐立,刘建勋,等. 银杏蜜环口服溶液作用 p38 MAPK 调节 eNOS/NO 信号途径保护人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (23): 79 - 84.
- [8] 张久亮,柳翼,史载祥,等. 缺血性脑卒中的中医病因病机再认识 [J]. 中医杂志, 2008, 49 (6): 569 - 570.
- [9] 程伟宁,谭登云,黄荣,等. 银杏蜜环口服溶液治疗急性缺血性脑卒中及对血流变和神经功能影响观察 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11 (6): 713 - 715.
- [10] 梁燕玲,高敏,刘子凡,等. 银杏叶提取物对大鼠局灶性脑缺血后血管新生的影响 [J]. 中国医药科学, 2013, 3 (20): 13 - 15.
- [11] 沈寿东,沈明花. 蜜环菌多糖对动脉血栓大鼠炎症反应和细胞凋亡的影响 [J]. 延边大学医学学报, 2018, 41 (1): 4 - 7.
- [12] 石建霞,顾健. 炎症网络调节与血管新生对血栓形成的影响 [J]. 血栓与止血学, 2005, 11 (5): 225 - 227.
- [13] 袁媛,刘景圣,蔡丹. 蜜环菌化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 农产品加工(学刊), 2008 (5): 46 - 49.
- [14] 何敏,刘志强,蒋玲霞,等. 基于 NIHSS、NDS 评分的银杏蜜环口服溶液治疗进展性缺血性脑卒中的疗效评估 [J]. 实用中西医结合临床, 2019, 19 (6): 1 - 3, 6.
- [15] 宋文婷,刘建勋,姚明江,等. 银杏蜜环口服溶液减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死的实验研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13 (1): 36 - 40.
- [16] MIKAMI H, SAITO Y, OKAMOTO N, et al. Requirement of Hsp105 in CoCl₂-induced HIF-1 α accumulation and transcriptional activation [J]. Exp Cell Res, 2017, 352 (2): 225 - 233.
- [17] 李玉珍,蔡莉蓉,孙胜,等. 低氧诱导因子-1 α 参与低氧预处理诱导的心肌血管生成 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (12): 2301 - 2304.
- [18] 江从庆,樊利芳,刁路明,等. 低氧及一氧化氮对 SW480 细胞缺氧诱导因子-1 α 、VEGF 及 iNOS 表达的初步研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (4): 722 - 726.
- [19] YANG JP, LIU HJ, LIU XF. VEGF promotes angiogenesis and functional recovery in stroke rats [J]. J Invest Surg, 2010, 23 (3): 149 - 155.
- [20] CHUNG HJ, KIM JT, KIM HJ, et al. Epicardial delivery of VEGF and cardiac stem cells guided by 3-dimensional PLLA mat enhancing cardiac regeneration and angiogenesis in acute myocardial infarction [J]. J Control Release, 2015, 205: 218 - 230. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.013.
- [21] 陈春媛,李青,汪泱. 内皮祖细胞源性胞外囊泡的研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29 (9): 1150 - 1154.
- [22] MOJIRI A, ALAVI P, JAHROUDI N. Von Willebrand factor contribution to pathophysiology outside of von Willebrand disease [J]. Microcirculation, 2018: e12510. doi: 10.1111/micc.12510.
- [23] 魏仁平,孙芳玲,刘婷婷,等. 莫诺苷对脑缺血再灌注大鼠皮层肝细胞生长因子及血管性血友病因子表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26 (3): 24 - 28.
- [24] ZHOU Z, REN X, ZHOU W, et al. Willed movement training reduces middle cerebral artery occlusion induced motor deficits and improves angiogenesis and survival of cerebral endothelial cells via upregulating hypoxia inducible factor-1 α [J]. Mol Med Rep, 2019, 20 (4): 3910 - 3916.
- [25] MA J, LUO Y. Effects of electroacupuncture on expressions of angiogenesis factors and anti-angiogenesis factors in brain of experimental cerebral ischemic rats after reperfusion [J]. J Tradit Chin Med, 2008, 28 (3): 217 - 222.

Effect of *Yinxing Mihuan Oral Liquid* (银杏蜜环口服溶液) on Proliferation of Cerebral Microvascular Endothelial Cells and Angiogenesis in Vitro in Mice Model of Oxygen and Glucose Deprivation/Reintroduction

YAO Mingjiang¹, HAN Xiao¹, REN Jianxun¹, REN Junguo¹, WANG Yimin², HE Shaoqing², LIU Jianxun¹

1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091; 2. Xi'an Buchang Traditional Chinese Cardio-Cerebrovascular Disease Hospital

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect and possible mechanism of *Yinxing Mihuan Oral Liquid* (YMOL, 银杏蜜环口服溶液) in promoting angiogenesis. **Methods** YMOL at a concentration of 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 and 9.6 mg/ml was selected, and CCK-8 method was used to detect the cell viability and to screen out the effective and safe concentration of YMOL for the following experiment, in which the mice were classified into normal group, model group, nimodipine group, and YMOL high and low dose groups. Oxygen and glucose deprivation (OGD) (4 h) /re-introduction (R) (24 h) method was used to establish bEnd.3 in vitro model of OGD/R in all groups except for the normal group. Before modelling, 10 μ mol nimodipine was given to nimodipine group while YMOL at selected concentration was administered in high and low dose YMOL groups, respectively. The cell scratch method was used to evaluate the migration ability of endothelial cells; the Matrigel microtube formation assay was used to detect the in vitro angiogenesis ability of endothelial cells; expression of angiogenesis-related proteins including vascular endothelial growth factor (VEGF), CD31, angiogenin (Ang), hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), and von Willebrand factor (vWF) were detected by western blotting. **Results** The concentration of YMOL at 0.6 mg/ml and 1.2 mg/ml were selected to be used in YMOL low and high dose group, respectively. Compared to the normal group, the model group had significantly decreased cell viability and cell migration, as well as increased number of nodes, intersections, meshes, total length, branch length and trunk length that form microtubules ($P < 0.05$); there was also an up-regulation of VEGF, CD31, HIF-1 α and Ang expression in the model group, but it was not statistically different with the normal group ($P > 0.05$). Compared to the model group, YMOL high dose group could improve the cell viability and the cell mobility, and remarkably up-regulate the expression of VEGF, CD31, HIF-1 α , Ang and vWF ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** YMOL could promote cell proliferation of endothelial cells and increase the cell mobility in the OGD/R induced injury model by up-regulating the expression of angiogenic factors and promoting angiogenesis. **Keywords** cerebral infarction; stroke; *Yinxing Mihuan Oral Liquid* (银杏蜜环口服溶液); oxygen and glucose deprivation/reintroduction; angiogenesis; cell migration

(收稿日期: 2020-09-21; 修回日期: 2021-02-19)

编辑: 王利芬

《中医杂志》(英文版) 欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志》(英文版)] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊)

由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志》(英文版) 自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中唯一的中国传统医学综合性学术期刊。

《中医杂志》(英文版) 主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究、思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltem.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。