



世界科学技术-中医药现代化

Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology

ISSN 1674-3849,CN 11-5699/R

《世界科学技术-中医药现代化》网络首发论文

题目：基于人脐静脉内皮细胞的 OGD/R 模型研究当归-川芎药对中 7 个活性成分对 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路的影响

作者：纪秋如，泥文娟，王晓艳，张书琦，吴娅丽，牛璐，李琨，李伟霞，唐进法

收稿日期：2023-04-08

网络首发日期：2024-04-26

引用格式：纪秋如，泥文娟，王晓艳，张书琦，吴娅丽，牛璐，李琨，李伟霞，唐进法. 基于人脐静脉内皮细胞的 OGD/R 模型研究当归-川芎药对中 7 个活性成分对 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路的影响[J/OL]. 世界科学技术-中医药现代化. <https://link.cnki.net/urlid/11.5699.r.20240423.1652.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于人脐静脉内皮细胞的 OGD/R 模型研究当归-川芎药对中 7 个活性成分对 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路的影响*

纪秋如¹, 泥文娟¹, 王晓艳², 张书琦², 吴娅丽², 牛璐²,
李琨¹, 李伟霞^{2**}, 唐进法^{2**}

(1. 河南中医药大学药学院 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院 河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心 河南省中药临床药理学重点实验室 河南省中药安全评价与风险防控工程研究中心 郑州 450000)

摘要:目的 探讨当归-川芎药对中 7 个活性成分(绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、丁烯基苯酚、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A、藁本内酯)对 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路关键蛋白及其上下游血管活性物质、黏附因子和炎症因子的调控作用。方法 构建人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型,采用细胞增殖试剂盒(CCK-8 法)检测细胞活力,探索 7 个成分的最佳造模时间;通过检测乳酸脱氢酶(LDH)释放探索最佳给药浓度;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 7 个成分对 VEGF、VCAM-1、PAI-1、NF- κ B、IL-1 和 IL-6 表达的影响;采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 7 个成分对 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路关键蛋白 mRNA 表达的影响。结果 HUVEC 氧糖剥夺 6 h 再复氧为最佳造模时间。高剂量绿原酸组、阿魏酸组、洋川芎内酯 H 组,低、中剂量丁烯基苯酚组,中、高剂量洋川芎内酯 A、藁本内酯组显著降低 LDH 漏出率($P < 0.05$, $P < 0.01$);绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 H 部分剂量组细胞中 VEGF、ICAM-1、VCAM-1 的表达显著降低,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 H、藁本内酯部分剂量组细胞 NF- κ B 的表达显著下降,绿原酸、咖啡酸、丁烯基苯酚、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A 部分剂量组细胞中 IL-6 的表达显著增加,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 A 部分剂量组细胞 IL-1 表达显著减少,阿魏酸、洋川芎内酯 H 部分剂量组细胞中 PAI-1 的表达量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、丁烯基苯酚和洋川芎内酯 A 部分剂量组细胞中 ERK、VEGF、NF- κ B、VEGFR2 和 MMP9 的 mRNA 相对表达量显著下调,洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 A 部分剂量组细胞中 AKT 的 mRNA 相对表达量均显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 当归-川芎中的药效成分可能通过抑制黏附因子、炎症因子和 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路关键蛋白 mRNA 的表达,从而发挥抗缺血性中风的作用。

关键词:当归-川芎药对 人脐静脉内皮细胞 药效成分 缺糖缺氧/复氧 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 信号通路

收稿日期: 2023-04-08

修回日期: 2023-06-16

* 国家自然科学基金委员会青年基金项目(82004082): 靶向 VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B 通路和 AA 级联代谢网络研究当归-川芎药对治疗缺血性中风的免疫炎症机制, 负责人: 李伟霞; 国家自然科学基金委员会河南人才培养联合基金项目(U1504827): 基于 JAK-STAT 信号通路研究当归-川芎药对补血、活血作用机制, 负责人: 李伟霞; 河南省科学技术厅河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(222301420087): 基于间接远程调控作用研究当归-川芎药对协同治疗缺血性中风的物质基础和作用机制, 负责人: 李伟霞。

** 通讯作者: 李伟霞, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 中药的物质基础和作用机制及临床合理应用; 唐进法, 主任药师, 博士研究生导师, 主要研究方向: 中药质量评价与合理用药。

缺血性中风(Ischemic stroke, IS)属于中医“中风”病,临床表现以猝然昏仆、不省人事或突然发生口眼歪斜、半身不遂、舌强语蹇、智力障碍为主要特征,其发病机制复杂,目前,西医尚无完好的治疗方法,而中医药在IS疾病的治疗中具有标本兼顾、综合治疗、整体调节的独特优势^[1],当归为“补血、活血”之圣药,现代药理研究表明具有抗炎、抗氧化、抗血栓、保护脑缺血损伤等作用^[2-3],川芎被称为“血中气药”,具有抗脑缺血、抗血栓形成、抗炎、抗氧化等药理作用^[4]。通过大量数据对中药治疗中风特点的挖掘发现,川芎、当归为治疗IS的高频用药,且为核心组合和药对,在治疗IS中起到活血通络之功用^[5]。前期网络药理学发现,PI3K-AKT、VEGF、NF- κ B信号通路是当归-川芎药对治疗脑血管疾病的3条主要信号通路,并且该药对治疗IS的通路可能也与PI3K信号通路有关^[6]。

当归和川芎中都含有有机酸、苯酚类化合物等,根据相关文献报道,芳香酸类、苯酚内酯类等是当归-川芎药对中的主要药效成分^[7-9]。因此,本研究以人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象,建立氧糖剥夺/复氧(Oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型,模拟体内脑缺血再灌注损伤,研究当归-川芎药对中的主要药效成分绿原酸(Chlorogenic acid)、阿魏酸(Ferulic acid)、咖啡酸(Caffeic acid)、丁烯基苯酚(Butylidenephthalide)、洋川芎内酯H(Senkyunolide H)、洋川芎内酯A(Senkyunolide A)、藁本内酯(Ligustilide)对VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B信号通路的影响,探讨其防治IS的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

HUVECs细胞由河南中医药大学第一附属医院中药药理实验室惠赠。

1.2 药物与试剂

对照品绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、丁烯基苯酚、洋川芎内酯A、藁本内酯(CHB190121、CHB180206、CHB180308、CHB190404、CHB180615、CHB181130,均购于成都克洛玛生物科技有限公司);对照品洋川芎内酯H(LW18010302,购于南京良纬生物科技有限公

司)。二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、DMEM无糖培养基、无酶无菌水(1129E034、20200604、20201208,均购于北京索莱宝科技有限公司);DMEM高糖培养基、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、青链霉素混合液(Penicillin-streptomycin, PS)、胰酶(14H16B73、NYMI1035、20190320、J190010,均购于HyClone公司);CCK8(PN558,购于东仁化学科技(上海)有限公司);LDH乳酸脱氢酶试剂盒(20200624,购于南京建成生物工程研究所);人纤溶酶原激活物抑制剂-1(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)试剂盒、人血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)试剂盒、人细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)试剂盒、人核转录因子- κ B(Nuclear factor kappa B, NF- κ B)试剂盒、人血管内皮细胞粘附分子-1(Vascular endothelial cell adhesion molecule-1, VCAM-1)试剂盒、人白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)试剂盒、人白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)试剂盒(20200826、20200826、20200826、20200910、20200910、20200910、Sep 2020,均购于上海苗彩生物科技有限公司);无水乙醇(20210109,购于郑州派尼化学试剂厂);RNA-Quick Purification Kit、Fast All-in-One RT Kit (with gDNA Remover)、2 \times Super SYBR Green qPCR Master Mix (20190901、20191001、20190201,均购于上海奕杉生物科技有限公司)。

1.3 仪器

CO₂恒温培养箱、三气培养箱、酶标仪、超微量分光光度计(3111、3427、Multiskan FC、NanoDrop one,均购于Thermo赛默飞世尔科技(中国)有限公司);梯度PCR仪(Labcyler 96,购于SensoQuest GmbH);荧光定量PCR仪(Roche cobas z 480,购于瑞士罗氏公司)。

2 方法

2.1 HUVECs细胞OGD/R模型的建立

将正常培养(含10% FBS、1% PS的DMEM高糖培养基)的HUVEC按每孔5000个左右铺于96孔板,培养10 h左右,此时生长密度约为70%。然后用移液枪将细胞培养基吸弃,用无菌PBS润洗一次,弃去,加入DMEM无糖培养基(含1% FBS、1% PS),置于三气培

养箱(37℃、5% CO₂、1% O₂)中培养,进行氧糖剥夺培养;氧糖剥夺后,弃去无糖培养基,加入含1% FBS、1% PS的DMEM高糖培养基,正常培养24 h。

2.2 CCK8检测HUVECs细胞存活率确定最佳造模时间点的影响

HUVEC细胞按5000个/孔接种于96孔板中,每孔100 μL,分为正常对照组、OGD/R模型组、绿原酸组(14.1 μmol·L⁻¹)、阿魏酸组(15.4 μmol·L⁻¹)、咖啡酸组(50 μmol·L⁻¹)、丁烯基苯酞组(1 μmol·L⁻¹)、洋川芎内酯H组(2 μmol·L⁻¹)、洋川芎内酯A组(15 μmol·L⁻¹)、藁本内酯组(2.5 μmol·L⁻¹),每组设置6个复孔,除正常对照组之外其他各组分别进行6、9、12、20 h的氧糖剥夺,氧糖剥夺后,正常组与模型组换成1% FBS、1% PS的DMEM高糖培养基,各给药组换成含有对应浓度单体的DMEM高糖培养基(含1% FBS、1% PS),继续于37℃、5% CO₂正常培养箱复氧24 h。吸弃培养基后每孔加60 μL的CCK8继续培养,40 min后,于酶标仪450 nm检测波长处测定吸光度(A)。细胞存活率= $A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

2.3 细胞培养液中LDH外漏量测定探索最佳给药浓度

取对数生长期的HUVEC细胞,以5000个/孔接种于96孔板中,每孔100 μL,分为绿原酸(正常对照组、OGD/R模型组、2.8、14.1、28.2 μmol·L⁻¹组)、阿魏酸组(正常对照组、OGD/R模型组、1.5、15.4、154 μmol·L⁻¹)、咖啡酸组(正常对照组、OGD/R模型组、25、50、100 μmol·L⁻¹)、丁烯基苯酞组(正常对照组、OGD/R模型组、0.1、1、10 μmol·L⁻¹)、洋川芎内酯H组(正常对照组、OGD/R模型组、0.2、2、20 μmol·L⁻¹)、洋川芎内酯A组(正常对照组、OGD/R模型组、7.5、15、30 μmol·L⁻¹)、藁本内酯组(正常对照组、OGD/R模型组、0.25、2.5、25 μmol·L⁻¹),各给药组设置的三个不同的给药剂量,为了方便在文章中用低、中、高剂量进行阐述。每组设置6个复孔,除正常对照组之外其他各组进行氧糖剥夺6 h,氧糖剥夺后,正常组与模型组换成1% FBS、1% PS的DMEM高糖培养基,各给药组换成相应的含有不同浓度单体成分的DMEM高糖培养基(含1% FBS、1% PS)继续于37℃、5% CO₂正常培养箱复氧24 h。收集细胞上清至1.5 mL离心管中,设置转速3000 r·min⁻¹离心10 min,吸取细胞上清,根据LDH试剂盒说明书操作方法检测LDH活性。

2.4 细胞培养液中细胞因子的测定

吸取2.3中所得的细胞上清,采用ELISA法检测相关因子的含量。

2.5 RT-PCR法测定细胞中通路相关蛋白mRNA表达

取对数生长期的HUVEC细胞按照4×10⁴个/孔接种于6孔板,每孔3 mL,分组同2.3,培养22 h左右后除正常对照组之外其他各组进行氧糖剥夺6 h,氧糖剥夺后,正常组与模型组换成1% FBS、1% PS的DMEM高糖培养基,各给药组换成相应的含有不同浓度单体成分的DMEM高糖培养基(含1% FBS、1% PS)继续于37℃、5% CO₂正常培养箱24 h,收集细胞,按RNA提取试剂盒说明提取细胞总RNA,按逆转录试剂盒说明逆转录成为cDNA,再以此cDNA为模板按PCR试剂盒说明进行实时PCR反应。使用2^{-ΔΔCt}法分析目的基因的表达,其中Ct代表循环阈值。各基因引物序列见表1。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间的数据比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 最佳造模时间点的确定

如表2所示,与正常对照组相比,HUVEC在缺糖缺氧6、9、12、20 h细胞活力均明显降低(P<0.01);与OGD/R组比较,绿原酸组、阿魏酸组、咖啡酸组、丁烯基苯酞组、洋川芎内酯H组、洋川芎内酯A组、藁本内酯组细胞活力在缺糖缺氧6 h后显著增高(P<0.05或P<0.01);丁烯基苯酞组、洋川芎内酯H组细胞活力在缺糖缺氧9 h后显著增高(P<0.05或P<0.01)。因此,确定HUVEC细胞OGD模型最佳造模时间点为6 h。

3.2 各药效成分对OGD/R后HUVECs中LDH活力的影响

如表3所示,与正常对照组比,OGD/R组细胞LDH漏出率明显增加(P<0.01);与OGD/R组比较,绿原酸、阿魏酸和洋川芎内酯H高剂量组显著降低LDH漏出率(P<0.05),丁烯基苯酞低、中剂量组显著降低LDH漏出率(P<0.05),洋川芎内酯A和藁本内酯中、高剂量组显著降低LDH漏出率(P<0.01)。

3.3 HUVEC 细胞培养液中相关细胞因子水平的测定

图 1 显示出当归-川芎药对中 7 个药效成分对 HUVECs 细胞上清中 VEGF 水平的影响,与正常对照

表 1 引物序列

基因名称	引物类型	基因序列(5'-3')
ERK	Forward	CGCCCTCCAAACGGCTCAA
	Reverse	GCAGCGCCTCCCTTGCTAGA
VEGF	Forward	AGGGCAGAATCATCAGAACT
	Reverse	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
PI3K	Forward	CTGTCAATCGGTGACTGTGTGG
	Reverse	AAACAGGTCAATGGCTGCATCATA
AKT1	Forward	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG
	Reverse	GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT
NF-κB1	Forward	AACAGAGAGGATTTCTTCCG
	Reverse	TTTGACCTGAGGTAAGACTTCT
MMP2	Forward	TACAGGATCATTGGCTACACACC
	Reverse	GGTCACATCGCTCCAGACT
MMP9	Forward	TGTACCCTATGGTTACACTCG
	Reverse	GCCAGGGACAGTTGCTTCT
VEGFR2	Forward	CCAGCAAAGCAGGGAGTCTGT
	Reverse	TGTCTGTGTCATCGGAGTGATATCC
GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGCTCGT
	Reverse	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

组比,绿原酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯 OGD/R 组均能显著增加细胞上清中 VEGF 水平($P<0.05, P<0.01$),阿魏酸 OGD/R 组显著降低细胞上清中 VEGF 水平($P<0.01$);与 OGD/R 组比较,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 H 各给药组以及藁本内酯 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著降低细胞上清中 VEGF 水平($P<0.05, P<0.01$),咖啡酸各给药组和藁本内酯 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著增加细胞上清中 VEGF 水平($P<0.05, P<0.01$)。

图 2 显示出当归-川芎药对中 7 个药效成分对 HUVECs 细胞上清中 ICAM-1 水平的影响,与正常对照组比,阿魏酸、丁烯基苯酚 OGD/R 组能显著增加细胞上清中 ICAM-1 水平($P<0.05, P<0.01$),洋川芎内酯 H OGD/R 组能显著降低细胞上清中 ICAM-1 水平($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,绿原酸 $14.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、 $28.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、阿魏酸各给药组、咖啡酸 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、洋川芎内酯 H $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均显著降低细胞上清中 ICAM-1 水平($P<0.05, P<0.01$),藁本内酯 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著增加细胞上清中 ICAM-1 水平($P<0.05, P<0.01$)。

图 3 显示出当归-川芎药对中 7 个药效成分对 HUVECs 细胞上清中 VCAM-1 水平的影响,与正常对

表 2 最佳建模时间点的确定($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	6 h	9 h	12 h	20 h
正常对照组	100.00±7.54	100.00±4.23	100.00±6.17	100.00±4.67
OGD/R 模型组	64.46±1.21**	58.14±2.23**	57.79±3.44**	52.92±5.47**
$14.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸组	68.95±2.68**	59.71±2.97	60.20±3.79	51.52±1.90
$15.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸组	68.62±2.80#	58.84±3.33	57.42±4.62	52.33±2.39
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡酸组	72.91±2.99**	61.45±3.84	59.43±1.35	50.98±3.51
$1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丁烯基苯酚组	69.98±3.50#	61.64±1.95#	60.28±3.56	50.26±3.26
$2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋川芎内酯 H 组	73.09±3.33**	62.30±2.25**	57.59±5.10	52.61±2.55
$15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋川芎内酯 A 组	73.83±1.91**	60.30±3.19	58.89±3.90	48.32±2.84
$2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 藁本内酯组	72.23±3.88**	59.84±3.58	57.34±4.79	54.56±3.40

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,# $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 各药效成分对 OGD/R 后 HUVECs 中 LDH 活力的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	正常对照组	OGD/R 模型组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
绿原酸	69.71±13.47	172.19±12.98**	168.94±20.73	180.78±7.67	154.45±7.13#
阿魏酸	78.52±17.18	200.26±23.32**	184.39±17.39	175.00±29.56	160.87±7.57#
咖啡酸	70.88±29.33	223.35±21.64**	234.04±47.10	209.96±22.20	218.58±32.15
丁烯基苯酚	121.64±45.43	216.44±22.97**	188.41±18.74#	167.14±31.35#	199.00±21.76
洋川芎内酯 H	76.00±19.80	204.30±55.65**	192.05±21.44	161.67±25.62	145.45±20.86#
洋川芎内酯 A	70.96±9.17	187.77±16.57**	176.96±18.97	148.14±13.57**	138.15±26.34**
藁本内酯	86.83±21.87	220.9±26.70**	203.69±24.46	161.73±25.41**	154.37±19.18**

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,# $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

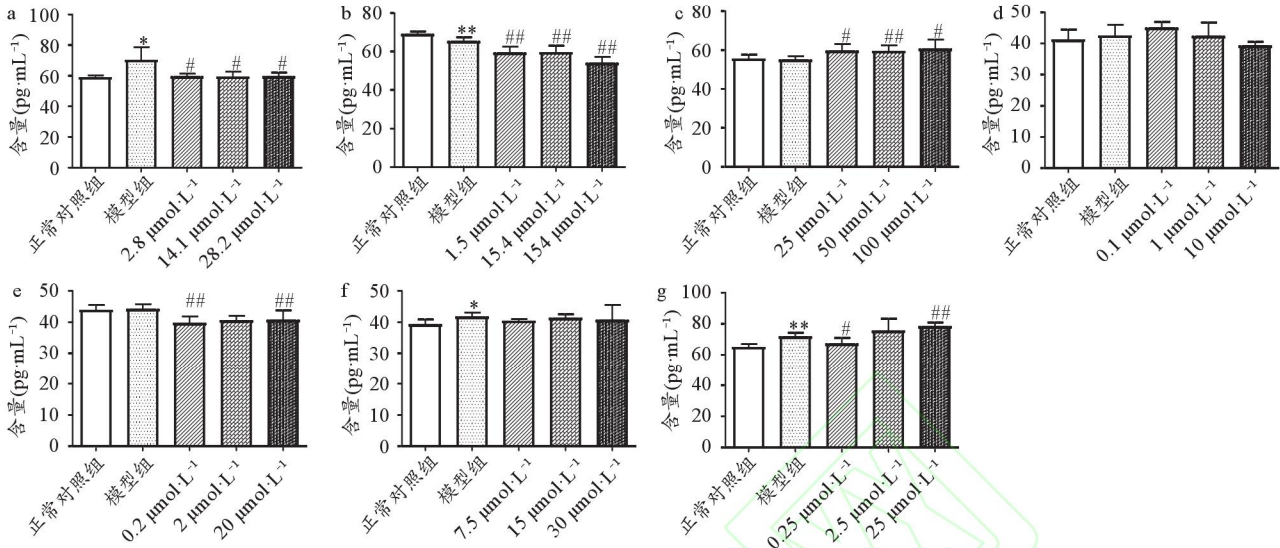


图1 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞VEGF水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与OGD/R组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

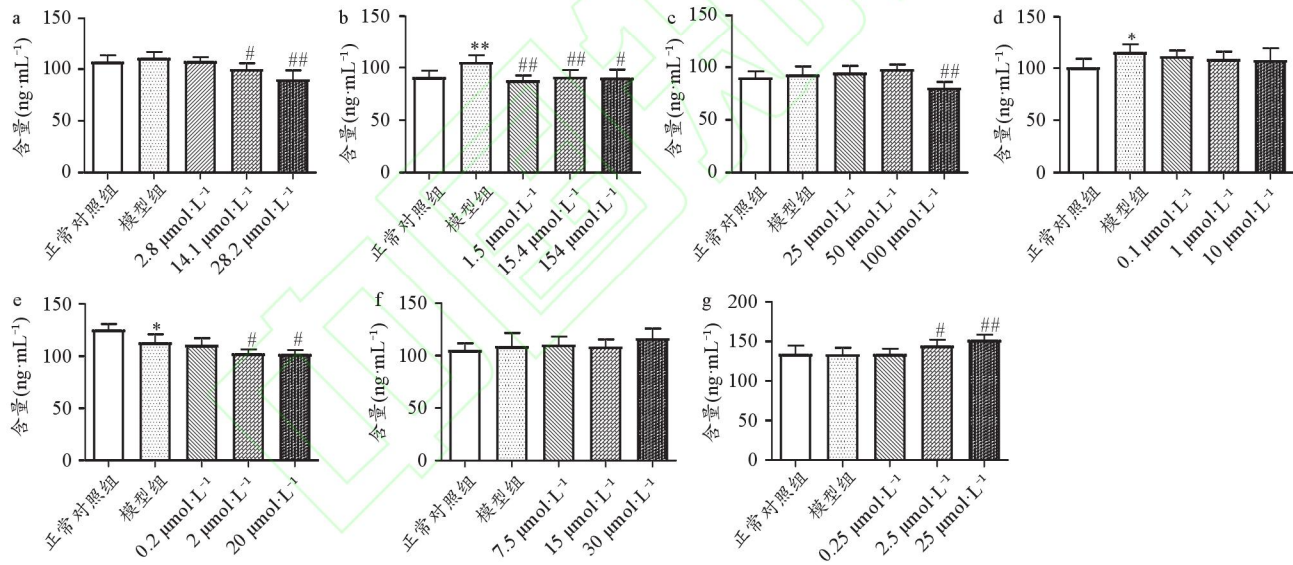


图2 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞ICAM-1水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与OGD/R组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

照组比,绿原酸、阿魏酸、藜本内酯 OGD/R 组能显著增加细胞上清中 VCAM-1 水平 ($P<0.05$); 与 OGD/R 组比较,绿原酸 $28.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、阿魏酸、洋川芎内酯 H 各给药组、藜本内酯 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均显著降低细胞上清中 VCAM-1 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 洋川芎内酯 A $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著增加细胞上清中 VCAM-1 水平 ($P<0.05$)。

图 4 显示出当归-川芎药对中 7 个药效成分对 HUVECs 细胞上清中 PAI-1 水平的影响,与正常对照组比,7 个单体成分的 OGD/R 组不同程度的增加或降低细胞上清中 PAI-1 水平,但无显著性差异 ($P>0.05$); 与 OGD/R 组比较,阿魏酸各给药组、洋川芎内酯 H $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、藜本内酯 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均显著降低细胞上清中 PAI-1 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$),

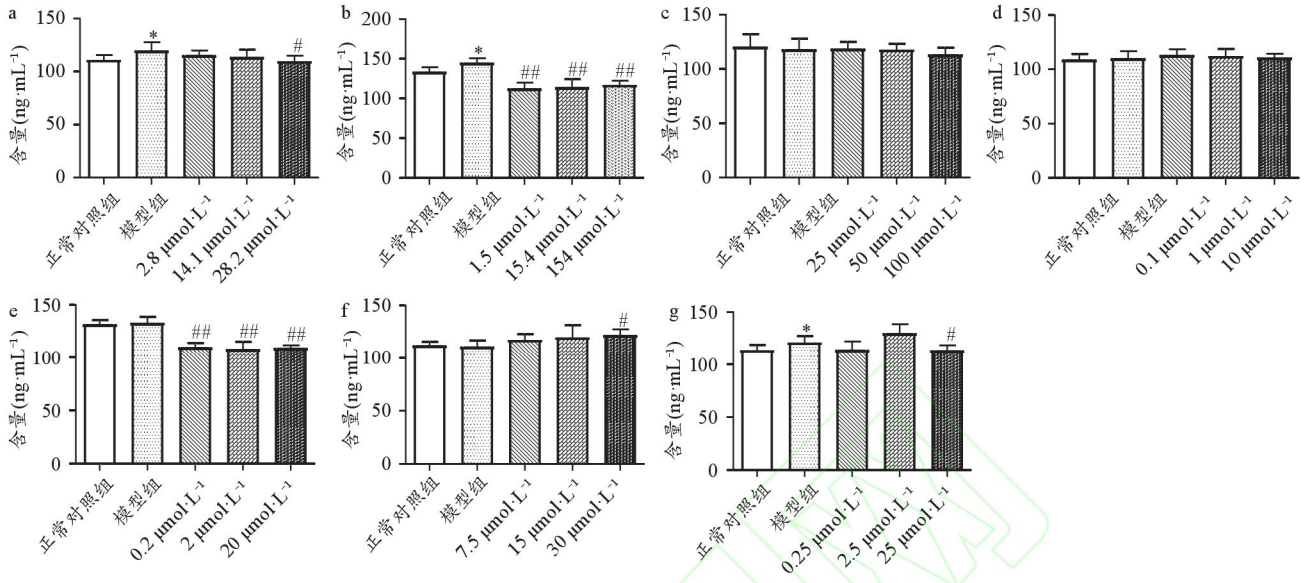


图3 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞VCAM-1水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,^{*} $P<0.05$;与OGD/R组比较,^{*} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

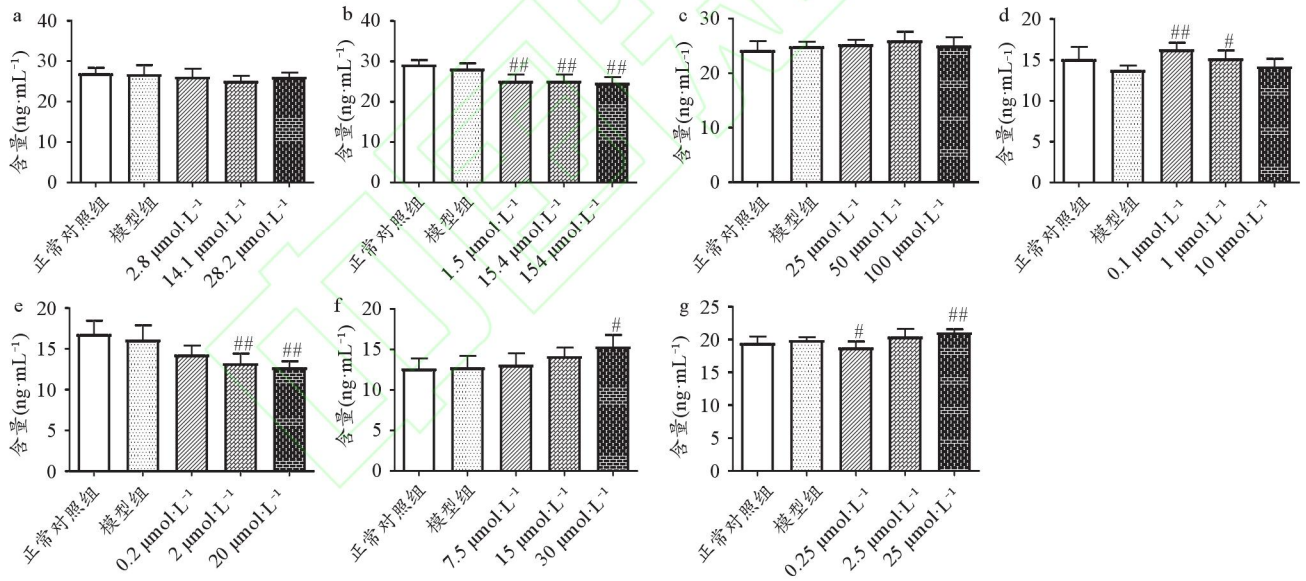


图4 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞PAI-1水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与OGD/R组比较,^{*} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

丁烯基苯酚 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、洋川芎内酯A $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、藜本内酯 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均显著增加细胞上清中PAI-1水平($P<0.05$, $P<0.01$)。

图5显示当归-川芎药对中7个药效成分对HUVECs细胞上清中NF- κ B水平的影响,与正常对照组比,绿原酸、丁烯基苯酚、藜本内酯OGD/R组能显著增加细胞上清中NF- κ B水平($P<0.05$, $P<0.01$);与

OGD/R组比较,绿原酸 $28.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、阿魏酸、洋川芎内酯H、藜本内酯各给药组均显著降低细胞上清中NF- κ B水平($P<0.05$, $P<0.01$),咖啡酸 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著增加细胞上清中NF- κ B水平($P<0.05$)。

图6显示当归-川芎药对中7个药效成分对HUVECs细胞上清中IL-1水平的影响,与正常对照组比,绿原酸OGD/R组显著增加细胞上清中IL-1水平

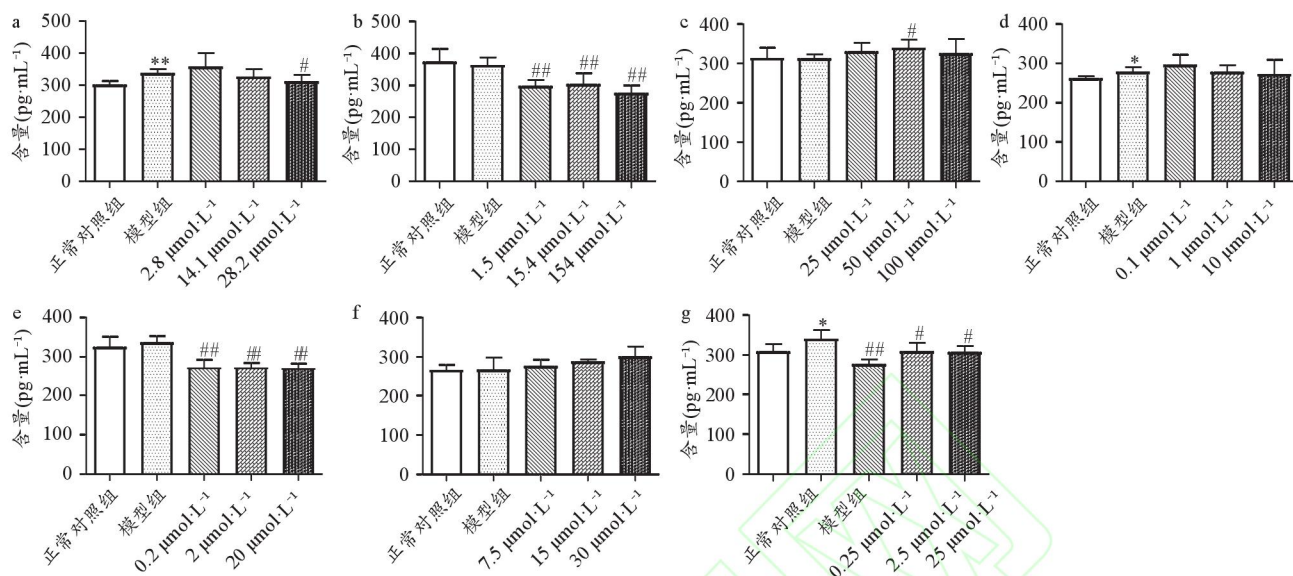


图5 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞NF-κB水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与OGD/R组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

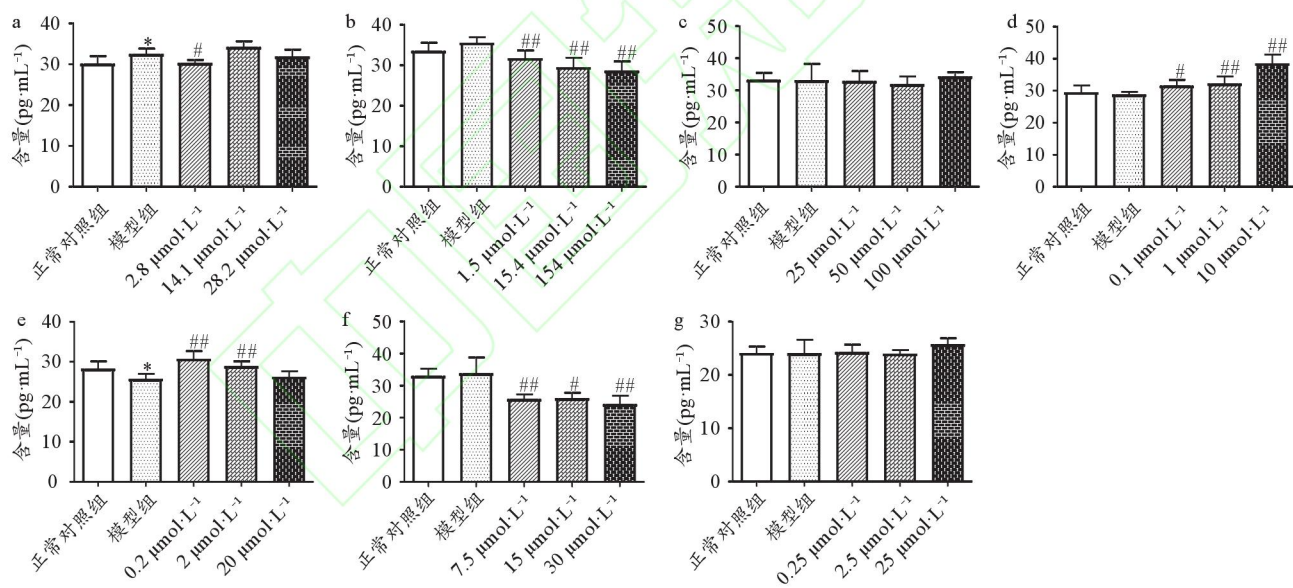


图6 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞IL-1水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,* $P<0.05$;与OGD/R组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

($P<0.05$),洋川芎内酯H OGD/R组显著降低细胞上清中IL-1水平($P<0.05$);与OGD/R组比较,绿原酸 $2.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、阿魏酸、洋川芎内酯A各给药组均显著降低细胞上清中IL-1水平($P<0.05$, $P<0.01$),丁烯基苯酚各给药组、洋川芎内酯H $0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著增加细胞上清中IL-1水平($P<0.05$,

$P<0.01$)。

图7显示出当归-川芎药对中7个药效成分对HUVECs细胞上清中IL-6水平的影响,与正常对照组比,7个单体成分的OGD/R组均显著降低细胞上清中IL-6的水平($P<0.01$);与OGD/R组比较,绿原酸 $28.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、咖啡酸 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、丁烯基苯酚

0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、洋川芎内酯H、洋川芎内酯A各给药组均显著增加细胞上清中IL-6水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4 各药效成分对 OGD/R 后信号通路关键蛋白 mRNA 表达的影响

3.4.1 绿原酸

由表4可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著上调PI3K、NF- κ B mRNA表达水平,显著下调MMP9 mRNA表达水平($P<0.05$);与OGD/R组相比,绿原酸2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、28.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调ERK mRNA表达水平,2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、14.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调NF- κ B mRNA表达水平,绿原酸各给药组显著下调VEGF、PI3K mRNA表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4.2 阿魏酸

由表5可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著上调ERK、NF- κ B、MMP9 mRNA表达水平,显著下调PI3K mRNA表达水平($P<0.05, P<0.01$);与OGD/R组相比,阿魏酸各给药组显著下调ERK mRNA表达水平,阿魏酸15.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调NF- κ B、VEGFR2 mRNA表达水平,15.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调VEGFR mRNA表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4.3 咖啡酸

由表6可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著下调PI3K mRNA表达水平,显著上调MMP9 mRNA表达水平($P<0.05, P<0.01$);与OGD/R组相比,咖啡酸25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调AKT mRNA表达水平,

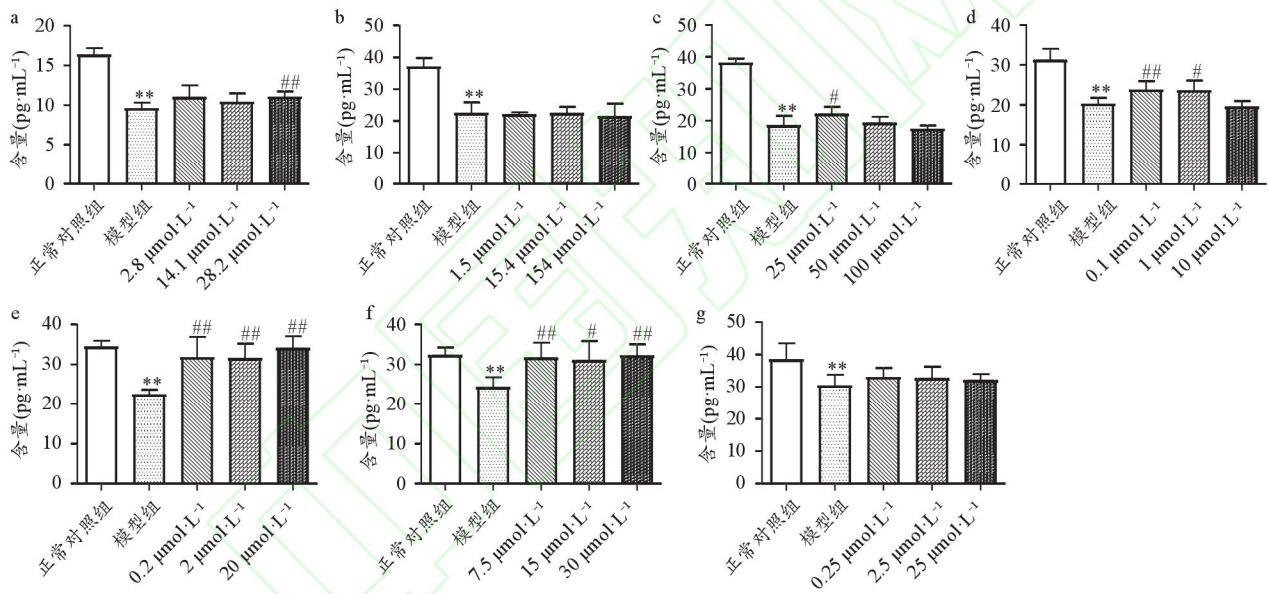


图7 OGD/R后各活性成分对HUVECs细胞IL-6水平的影响

注:a:绿原酸;b:阿魏酸;c:咖啡酸;d:丁烯基苯酚;e:洋川芎内酯H;f:洋川芎内酯A;g:藜本内酯;与正常对照组比较,** $P<0.01$;与OGD/R组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表4 绿原酸对通路相关蛋白mRNA相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R组	2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	14.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	28.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.05±0.40	1.36±0.08	0.50±0.20**	0.88±0.33	0.77±0.17#
VEGF	1.02±0.23	1.14±0.28	0.62±0.22*	0.66±0.12#	0.70±0.25#
PI3K	1.02±0.21	1.97±0.87*	0.82±0.26*	0.92±0.17#	1.07±0.42*
AKT	1.18±0.85	0.77±0.23	0.46±0.11	0.60±0.14	0.54±0.07
NF- κ B	1.02±0.27	1.45±0.14*	0.88±0.27**	0.97±0.02#	1.26±0.14
VEGFR2	1.22±0.98	0.31±0.24	0.48±0.39	0.18±0.09	1.43±2.20
MMP2	1.08±0.46	1.34±0.90	1.29±0.32	2.29±0.39	2.05±1.24
MMP9	1.12±0.65	0.21±0.33*	0.52±0.40	0.04±0.03	0.36±0.54

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与OGD/R组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表5 阿魏酸对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	15.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	154 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.03±0.30	1.88±0.26 [†]	1.03±0.43 [#]	1.00±0.56 [#]	0.82±0.20 ^{##}
VEGF	1.02±0.27	0.85±0.05	1.04±0.21	0.95±0.20	1.12±0.20 [#]
PI3K	1.07±0.49	0.54±0.03 [†]	0.43±0.07	0.62±0.07	0.75±0.07
AKT	1.02±0.24	0.79±0.09	0.78±0.14	0.71±0.21	0.81±0.25
NF- κ B	1.00±0.11	1.82±0.32 ^{**}	1.82±0.57	2.50±0.06 [#]	1.63±0.13
VEGFR2	1.02±0.23	0.52±0.16	0.75±0.12	4.28±3.26 [#]	2.95±1.66
MMP2	1.04±0.34	2.47±0.18	2.52±0.51	3.47±0.62	2.91±2.30
MMP9	1.20±0.71	4.68±0.66 [†]	3.14±2.26	5.44±2.00	2.70±2.26

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表6 咖啡酸对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.19±0.87	1.29±0.23	1.10±0.24	1.53±0.61	1.57±0.30
VEGF	1.01±0.16	0.68±0.19	0.98±0.02	1.38±0.15 ^{##}	1.40±0.42 ^{##}
PI3K	1.02±0.26	0.50±0.17 ^{**}	0.62±0.18	0.77±0.03	0.79±0.02
AKT	1.01±0.19	0.95±0.34	0.57±0.10 [#]	0.69±0.21	0.74±0.15
NF- κ B	1.00±0.09	0.97±0.29	0.62±0.09	1.58±0.30 [#]	0.80±0.22
VEGFR2	1.04±0.31	0.42±0.17	0.54±0.32	0.52±0.30	0.41±0.16
MMP2	1.03±0.27	0.48±0.27	0.74±0.40	0.89±0.97	1.62±1.25
MMP9	0.65±0.11	2.20±1.10 [†]	1.88±0.83	0.93±0.28 [#]	0.17±0.09 ^{##}

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表7 丁烯基苯酚对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.00±0.12	0.96±0.11	0.49±0.08 ^{##}	0.55±0.12 ^{##}	0.49±0.06 ^{##}
VEGF	1.03±0.28	0.59±0.33	1.39±0.45	1.34±0.01	1.19±0.53
PI3K	1.03±0.27	1.17±0.04	0.79±0.17 [#]	0.76±0.07 ^{##}	0.95±0.12
AKT	1.00±0.10	0.74±0.42	0.64±0.21	1.20±0.34	0.86±0.29
NF- κ B	1.03±0.29	1.16±0.47	2.11±0.75 [#]	1.14±0.15	0.82±0.27
VEGFR2	1.02±0.23	0.76±0.06	0.88±0.88	1.71±0.20	3.63±1.85 ^{##}
MMP2	1.04±0.36	1.77±0.70	1.00±0.35	2.73±0.34	3.46±1.71 [#]
MMP9	1.12±0.57	1.56±0.74 [†]	1.48±0.62	2.18±0.02	1.17±0.47 ^{##}

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 VEGF、NF- κ B mRNA 表达水平,显著下调 MMP9 mRNA 表达水平,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 VEGF mRNA 表达水平,显著下调 MMP9 mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4.4 丁烯基苯酚

由表7可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著上调 MMP9 mRNA 表达水平($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,丁烯基苯酚 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调 ERK、PI3K mRNA 表达水平,显著上调 NF- κ B mRNA 表达水平,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调 ERK、PI3K mRNA 表达水平,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著下调 ERK、MMP9 mRNA 表达水平,

显著上调 VEGFR2、MMP2 mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4.5 洋川芎内酯H

由表8可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著下调 ERK、VEGFR2、MMP2、MMP9 mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$);与 OGD/R 组相比,洋川芎内酯H各给药组显著下调 PI3K mRNA 表达水平,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 VEGFR、AKT mRNA 表达水平($P<0.05$)。

3.4.6 洋川芎内酯A

由表9可知,与正常对照组相比,OGD/R组显著上调 PI3K、MMP9 mRNA 表达水平($P<0.05$);与 OGD/R

表 8 洋川芎内酯 H 对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.00±0.03	0.53±0.07**	0.46±0.15	0.69±0.08	0.42±0.12
VEGF	1.02±0.25	0.64±0.25	0.84±0.08	1.38±0.47###	0.92±0.21
PI3K	1.01±0.15	1.39±0.36	0.84±0.15 [#]	0.85±0.13 [#]	0.73±0.34##
AKT	1.05±0.39	0.76±0.22	0.47±0.05	1.15±0.02 [#]	0.79±0.16
NF- κ B	1.07±0.49	0.75±0.19	0.75±0.16	0.77±0.07	1.04±0.11
VEGFR2	1.06±0.40	0.02±0.01**	0.03±0.01	0.01±0.00	0.02±0.01
MMP2	1.06±0.47	0.47±0.09 [†]	0.60±0.31	0.36±0.10	0.30±0.06
MMP9	1.02±0.25	0.03±0.01**	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$,** $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

表 9 洋川芎内酯 A 对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.09±0.58	0.98±0.16	1.29±0.11	0.96±0.08	0.87±0.01
VEGF	1.01±0.13	0.69±0.19	0.63±0.11	0.65±0.03	0.97±0.42
PI3K	1.00±0.05	1.63±0.37 [†]	1.51±0.15	1.74±0.30	1.42±0.41
AKT	1.06±0.47	0.72±0.10	1.18±0.07	1.37±0.30 [#]	1.72±0.19##
NF- κ B	1.03±0.31	1.72±0.38	1.19±0.57	1.61±0.42	0.87±0.26 [#]
VEGFR2	1.01±0.19	1.83±0.92	1.40±0.23	0.84±0.63 [#]	0.65±0.26 [#]
MMP2	1.49±1.10	3.15±1.08	9.48±7.68	3.70±1.64	3.66±1.27
MMP9	1.02±0.24	10.98±2.90 [†]	13.93±8.31	6.09±2.36	4.45±1.19

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

表 10 藁本内酯对通路相关蛋白 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	正常对照组	OGD/R 组	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ERK	1.00±0.08	0.44±0.10**	1.07±0.27##	1.38±0.26##	0.94±0.07##
VEGF	1.03±0.32	1.27±0.19	1.29±0.07	1.32±0.24	1.29±0.22
PI3K	1.08±0.49	0.51±0.18 [†]	0.84±0.20	0.76±0.15	0.75±0.10
AKT	1.00±0.10	1.07±0.19	0.94±0.20	1.08±0.37	0.84±0.04
NF- κ B	1.02±0.26	1.13±0.28	0.94±0.07	0.97±0.14	1.28±0.50
VEGFR2	1.14±0.60	0.33±0.13	1.11±0.53	1.56±0.55 [#]	1.07±0.76
MMP2	1.42±1.04	1.97±0.94	0.96±0.51	2.22±0.39	1.18±0.79
MMP9	1.05±0.43	0.49±0.17	0.66±0.05	0.85±0.19	0.35±0.17

注:与正常对照组比较,[†] $P<0.05$,** $P<0.01$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

组相比,洋川芎内酯 A 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 AKT mRNA 表达水平,显著下调 VEGFR2 mRNA 表达水平,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 AKT mRNA 表达水平,显著下调 NF- κ B、VEGFR2 mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$)。

3.4.7 藁本内酯

由表 10 可知,与正常对照组相比,OGD/R 组显著下调 ERK、PI3K mRNA 表达水平($P<0.05, P<0.01$);与 OGD/R 组相比,藁本内酯各给药组显著上调 ERK mRNA 表达水平,2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组显著上调 VEGFR2 mRNA 表达($P<0.05, P<0.01$)。

4 讨论

缺血性脑卒中是由血管狭窄或闭塞所致脑组织缺血缺氧、进而引起脑功能障碍甚至死亡的一种疾病,其发生、发展的关键环节与血管内皮的损伤密切相关^[10]。当归偏养血补血,川芎偏行血散血,二药相使配对,可协同增强养血补血、活血祛瘀之功,显著改善脑缺血/再灌注损伤大鼠的血液流变学指标,对脑组织的细胞形态也有较好改善作用^[11]。在此研究中,归芎药对中的绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、丁烯基苯酚、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A 和藁本内酯均能不同程度

增加缺糖缺氧 6 h 后 HUVEC 细胞的活力 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

VEGF 是一种内皮细胞强力丝裂剂,能够促进内皮细胞的生长,在神经保护中起着重要作用,能修复由 IS 引起的神经损伤和脑组织损伤^[12]。有文献报道,藁本内酯能降低 VEGF 的含量^[13],本研究中藁本内酯 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能显著降低 VEGF 的含量。NF- κB 是一种广泛研究的由炎症细胞因子、脂多糖等多种刺激诱导的二聚体转录因子,能诱导促炎症分子 IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达,对黏附分子、细胞因子等在炎症和免疫反应基因的转录起着关键性作用^[14-15]。内皮细胞黏附分子主要有 VCAM-1 和 ICAM-1,其表达可促进白细胞释放炎症介质和细胞因子,而炎症介质和细胞因子可以增加 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,二者相互作用,从而加剧脑后的炎症反应^[16]。PAI-1 由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞、单核细胞及血小板等分泌,参与动脉粥样硬化的形成。绿原酸、阿魏酸和咖啡酸能抑制 ICAM-1、PAI-1 及 IL-6 的表达,且对血管内皮细胞的炎症有一定的干预作用^[17]。藁本内酯通过上调 miR-181b 抑制 NF- κB 表达从而抑制 IL-6、ICAM-1 及 VCAM-1 的表达^[18]。洋川芎内酯 H 能减轻 MPP+ 处理后 PC12 细胞造成的氧化损伤,抑制 NF- κB 的累积,通过活性氧介导的 MAPK 途径发挥神经保护作用^[19]。洋川芎内酯 A 显著降低中脑动脉栓塞 (Middle cerebral artery embolism, MCAO) 大鼠脑组织中的白介素-1 β 、IL-6、丙二醛水平,增加超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性,通过抑制氧化应激反应和促炎因子的释放而保护脑缺血/再灌注 (Cerebral ischemia-reperfusion, I/R) 引起的损伤^[20]。本研究部分有效成分结果显示,绿原酸 ($14.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $28.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、咖啡酸 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 显著降低 ICAM-1 的表达,藁本内酯 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 显著降低 VCAM-1 的表达,阿魏酸 ($1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $15.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $154 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 显著降低 ICAM-1、PAI-1 的表达。

细胞外信号调节激酶 (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) 是一种由多种机制激活的混杂激酶,是 MAPK 信号家族的主要组成部分,主要与细胞分化、细胞增殖和细胞凋亡有关^[21]。目前,关于 ERK 信号通路在 I/R 损伤中对神经细胞的保护作用或凋亡作用存在争议,朱丽娟等^[22]研究发现当归挥发油改善

PC12 细胞膜的通透性,降低细胞脂质过氧化反应,其机制可能是通过激活 ERK 信号通路抑制缺血再灌注神经细胞凋亡,保护受损细胞。杨徐一等^[23]研究发现参芎化瘀胶囊可以改善 I/R 大鼠脑梗死体积和脑组织病变,通过抑制 MAPK/ERK 信号通路的激活,从而抑制细胞凋亡,实现对脑缺血/再灌注神经损伤的保护作用。在此研究中,藁本内酯各给药组显著上调 ERK mRNA 表达水平,而绿原酸 ($2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $28.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、阿魏酸和丁烯基苯酚各给药组显著抑制 ERK 的表达,与文献表达一致^[24]。

正磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶 (Protein kinase B, AKT) 信号通路在调节各种类型细胞的细胞增殖、分化、迁移和凋亡中起着重要作用,其信号通路的激活能促进神经元的存活,是 IS 治疗的关键通路^[25], PI3K/AKT 信号通路的下调会使 NF- κB 抑制性蛋白 I $\kappa\text{B}\alpha$ 的表达下调,促进 NF- κB 磷酸化,下调 NF- κB 对脑缺血有明显的神经保护作用^[26]。基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 是一种主要由脑微血管内皮细胞合成分泌的明胶酶,在局部脑缺血早期就被激活,激活后的 MMP-9 可通过破坏血脑屏障 (Blood-brain barrier, BBB) 结构使其通透性增加而加重脑水肿等缺血性脑损伤症状^[27-28]。当归可通过抑制 NF- κB 信号通路来抑制大鼠成纤维样滑膜细胞炎症增殖,减轻炎症反应^[29],川芎嗪抑制 NF- κB 信号通路,减少炎症因子的产生,抗 I/R 引起的损伤^[30]。此外,当归可以激活 PI3K/AKT 通路,抑制 MMP9 的表达,减小 I/R 引起的脑梗死体积及血-脑屏障通透性等作用^[31-32]。在 MCAO 大鼠中,川芎嗪能减轻脑梗死体积,下调 IL-6、TNF- α 的表达,上调 PI3K、P-AKT/AKT 的表达保护 I/R 引起的损伤^[33]。本研究结果显示,绿原酸 ($2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $14.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组和洋川芎内酯 A ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组显著抑制 NF- κB 的表达,咖啡酸 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组和丁烯基苯酚 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组显著抑制 MMP9 的表达,洋川芎内酯 A ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组显著增加 AKT 的表达。

综上所述,当归-川芎药对中的部分药效成分提高 OGD/R 后 HUVEC 的细胞活力,抑制黏附因子和炎症因子相关指标的表达,可能与 VEGF-PI3K-AKT/NF- κB 信号通路相关。

参考文献

- 陈孝男, 杨爱琳, 赵亚楠, 等. 缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展. 中国中药杂志, 2019, 44(3):422-432.
- Kim R, Kim P, Lee C Y, *et al.* Multiple combination of *Angelica gigas* extract and mesenchymal stem cells enhances therapeutic effect. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(12):1748-1756.
- Ohkura N, Ohnishi K, Taniguchi M, *et al.* Anti-platelet effects of chalcones from *Angelica keiskei koidzumi* (ashitaba) *in vivo*. *Pharmazie*, 2016, 71(11):651-654.
- Chen Z J, Zhang C, Gao F, *et al.* A systematic review on the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Chuanxiong). *Food Chem Toxicol*, 2018, 119:309-325.
- 刘亚鹭, 徐士欣, 张军平, 等. 川芎-当归药对有效成分在缺血性脑卒中应用的研究进展. 华西药理学杂志, 2018, 33(6):660-663.
- 杨正飞, 杨小燕, 陈叶飞, 等. 当归-川芎药对治疗脑梗死的“调控网络”和机制. 中医学报, 2020, 35(1):149-154.
- 李伟霞, 唐于平, 王欢, 等. 药对研究(VII)——当归-川芎药对. 中国中药杂志, 2013, 38(24):4220-4226.
- 李伟霞, 唐于平, 尚尔鑫, 等. 当归、川芎和归芎药对中主要芳香酸类成分在血虚大鼠体内的代谢研究. 中华中医药杂志, 2013, 28(5):1212-1218.
- 冯敬骞, 杨义芳. 当归、川芎及其药对的超临界提取物的GC-MS成分分析. 中国医药工业杂志, 2009, 40(10):754-757.
- 杜澍金. 黄芪甲苷对缺血缺氧性脑血管内皮损伤作用的研究进展. 重庆医学, 2019, 48(21):3720-3723.
- 李伟霞, 王晓艳, 唐进法, 等. 基于PLS-DA和多指标综合指数法研究当归-川芎药对对急性血瘀大鼠血清中血管活性物质和黏附分子的影响. 药学报, 2019, 54(11):1909-1917.
- Zhang W, Wu Y Q, Chen H, *et al.* Neuroprotective effects of SOX5 against ischemic stroke by regulating VEGF/PI3K/AKT pathway. *Gene*, 2021, 767:145-148.
- 王立宏, 武兴斌, 王利. 藜本内酯抗人肺癌A549细胞增殖作用研究. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(7):55-59.
- Pires B R B, Silva R C M C, Ferreira G M, *et al.* NF- κ B: Two sides of the same coin. *Genes*, 2018, 9(1):24.
- Du S B, Deng Y L, Yuan H J, *et al.* Safflower yellow B protects brain against cerebral ischemia reperfusion injury through AMPK/NF- κ B pathway. *Evid Based Complementary Alternat Med*, 2019, 2019:7219740.
- Miao M S, Cao L H, Li R Q, *et al.* Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat models. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4):556-563.
- 周英, 李敏, 孙黔云. 绿原酸、咖啡酸和阿魏酸对补体旁路激活致内皮细胞炎症相关分子表达的干预. 中国药理学通报, 2016, 32(12):1723-1728.
- 黄志勇, 田广永, 曹玲, 等. 藜本内酯上调miR-181 b减轻氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞炎症损伤. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7):18-23.
- Luo Y Y, Li X Q, Liu T W, *et al.* Senkyunolide H protects against MPP⁺-induced apoptosis via the ROS-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 65:73-81.
- 林红. 洋川芎内酯A对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究. 北方药学, 2016, 13(4):114-115.
- Wu C X, Wang J, Li C, *et al.* Effect of electroacupuncture on cell apoptosis and ERK signal pathway in the *Hippocampus* of adult rats with cerebral ischemia-reperfusion. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:414965.
- 朱丽娟, 罗建云, 张安平, 等. 当归挥发油通过激活ERK信号通路以减轻缺血再灌注神经细胞凋亡的作用. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(17):1679-1682.
- 杨徐一, 许仁军, 杨黎萍, 等. 参芎化瘀胶囊通过MAPK/ERK对脑缺血/再灌注大鼠的神经保护作用研究. 中国中医急症, 2018, 27(11):1906-1911.
- 李淑颖, 侯永忠, 葛志强. 川芎当归提取物对血管平滑肌细胞MAPK信号通路及周期蛋白的调控效应. 中草药, 2006, 37(8):1217-1221.
- Wang M M, Zhang M, Feng Y S, *et al.* Electroacupuncture inhibits neuronal autophagy and apoptosis via the PI3K/AKT pathway following ischemic stroke. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14:134.
- Harikrishnan H, Jantan I, Haque M A, *et al.* Anti-inflammatory effects of hypophyllanthin and niranthin through downregulation of NF- κ B/MAPKs/PI3K-Akt signaling pathways. *Inflammation*, 2018, 41(3):984-995.
- 戴凌燕, 程碧环, 李军. 姜黄素对大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响及机制. 中药材, 2015, 38(2):344-349.
- 林咸明, 陈丽萍, 姚旭. 不同疗程电针预处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子的影响. 针刺研究, 2015, 40(1):40-44.
- 陈贺宁, 王长志, 孟晓莹, 等. 基于NF- κ B和JAK/STAT通路探讨黄芪、当归、忍冬藤水提冻干粉调控大鼠滑膜细胞增殖和凋亡的作用机制. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(1):20-24.
- 刘和兰, 李健哲, 梁荣寿. 川芎嗪对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究. 现代医药卫生, 2014, (10):1446-1448.
- 程永杰, 赵子瑞, 李晓妮, 等. 朝鲜当归提取物对小鼠脑缺血-再灌注损伤神经的保护作用及其机制. 医药导报, 2020, 39(1):22-26.
- 王新立, 刘汝银, 王西彬, 等. 当归对氧化应激损伤的大鼠髓核细胞增殖和胞外基质合成的影响. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(1):119-122.
- 朱百科, 王新新, 赵恒. 川芎嗪通过激活VEGF介导的PI3K/AKT信号通路缓解大鼠脑缺血再灌注引起的损伤. 河北医学, 2020, 26(6):912-917.

HUVEC-Based OGD/R Injury Model to Study the Effect of Danggui-Chuanxiong Herb Pair Medicine on the Main Pharmacological Components on VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B Signaling Pathway

Ji Qiuru¹, Ni Wenjuan¹, Wang Xiaoyan², Zhang Shuqi², Wu Yali², Niu Lu², Li Kun¹, Li Weixia², Tang Jinfa²

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Henan Traditional Chinese Medicine Clinical Application, Evaluation and Transformation Engineering Research Center, Henan Traditional Chinese Medicine Clinical Pharmacy Traditional Chinese Medicine Key Laboratory, Henan Traditional Chinese Medicine Safety Evaluation and Risk Prevention and Control Engineering Research Center, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Objective To study the effects of Danggui-Chuanxiong herb pair medicine on vasoactive substances, adhesion factors, inflammatory factors, and VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B signaling pathways, in order to elucidate the mechanism of Danggui-Chuanxiong herb pair on the treatment of ischemic stroke (IS). Methods The oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was constructed, and the cell viability was detected by cell proliferation kit (CCK-8 method) to explore the optimal modeling time of seven components; The release of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by cytotoxicity kit; The expression of related cytokines was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); The mRNA expression of key proteins in the signaling pathway was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results Reoxygenation after 6 h of oxygen-glucose deprivation of HUVEC is the best modeling time. High-dose chlorogenic acid group, ferulic acid group, senkyunolide H, low-dose and medium-dose butylidenephthalide group, medium-dose and high-dose senkyunolide A and ligustilide groups significantly decreased LDH leakage rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$); The expression of IL-6 in the cells of the partial dose group of chlorogenic acid, caffeic acid, butenylphthalide, senkyunolide H and senkyunolide A was significantly increased, the expression of IL-1 in the cells of the partial dose group of chlorogenic acid, ferulic acid and senkyunolide A was significantly decreased, the expression of VEGF, ICAM-1 and VCAM-1 in the cells of the partial dose group of chlorogenic acid, ferulic acid and senkyunolide H was significantly decreased, the expression of NF- κ B in the cells of the partial dose group of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide H and ligustilide was significantly decreased, the expression of PAI-1 in the cells of ferulic acid and senkyunolide H partial dose group decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$); The mRNA relative expression levels of ERK, VEGF, NF- κ B, VEGFR2 and MMP9 were significantly down-regulated in the cells of chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, butylidenephthalide and senkyunolide A partial dose group, while the mRNA relative expression levels of AKT were significantly up-regulated in the cells of senkyunolide H and senkyunolide A partial dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion The medicinal components of Danggui-Chuanxiong herb pair may play a role in IS by inhibiting the mRNA expression of adhesion factor, inflammatory factor and key protein of VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B signaling pathway in HUVEC.

Keywords: Danggui-Chuanxiong herb pair, Human umbilical vein endothelial cells, Effective ingredients, Hypoglycemia/hypoxia/reoxygenation, VEGF-PI3K-AKT/NF- κ B signaling pathway

(责任编辑: 李青)