

川芎嗪对大鼠脑微血管内皮细胞迁移及管腔形成的影响

仲米存¹, 苏晓慧², 孔祥英^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察川芎嗪(TMP)对大鼠脑微血管内皮细胞(BMECs)增殖、迁移和管腔形成,及细胞基质衍生因子-1(SDF-1)和血管内皮生长因子(VEGF)的影响。**方法:**选择3~6代的原代分离的BMECs,分别给予TMP(2,10,50 mg·L⁻¹)处理,设为不同浓度TMP组,并设同体积培养基为空白组。采用非放射性细胞增殖检测(MTS)以及溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入法检测TMP对BMECs增殖的影响;采用Transwell法观察TMP对BMECs迁移的作用,通过体外管腔形成实验研究TMP对VEGF诱导的BMECs管腔形成的影响;选用ELISA法检测TMP对BMECs培养上清液中SDF-1和VEGF分泌的调节作用。**结果:**BrdU掺入实验及MTS实验结果提示,与空白组比较,TMP能明显促进BMECs的增殖活性($P < 0.05$, $P < 0.01$);TMP可剂量依赖性增加迁移到Transwell下室的BMECs数量,并提高毛细管管腔形成中管腔分支点的数量。此外,TMP可显著提高BMECs培养上清中SDF-1和VEGF的分泌($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**TMP能有效促进BMECs的增殖、迁移及管腔形成,并显著提高细胞因子SDF-1及VEGF在BMECs中的分泌,这可能是TMP促进血管新生的分子机制之一。

[关键词] 川芎嗪; 迁移; 管腔形成; 细胞基质衍生因子-1; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0103-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060103

Effects of Tetramethylpyrazine on Migration and Tube Formation of BMECs ZHONG Mi-cun¹, SU Xiao-hui², KONG Xiang-ying^{2*}, LIN Na^{1,2*} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medicine University, Beijing 100069, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on the proliferation, migration, tube formation and secretion of the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) from brain microvascular endothelial cells (BMECs). **Method:** Primary isolated BMECs of passage 3 to 6 were used in this experiment. BMECs that treated with TMP (2, 10, 50 mg·L⁻¹) were set as TMP 2, TMP 10 and TMP 50 groups, and that treated with the same volume of medium was regarded as control. Effects of TMP on the proliferation of BMECs were detected by MTS and BrdU incorporation. Impact of TMP on migration of BMECs was observed by Transwell assay. The influence of TMP on tube formation of BMECs induced by VEGF was observed by tube formation *in vitro*. The level of SDF-1 and VEGF in BMECs culture supernatant were examined by ELISA. **Result:** BrdU incorporation and MTS results showed that TMP (2, 10, 50 mg·L⁻¹) can significantly increase the proliferation of BMECs ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TMP can dose-dependently promote BMECs migrate to the lower chamber of Transwell and increase the number of branch points in tube formation. In addition, TMP (2, 10, 50 mg·L⁻¹) can significantly increase the level of SDF-1 and VEGF in cell culture supernatant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** TMP could effectively promote BMECs proliferation, migration and tube formation. Meanwhile, it could increase the secretion of SDF-1 and VEGF from BMECs, which may be part of the mechanism for promoting angiogenesis.

[Key words] tetramethylpyrazine; migration; tube formation; stromal-derived factor-1; vascular endothelial growth factor

[收稿日期] 20141208(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873394);中央级公益性科研院所基本科研业务专项(ZZ070825)

[第一作者] 仲米存,在读硕士,从事中药药理及药性理论研究,Tel:13718030121,E-mail:zhongmicun@126.com

[通讯作者] *孔祥英,博士,副研究员,从事中药药理及药性理论研究,Tel:010-64014411,E-mail:kongxypume@gmail.com;

*林娜,博士,研究员,从事药性理论研究,Tel:010-64014411,E-mail:linna888@163.com

脑缺血后,尽快恢复缺血区的血液供应,对于缺血后神经功能的恢复至关重要。血管新生是改善脑组织血供地有效途径,而血管内皮的增殖、迁移和血管管腔形成是血管新生的主要环节。因此,有效调节血管内皮细胞的生物功能是治疗脑缺血的关键。

川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是川芎药理学活性较显著的生物碱之一,目前可以人工合成。在临床上被广泛用于治疗缺血性心、脑血管疾病,并取得较好的疗效^[1]。既往研究表明其作用机制主要有抗凝血、抗血小板凝集、扩张微血管、改善微循环、保护血管内皮和神经保护等^[2]。但川芎嗪对脑微血管内皮细胞的增殖、迁移以及管腔形成作用如何,尚未见相关报道。本研究以大鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)为研究对象,观察川芎嗪对 BMECs 增殖、迁移及管腔形成的调节作用,同时通过观察对细胞分泌相关因子趋化因子细胞基质衍生因子-1(stromal-derived factor-1, SDF-1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响,初步阐述 TMP 对脑血管新生的调节机制。

1 材料

1.1 动物 3~4 周龄 SD 大鼠,雄性,购自军事医学科学院,清洁级,体重 70~80 g,动物合格证号 SCXK(军)2012-0004。

1.2 药物及试剂 川芎嗪(TMP,中国食品药品检定研究院),DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 NYM1033),FBS(美国 Hyclone 公司,批号 1036489),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号 884758),明胶(美国 Sigma 公司,批号 RN 9000-70-8),II 型胶原酶(美国 Sigma 公司,批号 9001-12-1),溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,美国 Sigma 公司,批号 HMBC4217V),非放射性细胞增殖检测(MTS,美国 Promega 公司,批号 34008),VEGF 和 SDF-1 ELISA 试剂盒(北京鑫方程生物技术有限公司,批号 20140312)。

1.3 仪器 HFsafe-TE1200 型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),HF151UV 型 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司),XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司),MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),BX50 型正置显微镜(日本 Olympus 公司),3K15 型离心机(美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 BMECs 的分离培养 参照文献[3]报道,取大

鼠颈椎脱臼处死后 75% 乙醇消毒,于超净台中打开颅腔,取出全脑,去除小脑、间脑、海马、大脑白质、残余大血管和软脑膜,保留大脑皮质;用虹膜剪将其剪碎,经 II 型胶原酶 37 ℃ 水浴消化后,于 4 ℃,1 800 r·min⁻¹,离心 8 min;弃上清保留底部红色的“微血管层”,接种于预先包被过明胶的培养瓶中,待微血管段充分生长后,换以 DMEM/F12 完全培养基,此后隔天换液。待微血管内皮细胞生长完全融合后,以 0.125% 的胰酶消化传代。

2.2 BrdU 掺入 取第 3~6 代的 BMECs 用 0.125% 胰酶消化成单细胞悬液后,以 8×10^3 个/mL 接种于 96 孔板。加不同浓度 TMP(终质量浓度为 2,10,50 mg·L⁻¹),将加入同体积培养基设为空白组。继续培养 24 h,每孔加 BrdU 20 μL。按照试剂盒操作说明,最后在酶标仪 450 nm 处测吸光度 A。

2.3 MTS 检测 取第 3~6 代的 BMECs 用 0.125% 胰酶消化成单细胞悬液后,以 8×10^3 个/mL 接种于 96 孔板。加不同浓度 TMP(终质量浓度为 2,10,50 mg·L⁻¹),将加入同体积培养基孔设为空白组。24 h 后每孔加 MTS 20 μL,继续培养 1~4 h 后,在酶标仪上测 A,波长为 492 nm。

2.4 BMEC 的迁移 静息 70%~80% 融合的 3~6 代的 BMECs 12 h,消化离心后 DMEM/F12 培养基重悬,接种于 Transwell 上室(密度为 5×10^4 个/孔),同时加 TMP(终质量浓度为 2,10,50 mg·L⁻¹),空白组加等量培养基。下室加 500 μL 培养基。迁移时间 8 h 后用润湿的棉签拭去膜上未迁移的细胞,甲醇(37 ℃ 水浴)固定 10 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min,用正置光学显微镜拍照计数。

2.5 管腔形成 消化生长至 70%~80% 融合的 BMECs,离心后加 DMEM/F12 培养基重悬,接种到基质胶包被 96 孔板中。除空白组外,其他各组分别加入 VEGF 25 μg·L⁻¹ 以诱导管腔的形成,TMP 组分别加入不同浓度含药培养基,VEGF 组加等量培养基。仅加入等体积培养基的设为空白组。37 ℃,5% CO₂ 温箱中孵育 12~16 h,相差显微镜观察细胞形态并拍照,用 Image Pro Plus 6.0 分析系统计数,每个孔 5 个随机选定的视野(50×)下分支点。

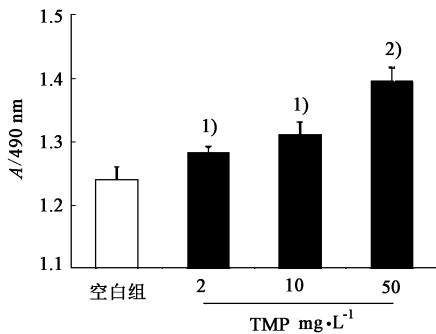
2.6 ELISA 检测 静息 70%~80% 融合的 3~6 代的 BMECs 12 h,消化离心后 DMEM/F12 培养基重悬,以 5×10^4 个/孔的密度接种于 48 孔板中,同时加不同浓度含药培养基 20 μL,空白组加等量培养

基,下室加 500 μL 培养基,迁移时间 8 h 后收集细胞上清液。ELISA 法检测 SDF-1 和 VEGF 的含量,具体操作参照试剂盒说明。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 数据分析软件对实验数据进行统计分析处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析做组间数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 促进 BMECs 的增殖 BrdU 法检测 TMP 可以促进 BMECs 增殖,其作用呈现明显的剂量依赖性。MTS 方法检测 TMP 对 BMECs 细胞增殖活性的影响,MTS 结果显示与 BrdU 掺入法结果基本一致,即 TMP 10, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以显著促进 BMECs 的增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$),见图 1, 2。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2, 表 1 同)

图 1 川芎嗪对 BMECs 增殖的影响 (BrdU, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of TMP on proliferation of BMECs (BrdU, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

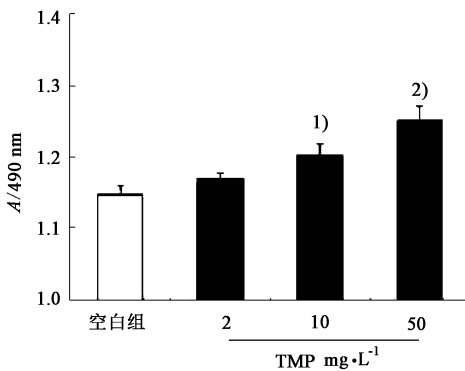
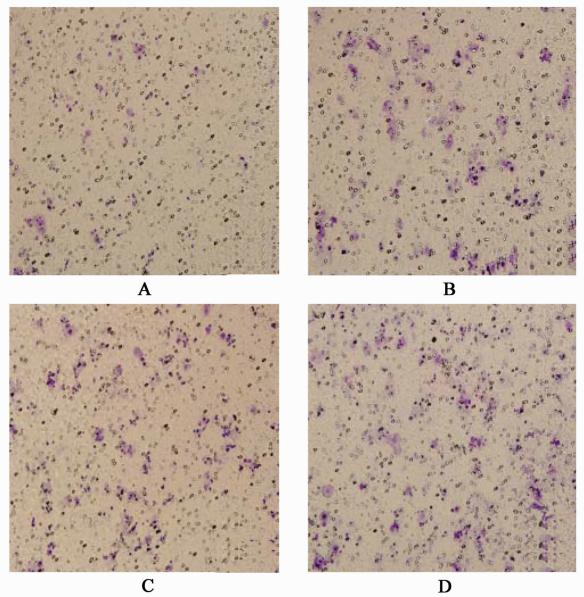


图 2 川芎嗪对 BMECs 增殖活性的影响 (MTS, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of TMP on proliferation of BMECs (MTS, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 增强 BMECs 的迁移 空白组可见少数细胞迁移通过 Transwell, 给予 TMP 后, BMECs 迁移数较空白组明显增多, 并且随 TMP 浓度增大, BMECs 的迁移作用明显增强。显示 TMP 可以显著促进 BMECs 的迁移, 且呈现量效相关性。见图 3。



A. 空白组; B. TMP 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. TMP 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. TMP 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 3 川芎嗪对 BMECs 迁移的影响 ($\times 100$)

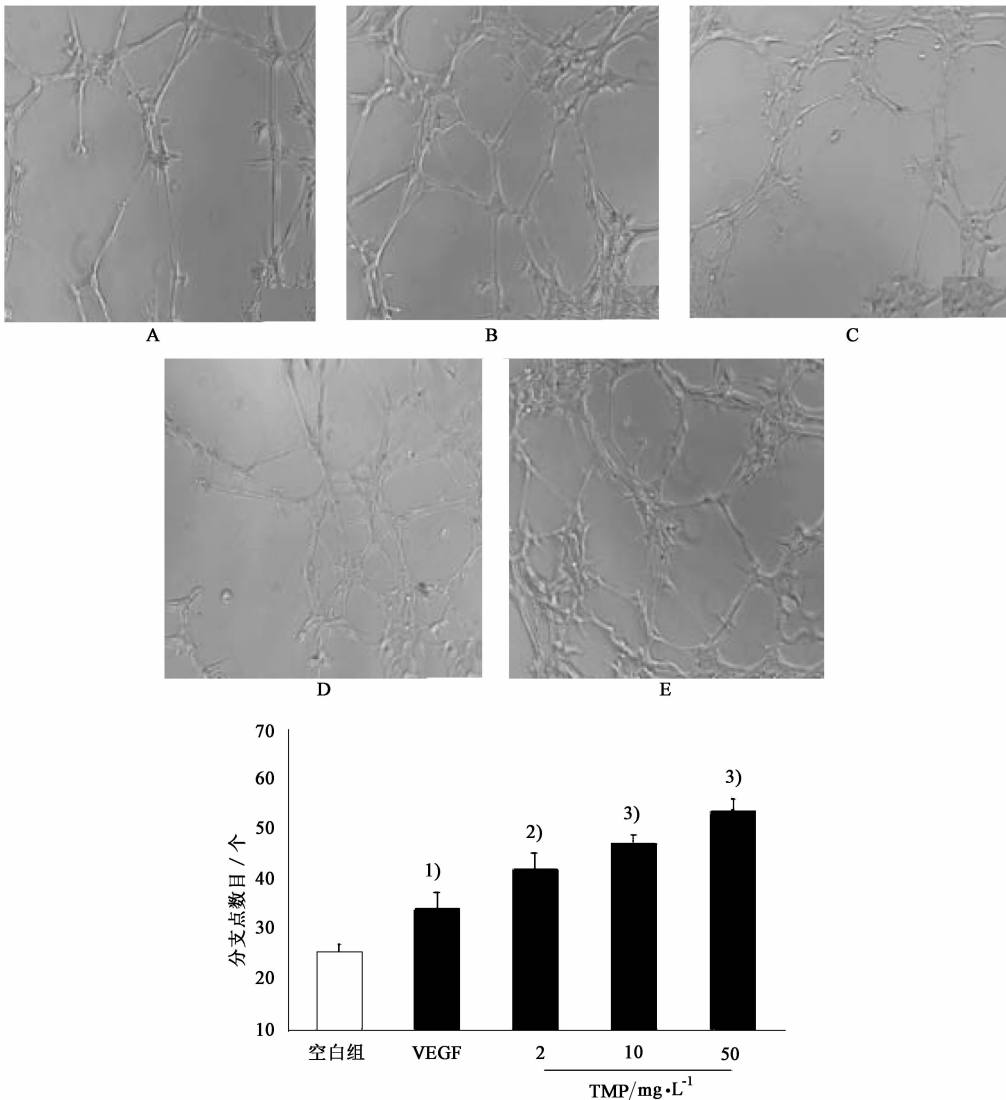
Fig. 3 Effects of TMP on migration of BMECs ($\times 100$)

3.3 促进 BMECs 管腔形成 接种在 Matrigel 上的 BMECs 可形成一定密度的管腔; 与空白组比较, VEGF 组管腔形成显著增多, 表现为管腔分支点明显增多 ($P < 0.05$), 提示 VEGF 诱导可显著增加 BMECs 在 Matrigel 上的管腔形成能力。给予 TMP 后, 可进一步促进管腔形成。TMP (2, 10, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 VEGF 组比较具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4。

3.4 上调培养上清中 SDF-1 和 VEGF 的分泌 培养中的 BMECs 可分泌基础水平的 SDF-1 (3199.1 ± 288.5) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 VEGF (756.2 ± 29.8) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$; 给予 TMP 后, SDF-1 及 VEGF 水平较空白组显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且随着药物浓度增加呈现一定的剂量依赖性, 说明 TMP 作用可显著提高 SDF-1 和 VEGF 在 BMECs 中的分泌水平。见表 1。

4 讨论

脑缺血后, 由于缺血、缺氧引起的神经细胞变性、坏死, 最终导致神经功能的损伤。尽快恢复缺血区的血供, 对脑缺血后的神经功能的恢复至关重要。血管新生可显著改善缺血区周围的组织灌注, 缩小脑梗死体积, 重塑神经结构, 尽可能恢复神经功能, 是改善脑血供的有效途径^[4]。因此促进血管新生是治疗脑缺血的有效方法, 其在脑缺血后修复中的地位日益受到重视。



A. 空白组; B. VEGF 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. TMP 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. TMP 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. TMP 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 VEGF 诱导组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图 4 川芎嗪对 BMECs 管腔形成的影响 ($\times 50$)

Fig. 4 Effects of TMP on tube formation of BMECs ($\times 50$)

表 1 川芎嗪对 BMECs 培养上清中 SDF-1, VEGF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of TMP on SDF-1, VEGF secretion in cultural supernatant of BMECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SDF-1/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	VEGF/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	3 199.1 \pm 288.5	756.2 \pm 29.8
TMP	2	3 225.3 \pm 119.2	785.5 \pm 7.3 ¹⁾
	10	3 606.2 \pm 149.2 ¹⁾	797.2 \pm 17.1 ¹⁾
	50	4 157.9 \pm 317.2 ²⁾	851.0 \pm 26.1 ²⁾

血管新生指新生的毛细血管从已存在血管侧枝中出芽与再塑,包括 3 个连续的环节:①血管舒张,内皮通透性增加,基底膜溶解;②内皮细胞增生、迁

移;③管腔形成,再塑,内皮细胞分化成熟。在正常生理状态下,成年脑的血管系统保持高度的稳定性。一旦发生脑缺血,内皮细胞即开始增殖,并发生迁移,主要在缺血区周围诱导血管新生,增加缺血区氧和能量的供应。因此血管内皮的增殖和迁移,以及后续的管腔形成是血管新生的关键步骤,也是药物调节的主要靶点^[5]。

TMP 是从伞形科藁本属植物川芎中提取的生物碱,即四甲基吡嗪,是川芎的有效成分之一。自 20 世纪 70 年代陈可冀首先将其应用于缺血性中风至今,已有近 40 年的历史。由于 TMP 可透过血脑屏障,通过清除氧自由基、影响内皮素和一氧化氮合成等对中

枢神经系统产生多种作用^[6]。最近的研究表明 TMP 具有内皮保护作用,川芎嗪降低 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 损伤。但 TMP 对脑微血管内皮细胞的增殖、迁移以及管腔形成的作用未见报道。本研究发现 TMP 能显著增强 BMECs 的增殖活性,并促进 BMECs 的迁移,此外还可以提高其体外管腔形成能力。这可能是 TMP 发挥脑缺血保护作用的可能机制之一。

血管内皮细胞的增殖、迁移以及管腔形成受多种调节性分子的影响,其中 SDF-1 及 VEGF 是目前调节细胞迁移以及血管形成的最重要的细胞因子。研究发现,脑血管病患者血清中的 SDF-1 及 VEGF 水平均明显增加^[7-8]。VEGF 是最强的特异性的调节内皮细胞生长和分化的因子,还是内皮细胞的有丝分裂剂^[9]。SDF-1 及其配体 CXCR4 在细胞迁移、增殖、动员及血管形成等过程中起十分重要的作用^[10]。最新研究表明 SDF-1 的受体 CXCR4 可在内皮祖细胞表面高表达^[11],内皮祖细胞可在 SDF-1/CXCR4 轴的调控下增殖、黏附与迁移。此外,SDF-1 还可诱导内皮细胞 VEGF 的过表达来促进血管的新生。本研究发现, TMP 可以显著促进 BMECs 分泌 VEGF 以及 SDF-1,提示 TMP 可能通过提高细胞因子 VEGF 和 SDF-1 的表达,促进 BMECs 的增殖、迁移,进而导致血管生成的增加,最终发挥防治脑血管疾病的作用。

综上所述,本研究结果提示 TMP 有效促进了 BMECs 的增殖,迁移及管腔形成,同时显著提高细胞因子 SDF-1 及 VEGF 在体外培养的 BMECs 中的分泌,这可能是 TMP 对促进血管新生的分子机制之一。相关研究结果为进一步阐明 TMP 在脑血管疾病防治中的机制提供初步的科学依据。

[参考文献]

[1] 钱超. 川芎嗪对心血管的药理作用[J]. 内蒙古中医

药,2014(23):107-108.

- [2] 蒋跃绒,陈可冀. 川芎嗪的心脑血管药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5):707-711.
- [3] Meng F, Liu R, Gao M, et al. Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Brain Res, 2011, 1391:93-101.
- [4] Zadeh Guha A. Angiogenesis in nervous system disorders [J]. Neurosurgery, 2003, 53(6):1362-1366.
- [5] Costa A, Afonso J, Osório C, et al. miR-363-5p regulates endothelial cell properties and their communication with hematopoietic precursor cells[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1):87-93.
- [6] 钟平,杨任民. 中药川芎嗪治疗急性脑缺血机理的实验研究[J]. 实用全科医学, 2003, 1(1):19-20.
- [7] 高岩升,张小明,万传军. 急性脑出血患者血清 VEGF 和 MMP-9 水平的变化及其意义[J]. 中华脑血管病杂志:电子版, 2011, 5(4):15-18.
- [8] Grierson R, Meyer-Rüsenberg B, Kunst F, et al. Endothelial progenitor cells and plasma vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor-1 during ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29(6):530-538.
- [9] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. Endocr Rev, 1997, 18(1):4-25.
- [10] 苏晓慧,孔祥英,林娜. 缺血性脑损伤后内源性神经干细胞迁移机制及中医药的调节作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27):5103-5107.
- [11] ZHANG S, LUO Y. Role of SDF-1/CXCR4 axis in treatment of cerebral ischemia with endothelial progenitor cells [J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2009, 17(10):792-796.

[责任编辑 周冰冰]