

基于 TGF- β_1 /Smad4 信号探讨缺氧条件下补阳还五汤促进新生血管成熟的机制

杨琳, 卢斌, 庞晓丽, 李虎虎, 舒刘芳, 孙英新, 丁娅, 范英昌, 姜希娟*
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:研究在缺氧条件下补阳还五汤通过调控转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)/Smad 蛋白4(drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smad4)基因信号促进新生血管成熟的分子机制。方法:于体外鼠尾胶基质上种植胸主动脉血管段构建新生血管三维培养模型,随机分为正常组,缺氧模型组,辛伐他汀组,补阳还五汤组。缺氧模型组,常氧条件下培养5 d后缺氧24 h,药物治疗组在缺氧同时分别给予辛伐他汀($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和补阳还五汤载药血清(10%),正常组则常氧条件下培养6 d。利用倒置显微镜观察新生血管生长情况,利用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测新生血管培养液中 TGF- β_1 的含量,利用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测新生血管 TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 的表达,利用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测新生血管神经型钙黏蛋白(neural-Cadherin, N-Cadherin)蛋白表达。结果:各实验组结果显示,培养6 d,倒置显微镜下均可观察到新生血管生成,与正常组比较,模型组中存活的新生血管数量减少($P < 0.05$),给予补阳还五汤干预后存活的新生血管数量增多($P < 0.05$);ELISA 结果显示与正常组比较,缺氧模型组 TGF- β_1 含量明显降低($P < 0.01$),给予补阳还五汤干预后 TGF- β_1 含量升高($P < 0.05$);Real-time PCR 结果显示,与正常组比较,模型组 TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达下调($P < 0.05$),经补阳还五汤治疗后 TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达明显上调($P < 0.05$);Western blot 结果显示与正常组比较,模型组 N-Cadherin 蛋白表达下调($p < 0.05$),补阳还五汤干预后 N-Cadherin 蛋白表达上调($P < 0.05$)。结论:在缺氧条件下补阳还五汤促进成熟新生血管形成,其机制与激活 TGF- β_1 /Smad4 信号进而启动下游 N-Cadherin 蛋白合成,形成细胞间紧密连接有关。

[关键词] 新生血管稳定; 补阳还五汤; 缺氧; 转化生长因子- β_1 ; Smad 蛋白4

[中图分类号] R22;R24;R277;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0114-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030114

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1143.030.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:43

Mechanism of Buyang Huanwutang in Promoting Maturation of Neovascularization Under Hypoxia Condition Based on TGF- β_1 /Smad4 Signal

YANG Lin, LU Bin, PANG Xiao-li, LI Hu-hu, SHU Liu-fang, SUN Ying-xin, DING Ya,
FAN Ying-chang, JIANG Xi-juan*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the molecular mechanism of Buyang Huanwutang in promoting the maturation of neovascularization by regulating the signal transduction of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) / drosophila mothers against decapentaplegic protein (Smad4) gene under hypoxia condition. **Method:** The three-dimensional model of vascularization was established by implanting abdominal aorta in Matrigel matrix. There were

[收稿日期] 20170829(010)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81704004);国家自然科学基金面上基金项目(81573733);天津中医药大学中西医结合学院教师科研启动基金项目(ZXYKY201604)

[第一作者] 杨琳, 硕士, 实验师, 从事中医药防治心脑血管疾病的工作, Tel:022-59596284, E-mail: yanglin7809@sina.com

[通信作者] *姜希娟, 博士, 教授, 从事中医药防治心脑血管疾病工作, Tel:022-59596279, E-mail: xijuanjiang@foxmail.com

four groups, namely the normal control group, the hypoxia model group, the Simvastatin treatment group and the Buyang Huanwutang treatment group. After incubation under normoxia condition for 5 days, the model group was given hypoxia intervention for 24 hours, while the treatment groups were respectively given Simvastatin ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and Buyang Huanwutang (10%), and the control group was incubated under normoxia for six days. The growth of neovascularization was observed under inverted microscope. The content of TGF- β_1 in culture medium of neovascularization was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The gene expressions of TGF- β_1 and Smad4 in neovascularization were detected by Real-time PCR. The protein expression of neural-Cadherin (N-Cadherin) was detected by Western blot. **Result:** The results of each experimental group displayed neovascularization under inverted microscope. Compared with the normal group, the number of stable neovascularization was reduced in the model group. After the treatment with Buyang Huanwutang, the number of stable neovascularization was increased, compared with the model group. The results of ELISA showed that the content of TGF- β_1 was significantly decreased ($P < 0.01$) in the model group, compared with the normal group. After the treatment with Buyang Huanwutang, the content of TGF- β_1 was increased ($P < 0.05$), compared with the model group. The results of Real-time PCR indicated that the mRNA expressions of TGF- β_1 and Smad4 in the model group were lower ($P < 0.05$) than those of the normal group. After the treatment with Buyang Huanwutang, the mRNA expressions of TGF- β_1 and Smad4 were higher ($P < 0.05$) than those of the model group. The results of Western blot demonstrated that the protein expression of N-Cadherin was lower ($P < 0.05$) in the model group than that of the normal group. After the treatment with Buyang Huanwutang, the protein expression of N-Cadherin was higher ($P < 0.05$) than that of the model group. **Conclusion:** Buyang Huanwutang could promote the neovascularization under hypoxia condition. Its mechanism is correlated with the activation of TGF- β_1 /Smad4 signal, which then starts the synthesis of downstream protein N-Cadherin and forms the close intercellular junction.

[Key words] stable neovascularization; Buyang Huanwutang; hypoxia; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); drosophila mothers against decapentaplegic protein

脑血管疾病是导致我国中老年人死亡的首要原因,其中以缺血性脑血管病的发病率最高,因其具有发病机制复杂、发病率高、致残致死率高、复发率高等特点^[1],备受医学工作者关注。目前,对缺血性脑血管疾病的治疗,主要从神经保护、抗凝、增加血流量等角度进行^[2-3],然而,治疗效果不尽人意。

缺血性脑血管病使脑组织缺血缺氧,受累神经元变性、坏死,甚至引发严重临床事件。因而,通过血管新生以改善脑组织血液供应,是防治缺血性脑血管疾病的有效手段。所谓血管新生即在原有毛细血管与/或微静脉基础上,通过血管内皮细胞增殖和迁移,以芽生或非芽生(或称套迭)形式生成新的毛细血管^[4]。Liman等^[5]研究表明缺血缺氧可激活内皮细胞芽生,诱导血管新生,发挥一定代偿作用。但这种血管新生则是一把双刃剑,一方面,通过提供氧和营养物质,有助于受损组织修复;然而,另一方面缺氧刺激产生的新生血管结构不成熟,通透性高,易发生血管渗漏,增加脑出血和脑水肿的风险,且易退化,无法实现长期供血。故重塑新生血管,使其结构成熟,是完善血管新生代偿和治疗举措的关键。

中医认为缺血性脑血管病的发生与人体气血津液的失常密切相关,多以气虚血瘀为主。因此,益气活血化瘀为其主要治则。补阳还五汤出自清代王清任的《医林改错》,是益气活血化瘀的代表方,具有活血、化瘀、通络之功效;现代药理学研究发现^[6-7]其具有抗炎、抗凝血、抗动脉粥样硬化、促血管新生的作用。但其在促进新生血管成熟方面尚未见报道。本研究据前期体内研究发现补阳还五汤可促进血管成熟的基础上,针对在体试验很难将细胞与其相应功能准确定位的缺陷,构建体外血管新生三维模型,模拟体内缺氧环境,探讨补阳还五汤促进新生血管成熟的作用靶点。

1 材料

1.1 动物 初断乳雄性SD大鼠,体重约80g;6周龄雄性SD大鼠,体重约200g,均购于中国医学科学院医学实验动物研究所,合格证号SCXK(京)2014-0004,本研究所设计的动物实验符合中国伦理委员会相关动物研究指导原则(编号TCM-LAEC2012011)。

1.2 药物与试剂 补阳还五汤(组成为黄芪120g,

当归 10 g, 川芎 10 g, 赤芍 10 g, 地龙 5 g, 红花 5 g, 桃仁 5 g, 饮片购自北京同仁堂, 经天津中医药大学中药标本馆李天祥教授对上述 7 种药材逐一鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》的标准。鼠尾胶, 辛伐他汀(美国 Sigma 公司, 批号分别为 20170126, s6196); MCDB131, DMEM 培养基(美国 Gibco 公司, 批号 20161126, 20161028); 胎牛血清(以色列 BI 公司, 批号 20160525); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20170306); RNA 试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 批号 P5014); Real-time PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 批号 Q5407); 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国 Cloud-Clone 公司, 批号 20161104); 神经型钙黏蛋白(N-Cadherin)兔抗大鼠多克隆抗体(美国 CST 公司, 批号 4061); trizol(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20161108); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 美国 Abcam 公司, 批号 GR217575-41); TGF- β_1 , Smad 蛋白 4 (Smad4), GAPDH 引物(生工生物工程有限公司, 批号分别为 8405339814-15, 9403687506-07, PRN04)其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 DM3000B 型倒置显微镜(德国 Leica 公司); ENSPINE 型多功能读板机(美国 Perkin Elmer 公司); Veriti96-well 型 PCR 仪(美国 Life 公司); 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Fusion FX5 凝胶成像系统(法国 Vilber 公司); POWERPAC BASIC 型电泳仪, min-subcellget 型垂直电泳槽(美国 Bio-rad 公司); Mini 型转膜仪(中国北京凯元仪器公司); CDI-165M 型三气培养箱(日本 Astec 公司); DL-CJ-2NDI 型超净台(中国北京东联哈尔仪器制造有限公司); DS-11 型核酸微量检测仪(美国 Denovix 公司); ALLEGRA 61R 型低温高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 体外血管新生三维培养模型的构建 参照 ZHU 等^[8]的研究体外构建三维培养血管新生模型。将初断乳 SD 大鼠 7% 水合氯醛(5 mL·kg⁻¹)麻醉后, 75% 乙醇浸泡 10 min, 超净台内快速打开胸腔, 剪开右心耳, 以预冷的 D-hank's 液进行心脏灌流至流出液无色为止, 切取约 1 cm 胸主动脉, 在预冷的 D-hank's 液中除去外膜, 用手术刀切成 1 mm 厚血管环, 置于铺有 pH 7.4 鼠尾胶和 MCDB131 混合培养基基质的 96 孔板内, 37 °C 凝固 20 min 后取出, 在培养物上层再加入混合基质, 37 °C 再次凝固 20 min, 于

上层加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37 °C 5% CO₂ 条件培养 72 h, 倒置显微镜下观察新生血管状态, 用于后续实验。

2.2 分组、缺氧干预及载药血清制备 血管段种植于鼠尾胶混合基质 3 d 后, 随机分为 4 组, 正常组, 常氧条件下正常培养基添加大鼠正常血清常规培养 3 d; 缺氧模型组, 按 2.1 项条件培养 2 d 后, 再缺氧 24 h(5% CO₂, 94% N₂, 1% O₂); 辛伐他汀组, 正常培养基添加 10 μg·L⁻¹ 辛伐他汀, 其余同模型组; 补阳还五汤组, 正常培养基添加 10% 补阳还五汤载药血清, 其余同模型组。补阳还五汤载药血清制备: 参照李水芹等^[9]的药物制备方法, 将雄性 6 周龄 SD 大鼠, 按人和大鼠用药等效剂量换算, 给予补阳还五汤(含生药 10 g·kg⁻¹)浓缩液(含生药 2 g·mL⁻¹)灌胃; 大鼠正常血清制备则给予等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 持续 1 周, 于末次灌胃后 2 h, 腹主动脉无菌取血、分离血清, 灭活后, -20 °C 保存备用。

2.3 新生血管形态学观察 药物干预结束后, 利用倒置显微镜观察各组胸主动脉血管段上的血管新生形态及数量, 调节微调在不同层面, 随机选取 5 个视野(200 倍)计数成管的新生血管数。

2.4 ELISA 检测 TGF- β_1 含量 实验干预结束后, 收集各组鼠尾胶混合基质上层的培养液, 瞬间离心 30 s 后, 采用 ELISA 测定培养液中 TGF- β_1 的含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测 TGF- β_1 /Smad4 mRNA 的表达 采用 trizol 一步法提取胸主动脉血管段及其新生血管的总 RNA。根据逆转录试剂盒操作说明, 进行逆转录合成 cDNA。以其为模板, GAPDH 为内参, TGF- β_1 和 Smad4 相应引物序列见表 1, 按照 20 μL 的反应体系, 行 40 个循环扩增, 扩增条件为 95 °C 变性, 10 s; 60 °C 退火/延伸, 30 s。据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行结果计算。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence list

引物名称	引物序列(5'-3')	序列号	引物长度/bp
TGF- β_1	上游 ATTCCTGGCGTTACCTTGG	59086	39
	下游 AGCCTGTATTCCGTCTCCT		
Smad4	上游 TTTTGCTGGGTCAACTCTC	50554	43
	下游 GGGCTCACGCATATATTTC		

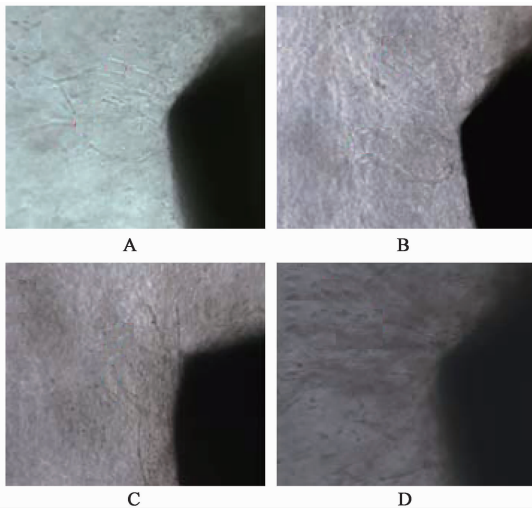
2.6 蛋白免疫印迹法(Westerns blot)检测 N-Cadherin 表达 提取胸主动脉血管段及其新生血管总蛋白, 利用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 均一化。

按照正常组、模型组、辛伐他汀组、补阳还五汤组顺序逐一上样,进行聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳,后转膜加入兔抗大鼠来源的 GAPDH(36 kDa,1:1 000),N-Cadherin(140 kDa,1:1 000)一抗 4 ℃ 过夜,洗膜 3 次后加二抗(羊抗兔来源),显影后,凝胶成像分析系统测定条带的灰度值。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量数据采用表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤载药血清对胸主动脉血管段血管新生的影响 利用倒置显微镜观察培养 6 d 后主动脉血管新生情况。培养 24 h 后,观察到血管段附近出现大量新生血管出芽现象,各组无明显差异。随着培养时间延长,部分新生血管出现退化现象,内皮细胞皱缩,细胞与细胞分离;健存新生血管呈放射管网状向血管段周围爬行,立体感强,呈现相对稳定、成熟状态。计数成管新生血管显示,与正常组比较,模型组健存新生血管数量减少($P < 0.05$);与模型组比较,给予辛伐他汀和补阳还五汤治疗后,稳定存在的新生血管数量增多($P < 0.05$)见图 1,表 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 辛伐他汀组 D. 补阳还五汤组(图 2 同)
图 1 补阳还五汤载药血清对主动脉血管段新生血管的影响(光镜, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang on maturation of neovascularization in aorta blood vessel (light mirror, $\times 100$)

3.2 补阳还五汤载药血清对新生血管分泌 TGF- β_1 的影响 与正常组比较,模型组 TGF- β_1 含量明显降低, ($P < 0.01$);与模型组比较,给予辛伐他汀和补阳还五汤治疗后, TGF- β_1 含量升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 补阳还五汤载药血清对胸主动脉血管段新生血管数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwutang on number of maturation of neovascularization in aorta blood vessel ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	培养 6 d 后新生血管数/根
正常	-	9.33 ± 1.033
模型	-	7.33 ± 1.211 ¹⁾
辛伐他汀	1 × 10 ⁻⁸	9.25 ± 0.880 ³⁾
补阳还五汤	2	9.17 ± 1.472 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

表 3 补阳还五汤载药血清对 TGF- β_1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwutang on content of TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	TGF- β_1 /ng·L ⁻¹
正常	-	52.69 ± 1.440
模型	-	48.69 ± 2.146 ²⁾
辛伐他汀	1 × 10 ⁻⁸	50.934 ± 0.878 ³⁾
补阳还五汤	2	50.93 ± 1.20 ³⁾

3.3 补阳还五汤载药血清对 TGF- β_1 和 Smad4 基因表达的影响 与正常组比较,模型组 TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达下调($P < 0.05$);与模型组比较,辛伐他汀治疗后, TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达上调($P < 0.05$);补阳还五汤治疗后, TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达明显上调,差异有显著性($P < 0.01$)。二者之间无显著性差异。见表 4。

表 4 补阳还五汤载药血清对 TGF- β_1 和 Smad4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang on expression of TGF- β_1 and Smad4 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	TGF- β_1	Smad4
正常	-	1.078 ± 0.234	1.019 ± 0.238
模型	-	0.62 ± 0.148 ¹⁾	0.468 ± 0.105 ¹⁾
辛伐他汀	1 × 10 ⁻⁸	1.016 ± 0.170 ³⁾	0.994 ± 0.200 ³⁾
补阳还五汤	2	1.09 ± 0.091 ⁴⁾	1.052 ± 0.110 ⁴⁾

3.4 补阳还五汤载药血清对 N-Cadherin 蛋白表达影响 与正常组比较,模型组 N-Cadherin 蛋白表达下调,差异有显著性($P < 0.05$);与模型组比较,辛伐他汀和补阳还五汤治疗后, N-Cadherin 蛋白表达

上调,差异有显著性 ($P < 0.05$),见表 5,图 2。

表 5 补阳还五汤载药血清对 N-Cadherin 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang on expression of N-Cadherin proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	质量浓度/ $g \cdot mL^{-1}$	N-Cadherin/GAPDH
正常	-	1.256 \pm 0.315
模型	-	0.972 \pm 0.135 ¹⁾
辛伐他汀	1×10^{-8}	1.151 \pm 0.128 ³⁾
补阳还五汤	2	1.090 \pm 0.104 ³⁾

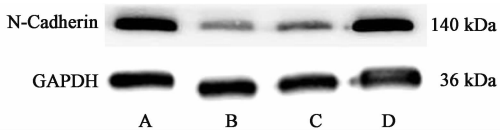


图 2 补阳还五汤载药血清对 N-Cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwutang on expression of N-Cadherin proteins

4 讨论

血管新生是缺血性脑病或心肌梗死等伴发的一种病理性血管新生现象,缺血缺氧是其主要诱发条件。有学者^[10-12]发现此时形成的新生血管的顶细胞处于活跃状态,内皮细胞间以及内皮细胞与血管周围的平滑肌细胞、周细胞之间紧密连接不足,导致血管结构不成熟,血管壁通透性强,易于破裂和退化。由此可见,促进细胞间紧密连接形成是促新生血管成熟的关键。本研究体外构建血管新生模型,在最初 24 h 出现大量新生血管,随着时间推移,新生血管出现退化现象,培养至第 6 天新生血管数明显减少,与 ZHU 等^[8]团队研究结果一致,提示构建体外血管新生模型成功。

新生血管紧密连接的形成需诸多调控因子共同参与,TGF- β_1 /Smad4 信号发挥关键作用。TGF- β_1 是一多功能蛋白在血管新生方面起到重要调节作用。近期研究发现,TGF- β_1 与平滑肌细胞或纤维母细胞的表面受体结合,调控其下游蛋白,尤其是 Smad 的表达。Smad 家族不同成员介导不同的 Smad 信号,其中,TGF- β_1 能够与 Smad4 结合形成复合物,继而转位至细胞核中,与 Smad 相关 DNA 序列结合,调控黏连蛋白、胶原蛋白的转录,使 N-Cadherin 功能蛋白生成,最终形成细胞间紧密连接^[13-15]。本研究发现缺氧条件下,新生血管 TGF- β_1 mRNA 表达下调。其蛋白分泌减少,提示新生血管易发生退化;进一步的研究发现,缺氧亦使 Smad4

mRNA 表达下调,进而导致其下游 N-Cadherin 功能蛋白生成减少,细胞间连接松弛,故而新生血管亦发生退化,随着时间的推移,稳定存在的新生血管数量减少。

中药古方补阳还五汤临床多用于中风后遗症患者,方中重用黄芪,达到益气活血的功效。动物实验发现^[16-21]补阳还五汤可促进脑组织缺血区血管新生,改善血循环供应状态。经细胞实验研究发现其能促进内皮细胞增殖,促血管新生^[22]。本研究利用补阳还五汤的载药鼠血清体外培养血管组织,为避免载药血清的假阳性结果出现,平行设立正常组(给予等量生理盐水灌胃后获得的正常鼠血清),结果显示,经补阳还五汤培养 6 d 后,新生血管 TGF- β_1 mRNA 表达上调,其蛋白分泌增高,提示退化的新生血管减少,稳定存在的新生血管数量增多。深入机制研究发现,在基因层面补阳还五汤亦上调 Smad4 mRNA 表达,启动下游 N-Cadherin 蛋白的表达,促进细胞间紧密连接形成,从而促进新生血管的成熟,减少新生血管退化的发生。

综上所述,本研究发现补阳还五汤可在缺氧条件下,稳定体外三维培养的新生血管。这一过程与促进细胞间紧密连接形成有关,且上述作用可能通过激活 TGF- β_1 /Smad4 信号,进而启动下游 N-Cadherin 蛋白合成来实现。

[参考文献]

[1] 游然,幸敏丽,沈海滔,等.缺血性脑血管疾病的发病机制及治疗药物[J].药学进展,2009,33(6):247-253.

[2] 张雯,宋俊科,杜立达,等.急性脑缺血治疗药物研究进展[J].河北北方学院学报:医学版,2014,4(4):50-58.

[3] Murray C J, Lopez A D. Measuring the global burden of disease[J]. N Engl J Med,2013,369(5):448-457.

[4] 陈杰,周桥.病理学-"十二五"普通高等教育本科国家级规划教材[M].北京:人民卫生出版社,2016:4.

[5] Liman T G, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration[J]. Cerebrovasc Dis,2012,33(5):492-499.

[6] 朱博冉,吴颖昕.补阳还五汤抗动脉粥样硬化机制的研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2017,25(1):99-104.

[7] 黄兴,李艳芬,寇冠军,等.补阳还五汤抗动脉粥样硬化作用机制研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(3):1187-1190.

[8] ZHU W H, Nicosia R F. The thin prep rat aortic ring

- assay; a modified method for the characterization of angiogenesis in whole mounts[J]. *Angiogenesis*, 2002, 5(1/2): 81-86.
- [9] 李水芹,李学君,王飞,等. 补阳还五汤大鼠含药血清对肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smad/ERK 信号通路的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(12): 2436-2439.
- [10] 陆征宇,董强. 脑缺血后神经血管保护机制和损伤机制研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2013, 7(3): 153-159.
- [11] Mario V, CHANG J L, ZHANG H J, et al. Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(18): 3489-3506.
- [12] Alberts M J, Latchaw R E, Jagoda A, et al. Revised and updated recommendations for the establishment of primary stroke centers: a summary statement from the brain attack coalition [J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2651-2665.
- [13] 王进,王莉,杨佳辰,等. Avastin 对小鼠角膜新生血管形成和 TGF β 表达的影响[J]. *解剖科学进展*, 2017, 23(2): 144-147.
- [14] 韩宇英,李光勤. 阿托伐他汀和辛伐他汀在调脂与抗动脉粥样硬化及卒中防治方面的应用进展[J]. *临床合理用药*, 2013, 6(2): 153-155.
- [15] Mercado-Pimentel M E, Runyan R B. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial mesenchymal cell transformation in the embryonic heart [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(123): 146-156.
- [16] 邓常青,邓奕晖,贺福元,等. 补阳还五汤和有效部位组方对沙土鼠脑缺血及再灌注后脑组织 EAA 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2001, 7(6): 24-27.
- [17] 孙明良,施玖龙. 补阳还五汤与瑞代合用对缺血再灌注损伤大鼠保护作用及肠道菌群影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(9): 2274-2278.
- [18] 饶晓,汤轶波,潘彦舒,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血损伤血脑屏障的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(6): 49-52.
- [19] 田兆华,刘柏炎. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(3): 193-198.
- [20] 庞晓丽,杨琳,曾文赞,等. 补阳还五汤对家兔易损斑块内新生血管的影响研究[J]. *天津中医药*, 2015, 32(11): 672-674.
- [21] 叶淑静,孙斯琪,李琳,等. 补阳还五汤含药血清对大鼠微血管内皮细胞增殖和迁移的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2016, 26(10): 887-889.
- [22] 时召平,周晓慧,徐倩,等. 丹皮酚对急性心肌梗死大鼠 Smad2, Smad3, Smad7 mRNA 含量表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 146-150.

[责任编辑 邹晓翠]