

天麻乙醇提取物促进小鼠下肢缺血模型血管新生的作用研究*

张冰琳, 夏霜莉, 马琛婧, 李秀芳, 代 蓉[△]

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 考察天麻 80%乙醇提取物(以下简称“天麻醇提物”)对小鼠下肢缺血模型血管新生的作用并初步探讨其作用机制,为其用于治疗下肢缺血性疾病提供实验依据。**方法** 雄性昆明种小鼠 72 只,随机分为模型组、假手术组、天麻醇提物组不同处理时间组,采用阻断股动脉法复制小鼠下肢缺血模型,造模后连续给予天麻醇提物(0.94 g/kg),分别于给予受试物后第 1、3、7、14 天,采用激光散斑扫描仪检测血流量,观察血流恢复情况;qPCR 法检测血管内皮生长因子 A (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF-A)、血管内皮生长因子受体 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR-2)、血管生成素 2 (Angiopoietin 2, Angpt2) mRNA 的表达;术后 7、14 d 采用免疫荧光三标法(Ki67/Tomato-Lectin/DAPI)标记腓肠肌组织新生血管。**结果** 与模型组比较,天麻醇提物组术后 3、7 d,缺血侧血流增加($P<0.001$)、Ki67 阳性表达增多;术后 1、3 d,缺血侧 VEGF-A、Angpt2 mRNA 的表达上调($P<0.01$ 、 $P<0.05$);术后 7 d,VEGFR-2 和 Angpt2 mRNA 的表达上调($P<0.05$)。**结论** 天麻醇提物能够促进小鼠下肢缺血模型的血管新生,其作用机制可能与促进促血管新生因子 VEGF-A 及其受体 VEGFR-2、Angpt2 的表达相关。

关键词: 天麻醇提物;下肢缺血;血管新生;血管内皮生长因子 A;血管内皮生长因子受体 2;血管生成素 2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2019)04-0015-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.003

Effect of Ethanol Extract of Gastrodiae Rhizoma on Angiogenesis in Ischemic Hindlimbs of Mice

ZHANG Binglin, XIA Shuangli, MA Chenjing, LI Xiufang, DAI Rong

(School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of 80% ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma (hereinafter referred to as “extractive from ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma”) on angiogenesis in ischemic hindlimbs of mice, and to provide experimental basis for the treatment of ischemic diseases of lower extremity. **Methods** 72 male mice were randomly divided into the model group, the sham operation group and the ethanol extraction group with different treat time. The model of lower limb ischemia was established by blocking femoral artery. After modeling the mice were continuously administrated with ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma 0.94 g/kg. The blood flow of ischemic was measured with a laser Doppler blood flow (LDBF) analyzer on the 1, 3, 7 and 14 d after giving the samples. The expressions of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) and angiopoietin 2 (Angpt2) mRNA were detected by performing qPCR. The neovascularization of gastrocnemius muscle was labeled by immunofluorescence triple labeling (Ki67/Tomato-Lectin/DAPI) at the 7 and 14 d after operation. **Results** Compared with the model group, the blood flow and the positive expression of Ki67 in the ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma group were increased on the 3 and 7 d after operation($P<0.001$). The expressions of VEGF-A and Angpt2 mRNA on the ischemic side were up-regulated on the 1 and 3 d after operation. On the 7 d after operation, the expressions of VEGFR-2 and Angpt2 mRNA were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma may promote angiogenesis in mouse lower limb ischemia model, and its mechanism may be related to promoting the expression of angiogenic factor VEGF-A and its receptor 2 and Angpt2.

KEY WORDS: ethanol extract of Gastrodiae Rhizoma; lower limb ischemia; angiogenesis; VEGF-A; VEGFR-2; Angpt2

收稿日期: 2019-07-08

* 基金项目: 国家自然科学基金(81660677);云南省科技计划重点项目(2017FA046);云南省科技计划项目(2018FF001(-007))

第一作者简介: 张冰琳(1994-),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学。

[△]通信作者: 代蓉, E-mail: 1647029626@qq.com

下肢缺血性疾病是动脉狭窄或闭塞而导致肢体远端组织灌注不足的一类疾病,以动脉硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎和糖尿病足最为常见^[1],有极高的致残率、致死率,危害着人类健康。在缺血性疾病发生发展过程中,机体具有一定的代偿能力,主要表现为血管新生和侧支循环建立^[2],但这种内源性的修复能力有限,尚不足以有效的缓解缺血部位的功能恢复,因此,通过药物促进缺血部位修复对下肢缺血的治疗具有重要意义。

课题组前期研究发现,天麻 80%乙醇提取物具有促进脑缺血再灌注损伤模型大鼠(Middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)脑内血管新生的作用,但其对外周缺血的作用未见报道,因此本实验通过阻断股动脉法复制小鼠下肢缺血模型,观察天麻醇提取物对该模型动物血管新生的作用,为其用于治疗下肢缺血性疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 TRIzol™ 试剂(Thermo Fisher scientific, 191012), PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect Real Time) (Takara, AGH 1533A), PowerUp™ SYBR Green, Master Mix (Thermo Fisher scientific, 662399), Anti-Ki67 一抗 (Abcam, GR3237895-1), Tomato-lectin (Vactor laboratories, TL-1176), 羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor 488) (Abcam, GR3176293-1), Fluorshield Mounting Medium With DAPI (Abcam, GR3182624-6), 山羊血清(北京索莱宝科技有限公司, SL034), OCT (Thermo Fisher scientific, 387208), DNase /RNase-Free Water (北京索莱宝科技有限公司, 20180628)。

1.2 天麻醇提取物 称取天麻样品 500 g, 粉碎, 过 10 目筛。加 80%乙醇 6 L, 75 °C 回流提取 2 h 后, 取上清, 上清为黄色液体; 残渣加 80%乙醇 6 L 回流提取 2 h, 合并提取液, 浓缩得醇提取物 46 g。

1.3 仪器 激光散斑血流检测视频系统(PeriCam PS), 实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio 5), 梯度 PCR 仪 (ABI Veriti), 冰冻切片机 (CRYOSTAR NX50), 荧光显微镜 (Ci-L), 电凝 Pro'sKit (1PK-SC109B)。

1.4 实验动物 SPF 级雄性昆明种小鼠, 6 周龄, 体

质量(20±2)g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 合格证号: SCXK(辽)2015-0001。

1.5 复制小鼠下肢缺血模型及分组 昆明种小鼠注射 10%水合氯醛进行麻醉, 小鼠完全麻醉后, 将其仰卧位固定于 37 °C 恒温操作台, 右侧腹股沟皱痕处剃毛消毒后剪一 0.5 cm 切口, 暴露股动脉, 小心分离出股神经、静脉、股动脉、髂动脉、旋股外侧动脉, 用电凝阻断股动脉(位置: 股动脉中靠近髂外动脉分支处下端, 旋股外侧动脉上端处, 注意不要损伤静脉和神经), 确认无出血后缝合手术切口并消毒; 术后 30 min 使用激光散斑检测两侧后肢血流量, 缺血侧下肢血流量下降至未缺血侧 50% 以下为造模成功。

将实验动物随机分为模型组、假手术组、天麻醇提取物 1、3、7、14 d 处理组, 每组 12 只。各组小鼠造模后灌胃给予天麻醇提取物 0.94 g/kg, 模型组、假手术组灌胃给予等量蒸馏水, 给药体积均为 0.2 mL / 10 g 体重。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 激光散斑检测血流量 用异氟烷麻醉小鼠后, 将其仰卧位固定于 37 °C 恒温操作台, 右侧腹股沟皱痕处剃毛消毒, 将小鼠后肢脚掌部置于激光散斑仪的红外十字投射区域, 调整位置并对齐, 分别监测小鼠两个后肢的血流量, 并记录后肢血流的基础值。

1.6.2 免疫荧光检测新生血管 术后第 7、14 天, 处死小鼠, 取缺血侧下肢腓肠肌, 置于 4%多聚甲醛固定后, 依次进行梯度脱水、OCT 包埋、冰冻切片处理。采用免疫荧光法, 检测 Ki67、Tomato-Lectin、DAPI 的表达, 3 个指标重合区域即为新生血管, 进行荧光显微镜拍照(1:200)。

1.6.3 促血管新生因子 mRNA 表达的影响 给予天麻醇提取物 1、3、7、14 d 后, 取小鼠缺血下肢腓肠肌按照试剂说明提取总 RNA, 根据逆转录试剂盒操作说明, 进行逆转录合成 cDNA。以其为模板, GAPDH 做内参, 各血管新生调控因子引物序列见表 1, 反应条件: 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 反应完毕, 计算各基因的相对表达水平, 相对表达水平等于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{处理样本} - \Delta Ct_{对照样本}$ (对照样本为假手术组)。

表 1 引物序列

基因	引物	引物序列(5'-3')	产物(bp)
GAPDH	正向引物	GTAAGAAACCCTGGACCACCC	113
	反向引物	GAGGGAGATGCTCAGTGTGG	
VEGF-A	正向引物	GTCTGCTCTGCGCTCTGTA	76
	反向引物	AGGGAGCAAAGGTCACGAAA	
VEGFR-2	正向引物	CTGCGCTCACCTCCTGTTTA	131
	反向引物	AATGTGGCTACTTCCGGGTG	
Angpt2	正向引物	TGTTGTAGTGACACCCAGCC	126
	反向引物	CCTGTGGGCAGAGACCTTTT	

1.6.4 统计学处理 数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析法处理,方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Tamhane's 法检验,用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血流量变化情况 激光散斑检测结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠手术侧血流量明显下降($P < 0.001$),缺血侧下肢血流量下降至未缺血侧 50%的动物视为造模成功;与模型组比较,术后 3、7 d,天麻醇提物组小鼠手术侧血流量增加($P < 0.001$),见表 2、图 1。

表 2 天麻醇提物对下肢缺血小鼠手术侧血流量的影响($\bar{x} \pm s, n=12, \%$)

时间	假手术组	模型组	天麻醇提物组
缺血前	1.02±0.18	0.99±0.19	0.96±0.16
缺血 30 min	0.98±0.16	0.39±0.10 $\Delta\Delta\Delta$	0.45±0.10
3 d	0.95±0.12	0.45±0.11 $\Delta\Delta\Delta$	0.64±0.14 ***
7 d	0.94±0.16	0.51±0.10 $\Delta\Delta\Delta$	0.69±0.14 ***
14 d	0.99±0.20	0.64±0.12 $\Delta\Delta\Delta$	0.70±0.13

注:与假手术组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$;与模型组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

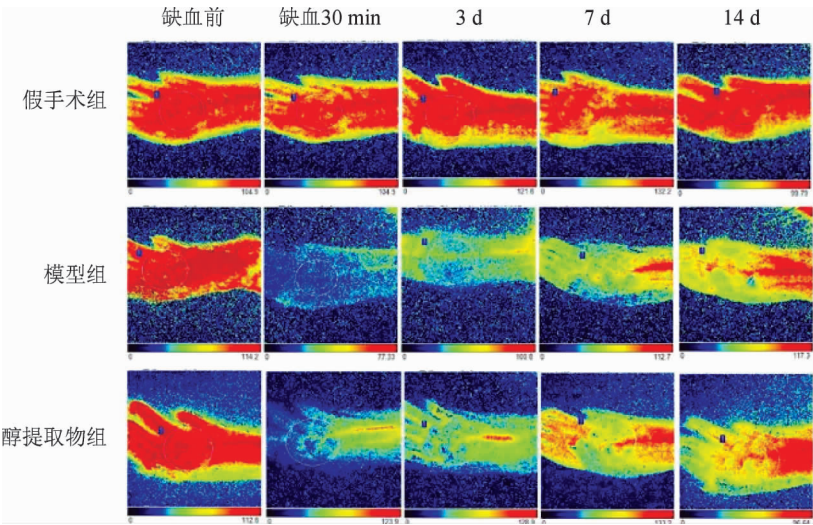


图 1 天麻醇提物对下肢缺血小鼠血流量的影响

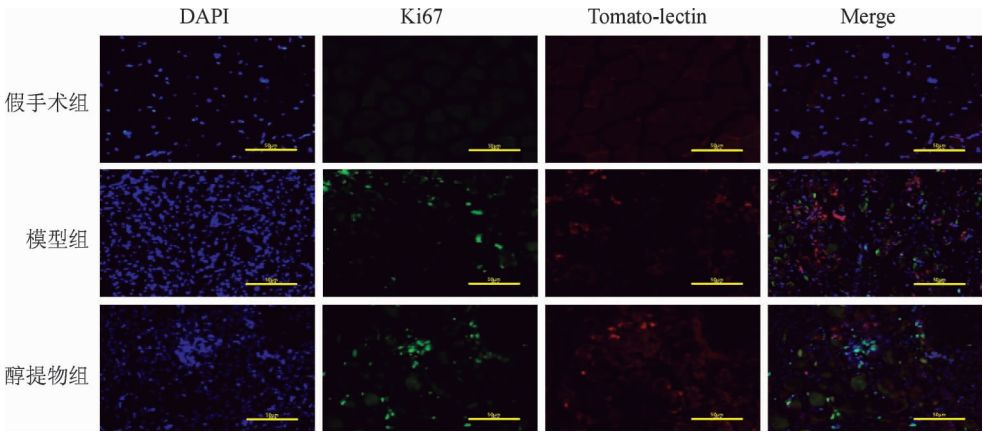


图 2 天麻醇提物对下肢缺血小鼠 7 d 新生血管的影响

2.2 Tomato-Lectin、Ki67 的阳性表达 肌肉组织的荧光免疫分析结果显示:与模型组比较,术后 7、14

d,天麻醇提取物组小鼠缺血侧下肢腓肠肌 Tomato-Lectin、Ki67 的阳性表达增多,见图 2、图 3。

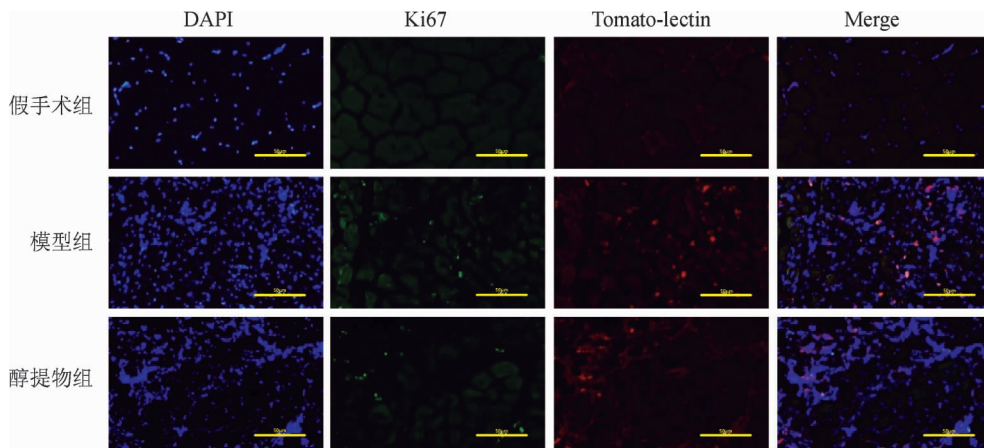


图 3 天麻醇提取物对下肢缺血小鼠 14 d 新生血管的影响

2.3 qPCR 检测结果

2.3.1 VEGF-A 的表达情况 qPCR 检测结果分析显示:与假手术组比较,术后 1、14 d,模型组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 VEGF-A 表达增加($P<0.05$, $P<0.001$);与模型组比较,术后 1、3 d,天麻醇提取物组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 VEGF-A 表达增加($P<0.01$, $P<0.05$),见表 3。

表 3 下肢缺血小鼠腓肠肌中 VEGF-A mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

时间	假手术组	模型组	天麻醇提取物组
1 d	1.00±0.00	1.63±0.56 [△]	3.55±1.15 ^{**}
3 d	1.00±0.00	1.15±0.31	2.38±1.25 [*]
7 d	1.00±0.00	0.85±0.41	2.00±1.20
14 d	1.00±0.00	1.93±0.41 ^{△△△}	1.97±0.64

注:与假手术组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$,^{△△△} $P<0.001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

2.3.2 VEGFR-2 的表达情况 qPCR 检测结果分析显示:与假手术组比较,术后 14 d,模型组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 VEGFR-2 表达增加($P<0.001$);与模型组比较,术后 7 d,天麻醇提取物组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 VEGFR-2 表达增加($P<0.05$),见表 4。

2.3.3 Angpt2 的表达情况 qPCR 检测结果分析显示:与假手术组比较,术后 1、3、7、14 d,模型组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 Angpt2 表达增加($P<0.05$ 、 $P<0.01$);与模型组比较,术后 1、3、7 d,天麻醇提取物组小鼠下肢缺血侧腓肠肌 Angpt2 表达增加($P<0.05$ 、 $P<0.01$),见表 5。

表 4 下肢缺血小鼠缺血侧腓肠肌中 VEGFR-2 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

时间	假手术组	模型组	天麻醇提取物组
1 d	1.00±0.00	1.17±0.27	1.18±0.12
3 d	1.00±0.00	1.04±0.39	1.35±0.62
7 d	1.00±0.00	1.67±0.72	3.74±1.79 [*]
14 d	1.00±0.00	2.61±0.79 ^{△△△}	2.89±2.44

注:与假手术组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$,^{△△△} $P<0.001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

表 5 下肢缺血小鼠缺血侧腓肠肌中 Angpt2 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

时间	假手术组	模型组	天麻醇提取物组
1d	1.00±0.00	2.55±0.99 ^{△△}	4.62±1.37 [*]
3d	1.00±0.00	2.86±1.33 ^{△△}	8.44±5.42 ^{**}
7d	1.00±0.00	4.08±2.41 [△]	17.14±13.60 [*]
14d	1.00±0.00	14.37±12.92 [△]	8.54±7.36

注:与假手术组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$,^{△△△} $P<0.001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

3 讨论

下肢缺血性疾病是常见的外周动脉疾病之一,主要原因是动脉狭窄或闭塞而引起下肢动脉的供氧量与需氧量之间不平衡所致^[3]。临床主要表现为间歇性跛行、静息痛、溃疡及坏疽,严重者甚至可导致截肢或死亡。目前常见的治疗方法有外科手术、介入治疗、药物溶栓等,但均达不到良好的治疗效果^[4-7]。近年来促血管新生技术的出现,使得在缺血部位重建侧肢循

环,恢复有效血供逐渐成为可能,从而为缺血性疾病提供了新的治疗策略^[8-10]。课题组前期实验结果表明,天麻醇提物能促进脑缺血后脑内血管新生,但其对外周缺血的作用未见报道,为进一步研究其是否具有促进外周缺血部位血管新生作用,本实验采用股动脉阻断法复制小鼠下肢缺血模型,该模型能够较好地模拟临床病人下肢缺血的病理状态,反应机体下肢严重缺血、供血不足的多个阶段,包括发生、演进和修复等过程^[11]。给予天麻醇提物后,采用激光散斑扫描仪检测术后1、3、7、14 d的缺血侧下肢血流量,观察血流恢复情况,结果显示,术后3、7 d,缺血侧血流增加($P < 0.001$),提示天麻醇提物能促进下肢缺血小鼠的血流恢复;采用免疫荧光三标法,检测术后7、14 d的Ki67、Tomato-Lectin、DAPI的表达。Ki67是增殖细胞的标记物, Tomato-Lectin可以标记血管内皮细胞, DAPI标记细胞核,3个指标重合区域为新生血管。结果显示,术后7 d, Ki67/Tomato-Lectin的阳性表达明显,提示天麻醇提物可以促进模型动物缺血侧的血管新生。

血管新生是一个多信号介导、多细胞参与调控的过程。在缺血/缺氧情况下,缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)在组织缺血部位聚集,作为缺血情况的传感器,激活与缺血性损伤相关的血管新生过程^[12]。其中 VEGF-A/VEGFR-2 信号通路参与调控血管新生的整个过程。在缺血早期 VEGF-A 和 Angpt2 大量表达, VEGF-A 选择性的作用于内皮细胞膜上的酪氨酸受体 VEGFR-2, 使血管通透性增加并促进血管内皮细胞的增殖、迁移、出芽参与损伤部位的血管生成^[13-15], 而血管生成素家族成员 Angpt2 在 VEGF-A 存在的条件下, 能促进血管结构松解, 消除血管基底膜和周细胞对内皮的支撑作用, 使内皮容易浸润、迁移、黏附, 增强了 VEGF-A 的促血管新生作用^[16-19]。qPCR 检测术后1、3、7、14 d 促血管新生因子的表达, 实验结果表明, 术后1、3 d, 缺血侧 VEGF-A、Angpt2 表达上调, 术后7 d, VEGFR-2 和 Angpt2 表达上调, 提示天麻醇提物能促进模型动物下肢缺血是通过调节 VEGF-A/VEGFR-2 信号通路中促血管新生因子 VEGF-A、VEGFR-2、Angpt2 mRNA 的表达而发挥作用的。

综上所述,天麻醇提物对小鼠下肢缺血模型具有

促血管新生,增加缺血部位血流量,促进侧支循环建立的作用,其作用机制可能与促进促血管新生因子 VEGF-A 及其受体 VEGFR-2、Angpt2 的表达相关。

参考文献:

- [1] 张鉴清,蒋小兵. 肝细胞生长因子治疗下肢缺血性疾病的研究进展[J]. 中国实用医药, 2011, 6(13): 271-272.
- [2] SUNDBERG C, KOWANETZ M, BROWN L F, et al. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo[J]. Laboratory Investigation, 2002, 82(4): 387-401.
- [3] 王雁彬,李廷荃,化金凤,等. 三七对大鼠下肢缺血模型 MVD 及 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(4): 371-372.
- [4] LATZA U, STANG A, BERGMANN M, et al. The problem of response in epidemiological studies in Germany (part I) [J]. Gesundheitswesen, 2004, 66(5): 326-336.
- [5] QURIED K. Peripheral arterial disease [J]. Lancet, 2001, 358(9289): 1257-1264.
- [6] FERNANDEZ B B. A rational approach to diagnosis and treatment of intermittent claudication[J]. Am J Med Sci, 2002, 323(5): 244-251.
- [7] 龙刚,黄文. 生物治疗在下肢缺血性疾病中的应用[J]. 重庆医学, 2017, 46(34): 4865-4867.
- [8] 戚勋,苑永辉,钟红珊,等. 2-羟丙基- β -环糊精促进小鼠下肢缺血模型血管新生的作用研究[J]. 兰州大学学报(医学版), 2015, 41(2): 20-24.
- [9] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [10] 袁园,张潇,邵菊,等. 富血小板血浆对小鼠下肢缺血血管生成的作用研究[J]. 重庆医学, 2019, 48(2): 198-201.
- [11] MAGALOTTI S, GUSTAFSON T P, CAO Q, et al. Evaluation of inflammatory response to acute ischemia using near infrared fluorescent reactive oxygen sensors [J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(4): 423-430.
- [12] 李玉娟,刘建勋. HIF-1 活性调节及其在缺血后血管新生中的作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 19-20.
- [13] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 81-86.

- [14] GREEBERG D A. Cerebral angiogenesis: a realistic therapy for ischemic disease?[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1135:21-24.
- [15] GREEBERG D A, JIN K. Vascular endothelial growth factors(VEGFs) and stroke[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2013, 70(10):1753-1761.
- [16] LUCITTI J L, MACKEY J K, MORRISON J C, et al. Formation of the collateral circulation is regulated by vascular endothelial growth factor-A and $\alpha_5\beta_1$ integrin and metalloprotease family members 10 and 17 [J]. *Circulation Research*, 2012, 111(12):1539-1550.
- [17] YANO A, SHINGO T, TAKEUCHI A, et al. Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2005, 103(1):104-114.
- [18] FANG R, JIANG J J, SMITH B L, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in vocal polyps[J]. *The Laryngoscope*, 2013, 123(9):2184-2188.
- [19] SLEVIN M, KRUPINSKI J, SLOWIK A, et al. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2000, 31 (8):1863-1870.

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿
网址:<http://www.xb.ynutcm.edu.cn>