

通窍活血汤含药脑脊液对 OGD/R 损伤大鼠 BMECs 的保护作用

戴纪恒¹, 吴思鹏¹, 汪宁^{1,2*}, 王艳^{1,2}, 吴倩^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012;

2. 安徽省中医药科学院中药药效与安全性评价研究所, 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] 目的:探讨通窍活血汤含药脑脊液对氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤大鼠脑微血管内皮细胞(BMECs)的保护作用及潜在机制。方法:通过酶消化法提取原代 BMECs,并将细胞随机分为6组,分别为正常组,OGD/R组,通窍活血汤(TQHXT)组(20%),尼莫地平(NMDP)组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),卡博替尼(BMS)组($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和合用药组。除正常组外,其余各组细胞在氧糖剥夺2 h后迅速复糖复氧24 h进行 OGD/R 造模并分组给药。采用细胞免疫荧光染色法鉴定 BMECs,观察 OGD/R 损伤大鼠 BMECs 的形态学和超微结构改变并检测细胞跨膜电阻(TEER)值变化。用试剂盒检测细胞内一氧化氮(NO)水平、乳酸脱氢酶(LDH)活性、活性氧(ROS)荧光强度和组织型纤溶酶原激活因子(tPA)含量。采用流式细胞术检测细胞内钙离子浓度及细胞凋亡,观察血管新生标记因子 CD34 的表达,用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中紧密连接蛋白(ZO-1),血管内皮生长因子(VEGF),黏着斑激酶(FAK)和 Paxillin 蛋白的表达情况。结果:与正常组比较,OGD/R 组细胞皱缩、变圆,细胞 TEER 值和细胞中 ZO-1 蛋白表达显著降低,细胞中 NO, LDH 及 ROS 水平显著升高, tPA 含量显著降低,细胞中钙离子浓度和细胞凋亡显著增加,细胞中 CD34 有所表达, VEGF, FAK 和 Paxillin 蛋白表达显著升高($P<0.01$);与 OGD/R 组比较, TQHXT 组细胞损伤明显改善,细胞 TEER 值和细胞中 ZO-1 蛋白表达显著升高,细胞中 NO, LDH 及 ROS 含量显著降低, tPA 含量显著升高,细胞中钙离子浓度和细胞凋亡显著减少,细胞中 CD34 表达增加, VEGF, FAK 和 Paxillin 蛋白表达显著升高($P<0.05, P<0.01$)。结论:通窍活血汤含药脑脊液对 OGD/R 损伤大鼠 BMECs 具有保护作用,该保护作用可能是通过 VEGF/VEGF 受体 2(R_2)/FAK/Paxillin 信号通路促进血管生成来发挥作用。

[关键词] 通窍活血汤;含药脑脊液;氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R);脑微血管内皮细胞(BMECs);血管新生因子

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0042-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201405

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200428.1229.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-28 13:20

Protective Effect of Cerebrospinal Fluid Containing Tongqiao Huoxuetang on Brain Microvascular Endothelial Cells from Rats with Oxygen Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury

DAI Ji-heng¹, WU Si-peng¹, WANG Ning^{1,2*}, WANG Yan^{1,2}, WU Qian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula of Anhui Province, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Key Laboratory of Xin'an Medicine under Ministry of Education, Institute for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of cerebrospinal fluid containing Tongqiao

[收稿日期] 20200106(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773933)

[第一作者] 戴纪恒, 硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 1215587216@qq.com

[通信作者] *汪宁, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及药理学研究, Tel: 0551-68129186, E-mail: wnscl123@163.com

Huoxuetang (TQHXT) on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced brain microvascular endothelial cells (BMECs), in order to explore the underlying mechanisms. **Method:** Primary BMECs were extracted by enzymatic digestion, and the cells were randomly divided into six groups: the normal control group, the OGD/R group, the TQHXT group (20%), the nimodipine (NMDP) group ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the cabozanix group ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and the combination group. Except for the normal control group, the cells in the other groups were rapidly reoxygenated for 24 h after 2 h of oxygen-glucose deprivation, the OGD/R modeling was performed, and the rats were administered with drugs by groups. BMECs were identified by cell immunofluorescence staining, morphological and ultrastructural changes of OGD/R-induced BMECs were observed, and changes in cell transmembrane resistance (TEER) were detected. The levels of nitric oxide (NO), the activity of lactate dehydrogenase (LDH), the fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) and the content of tissue-type plasminogen activator (tPA) were measured with kits. Intracellular Ca^{2+} concentration and cell apoptosis were detected by flow cytometry, and the expression of CD34 was observed. The protein expressions of zonula occluden-1 (ZO-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), adhesion kinase (FAK), and Paxillin were detected by Western blot. **Result:** Compared with the normal control group, the cells in the OGD/R group were shrinking and rounded, TEER value and ZO-1 protein expression in cells were significantly decreased, the contents of NO, LDH and ROS in cells were significantly increased, the content of tPA was significantly decreased, the concentration of Ca^{2+} and the apoptosis in the cells were significantly increased, CD34 was expressed in cells, and the protein expressions of VEGF, FAK and Paxillin were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the OGD/R group, cell damage in the TQHXT group was significantly improved, the TEER value and ZO-1 protein expression in cells were significantly increased, the contents of NO, LDH and ROS in cells were significantly reduced, the content of tPA was significantly increased, the concentration of Ca^{2+} and the apoptosis in the cells were significantly reduced, CD34 expression increased in cells, and the protein expressions of VEGF, FAK and Paxillin were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** CSF containing TQHXT protects BMECs from OGD/R injury possibly by promoting angiogenesis through the VEGF-VEGFR₂/FAK/Paxillin signaling pathway.

[Key words] Tongqiao Huoxuetang; cerebrospinal fluid; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; brain microvascular endothelial cells; angiogenesis factor

由于中枢神经系统的再生能力有限,脑血管疾病已成为世界范围内死亡和残疾的主要原因^[1]。脑卒中又称脑血管意外,其中缺血性脑卒中占卒中总病例的80%^[2]。缺血性脑卒中的损伤程度与缺血程度有关,然而与缺血性脑卒中相关的临床研究表明,恢复大脑的血液供应会导致再灌注损伤^[3]。当脑缺血发生时,血脑屏障(BBB)的通透性会增加,脑组织微环境稳态会被破坏^[4-5]。脑微血管内皮细胞(BMECs)作为BBB的主要组成部分之一,在维持BBB的完整性方面发挥着至关重要的作用^[6]。因此,保护BMECs免受氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤的研究对于临床治疗缺血性脑卒中有重要意义。目前,国内外对脑卒中的研究主要集中在通过药物治疗和手术治疗改善脑缺血区血流供应,增强神经保护和减少脑梗死体积等方面,但治疗效果并不理想。血管新生是指在原有的血管结构上

生长、重组并形成新的成熟血管网的生物学过程^[7]。临床研究表明,缺血性脑卒中后的内源性血管新生可以增加缺血区脑组织的氧供和营养物质输送,从而挽救濒危的缺氧组织^[8]。因此,刺激血管新生可能是治疗缺血性脑卒中的一种新的有效方法。

通窍活血汤(TQHXT)出自《医林改错》,是清代名医王清任创立的一种广泛应用于脑血管疾病治疗的中药经典方剂,主要由麝香、川芎、红花、赤芍、桃仁、葱、大枣等中药组成,具有活血祛瘀,通络开窍之功效。课题组长期从事于TQHXT的药效物质基础及药理学研究^[9-17],前期采用高效液相色谱法建立了TQHXT的指纹图谱^[12],为TQHXT的质量控制提供了依据。此外,前期的研究表明,TQHXT通过降低BBB的通透性来保护脑缺血性损伤,并且在大鼠的脑脊液中检测到了麝香酮、藁本内酯和羟基红花黄色素A这些有效成分^[14]。药理实验证实了

这些化合物在体外对 OGD 诱导的 BMECs 具有保护作用^[15-16]。因此,本实验采用 BMECs 的体外 OGD/R 模型,探讨 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 损伤大鼠 BMECs 的保护作用及潜在机制,以期为 TQHXT 的进一步研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,体质量(240±20) g 及新生 SD 大鼠(3~7 日龄)购自安徽医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(皖)2011-002。所有动物实验均经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 TQHXT 由麝香、川芎、红花、赤芍、桃仁、葱、大枣 7 味中药组成,均购自合肥和义堂中药饮片有限责任公司,经安徽中医药大学刘守金教授鉴定均为正品;尼莫地平注射液(NMDP,德国 Bayer 公司,批号 990118);卡博替尼(BMS,美国 MedChemExpress 公司,批号 849217-68-1);II 型胶原酶, DNase I,牛血清白蛋白(BSA)(美国 Sigma 公司,批号分别为 C6885, D5025, A7030);胶原酶/分散酶(瑞士 Roche 公司,批号 11488501);总一氧化氮(NO),乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性,活性氧(ROS),增强型细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒,Fluo-3AM 钙离子荧光探针, FITC 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L), Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(碧云天生物技术研究,批号分别为 S0023, C0016, S0033, C0042, S1056, A0568, A0516);大鼠 tPA 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 E-EL-R0747C);Hoechst 33258 染色试剂(美国 Sigma 公司,批号 B2833);FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD Biosciences 公司,批号 7312712);VWF(C-12)抗体,血管内皮生长因子(VEGF)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-365712, sc-57496);紧密连接蛋白(ZO-1),黏着斑激酶(FAK),桩蛋白(Paxillin)CD34 抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab96587, ab40794, ab32084, ab81289); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司,批号分别为 TA-09, ZDR-5307)。

1.3 仪器 371 型 CO₂ 培养箱, Heracell VIOS160i 型 CO₂ 培养箱, D-37520 型低温高速冷冻离心机, 1500 型全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);PROOX C21 型控制器(美国 BioSpherix 公司);TDL-5 型飞鸽台式离心机(上海安亭科学仪器厂);

Countstar 型细胞计数仪(艾利特国际有限公司);BHWY-100BC 型恒温振荡培养箱(常州杰博森仪器有限公司);SW-CJ 型洁净工作台(苏净集团安泰公司);TS-1 型水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Milli-Q Direct 8/16 型纯水/超纯水一体化系统, Millicell-ERS2 细胞电阻仪(美国 Millipore 公司);XB-70 型制冰机(南京先欧仪器制造有限公司);XSP-15CE 型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司);JEM-1230 型透射电子显微镜(日本 Hitachi Limited 公司);DMI4000B 型荧光显微镜(德国 Leica 公司);MiniProtean 型电泳仪, Miniblot 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Amersham Imager 600 型凝胶成像系统(美国 General Electric 公司);Cytomics FC 500 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 TQHXT 含药脑脊液的制备 参照课题组前期 TQHXT 的提取方法^[17],称取原方 10 倍量的 TQHXT(麝香 1.5 g,川芎 30 g,红花 90 g,赤芍 30 g,桃仁 90 g,葱 30 g,大枣 50 g)于圆底烧瓶中,加入 70% 乙醇回流提取后,将滤液浓缩至含生药质量浓度为 2 g·mL⁻¹。将 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,以 6 g·kg⁻¹ 的剂量每天 2 次进行灌胃给药,持续给药 4 d,参照文献[18]于末次灌胃给药后 1.5 h,以 3.5% 水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,提取脑脊液。在无菌操作台上将大鼠脑脊液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,并在 -20 °C 条件下保存备用。

2.2 BMECs 的原代分离与培养 参照课题组前期从新生 SD 大鼠中分离出 BMECs^[19]的方法,将新生的 SD 大鼠脑灰质部分剪切成约 1 mm³ 的组织块并匀浆至 15 mL 离心管中,静置分层后吸出管中上清液,并加入含 DNase I (30 U·mL⁻¹)的 0.1% II 型胶原酶。吹打消化 15 min 后,在 4 °C 条件下以 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 并保留底部沉淀。再加入 20% BSA 3 mL 吹打纯化 5 min,然后在 4 °C 条件下以 1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 并保留底部沉淀。接着加入含 DNase I (20 U·mL⁻¹)的 0.1% 胶原酶/分散酶 3 mL 再次消化 10 min,然后在 4 °C 条件下以 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 并保留底部沉淀。最后,加入新鲜培养基制备细胞悬液并接种到预先涂有 1% 明胶的培养瓶中,在 37 °C 5% CO₂ 的常氧恒温培养箱中培养。在倒置生物显微镜下观察 BMECs 的生长状况,当细胞融合达到 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞进行传代培养,并将第 3 代细胞用于

后续实验。

2.3 OGD/R模型的建立 基于课题组前期研究,建立了BMECs的OGD/R模型^[16]。将第3代BMECs用PBS漂洗2次后,加入无糖的DMEM培养基,并置于预先调试好的37℃恒温缺氧小室(95%N₂,5%CO₂)2h。随后用高糖培养基替代无糖DMEM培养基,并在37℃5%CO₂的常氧恒温培养箱中复糖复氧24h。

2.4 实验分组及给药 为了研究TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs的保护作用,将细胞随机分为4组,分别为正常组(含20%空白脑脊液),OGD/R组(OGD/R+20%空白脑脊液),TQHXT组(OGD/R+20%TQHXT含药脑脊液)和NMDP组(10μmol·L⁻¹,OGD/R+NMDP+20%空白脑脊液)。为了进一步研究TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs的保护机制,将细胞随机分为5组,分别为正常组,OGD/R组,TQHXT组,BMS组(1μmol·L⁻¹,OGD/R+BMS+20%空白脑脊液)和合用药组(OGD/R+BMS+20%TQHXT含药脑脊液)。除正常组外,其余各组细胞均进行OGD/R造模,并分组给药。

2.5 细胞活力测定 将细胞以每孔2×10⁴个细胞接种到96孔板中,根据分组分别造模和给药后,按照增强型CCK-8试剂盒的检测说明书进行实验操作。在酶标仪450nm波长处测量各组的吸光度A,取3次重复实验的平均值并按如下公式计算细胞活力。
细胞活力=(A_{实验组}-A_{阴性组})/(A_{空白组}-A_{阴性组})×100%。

2.6 细胞形态学与超微结构变化的观察 将细胞以每孔2×10⁵个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,在倒置生物显微镜下观察并拍摄细胞的形态学变化。接着用2.5%戊二醛固定细胞30min并将细胞漂洗后在室温下与1%OsO₄一起孵育1h,然后将细胞在不同浓度梯度的乙醇中脱水并包埋在Epon 812树脂中,用枸橼酸铅染色后使用透射电子显微镜观察并拍摄细胞的超微结构变化。

2.7 细胞跨膜电阻(TEER)值的测定 将细胞以每孔1×10⁵个细胞接种到24孔transwell小室中,根据分组分别造模和给药后,通过Millicell-ERS2仪测定各组单层细胞在不同时间点(0,3,6,12,24h)的TEER值并比较各组TEER值的变化。

2.8 细胞上清液中NO水平检测 将细胞以每孔2×10⁵个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各组细胞上清液并按照总NO检测试剂盒说明书进行实验操作。在酶标仪540nm波长

处测量各组的A,并根据标准品曲线计算出样品中NO的浓度。

2.9 细胞上清液中LDH活性检测 将细胞以每孔2×10⁴个细胞接种到96孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各孔细胞上清液并按照LDH细胞毒性检测试剂盒的说明书进行实验操作。在酶标仪490nm波长处检测各孔A,并通过标准曲线相应公式计算出样品中LDH的酶活性。

2.10 流式细胞术检测细胞内ROS荧光强度 将细胞以每孔1×10⁶个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各组细胞并按照ROS检测试剂盒的说明书进行实验操作,用流式细胞仪在488nm激发波长和525nm发射波长下实时检测ROS的荧光强度。

2.11 细胞上清液中tPA含量检测 将细胞以每孔2×10⁵个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各组细胞上清液并按照大鼠tPA酶联免疫吸附测定试剂盒的说明书进行实验操作。在酶标仪450nm波长处测量各组的A,并通过绘制标准曲线计算出样品中tPA的浓度。

2.12 Hoechst 33258染色观察细胞凋亡情况 将细胞以每孔2×10⁵个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,在室温下用4%多聚甲醛固定细胞30min,再将细胞漂洗后用Hoechst 33258染色并孵育15min,通过荧光显微镜观察染色的细胞并拍照。

2.13 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞以每孔1×10⁶个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各组细胞并按照FITC Annexin V细胞凋亡检测试剂盒的说明书进行实验操作。用流式细胞仪检测各组细胞凋亡并通过Flow Jo 7.6软件分析细胞凋亡率。

2.14 流式细胞术检测细胞内Ca²⁺水平 将细胞以每孔1×10⁶个细胞接种到6孔板中,根据分组分别造模和给药后,收集各组细胞并按照Fluo-3AM钙离子荧光探针的使用说明进行实验操作。用流式细胞仪检测Ca²⁺荧光强度并通过Flow Jo 7.6软件进行分析。

2.15 免疫荧光分析

2.15.1 BMECs的原代细胞鉴定 采用血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原的免疫荧光染色法来鉴定BMECs。将第3代BMECs以每孔2×10⁵个细胞接种到24孔板中,待细胞融合至80%时,在室温下用预冷的4%多聚甲醛固定细胞20min并用磷酸盐缓

冲液(PBS)漂洗。随后加入0.5% Triton X-100透化15 min,用PBS漂洗后,加入山羊血清并在37℃恒温振荡培养箱中封闭30 min。吸弃山羊血清,在孔中加入VWF抗体(1:200)并于4℃条件下孵育过夜。次日取出24孔板,吸弃VWF抗体,用PBS漂洗后,在避光条件下,加入FITC标记的山羊抗小鼠二抗(1:500)并在37℃恒温振荡培养箱中孵育1 h。吸弃二抗,用PBS漂洗后加入含DAPI的抗荧光淬灭封片液,随后在荧光显微镜下观察细胞并拍照。

2.15.2 采用细胞免疫荧光染色法检测BMECs中血管新生标记因子CD34的表达 将细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种到24孔板中,根据分组分别造模和给药。参照前面VIII因子相关抗原免疫荧光染色法的实验步骤,各组分别加入CD34抗体(1:200)和Cy3标记的山羊抗兔二抗(1:500)后,在荧光显微镜下观察细胞并拍照。

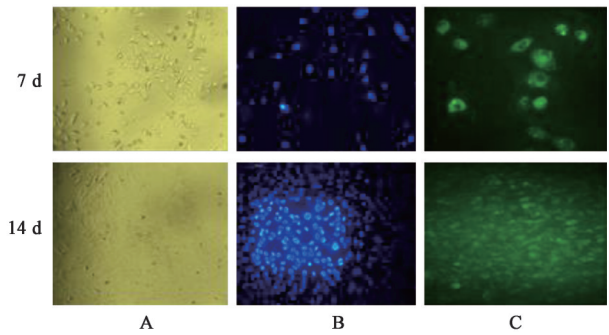
2.16 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测ZO-1, VEGF, FAK, Paxillin蛋白的表达 根据实验分组分别处理细胞后,用预冷的PBS漂洗并收集各组细胞。用RIPA裂解液裂解各组细胞得到可溶性蛋白后,采用BCA法定量各组细胞的蛋白浓度并调整至同一浓度。通过SDS-PAGE电泳法分离出各组提取的蛋白质样品,并转移到PVDF膜上。将膜用5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h后,在4℃条件下分别与相应的一抗一起孵育过夜(ZO-1, 1:500; VEGF, 1:800; FAK, 1:2000; Paxillin, 1:5000; β -actin, 1:1000)。次日将膜漂洗并与HRP标记的二抗(1:1万)在37℃恒温振荡培养箱中孵育1 h。再次将膜漂洗,启用凝胶成像系统,用增强的化学发光(ECL)试剂盒进行信号检测,并通过AlphaVIEW SA软件分析蛋白质条带。

2.17 统计学分析 采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,所有计量资料均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用单因素方差分析法比较多组间数据,通过LSD-*t*检验比较两组之间的数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BMECs的形态学观察与鉴定 倒置相差显微镜观察结果显示,在第7天细胞开始呈现长梭形,继续培养至第14天,细胞呈现铺路石样;荧光显微镜观察到VIII因子相关抗原表达阳性,细胞质内发出明显绿色荧光,细胞核经DAPI复染呈蓝色。见图1。

3.2 TQHXT含药脑脊液的最适浓度筛选 与正常组比较,不同浓度的TQHXT含药脑脊液对正常培养的细胞无毒副作用,20%浓度的TQHXT含药



A.倒置显微镜;B.DAPI;C.Factor VIII

图1 BMECs的形态学观察与鉴定(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 1 Morphological observation and identification of BMECs (IF, $\times 200$)

脑脊液显著增加细胞活力($P < 0.01$)。见表1。与OGD/R组比较,5%和10%浓度的TQHXT含药脑脊液提升细胞活力不明显,而20%浓度的TQHXT含药脑脊液显著提升细胞活力($P < 0.01$)。见表2。

表1 TQHXT含药脑脊液的安全浓度筛选($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Screening of safe concentrations of cerebrospinal fluid containing TQHXT($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	细胞活力/%
正常	-	100.00
TQHXT	5	101.53 \pm 1.57
	10	104.27 \pm 1.30
	15	104.27 \pm 1.19
	20	110.47 \pm 1.60 ¹⁾
	40	106.13 \pm 2.09

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表2 TQHXT含药脑脊液的有效浓度筛选($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Screening of effective concentrations of cerebrospinal fluid containing TQHXT($\bar{x} \pm s, n=6$)

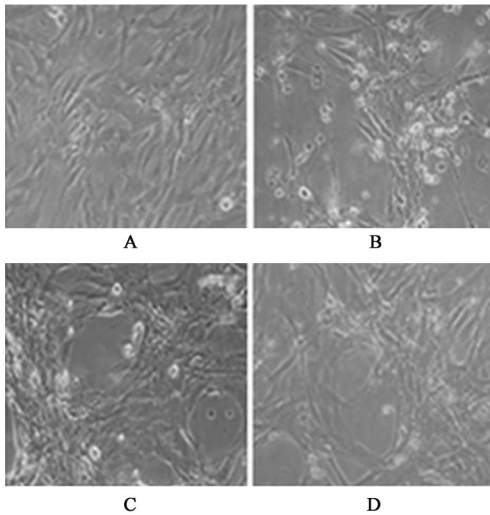
组别	体积分数/%	细胞活力/%
正常	-	100.00
OGD/R	-	39.58 \pm 7.08 ¹⁾
TQHXT	5	45.27 \pm 7.30
	10	50.95 \pm 8.27
	20	76.27 \pm 6.19 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与OGD/R组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与TQHXT组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表3~9同)。

3.3 TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs的形态学的影响 正常组细胞贴壁状态较好,细胞较为饱满呈梭形;OGD/R组细胞稀疏脱落,细胞皱缩、变圆;与OGD/R组比较,TQHXT组和NMDP组细胞贴壁数目增多,折光性增强,见图2。正常组细

胞显示出正常细胞的超微结构;OGD/R组细胞胞体皱缩、变圆,染色质凝聚成簇;与OGD/R组比较,TQHXT组和NMDP组细胞的超微结构发生明显改善,见图3。

3.4 TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs结构的影响 与正常组比较,OGD/R组细胞在不同



A. 正常组;B. OGD/R组;C. TQHXT组;D. NMDP组(图3~7同)
图2 TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs形态学的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 2 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on morphology of OGD/R-induced BMECs(inverted microscope,×200)

表3 TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs在不同时间点的TEER值影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on TEER value of OGD/R-induced BMECs at different times($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常	-	434.67±2.49	432.67±0.94	431.33±1.89	431.67±2.05	430.33±1.25
OGD/R	-	413.00±1.41 ¹⁾	328.33±2.87 ¹⁾	303.33±2.49 ¹⁾	225.00±2.94 ¹⁾	188.00±2.16 ¹⁾
TQHXT	20	414.33±1.70	353.67±2.62 ³⁾	334.00±1.41 ³⁾	250.33±1.25 ³⁾	247.33±1.70 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	415.33±0.94	360.00±1.63 ³⁾	342.67±2.05 ³⁾	256.67±1.70 ³⁾	252.00±1.63 ³⁾

注:⁵⁾表示单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表4~9同)。

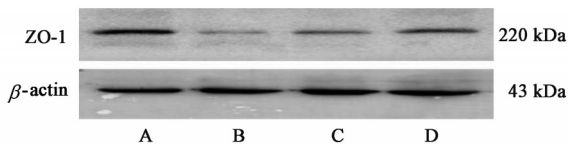


图4 各组细胞中ZO-1蛋白的表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of ZO-1 protein expression in each group

3.5 TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs的功能影响 与正常组比较,OGD/R组细胞上清液中NO水平,LDH释放量及细胞内ROS荧光强度显著增加($P<0.01$);与OGD/R组比较,NMDP组和TQHXT组显著降低细胞上清液中的NO水平,LDH活性及细胞内ROS荧光强度($P<0.01$)。与正常组

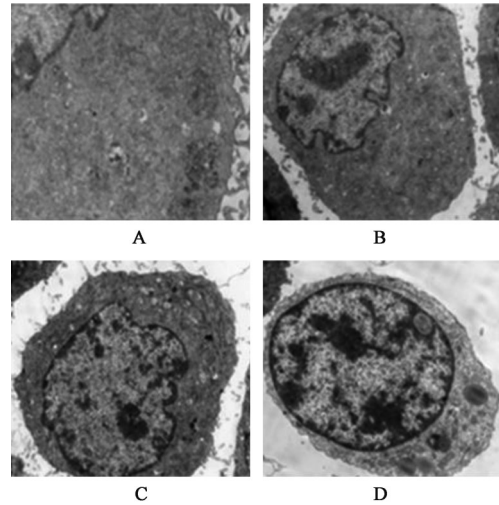


图3 透射电子显微镜观察TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs的超微结构影响(电镜扫描,×3 000)

Fig. 3 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on ultrastructure of OGD/R-induced BMECs(SEM,×3 000)

时间点的TEER值均显著降低($P<0.01$);与OGD/R组比较,TQHXT组和NMDP组可不同程度地提升细胞的TEER值($P<0.01$)。见表3。与正常组比较,OGD/R组中ZO-1蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$);与OGD/R组比较,TQHXT组和NMDP组显著升高细胞中ZO-1蛋白的表达($P<0.01$)。见图4,表4。

表4 TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs中ZO-1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on expression of ZO-1 protein in BMECs with OGD/R injury($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	ZO-1/β-actin
正常	-	0.882±0.020
OGD/R	-	0.306±0.007 ¹⁾
TQHXT	20	0.482±0.005 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	0.582±0.016 ³⁾

比较,OGD/R组细胞上清液中tPA含量显著降低($P<0.01$);与OGD/R组比较,NMDP组和TQHXT

组均显著升高细胞上清液中 tPA 含量 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 BMECs 的功能影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on OGD/R-induced BMECs function ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	tPA/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	7.05 \pm 1.35	220.33 \pm 36.17	120.17 \pm 4.52	7.86 \pm 0.79
OGD/R	-	19.45 \pm 1.96 ¹⁾	600.65 \pm 60.89 ¹⁾	165.60 \pm 18.32 ¹⁾	4.00 \pm 0.65 ¹⁾
TQHXT	20	13.50 \pm 1.01 ³⁾	374.25 \pm 36.13 ³⁾	133.94 \pm 12.68 ³⁾	7.06 \pm 0.64 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	13.33 \pm 1.22 ³⁾	360.33 \pm 28.99 ³⁾	125.90 \pm 10.74 ³⁾	6.27 \pm 1.29 ³⁾

3.6 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 BMECs 的细胞凋亡的影响 正常组细胞呈现弥散均匀的微弱蓝色荧光; OGD/R 组细胞胞核固缩, 可见强烈的蓝色荧光; 而 TQHXT 组和 NMDP 组细胞核蓝色荧光强度明显减弱, 胞核变圆变大, 接近正常组。见图 5。与正常组比较, OGD/R 组细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, NMDP 组和 TQHXT 组显著降低细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。见表 6。

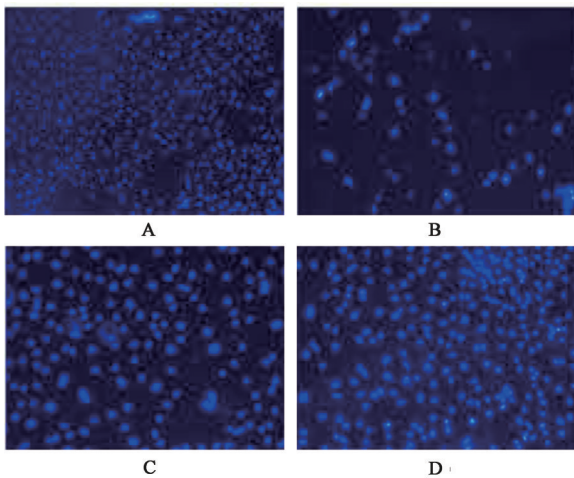


图 5 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 BMECs 的细胞凋亡的影响 (Hoechst33258, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on apoptosis in BMECs with OGD/R injury (Hoechst33258, $\times 200$)

表 6 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 BMECs 的细胞凋亡影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on OGD/R-induced BMECs apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	细胞凋亡率/%
正常	-	5.50 \pm 0.67
OGD/R	-	30.94 \pm 0.65 ¹⁾
TQHXT	20	7.63 \pm 0.82 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	6.37 \pm 0.96 ³⁾

3.7 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的细胞内 Ca^{2+} 内流的影响 与正常组比较, OGD/R 组细胞内 Fluo-3AM 的 Ca^{2+} 荧光强度显著升高 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, TQHXT 组和 NMDP 组均显著降低细胞内 Ca^{2+} 荧光强度 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 7 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 Ca^{2+} 内流影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on Ca^{2+} influx induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	$\text{Ca}^{2+}/\%$
正常	-	73.89 \pm 2.16
OGD/R	-	100.00 \pm 1.27 ¹⁾
TQHXT	20	84.31 \pm 1.10 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	89.29 \pm 0.82 ³⁾

3.8 TQHXT 含药脑脊液对 OGD/R 诱导的 BMECs 中 CD 34 因子的表达和 VEGF-VEGFR₂/FAK/Paxillin 信号通路的影响 正常组中 Cy3 标记的 CD34 因子荧光强度微弱, 而 OGD/R 组中 CD34 因子荧光强度有所增加, 与 OGD/R 组比较, NMDP 组和 TQHXT 组中 CD34 因子的阳性表达均有不同程度的增强, 见图 6。与正常组比较, OGD/R 组细胞中 VEGF 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, NMDP 组和 TQHXT 组均显著升高细胞中 VEGF 蛋白表达量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 7, 表 8。与正常组比较, OGD/R 组细胞中 FAK 和 Paxillin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 与 OGD/R 组比较, NMDP 组和 TQHXT 组显著增加细胞中 FAK 和 Paxillin 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 此外, BMS-907351 显著抑制了 TQHXT 含药脑脊液对 FAK 和 Paxillin 蛋白表达的上调作用 ($P < 0.01$)。见图 8, 表 9。

4 讨论

脑脊液药理学现已广泛应用于中药研究^[20], 与中药含药血清相比, 中药含药脑脊液的研究可以避免血清中复杂成分的干扰, 提高实验结果的可信

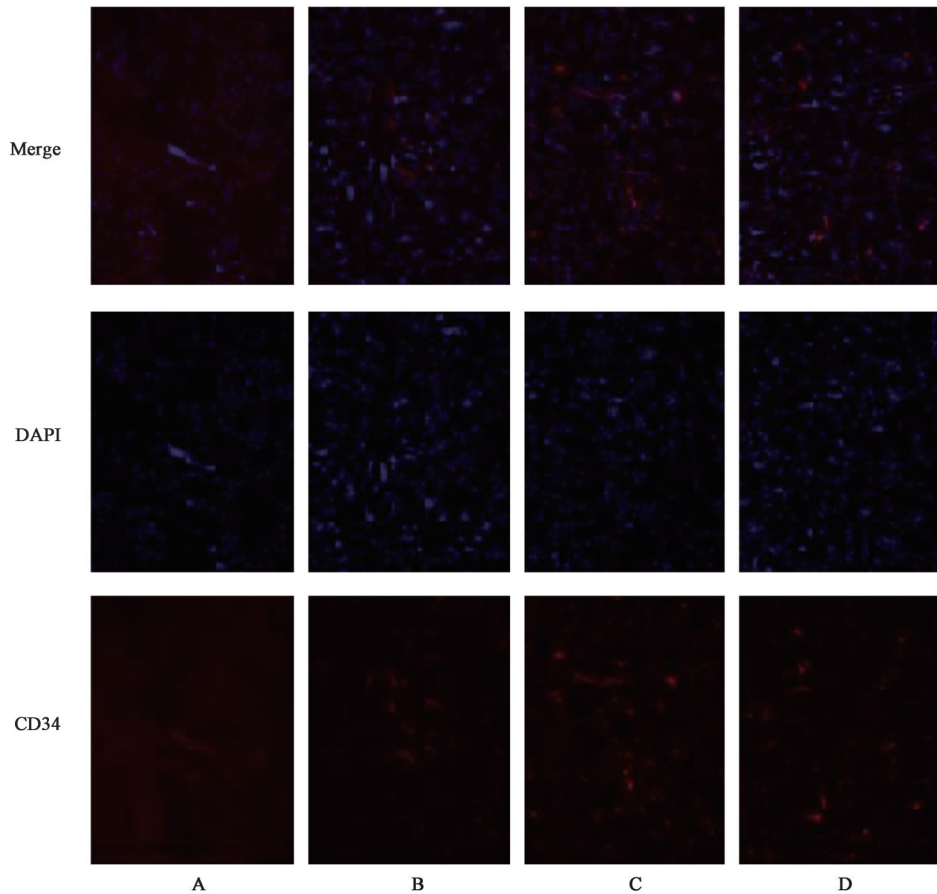


图6 各组细胞中CD34的表达

Fig. 6 Expression of CD34 in each group

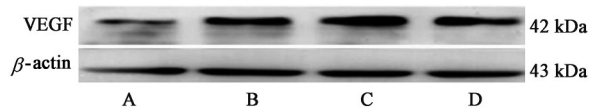


图7 各组细胞中VEGF蛋白表达电泳

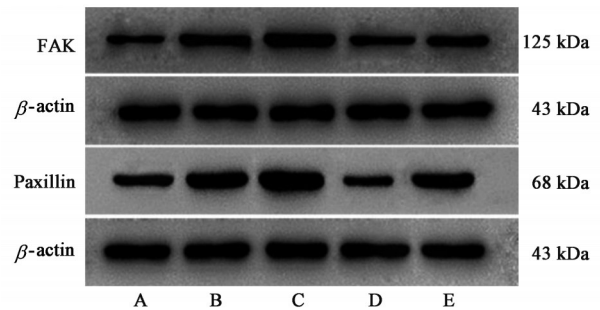
Fig. 7 Electrophoresis of VEGF protein expression in each group

表8 TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs中VEGF蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on expression of VEGF protein in BMECs with OGD/R injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	VEGF/ β -actin
正常	-	0.673 \pm 0.014
OGD/R	-	0.980 \pm 0.020 ¹⁾
TQHXT	20	1.240 \pm 0.094 ³⁾
NMDP	10 ⁵⁾	1.133 \pm 0.066 ²⁾

度。本实验的细胞活力检测结果显示20%浓度的TQHXT含药脑脊液显著增加了OGD/R诱导的BMECs的细胞活力,且对正常细胞无毒性,因此笔者选择含有20%浓度的TQHXT含药脑脊液作为后续实验的最适给药浓度。为了确定TQHXT含药脑



A. 正常组; B. OGD/R组; C. TQHXT组; D. BMS组; E. 合用药组

图8 各组细胞中FAK和Paxillin蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of FAK and Paxillin protein expression in each group

脊液对OGD/R诱导的BMECs的保护作用,首先观察了BMECs的形态学和超微结构变化,实验结果表明,TQHXT含药脑脊液与NMDP阳性药物对OGD/R诱导的BMECs均具有结构改善作用。在脑缺血期间,由于BMECs的线粒体丰富,在缺血和缺氧条件下会刺激机体蛋白酶的激活,导致细胞紧密连接蛋白降解,使得BMECs之间紧密连接结构快速被破坏^[21]。研究结果证实TQHXT含药脑脊液可

表9 TQHXT含药脑脊液对OGD/R损伤的BMECs中FAK和Paxillin蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of cerebrospinal fluid containing TQHXT on expression of FAK and Paxillin protein in BMECs with OGD/R injury($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	FAK/ β -actin	Paxillin/ β -actin
正常	-	0.544 \pm 0.016	0.662 \pm 0.007
OGD/R	-	0.954 \pm 0.041 ¹⁾	0.766 \pm 0.003 ¹⁾
TQHXT	20	1.153 \pm 0.027 ²⁾	1.013 \pm 0.005 ³⁾
BMS	1 ⁵⁾	0.651 \pm 0.017 ²⁾	0.547 \pm 0.010 ³⁾
合用药	20	0.777 \pm 0.013 ⁴⁾	0.753 \pm 0.015 ⁴⁾

以增加OGD/R诱导的BMECs的TEER值,并显著增强ZO-1蛋白在OGD/R诱导的BMECs中的表达,这表明TQHXT含药脑脊液可以通过保护BMECs的细胞结构来改善脑缺血后BBB完整性的破坏。

脑缺血/再灌注损伤是一个复杂的生物学过程,包括氧化应激^[22],细胞内钙超载^[23]和细胞凋亡^[24]等。脑缺血发生时,机体的调节机制会发生改变,并且由于NO和ROS产生激增,会使得细胞的损伤延长^[25],而当NO被O₂迅速除去形成反应性的过氧亚硝酸盐时,会使得ROS的产生和细胞氧化损伤进一步增强^[26-27]。研究结果证实,TQHXT含药脑脊液可显著减少OGD/R诱导的BMECs中NO和ROS的产生。此外,LDH的活性检测结果表明TQHXT含药脑脊液可通过减少OGD/R诱导的BMECs中LDH的释放来降低细胞膜的通透性。研究表明,tPA诱导的早期再灌注可改善缺血性卒中的预后^[28],而tPA检测的结果证实了TQHXT含药脑脊液可显著增加OGD/R诱导的BMECs中tPA的含量,增强细胞的纤维蛋白溶解能力。细胞内Ca²⁺浓度和细胞凋亡水平的检测结果进一步表明,TQHXT含药脑脊液能显著减少OGD/R诱导的细胞内Ca²⁺内流和细胞凋亡。以上实验结果表明,TQHXT含药脑脊液的神经保护作用与抑制亚硝化应激、氧化应激,Ca²⁺超载及细胞凋亡等有关。

TQHXT含药脑脊液对OGD/R诱导的BMECs发挥保护作用的具体机制尚不清楚。研究表明,CD34是一种跨细胞膜表面的糖蛋白,可以加速内皮细胞聚集形成血管,调节内皮细胞的增殖和分化,参与新生毛细血管网的形成和血管内膜修复,是目前测定微血管密度(MVD)值的良好指标^[29]。而VEGF是血管发育的关键因子,被广泛认为是血管生成的关键效应物,VEGF不仅可以刺激内皮细胞分化,还可以刺激造血功能^[30]。荧光显微镜观察

和Western blot的结果表明TQHXT含药脑脊液可显著上调OGD/R诱导的BMECs中CD34和VEGF的表达,对血管新生有着促进作用。研究表明VEGF依赖性激活的FAK/Paxillin信号体是内皮细胞增殖和迁移所必需的,VEGF通过刺激FAK和Paxillin组成的信号体激活内皮细胞^[31-32],并且Paxillin蛋白缺失导致细胞功能障碍和发育迟缓^[33]。卡博替尼(XL184, BMS-907351)是一种小分子激酶抑制剂,其具有抗血管生成的作用,对VEGFR₂有很强的抑制效果^[34]。为此,笔者通过加入血管新生通路中BMS-907351抑制剂来研究TQHXT含药脑脊液是否通过VEGF-VEGFR₂/FAK/Paxillin信号通路来调节OGD/R诱导的BMECs损伤。Western blot的结果显示,BMS-907351下调了OGD/R诱导的BMECs中FAK和Paxillin蛋白的表达水平,而TQHXT含药脑脊液能够显著增加OGD/R诱导的BMECs中FAK和Paxillin蛋白的表达水平。此外,在合用药组,笔者观察到BMS-907351减弱了TQHXT含药脑脊液的上调作用,这表明TQHXT含药脑脊液可以激活该通路。

综上所述,TQHXT含药脑脊液能够改善OGD/R诱导的BMECs结构和功能改变,抑制细胞凋亡,减少细胞内Ca²⁺内流,保护BBB的完整性,其作用机制可能与血管新生和VEGF-VEGFR₂/FAK/Paxillin信号转导通路的激活有关。本研究为进一步研究TQHXT的潜在神经保护作用提供了理论依据,同时为缺血性脑卒中的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

[1] MIETTO B S, MOSTACADA K, MARTINEZ A M. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses[J]. Mediators Inflamm, 2015, doi: 10.1155/2015/251204.

[2] NENTWICH L M, GRIMM NITZ B. Neurologic emergencies in the elderly[J]. Emerg Med Clin North Am, 2016, 34(3): 575-599.

[3] JIANG D, SUN X, WANG S, et al. Upregulation of mir-874-3p decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by directly targeting bmf and bcl2l13 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108941.

[4] GREENE C, CAMPBELL M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: Cns delivery of small molecules [J]. Tissue Barriers, 2016, 4(1): e1138017.

- [5] 杨开令,周颖,闫福曼,等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠恢复期突触可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):43-49.
- [6] CHEN W, GUO Y, YANG W, et al. Protective effect of ginsenoside Rb₁ on integrity of blood-brain barrier following cerebral ischemia[J]. *Exp Brain Res*, 2015, 233(10):2823-2831.
- [7] LIU D, TANG Z Y, HU Z J, et al. Mir-940 regulates angiogenesis after cerebral infarction through VEGF [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7899-7907.
- [8] DU Y, SHI L, LI J, XIONG J, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area were detected after electroacupuncture treatment to rats with ischemic stroke[J]. *Neurol Res*, 2011, 33(1):101-107.
- [9] 汪宁,刘青云,彭代银,等. 通窍活血汤对反复脑缺血再灌注小鼠的保护作用及机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,10(5):22-24.
- [10] 汪宁,刘青云,彭代银,等. 通窍活血汤对小鼠脑缺血缺氧保护作用的研究[J]. 中国中医药科技,2003,10(6):339-340.
- [11] 汪宁,刘青云,彭代银,等. 通窍活血汤对脑缺血大鼠的保护作用及机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2004,11(5):407-409.
- [12] 许凤清,汪宁,刘金旗,等. 通窍活血汤的液相指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):1-4.
- [13] 汪宁,邓奕,何群,等. 通窍活血汤含药血清对谷氨酸损伤的PC12细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2010,35(10):1307-1310.
- [14] LI L, WANG N, JIN Q, et al. Protection of Tong-Qiao-Huo-Xue Decoction against cerebral ischemic injury through reduction blood-brain barrier permeability[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2017, 65(11):1004-1010.
- [15] YANG G, QIAN C, WANG N, et al. Tetramethylpyrazine protects against oxygen-glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial cells injury via rho/rho-kinase signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(4):619-633.
- [16] YANG G, WANG N, SETO S W, et al. Hydroxysafflor yellow a protects brain microvascular endothelial cells against oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury: involvement of inhibiting autophagy via class I PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140:243-257.
- [17] WANG N, DENG Y, WEI W, et al. Serum containing Tongqiao Huoxue Tang suppresses glutamate-induced pc12 cell injury[J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(15): 1125-1131.
- [18] VAN DEN BERG M P, ROMEIJN S G, VERHOEF J C, et al. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity[J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 116(1):99-107.
- [19] Wang Y, Wang N, Cai B, et al. *In vitro* model of the blood-brain barrier established by co-culture of primary cerebral microvascular endothelial and astrocyte cells[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(12): 2011-2017.
- [20] WU Y Q, ZHOU Y W, QIN X D, et al. Cerebrospinal fluid pharmacology: an improved pharmacology approach for chinese herbal medicine research [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/674305.
- [21] WU S, YUE Y, LI J, et al. Procyanidin B2 attenuates neurological deficits and blood-brain barrier disruption in a rat model of cerebral ischemia[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(10):1930-1941.
- [22] NEIL R S, HAKAN M M. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1):80-91.
- [23] DEPP C, BAS-ORTH C, SCHROEDER L, et al. Synaptic activity protects neurons against calcium-mediated oxidation and contraction of mitochondria during excitotoxicity [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(12):1109-1124.
- [24] HÜTTEMANN M, HELLING S, SANDERSON T H, et al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome C in ischemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817(4):598-609.
- [25] THEODORE K, CHRISTOPHER P B, MAIKE KRENZ R K. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298, 229-317.
- [26] KUNZ A, PARK L, ABE T, et al. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(27):7083-7093.
- [27] FOLINO A, LOSANO G. Balance of nitric oxide and reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury and protection [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(6):567-575.
- [28] KANAZAWA M, TAKAHASHI T, NISHIZAWA M. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke [J]. *J Atheroscler*

- Thromb, 2017, 24(3):240-253.
- [29] LAU K K, CHAN Y H, YIU K H, et al. Burden of carotid atherosclerosis in patients with stroke: relationships with circulating endothelial progenitor cells and hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2007, 21(6):445-451.
- [30] LIANG D, CHANG J R, CHIN A J, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development[J]. *Mech Dev*, 2001, 108(1/2): 29-43.
- [31] TOUTOUNCHIAN J J, PAGADALA J, MILLER D D, et al. Novel small molecule JP-153 targets the Src-FAK-Paxillin signaling complex to inhibit VEGF-induced retinal angiogenesis [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(1):1-13.
- [32] PROVENZANO P P. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 8):1195-1205.
- [33] BROWN M C, CARY L A, JAMIESON J S, et al. Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(9):4316-4328.
- [34] YAKES F M, CHEN J, TAN J, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(12): 2298-2308.

[责任编辑 周冰冰]