

· 药理 ·

断藤益母汤对人脐静脉内皮细胞模型的作用机制

钱凯¹, 郑雪霞¹, 许舒迪¹, 詹静怡¹, 叶棠明¹, 廖发杰¹, 刘敏莹², 林昌松^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**探讨断藤益母汤(DTYM)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)模型细胞活化的作用,以及对相关活化蛋白与血管内皮生长因子(VEGF)信号通路的作用。**方法:**VEGF和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导HUVEC,DTYM(200,400 mg·L⁻¹)作用后,采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8),5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)法,transwell 鬼笔环肽荧光染色法及基质胶法检测细胞增殖活力、迁移和管形成能力,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测黏附因子E选择素(E-selectin),细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和脉管细胞黏附分子-1(VCAM-1) mRNA的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测血管性血友病因子(VWF),血小板-内皮细胞黏附分子31(CD31),血管诱导生成因子61(CYR61),血管生成素-1(ANG-1),VEGF和VEGF受体2(VEGFR2)的表达,免疫荧光检测CD31的表达。**结果:**与正常组比较,模型组HUVEC的增殖活力、迁移和管形成能力明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);E-selectin,ICAM-1,VCAM-1 mRNA表达升高($P<0.01$);VWF,CD31,ANG-1,CYR61,VEGF- α ,磷酸化(p)-VEGFR2蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),CD31免疫荧光强度升高($P<0.01$);与模型组比较,DTYM两剂量组HUVEC的增殖活力、迁移和管形成能力明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);E-selectin,ICAM-1,VCAM-1 mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),VWF,CD31,ANG-1,CYR61,VEGF- α ,p-VEGFR2蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),CD31免疫荧光强度降低($P<0.01$)。**结论:**DTYM抑制HUVEC的增殖、迁移、黏附和管形成,与其调控HUVEC中CD31,VWF,CYR61,ANG-1的表达及VEGF信号通路有关。

[关键词] 断藤益母汤;人脐静脉内皮细胞;类风湿关节炎;血管内皮生长因子(VEGF)信号通路;内皮细胞活化;血管新生

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0036-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211706

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210729.0942.001.html>

[网络出版日期] 2021-08-06 13:27

Mechanism of Duanteng Yimu Decoction on Human Umbilical Vein Endothelial Cell Model

QIAN Kai¹, ZHENG Xue-xia¹, XU Shu-di¹, ZHAN Jing-yi¹, YE Tang-ming¹,

LIAO Fa-jie¹, LIU Min-ying², LIN Chang-song^{2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Duanteng Yimu decoction (DTYM) on the activation of the human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model and the effect on related activated proteins and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Method:** After DTYM (200, 400 g·mL⁻¹) treatment of HUVEC induced by VEGF and tumor necrosis factor- α (TNF- α), cell proliferation, migration, and tubulogenesis were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay, transwell migration assay, phalloidin staining, and matrix gel card method. The mRNA expression of adhesion

[收稿日期] 20210411(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774262);广东省自然科学基金项目(2017A030311009)

[第一作者] 钱凯,博士,从事中医临床基础及风湿病研究,E-mail:13724051203@163.com

[通信作者] *林昌松,硕士,主任医师,博士生导师,从事风湿病中医药研究,E-mail:13802772276@163.com

factors, including E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of von Willebrand factor (VWF), platelet-endothelial cell adhesion molecule-31 (CD31), angiogenic factor cysteine-rich-61 (CYR61), angiopoietin-1 (ANG-1), VEGF, and VEGF receptor-2 (VEGFR2) was detected by Western blot. Immunofluorescence was used to determine CD31 expression. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed potentiated proliferation, migration, and tubulogenesis of HUVEC ($P<0.05$, $P<0.01$), elevated mRNA expression of E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 ($P<0.01$), up-regulated protein expression of VWF, CD31, ANG-1, CYR61, VEGF- α , and phospho (p)-VEGFR2 ($P<0.05$, $P<0.01$), and increased CD31 immunofluorescence intensity ($P<0.01$). Compared with the model group, the DTYM groups displayed blunted proliferation, migration, and tubulogenesis of HUVEC ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased mRNA expression of E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 ($P<0.05$, $P<0.01$), down-regulated protein expression of VWF, CD31, ANG-1, CYR61, VEGF- α , and p-VEGFR2 ($P<0.05$, $P<0.01$), and weakened CD31 immunofluorescence intensity ($P<0.01$). **Conclusion:** DTYM inhibits HUVEC proliferation, migration, adhesion, and tubulogenesis, which is associated with the regulation of CD31, VWF, CYR61, and ANG-1 expression in HUVEC and the VEGF signaling pathway.

[Keywords] Duanteng Yimu decoction; human umbilical vein endothelial cells; rheumatoid arthritis; vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway; endothelial cell activation; angiogenesis

类风湿关节炎(RA)病理特征是持续性滑膜炎和血管翳的形成,导致滑膜增生及骨和软骨的侵蚀,最终可能导致关节畸形和功能丧失。其中血管翳是RA病变过程中关键的病理产物,出现在绝大多数RA患者病变关节腔内。而RA患者的滑膜血管数量和密度增加,是供应滑膜组织的扩张和形成RA滑膜的增生性和侵袭性所必需的,这种病理性血管结构在RA滑膜炎形成过程中起着关键的作用^[1]。血管翳由新生微血管、增生肥大的滑膜细胞、炎性细胞及机化的纤维素构成,具有类似肿瘤组织的特性,是引起关节病变、软骨破坏的主要病理基础,新生的血管可能是维持和促进类风湿关节炎的核心^[2-3]。

内皮细胞(ECs)是细胞因子、生长因子、通透性因子和基质降解酶作用的活性靶点,ECs对上述因素的反应既维持又促进RA的病情发展^[4]。血管内皮参与炎症反应的引发和维持,ECs被多种刺激因素激活,以表达表面黏附分子,从而通过主动过程结合并促进白细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞)向目标组织的运动。细胞因子释放、生长因子的产生及随后的下游分子信息,都会导致血管通透性改变,ECs增殖和迁移、基底膜破及新血管形成^[5]。另外有研究表明,在炎性肠病和急性移植抗宿主病动物模型的炎症过程中,血管生成先于白细胞浸润^[6];因此抑制RA中ECs的活化是十分必要的。

断藤益母汤是林昌松教授多年来治疗RA的经验方,其组方为南蛇藤、黑骨藤、续断、益母草。断藤益母汤以南蛇藤、黑骨藤为君药,祛风除湿、消肿止痛;以续断、益母草为佐使,活血利湿、补肝肾、强筋骨;全方具有祛风湿、强筋骨、通血脉的功效。断藤益母汤在长期的临床应用中,治疗RA疗效显著^[7];课题组已进行断藤益母汤系列的基础实验研究,证实断藤益母汤能抑制成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭、炎症因子的分泌及诱导其凋亡,并且断藤益母汤能抑制破骨细胞的分化^[8-10]。在前期研究中发现断藤益母汤具有抑制胶原蛋白诱导关节炎(CIA)小鼠血管翳形成的作用,然而断藤益母汤抑制血管翳内皮细胞活化的分子作用机制尚未阐明。本研究为进一步探讨断藤益母汤对内皮细胞活化的作用机制,采用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)体外诱导模型,从增殖、迁移、黏附和管形成等生物过程及其相关活化蛋白与血管内皮生长因子(VEGF)信号通路展开研究。

1 材料

1.1 细胞 原代人脐静脉内皮细胞购自美国ScienCell公司,批号28433。

1.2 药物与试剂 南蛇藤、续断、益母草(广东康美药业股份有限公司,批号分别为180901971,181203101,1190201241);黑骨藤(贵阳市中药材市场),所有药材经广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》相

关要求;内皮ECM培养基(美国ScienCell公司,批号1001);0.25%胰酶(美国Gibco公司,批号15050065);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8,美国MCE公司,批号HY-K0301);重组人肿瘤坏死因子- α (TNF- α),重组人VEGF₁₆₅(美国Peprotech公司,批号分别为300-01A,100-20);5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)试剂盒(中国锐博生物有限公司,批号C10310);transwell小室(美国Corning公司,批号3414);结晶紫粉末,鬼笔环肽-纤维形肌动蛋白(F-actin)微丝蛋白荧光染料(美国Sigma公司,批号分别为C0775,P1951);基质胶(美国BD公司,批号356234);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,批号15596-018);逆转录试剂盒,SYBR Green实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR036A,RR820A);血小板-内皮细胞黏附分子31(CD31)抗体,血管性血友病因子(VWF)抗体,血管生成素-1(ANG-1)抗体,血管诱导生成因子61(CYR61)抗体,VEGF- α 抗体,VEGF受体2(VEGFR2)抗体,磷酸化(p)-VEGFR2抗体(美国Afinity公司,批号分别为AF6191,AF3000,AF5184,DF6250,AF5131,AF6281,AF3279);聚偏氟乙烯(PVDF)膜,PAGE凝胶快速制备试剂盒,超敏化学发光检测试剂盒(中国雅酶公司,批号分别为WJ001,PG111,PG112,SQ201);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法蛋白定量试剂盒,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔二抗,RIPA裂解液,一抗稀释液,二抗稀释液,QuickBlock™免疫染色封闭液,免疫染色一抗稀释液,免疫染色洗涤液,抗淬灭封片剂(碧云天生物技术研究,批号分别为P0010S,A0208,P0013B,P0256,P0023D,P0231,P0103,P0106,P0131);荧光二抗山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G H&L(美国Abcam公司,批号ab150077)。

1.3 仪器 3111型CO₂细胞培养箱,1300系列A2型生物安全柜,NanoDrop 2000型微量分光光度计,991型超低温冰箱(美国Thermo Scientific Forma公司);5415D型低温超速离心机,5702型常温离心机,BMR-100型酶标仪,3120型微量移液器(德国Eppendorf公司);164-5050型电泳仪和Trans-Blot Turbo型转膜仪,Biorad ChemiDoc MP型多功能成像系统(美国Bio-Rad公司);AB7000型Real-time PCR仪(美国AB公司);Milli-Q Academic型超纯水系统(美国Millipore公司);WD-9405D型恒温摇床(北京六一仪器厂);BX53型生物显微镜(日本Olympus公司);MS105D型电子分析天平(瑞士

Mettler Toledo公司)。

2 方法

2.1 断藤益母汤冻干粉制备 断藤益母汤组成:南蛇藤30 g,黑骨藤15 g,益母草15 g,续断15 g。用10倍质量体积比的去离子水充分浸泡药物,然后以武火煮沸后文火慢煎1 h,水煎液以纱布及200目筛网过滤药渣。第2次以8倍质量体积比的去离子水煎煮45 min,过滤收集滤液,将2次水煎液均匀混合。水煎液于70℃减压浓缩至约250 mL,将浓缩液置于100 mm的培养皿中,于-80℃的预冷过夜。将培养皿置入冷冻干燥机进行冻干,48 h后将冻干粉快速捻匀后放入50 mL离心管中,储存于-20℃备用。

适量冻干粉加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)配制终质量浓度为100 g·L⁻¹的断藤益母汤母液,使用0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌,于-80℃冰箱保存。实验时提前解冻母液,用培养基对母液进行稀释,获得不同实验所需药物浓度,药物最大浓度的含药培养基中PBS的浓度<0.1%。

2.2 细胞培养 HUVEC使用专用内皮细胞培养基,在37℃,5%CO₂条件下培养。培养皿细胞在倒置显微镜下观察,根据细胞的状态、密度,进行换液、传代培养、冻存、复苏或者种板等操作。其中,4~6代细胞进行实验。

2.3 CCK-8细胞活力测定实验 HUVEC接种(6×10^3 个/孔)于96孔板中,设为空白组,25,50,100,200,400,800,1 000,2 000 mg·L⁻¹断藤益母汤各剂量组,每组5个复孔,培养24 h。弃培养基,PBS换洗一次,每孔加入新鲜完全培养基100 μ L,每孔再加CCK-8溶液10 μ L,继续培养1 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A,计算细胞活力,每次实验重复3次,取均值进行统计分析。

2.4 HUVEC细胞增殖实验 HUVEC接种(6×10^3 个/孔)于96孔板中,设空白组,模型组(VEGF 50 μ g·L⁻¹),断藤益母汤低、高剂量组(200,400 mg·L⁻¹),按照上述分组进行药物干预HUVEC 24 h。每孔加入终浓度为50 μ mol·L⁻¹的EdU培养基100 μ L,孵育2 h。PBS清洗细胞2次,每次5 min。每孔加入4%多聚甲醛50 μ L,室温孵育30 min,弃固定液。每孔50 μ L 2 g·L⁻¹甘氨酸溶液,室温脱色摇床孵育5 min,弃甘氨酸溶液。PBS清洗5 min,1次。每孔100 μ L渗透剂(0.5% TritonX-100),摇床孵育10 min。PBS清洗5 min,1次。每孔加入Apollo染色液100 μ L,在室温避光摇床下孵育

30 min后,弃染色反应液。每孔加入渗透剂100 μL ,摇床孵育10 min,3次,弃渗透剂。每孔加入Hoechst33342反应液100 μL ,避光室温摇床孵育30 min后,弃染色反应液。PBS清洗10 min,3次。在倒置荧光显微镜下观察并获取图像,用Image J软件对图片中EdU⁺细胞和Hoechst⁺细胞分别计数,计算EdU染色的阳性率(阳性率=EdU⁺细胞数/Hoechst⁺细胞数),每组样本选取3个视野,取均数进行统计学分析,实验重复3次。

2.5 HUVEC 细胞 transwell 迁移实验 将(4×10^5 个/mL)细胞悬液100 μL 加入transwell上室中,上室总体积为200 μL (溶剂为无血清培养基)。下室加入含5%FBS的培养基600 μL ,再置于培养箱中培养24 h。取出transwell小室,弃培养液,下室中PBS洗2遍,棉签擦掉上室内的水分和未迁移的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,蒸馏水浸洗2次,每次2 min;上室风干2 min。用0.1%结晶紫(甲醇10 mL+结晶紫粉末0.5 g,终浓度为0.5%的储存液,使用时PBS稀释到0.1%浓度的工作液)染色15 min,蒸馏水浸洗2次,每次2 min,棉签擦拭上室内水分后风干2 min。在倒置相差显微镜下($\times 200$)对迁移至下室的细胞进行拍照,每个样本选取3个视野,使用Image J软件进行细胞计数,取均数进行统计学分析,实验重复3次。

2.6 HUVEC 细胞肌动蛋白鬼笔环肽荧光染色实验 适量鬼笔环肽溶解在甲醇中配制成100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;工作质量浓度为5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,-4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。细胞爬片置于滴加完全培养基50 μL 的24孔板中,再将100 μL 细胞悬液(2×10^5 个/mL)加入24孔板中,设空白组,模型组(TNF- α 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),断藤益母汤低、高剂量组(200,400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。按上述分组进行干预,每孔总体积为200 μL 。将培养板置于培养箱中培养24 h。吸去旧培养基,加入新鲜完培后,TNF- α 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激5 h。吸去培养基,PBS洗3次,每次5 min;4%多聚甲醛室温固定20 min,PBS洗3次,每次5 min;0.1% Triton X-100通透处理5 min,PBS洗3次,每次5 min;用1% BSA室温封闭20 min,PBS洗3次,每次5 min;每孔5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-鬼笔环肽染色液200 μL ,置于培养箱内孵育40 min,弃去染色液,PBS洗3次,每次5 min,整个过程避光操作;10 μL 抗荧光封片剂(含DAPI)封片,暗湿盒保存。用激光共聚焦显微镜($\times 630$)观察并拍照,每个样本选取5个视野,使用Image J软件进行荧光定量^[11],单位为Arbitrary unit,取均数进行统

计学分析,实验重复3次。

2.7 HUVEC 细胞管形成实验 细胞悬液(4×10^5 个/mL)100 μL 加入基质胶已凝固的96孔板中,设空白组,模型组(VEGF 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),断藤益母汤低、高剂量组(200,400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),按照上述分组进行干预(先加断藤益母汤再加VEGF),每孔200 μL 。再置于培养箱中培养6 h。在倒置相差显微镜下($\times 200$)对HUVEC管形成情况进行拍照。每孔选取5个视野,使用Image J软件中Angiogenesis Analyzer插件进行管腔节点数目及管腔连接交叉点数分析^[12],取均数进行统计学分析,实验重复3次。

2.8 Real-time PCR 检测 E 选择素 (E-selectin), 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1), 脉管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) mRNA 表达 6孔板铺板(每孔 4×10^5 个细胞),设空白组,模型组(TNF- α 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组),断藤益母汤低、高剂量组(200,400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),分组干预24 h。用TRIzol法提取总RNA。采用Takara公司的逆转录试剂盒,按照说明书配制逆转录体系。于PCR仪中37 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min,然后85 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,以灭活逆转录酶,将不稳定的RNA逆转录稳定的cDNA。逆转录后,使用无RNA酶水将cDNA稀释合适的倍数,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。采用Real-time PCR试剂盒,参照说明书配制反应体系,相应基因的引物序见表1,采用两步法进行PCR反应,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,共40个循环。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将靶基因出峰的循环数(C_t 值)与内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)进行比较,计算各目的基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值,以空白组为基线计算各组目的基因的相对表达水平。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
E-selectin	上游 TGGAACACAACCTGTACATTTG	85
	下游 AATTCCCAGATGAGGTACACTG	
ICAM-1	上游 GTCACCTATGGCAACGACTCCTTC	119
	下游 AGTGTCTCCTGGCTCTGGTTCC	
VCAM-1	上游 TCTCATTGACTTGCAGACCACAG	97
	下游 CCCTCATTCTGCACCTTCCCATTG	
GAPDH	上游 GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
	下游 TGGTGAAGACGCCAGTGGGA	

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达水平 6孔板铺板(每孔 4×10^5 细胞),设空白

组,模型组($\text{TNF-}\alpha$ $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{TNF-}\alpha$ $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +断藤益母汤中剂量组($200 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{TNF-}\alpha$ $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +断藤益母汤高剂量组($400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),分组干预24 h,后再加 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激1 h。用含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解细胞,提取总蛋白并进行蛋白定量,将所有样本定至统一浓度,30 μg 蛋白上样。将配制好的凝胶安置在电泳槽内,选择80 mV进行恒压电泳,至样本到达浓缩胶与分离胶分界处,120 mV进行恒压电泳,适时结束电泳。PVDF转膜,恒压200 V转膜90 min。TBST洗膜3次,每次10 min,无蛋白快速封闭液室温下封闭15 min。TBST洗膜3次,每次10 min,用一抗稀释液配制1:1 000的一抗,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min。使用二抗稀释液稀释二抗(1:4 000),室温下摇床孵育2 h。TBST洗膜3次,每次10 min。按照A液-B液1:1进行配制适量ECL发光液,在化学发光图像分析系统上扫描并进行灰度分析。

2.10 免疫荧光检测细胞CD31表达 提前将小圆片浸泡75%乙醇中24~48 h,用酒精灯进行烧灼直至小圆片上残留液体全部挥发,后置于滴加新鲜完全培养基50 μL 的24孔板中。 (2×10^4) 细胞/孔接种于小圆片上。设空白组(空白组),模型组($\text{TNF-}\alpha$ $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组),断藤益母汤低、高剂量组($200, 400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),按照实验分组干预24 h,后再加 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激1 h。弃培养基,PBS缓冲液浸洗2次,每次5 min。每孔4%多聚甲醛100 μL 室温固定20 min,PBS洗3次,每次5 min。0.1% Triton X-100通透打孔处理5 min,PBS洗3次,每次5 min。QuickBlockTM免疫染色封闭液100 μL 封闭15 min,免疫染色洗涤液洗3次,每次5 min。免疫染色一抗稀释液稀抗体(1:50)。滴加适量一抗于薄膜上,小圆片吸掉残留洗涤液,使小圆片上有细胞一面覆盖于一抗上,湿盒内4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。免疫染色洗涤液洗浸洗小圆片3次,每次5 min,滴加适量浓度为1:3 000的荧光二抗于薄膜上,避光,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育1 h,免疫染色洗涤液洗3次,每次5 min。抗荧光封片剂(含DAPI)10 μL 封片,暗湿盒保存。用激光共聚焦显微镜($\times 630$)观察并拍照,每个样本选取5个视野,使用Image J软件进行荧光定量^[11],单位为Arbitrary unit,取均数进行统计学分析,实验重复3次。

2.11 统计学分析 所有数据用SPSS 20.0统计软件处理,定量资料均满足正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组间比较使用 T 检验,多组样本间比较采用One-

way ANOVA法,若方差齐性则使用Bonferroni分析,方差不齐使用Tamhane's T_2 ,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对HUVEC活力的影响 与空白组比较,DTYM各剂量组HUVEC细胞活力均有所下降;其中DTYM($200, 400, 600, 1\ 000, 2\ 000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组HUVEC的细胞活力明显下降($P<0.05, P<0.01$),DTYM能够抑制HUVEC的活力,且与药物浓度相关,药物浓度较低时,细胞活性无明显变化,而当药物浓度越高时,细胞活性下降越明显,呈现出剂量依赖性关系。将细胞生存率80%以上的药物浓度作为断藤益母汤对HUVEC的非毒性剂量,应用 $200, 400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量的断藤益母汤做后续实验研究。见表2。

表2 断藤益母汤对HUVEC活力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Duanteng Yimu decoction (DTYM) on HUVEC activity ($\bar{x}\pm s, n=3$)

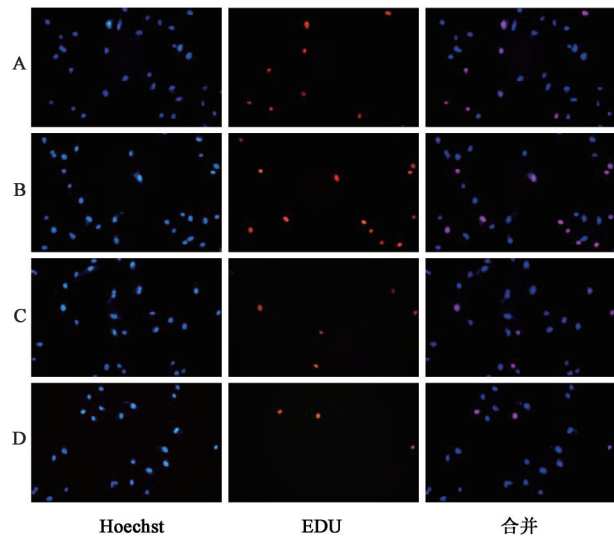
组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h细胞活力/%
空白		100.67 \pm 1.09
断藤益母汤	25	99.95 \pm 8.11
	50	100.27 \pm 5.29
	100	94.08 \pm 4.06
	200	94.39 \pm 2.56 ¹⁾
	400	92.75 \pm 1.49 ²⁾
	600	91.23 \pm 3.41 ¹⁾
	800	88.49 \pm 13.05
	1 000	86.25 \pm 5.89 ¹⁾
	2 000	66.46 \pm 4.71 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3.2 对HUVEC增殖的影响 与空白组比较,模型组细胞生长密度更大,更密集,模型组能明显促进HUVEC的增殖,明显提高HUVEC的增殖率($P<0.05$);与模型组比较,DTYM组细胞明显密度减少,HUVEC的增殖率显著降低($P<0.01$)。提示断藤益母汤可抑制由VEGF诱导的HUVEC细胞增殖。见图1,表3。

3.3 对VEGF诱导HUVEC迁移能力的影响 与空白组比较,模型组迁移到Transwell下室的细胞数量明显增多($P<0.05$)。与模型组比较,DTYM两剂量组迁移到Transwell下室的细胞数量显著减少($P<0.01$),并呈现剂量依赖性。见图2,表4。

3.4 对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导HUVEC纤维形肌动蛋白的影响 与空白组比较,模型组HUVEC纤维形肌动蛋



A. 空白组; B. 模型组; C. 断藤益母汤低浓度组; D. 断藤益母汤高浓度组(图2~7同)

图1 断藤益母汤对VEGF诱导的HUVEC增殖的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 1 Effect of DTYM on HUVEC proliferation induced by VEGF (IF, ×200)

表3 断藤益母汤对HUVEC增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DTYM on proliferation of HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	增殖率/%
空白		21.97±1.86
模型		33.05±1.49 ¹⁾
断藤益母汤	200	14.50±3.12 ⁴⁾
	400	12.89±1.19 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4~10同)。

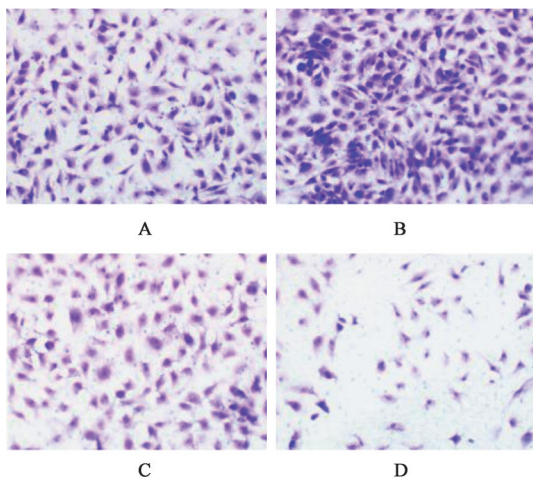


图2 断藤益母汤对HUVEC体外迁移功能的影响(结晶紫, ×200)

Fig. 2 Effect of DTYM decoction on migration function of HUVEC *in vitro* (crystal violet, ×200)

白表达显著增多($P<0.01$)。与模型组比较,DTYM两剂量组HUVEC纤维形肌动蛋白表达明显减少

表4 断藤益母汤对HUVEC体外迁移功能的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DTYM on migration function of HUVEC *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	迁移细胞数/个
空白		204.67±47.17
模型		328.00±13.53 ¹⁾
断藤益母汤	200	137.67±19.86 ⁴⁾
	400	60.00±6.56 ⁴⁾

($P<0.05, P<0.01$),并呈现剂量依赖性;实验结果证明了断藤益母汤可抑制TNF- α 诱导的HUVEC细胞纤维形肌动蛋白表达。见图3,表5。

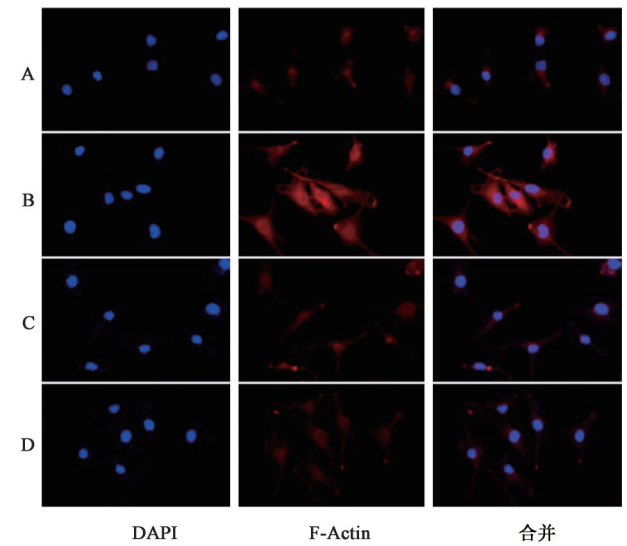


图3 断藤益母汤对HUVEC纤维形肌动蛋白表达的影响(免疫荧光, ×630)

Fig. 3 Effect of DTYM on HUVEC fibrous actin expression (IF, ×630)

表5 断藤益母汤对HUVEC纤维形肌动蛋白平均荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DTYM on average fluorescence intensity of HUVEC fibrous actin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	平均荧光强度
空白		9.27±1.43
模型		20.06±1.88 ²⁾
断藤益母汤	200	12.64±1.14 ³⁾
	400	8.63±1.19 ⁴⁾

3.5 对VEGF诱导HUVEC管腔形成的影响 与空白组比较,模型组HUVEC形成管腔节点数目及管腔连接交叉点数目显著增多($P<0.01$)。与模型组比较,DTYM两剂量组HUVEC形成的管腔节点数目及管腔连接交叉点数目明显减少($P<0.05, P<0.01$),并有剂量依赖性;实验结果证明了DTYM呈现抑制

HUVEC的管腔形成的作用。见图4,表6。

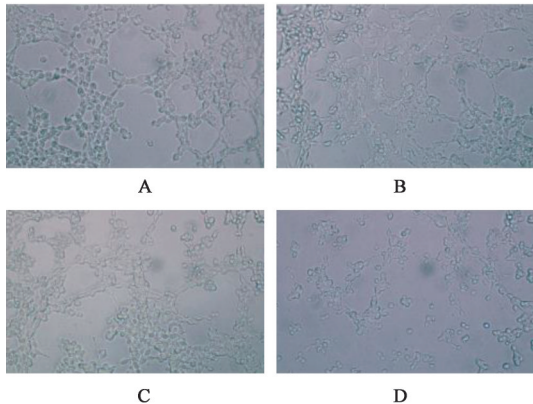


图4 断藤益母汤对HUVEC管腔形成的影响(倒置显微镜,×200)
Fig. 4 Effect of DTYM decoction on tube formation of HUVEC (inverted microscope, ×200)

3.6 对HUVEC中E-selectin, ICAM-1和VCAM-1

表7 断藤益母汤对HUVEC中E-selectin, ICAM-1和VCAM-1 mRNA的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DTYM on E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	E-selectin	ICAM-1	VCAM-1
模型		3.64±0.70 ²⁾	11.53±2.73 ²⁾	23.87±3.25 ²⁾
断藤益母汤	200	1.64±0.14 ³⁾	6.26±0.94 ³⁾	14.79±2.74 ⁴⁾
	400	0.70±0.13 ⁴⁾	4.54±1.20 ³⁾	8.04±0.93 ⁴⁾

注:设空白组各指标mRNA表达量为1。

3.7 对HUVEC细胞活化相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组HUVEC中VWF, CD31, ANG-1, CYR61蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,DTYM两剂量组能明显下调VWF, CD31, ANG-1, CYR61的蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$),呈剂量依赖性。见图5,表8。

3.8 对HUVEC中CD31细胞免疫荧光的影响 与空白组比较,模型组CD31荧光强度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,DTYM两剂量组荧光强度显著降低($P<0.01$),且呈剂量依赖性。提示断藤益母汤在可抑制显著抑制CD31的表达。见图6,表9。

3.9 对VEGF信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组HUVEC中VEGF- α , p-VEGFR2蛋白相对表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比

表6 断藤益母汤对HUVEC管腔形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of DTYM on tube formation of HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	管腔节点数	管腔连接交叉点数
空白		1 617.33±42.71	443.00±21.70
模型		2 109.00±66.09 ²⁾	600.33±23.01 ²⁾
断藤益母汤	200	1 599.00±62.75 ⁴⁾	432.33±20.31 ³⁾
	400	991.00±196.05 ⁴⁾	268.67±52.70 ⁴⁾

mRNA的影响 与空白组比较,模型组HUVEC中E-selectin, ICAM-1和VCAM-1 mRNA的表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,DTYM两剂量组HUVEC中E-selectin, ICAM-1和VCAM-1 mRNA的表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性。提示DTYM能下调HUVEC中E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 mRNA的表达。见表7。

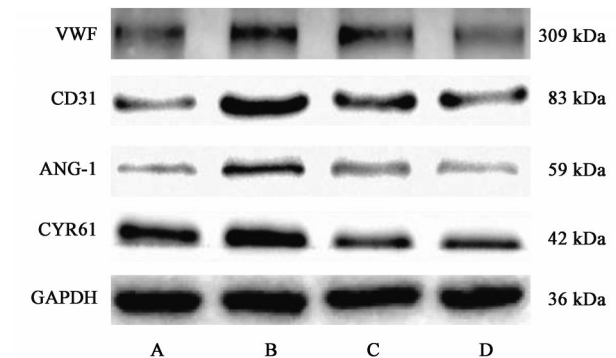


图5 各组HUVEC细胞活化相关蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of HUVEC cell activation related proteins expression

较,DTYM组HUVEC中VEGF- α , p-VEGFR2蛋白相对表达水平显著降低($P<0.01$)。见图7,表10。

表8 断藤益母汤对HUVEC细胞活化蛋白相关表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of DTYM decoction on expression of HUVEC activation related proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	VWF/GAPDH	CD31/GAPDH	ANG-1/GAPDH	CYR61/GAPDH
模型		1.70±0.22 ²⁾	3.10±0.27 ²⁾	3.22±0.21 ²⁾	1.32±0.15 ¹⁾
断藤益母汤	200	1.18±0.13 ³⁾	1.87±0.20 ⁴⁾	1.76±0.17 ⁴⁾	0.69±0.17 ⁴⁾
	400	0.84±0.09 ⁴⁾	1.46±0.09 ⁴⁾	1.01±0.17 ⁴⁾	0.45±0.13 ⁴⁾

注:设空白组各指标蛋白相对表达量为1。

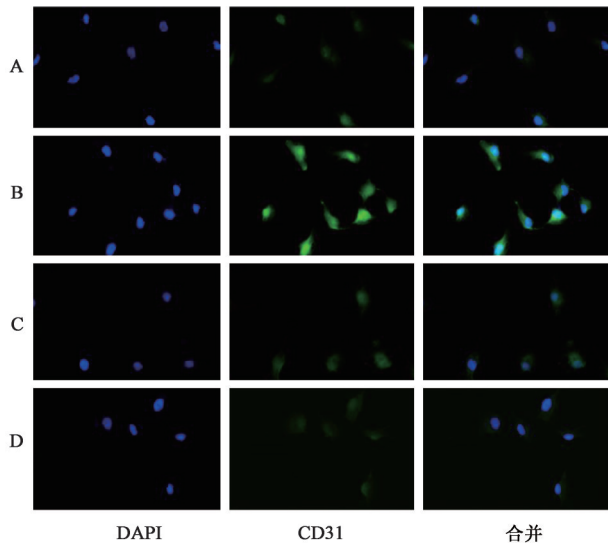


图6 断藤益母汤对HUVEC中CD31细胞免疫荧光的影响(免疫荧光, ×630)

Fig. 6 Effect of DTYM on immunofluorescence of CD31 in HUVEC (IF, ×630)

表9 断藤益母汤对HUVEC中CD31平均荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of DTYM on average fluorescence intensity of CD31 in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	平均荧光强度
空白		7.94±1.93
模型		18.71±3.31 ²⁾
断藤益母汤	200	9.02±2.20 ⁴⁾
	400	6.65±1.04 ⁴⁾

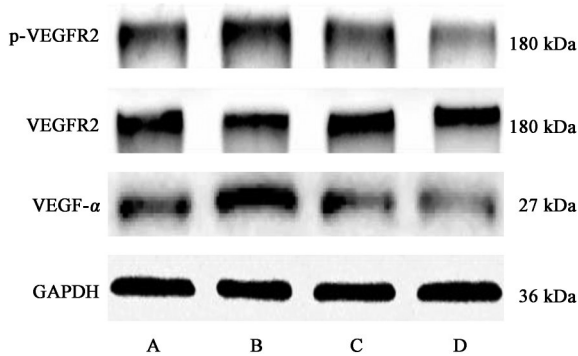


图7 各组HUVEC中VEGF信号通路蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of VEGF signal pathway protein expression in HUVEC

4 讨论

滑膜血管新生在血管翳的形成和维持中起到重要作用,而ECs是血管结构形成及血管新生的重要组成部分,其增殖、迁移、黏附及管形成能力在促血管形成的过程中处于中心地位^[13]。在这项研究中,课题组证实了断藤益母汤能抑制ECs的增殖、迁

表10 断藤益母汤对HUVEC中VEGF信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of DTYM on protein expression of VEGF signaling pathway in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-VEGFR2 /VEGFR2	VEGF-α /GAPDH
模型		1.67±0.19 ²⁾	1.93±0.16 ²⁾
断藤益母汤	200	0.97±0.14 ⁴⁾	0.87±0.09 ⁴⁾
	400	0.65±0.07 ⁴⁾	0.56±0.07 ⁴⁾

注:设各指标蛋白相对表达量为1。

移、黏附及管腔形成,从而抑制了ECs的活化。

在RA滑膜血管新生体外研究中最为常用模型是血管ECs模型,其可以模拟ECs体外的增殖、迁移、黏附及管腔形成实验,用以观察血管生成的不同环节^[14-15]。故选取HUVEC作为研究对象。在RA发病之前, TNF-α及其受体水平明显升高^[16], TNF-α直接影响ECs的迁移和增殖以及新血管的形成^[17]。TNF-α通过与白细胞介素-1β(IL-1β)和IL-17的协同作用间接促进RA滑膜组织成纤维细胞血管内皮生长因子的产生^[18]。TNF-α能通过调节ECs分泌促血管生成黏附分子E-selectin, ICAM-1和VCAM-1及趋化因子影响RA的血管生成^[19-20]。VEGF在关节液和组织中的表达水平与RA的临床严重程度及关节破坏程度相关^[21-22]。VEGF能促进新血管的形成,增加血管的通透性,加重RA中炎症的发展,两者相互作用共同调控血管翳的发生与发展^[23]。并且VEGF也是血管生成的关键调节因素,其与血管ECs的增殖、迁移和管形成以及防止ECs凋亡有关^[24]。TNF-α与VEGF在RA发病和血管新生中均能起到关键作用,故而参照前人研究的基础上^[25],在模拟HUVEC体外增殖, transwell迁移,管形成实验上采用VEGF造模,在模拟HUVEC体外纤维形肌动蛋白、黏附、细胞免疫荧光和检测蛋白表达上采用TNF-α造模。

在细胞表型方面,首先采用CCK-8检测DTYM对HUVEC活力的影响来确定干预剂量。然后检测细胞增殖情况,通过EdU法检测DTYM对HUVEC细胞增殖的影响,结果发现DTYM能显著抑制HUVEC的体外增殖。在细胞迁移方面通过transwell迁移实验和F-actin荧光染色来确认。通过transwell小室诱导模拟体内迁移情况,实验结果显示DTYM能显著抑制由VEGF诱导的HUVEC向下室迁移能力。另外微丝是细胞内运动,细胞机械支持的物质基础,由actin组成的直径约为7 nm的纤

维结构。肌动蛋白单体一个接一个连成一串肌动蛋白链,两串这样的肌动蛋白链互相缠绕扭曲成一股微丝。这种肌动蛋白多聚体又被称为F-actin。通过鬼笔环肽染料的荧光强度可以判断F-actin在细胞内的表达量。断藤益母汤进行干预后,HUVEC的F-actin的荧光强度明显减弱。因此,本研究从两方面证实了断藤益母汤可以抑制HUVEC的迁移能力。细胞间的黏附也是血管形成的重要基础,E-selectin,ICAM-1及VCAM-1存在于活化的血管ECs表面。TNF- α 可活化脉管ECs,刺激E-selectin,ICAM-1和VCAM-1的合成,介导的白细胞与ECs的黏合作用。Real-time PCR法检测DTYM对TNF- α 刺激下E-selectin,ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达情况;结果显示,DTYM可显著抑制HUVEC中E-selectin,ICAM-1和VCAM-1 mRNA的相对表达。管形成实验是体外研究血管生成的经典方法,ECs具有快速分裂和迁移的能力,响应血管生成信号,HUVEC细胞在基质胶中能自发形成管腔样的结构。实验结果显示,DTYM能明显抑制HUVEC在体外的管腔形成。综上所述,DTYM通过抑制ECs的增殖、迁移、黏附和管形成,从而抑制血管新生。

ECs活化相关蛋白涉及增殖、迁移、黏附和管形成等生物过程,VWF,CD31,CYR61,ANG-1是其中较为关键的影响因素。VWF是一种存在于血浆中的多聚糖蛋白,在ECs、巨核细胞和内皮下结缔组织中可以产生超大的VWF^[26],可以介导血小板沿血管ECs黏附的多聚促凝血浆糖蛋白的表达;其除了维持正常的止血作用,最近新的生物学功能研究表明,VWF参与包括炎症,血管生成和转移等过程^[27],VWF可以通过多种途径调节血管生成^[28]。同时,CD31在调节白细胞与ECs的黏附中起着关键作用^[29],也是具有促进血管生成和炎症活性的细胞黏附重要分子^[30]。CYR61定位于并作用于微血管周细胞基质,构成微血管顺应性的主要候选标记和调节因子^[31],CYR61属于基质细胞蛋白的细胞间通讯网络(CCN)家族,这个家族参与血管生成、软骨形成和骨形成,他们可能参与细胞增殖和分化的控制^[32]。CYR61在调节细胞增殖、分化、凋亡、血管生成和纤维化等方面发挥重要作用^[33]。本研究表明,DTYM能够抑制在TNF- α 刺激下HUVEC中VWF,CD31,ANG-1,CYR61蛋白的表达,尤其是CD31在动物免疫组化和细胞免疫荧光上的表达均被显著抑制,表明DTYM可能是通过影响VWF,CD31,ANG-1,CYR61蛋白的表达,来抑制ECs的活化。

在体外HUVEC蛋白表达中发现,DTYM能够显著降低TNF- α 刺激下VEGF-A的表达,以及抑制VEGFR2的磷酸化,表明DTYM能够限制抑制VEGF通路的激活。

综上所述,本研究表明断藤益母汤能抑制HUVEC的增殖、迁移、黏附和管形成,从而抑制ECs的活化,其作用机制可能与断藤益母汤抑制HUVEC相关活化蛋白(CD31,VWF,CYR61,ANG-1)的表达以及调控VEGF信号通路有关,本研究为其临床应用提供新的依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LEBLOND A, ALLANORE Y, AVOUAC J. Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(6): 594-601.
- [2] 李香斌, 连金饶, 林娜, 等. 类风湿关节炎滑膜血管生成和血管翳[J]. *医学综述*, 2010, 16(1): 7-9.
- [3] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南一类风湿关节炎(2019-10-11)[J]. *世界中医药*, 2020, 15(20): 3160-3168.
- [4] PALEOLOG E M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(Suppl 3): S81-S90.
- [5] VEALE D J, FEARON U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006, 20(5): 941-947.
- [6] RIESNER K, SHI Y, JACOBI A, et al. Initiation of acute graft-versus-host disease by angiogenesis [J]. *Blood*, 2017, 129(14): 2021-2032.
- [7] 林昌松, 梁江, 刘风震, 等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6): 632-637.
- [8] 王强, 韩隆胤, 魏赓权, 等. 断藤益母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞MEKK2及CIA小鼠关节炎的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 31-41.
- [9] 蔡叙东, 林昌松, 潘东梅, 等. 断藤益母汤对破骨细胞RANKL信号通路及MMP-9的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 68-73.
- [10] 潘东梅, 王强, 蔡叙东, 等. 断藤益母汤抑制PI3K/AKT通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2051-2055.
- [11] JENSEN E C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2013, 296(3): 378-381.
- [12] CARPENTIER G, BERNDT S, FERRATGE S, et al. Angiogenesis analyzer for ImageJ-a comparative

- morphometric analysis of "endothelial tube formation assay" and "fibrin bead assay" [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1):11568.
- [13] 刘春芳. 抗类风湿性关节炎滑膜血管新生的中药药效评价方法研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2012.
- [14] 郭炜, 刘春芳, 林娜. 类风湿性关节炎滑膜血管新生与中医药[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 308-312.
- [15] 王靖霞. 风湿祛痛胶囊抑制滑膜血管生成治疗类风湿关节炎作用研究[D]. 承德:承德医学院, 2019.
- [16] KOKKONEN H, SÖDERSTRÖM I, ROCKLÖV J, et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2):383-391.
- [17] LEIBOVICH S J, POLVERINI P J, SHEPARD H M, et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha [J]. *Nature*, 1987, 329 (6140):630-632.
- [18] HONORATI M C, NERI S, CATTINI L, et al. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(4):345-352.
- [19] PICKENS S R, CHAMBERLAIN N D, VOLIN M V, et al. Anti-CXCL5 therapy ameliorates IL-17-induced arthritis by decreasing joint vascularization [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(4):443-455.
- [20] SHU Q, AMIN M A, RUTH J H, et al. Suppression of endothelial cell activity by inhibition of TNF α [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2):R88.
- [21] BERSE B, HUNT J A, DIEGEL R J, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1) -induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115(1):176-182.
- [22] 唐希文, 杨莉, 侯昱. 温和艾灸治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎的疗效及对免疫学的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(2):481-485.
- [23] 高秋莲, 梅湘, 陈俞池, 等. 中医药抑制类风湿关节炎血管翳形成的研究概况[J]. *中医药学报*, 2013, 41 (5):94-95.
- [24] MARRELLI A, CIPRIANI P, LIAKOULI V, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10 (10) : 595-598.
- [25] LEBLOND A, PEZET S, CAUVET A, et al. Implication of the deacetylase sirtuin-1 on synovial angiogenesis and persistence of experimental arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(7):891-900.
- [26] SADLER J E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 395-424.
- [27] PATMORE S, DHAMI S, O'SULLIVAN J M. Von Willebrand factor and cancer; metastasis and coagulopathies [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(10): 2444-2456.
- [28] RANDI A M, LAFFAN M A. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues [J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15(1):13-20.
- [29] GLARÍA E, VALLEDOR A F. Roles of CD38 in the immune response to infection [J]. *Cells*, 2020, 10. 3390/cells9010228.
- [30] PARK S, SORENSON C M, SHEIBANI N. PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129 (3) : 217-234.
- [31] CHAQOUR B. Caught between a "Rho" and a hard place: are CCN1/CYR61 and CCN2/CTGF the arbiters of microvascular stiffness? [J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(1):21-29.
- [32] PERBAL B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators [J]. *Lancet*, 2004, 363(9402):62-64.
- [33] ZHU Y, ALMUNTASHIRI S, HAN Y, et al. The roles of CCN1/CYR61 in pulmonary diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):7810.

[责任编辑 周冰冰]