

丹参注射液对大鼠脊髓损伤后低氧诱导因子-1 α 及血管内皮生长因子表达的影响

刘杨, 高玉亭, 苗宇船*
(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**观察丹参注射液对大鼠脊髓损伤(SCI)后低氧诱导因子(HIF)-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨其参与脊髓损伤修复的机制。**方法:**选取 50 只 SD 大鼠(SPF 级)建立 Allens' 重力打击 SCI 模型(正常组除外)后,随机分为正常组、模型组、丹参治疗组、丹参加雷帕霉素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组(每组 10 只)。正常组常规饲养,其余实验组均按 1 mL \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹剂量分别腹腔注射生理盐水、丹参注射液、丹参注射液(含雷帕霉素 3 mg \cdot kg⁻¹)和尾静脉注射甲泼尼龙琥珀酸钠溶液 30 g \cdot L⁻¹。伤后 1,3,7,14 d 时采用联合行为评分法(CBS)评价大鼠脊髓神经功能恢复情况。伤后 14 d 处死动物,采用免疫组化染色和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各实验组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达差异。**结果:**SCI 后 14 d,与正常组比较,模型组大鼠 CBS 评分升高,HIF-1 α 和 VEGF 表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,丹参治疗组 CBS 评分降低,HIF-1 α 和 VEGF 表达升高($P < 0.05$);与丹参治疗组比较,丹参加雷帕霉素组 CBS 评分升高,而 HIF-1 α 和 VEGF 表达降低($P < 0.05$);上述指标在丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组之间的差异不具有统计学意义。**结论:**丹参注射液可通过调节 HIF-1 α 和 VEGF 的表达从而参与脊髓的损伤修复。

[关键词] 脊髓损伤;丹参注射液;低氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;雷帕霉素

[中图分类号] R285.5;R274.9;R289.5;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0110-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180629

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1149.003.html>

[网络出版时间] 2017-12-27 11:01

Effects of Danshen Injection on Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor in Rats with Spinal Cord Injury

LIU Yang, GAO Yu-ting, MIAO Yu-chuan*
(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Danshen injection on promoting spinal cord functional recovery by observing the expression of hypoxia inducible factor (HIF) -1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats with spinal cord injury (SCI). **Method:** Fifty SD rats were selected and divided randomly into normal control group, model group, Danshen injection treatment group, Danshen injection + rapamycin group and methylprednisolone sodium group ($n = 10$ in each group). The rats in normal group were fed normally, and all the rats in other groups received 1 mL \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ normal saline, Danshen injection, Danshen injection (including rapamycin 3 mg \cdot kg⁻¹) by intraperitoneal injection and methylprednisolone sodium solution by tail vein injection. The combine behavioral score (CBS) was used on 1, 3, 7, 14 d after SCI to evaluate the recovery of spinal nerve function in rats. All theses rats were killed on 14 d after SCI, and the expression levels of HIF-1 α and VEGF were detected with immunohistochemical staining method and Western blot technique. **Result:**

[收稿日期] 20171012(016)

[基金项目] 山西中医学院博士科研启动基金项目(2014)

[第一作者] 刘杨,博士,副教授,从事脊髓损伤的机制及中西医结合治疗研究,Tel:0351-3179702,E-mail:syf2004@163.com

[通信作者] *苗宇船,博士,教授,从事脊髓损伤的机制及中西医结合治疗研究,Tel:0351-3179702,E-mail:mych65@163.com

14 d after SCI, as compared with the normal control group, the CBS and expression levels of HIF-1 α and VEGF were elevated in the model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the CBS was declined and the expression levels of HIF-1 α and VEGF were elevated in Danshen injection treatment group ($P < 0.05$). As compared with the Danshen injection treatment group, the CBS was elevated and the expression levels of HIF-1 α and VEGF were declined in Danshen injection + rapamycin group ($P < 0.05$). The differences of these indicators were not statistically significant between Danshen injection treatment group and methylprednisolone sodium group.

Conclusion: Danshen injection could promote the recovery of nerve function after SCI by regulating the expression of HIF-1 α and VEGF.

[Key words] spinal cord injury; Danshen injection; hypoxia inducible factor (HIF) -1 α ; vascular endothelial growth factor; rapamycin

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种发生率很高的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤, 多由外伤造成。流行病学资料显示, SCI 的世界年发病率为 (3.6 ~ 195.4) 例/百万人口, 男女比例为 3.8:1^[1]。SCI 发生后, 损伤局部组织的继发性缺血缺氧可在原发性损伤的基础上进一步加重对脊髓结构和功能的破坏, 是引发脊髓神经功能障碍的主要原因之一^[2]。中药丹参在中医学中被认为具有活血、祛瘀、养血、安神的功效, 而现代药理学也发现其具有改善损伤局部组织微循环的作用^[3]。前期研究发现, 丹参注射液可以有效改善 SCI 大鼠的脊髓神经功能^[4], 但其作用机制是否与改善损伤局部的缺血缺氧环境有关, 目前尚缺少相关实验依据。因此, 本文拟通过观察丹参注射液对 SCI 大鼠脊髓组织中低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达变化的影响, 从而对丹参注射液改善脊髓损伤局部组织缺氧环境的效果及其作用机制进行探讨, 为丹参注射液的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 (200 \pm 20) g, 由中国食品药品检定研究所提供, 合格证号 SCXK(京)2014-0013。本实验已获山西中医药大学实验动物伦理委员会批准, 大鼠在本实验室经 1 周适应性饲养后方可开始实验。

1.2 药物与试剂 丹参注射液 (四川升和药业股份有限公司, 批号 Z51021303, 2 g \cdot mL⁻¹); 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 (比利时 Pfizer Manufacturing Belgium NV 公司, 批号 H201320301); 雷帕霉素 [爱必信 (上海) 生物科技有限公司, 批号 abs810030a]; HIF-1 α 单克隆抗体, VEGF 单克隆抗体, β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分

别为 sc-13515, sc-81670, sc-47778); 免疫组化 SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 SP9001, PAB180021); RIPA 组织细胞裂解液, BCA 试剂盒, HRP-标记羊抗小鼠 IgG (海斯信生物科技有限公司, 批号分别为 PAB180006, PAB180007, PAB160013); ECL 超敏发光液 (北京普利莱基因技术有限公司, 批号 P1010); 其他相关生化试剂或耗材均购自 Sigma 公司和北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器 RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); CX41 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司); DFC295-IMS 型图象分析系统 (上海研吉生物科技有限公司); MK3 型酶标仪 (芬兰 Thermo 公司); 5424 R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Mini protean 3 cell 型电泳仪, Mini Trans-Blot[®] Cell 小型转印槽 (美国 Bio-Rad 公司); CBIO-Gel Pro 全自动电泳凝胶成像系统 (北京赛百奥科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型建立 参照文献 [5] 的方法建立 Allens' WD (weight drop) SCI 模型, 大鼠术前禁食禁饮 12 h, 3% 戊巴比妥钠 (30 mg \cdot kg⁻¹) 腹腔注射麻醉后俯卧位固定, 分离背部皮肤、肌肉及 T12 ~ L1 棘突和椎板, 暴露硬脊膜。将自制打击装置的冲击通道垂直置于 T13 节段脊髓之上, 并将一弧形塑料垫片覆盖于该阶段脊髓 (以保证打击受力均匀)。5 g 的冲击杆沿冲击通道自 10 cm 高度打击 T13 节段脊髓。模型建立成功标准为打击后大鼠立刻出现躯体痉挛性颤动及尾巴摆动, 双下肢呈回缩样扑动; 麻醉苏醒后大鼠双下肢呈弛缓性瘫痪, 并伴有排尿功能障碍。建模成功后, 大鼠常规饲养, 定时按摩膀胱辅助排尿, 腹腔注射青霉素 (100 U \cdot d⁻¹) 以预防感染。

2.2 分组处理 大鼠随机分为正常组、模型组、丹

参治疗组、丹参加雷帕霉素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组(每组 10 只)。实验动物处理及给药方式和剂量参照参考文献[4]进行。正常组,常规饲养;模型组,腹腔注射生理盐水 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (生药 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);丹参治疗组,腹腔注射丹参注射液 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;丹参加雷帕霉素组,腹腔注射丹参注射液 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (其中含雷帕霉素 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);甲泼尼龙琥珀酸钠组,将甲泼尼龙琥珀酸钠常规配制成 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液后,按 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 尾静脉推注(以降低甲泼尼龙琥珀酸钠的不良不良反应)。至术后 14 d 处死动物,无菌、低温条件下提取 T13 节段脊髓组织,部分 4% 多聚甲醛内固定,部分液氮保存。

2.3 脊髓神经功能评定 采用联合行为评分法 (combine behavioral score, CBS), 分别于术前及术后 1, 3, 7, 14 d 评定大鼠脊髓神经功能。CBS 评分方法参照文献[6]进行, 主要包括斜坡试验、脚趾伸展能力、端正体位能力、开放空间中运动能力、回缩反应能力、触地反应能力和游泳实验等, 正常者为 0 分, 全瘫者为 100 分, 采用双盲法, 最后取其均值。

2.4 免疫组化 (immunohistochemical, IHC) 检测 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数 脊髓组织经常规石蜡包埋切片, 微波修复抗原及封闭血清室温封闭后, 分别加入 1:500 稀释的 HIF-1 α 单克隆抗体和 VEGF 单克隆抗体孵育过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$ 保湿盒内), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min 后, 按照免疫组化 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒说明书要求加入相关试剂, 中性树脂封片, Olympus 显微镜拍照, 采用 IMS 图象分析系统计算各实验组 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数 (每张切片随机选取 5 各高倍视野, 计算阳性表达细胞的总个数)。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HIF-1 α

和 VEGF 的表达量 取脊髓组织 0.5 g 冰上研磨后, 加入组织细胞快速裂解液 1 mL, 反应 10 min 后, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000 \times g$, 离心 15 min, 上清液采用 BCA 法进行蛋白质定量 (总蛋白 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 (浓缩胶 80 V, 40 min, 分离胶 120 V, 50 min) 分离蛋白质, 湿转法转移蛋白质 (90 V, 50 min)。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后分别加入 1:1 000 稀释的 HIF-1 α 单克隆抗体和 VEGF 单克隆抗体 (4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上过夜), TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min 后加入 1:1 000 稀释的 HRP-标记羊抗小鼠 IgG (室温 1 h, 摇床上进行), TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 ECL 超敏发光液暗室内曝光, 胶片结果输入电脑后, 采用 IMS 图象分析系统分别计算 HIF-1 α , VEGF 与 β -actin 条带灰度值的比值, 作为其各自的相对表达量。

2.6 统计学分析 所得计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 并使用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参注射液对大鼠 CBS 评分的影响 伤后 1 d 时, 与正常组比较, 其余实验组评分均升高 ($P < 0.05$), 各给药组组间比较, 评分差异不具有统计学意义, 表明各实验组大鼠均遗留相同程度的脊髓神经功能障碍, 具有一致性, 模型建立成功; 至伤后 14 d 时, 与正常组比较, 模型组评分显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹参治疗组评分降低 ($P < 0.05$); 与丹参治疗组比较, 丹参加雷帕霉素组评分升高 ($P < 0.05$); 丹参治疗组与甲泼尼龙琥珀酸钠组比较, 两组评分差异不均具有统计学意义。结果显示, 丹参治疗组大鼠的脊髓神经功能恢复情况优于模型组, 而丹参加雷帕霉素组大鼠的恢复情况显著差于丹参治疗组。见表 1。

表 1 参注射液对大鼠 CBS 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	伤前	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 7 d	伤后 14 d
正常	-	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
模型	-	0.0 \pm 0.0	90.2 \pm 10.1 ¹⁾	82.1 \pm 9.2 ¹⁾	68.2 \pm 8.8 ¹⁾	50.8 \pm 6.1 ¹⁾
丹参注射液	2	0.0 \pm 0.0	89.4 \pm 11.0 ¹⁾	76.2 \pm 8.1 ¹⁾	48.1 \pm 7.7 ^{1,2,3)}	35.6 \pm 6.5 ^{1,2,3)}
甲泼尼龙琥珀酸钠	0.03	0.0 \pm 0.0	90.0 \pm 9.6 ¹⁾	74.1 \pm 8.9 ¹⁾	44.3 \pm 7.1 ^{1,2,3)}	34.8 \pm 6.2 ^{1,2,3)}
丹参加雷帕霉素	2 (含雷帕霉素 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	0.0 \pm 0.0	91.1 \pm 11.7 ¹⁾	88.1 \pm 10.5 ¹⁾	79.6 \pm 10.1 ¹⁾	60.3 \pm 7.2 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与丹参加雷帕霉素组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同)。

3.2 丹参注射液对大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数的影响 在正常组大鼠脊髓组织内, 可见少

量的 HIF-1 α 免疫阳性细胞和 VEGF 免疫阳性细胞 (以神经元为主); SCI 后 14 d 时, 与正常组比较, 模

型组大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数均有不同程度的升高(以神经胶质细胞为主)($P < 0.05$);与模型组比较,丹参治疗组 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数显著升高(以神经胶质细胞为主)($P < 0.05$);与丹参治疗组比较,丹参加雷帕霉素组 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数显著降低(以神经胶质细胞为主)($P < 0.05$)。丹参治疗组与甲泼尼龙琥珀酸钠组比较,HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数差异不具有统计学意义。见表 2,图 1。

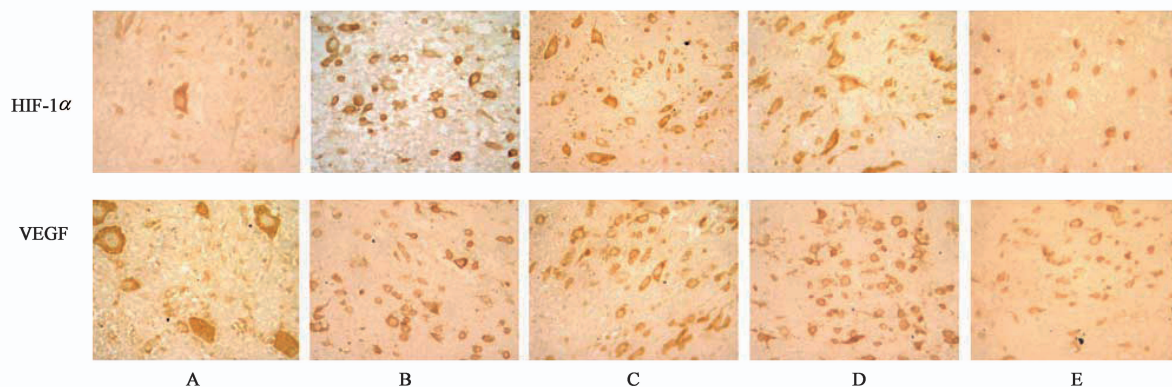
3.3 丹参注射液对大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达的影响 在正常组大鼠,可见少量的 HIF-1 α 及 VEGF 表达;SCI 后 14 d 时,与正常组比较,模型组大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 的相对表达量均升高($P < 0.05$);与模型组比较,丹参治疗组 HIF-1 α 和 VEGF 的相对表达量升高($P < 0.05$);与丹参治疗组比较,丹参加雷帕霉素组 HIF-1 α 和 VEGF 的相对表达量

表 2 丹参注射液对大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Danshen injection on immunes histochemistry positive cells number of HIF-1 α and VEGF in all experiment groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HIF-1 α	VEGF
正常	-	4.1 \pm 1.7	16.7 \pm 3.2
模型	-	56.1 \pm 7.1 ¹⁾	82.1 \pm 13.2 ¹⁾
丹参注射液	2	134.4 \pm 21.2 ^{1,2,3)}	154.7 \pm 23.2 ^{1,2,3)}
甲泼尼龙琥珀酸钠	0.03	142.7 \pm 19.2 ^{1,2,3)}	167.1 \pm 30.7 ^{1,2,3)}
丹参加雷帕霉素	2(含雷帕霉素 3 mg·kg ⁻¹)	62.1 \pm 6.8 ¹⁾	70.1 \pm 16.5 ¹⁾

降低($P < 0.05$)。丹参治疗组与甲泼尼龙琥珀酸钠组比较,HIF-1 α 和 VEGF 的相对表达量差异不具有统计学意义。见表 3,图 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 丹参注射液组;D. 甲泼尼龙琥珀酸钠组;E. 丹参加雷帕霉素组(图 2 同)

图 1 丹参注射液对各实验组大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 免疫阳性细胞数的影响(IHC, $\times 400$)

Fig.1 Effect of Danshen injection on immunes histochemistry positive cells number of HIF-1 α and VEGF in all experiment groups (IHC, $\times 400$)

表 3 丹参注射液对大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Danshen injection on relative expression quantity of HIF-1 α and VEGF in all experiment groups($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HIF-1 α / β -actin	VEGF/ β -actin
正常	-	0.041 \pm 0.011	0.238 \pm 0.056
模型	-	0.532 \pm 0.035 ¹⁾	0.467 \pm 0.079 ¹⁾
丹参注射液	2	0.853 \pm 0.098 ^{1,2,3)}	0.749 \pm 0.131 ^{1,2,3)}
甲泼尼龙琥珀酸钠	0.03	0.899 \pm 0.108 ^{1,2,3)}	0.781 \pm 0.146 ^{1,2,3)}
丹参加雷帕霉素	2(含雷帕霉素 3 mg·kg ⁻¹)	0.525 \pm 0.022 ¹⁾	0.438 \pm 0.089 ¹⁾

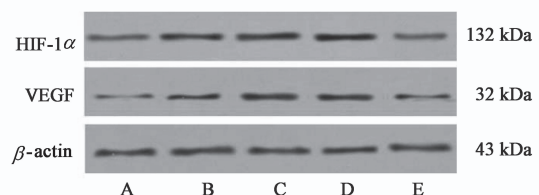


图 2 丹参注射液对各实验组大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 相对表达电泳
Fig.2 Effect of Danshen injection on relative expression quantity of HIF-1 α and VEGF in all experiment groups

坏死和神经纤维断裂,同时还会引起一系列脊髓血管病变,如血管破裂、血管内血栓形成,以及血管痉挛等,造成脊髓血流量(spinal cord blood flow, SCBF)的下降,从而导致继发性缺血缺氧损伤的发生,从而加重 SCI 患者的神经功能障碍^[2]。因此,如何能够促进损伤局部组织内的新生血管的形成,增

4 讨论

SCI 发生后,原发性损伤不但可以引起神经元

加 SCBF,改善损伤局部的缺氧环境,可以作为一个能够有效促进 SCI 损伤后神经组织修复的治疗手段。

HIF-1 属于 bHLH-PAS(basic Helix Loop Helix-Per/ARNT/AhR/Sim) 转录因子家族成员,由 120 kDa 的 HIF-1 α 亚基(属调节活性的功能亚单位)和 91 ~ 94 kDa 的 HIF-1 β 亚基(属构建型表达)以异源二聚体的形式构成。在常氧情况下,HIF-1 α 通过泛素-蛋白酶体途径降解,低氧时该酶途径受到抑制,HIF-1 α 与 HIF-1 β 形成 HIF-1 复合体,后者与靶基因的低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)中的 HIF-1 结合点结合,引起一系列细胞对低氧的反应,提高组织细胞对缺氧环境的适应性^[7]。VEGF 是一种是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在血管内皮细胞发生损伤时,抑制其凋亡,并对其产生强烈的促增殖作用,从而促进新生血管形成,改善损伤局部缺血缺氧的状态,促进损伤的修复愈合^[8]。二者在各种组织损伤中的缺氧调节中起着关键性作用。有研究发现,大鼠 SCI 后,伴随着损伤节段脊髓组织内 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平升高,大鼠脊髓神经功能可得到显著改善,提示 HIF-1 α 和 VEGF 通过抑制继发性缺血缺氧损伤的发生发展,从而在 SCI 后神经功能恢复的过程中发挥重要作用^[9-10]。

丹参为多年生唇形科 Labiatae 鼠尾草属植物,在祖国医学中被认为具有活血祛瘀,养血安神,凉血消肿的功效。有研究发现,SCI 早期应用大剂量丹参治疗后,采用多通道激光多普勒血流仪检测,发现患者损伤节段脊髓的 SCBF 显著增加,并且随着 SCBF 的升高,患者的脊髓神经功能得以明显改善^[11-12]。本次实验结果也显示,与 SCI 模型组比较,丹参治疗组大鼠的 CBS 评分显著降低,表明经丹参注射液治疗后,大鼠脊髓神经功能得以明显改善。同时,与 SCI 模型组比较,丹参治疗组大鼠脊髓组织内 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平显著升高,表明丹参注射液可以诱导 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,而 HIF-1 α 和 VEGF 表达升高后,可以发挥重要的缺氧调节作用,从而改善脊髓损伤局部的缺血缺氧环境,促进神经功能的恢复。

此外,本实验结果显示,对于丹参加雷帕霉素组大鼠,在同时给与雷帕霉素[磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 信号转导通路的特异性阻断剂]后,与丹参治疗组比较,该实验组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平显著降低,并且 CBS 评

分显著升高,表明在阻断上述信号转导通路后,伴随着 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平的下降,丹参注射液在缺氧环境下的促进脊髓神经功能恢复的作用明显减弱。前期研究发现,丹参注射液可以升高 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路的活性^[4],因此,分析认为丹参注射液诱导 HIF-1 α 和 VEGF 表达升高的生物学机制可能与上述信号转导通路有关。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是膜受体信号向细胞内转导的一条重要途径,广泛存在于各种神经细胞中,具有调节细胞增殖、分化、代谢以及抗细胞凋亡的作用^[13]。而 HIF-1 α 和 VEGF 均是 PI3K/Akt/mTOR 信号通路下游重要的靶分子,在缺氧环境下,mTOR 可通过调节 p70S6K,eIF4E 及 4E-BP 的磷酸化,诱导 HIF-1 α 和 VEGF 基因的转录调节,从而发挥缺氧条件下的低氧保护作用以及促进血管内皮细胞增殖和血管生成作用^[14]。并且已有实验证明,PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 HIF-1 α 和 VEGF 的诱导作用可以被该信号通路的特异性抑制剂雷帕霉素所阻断^[15]。但上述假设尚需进一步的实验予以证明。

综上所述,丹参注射液可通过调节 HIF-1 α 和 VEGF 基因的转录和表达,从而发挥对脊髓神经组织的缺氧保护作用,参与 SCI 后神经功能恢复的过程。

[参考文献]

- [1] Jazayeri S B, Beygi S, Shokraneh F, et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review [J]. *Eur Spine J*, 2015, 24(5):905-918.
- [2] Sinescu C, Popa F, Grigorean V T, et al. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury [J]. *J Med Life*, 2010, 3(3):254-261.
- [3] LI Y H, WANG F Y, FENG C Q, et al. Studies on the active constituents in radix salviae miltiorrhizae and their protective effects on cerebral ischemia reperfusion injury and its mechanism [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(41):69-73.
- [4] 刘杨,高玉亭,苗宇船. 丹参注射液对大鼠脊髓损伤后 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性及后肢运动功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(14):152-157.
- [5] TIAN D S, JING J H, QIAN J, et al. Effect of oscillating electrical field stimulation on motor function recovery and myelin regeneration after spinal cord injury in rats [J]. *J Phys Ther Sci*, 2016, 28(5):1465-1471.
- [6] 殷铭,徐又佳. 大鼠脊髓损伤后 CBS 和 BBB 评分比

- 较研究 [J]. 中国血液流变学杂志, 2012, 22(3): 398-400.
- [7] Lee J W, Bae S H, Jeong J W, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(1): 1-12.
- [8] LONG H Q, LI G S, CHENG X, et al. Role of hypoxia-induced VEGF in blood-spinal cord barrier disruption in chronic spinal cord injury [J]. *Chin J Traumatol*, 2015, 18(5):293-295.
- [9] CHEN H, LI J, LIANG S, et al. Effect of hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor signaling pathway on spinal cord injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3):861-866.
- [10] WU K, ZHOU K, WANG Y, et al. Stabilization of HIF-1 α by FG-4592 promotes functional recovery and neural protection in experimental spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2016, 1632(17):19-26.
- [11] 王钢,蔡青,刘世清,等. 早期大剂量应用丹参对急性
颈髓损伤患者血液流变性的影响 [J]. *微循环学杂志*, 2009, 19(4):61-62.
- [12] 胡俊勇,刘世敬,杨远良,等. 丹参对大鼠脊髓损伤后脊髓血流量及运动功能的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(6):167-169.
- [13] Brunet A, Datta S R, Greenberg M E. Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(3): 297-305.
- [14] YANG Y, CONG H, HAN C, et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibits the expression of VEGF and HIF-1 α in MCF-7 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 1755-1760.
- [15] WANG W, JIA W D, XU G L, et al. Antitumoral activity of rapamycin mediated through inhibition of HIF-1 α and VEGF in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(10): 2128-2136.

[责任编辑 邹晓翠]