

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.007

丹红注射液中 5 种主要活性成分促血管新生作用研究 *

卫 国^{1,2} 殷 英¹ 段佳林^{1,2} 梁凌飞² 文爱东^{1,2Δ}

(1 第四军医大学西京医院 药剂科 陕西 西安 710032; 2 陕西中医药大学 药学院 陕西 咸阳 712046)

摘要 目的:研究丹红注射液(DHI)入血后 5 个主要成分的促血管新生活性。**方法:**采用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)正常培养体系和鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型评价。细胞和鸡胚分别随机分为正常对照组, DHI 组、羟基红花黄色素 A 组、丹酚酸 B 组、丹参素组, 原儿茶醛组和迷迭香酸组。MTT 法检测 HUVEC 增殖情况, 免疫印迹法测定 HUVEC 促血管新生相关因子的表达, 显微镜下计数鸡胚 CAM 给药区域新生血管数。**结果:**与正常对照组比较, 10 % (V/V) DHI 及相应浓度的各单体均能显著增加 HUVEC 的增殖 ($P < 0.01$), 并促进 HUVEC 中促血管新生因子 VEGF-A, bFGF, HGF 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而 50 % (V/V) DHI 及相应浓度的各单体均能不同程度地增加鸡胚 CAM 给药区域新生血管数; 两个筛选模型中, 羟基红花黄色素 A 和丹参素均呈现一定的作用优势。**结论:**DHI 入血后的 5 个主要活性成分都有促血管新生作用, 其中羟基红花黄色素 A 和丹参素活性更佳。

关键词:丹红注射液; 血管新生; 人脐静脉内皮细胞; 鸡胚绒毛尿囊膜; 活性成分筛选

中图分类号: R284.1; R285.5; R543; R-33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2017)17-3230-04

Study on Proangiogenic Activities of Five Principal Active Components in Danhong Injection*

WEI Guo^{1,2}, YIN Ying¹, DUAN Jia-lin^{1,2}, LIANG Ling-fei², WEN Ai-dong^{1,2Δ}

(1 Department of Pharmacy, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, 712046, China)

ABSTRACT Objective: To explore the proangiogenic activities of five main components from Danhong injection (DHI) absorbed in blood. **Methods:** A in vitro culture system of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and a model of chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) were used in this study. Cells or chicken embryos were randomly divided into control (Con) group, DHI group, hydroxysafflor yellow A (HSYA) group, salvianolic acid B (Sal B) group, Tanshinol (Tan) group, protocatechuic aldehyde (Pra) group and Rosmarinic acid (RosA) group. **Results:** In comparison with Con group, 10 % (V/V) DHI and its five main components at corresponding concentrations could significantly promote HUVEC proliferation ($P < 0.01$) and the expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), basic fibroblast growth factor (bFGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in HUVEC ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Also, 50 % (V/V) DHI and these components at corresponding concentrations were able to boost the blood vessel density on CAM to different extent. Consistently, HSYA and Tan showed better proangiogenic action in both models. **Conclusions:** All the five main components from Danhong injection (DHI) absorbed in blood promote angiogenesis and HSYA and Tan have stronger proangiogenic activities than the others.

Key words: Danhong injection; Angiogenesis; Human umbilical vein endothelial cells; Chick chorioallantoic membrane; Screening of active components

Chinese Library Classification(CLC): R284.1; R285.5; R543; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3230-04

前言

冠心病是冠状动脉狭窄或闭塞导致心肌缺血、坏死, 从而使心功能受损的临床常见心血管疾病。近年来, 以促进心肌缺血区血管新生和侧支循环的建立为目的的治疗性血管新生, 在缺血性心脏病的治疗中已越来越受到重视^[1], 而相较于蛋白和基因疗法, 中药治疗以其多靶点, 多环节, 多重功效的特点被广

泛关注^[2,3]。

丹红注射液 (Danhong injection, DHI) 由丹参和红花两味活血要药制成, 临床上常用于冠心病等瘀血闭阻所致诸证。研究^[4,5]表明 DHI 能显著促进大鼠心肌梗死后冠状动脉微血管新生, 改善侧支循环, 进而减轻心肌梗死损伤, 但 DHI 治疗性血管新生的物质基础尚不明确。本课题组前期研究^[6]证实 DHI 入血活性成分中含量最高的 5 个单体分别是羟基红花黄色素 A

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403135)

作者简介: 卫国 (1987-), 硕士研究生, 主要研究方向: 心脑血管疾病新药研究与开发, E-mail: qigaidaren@163.com

Δ 通讯作者: 文爱东 (1964-), 主任药师, 主要研究方向: 合理用药与新药研发, E-mail: adwen-2004@hotmail.com, 电话: 029-84773636

(收稿日期: 2016-12-08 接受日期: 2016-12-29)

(Hydroxysafflor yellow A, HSYA), 丹酚酸 B (Salvianolic acid B, Sal B), 丹参素 (Tanshinol, Tan), 原儿茶醛 (Protocatechuic aldehyde, Pra) 和迷迭香酸 (Rosmarinic acid, RosA)。本研究拟采用人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 体外培养体系和鸡胚绒毛尿囊膜 (Chorioallantoic membrane, CAM) 模型探究这些单体的促血管新生作用, 以初步确定 DHI 促血管新生的主要活性成分。

1 材料与方法

1.1 细胞及种蛋

HUVEC 细胞株, 购自上海拜力生物科技有限公司; 种蛋, 60 枚, 重 50~60 g, 购自西安高陵北关孵化厂。

1.2 仪器及设备

371 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); SHH-150SD 型恒温试验箱 (上海建恒); IX71+DP72 型倒置显微镜 (日本奥林巴斯); 5804R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); MULTISKAN GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); POWERPAC BASIC 蛋白电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 试剂及试剂

DHI (10 mL/支, 批号: 14121025, 山东步长制药有限公司提供); HSYA (含量 96.5%, 批号: 111637-201308), Sal B (含量 96.2%, 批号: 111562-201615), Tan (含量 98.8%, 批号: 110855-201613), Pra (含量 99.3%, 批号: 110810-201608), RosA (含量 98.5%, 批号: 111871-201505), 购于中国药品生物制品检定所; MCDB131 完全培养基、MCDB131 基础培养基、胎牛血清 (FBS), 购自美国 AilCells 公司; 兔抗人-抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、血管生成素 1 (angiopoietin-1, Ang1) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国 Cell Signaling 公司。

1.4 细胞培养及分组

将购入的 HUVEC 细胞株复苏, 加入 MCDB131 完全培养基 (内含 10% FBS、100 U/mL 的链霉素和青霉素和 50 ng/mL 内皮细胞生长因子), 置于 37 °C、含 5% CO₂ 培养箱中培养, 每天更换培养液 1 次。传代中用含 0.25% 胰蛋白酶和 EDTA (乙二胺四乙酸) 的消化液进行消化, 以 1:4 比例分瓶传代, 取第 4 代~第 6 代细胞进行实验。将接种细胞随机分为正常对照 (Con) 组、DHI 组、HSYA 组、Sal B 组、Tan 组、Pra 组和 RosA 组, 分别给予 10% (V/V) 1× PBS, 10% (V/V) DHI, 2.4 μ g/mL HSYA, 72.8 μ g/mL Sal B, 100 μ g/mL Tan, 8.8 μ g/mL Pra 和 20.5 μ g/mL RosA。

1.5 内皮细胞增殖情况检测

采用 MTT 法测定内皮细胞增殖情况。将处于对数生长期的 HUVEC 以 1×10^4 孔的密度接种于 96 孔板, 正常条件培养 24 h; 按方法 "2.1" 中各药物浓度给药, 每组设 6 个复孔, 以只加培养基不加细胞的空白对照调零, 继续孵育 24 h; 小心吸弃孔内培养液后, 加 MTT (0.5 g/L) 100 μ L/孔, 继续培养 4 h; 弃上清, 加二甲亚砜 150 μ L/孔, 振荡器振荡 10 min, 使紫色结晶充分溶解, 570 nm 波长下的测定吸光度 (A) 值。增值率 = (实验

组 A 值 - 空白组 A 值) / (正常对照组 A - 空白组 A 值) $\times$ 100%, 检测 3 次, 取平均值。

1.6 促血管新生相关因子表达测定

加药培养 48 h 后, 收集细胞, 加入蛋白裂解液, 冰浴裂解, 4 °C 离心机上 10000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清, 蛋白定量试剂盒定量。100 °C 蛋白变性, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 转至 PVDF 膜上; 37 °C 下, 脱脂奶粉封闭 30 min, 加入 1:1000 稀释的 VEGF-A、bFGF、HGF、Ang1、 β -actin 一抗, 4 °C 孵育过夜; 二抗 (1:5000) 37 °C 孵育 30 min, ECL 显影、曝光; Quantity One 软件分析各条带灰度值, 蛋白相对水平以目的蛋白与 β -actin 条带灰度值的比值表示, 检测 3 次, 取平均值。

1.7 鸡胚 CAM 模型建立及分组

参考董海燕等人^[7]的方法, 建立鸡胚 CAM 模型。选择蛋壳结构致密均匀的 60 枚新鲜种蛋, 洗净后 0.1% 新洁尔灭消毒, 在 37.6 $\pm$ 0.2 °C、60% 湿度的恒温试验箱中孵育, 第 3 d 开始, 每日翻动 3 次并观察种蛋生长情况, 弃去不合格种蛋。孵育第 8 d, 取发育良好的 42 只鸡胚, 随机分为 Con 组、DHI 组、HSYA 组、Sal B 组、Tan 组、Pra 组和 RosA 组。酒精消毒气室端, 无菌条件下, 砂轮磨切蛋壳, 眼科镊小心揭除蛋壳及壳膜, 开 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 的小窗, 揭去气室膜, 使 CAM 完全暴露。分别将滴有生理盐水、50% (V/V) DHI, 12 μ g/mL HSYA, 364 μ g/mL Sal B, 500 μ g/mL Tan, 44 μ g/mL Pra 和 102.5 μ g/mL RosA 的药物载体 (各 20 μ L) 置于各组鸡胚 CAM 中央血管稀少区, 然后用无菌透明胶带密封窗口, 继续孵育, 连续加药 3 d。

1.8 鸡胚 CAM 血管新生测定

孵育第 11 天, 剪开透明胶带, 由观察窗加入福尔马林液 5~10 滴, 固定约 15 min, 以含药载体为中心剪下 CAM, 置于清水中展开后铺于干净滤纸上, 晾干。以滤纸为背景, 解剖显微镜下观察计数载体周围血管分支点数, 以实验部位边缘 1 mm 范围内为一级血管, 实验部位边缘 5 mm 范围内为二级血管, 分别观察计数。

1.9 统计学分析

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析, 所得数据以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ S.D) 表示, 组间比较采用方差分析 (ANOVA), 两两比较使用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHI 及各单体对 HUVEC 增殖能力的影响

MTT 实验表明, 与正常对照 (Con) 组比较, 10% (V/V) DHI 及相应浓度的各单体均能显著增加 HUVEC 的增殖 ($P < 0.01$); 与其余 3 个单体比较, HSYA 和 Tan 促细胞增殖作用更为显著 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

2.2 DHI 及各单体对 HUVEC 中促血管新生相关因子表达的影响

给药孵育 48 h 后, 10% (V/V) DHI 及相应浓度的各单体均能明显增加 HUVEC 中促血管新生因子 VEGF-A、bFGF 和 HGF 的表达, 与正常对照 (Con) 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); HSYA 和 Tan 促 HUVEC 表达 VEGF-A、bFGF 和 HGF 的作用优于其余 3 个单体 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 此外, DHI 及各单体对 HUVEC 中 Ang1 的表达有一定促进作用, 但差异无统计学意义。结果见图 2。

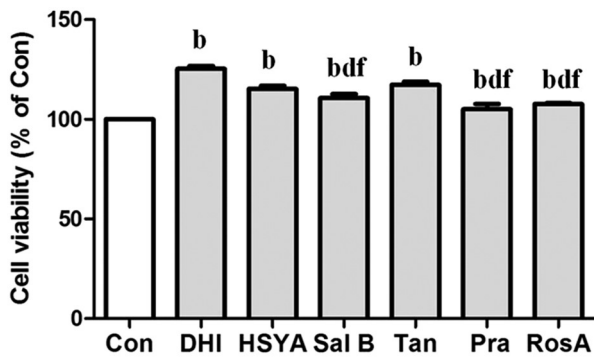


图1 DHI及各单体对HUVEC增殖能力的影响(n=6)

Fig.1 The effects of DHI and its five main components on HUVEC proliferation

Note: compared with Con group, ^bP<0.01; compared with HSYA group, ^dP<0.01; compared with Tan group, ^fP<0.01.

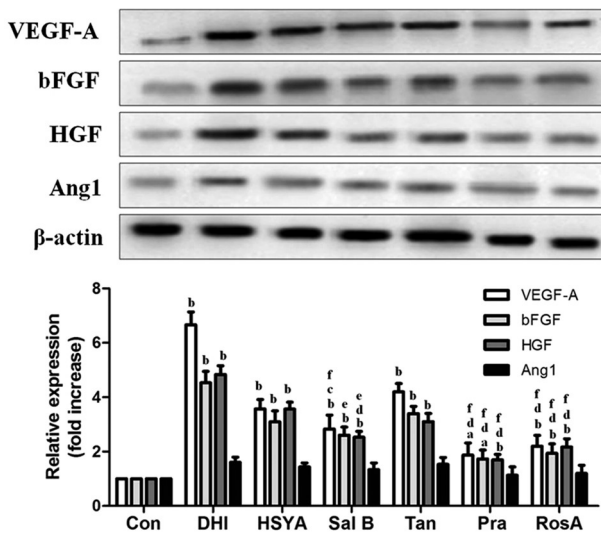


图2 DHI及各单体对HUVEC中促血管新生相关因子表达的影响(n=6)

Fig.2 Effects of DHI and its five main components on the expression of proangiogenic factors in HUVEC.

Note: compared with Con group, ^aP<0.05, ^bP<0.01; compared with HSYA group, ^cP<0.05, ^dP<0.01; compared with Tan group, ^eP<0.05, ^fP<0.01.

2.3 DHI及各单体对CAM血管新生的影响

孵育11天后,50%(V/V)DHI及相应浓度的各单体能不同程度地促进鸡胚CAM的血管生成;DHI、HSYA、Sal B、Tan和RosA组的新生一级血管数较阴性对照(Con)组均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),Pra组新生一级血管数与Con组比较,差异无统计学意义;与此类似,除Pra和RosA组外,DHI、HSYA、Sal B和Tan组新生二级血管数较Con组亦显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);此外,HSYA和Tan促CAM血管生成能力较其他单体均有不同程度增加。结果见表1。

3 讨论

丹参与红花是中医治疗"胸痹"和"真心痛"的常用中药,二者均为活血的要药,具有祛瘀生新,通经利脉的功效。现代药理表明,其都具有扩张冠状动脉,增加冠脉血流量;改善微循环,提高机体耐缺氧能力的作用^[8-11]。DHI是丹参与红花经现

表1 DHI及各单体对鸡胚CAM血管生成的影响(mean±SD,n=6)

Table 1 Effects of DHI and its five main components on newborn vessels formation on CAM of chicken embryo (mean±SD,n=6)

Groups	First grade vessel	Second grade vessel
Con	11.4± 2.7	16.2± 2.0
DHI	24.6± 3.8 ^b	31.4± 4.4 ^b
HSYA	19.0± 3.2 ^b	25.4± 3.4 ^b
Sal B	17.4± 3.4 ^a	24.0± 3.2 ^a
Tan	20.8± 3.3 ^b	27.6± 4.2 ^b
Pra	15.0± 2.5 ^{ac}	20.0± 2.8 ^{cd}
RosA	16.4± 2.9 ^a	19.8± 3.1 ^{cd}

Note: compared with Con group, ^aP<0.05, ^bP<0.01; compared with HSYA group, ^cP<0.05; compared with Tan group, ^dP<0.05, ^eP<0.01.

代工艺提取制成,在临床上用于冠心病、中风等心脑血管疾病的治疗,疗效确切。进一步的研究证实,DHI具有显著的促血管新生活性,且具有一定的量效关系^[12,13]。此外,DHI能够促进心肌梗死大鼠心肌血管再生,提高其侧支循环代偿能力,从而减小心肌梗死面积^[4]。这些结果表明,DHI对缺血心肌的保护作用与其促血管新生能力具有密切的相关性。本研究利用HUVEC体系和CAM模型对本课题组前期研究鉴定出的DHI入血后的5个主要活性成分(HSYA、Sal B、Tan、Pra和RosA)进行促血管新生活性研究。这对于阐明DHI作用机制,寻找具有开发价值的冠心病治疗药物都具有重要意义。

血管内皮细胞在各种内源性或外源性刺激信号引起的机体血管新生过程中都发挥着关键作用,血管网的形成依赖于血管内皮细胞结构和功能的完整性^[14]。因此,本研究首先采用体外培养HUVEC模型,观察DHI及5个单体对HUVEC增殖和表达促血管新生因子功能的影响。预实验结果表明DHI促细胞增殖作用的最佳浓度是10%(V/V),即以该浓度DHI中上述5个单体的含量为各单体的给药剂量。MTT实验结果表明,10%DHI及相应浓度的各单体均能显著促进HUVEC的增殖,且HSYA和Tan的促细胞增殖作用优于其余3个单体。血管新生过程离不开内皮细胞的增殖,更需要多种促血管新生因子的综合调节。在众多因子中,VEGF-A、bFGF、HGF和Ang1研究较多。VEGF-A是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可促进内皮细胞增殖、出芽和管腔形成,抑制内皮细胞凋亡并增加血管内皮血管通透性^[15,16];bFGF作用靶点广泛,在毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增生、胶原合成、管腔形成等多个环节均有明显促进作用^[17,18];HGF较VEGF-A副作用少,促血管新生作用更强^[19],而Ang1促血管成熟方面更有优势,常与其他因子联合使用^[20]。本研究中10%DHI及相应浓度的各单体均能显著促进HUVEC中VEGF-A、bFGF和HGF的表达,且HSYA和Tan促HUVEC表达因子的作用更强。这些结果提示,HSYA和Tan在促血管新生方面可能更有优势。

鸡胚CAM模型因重复性好、结果可靠而被广泛应用于血管新生活性物质的筛选^[21]。本研究亦采用该模型观察DHI及5个单体的促血管新生效应。DHI的给药剂量参考罗海明等人^[13]的研究结果,选择50%(V/V)浓度。相应地,各单体的给药剂量即按该浓度下DHI中各单体的含量确定。结果显示,50%DHI

及相应浓度的各单体均能不同程度地促进 CAM 血管生成,且 HSYA 和 Tan 促 CAM 血管作用较其余 3 个单体均有不同程度地增加;这与 HUVEC 体系的观察结果一致,不仅为 HSYA 和 Tan 促血管新生作用的优效性提供更为直接的证据,同时也提示 DHI 及其活性成分的促血管新生功能可能与其促进血管内皮细胞增殖和增加促血管新生因子的表达有关。

综上所述,DHI 入血后的 5 个主要活性成分均可显著地促进 HUVEC 增殖和表达促血管新生因子 VEGF-A,bFGF 和 HGF,且能不同程度地增加鸡胚 CAM 血管生成;5 个单体中,HSYA 和 Tan 促血管新生活性最为显著。当然,本研究中的两个研究体系与动物模型尚有诸多不同,HSYA 和 Tan 在促进动物缺血心肌的血管新生方面的优效性仍有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Mitsos S, Katsanos K, Koletsis E, et al. Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 1-22
- [2] 李军,杜建超,唐新军. 促冠脉血管新生中药的研究概述[J]. *北京中医药*, 2013, 32(9): 650-652
- Li Jun, Du Jian-chao, Tang Xin-jun. Summary of research on traditional Chinese medicine that promotes coronary angiogenesis[J]. *Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 32(9): 650-652
- [3] 陈裴裴,周昕,谢瑞芳. 基于心肌缺血的中药促血管新生机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(5): 133-136
- Chen Pei-pei, Zhou Xin, Xie Rui-fang. Research advance on the angiogenic mechanisms of anti myocardial ischemic traditional chinese medicine [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2014, 21(5): 133-136
- [4] 殷英,卫国,王艳华,等. 丹红注射液促进心肌梗死大鼠缺血心肌血管新生[J]. *中成药*, 2016, 38(9): 1893-1897
- Yin Ying, Wei Guo, Wang Yan-hua, et al. Danhong Injection promotes the acceleration of neovascularization in myocardial infarction rats with myocardial ischemia [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2016, 38(9): 1893-1897
- [5] 余萍,李敏,郭俐宏. 丹红注射液对大鼠实验性心肌缺血再灌注损伤血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(12): 35-38
- Yu Ping, Li Min, Guo Li-hong. The effect of Danhong injection on the expression of vascular endothelial growth factor in experimental rats subjected to myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Liaoning University of TCM*, 2015, 17(12): 35-38
- [6] Guan Yue, Yin Ying, Zhu Yan-rong, et al. Dissection of mechanisms of a Chinese medicinal formula, danhong injection therapy for myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro[J]. 2013, 2013 (972370): 1-12
- [7] 董海燕,郑巧伟,张李侠,等. 5 种他汀类药物对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(9): 655-658
- Dong Hai-yan, Zheng Qiao-wei, Zhang Li-xia, et al. Effects of five statins on angiogenesis in chicken chorioallantoic membrane model [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2012, 32(9): 655-658
- [8] 高传长,邹书兵. 丹参及其主要成分在冠心病及胰腺炎等疾病中的治病机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(11): 1222-1226
- Gao Chuan-chang, Zou Shu-bing. Therapeutic mechanisms of Dan-shen and its main components against diseases like coronary heart disease and pancreatitis [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2010, 30(11): 1222-1226
- [9] 陈俞材,方莲花,杜冠华. 丹参水溶性化合物抗心肌缺血作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2): 162-165
- Chen Yu-cai, Fang Lian-hua, Du Guan-hua. Research advance on anti myocardial ischemic effects of aqueous soluble active constituents from Danshen [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2015, 31 (2): 162-165
- [10] 扈晓佳,殷莎,袁婷婷,等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展[J]. *药实践杂志*, 2013, 31(3): 161-168+ 197
- Hu Xiao-jia, Yin Sha, Yuan Ting-ting, et al. Research advance on chemical components and pharmacological activities of Carthamus tinctorius L [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2013, 31 (3): 161-168+197
- [11] 宋庆华. 红花黄色素治疗冠心病的进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2013, 13(25): 45, 52
- Song Qing-hua. The progress on coronary heart disease therapy by carthamin yellow [J]. *World Latest Medicine Information*, 2013, 13 (25): 45, 52
- [12] 唐昱,钟志英,盛国太,等. 丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(12): 3133-3135
- Tang Yu, Zhong Zhi-ying, Sheng Guo-tai, et al. The Angiogenesis effect of Danhong injection on the chick embryo chorioallantoic membrane model [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(12): 3133-3135
- [13] 罗海明,陆华栋,余尚才,等. 丹红注射液促血管新生作用及其量效关系的实验研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(6): 504-506
- Luo Hai-ming, Lu Hua-dong, Yu Shang-cai, et al. Study on the dose-related effects of Danhong injection on angiogenesis[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease*, 2007, 5(6): 504-506
- [14] Cho SW, Yang F, Son SM, et al. Therapeutic angiogenesis using genetically engineered human endothelial cells[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 160(3): 515-524
- [15] 杨晓云,郭靖涛. 血管内皮生长因子与急性心肌梗死[J]. *河北医学*, 2012, 18(12): 1794-1796
- Yang Xiao-yun, Guo Jing-tao. Vascular endothelial growth factor and acute myocardial infarction [J]. *Hebei Medicine*, 2012, 18 (12): 1794-1796
- [16] Yang WJ, Yang YN, Cao J, et al. Paxillin regulates vascular endothelial growth factor A-induced in vitro angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(3): 1784-1792
- [17] 金松,王瀚锐,刘彦东,等. 碱性成纤维生长因子与血管内皮生长因子联合对大鼠后肢动脉硬化闭塞血管再生作用机制研究[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(9): 404-406
- Jin Song, Wang Han-rui, Liu Yan-dong, et al. Research of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat hind legs arteriosclerosis occlusive vascular regeneration mechanism [J]. *Guide of China Medicine*, 2013, 11(9): 404-406

综上所述, orexin-A 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 可能与其降低脑内自由基水平, 控制脂质过氧化物酶有关。本实验从抗氧化应激方面为 orexin-A 的神经保护作用提供了新的证据, 为脑缺血再灌注损伤的治疗提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] Shimizu S, Nakamachi T, Konno N, et al. Orexin A enhances food intake in bullfrog larvae[J]. *Peptides*, 2014, 59: 79-82
- [2] Tsuneki H, Sasaoka T. Hypothalamic orexin system regulates energy and glucose metabolism [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2013, 142(6): 316-317
- [3] Kantor S, Mochizuki T, Lops S N, et al. Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness in narcoleptic mice[J]. *Sleep*, 2013, 36(8): 1129-1138
- [4] Inutsuka A, Yamanaka A. The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 18
- [5] Lim A S, Yu L, Schneider J A, et al. Sleep Fragmentation, Cerebral Arteriosclerosis, and Brain Infarct Pathology in Community-Dwelling Older People[J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 516-518
- [6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- [7] Pace M, Baracchi F, Gao B, et al. Identification of Sleep-Modulated Pathways Involved in Neuroprotection from Stroke [J]. *Sleep*, 2015, 38(11): 1707-1718
- [8] Song J, Kim E, Kim C H, et al. The role of orexin in post-stroke inflammation, cognitive decline, and depression[J]. *Mol Brain*, 2015, 8 (10): 1186-1202
- [9] Kotan D, Deniz O, Aygul R, et al. Acute cerebral ischaemia: relationship between serum and cerebrospinal fluid orexin-A concentration and infarct volume[J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(2): 404-409
- [10] Xiong X, White R E, Xu L, et al. Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation[J]. *Stroke*, 2013, 44(3): 764-770
- [11] Kitamura E, Hamada J, Kanazawa N, et al. The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia[J]. *Neurosci Res*, 2010, 68(2): 154-157
- [12] Hirota K, Kushikata T, Kudo M, et al. Effects of central hypocretin-1 administration on hemodynamic responses in young-adult and middle-aged rats[J]. *Brain Res*, 2003, 9(81): 143-150
- [13] Lo Martire V, Silvani A, Bastianini S, et al. Effects of ambient temperature on sleep and cardiovascular regulation in mice: the role of hypocretin/orexin neurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): 470-472
- [14] Dohi K, Nishino S, Nakamachi, T, et al. CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest[J]. *Neuropeptides*, 2006, 40(13): 245-250
- [15] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. *Cell*, 1998, 1(92): 573-585
- [16] Davies J, Chen J, Pink R, et al. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103[J]. *Sci Rep*, 2015, 30(5): 12584
- [17] Feng Y, Liu T, Li XQ, et al. Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 10(579): 35-40
- [18] Li LY, Hai LD, Hao PZ, et al. Neuroprotective Effect of Orexin-A Is Mediated by an Increase of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity in Rat[J]. *Anesthesiology*, 2011, 2(114): 340-354
- [19] Harada S, Tokuyama S. Involvement of communication system between brain and peripheral tissues on the development of post-ischemic glucose intolerance induced by cerebral neuronal damage[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2016, 148(1): 34-38
- [20] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP[J]. *Chin J Physiol*, 2017, 60(1): 435
- [21] Hao L, Xie Y, Wu G, et al. Protective Effect of Hericium erinaceus on Alcohol Induced Hepatotoxicity in Mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 10(4): 1155-1159

(上接第 3233 页)

- [18] 徐杰, 左金华. 碱性成纤维细胞生长因子促进血管再生的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(24): 4317-4318
Xu Jie, Zuo Jin-hua. Research advance on basic fibroblast growth factor in promoting angiogenesis [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2008, 24(24): 4317-4318
- [19] 史笑笑, 王宁夫. 肝细胞生长因子对冠心病治疗作用的研究[J]. *心血管病学进展*, 2008, 29(5): 700-703
Shi Xiao-xiao, Wang Ning-fu. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor on coronary heart disease[J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2008, 29(5): 700-703
- [20] 杨夏茵, 徐应军, 张桂东. 冠心病基因治疗研究进展 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2012, 4(1): 73-74
Yang Xia-yin, Xu Ying-jun, Zhang Gui-dong. Research advance on gene therapy for coronary heart disease [J]. *Chinese Journal of Evidence-based Cardiovascular Medicine*, 2012, 4(1): 73-74
- [21] 魏仙, 姚于勤, 杨金亮. 新生血管生成模型及应用 [J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(3): 421-425
Wei Xian, Yao Yu-qin, Yang Jin-liang. Angiogenesis models and the applications[J]. *Letters in Biotechnology*, 2015, 26(3): 421-425