

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.004

黄芪红花配伍对大鼠脑缺血后血管新生及 Cav-1/VEGF 信号通路的影响 *

曹金一¹ 雷 露² 段佳林¹ 胡咏武¹ 乔 逸¹ 文爱东¹ 杨志福^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032; 2 中国药科大学基础医学与临床药学院 江苏 南京 211198)

摘要 目的: 黄芪红花配伍是否通过调节小凹蛋白 1 (Caveolin-1, Cav-1)/ 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 通路促进血管新生保护大鼠脑缺血损伤。**方法:** 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 个组: 对照组 (Sham 组, n=12), 模型组 (MACO 组, n=12), 黄芪红花 40:1 组 (n=12), 20:1 组 (n=12), 5:1 (n=12)。大鼠脑缺血再灌注损伤模型采用尼龙线栓法制作, 连续给药 21d 后, 评价神经功能学评分, 计算脑梗死体积, 采用免疫组化法测定皮质区的微血管密度, 采用 RT-PCR 法检测皮质区 VEGF mRNA 和 Cav-1 mRNA 表达, 采用 Western-blotting 法测定皮质区 VEGF 和 Cav-1 的蛋白表达。**结果:** 连续给药 21d 后, 各组大鼠的神经功能学评分均有所降低, 3 个不同比例的黄芪红花组的神经功能学评分降低最为明显 ($P<0.01$), 脑梗死体积较模型组显著减少 ($P<0.05\sim P<0.01$), 微血管密度、VEGF 和 Cav-1 mRNA 和蛋白表达水平均较模型组明显升高 ($P<0.05\sim P<0.01$)。**结论:** 黄芪红花配伍可能通过调节 Cav-1/VEGF 信号通路促进脑缺血再灌注损伤大鼠脑内的血管新生, 从而减轻脑缺血损伤, 且最佳的配伍比例为黄芪红花 5:1。

关键词: 黄芪; 红花; 脑缺血再灌注; 血管新生; 小凹蛋白 1; 血管内皮生长因子

中图分类号: R-33; R743; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)06-1016-04

Effect of Huangqi-honghua Combination on the Angiogenesis and Cav-1/VEGF Signal Pathway in Brain Tissue of Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury*

CAO Jin-yi¹, LEI Lu², DUAN Jia-lin¹, HU Yong-wu¹, QIAO Yi, WEN Ai-dong¹, YANG Zhi-fu^{1Δ}

(1 Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 211198, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether Huangqi-Honghua combination protect brain from cerebral ischemia reperfusion injury through promoting angiogenesis by inducing the Cav-1/VEGF (Caveolin-1/vascular endothelial growth factor) signal pathway. **Methods:** Sixty rats were randomly divided into five groups: control group, model group and Huangqi-Honghua 40:1, 20:1, 5:1 groups (12 rats per group). The rat cerebral ischemia reperfusion injury models were induced by nylon monofilament. After 21 days of administration, the neurological scores were evaluated, the infarct volumes were calculated. Immunohistochemical method was used to detect the microvessel density (MVD) in brain tissue. RT-PCR and Western-blotting was used to detect the mRNA and protein expression levels of Cav-1 and VEGF. **Results:** After 21 days of administration, the neurological scores of each group were decreased, especially the Huangqi-Honghua groups ($P<0.01$), and infarct volume ($P<0.05\sim P<0.01$) in Huangqi-Honghua groups were significantly lower than the model group. Compared with model group, the level of MVD, Cav-1 and VEGF mRNA and protein expression levels were significantly higher in Huangqi-Honghua treatment group ($P<0.05\sim P<0.01$). **Conclusions:** Huangqi-Honghua combination has protective against cerebral ischemia injury, the Cav-1/VEGF pathway may be involved and then promote the angiogenesis. Additionally, the best proportion of Huangqi-Honghua was 5:1.

Key words: Huangqi; Honghua; Ischemia reperfusion injury; Angiogenesis; Caveolin-1; Vascular endothelial growth factor

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R743; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)06-1016-04

前言

缺血性脑卒中具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率

高等特点,是威胁人的重大疾病之一^[1]。但是目前对脑卒中患者的治疗,尤其是错过了溶栓期的患者,其临床疗效仍欠佳。在局灶性脑缺血导致的脑损伤的后期是以神经再生、血管新生等脑

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503280, 81573549)

作者简介: 曹金一 (1984-), 博士研究生, 主要研究方向: 中药药理学, E-mail: 187266749@qq.com

Δ 通讯作者: 杨志福 (1973-), 硕士生导师, 副教授, 主要研究方向: 中药药理学及药剂学, E-mail: 13572931173@163.com, 电话: 029-84775471

(收稿日期: 2018-09-20 接受日期: 2018-10-13)

重构表现为主的,而脑血管新生又可以刺激内源性的恢复机制,是临床中有效的治疗脑缺血的方法。黄芪与红花配伍应用在治疗气虚血瘀证的方剂中较常见,黄芪补气,红花活血,二者配伍使用,完全符合缺血性脑卒中气虚血瘀的发病机制,临床使用广泛^[2,3]。但二者如何配伍,对脑缺血的保护作用最佳,鲜有报道。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种血管生成生长关键因子,在促进血管内皮细胞的增殖、分化、迁移以及增强血管通透性等方面具有重要作用^[4]。小凹蛋白1(Caveolin-1, Cav-1)是组成脂膜囊泡 caveolae 的主要蛋白成分,高度表达于血管内皮细胞中,对血管新生起着重要作用^[5]。有研究表明^[6],Cav-1 是 VEGF 介导的血管新生关键因子。目前,黄芪红花配伍是否通过促进血管新生发挥脑缺血再灌注损伤保护作用及其作用机制还未见报道。因此,本研究拟建立脑缺血再灌注大鼠模型,基于此研究黄芪红花不同配伍比例对脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨血管新生及 Cav-1/VEGF 信号通路在其中的作用,从而优选出黄芪红花的最佳配伍比例,指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 雄性,SPF 级 SD 大鼠共 60 只,体重为 240~260 g,购自第四军医大学实验动物中心,合格证编号:SCXK(军)2012-0007。适应性喂养 1 周后,随机分为对照组、模型组和黄芪-红花 5:1 组、20:1 组和 40:1 组,每组 12 只。

1.1.2 主要试剂及仪器 黄芪-红花配方颗粒(广东一方制药有限公司),CD34 抗体、VEGF、caveolin-1 抗体(均购自于 Cell Signaling TECHNOLOGY,批号分别为 3569、2463S、9698、3267),RT-PCR 测定试剂盒(美国 MBI 公司,批号 015234),RIPA(强)裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),蛋白凝胶成像系统(上海培清科技有限公司,型号 JS-786),电泳仪(北京六一仪器厂,型号 DYCZ30D),倒置显微镜(Olympus,型号 CX23),Image-pro-plus 6.0 图像分析软件。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑缺血再灌注损伤模型制备及给药 采用改良 Longa 法^[7]制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型,主要步骤:腹腔注射水合氯醛麻醉,仰卧位,固定,颈部备皮,颈正中部位切开皮肤,依次分离各动脉后,结扎颈总动脉和颈外动脉,并插入线栓(直径 0.26~0.28 mm,长度 5 cm),栓塞 90 min,然后退出线栓进行再灌注 24 h。对照组大鼠只开胸,不做处理。给药组在模型复制成功后分别灌胃给药黄芪-红花 5:1 配方颗粒、20:1 配方颗粒和 40:1 配方颗粒,每天 1 次,连续 21 d。对照组和模型组灌胃给予纯净水。

1.2.2 观察指标 (1)神经功能学评分:按 Bederson 方法^[8]进行神经功能学评分:无功能障碍为 0 级(0 分);无法伸展左侧前肢为 1 级(1 分);向左侧旋转为 2 级(2 分);向左侧倾倒为 3 级(3 分);无自主活动并伴有意识障碍为 4 级(4 分)。于造模后和给药 21 d 后各评估一次。评分较高者神经功能损伤较大。

(2)脑梗死体积测定:采用 TTC 染色方法^[9],步骤如下:10%水合氯醛麻醉,脱颈处死后,快速取出全脑,除去嗅球组织、小脑组织和低位脑干组织,其余脑组织于冰盘上切厚度为 2 mm

的冠状切片。脑片置于 37 ℃ 的 1%TTC 磷酸缓冲液中避光孵育 15 min,然后 10%福尔马林中固定,吸干表面水分后,按次序整齐排列,数码相机拍照,分别测定红色和白色区域面积,计算梗死体积比。照片用图像分析系统 Image Pro Plus 6.0 计算每片脑组织的梗死面积、脑片面积。

(3)脑微血管密度(Microvascular density, MVD)的测定 取各组大鼠缺血周边脑组织,10%甲醛固定,石蜡包埋后,进行切片,脱蜡,热修复, H₂O₂ 封闭后,用 CD34 抗体(1:800)在 4 ℃ 孵育过夜。然后,二抗常温孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染,水洗返蓝,梯度酒精脱水后,树胶封片,拍片。右侧皮质区 MVD 计数采用 WEIDNER 法^[10]。

(4) VEGF mRNA 和 Cav-1 mRNA 的检测 取各组大鼠缺血周边脑组织,采用 TRIzol 法提取总 RNA,应用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,应用 Real-time PCR 技术检测 mRNA 的表达, GAPDH 作为内参。VEGF 引物序列:正义:5'-GCC AAT GAA GGC ACT GAA CT-3', 反义:5'-CTC TGA CTG CTG GTG ATG TC-3', 片段长度 380 bp; Cav-1 引物序列,正义:5'-TCT ACA AGC CCA ACA ACA AGG CC-3'; 反义:5'-TGC ACT GAA TCT CAA TCA ATC AGG AAGC-3', 片段长度 318bp。GAPDH 引物序列,正义:5'-AGT GTG ACG TGG A-CA TCC GCA AAG-3', 反义:5'-ACT CAC ATC TGC TGG AAG GTG GAC-3', 片段长度 390 bp。

(5) VEGF 和 Cav-1 蛋白的检测 取各组大鼠缺血周边皮层脑组织,匀浆,离心后收集上清液,即为总蛋白提取液,加入到上样缓冲液中水煮变性,将等量蛋白加入到 SDS-PAGE 胶中,电泳,转膜至 PVDF 上,封闭 2 h, Cav-1 和 VEGF 一抗 1:500 稀释后,在 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后,在常温下孵育二抗 60 min,加入 ECL 发光底物。扫描并计算各条带的灰度,以 GAPDH 作为内参计算相对蛋白含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件,实验结果中计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示;进行方差齐性检验后通过方差分析比较各组间数据; $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能学评分

与对照组比较,模型组大鼠的神经功能学评分显著升高,而经过 21 d 的给药治疗,各组的神经功能学评分均有所降低,尤其是黄芪-红花 5:1 组相较模型组改善最为明显($P < 0.01$),见图 1。

2.2 脑梗死体积测定

如图 2 所示, TTC 染色结果显示,对照大鼠组脑组织切片呈现均匀红色,没有发现梗死病灶;而模型组梗死区皮层及纹状体缺血部分呈白色。在给药 21 d 后,给药组梗死体积有明显的减少,尤其以黄芪-红花 5:1 改善最为明显($P < 0.01$)。结果见图 2。

2.3 脑微血管密度(Microvascular density, MVD)的测定

与对照组比较,模型组皮质区 MVD 值显著高于对照组($P < 0.01$)。连续给药 21 d 后,三个给药组皮质区 MVD 值均明显大于模型组,并高于对照组($P < 0.01$),其中,以黄芪-红花 5:1 组皮质区 MVD 升高最为显著。结果见图 3 和表 1。

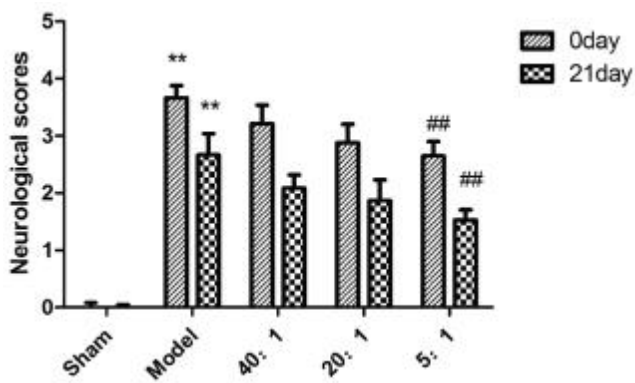


图1 神经功能学评分

Fig.1 Neurological scores after MCAO in each group(n=8)

Neurological scores were expressed as median(range); ** $P<0.01$ compared with control group, # $P<0.01$ compared with model group.

2.4 VEGFmRNA 和 Cav-1 mRNA 的检测

与对照组比较,模型组皮质区 VEGF 和 Cav-1 mRNA 的表达水平显著降低($P<0.01$),连续给药 21 d 后,皮质区 VEGF 和 Cav-1 mRNA 表达水平均有所升高($P<0.01$),尤其是黄芪红花 5:1 组,升高最为显著。结果见表 1。

2.5 VEGF 和 Cav-1 蛋白的检测

脑缺血再灌注损伤后,模型组皮质区的 VEGF 和 Cav-1 蛋白表达均明显低于对照组($P<0.01$),连续给药 21 d 后,给药组脑缺血再灌注区 VEGF 和 Cav-1 蛋白表达量均有所升高,尤其

是黄芪红花 20:1 组和 5:1 均显著高于模型组($P<0.01$)。

3 讨论

脑缺血后,持续的缺氧和缺血导致脑神经细胞坏死、变性和凋亡,造成严重的神经功能损伤。美国心脏协会/美国卒中协会为医疗保健专业人员制定的 2013 年《急性缺血性卒中的早期治疗指南》中指出:“目前,没有哪种具有公认神经保护作用的药物可有效改善缺血性卒中的结局,所以不建议使用其他神经保护剂。”^[11]而在局灶性脑缺血导致的脑损伤的后期是以神经再生、血管新生等脑重构表现为主的,有研究表明,缺血半暗带血管密度越高,卒中患者存活时间越长^[12]。因此,有效的保护缺血半暗带的神经元存活和建立丰富的侧支循环就成为脑梗塞研究的突破口,对改善中风的结果和卒中后功能恢复非常关键。

血管新生主要包括血管内皮细胞的激活、增殖、迁移、黏附,并最终新的腔样结构等过程,有多种活性因子参与这些过程。其中,VEGF 是迄今为止发现最强的促血管新生活性因子,VEGF 与其受体结合后,能够有效的刺激血管内皮前体细胞即内皮祖细胞的成熟和分化,同时促进血管内皮细胞黏附和迁移^[13]。有研究表明^[14],Cav-1,是细胞膜主要支架蛋白之一,在介导 VEGF 的血管新生作用过程中扮演着重要角色。在 Cav-1 基因敲除鼠体内,由 VEGF 介导而形成的血管数量显著降低,同时,eNOS 蛋白活性显著下降,最终 NO 生成减少;而给予 VEGF 刺激也不能有效的刺激血管生成,表现出较弱的血管新生能力。这充分证明了 Cav-1 和 VEGF 共同参与了血管新生的过程,并

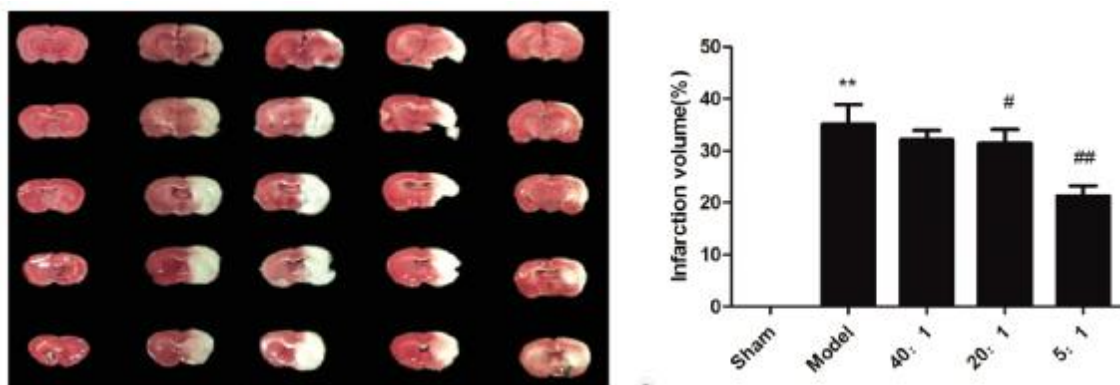


图2 大鼠脑缺血再灌注后大脑切片

Fig. 2 Infarct size in each group

** $P<0.01$ compared with sham group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with model group.

表1 大鼠再灌注皮质区 MVD、VEGFmRNA 和 Cav-1 mRNA 相对表达量(n=8)

Table 1 The number of MVD and relative expression of VEGF and Cav-1 mRNA(n=8)

Groups	MVD	VEGF mRNA	Cav-1 mRNA
Sham	7.40± 0.02	1.00± 0.00	1.00± 0.00
Model	10.85± 0.03**	0.516± 0.14**	0.435± 0.05**
40:1group	13.87± 0.02###	0.581± 0.08	0.548± 0.13##
20:1group	14.92± 0.05###	0.723± 0.06##	0.666± 0.03##
5:1group	18.52± 0.03###	0.910± 0.02##	0.932± 0.03##

Note: ** $P<0.01$ vs. Sham group, ### $P<0.01$ compared with model group.

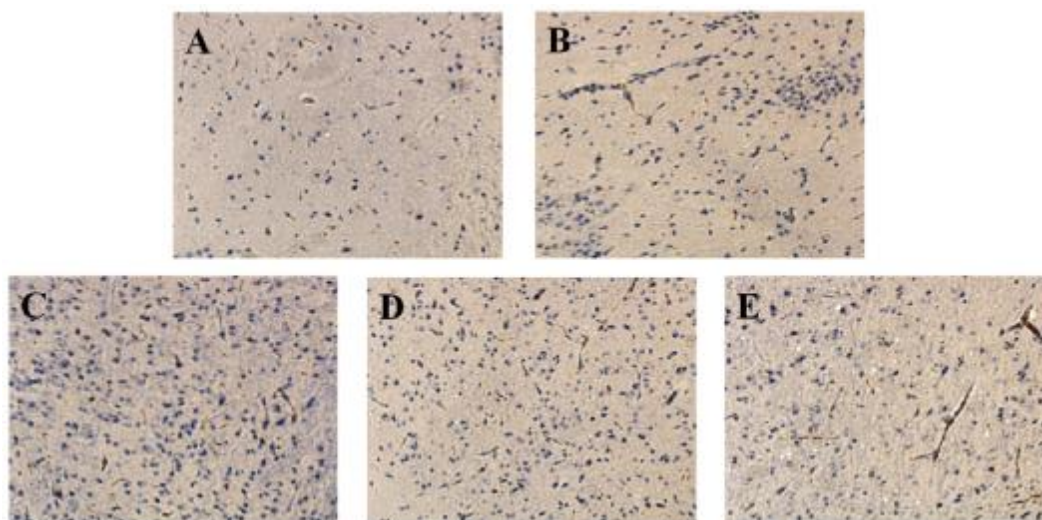


图3 脑皮层梗死区免疫组化染色 CD34 表达结果(× 200)

Fig.3 The CD34 expression in the cerebral cortex infarction by immunohistochemical staining (× 200)

A, Sham; B, Model; C, 40:1; D, 20:1; E, 5:1

起着重要作用。

血管新生与中医机理之益气生血、祛瘀生新等有着密切的关系,如“生脉”、“生肌”等。从中医角度看,“生脉”即采用益气生血类药物使原本闭塞的血管恢复通血或者刺激其他部位生成新的血管以代替原来闭塞的血管^[5]。补阳还五汤为临床常用的治疗气虚血瘀的方剂,其中黄芪红花比例为 40:1,除此,黄芪红花常见的配伍比例还有 5:1、20:1 等,但究竟最佳比例为多少,鲜有报道。我们的前期研究证实黄芪的有效成分黄芪甲苷,红花的有效成分羟基红花黄色素 A 能够显著减小脑缺血再灌注损伤大鼠的脑梗死面积,促进神经功能的恢复,表明其具有抗脑缺血损伤的作用^[6]。

本研究中,灌胃不同配比(40:1、20:1、5:1)的黄芪红花配方颗粒后大鼠的神经功能评分均显著低于模型组,且脑梗死体积显著低于模型组,表明黄芪红花配伍可有效的保护脑缺血损伤,恢复神经功能;三种不同配比组的大鼠损伤皮质区 MVD 显著高于模型组,表明黄芪红花配伍可以促进损伤脑区的血管新生;且三个给药组脑缺血再灌注区的 VEGF 和 Cav-1 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于模型组,效果最佳的组别为黄芪红花 5:1 组。基于以上的研究结果,我们可以推测,黄芪红花配伍确可以通过上调 Cav-1,促进 VEGF 的表达,促进血管新生,从而改善脑缺血损伤,且最优的配伍比例应为黄芪红花 5:1。

参考文献(References)

- [1] Pollak J, Doyle K P, Mamer L, et al. Stratification substantially reduces behavioral variability in the hypoxic-ischemic stroke model [J]. Brain Behavior, 2012, 2(5): 698-706
- [2] 辛伟,郭东青,薛新宇,等. 黄芪联合红花注射液治疗脑出血患者效果观察[J]. 中医临床研究, 2017, 9(33): 51-52
- [3] 敬满芳. 黄芪注射液联合红花注射液治疗原发性肾病综合征 40 例 [J]. 内蒙古中医药, 2013, 26: 22-23
- [4] Bellon A, Balik E, Feingold DL, et al. Major abdominal surgery increases Plasma level of vascular endothelial growth factor; open more so than minimally invasive methods[J]. Ann Surg, 2006, 244(5): 792-798
- [5] Marek Drab, Paul Verkade, Marlies Elger, et al. Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice[J]. Science, 2001, 293: 2449-2452
- [6] Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, et al. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide mediated angiogenesis[J]. Circ Res, 2004, 95(2): 154-161
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84-89
- [8] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476
- [9] Gu Li-juan, Xiong Xiao-xing, Wei Ding-tai, et al. T cells contribute to stroke-induced lymphopenia in rats[J]. PLOS ONE, 2013, 8(3): e59602
- [10] Weidner N J, RSample W R, Welch, et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324: 1-8
- [11] Edward C Jauch, Jeffrey L Saver, Harold P Adams, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association[J]. Stroke, 2013, 44: 870-947
- [12] Chen Yu-chang, Wu Jui-sheng, Yang Shun-tai, et al. Stroke, angiogenesis and phytochemicals[J]. Front Biosci, 2012, 1(4): 599-610
- [13] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 81-86
- [14] Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, et al. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide mediated angiogenesis [J]. Circ Res, 2004, 95(2): 154-161
- [15] 韩琳,姜鹏,李敏,等. 中药促血管新生的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2013, 31(5): 326-329
- [16] Cao Jin-yi, Chen Zheng-yu, Zhu Yan-rong, et al. Huangqi-Honghua combination and its main components ameliorate cerebral infarction with Qi deficiency and blood stasis syndrome by antioxidant action in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, (155): 1053-1060