

· 论 著 ·

丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的人脑微血管内皮细胞血管新生能力的保护作用及机制

张 森¹, 刘成娣¹, 孔德文¹, 蒋 楠^{1,2}, 孔令雷¹, 杜冠华¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

摘要:目的 探讨丹酚酸 A(SAA)对血管内皮细胞低氧损伤后体外血管新生能力的作用及其机制。方法 采用氧糖剥夺(OGD)的方法构建人脑微血管内皮细胞(HBMEC)缺氧损伤模型,CCK-8 法检测 OGD 2, 4, 6, 8 和 10 h 细胞存活率, 确定 OGD 时间。HBMEC 分为细胞对照组、OGD 组、OGD+SAA 0.3, 1.0 和 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及 OGD+依达拉奉 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, OGD 6 h 后, 用 CCK-8 法检测细胞存活率; Matrigel 管腔形成实验观察 OGD 2~10 h 管腔形成; OGD 6 h 后, 检测管腔节点数、网眼数、分支数以及管腔长度; EdU 掺入实验检测细胞增殖, 划痕实验检测细胞迁移距离。HBMEC 分为细胞对照组、OGD 组、OGD+SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 OGD+依达拉奉 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, OGD 6 h 后, Western 印迹实验检测低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)及其受体 VEGFR2 蛋白表达水平及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路蛋白磷酸化水平。结果 OGD 6 h 细胞存活率为 (56 \pm 6)%, 确定为后续 OGD 时间。与细胞对照组相比, OGD 组细胞存活率明显降低, 形成管腔的节点数、网眼数、分支数以及管腔长度均显著减少 ($P<0.01$, $P<0.05$), EdU 阳性细胞比例和细胞迁移距离也明显下降 ($P<0.01$)。与 OGD 组相比, OGD+SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 OGD+依达拉奉 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率明显提高 ($P<0.05$), 形成管腔的节点数、网眼数、分支数以及管腔长度均显著升高 ($P<0.01$, $P<0.05$), EdU 阳性细胞比例和细胞迁移距离也明显增加 ($P<0.01$, $P<0.05$); Western 印迹结果显示, 与 OGD 组相比, OGD+SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HIF-1 α , VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$, $P<0.05$), PI3K, Akt 和 mTOR 磷酸化水平明显升高 ($P<0.05$)。结论 SAA 可能通过激活 HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 及其下游信号通路 PI3K/Akt/mTOR 发挥内皮细胞保护和促进血管生成的作用。

关键词: 丹酚酸 A; 脑微血管内皮细胞; 血管新生; 低氧诱导因子 1 α ; 血管内皮生长因子 A

中图分类号: R285.5R, R966 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)03-0161-09

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.03.001

目前脑卒中的临床治疗策略包括溶栓、治疗中风相关并发症和预防复发^[1]。大多数脑卒中患者都有功能缺损^[2]。卒中后血管新生是改善长期预后的重要环节^[3], 在脑缺血康复治疗中的作用越来越受到重视。

缺血性脑卒中脑梗死区血液供应严重减少, 引起细胞死亡, 导致不可逆损伤^[4]。越来越多的证据表明, 缺血性脑损伤可通过恢复脑血流供应来挽救

受损的神经元, 减轻神经功能损害^[5]。药物溶栓和机械取栓可迅速恢复血液供应, 但由于治疗窗狭窄和出血转化的副作用, 大多数患者无法及时接受有效的溶栓治疗。通过促进血管新生发挥脑保护作用已成为脑缺血治疗的新策略^[6]。血管新生, 即通过内皮细胞增殖、黏附、迁移和中空管腔形成, 最终从已有血管中长出新的毛细血管, 增加血管密度和脑血流量^[7-8], 恢复缺血脑组织的氧气和营养供应, 并作为神经元迁移的支架, 促进神经再生和功能恢复^[3-5, 9-10]。新生血管也是清除坏死脑组织的关键, 为梗死后神经再生和突触重塑提供适宜的环境。研究表明, 脑卒中后, 缺血半暗带中的内皮细胞、神经元和胶质细胞等释放血管生成因子, 诱导内皮细胞增殖和迁移以形成新血管, 半暗带内的新生血管

基金项目: 国家自然科学基金(82004071); 北京市自然科学基金(7182113); 国家科技重大专项(2018ZX09711001-009-009)

作者简介: 张森, 硕士研究生, 主要从事神经药理学及新药发现研究。

通讯作者: 孔令雷, E-mail: konglinglei@imm.ac.cn; 杜冠华, E-mail: dugh@imm.ac.cn

数量与患者生存期相关^[11]。有研究表明,随着再灌注时间的延长,缺血半暗带内的新生血管逐渐崩解^[12],血管密度降低,因此脑缺血引起的代偿性血管生成不足以支持受损脑组织修复和神经功能恢复^[13]。因此,研发有效促进血管新生的药物,可能是未来改善脑卒中预后的有效策略。

丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAA) 是从丹参中提取的水溶性化合物,具有多种药理活性,包括抗氧化应激^[14]、抗凋亡^[15-17]、抗炎^[17-19]和神经血管保护^[20-21]作用。已有研究报道,SAA 可显著减少脑缺血再灌注大鼠的脑梗死体积,减轻炎症反应并维持血脑屏障完整性^[18],从而改善神经功能,改善预后。但 SAA 是否能够促进脑微血管内皮细胞增殖与血管新生而发挥保护作用尚不清楚。本研究采用体外培养人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cell, HBMEC) 建立氧-糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型,采用管腔形成实验模拟体外血管生成的动态过程,研究 SAA 对 OGD 损伤后 HBMEC 增殖及体外血管新生能力的影响,并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和主要仪器

SAA (HPLC 纯度 >99%, 中国医学科学院协和医院药物研究所自制); 依达拉奉 (edaravone) 注射液 (江苏先声药业有限公司, 批号: H20031342 80-190907), 作为阳性对照药。胎牛血清、RPMI-1640 基础培养基和无糖 RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (上海 Beyotime 公司); EdU 细胞增殖检测试剂盒 (广州 RiboBio 公司); Matrigel 基质胶 (美国 BD Biosciences 公司); 细胞裂解液和 BCA 蛋白质定量试剂盒 (北京普利来公司); 兔抗人低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 单克隆抗体、兔抗人血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGFA) 和 VEGF 受体 2 (VEGF receptor-2, VEGFR2) 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 小鼠抗人 β 肌动蛋白单克隆抗体、兔抗人磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of Rapamycin, mTOR) 和 p-mTOR 单克隆抗体 (美国 CST 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体和山羊抗小鼠 IgG 抗体 (北京

康为世纪有限公司)

MCO-175 细胞培养箱 (美国 Sanyo 公司); 8000WJ/IR/N2 三气培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); SpectraMax M5 酶标仪 (美国 Molecular Device 公司); 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); Tanon-5200 成像系统 (上海 Tanon 公司)。

1.2 细胞和细胞培养

HBMEC (中国医学科学院基础医学研究所), 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 在常氧条件 (95% O₂, 5% CO₂) 和 37°C 条件下培养。选择对数生长期细胞进行实验。

1.3 OGD 模型建立和细胞分组

将对数生长期的 HBMEC 接种于 96 孔板或 6 孔板中, 培养至贴壁。正常对照组始终使用完全培养基在常氧、37°C 条件下培养, OGD 组细胞用 37°C 预热的生理盐水洗涤 2 次后更换为无糖 RPMI-1640 培养基, 置于三气培养箱中以低氧条件 (94% N₂, 1% O₂, 5% CO₂) 培养。分别于 2, 4, 6, 8 和 10 h 采用 CCK-8 法检测细胞存活率。

细胞分组: ① 细胞对照组、OGD 组、OGD+SAA 0.3, 1.0 和 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及 OGD+依达拉奉 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; ② 细胞对照组、OGD 组、OGD+SAA 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 OGD+依达拉奉 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。

1.4 CCK-8 法检测细胞存活率

将对数生长期 HBMEC 以密度 $2\times 10^8\text{L}^{-1}$ 接种在 96 孔板中, 每孔 100 μL , 培养至贴壁。细胞分组同 1.3 中①, 各组细胞在三气培养箱中 OGD 6 h 后, 将 10 μL CCK-8 溶液添加到 96 孔培养板中, 37°C 孵育 1~4 h。采用 SpectraMax M5 酶标仪于 450 nm 处检测吸光度 ($A_{450\text{nm}}$) 值。细胞存活率 (%) = (用药组 $A_{450\text{nm}}$ - 空白对照组 $A_{450\text{nm}}$) / (细胞对照组 $A_{450\text{nm}}$ - 空白对照组 $A_{450\text{nm}}$) $\times 100\%$ 。

1.5 管腔形成实验检测细胞管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度

向 96 孔板中加入无生长因子的 Matrigel 基质胶 (每孔 50 μL), 在 37°C 下凝固 1 h, 并将对数生长期 HBMEC 以 $2\times 10^8\text{L}^{-1}$ 的密度每孔 100 μL , 接种到铺有基质胶的 96 孔板中。细胞分组同 1.3 中①, 分别于 2, 4, 6, 8 和 10 h 用显微镜拍摄内皮细胞管腔形成的情况。使用 Image J 软件计算管腔的节点、网眼和分支数目以及管腔长度。实验重复 5 次。

1.6 EdU 掺入实验检测细胞增殖

将对数生长期 HBMEC 以密度 $2\times 10^8\text{L}^{-1}$ 每孔 100 μL , 接种到 96 孔板中, 细胞分组同 1.3 中①, OGD 损伤 6 h 后, 根据说明书使用 EdU 细胞增殖检

测试剂盒进行 EdU 掺入实验分析。使用荧光显微镜拍摄图像,并计算 EdU 阳性细胞数占总细胞数百分数。

1.7 划痕实验检测细胞迁移距离

将对数生长期 HBMEC 以密度 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 每孔 3 mL 接种至 6 孔板,在形成单层细胞层后,用 10 μL 枪头尖端垂直于板底划出 3 道平行的划痕,并确保每个划痕的宽度尽可能一致。细胞分组同 1.3 中①,在 OGD 前(0 h)和后(6 h)用显微镜拍摄图像。使用 Image J 软件量化迁移距离。迁移距离(μm)=初始划痕宽度(W_{0h})-实验终点划痕宽度(W_{6h})。

1.8 Western 印迹法检测细胞 HIF-1 α , VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达水平及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白磷酸化水平

将对数生长期 HBMEC 以密度 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种至 6 孔板,每孔 3 mL,细胞分组同 1.3 中②,OGD 损伤 6 h 后,弃掉细胞培养基,加入裂解液冰上裂解 15 min,收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,12000 $\times g$ 离心 20 min,吸取上清。使用蛋白质定量试剂盒,基于 BCA 法测定蛋白质浓度。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质样品,并将其转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,将膜与相应的一抗[抗 HIF-1 α 、VEGFA、VEGFR2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 和 β 肌动蛋白(均 1:1000)]在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。然后与二抗(1:5000)在室温下培养 2 h。使用增强化学发光法和 Tanon 4600 成像系统对条带进行成像,以目标蛋白条带积分吸光度与内标条带积分吸光度比值表示目标蛋白相对表达水平,以磷酸化蛋白条带积分吸光度与总蛋白条带积分吸光度比值表示蛋白磷酸化水平。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计分析,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用单因素方差分析和 Dunnett *t* 检验分析各组之间的差异。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 细胞存活率的影响

如图 1A 显示,与细胞对照组相比,OGD 组细胞存活率随 OGD 时间延长显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),OGD 损伤 6 h 时细胞存活率为细胞对照组的 $(56 \pm 6)\%$ ($P < 0.01$),确定为后续 OGD 时间。如图 1B 显示,SAA 0.3, 1.0 和 $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能够浓度依

赖性地逆转 OGD 对 HBMEC 造成的损伤($r = 0.99$, $P < 0.05$),相对于 OGD 组,OGD+SAA 1.0 和 $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组及 OGD+依达拉奉 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞存活率显著提高,分别为细胞对照组的 $(62 \pm 4)\%$, (68 ± 4) 和 $68 \pm 6)\%$ ($P < 0.05$)。

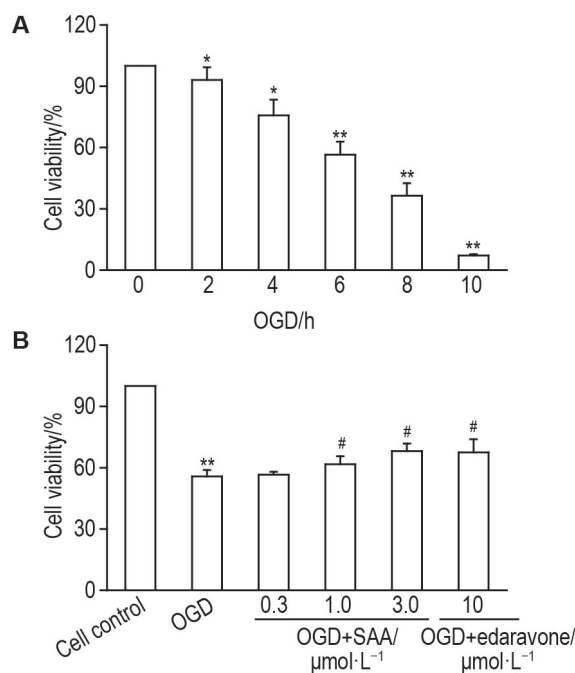


Fig.1 Effect of salvianolic acid A (SAA) on cell viability in human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) after oxygen-glucose deprivation (OGD) injury. A: cell viability of HBMECs at different time points after OGD; B: cell viability of HBMECs after treatment with SAA 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ or edaravone 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ under OGD condition for 6 h. Cell viability (%) = $(A_{450 \text{ nm}} \text{ of drug treatment group} - A_{450 \text{ nm}} \text{ of blank group}) / (A_{450 \text{ nm}} \text{ of cell control group} - A_{450 \text{ nm}} \text{ of blank group}) \times 100\%$. $\bar{x} \pm s$, $n = 4-5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with cell control group; # $P < 0.05$, compared with OGD group.

2.2 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度的影响

如图 2 所示,前 6 h 细胞对照组形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度在逐渐升高,随后逐渐降低,第 6 h 时管腔结构开始出现拉长和崩解。与细胞对照组相比,OGD 组内皮细胞形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度在每个时间点均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且分支数在管腔形成 2 h 后即开始降低,网眼数和管腔长度在 4 h 后开始降低,表明 OGD 后管腔崩解时间提前。OGD+SAA 0.3, 1.0 和 $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度的动态变化过程与细胞对照组一致,管腔崩解从 6 h 开始。在 6 h,相对于 OGD 组,OGD+SAA $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组管腔形成各指标显著升高

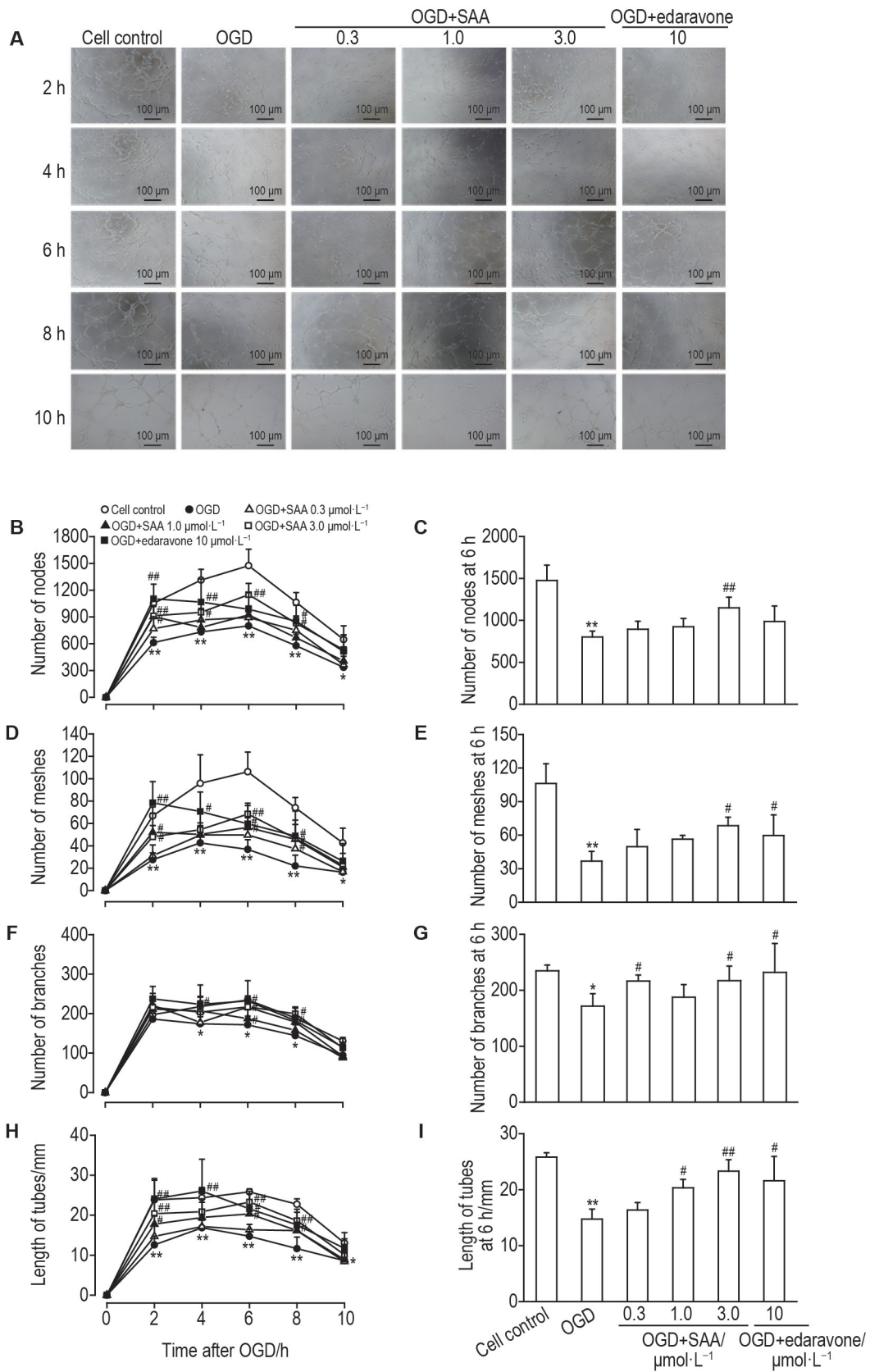


Fig.2 Effect of SAA on numbers of nodes, meshes, branches and length of tubes in HBMECs after OGD injury. The HBMECs in OGD+SAA 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups and OGD+edaravone 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group were treated with SAA 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or edaravone 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ under OGD conditions for 10 h. A: representative images of tube formation. B-I: the numbers of nodes, meshes, branches and the length of tubes over 10 h (B, D, F, H) or at 6 h (C, E, G, I), respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=5$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD group.

($P<0.05$, $P<0.01$), OGD+依达拉奉 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组除节点数外,其他指标显著升高($P<0.05$)。

2.3 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 细胞增殖的影响

EdU 掺入实验结果显示,与细胞对照组相比, OGD 组细胞总数以及 EdU 阳性细胞占总细胞的百分数明显降低($P<0.01$),说明 OGD 后 HBMEC 增殖被抑制。与 OGD 组相比, OGD+SAA $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 OGD+依达拉奉 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 EdU 阳性细胞的百分数显著增加($P<0.01$, $P<0.05$),细胞总数也有增加

的趋势,但无显著性差异(图 3)。

2.4 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 细胞迁移距离的影响

如图 4 所示,与细胞对照组(155 ± 13) μm 相比, OGD 组细胞迁移距离为(82 ± 4) μm ,细胞迁移能力明显降低($P<0.01$)。与 OGD 组相比, OGD+SAA $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 OGD+依达拉奉 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞迁移距离显著增加($P<0.05$),分别为 112 ± 15 和 $(111\pm 19)\mu\text{m}$,部分恢复细胞迁移能力。确定 SAA $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续机制探索实验。

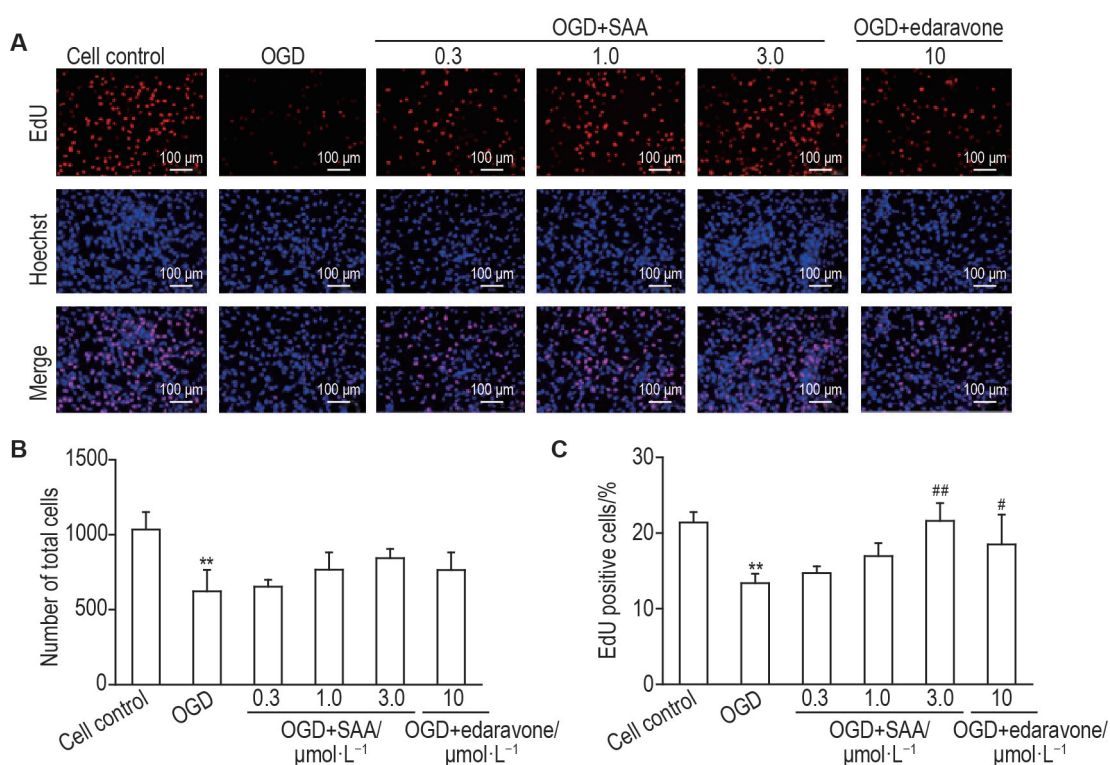


Fig.3 Effect of SAA on proliferation of HBMECs after OGD injury. The HBMECs in OGD+SAA $0.3, 1.0, 3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups and OGD + edaravone $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group were treated with SAA $0.3, 1.0, 3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or edaravone $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ under OGD conditions for 6 h. A: representative images of EdU incorporation assay; B and C were the semi-quantitative results of A. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD group.

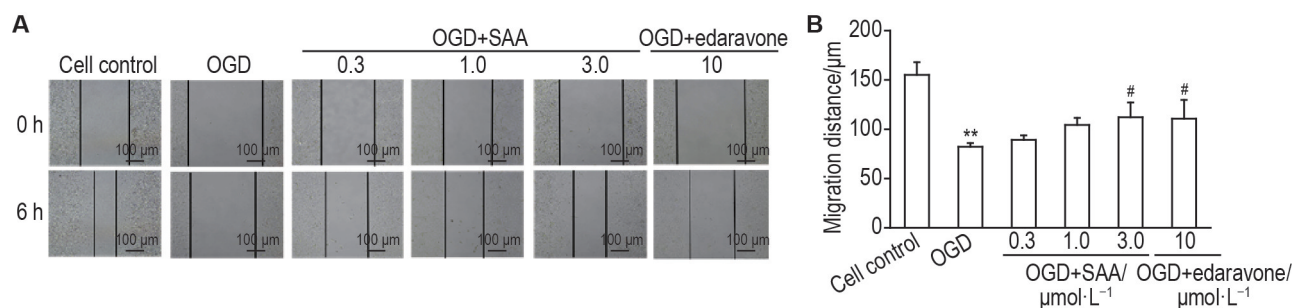


Fig.4 Effect of SAA on migration in HBMECs after OGD injury. See Fig.3 for the cell treatment. A: representative images of migration; B was the quantitative result of A. Migration distance (μm)=width of 0 h-width of 6 h. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, compared with OGD group.

2.5 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 细胞 HIF-1 α , VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达的影响

Western 印迹实验结果显示,与细胞对照组相比,OGD 组 HIF-1 α , VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$)。与 OGD 组细胞相比,OGD+SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 HIF-1 α , VEGFA 和

VEGFR2 蛋白表达显著上调($P<0.05, P<0.01$); 依达拉奉对上述蛋白表达也有一定促进作用(图 5)。

2.6 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的 HBMEC 细胞 PI3K, Akt, mTOR 蛋白磷酸化水平的影响

如图 6 所示,与细胞对照组相比,OGD 组 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 p-mTOR/m-TOR 比值显著下降

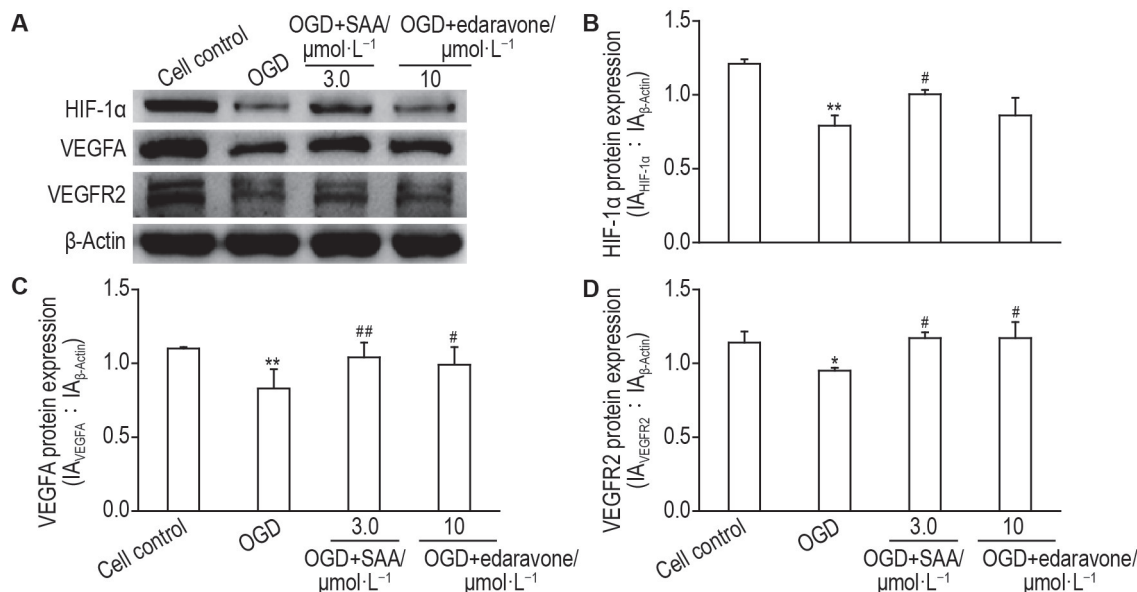


Fig.5 Effect of SAA on protein expression levels of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor-A (VEGFA) and VEGF receptor-2 (VEGFR2) in HBMECs after OGD injury detected by Western blotting. HBMECs in OGD+SAA group and OGD+edaravone group were treated with SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or edaravone 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ under OGD conditions for 6 h. B, C and D were the semi-quantitative results of A. $\bar{x}\pm s, n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD group.

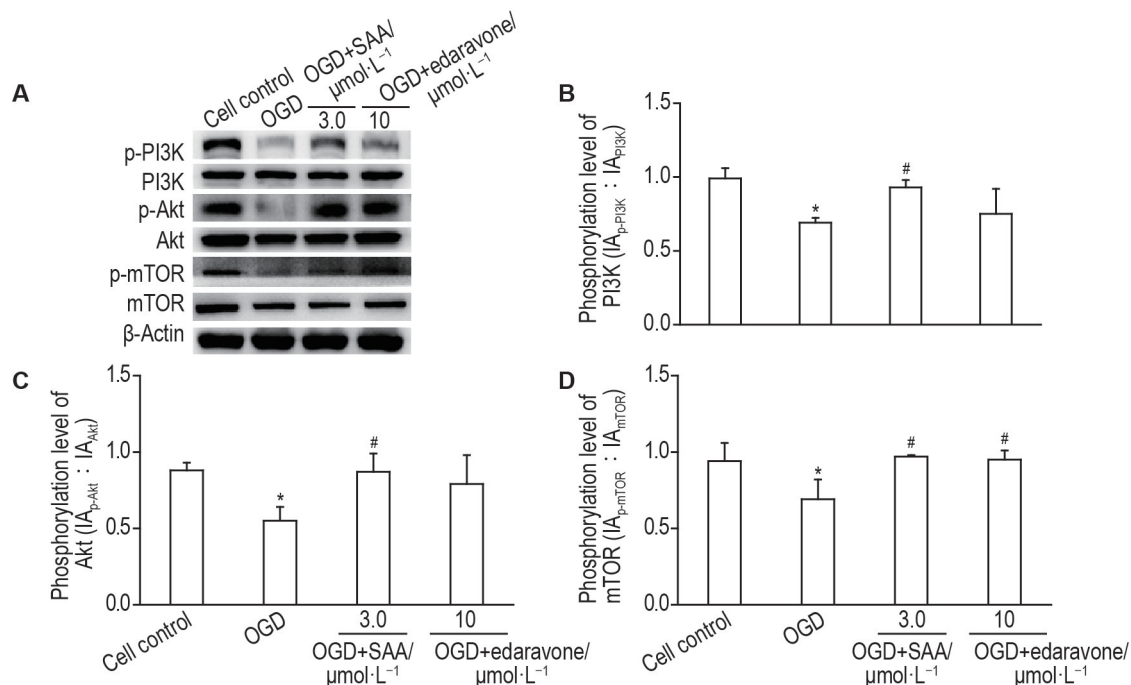


Fig.6 Effect of SAA on phosphorylation levels of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and mammalian target of Rapamycin (mTOR) in HBMECs after OGD injury detected by Western blotting. See Fig.5 for the cell treatment. B, C and D were the semi-quantitative results of A. $\bar{x}\pm s, n=3$. * $P<0.05$, compared with the cell control group; # $P<0.05$, compared with the OGD group.

($P < 0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+SAA $3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt 和 p-mTOR/m-TOR 比值升高 ($P < 0.05$), 表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白磷酸化水平升高; OGD+依达拉奉组 p-mTOR/mTOR 比值升高 ($P < 0.05$), 但 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值无明显变化。

3 讨论

本研究结果表明, OGD 损伤后 HBMEC 细胞存活率显著降低, HBMEC 增殖和迁移能力明显下降, 导致管腔形成被显著抑制。SAA 在 $0.3 \sim 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 可以提高 OGD 损伤后细胞存活率, 改善 HBMEC 增殖和迁移能力, 进而促进管腔形成, 诱导血管新生, HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 表达升高, PI3K, Akt 和 mTOR 磷酸化水平增加。

脑缺血后的血管新生是一个严格调控的多步骤过程, 涉及 HBMEC 的增殖、迁移、聚集和重排。在体外细胞实验的血管生成过程中, 管腔结构以时间依赖性形成、拉长, 然后崩解^[22]。为了观察管腔形成过程, 本研究连续监测 10 h, 观察 HBMEC 形成管腔结构的动态变化。发现 HBMEC 在接种后 6 h 内逐渐形成管腔结构, 达到最大节点数、网眼数、分支数和管腔长度, 随后管腔逐渐拉长并最终崩解, 表明 6 h 为评价 HBMEC 血管生成能力的最佳时间节点。OGD 后形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度在各时间点均显著降低并且更早地发生崩解, 血管生成能力下降, SAA 能够增加形成管腔的节点数、网眼数、分支数和管腔长度, 并延缓管腔崩解, 促进血管生成。

内皮细胞增殖和迁移是血管生成的标志之一, 血管生成调节剂对其作用已经得到验证^[23]。本研究结果表明, OGD 损伤后, HBMEC 增殖和迁移能力严重受损, 管腔结构形成受阻, 血管生成能力下降。SAA 能够改善 HBMEC 增殖和迁移能力, 进而显著促进管腔形成, 延缓管腔崩解, 恢复血管生成能力。上述结果表明, SAA 明显改善缺氧损伤后内皮细胞的血管生成能力。

HIF-1 α 是缺氧诱导血管生成的关键因子, 可作为转录因子与 VEGFA 启动子结合^[24], 诱导 VEGFA 表达^[25]。VEGFA 属于 VEGF 家族, 作为血管内皮细胞特异性有丝分裂原, 是诱导血管生成的关键信号^[26]。VEGFA 通过与血管内皮细胞表面的 VEGFR2 结合来介导下游信号通路 PI3K/Akt/mTOR 的磷酸化激活, 促进内皮细胞增殖、黏附、迁移、存活和侧支血管

的形成, 促进血管生成^[27]。抑制 HIF-1 α 的降解, 可通过激活 VEGFA 介导的内源性血管生成促进缺血性脑卒中小鼠的功能恢复^[28]。SAA 能够促进 HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 的表达, 进一步增强下游信号通路 PI3K/Akt/mTOR 的磷酸化激活, 维持 HBMEC 的存活, 促进细胞的增殖和血管生成。

依达拉奉是临床上常用的脑保护剂之一, 可促进脑缺血后血管新生, 但其作用机制尚不明确^[29]。本研究结果表明, 依达拉奉 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可恢复 OGD 后 HBMEC 的增殖、迁移和管腔形成能力, 作用与 SAA $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当, 提示在一定剂量范围内, SAA 的效价更高, SAA 对内皮细胞保护和促进血管生成的作用可能更强。依达拉奉对 VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达也有一定促进作用, 但对 HIF-1 α 蛋白表达及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白磷酸化程度无明显作用, 说明依达拉奉可能通过其他机制促进 VEGFA 的表达, 并引起 VEGFR2 下游其他信号通路的改变。依达拉奉和 SAA 之间的差异可能与依达拉奉对自由基的显著清除作用有关^[30-31]。

综上所述, SAA 可改善缺氧诱导的 HBMEC 损伤, 改善 HBMEC 增殖和迁移能力, 进而促进管腔形成, 发挥内皮细胞保护和促进血管生成的作用, 其机制可能涉及 HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 及其下游信号通路 PI3K/Akt/mTOR 的激活。

参考文献:

- [1] Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7609 [2021-09-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7589849/>. DOI: 10.3390/ijms21207609.
- [2] Loi M, Zaliani A, Abbamonte M, et al. Milestones and timescale of poststroke recovery: a cohort study[J/OL]. *Behav Neurol*, 2020, 8216758 [2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33282006/>. DOI: 10.1155/2020/8216758.
- [3] Aghazadeh Y, Khan ST, Nkenner B, et al. Cell-based therapies for vascular regeneration: past, present and future[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2021, 107976 [2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34480961/>. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107976.
- [4] Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(4): 313-320.
- [5] Sun P, Zhang K, Hassan SH, et al. Endothelium-targeted deletion of microRNA-15a/16-1 promotes poststroke angiogenesis and improves long-term

- neurological recovery[J]. *Circ Res*, 2020, 126(8):1040-1057.
- [6] Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, *et al.* Angiogenesis in the ischemic core: a potential treatment target? [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(5):753-769.
- [7] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [8] Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology[J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 954-959.
- [9] Gregorius J, Wang C, Stambouli O, *et al.* Small extracellular vesicles obtained from hypoxic mesenchymal stromal cells have unique characteristics that promote cerebral angiogenesis, brain remodeling and neurological recovery after focal cerebral ischemia in mice [J/OL]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 40 [2021-09-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8187185/>. DOI: 10.1007/s00395-021-00881-9.
- [10] Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(1): 16-19.
- [11] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, *et al.* Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-1798.
- [12] Yu SW, Friedman B, Cheng Q, *et al.* Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(4): 755-763.
- [13] Wang ML, Zhang LX, Wei JJ, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor and stromal cell-derived factor-1 combination therapy: a more effective treatment for cerebral ischemic stroke[J]. *Int J Stroke*, 2020, 15(7): 743-754.
- [14] 张雯, 宋俊科, 闫蓉, 等. 丹酚酸 A 通过 Nrf2/HO-1 途径减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *药学学报(Acta Pharmaceutica Sinica)*, 2016, 51(11): 1717-1723.
- [15] Qian W, Wang Z, Xu T, *et al.* Anti-apoptotic effects and mechanisms of salvianolic acid A on cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury[J]. *Histol Histopathol*, 2019, 34(3): 223-231.
- [16] Song J, Zhang W, Wang J, *et al.* Inhibition of FOXO3a/BIM signaling pathway contributes to the protective effect of salvianolic acid A against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(3): 505-515.
- [17] Zhao J, Li L, Fang G. Salvianolic acid A attenuates cerebral ischemia / reperfusion injury induced rat brain damage, inflammation and apoptosis by regulating miR-499a/DDK1[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(7): 3288-3301.
- [18] Zhang W, Song JK, Zhang X, *et al.* Salvianolic acid A attenuates ischemia reperfusion induced rat brain damage by protecting the blood brain barrier through MMP-9 inhibition and anti-inflammation[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(3): 184-193.
- [19] Chien MY, Chuang CH, Chern CM, *et al.* Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice[J]. *Free Radical Biol Med*, 2016, 99: 508-519.
- [20] Liu CD, Liu NN, Zhang S, *et al.* Salvianolic acid A prevented cerebrovascular endothelial injury caused by acute ischemic stroke through inhibiting the Src signaling pathway[J]. *Acta Pharma Sin B*, 2021, 42(3): 370-381.
- [21] Mahmood Q, Wang GF, Wu G, *et al.* Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice[J]. *Phytomedicine*, 2017, 25: 8-14.
- [22] Lee H, Kang KT. Advanced tube formation assay using human endothelial colony forming cells for evaluation of angiogenesis[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(6): 705-712.
- [23] Wiedemann E, Jellinghaus S, Ende G, *et al.* Regulation of endothelial migration and proliferation by ephrin-A1[J]. *Cell Signal*, 2017, 29: 84-95.
- [24] Jung JE, Lee HG, Cho IH, *et al.* STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells[J]. *FASEB J*, 2005, 19(10): 1296-1298.
- [25] Liu Y, Ran H, Xiao Y, *et al.* Knockdown of HIF-1 α impairs post-ischemic vascular reconstruction in the brain via deficient homing and sprouting bmEPCs[J]. *Brain Pathol (Zurich, Switzerland)*, 2018, 28: 860-874.
- [26] Chen B, Zhang Y, Chen S, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke[J]. *Pharmazie*, 2021, 76(4): 127-131.
- [27] Wang X, Bove AM, Simone G, *et al.* Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 599281 [2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33304904/>. DOI:10.3389/fcell.2020.599281.
- [28] Mi DH, Fang HJ, Zheng GH, *et al.* DPP-4 inhibitors promote proliferation and migration of rat brain microvascular endothelial cells under hypoxic / high-glucose conditions, potentially through the SIRT1/HIF-1/VEGF pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(3): 323-332.
- [29] 龙亮, 何劲松, 雷勇前, 等. 基于血管新生与神经发生探讨依达拉奉对缺血性脑卒中大鼠的作用与机制[J]. *卒中与神经疾病(Stroke and Nervous Diseases)*, 2021, 28(3): 300-305.
- [30] Kikuta M, Shiba T, Yoneyama M, *et al.* *In vivo* and

in vitro treatment with edaravone promotes proliferation of neural progenitor cells generated following neuronal loss in the mouse dentate gyrus[J]. *Pharmacol Sci*, 2013, 121(1): 74-83.

[31] He L, He T, Farrar S, *et al.* Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 532-553.

Protective effect of salvianolic acid A on angiogenesis of human brain microvascular endothelial cells injured by oxygen glucose deprivation and mechanisms

ZHANG Sen¹, LIU Cheng-di¹, KONG De-wen¹, JIANG Nan^{1,2}, KONG Ling-lei¹, DU Guan-hua¹
(1. Beijing Key Laboratory of Drug Target and Screening Research, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the effects of salvianolic acid A (SAA) on angiogenesis *in vitro* and the underlying mechanisms. **METHODS** A hypoxic-injury model for oxygen-glucose deprivation (OGD)-induced human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) was used to investigate the effects of SAA on angiogenesis. CCK-8 assay was used to detect the cell viability at 0, 2, 4, 6, 8 and 10 h after OGD to determine the OGD time. HBMECs were randomly divided into six groups: cell control, OGD, OGD+SAA 0.3, 1.0, 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and OGD+edaravone 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups. After 6 h of OGD, cell viability was determined by CCK-8 assay. Matrigel tube formation assay was conducted to observe the formation of lumina 2–10 h after OGD. The numbers of nodes, meshes, branches and the lumen length were detected at 6 h. EdU incorporation assay was used to evaluate the cell proliferation ratio while cell scratch assay was used to detect the migration distance 6 h after OGD. HBMECs were divided into cell control, OGD, OGD+SAA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and OGD+edaravone 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups. The expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor-A (VEGFA) and VEGF receptor-2 (VEGFR2), and protein phosphorylation levels of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and mammalian target of Rapamycin (mTOR) protein were determined by Western blotting 6 h after OGD. **RESULTS** The cell viability was (56 \pm 6)% 6 h after OGD, which was determined as the time of subsequent experiments. Compared with the cell control group, OGD resulted in a significant decrease in cell viability ($P<0.01$). SAA (3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and edaravone (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) reversed OGD-induced cell injury and increased cell viability. In addition, SAA (3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly increase the numbers of nodes, meshes, branches, the lumen length in tube formation ($P<0.05$, $P<0.01$), the ratio of EdU-positive cells ($P<0.01$) and the migration distance ($P<0.05$), which were all reduced in the OGD group ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, SAA (3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) up-regulated the expression levels of HIF-1- α , VEGFA, VEGFR2, and the phosphorylation levels of PI3K, Akt and mTOR ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** SAA can protect HBMECs against OGD injury and promote angiogenesis by activating HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 and its downstream signaling pathway PI3K/Akt/mTOR.

Key words: salvianolic acid A; brain microvascular endothelial cells; angiogenesis; hypoxia inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor-A

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (82004071); Beijing Municipal Natural Science Foundation (7182113); and National Scientific and Technology Major Project of China (2018ZX09711001-009-009)

Corresponding author: KONG Ling-lei, E-mail: konglinglei@imm.ac.cn; DU Guan-hua, E-mail: dugh@imm.ac.cn

(收稿日期: 2021-09-18 接受日期: 2021-11-01)

(本文编辑: 乔虹)