

基于 Sema3E/PlexinD1 和 Sema4D/PlexinB1 途径探讨黄芪甲苷促进脑梗死大鼠血管新生及改善血脑屏障受损的机制

陈锋, 徐翀颖, 邹晓慧 (江西省九江市中医医院, 江西 九江 332000)

摘要: **目的** 研究黄芪甲苷促进脑梗死后血管新生及改善血脑屏障受损的作用, 并探讨其内在机制。**方法** 采用线栓法制造大鼠中动脉闭塞(MCAO)模型, 假手术组只穿线不结扎, 将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、依达拉奉组及黄芪甲苷低、中、高剂量组, 依达拉奉组给予依达拉奉 $3.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 黄芪甲苷组分别灌胃给予黄芪甲苷 20 、 40 、 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续用药 2 周。用改良大鼠神经功能缺损评分(mNSS)法评价行为学变化, 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定脑梗死体积; HE 染色法观察病理变化; 免疫组化法检测血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-2(Ang-2)的表达及微血管计数(MVC); 伊文思蓝法评估血脑屏障破坏水平; RT-PCR 法检测 Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA 的表达。**结果** 黄芪甲苷中、高剂量可明显降低大鼠中动脉闭塞大鼠神经功能缺损评分($P < 0.05$, $P < 0.01$), 减少脑梗死体积($P < 0.01$), 改善脑组织病理改变, 增加脑组织 MVC 及 VEGF、Ang-2 的表达($P < 0.01$), 降低血脑屏障的通透性($P < 0.01$), 降低脑组织 Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA 表达($P < 0.01$)。**结论** 黄芪甲苷可以明显促进大鼠中动脉闭塞大鼠血管新生及改善血脑屏障受损, 其可能是通过调控 Sema3E/PlexinD1 和 Sema4D/PlexinB1 途径相关基因表达实现的。**关键词:** 黄芪甲苷; 脑梗死; 大鼠中动脉闭塞(MCAO); 血管新生; 血脑屏障; Sema3E/PlexinD1; Sema4D/PlexinB1; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)08-1079-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.003

Mechanism of Astragaloside IV in Promoting Angiogenesis and Alleviating Blood-brain Barrier in Cerebral Infarction Rats Based on the Sema3E/PlexinD1 and Sema4D/PlexinB1 Signaling

CHEN Feng, XU Chongying, ZOU Xiaohui (Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiujiang City, Jiangxi Province, Jiujiang 332000 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of astragaloside IV in promoting angiogenesis and alleviating blood-brain barrier in cerebral infarction rats. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was made by thread occlusion of middle cerebral artery. The sham operation group only threaded but not ligated. 100 rats successfully modeled were randomly divided into 5 groups: model group, positive control group, low-, medium-, and high-dose astragaloside IV group. Astragaloside IV groups were respectively given 20 , 40 , $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of astragaloside IV, the positive control group was given edaravone $3.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the sham group and model group were given an equal volume of normal saline. All of the treatment lasted for 2 weeks. The neurological defects were evaluated by modified mNSS method. The cerebral infarction volume was detected by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The pathological changes were evaluated by HE staining. The expression of VEGF, Ang-2 and MVC was detected by immunohistochemical method. BBB disruption was evaluated by Evans blue method; The mRNA expression of Sema3E, PlexinD1, Sema4D, and PlexinB1 was detected by RT-PCR. **Results** Astragaloside IV significantly reduced neurological deficit scores in the brain of MACO rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced

收稿日期: 2021-02-08

作者简介: 陈锋, 男, 本科, 副主任中医师, 研究方向: 康复医学。Email: chenfeng1966c@163.com。

基金项目: 九江市科技计划项目(2016210)。

cerebral infarction volume ($P < 0.01$), improved brain pathological changes, increased MVC and VEGF, Ang-2 expression in brain tissue ($P < 0.01$), decreased the BBB permeability ($P < 0.01$), decreased the mRNA expression of Sema3E, PlexinD1, Sema4D and PlexinB1 ($P < 0.01$). **Conclusion** Astragaloside IV can significantly promote angiogenesis and improve blood-brain barrier damage in the brain of MCAO rats. The mechanism may be achieved by regulating the expression of related genes in the Sema3E/PlexinD1 and Sema4D/PlexinB1 pathways.

Keywords: Astragaloside IV; middle cerebral artery occlusion (MCAO); angiogenesis; blood-brain barrier; Sema3E/PlexinD1; Sema4D/PlexinB1 pathway; rats

脑梗死是一种具有高复发率、高致死率特点的疾病。缺血性脑梗死占其中的 70% ~ 80%，是由于脑血管闭塞使得血流灌注中断，大脑缺血、缺氧引发的脑组织坏死及一系列疾病^[1-2]。

黄芪甲苷是从黄芪中提取的一种单体。研究^[3]表明，黄芪甲苷能够减少脑梗死体积，缓解脑内氧化应激反应，具有较好的脑保护作用；也有研究^[4]显示，黄芪甲苷可以通过降低病理状态下血脑屏障的通透性而发挥脑保护作用。

有研究^[5]显示，Semaphorin 3E(Sema3E)和其受体 PlexinD1 在新生血管的形成中发挥重要作用。Sema4D 可以通过激活炎性小胶质细胞等在中枢神经系统疾病中发挥作用^[6]。

本研究旨在探讨黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞(MCAO)引起的脑梗死后血管新生及血脑屏障破坏的改善作用，并基于 Sema3E/PlexinD1 和 Sema4D/PlexinB1 信号途径探索其内在的作用机制，为临床治疗脑梗死提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 动物 120 只 SD 大鼠，SPF 级，雌雄各半，8 周龄，体质量(200±20)g，购于湖南斯莱克动物实验公司，动物质量合格证号：43004700002217，生产许可证号：SCXK(湘)2018-0001，饲养于 SPF 级动物实验室，温度 25 ℃、湿度 45%。

1.2 药物及试剂 黄芪甲苷，纯度>98%，成都锦泰和医药化学技术有限公司，批号：150202；阳性药依达拉奉注射液(20 mL:30 mg)，国瑞药业有限公司，批号：20190825；氯化三苯基四氮唑(TCC)、伊文思蓝(Evans blue, EB)多克隆抗体，美国 Abcam 公司，批号分别为：ab63254、ab33167；兔抗大鼠血管生成素-2(angio-poietin-2, Ang-2)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)，美国 Millipore 公司，批号分别为：1704201，1803206。

1.3 仪器 AB135-S 电子分析天平，梅特勒中国公司；SW-CJ-1F 型超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；MDF-382E 荧光倒置显微镜，日本 SANYO 公司；PrimoR 低温高速离心机，德国 Heraeus 公司；905-ULTS 超低温冰箱，美国 Thermo Scientific 公司；7500fast 荧光定量 PCR 仪，美国 Applied Biosystems 公司。

1.4 大脑中动脉闭塞模型复制 参照 Longa 等^[7]提出的大脑中动脉栓塞线栓法复制大鼠 MCAO 模型：大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)麻醉后仰卧位固定，颈部消毒；颈正中做一切口，分离右侧颈总动脉、颈内、颈外动脉；结扎并游离颈外动脉，颈外动脉起始段剪一小口，向颈内动脉插入 4-0 单丝尼龙线栓，至有轻微阻力感时停止(约 18.5 ~ 19.5 mm)，用 1 号手术线固定线栓，2 h 后拔出线栓。假手术组(20 只)不插线栓，其余步骤与模型组保持一致。

参照 Longa^[7]的 5 分制法评价模型成功标准。不能行走或昏迷：4 分；右侧倾倒：3 分；向右旋转：2 分；右前肢不能完全伸直：1 分；无任何神经缺损症状：0 分。分值越高行为障碍越严重，选 1 ~ 3 分者为成功模型，其余剔除。

1.5 分组及给药 取模型复制成功的 100 只 MCAO 大鼠随机分为模型组、依达拉奉组及黄芪甲苷低、中、高剂量组，每组 20 只。依达拉奉组腹腔注射依达拉奉注射液 3.2 mg·kg⁻¹，黄芪甲苷低、中、高剂量组分别灌胃给予黄芪甲苷 20、40、100 mg·kg⁻¹，假手术组及模型组给予等量生理盐水，每天 1 次，连续给药 2 周。

1.6 大鼠神经功能变化 给药 1、7、14 d 时，采用改良大鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)^[8]对大鼠神经功能进行评分。正常为 0 分，有损伤者根据严重程度与量表匹配计 1 ~

6 分, 总分最高 18 分。

1.7 氯化三苯基四氮唑染色法测定脑梗死体积 末次给药后, 每组随机取 15 只大鼠脱颈法处死, 迅速取出大脑放入切片模具, 置于 -20 °C 冰箱 5 min; 取出, 间隔 2 mm 冠状切片, 将切片放入 5 mL 含 2% TTC 的磷酸盐缓冲液, 避光, 37 °C 孵育 0.5 h; 取出脑片, 以 4% 多聚甲醛固定。白色为脑梗死组织, 红色为正常脑组织, 逐层拍照, 各层梗死面积用 Adobe photoshop CS 软件计算, 然后乘以层面, 则为脑梗死体积。

1.8 HE 染色法观察脑组织病理变化 同“1.7”项, 每组取 15 只大鼠脱颈处死后, 迅速取出大脑, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋及切片, HE 染色, 观察脑组织病理形态变化。

1.9 免疫组化法检测脑组织微血管计数(microvessel count, MVC)、VEGF、Ang-2 表达 同“1.7”项, 每组取 15 只大鼠脱颈处死后, 迅速取出大脑, 切片, 加入 Ang-2 (1:100)、VEGF(1:500)一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 30 min, DAB 显色, 高倍(×400)镜下采集图片, 以 Image pro-plus 6.0 成像分析系统对照片进行分析。取 5 个视野进行微血管计数, 以内皮细胞簇者为标准。

1.10 伊文思蓝法检测血脑屏障通透性 每组余下的 5 只大鼠, 在给药后即经尾静脉注射 2% 伊文思蓝(4 mL·kg⁻¹), 24 h 后行心脏灌注。操作如下: 大鼠麻醉仰卧位固定, 胸部消毒备皮, 剪开胸骨, 暴露心脏; 将针尖沿心轴方向迅速插入左心室, 可见血液回流, 止血钳夹闭固定破口, 剪开右心耳, 以生理盐水进行心脏灌注; 灌注约 10 mL 后, 从右心耳流出的液体变澄清时取出大脑, 分为梗死半球与非梗死半球, 称质量; 采用 50% 的三氯乙酸溶液按 1.5 mL·g⁻¹ 脑组织进行匀浆, 离心 20 min(3 000 r·min⁻¹, 离心半径 8 cm), 取上清液, 酶标仪于 620 nm 处测定吸光度。对倍稀释法制作伊文思蓝标准曲线, 依据绘制的标准曲线计算伊文思蓝的含量(μg·g⁻¹ 脑组织)。

1.11 RT-PCR 检测大鼠脑组织 Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA 的表达 同“1.7”项, 末次给药后, 每组取 15 只大鼠脱颈法处死, 迅速取出大脑, 提取脑组织总 RNA, 按照逆转录以及 PCR 试剂盒的操作步骤进行反转录及实时荧光定量 PCR 反应。PCR 反应条件: 95 °C, 30 s; 60 °C, 40 s; 72 °C, 60 s。40 次循环。以 Opticon Monitor 3 软件对结果进行分析。实验重复 3 次取平均值。引物由

上海英骏生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

引物	引物序列
β-actin	Forward 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TA -3' Reverse 5'-CTC GGT GAG GAT CTT CAT GA-3'
Sema3E	Forward 5'-AAGTCAGATTCCATCACTGTGACAT-3' Reverse 5'-AGCAAAGTACTGTTGTTCTCTATGC-3'
PlexinD1	Forward 5'-CAGGTGGTCGCTCTGATGGA AAA-3' Reverse 5'-TCTGTGGCAATGGGCAG AAAC-3'
Sema4D	Forward 5'-CAGACAGACTCAATCTCTTTTCAC-3' Reverse 5'-CAATGTCCTAATGTCAGCTATAC-3'
PlexinB	Forward 5'-CAGCGTACTACAAGAAGATCATCG-3' Reverse 5'-GCTCAAACCTGTGCTGCAGTTGAGC-3'

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA), 两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪甲苷对大鼠中动脉闭塞大鼠神经功能的影响 见表 2。假手术组神经功能均正常, 模型对照组大鼠神经功能评分均明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组与模型组比较, 均出现下降趋势, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 黄芪甲苷对大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠神经功能评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

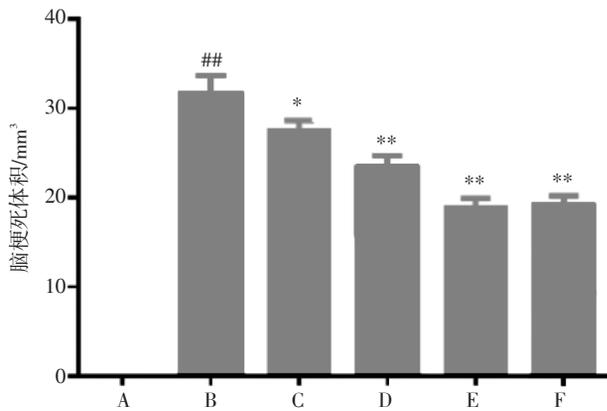
Table 2 Effect of astragaloside IV on the score of nerve function in MCAO rats($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

分组	神经功能缺损评分/分		
	1 d	7 d	14 d
假手术组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	11.41 ± 0.78 ^{##}	9.23 ± 0.72 ^{##}	6.72 ± 0.53 ^{##}
黄芪甲苷低剂量组	11.10 ± 0.74	8.84 ± 0.62	6.50 ± 0.45
黄芪甲苷中剂量组	10.35 ± 0.59 [*]	7.64 ± 0.47 [*]	5.70 ± 0.50 [*]
黄芪甲苷高剂量组	9.82 ± 0.61 ^{**}	6.80 ± 0.38 ^{**}	4.73 ± 0.36 ^{**}
依达拉奉组	9.22 ± 0.78 ^{**}	6.46 ± 0.40 ^{**}	4.71 ± 0.40 ^{**}

注: 与假手术组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.2 黄芪甲苷对大鼠中动脉闭塞大鼠脑梗死体积的影响 见图 1。与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积明显变大, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 黄芪甲

昔低、中、高剂量组及依达拉奉组与模型组比脑梗死体积明显缩小, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷低剂量组; D. 黄芪甲苷中剂量组; E. 黄芪甲苷高剂量组; F. 依达拉奉组。与假手术组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

图1 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Figure 1 Effect of astragaloside IV on cerebral infarction volume in MCAO rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

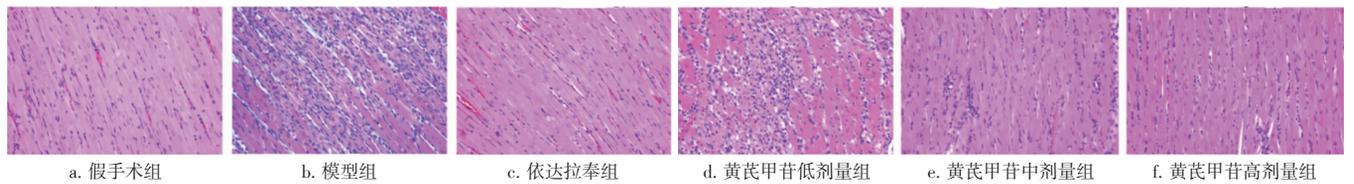
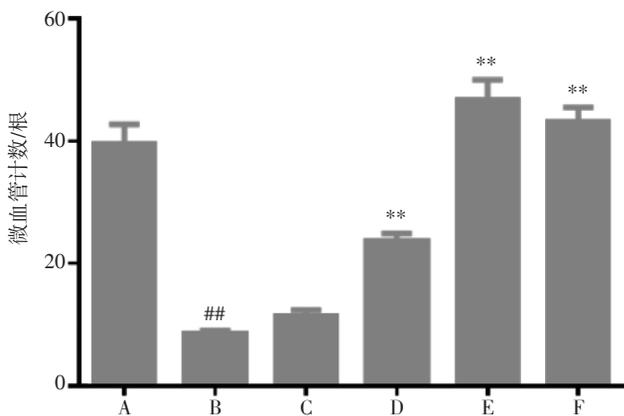


图2 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑组织病理变化的影响(HE, $\times 400$)

Figure 2 Effect of astragaloside IV on pathological changes of brain tissue in MCAO rats(HE, $\times 400$)



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷低剂量组; D. 黄芪甲苷中剂量组; E. 黄芪甲苷高剂量组; F. 依达拉奉组。与假手术组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$

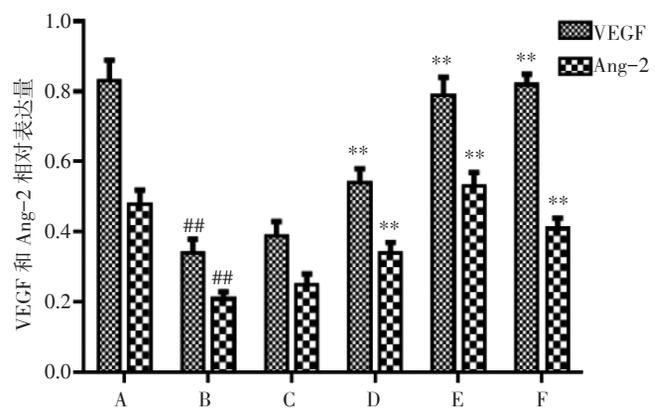
图3 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑组织微血管计数(MVC)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Figure 3 Effect of astragaloside IV on MVC in brain tissue of MCAO rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

2.3 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞大鼠脑组织病理变化的影响 见图2。假手术组脑组织形态结构正常, 细胞排列均匀整齐; 模型组细胞排列紊乱, 且有空泡变性, 与周围组织间隙变大, 有大量炎症细胞浸润。与模型组比较, 黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组细胞排列比较均匀, 细胞空泡变性减少, 与周围组织间隙变小, 炎症细胞浸润明显减少, 形态基本恢复正常。

2.4 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞大鼠微血管计数的影响 见图3。与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织微血管计数明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组大鼠脑组织微血管计数明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞大鼠脑组织 VEGF、Ang-2 表达的影响 见图4。与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 VEGF、Ang-2 表达量明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组大鼠脑组织 VEGF、Ang-2 表达量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

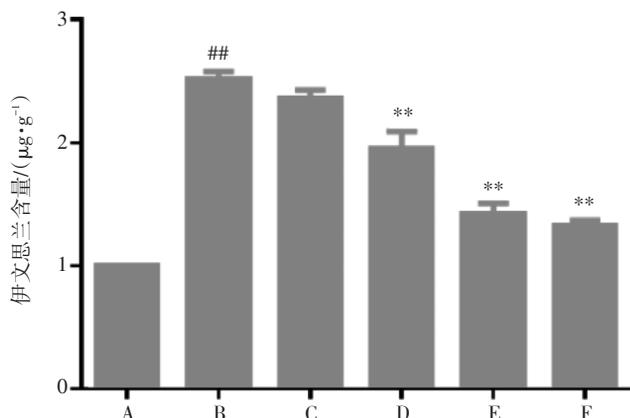


注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷低剂量组; D. 黄芪甲苷中剂量组; E. 黄芪甲苷高剂量组; F. 依达拉奉组。与假手术组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$

图4 黄芪甲苷对大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑组织血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-2(Ang-2)表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Figure 4 Effects of astragaloside IV on the expression of VEGF and Ang-2 in the brain tissues of MCAO rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

2.6 黄芪甲苷对大鼠脑中动脉闭塞大鼠血脑屏障通透性的影响 见图 5。与假手术组比较，模型组大鼠脑组织伊文思兰含量明显增加，差异有统计学意义($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组大鼠脑组织伊文思兰含量明显降低，差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 黄芪甲苷低剂量组；D. 黄芪甲苷中剂量组；E. 黄芪甲苷高剂量组；F. 依达拉奉组。与假手术组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{**}P < 0.01$

图 5 黄芪甲苷对大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠血脑屏障通透性的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Figure 5 Effect of astragaloside IV on blood-brain barrier permeability in MCAO rats($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.7 黄芪甲苷对大鼠脑中动脉闭塞大鼠脑组织 Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA 表达的影响 见表 3。与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中 Sema3E、PlexinD1、Sema4D 及 PlexinB1 mRNA 的表达量明显增加，差异有统计学意义($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪甲苷中、高剂量组及依达拉奉组大鼠脑组织 Sema3E、PlexinD1、Sema4D 及 PlexinB1 mRNA 的表达量明显降低，差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

脑梗死后血管内皮受到损伤、渗透性增加，血管重塑在脑梗死后脑功能恢复中发挥重要作用^[9-10]。研究^[11-12]显示，黄芪甲苷可通过促进血管新生、抗炎等机制改善脑缺血再灌注、心肌缺血再灌注损伤。在本实验中，黄芪甲苷组大鼠神经功能评分明显降低，脑梗死体积明显减少，血脑屏障通透性明显降低，提示黄芪甲苷具有较好的脑保护作用。

血管新生可以为神经修复提供氧气、营养及大量的生长因子，是脑缺血后神经修复的基础；VEGF 是

表 3 黄芪甲苷对大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑组织 Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of astragaloside IV on mRNA expression of Sema3E, PlexinD1, Sema4D and PlexinB1 in brain tissues of MCAO rats($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	Sema3E	PlexinD1	Sema4D	PlexinB1
假手术组	0.22 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.45 ± 0.03
模型组	0.56 ± 0.03 ^{##}	0.85 ± 0.05 ^{##}	0.46 ± 0.02 ^{##}	0.84 ± 0.06 ^{##}
黄芪甲苷低剂量组	0.51 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.42 ± 0.02	0.81 ± 0.05
黄芪甲苷中剂量组	0.39 ± 0.02 ^{**}	0.63 ± 0.03 ^{**}	0.35 ± 0.02 ^{**}	0.62 ± 0.04 ^{**}
黄芪甲苷高剂量组	0.20 ± 0.02 ^{**}	0.42 ± 0.02 ^{**}	0.23 ± 0.02 ^{**}	0.44 ± 0.02 ^{**}
依达拉奉组	0.23 ± 0.02 ^{**}	0.39 ± 0.02 ^{**}	0.21 ± 0.02 ^{**}	0.46 ± 0.02 ^{**}

注：与假手术组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{**}P < 0.01$

血管新生的关键调控因子，可以诱导细胞外基质降解、促进血管内皮细胞增殖、存活，从而促进新血管的形成^[13]。Ang-2 是一种促血管生成因子，在内皮细胞中特异性表达，当脑组织供血供氧不足时，Ang-2 可与 VEGF 共同作用，促进血管重塑和神经再生^[14]。血脑屏障(BBB)受损是脑缺血再灌注后产生的继发性脑损伤，是造成脑水肿、出血转化的主要病理变化^[15]，而严重脑水肿和出血转化是造成脑卒中患者高死亡率的重要原因^[16]。在脑梗死初期，梗死核心血管通透性出现短暂性增加；在脑梗死后 2 ~ 3 d 内，缺血半暗带区域出现持续血脑屏障破坏，表现为血管源性水肿，此时促血管生成因子失调可加重血脑屏障的损坏^[17-18]。

在本实验中，模型对照组大鼠神经功能评分升高，脑梗死体积增加，脑组织中微血管计数明显减少，VEGF、Ang-2 表达明显降低，血脑屏障通透性明显增加，说明大鼠神经功能损伤严重，血管内皮受损、渗透性增加，血脑屏障受损。经过黄芪甲苷治疗后，大鼠脑神经功能评分下降，梗死体积明显减少，脑组织中 MVC 明显增加，VEGF、Ang-2 表达明显升高，血脑屏障通透性明显降低。说明黄芪甲苷能促进脑损伤后的血管新生，修复受损的血脑屏障。

Sema3E 是一种抗血管生成信号，Sema3E 或其受体 PlexinD1 基因缺失可引起血管的异常生长和旺盛^[19]。Sema4D 也是血管系统的调节因子，有研究^[20]证实，在 iNOS 阳性的活化小胶质细胞中，Sema4D 基因敲除可改善其缺血性损伤。此外，Sema4D 与血脑屏障的通透性有关，其机制是通过内皮细胞、星形胶质细胞和周细胞的相互作用实现的^[21]。为进一步

探索黄芪甲苷改善脑损伤的作用机制,检测脑组织中Sema3E/PlexinD1、Sema4D/PlexinB1通路表达分子生物学的表达,发现模型组大鼠Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA表达水平均明显增加,而黄芪甲苷各剂量组大鼠Sema3E、PlexinD1、Sema4D、PlexinB1 mRNA表达水平均明显降低,说明在脑梗死刺激下,黄芪甲苷可以抑制Sema3E/PlexinD1、Sema4D/PlexinB1通路发挥促血管新生、改善血脑屏障受损的作用。

综上所述,黄芪甲苷可以促进脑梗死大鼠血管新生,改善其血脑屏障损伤,其机制可能是通过调节Sema3E/PlexinD1、Sema4D/PlexinB1通路来实现的。

参考文献:

- [1] GUO C, GENG Y, SONG F, et al. Mild hypothermia protects rat neuronal injury after intracerebral hemorrhage via attenuating endoplasmic reticulum response induced neuron apoptosis[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 635(2): 17-23.
- [2] BONG J B, KANG H G, CHOO I S. Acute cerebral infraction after pyrethroid ingestion[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2017, 17(3): 510-511.
- [3] 杨龙, 韩冬. 黄芪甲苷对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激的影响[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(5): 799-803.
- [4] 曲友直, 李敏, 赵燕玲, 等. 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注后血-脑屏障的保护作用及ZO-1蛋白表达的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2009, 22: 278.
- [5] THURSTON G, NOGUERA-TROISE I, YANCOPOULOS G D. The delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 327-331.
- [6] CONROTTO P, VALDEMBRI D, CORSO S, et al. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1[J]. *Blood*, 2005, 105: 4321-4329.
- [7] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] LUO D, FAN X N, MA C C, et al. A study on the effect of neurogenesis and regulation of GSK3 β /PP2A expression in acupuncture treatment of neural functional damage caused by focal ischemia in MCAO rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 962343.
- [9] 王鹏成, 任长虹, 季泰令, 等. 缺血性卒中后血管新生的研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2014, 11(6): 325-328.
- [10] GREENBERG D A. Cerebral angiogenesis: a realistic therapy for ischemic disease[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1135: 21-24.
- [11] 曲友直, 段君民, 曹鹏, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后脑组织MPO活性及TNF- α 、IL-1 β 含量的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(14): 1620-1621.
- [12] 张宇燕, 李剑, 万海同, 等. 黄芪甲苷与川芎嗪合用对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(9): 2788-2792.
- [13] QIAN X, LI X, CAI Q, et al. Phosphoglycerate kinase 1 phosphorylates Beclin1 to induce autophagy[J]. *Mol Cell*, 2017, 65(5): 917.
- [14] MARTEAU L, VALABLE S, DIVOUX D, et al. Angiotensin-2 is vasoprotective in the acute phase of cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(3): 389-395.
- [15] ALVAREZ-SABIN J, MAISTERRA O, SANTAMARINA E, et al. Factors influencing haemorrhagic transformation in ischaemic stroke[J]. *Lancet Neurol* 2013, 12: 689-705.
- [16] DESILLES J P, ROUCHAUD A, LABREUCHE J, et al. Blood-brain barrier disruption is associated with increased mortality after endovascular therapy[J]. *Neurology*, 2013, 80: 844-851.
- [17] ERGUL A, ALHUSBAN A, FAGAN S C. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke[J]. *Stroke*, 2012, 43: 2270-2274.
- [18] SANDOVAL K E, WITT K A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32: 200-219.
- [19] GU C, YOSHIDA Y, LIVET J, et al. Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins[J]. *Science*, 2005, 307: 265-268.
- [20] SAWANO T, WATANABE F, ISHIGUCHI M, et al. Effect of Sema4D on microglial function in middle cerebral artery occlusion mice[J]. *Glia*, 2015, 63: 2249-2259.
- [21] ZHOU H, YANG Y H, BASILE J R. The Semaphorin 4D-Plexin-B1-RhoA signaling axis recruits pericytes and regulates vascular permeability through endothelial production of PDGF-B and ANGPTL4[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17: 261-274.

(编辑: 修春)