

# 桃红四物汤对人脑微血管内皮细胞 OGD 损伤的保护作用及机制

季兆洁, 韩岚, 吴欢茹, 郭栋栋, 彭代银\*

(安徽中医药大学药学院, 现代中药安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**[摘要]** **目的:**通过建立糖氧剥夺(OGD)诱导的人脑微血管内皮细胞(h-BMECs)损伤模型,观察桃红四物汤对细胞的保护作用及机制。**方法:**体外建立人脑微血管内皮细胞糖氧剥夺损伤模型,随机分为正常组、模型组、桃红四物汤高、中、低质量浓度组(0.8, 0.4, 0.2 g·L<sup>-1</sup>)和阳性药尼莫地平组。噻唑蓝(MTT)比色法检测 h-BMECs 细胞活性,酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平、细胞中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内皮细胞血管内皮生长因子(VEGF)和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达水平。**结果:**桃红四物汤可显著提高拟缺血损伤的人脑微血管内皮细胞活性,降低 LDH 漏出率( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),改善细胞形态,降低 MDA 水平( $P < 0.05$ ),增强 SOD 活性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。增加内皮细胞 VEGF 和 HIF- $\alpha$  蛋白的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**桃红四物汤对拟缺血损伤人脑微血管内皮细胞具有保护作用,其机制与增强细胞抗氧化能力,通过 HIF- $\alpha$  途径增强 VEGF 表达有关,显示中药组方可发挥整体调节的治疗优势。

**[关键词]** 桃红四物汤; 人脑微血管内皮细胞; 缺糖缺氧损伤; 氧化应激; 血管内皮生长因子; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R259;R289.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0095-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180627

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1149.005.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-27 10:25

## Protective Effect and Mechanism of Taohong Siwutang on OGD-induced Injury of Human Brain Microvascular Endothelial Cells

JI Zhao-jie, HAN Lan, WU Huan-ru, GUO Dong-dong, PENG Dai-yin\*

(School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicines of Anhui Province, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism that Taohong Siwutang (TST) protects human brain cerebral microvascular endothelial cells (h-BMECs) injury induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). **Method:** The h-BMECs injury models were induced by OGD, and then the cells were randomly divided into six groups: normal control group, model group, TST high, middle and low dose (0.8, 0.4, 0.2 g·L<sup>-1</sup>) groups and nimodipine group. 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) staining was employed to assay the activities of h-BMECs; the content of superoxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA) in cells, and lactate dehydrogenase (LDH) in cell supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and the expression levels of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blot. **Result:** TST could significantly improve the

**[收稿日期]** 20171027(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473387);国家自然科学基金青年基金项目(81503291);安徽中医药大学2016年青年科学研究基金项目(2016qn013)

**[第一作者]** 季兆洁, 硕士, 助教, 从事中药药理研究, Tel: 0551-68129153, E-mail: 13856966893@163.com

**[通信作者]** \* 彭代银, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中药学研究, Tel: 0551-5169189, E-mail: pengdaiyin@163.com

activities of mimic ischemia injured hMBECs, decrease LDH leakage rate, improve the morphology of h-MBECs obviously, reduce MDA level, enhance SOD activity, and up-regulate the protein expression levels of VEGF and HIF- $\alpha$ . **Conclusion:** TST has protective effects on OGD-injured h-BMECs, and its mechanism may be related to enhancing the antioxidant capacity, and up-regulating the expression of VEGF and HIF- $\alpha$ , showing the advantages of compound Chinese medicine in integrative regulation.

[ **Key words** ] Taohong Siwutang ( TST ); brain microvascular endothelial cells; oxygen-glucose deprivation; oxidantive stress; vascular endothelial growth factors; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

缺血性脑血管疾病属于中医“中风”范畴,具有高发病率、高致残率、高死亡率和高复发率等特点,给社会和家庭带来了沉重的负担。近年来研究发现,脑微血管内皮细胞通过释放和合成多种血管活性因子,在维持脑部血管正常结构功能和促进缺血区血管新生过程中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。脑缺血会导致脑微血管内皮细胞功能受损,血管通透性增高,严重破坏血脑屏障,因此改善脑微血管内皮细胞功能逐渐成为缺血性脑损伤防治的新趋势。

桃红四物汤(Taohong Siwutang, TST)出自于清·吴谦所著的《医宗金鉴》,由四物汤加桃仁、红花2味药衍化而成,具有养血活血、祛瘀生新之功效,为中医传统祛瘀生新经典方剂之一<sup>[2]</sup>。现今桃红四物汤被广泛应用于心脑血管疾病的治疗。前期临床研究<sup>[3]</sup>和实验研究发现<sup>[4-6]</sup>,桃红四物汤对脑缺血及缺血状态下的神经功能损伤具有较好的保护作用。本课题组前期研究发现,桃红四物汤能够通过调节神经递质水平,改善血管舒缩与血小板异常,改善血流状态,促进脑部血管新生来实现对缺血性脑损伤的保护作用<sup>[7-8]</sup>。然而其对脑缺血状态下脑微血管内皮细胞的相关作用研究目前尚无报道。

本研究以脑微血管内皮细胞为切入点,采用缺氧(Oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤人脑微血管内皮细胞(human brain cerebral microvascular endothelial cells, h-BMECs)复制缺血性脑血管疾病损伤模型,观察桃红四物汤对细胞活力及细胞形态的影响,探讨桃红四物汤对细胞损伤后氧化应激相关因子超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malonaldehyde, MDA)水平及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )在介导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)增生中的表达的干预作用。以期为临床应用桃红四物汤治疗缺血性脑血管疾病提供更多的实验依据。

## 1 材料

**1.1 药品** 桃红四物汤由桃仁 9 g, 红花 6 g, 熟地

黄 12 g, 白芍 12 g, 当归 10 g, 川芎 8 g 组成, 经 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 h 后, 滤尽药液, 再用 8 倍量 75% 乙醇回流提取 2 h, 合并 2 次提取液, 浓缩制成生药质量浓度选择 1 g·mL<sup>-1</sup> 的提取液, 经 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤除菌后, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。6 味药材均购自北京同仁堂药业有限公司, 并经安徽中医药大学中药与资源教研室杨青山副教授鉴定为正品; 尼莫地平(亚宝药业集团股份有限公司, 批号 150928)。

**1.2 细胞株** 人脑微血管内皮细胞购自于赛齐(上海)生物工程有限公司(纯度 > 97%)。

**1.3 试剂** DMEM 高糖、无糖培养基(Gibco BRL 公司, 批号分别为 11993408, 25063118); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司, 批号 GZE124); 二甲基亚砜(DMSO, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20150329); 噻唑蓝(MTT, Sigma 公司, 批号 MKB06849V); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH), 超氧化物歧化酶(SOD), 丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20150813, 20150927, 20150927);  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体, 辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 ZB2301, 17AV0303); 小鼠抗人 HIF- $\alpha$  抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号 AE120101P); 小鼠抗人 VEGF 抗体(美国 Santa Cruz 公司, 批号 E8562)。

**1.4 仪器** MCO-175 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 SANYO 公司); Proox C21 型三气培养箱(美国 Biospherix 公司); SW-CJ-1F 型洁净工作台(苏净集团安泰公司); XSP-15CE 型倒置显微镜(上海长方光学仪器有限公司); MSS 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司); PL601-S 型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; AF-10 型自动制冰机(意大利 Scotsman 公司); EPS 300 型电泳仪, VE-180 型电泳槽, VE-186 型转膜仪(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 细胞接种于含 10% 胎牛血清及 1% 青、链霉素的高糖 DMEM 培养液中, 在 37  $^{\circ}$ C 5%

CO<sub>2</sub> 条件下进行培养,平均每 2 d 换液 1 次,每 2~3 d 传代 1 次,传代培养至对数生长期备用。

**2.2 人脑微血管内皮细胞 OGD 损伤模型的建立**  
参考文献方法<sup>[9-10]</sup>并有所改进。将培养的人脑微血管内皮细胞密度调整至  $3 \times 10^5$  个/mL。以每孔 1 mL 接种到 6 孔板,或以每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板,细胞培养 24 h 后弃去旧培养基,用预温的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤培养板 2 次,换为无糖 DMEM 培养基。将培养板放置于含 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的三气培养箱中培养 6 h,造成细胞缺糖缺氧损伤。

**2.3 实验分组及干预** MTT 法确定细胞的毒性剂量范围及造模预试确定加药浓度。取长成致密单层的脑微血管内皮细胞,随机分成 6 组,每组 6 个复孔。正常组在制备 OGD 损伤模型时同步换以无血清培养基,于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行正常培养;模型组干预方法如 2.2 项中 OGD 损伤模型的建立所述;桃红四物汤高、中、低剂量组根据前期药物浓度筛选,制备 OGD 模型前 12 h 给予含(0.8, 0.4, 0.2 g·L<sup>-1</sup>)终质量浓度的桃红四物汤培养基,其他处理同模型组;阳性药物尼莫地平组制备 OGD 模型前 12 h 给予终质量浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup> 尼莫地平,其他处理同模型组。造模 6 h 后,倒置显微镜下观察各组细胞形态,并拍照记录。

**2.4 MTT 比色法检测桃红四物汤对 h-BMECs 的作用** 取细胞以  $1 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 96 孔板内,按 2.3 项进行分组给药,经 OGD 损伤后,各组孔中加入 MTT(5 g·L<sup>-1</sup>)溶液 20  $\mu$ L,于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4 h。弃去培养液,加入 DMSO 200  $\mu$ L,振荡 10 min 后,使结晶物充分溶解,并于酶联免疫吸附(ELISA)检测仪 570 nm 波长处检测吸光度 A。

**2.5 LDH 漏出率测定** 采用 96 孔板进行实验。OGD 损伤结束时,吸取细胞上清液,采用 LDH 试剂盒测定 LDH 活性,酶标仪测定 450 nm 处 A,实验操作严格按照说明书进行。

**2.6 ELISA 检测 SOD 活性及 MDA 含量** 造模后,去除培养基,用 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液振荡,使细胞裂解,收集裂解液,按试剂盒说明书方法测定 SOD 活性及 MDA 水平。

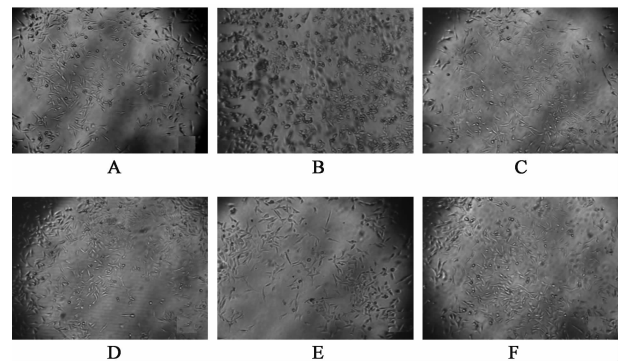
**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测** 各组内皮细胞中 VEGF, HIF-1 $\alpha$  蛋白表达实验结束提取各组人脑微血管内皮细胞蛋白,各组取 30  $\mu$ g 样品蛋白,进行 10% SDS-PAGE(100 V, 3 h)电泳,转入硝酸纤维素膜。应用 5% 的脱脂奶粉(TBST 稀释, pH 7.4)室温封闭硝酸纤维素膜 1 h,加入 1:1 000 稀释

浓度的小鼠抗人 VEGF 多克隆抗体及小鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体,4  $^{\circ}$ C 密封过夜。次日, TBST 振荡洗膜后,应用羊抗小鼠二抗室温孵育 1.5 h, TBST 振荡洗膜后,进行化学发光(ECL)显色,以  $\beta$ -actin 作为内参照,观察蛋白的表达情况,并以 Image J 软件对条带灰度值进行分析。

**2.8 统计学方法** 实验数据采用 SPSS 19.0 统计学软件处理,结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 OGD 损伤的 h-BMECs 细胞形态的影响**  
倒置显微镜观察各组细胞。正常的人脑微血管内皮细胞多呈短梭形或多边形,胞浆丰富,细胞折光性强,呈典型“铺路石”样排列;模型组细胞体积收缩变圆,细胞间间隙扩大,细胞内可见多数暗色颗粒和大小不等的孔泡,折光性下降;桃红四物汤给药组相较于模型组而言,细胞连接更紧密,形态更饱满,说明桃红四物汤能维持脑微血管内皮细胞在缺糖缺氧条件下的正常形态。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C~E. 桃红四物汤高、中、低质量浓度组; F. 尼莫地平组(图 2 同)

图 1 桃红四物汤对 OGD 诱导的人脑微血管内皮细胞的形态学影响(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of TST on morphological changes of h-BMECs injured by oxygen-glucose deprivation(inverted microscope,  $\times 100$ )

**3.2 对 OGD 损伤的 h-BMECs 细胞保护的影响**  
与正常组比较,人脑微血管内皮细胞经 OGD 造模后,其 A 显著降低( $P < 0.01$ ),表明造模条件可靠,造模成功。用药干预后,与模型组比较,桃红四物汤各剂量组均可明显提高细胞存活率( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.3 对各组细胞 LDH 漏出率的影响** 与正常组比较,模型组细胞 LDH 漏出率显著升高( $P < 0.01$ ),表明细胞膜受到了明显的损伤,通透性增加。与模

表 1 桃红四物汤对 OGD 损伤的 h-BMECs 细胞存活, LDH 释放, SOD 活性和 MDA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of TST on cell survival, leakage of LDH, SOD activity, and MDA level in h-BMECs injured by OGD ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	A	LDH/ $U \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常	-	0.936 $\pm$ 0.134	57.57 $\pm$ 6.51	82.26 $\pm$ 5.74	4.36 $\pm$ 0.32
模型	-	0.486 $\pm$ 0.076 <sup>2)</sup>	92.87 $\pm$ 9.29 <sup>2)</sup>	48.31 $\pm$ 7.97 <sup>2)</sup>	5.66 $\pm$ 0.67 <sup>2)</sup>
桃红四物汤	0.8	0.735 $\pm$ 0.045 <sup>4)</sup>	70.85 $\pm$ 6.66 <sup>4)</sup>	69.11 $\pm$ 10.36 <sup>4)</sup>	4.54 $\pm$ 0.57 <sup>3)</sup>
	0.4	0.691 $\pm$ 0.039 <sup>4)</sup>	77.22 $\pm$ 8.03 <sup>3)</sup>	57.93 $\pm$ 6.23 <sup>3)</sup>	4.83 $\pm$ 0.69
	0.2	0.599 $\pm$ 0.071 <sup>3)</sup>	80.97 $\pm$ 6.92 <sup>3)</sup>	55.19 $\pm$ 7.47	5.58 $\pm$ 0.87
尼莫地平	0.2	0.773 $\pm$ 0.047 <sup>3)</sup>	63.52 $\pm$ 10.33 <sup>4)</sup>	76.56 $\pm$ 9.12 <sup>4)</sup>	4.49 $\pm$ 0.49 <sup>4)</sup>

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

型组比较,桃红四物汤高、中、低剂量组及尼莫地平组 LDH 漏出率显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

**3.4 对 OGD 损伤的 h-BMECs 的 SOD 活性和 MDA 水平的影响** OGD 损伤造成细胞内 SOD 活性降低,MDA 水平显著增加 ( $P < 0.01$ ),显示 h-BMECs 清除氧自由基的能力下降。桃红四物汤高剂量组能明显降低细胞内 MDA 水平 ( $P < 0.05$ ),桃红四物汤高、中剂量组可明显增加 SOD 活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

**3.5 对 OGD 损伤内皮细胞 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  表达的影响** 正常人脑微血管内皮细胞 VEGF 及 HIF-1 $\alpha$  有微量表达,OGD 损伤后 2 种蛋白的表达均明显增加 ( $P < 0.01$ );药物干预后,与模型组比较,桃红四物汤 3 个剂量组均可显著增强人脑微血管内皮细胞中 VEGF 与 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2,表 2。

表 2 桃红四物汤对拟缺血损伤 h-BMECs 中 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of TST on expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in h-BMECs induced by OGD injury ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	VEGF/ $\beta$ -actin
正常	-	0.082 $\pm$ 0.006	0.174 $\pm$ 0.024
模型	-	0.403 $\pm$ 0.057 <sup>2)</sup>	0.391 $\pm$ 0.058 <sup>2)</sup>
桃红四物汤	0.8	0.887 $\pm$ 0.081 <sup>4)</sup>	0.914 $\pm$ 0.095 <sup>4)</sup>
	0.4	0.621 $\pm$ 0.065 <sup>4)</sup>	0.738 $\pm$ 0.082 <sup>4)</sup>
	0.2	0.550 $\pm$ 0.064 <sup>3)</sup>	0.686 $\pm$ 0.020 <sup>4)</sup>
尼莫地平	0.2	0.803 $\pm$ 0.084 <sup>4)</sup>	0.927 $\pm$ 0.036 <sup>4)</sup>

微血管内皮细胞是血脑屏障主要构成细胞之一,它能够限制可溶性物质和细胞等从血液进入大脑,并且在调节机体内环境的稳定、维持正常生理和免疫功能、以及介导脑病的发生、发展和转归等方面都发挥着重要的作用<sup>[15]</sup>。在缺血缺氧条件下,脑微血管内皮细胞通过释放和合成多种血管活性因子,在血管自稳态的调节中发挥着重要的作用。因此,对 h-BMECs 损伤机制及保护措施进行深入研究有重要的临床意义。

桃红四物汤是活血化瘀、祛瘀生新的代表之方。课题组前期研究表明,桃红四物汤能够通过改善血管舒缩与血小板聚集异常,扩张脑血管,促进缺血区域的血管新生来改善缺血性损伤大鼠脑梗死情况<sup>[16]</sup>。提示桃红四物汤可能作用于脑微血管内皮细胞,从而达到干预缺血性损伤的作用。本实验采用三气培养箱结合无糖培养基模拟脑缺血损伤状态,进行研究桃红四物汤对离体的缺糖缺氧细胞模型的保护作用。MTT 广泛用于检测细胞存活和增殖,结果显示,OGD 损伤可引起细胞活性显著降低,与各剂量组桃红四物汤共同孵育后细胞活性显著增强,细胞形态得到明显改善。LDH 是反映细胞损伤

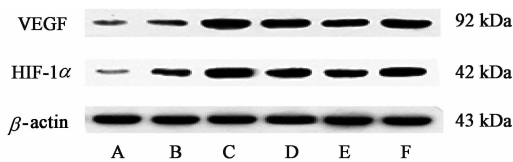


图 2 桃红四物汤对 OGD 损伤细胞 VEGF, HIF-1 $\alpha$  蛋白表达电泳  
Fig. 2 Effect of TST on protein levels of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in OGD treated h-BMECs detected by Western blot analysis

#### 4 讨论

缺血性脑血管疾病因其较高的发病率、死亡率、致残率及复发率严重影响着患者的生存质量,且目前尚无有效的治疗方法。现代研究发现,脑缺血导致大量脑神经元发生不可逆性的变性坏死,出现严重的神经功能缺失<sup>[11]</sup>。如能及早促进局部新生血管形成恢复血流再灌注,挽救半影区濒临死亡的神细胞,对于缺血性脑卒中具有重大意义<sup>[12-14]</sup>。脑

的重要指标,当细胞损伤后,LDH 由细胞内溢出,导致其释放增加。桃红四物汤可以明显减少 OGD 损伤 h-BMECs LDH 的释放。以上结果共同表明桃红四物汤可以保护 OGD 对 h-BMECs 的损伤作用。

脑缺血过程中可使细胞产生大量自由基,过量自由基是细胞脂质过氧化的主要机制,是导致细胞损伤的重要原因<sup>[17]</sup>。SOD 与 MDA 是反映过氧化损伤的重要指标。MDA 是脂质过氧化反应的最终产物,性质稳定,其含量的高低可反映细胞受氧自由基攻击而损伤的严重程度;SOD 是体内超氧阴离子自由基清除剂和催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解的酶,它通过歧化方式清除自由基而显示出抗氧化损伤的作用,其活性的高低间接反映了组织细胞清除氧自由基的能力<sup>[18]</sup>。本实验结果显示,桃红四物汤能维持缺糖缺氧状态下细胞的正常形态,明显抑制 MDA 的产生,增强胞内 SOD 活性,具有明显的抗氧化作用,说桃红四物汤可以上调细胞内氧化防御系统的活性,减少氧自由基的产生,清除自由基,从而保护细胞免受氧化应激损伤。

现代研究发现,脑缺血后尽早促进局部新生血管形成,恢复血流再灌注对于增加脑缺血区血液灌注量和限制缺血半影区面积的扩散具有积极作用<sup>[19]</sup>。血管新生受多种激酶和生长因子的调节,VEGF 是公认的血管生成过程中极为重要的血管发生和血管形成过程中调控因子,在血管发生和形成过程中起着中枢性的调控作用<sup>[20]</sup>。VEGF 的表达受多种因素的调控,其中缺氧是迄今为止所发现的最强的调节因子。HIF-1 $\alpha$  作为调节氧稳态的核心转录因子在低氧条件下通过促 VEGF 基因转录,在调节组织新生血管的生成中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。本研究中,探讨了桃红四物汤能否通过上调 HIF- $\alpha$  从而达到促进 VEGF 的表达。实验结果表明,OGD 诱导体外培养的人脑微血管内皮细胞损伤后,模型组内皮细胞中 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达均显著增加,表明缺糖缺氧损伤可反馈性诱导血管内皮细胞中二者的表达,与前期文献报道一致<sup>[22]</sup>。而桃红四物汤干预过的血管内皮细胞中 HIF-1 $\alpha$  的分泌和蛋白表达增加,VEGF 蛋白表达更加明显,说明桃红四物汤在一定意义上提高了人脑微血管耐缺氧能力,HIF-1 $\alpha$  对于 VEGF 上调作用,可能是通过 HIF-1 $\alpha$  通路促进 VEGF 的表达,促进缺血区域的血管新生,从而减轻脑组织损伤。

本实验结果显示,桃红四物汤能维持缺糖缺氧状态下细胞的正常形态,改善缺糖缺氧损伤所致的

人脑微血管内皮细胞的生存活性,降低模型细胞 LDH 的漏出率,降低 MDA 的产生,显著增强胞内 SOD 活性,说明桃红四物汤可以上调细胞内氧化防御系统的活性,减少氧自由基的产生,从而保护细胞免受氧化应激所伤。同时,本实验发现桃红四物汤能促进损伤状态下 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 蛋白表达,提示桃红四物汤在一定意义上提高了内皮细胞耐缺氧能力,促进血管新生。本实验为全面深入阐明桃红四物汤改善脑缺血的作用机制奠定基础,也为今后临床应用桃红四物汤治疗和预防缺血性脑血管疾病提供科学依据。但要充分阐明其作用机制仍需要进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] YU Q J, TAO H, WANG X, et al. Targeting brain microvascular endothelial cells; a therapeutic approach to neuroprotection against stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2015,10(11):1882-1891.
- [2] 刘立,段金璇,宿树兰,等.用于妇科血瘀证痛经的四物汤类方——桃红四物汤的研究进展[J].*中国中药杂志*,2015,40(5):814-821.
- [3] 周渭.桃红四物汤临床应用概述[J].*实用中医药杂志*,2014,30(1):81-83.
- [4] 陈刚领,李亚,胡瑞芸,等.桃红四物汤防治缺血性中风作用研究[J].*中药药理与临床*,2014,30(1):13-16.
- [5] LI L, YANG N, NIN L, et al. Chinese herbal medicine formula Tao Hong Si Wu decoction protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt and the Nrf2 signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2014, 69(1):76-85.
- [6] WU C J, CHEN J T, YEN T L, et al. Neuroprotection by the traditional Chinese medicine, Tao-Hong-Si-Wu-Tang, against middle cerebral artery occlusion-induced cerebral ischemia in rats [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2011, doi: 10.1155/2011/803015.
- [7] HAN L, JI Z J, CHEN W D, et al. Protective effects of Tao-Hong-Si-Wu decoction on memory impairment and hippocampal damage in animal model of vascular dementia [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, doi: 10.1155/2015/195835.
- [8] 韩岚,季兆洁,陈卫东,等.桃红四物汤含药血清对缺糖缺氧损伤 PC12 细胞的保护作用[J].*安徽中医药大学学报*,2016,35(1):63-67.
- [9] 徐海波,邢志军,李志宏,等.黄芩苷对无糖复合低氧致人脑微血管内皮细胞损伤的保护作用[J].*中国应用生理学杂志*,2013,29(5):433-436.

- [10] 李卫红,王东坡,李兴广,等. 通络救脑注射液及其有效成分对拟缺血损伤人脑微血管内皮细胞的保护作用[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(6): 42-46.
- [11] ZHANG Z G, Chopp M. Promoting brain remodeling to aid in stroke recovery[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(9): 543-548.
- [12] 谭峰,莫新民. 缺血性脑血管病血管新生的研究概况[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(4): 76-77, 80.
- [13] Ohab J J, Fleming S, Blesch A, et al. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke [J]. J Neurosci, 2006, 26(50): 13007-13016.
- [14] XIONG Y, ZHANG Y, Mahmood A, et al. Investigational agents for treatment of traumatic brain injury [J]. Expert Opin Inv Drug, 2015, 24(6): 743-760.
- [15] Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier [J]. Cell Tissue Res, 2014, 355(3): 687-699.
- [16] 王飞龙,韩岚,樊玲,等. 桃红四物汤对实验性脑缺血大鼠血清中 ET-1, Ang-1, VEGF 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 101-106.
- [17] 张茜珊,李娟娟,吴春云. 脑缺血的损伤机制及相关信号通路的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(6): 729-732.
- [18] 宫健伟,叶蕾,张秀丽,等. 地黄饮子对脑缺血再灌注模型大鼠血清、脑组织 SOD, CAT 和 GSH-Px 及 MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 247-250.
- [19] 丁利静,石京山,李菲,等. 缺血性脑损伤治疗新策略:促进血管新生和神经再生[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(6): 426-432.
- [20] Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar C R, et al. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases [J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(8): 439-454.
- [21] 朱国献,谭毅华,李涛. HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 基因促进大鼠缺血组织血管新生的实验研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(18): 1-4.
- [22] 杜旌畅,谢晓芳,熊亮,等. 藜蘆内酯预处理对糖氧剥夺-复糖氧损伤血管内皮细胞活性及 NO/NOS 与 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、Tubulin 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 31-35.

[责任编辑 邹晓翠]