

本文引文格式:林超群,李维纳,邱波,等.血塞通注射液通过 HIF-1 α -VEGF 通路调控 NSCs 的增殖和分化[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):184-189.

【论著与临床报道】

血塞通注射液通过 HIF-1 α -VEGF 通路调控 NSCs 的增殖和分化

林超群¹,李维纳²,邱波¹,范学政¹

1. 中国科学院大学深圳医院(光明)神经外科,广东 深圳 518106;
2. 广西柳州爱尔眼科医院白内障与青光眼科,广西 柳州 545005]

摘要:目的 探讨缺氧状态下血塞通注射液调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进神经干细胞(NSCs)增殖和分化的机制。方法 孕 14 d SD 大鼠解剖取出胎鼠,分离胎鼠海马组织,提取培养原代 NSCs。血塞通注射液和 NSCs 共培养。建立缺氧 NSCs 模型及无缺氧 NSCs 模型。缺氧模型为 37 °C,5%空气,90%N₂,5%CO₂ 的细胞培养环境。无缺氧模型为 37 °C,5%CO₂,95%空气的细胞培养环境。将 NSCs 分为无缺氧组、无缺氧联合血塞通注射液组、缺氧组、缺氧联合血塞通注射液组。免疫荧光实验鉴定 NSCs,分析 NSCs 的增殖和分化情况。CCK8 实验评估不同浓度血塞通注射液对 NSCs 活力的影响。Western blot 实验分析 HIF-1 α 蛋白表达情况,QRT-PCR 实验检测 VEGF 表达量。结果 1 g/L 浓度的血塞通注射液能明显增加 NSCs 的细胞活力,继续增大血塞通注射液的浓度后,NSCs 的活力无明显变化。缺氧联合血塞通注射液组较缺氧组 NSCs 的细胞活力明显升高($P < 0.01$)。在缺氧状态下,血塞通注射液能显著提升 NSCs 的分化能力,并且能调控 HIF-1 α -VEGF 通路,促进 NSCs 增殖和分化。结论 在缺氧状态下,NSCs 的细胞活性降低,1 g/L 浓度的血塞通注射液能显著提升 NSCs 的细胞活性,血塞通注射液不仅挽救缺氧状态下 NSCs 的细胞活力下降,而且能显著提升 NSCs 的分化能力。其机制为缺氧状态下血塞通注射液调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖和分化。

关键词:血塞通注射液;NSCs;HIF-1 α ;VEGF;缺氧

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2022)02-0184-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.009

Xuesaitong injection's regulation of the proliferation and differentiation of NSCs through the HIF-1 α -VEGF pathway

Lin Chaoqun¹, Li Weina², Qiu Bo¹, Fan Xuezheng¹

1. Department of Neurosurgery, Shenzhen (Guangming) Hospital of University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518106, Guangdong, China;
2. Department of Cataract and Glaucoma, Liuzhou Aier Eye Hospital, Liuzhou 545005, Guangxi, China]

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Xuesaitong injection regulating the HIF-1 α -VEGF pathway to promote the proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) under hypoxia. **Methods**

Fetal rats were removed from dissected SD rats on the 14th day of gestation. Their hippocampus was isolated. And primary NSCs were extracted from the hippocampus and cultured. Xuesaitong injection was co-cultured with NSCs. The hypoxic NSCs model and the non-hypoxic NSCs model were established. The hypoxic NSCs model was established in a cell culture environment of 37 °C, 5% air, 90% N₂, and 5% CO₂. The non-hypoxic NSCs model was established in a cell culture environment of 37 °C, 5% CO₂ and 95% air. The NSCs were divided into non-hypoxia group, non-hypoxia Xuesaitong injection group, hypoxia group and hypoxia Xuesaitong injection group. The NSCs were identified by immunofluorescence assay, with their proliferation and

基金项目:深圳市光明区科技创新局中医药基础研究项目(2020R01118)

第一作者简介:林超群(1986-),男,硕士,主治医师,研究方向:神经外科手术治疗神经系统疾病的诊治,长期研究神经干细胞及其外泌体治疗缺血性脑疾病,E-mail:1668598098@qq.com

differentiation to be analyzed. Cell Counting Kit-8 assay was employed to evaluate the effects of different concentrations of Xuesaitong injection on the activity of NSCs. Western blot assay was adopted to analyze the expression of HIF-1 α protein and QRT-PCR assay to detect the expression of VEGF. **Results** Xuesaitong injection at the concentration of 1 g/L could significantly increase the cell viability of NSCs, but there was no significant change in the viability of NSCs after increasing the concentration. The cell viability of NSCs in the hypoxia Xuesaitong injection group was significantly higher than that in the hypoxia group ($P < 0.01$). Under the condition of hypoxia, Xuesaitong injection could significantly enhance the differentiation ability of NSCs and regulate the HIF-1 α -VEGF pathway to promote the proliferation and differentiation of NSCs. **Conclusion** Under the condition of hypoxia, the cell activity of NSCs decreases. Xuesaitong injection at 1 g/L concentration can significantly improve the cell activity of NSCs. Xuesaitong injection can not only prevent the decrease of cell activity of NSCs under the condition of hypoxia, but can also significantly improve the differentiation ability of NSCs. The mechanism is that Xuesaitong injection regulates the HIF-1 α -VEGF pathway to promote the proliferation and differentiation of NSCs under the condition of hypoxia.

Key words: Xuesaitong injection; NSCs; HIF-1 α ; VEGF; hypoxia

随着老年化席卷全球,脑卒中在全球发病率进一步上升,其中缺血性脑卒中占其发病率的 70%,且致死率极高,即使病后生存,其致残率也居高不下^[1]。在 20 世纪 90 年代,各国科学家开始了神经干细胞(NSCs)的深入研究^[2],研究表明^[3]脑缺氧往往会导致 NSCs 的增殖能力和分化能力受到抑制,甚至发生凋亡,而且 NSCs 对缺氧比其他类型的细胞^[4]更敏感,缺氧后 NSCs 可能发生延迟死亡^[5]。在缺血性脑卒中动物模型中,内源性 NSCs 能促进大鼠神经功能的恢复,在缺血性脑卒中修复的机制中发挥着至关重要的作用^[6]。星形胶质细胞可以分泌多种可溶性因子,能和 NSCs 发生一系列的神经网络功能,因此,星形胶质细胞在缺血缺氧性中枢神经系统疾病中的作用也不可忽视^[7]。如果我们能找到一种药物,能促进 NSCs 分化为星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元,并且可以在缺氧环境下保护 NSCs,避免 NSCs 的增殖能力和分化能力受到抑制,这种药物可能对缺血性脑卒中至关重要。

国内外使用中医中药治疗缺血性脑卒中成为了 21 世纪研究的新热点^[8]。国内学者发现血塞通胶囊可明显增加梗死区脑组织神经干细胞的增殖能力及分化能力^[9],但血塞通注射液对神经干细胞增殖能力及分化能力的影响少见报道。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)为缺氧环境中非常重要的转录调节因子,对 NSCs 增殖、分化发挥着关键作用^[10-11]。实验证明,在缺氧环境中,NSCs 的增殖和分化与 HIF-1 的表达呈正相关^[12]。HIF-1 分为 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基,HIF-1 的活性主要由 HIF-1 α 决定^[13]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种能促进颅内新生血管形成的细胞因子,在缺氧环境中受到 HIF-1 的调控^[14]。

本文建立缺氧 NSCs 模型及无缺氧 NSCs 模型^[15],拟探讨在缺氧环境中,血塞通注射液与星形胶质细胞等多种细胞的相互关系,并且研究血塞通注射液通过调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖能力及分化能力,为进一步阐述血塞通注射液治疗缺血性脑卒中的机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 原代 NSCs 的提取培养(胎鼠海马来源) 雌性 SD 大鼠(8 周龄,体重 240~280 g)购于北京维通利华实验动物有限公司,动物实验根据国家《实验动物管理条例》、《广东省实验动物管理办法》以及中国科学院大学深圳医院实验动物中心规章制度执行,本动物实验经中国科学院大学深圳医院伦理委员会批准后进行。使用颈部脱臼的方法结束孕 14 d SD 大鼠的生命,在无菌操作台,0 $^{\circ}\text{C}$ 环境中腹部解剖实验大鼠,取出胎鼠,分离出胎鼠的大脑,显微镜下解剖出胎鼠海马组织,显微剪均匀剪碎海马组织,用 0.25% 的胰酶(美国 Gibco 公司)消化 5 min,10% 胎牛血清(北京索莱宝科技有限公司)终止消化,800 r/min、离心半径 9.5 cm 离心 5 min,弃上清,加入 NSCs 完全培养(DMEM/F12+2% B27+20 ng/ml EGF+20 ng/ml bFGF+1% 双抗)(DMEM/F12 培养基、B27 细胞补充添加剂、双抗均为美国 Gibco 公司;EGF、bFGF 均为美国 PeproTech 公司)后,仔细吹打均匀重悬,过 400 目细胞筛网,细胞计数后,接种于细胞培养瓶中,把细胞密度调整为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、二氧化碳浓度为 5% 的恒温培养箱(美国 Thermo 公司)中培养,3 d 换液,7 d 传代,每天在显微镜下观察 NSCs 的状态,取第 2 代悬浮神经干细胞球进行下一步实验。

1.2 NSCs 免疫荧光鉴定 使用浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多聚赖氨酸预先包被 24 孔板爬片,PBS 轻柔冲洗 3

次,取吹打均匀的第 2 代悬浮神经干细胞 200 μl 悬于 24 孔板爬片上,放入恒温培养箱中继续培养 2 h,细胞贴壁后,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 轻柔冲洗 3 次;加入 0.3% Triton X-100(美国 Amresco 公司)通透 30 min,PBS 轻柔冲洗 3 次;加入 10% 驴血清(美国 Jackson 公司)37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,不洗,加入一抗(小鼠抗兔多克隆抗体 Nestin,美国 Abcam 公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 轻柔冲洗 3 次;在避光环境下加入同源荧光二抗(ab150125,美国 Abcam 公司)室温孵育 1 h,PBS 轻柔冲洗 3 次;DAPI(北京雷根生物技术有限公司染核),PBS 轻柔冲洗 3 次,取出爬片后置于防脱载玻片上(预先滴加抗荧光淬灭剂),封片,使用倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)观察染色结果。

1.3 细胞增殖/抑制 CCK8 实验 CCK8 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,用 Accutase 分离液(美国 Sigma-Aldrich 公司)消化第 2 代悬浮神经干细胞球,消化充分后细胞球消失,形成多个悬浮单细胞,调整细胞浓度,以 1×10^4 个/孔的细胞密度种于 96 孔板中,分组加入不同浓度血塞通注射液(分别为 0 g/L、0.25 g/L、0.5 g/L、0.75 g/L、1 g/L、1.25 g/L;湖北清大康迪药业有限公司),培养 3 d 后,每孔加入 10 μl CCK8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长各孔的吸光度值,记录数据并统计。建立缺氧 NSCs 模型及无缺氧模型,缺氧模型为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 空气、90% N_2 、5% CO_2 的细胞培养环境。无缺氧模型为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气的细胞培养环境。将 NSCs 分为无缺氧组、无缺氧联合血塞通注射液组、缺氧组、缺氧联合血塞通注射液组。4 组不同细胞分别接种于 96 孔板,无缺氧组和无缺氧联合血塞通注射液组细胞在无缺氧环境中培养 24 h。缺氧组和缺氧联合血塞通注射液组细胞在缺氧环境中培养 24 h,然后每孔加入 10 μl CCK8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长各孔的吸光度值,记录数据并统计。

1.4 NSCs 诱导分化及免疫荧光实验 为了研究缺氧状态下血塞通注射液对 NSCs 分化能力的影响,使用干细胞诱导分化培养基(含 2% FBS 的 DMEM 培养基)对 NSCs 进行培养,培养 3 d 后进行细胞免疫荧光实验。实验分为对照组及血塞通注射液给药组,其中药物浓度为 1 g/L。两组细胞在缺氧环境中培养 1 d,然后在无缺氧患者中继续培养 2 d。GFAP 标记星形胶质细胞,Tuj-1 标记神经元,MBP 标记少突胶质细胞。细胞培养 3 d 后,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 轻柔冲洗 3 次;加入 0.3% 曲拉通 Triton X-100 通透 30 min,PBS 轻柔冲洗 3 次;加入 10% 驴血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,不洗,分别加入一抗(兔抗羊多克隆抗体

GFAP、小鼠抗兔多克隆抗体 Tuj1、羊抗兔多克隆抗体 MBP;美国 Abcam 公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 轻柔冲洗 3 次;在避光环境下加入同源荧光二抗(ab150079、ab150181,美国 Abcam 公司)室温孵育 1 h,PBS 轻柔冲洗 3 次;DAPI 染核,PBS 轻柔冲洗 3 次,取出爬片后置于防脱载玻片上(预先滴加抗荧光淬灭剂),封片,使用荧光显微镜观察染色结果。

1.5 Western blot 实验 检测实验中 Nestin、Tuj1、GFAP、MBP、HIF-1 α 蛋白的表达。分别收集各实验细胞后,提取相应实验的细胞总蛋白(使用 RAPI 裂解),通过 BCA 法检测蛋白浓度,并且调整浓度使各组一致,加入 $5 \times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 5~10 min。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,待胶凝固后准备加样电泳;每孔上样量 20 μg ,蛋白电泳条件为 120 V 90 min;准备与电泳凝胶合适大小的 PVDF 膜,用甲醇浸泡 20 s 使膜激活,准备转膜,转膜夹两面各放置 1 块海绵和 3 块滤纸,凝胶和膜的放置顺序为转膜夹黑面-凝胶-PVDF 膜-白面,转膜条件为 300 mA 90 min;转膜结束后,不洗,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液摇床上室温封闭 1 h;膜不洗,根据预染蛋白 marker 分子量大小分别裁剪不同位置的分子量抗体,孵一抗 Nestin(1 : 1 000)、Tuj1(1 : 1 000)、GFAP(1 : 1 000)、MBP(1 : 1 000)、HIF-1 α (1 : 500),内参为 GAPDH(1 : 2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;第 2 天一抗室温摇床 30 min,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,室温摇床孵育相应山羊抗小鼠标记二抗(1 : 5 000)1 h,TBST 再洗 3 次,每次 10 min,用 ECL 显色及化学发光成像仪进行曝光,保存图片数据并分析。

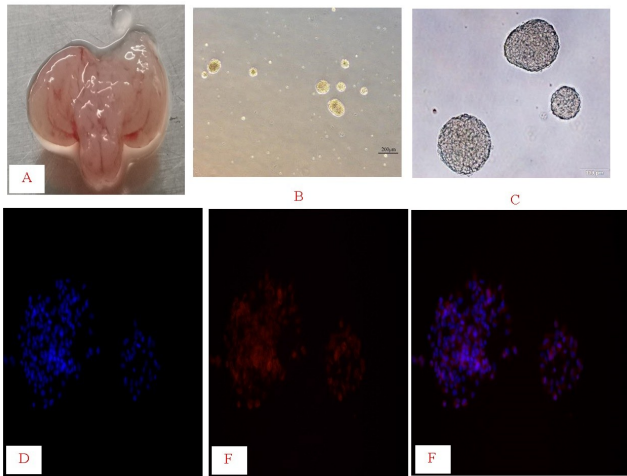
1.6 qRT-PCR 实验 收集对照组及血塞通注射液给药组细胞后,使用 Trizol 法提取 RNA。按照试剂盒说明书中的步骤提取 RNA。分光光度法测定 RNA 浓度和纯度。然后按试剂盒说明书合成逆转 20 μl cDNA。其样本 cDNA 稀释 10 倍为 SYBR Green 实时定量 PCR 反应的最佳模板浓度。25 μl PCR 反应体系:2X Fermentas MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 12.5 μl ,模板(cDNA 稀释 10 倍)1 μl ,引物 F 和 R 5 pmol/ μl mix 1 μl ,dH₂O 10.5 μl 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,一共循环 45 次,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。从 60 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$,每上升 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 取一次荧光值,最后生成融解曲线。所有样本均重复检测 3 次,计算出 Ct 值,各基因 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算分析。PCR 引物合成 VEGF 和及内参照 β -actin 引物。各基因的上下游引物序列分别为:VEGF:5'-CACCCACATACATACA-3';5'-CTCAAGTCCACAGCAGTCAA-3'; β -actin:5'-GCAGAAGGAGAT-

CACAGCCCT-3' ; 5'-GCTGATCCACATCTGCTG-GAA-3';引物由广州复能基因有限公司合成。

1.7 统计学方法 以上检测指标用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 22.0 和 GraphPad 8.0 软件对实验数据进行处理。对实验所得数据首先进行正态分布及方差齐性检验,对于符合正态分布及方差齐性的数据资料,两组之间均数比较用独立 t 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代胎鼠海马来源 NSCs 形态及鉴定 分离出胎鼠的大脑,显微镜下解剖出胎鼠海马组织,并提取 NSCs。NSCs 悬浮生长,随着增殖的 NSCs 逐渐融合,6~7 d 后,肉眼就能辨认出含有数千个细胞的大神经球。原代 NSCs 在体外是神经球样的,通过显微镜可以看出 NSCs 悬浮球状生长,通过免疫荧光法证实表达 NSCs 的特异性标记蛋白 Nestin(见图 1)。



注:A:分离出胎鼠的大脑,可见胎鼠海马组织;B:在显微镜下观察神经球(200 μm);C:在显微镜下观察神经球(100 μm);D: NSCs 免疫荧光鉴定(DAPI, $\times 100$); E: NSCs 免疫荧光鉴定(Nestin, $\times 100$); F: NSCs 免疫荧光鉴定(Merge, $\times 100$)。

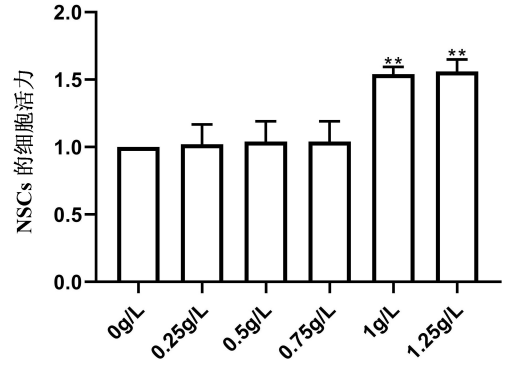
图 1 原代胎鼠海马来源 NSCs 形态及鉴定

2.2 不同浓度血塞通注射液对 NSCs 活力的影响

使用 CCK8 实验对血塞通注射液的浓度进行筛选,评估不同浓度血塞通注射液对 NSCs 活力的影响(见图 2)。可见 1 g/L 浓度的血塞通注射液能明显增加 NSCs 的细胞活力,继续增大血塞通注射液的浓度后,NSCs 的活力无明显变化。所有的实验数据均来自于至少 3 次独立重复实验。

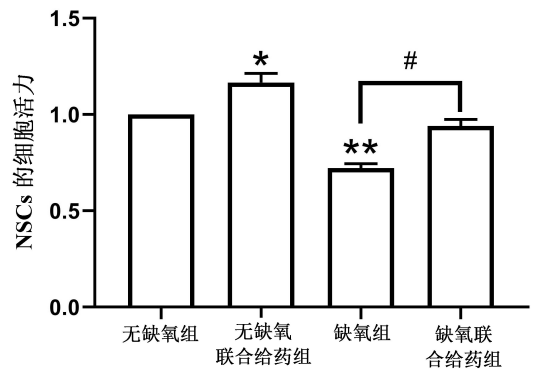
2.3 缺氧状态下血塞通注射液对 NSCs 细胞活力的影响 将 NSCs 分为无缺氧组、无缺氧+血塞通注射液组、缺氧组、缺氧+血塞通注射液组,其中血塞通注射液浓度为:1 g/L。使用 CCK8 实验评估血塞通注射

液对缺氧状态下 NSCs 的细胞活力的影响(见图 3): ①在无缺氧状态中,给药组的细胞活力升高;②在缺氧状态中,NSCs 的细胞活力明显下降;③在缺氧状态中,给药组的细胞活力升高。所有的实验数据均来自于至少 3 次独立重复实验。



注:与 0.25 g/L、0.5 g/L、0.75 g/L 进行比较,**表示 $P < 0.01$ 。

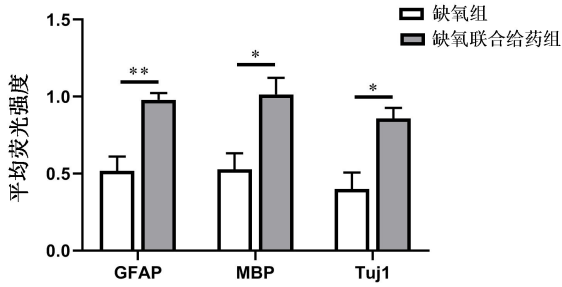
图 2 不同浓度血塞通注射液对 NSCs 活力的影响



注:*、#表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

图 3 缺氧状态下血塞通注射液对 NSCs 细胞活力的影响

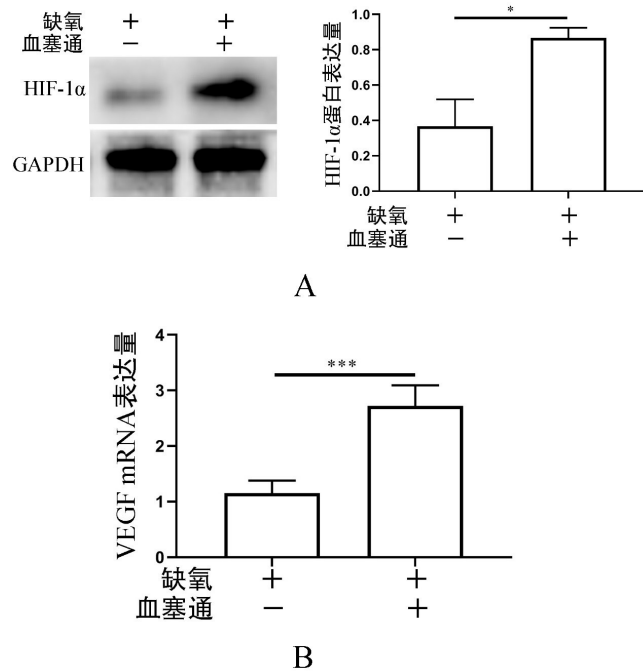
2.4 缺氧状态下血塞通注射液对 NSCs 分化能力的影响 将 NSCs 分为缺氧组、缺氧联合血塞通注射液组,使用干细胞诱导分化培养基(含 2% FBS 的 DMEM 培养基)对 NSCs 进行培养,两组细胞在缺氧环境中培养 1 d,然后在无缺氧状态中继续培养 2 d。其中血塞通注射液浓度为 1 g/L。使用免疫荧光实验评估血塞通注射液对缺氧状态下 NSCs 分化能力的影响。通过免疫荧光实验证实了缺氧联合血塞通组中神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的特异性蛋白 TuJ1、GFAP、MBP 的荧光强度明显高于缺氧组。在缺氧状态下,1 g/L 浓度的血塞通注射液能显著提升 NSCs 的分化能力(见图 4)。NSCs 诱导分化及免疫荧光实验显示:在缺氧状态下,血塞通注射液能显著提升 NSCs 的分化能力。所有的实验数据均来自于至少 3 次独立重复实验。



注: *、# 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 4 缺氧状态下血塞通注射液对 NSCs 分化能力的影响

2.5 缺氧状态下血塞通注射液调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖和分化 将 NSCs 分为缺氧组、缺氧联合血塞通注射液组,使用干细胞诱导分化培养基(含 2%FBS 的 DMEM 培养基)对 NSCs 进行培养,两组细胞在缺氧环境中培养 1 d。其中血塞通注射液浓度为 1 g/L。我们使用 Western blot analysis 实验及 Quantitative RT-PCR 实验评估缺氧状态下血塞通注射液促进 NSCs 增殖和分化的能力是否与 HIF-1 α -VEGF 通路相关(见图 5)。所有的实验数据均来自于至少 3 次独立重复实验。



注:+-代表:单纯缺氧组,++代表:缺氧联合给药组;A:通过 Western blot analysis 实验发现:缺氧联合血塞通注射液组的 HIF-1 α 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), * 表示 $P < 0.05$ 。B:通过 Quantitative RT-PCR 实验我们发现:缺氧联合血塞通注射液组的 VEGF 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), *** 表示 $P < 0.01$ 。

图 5 缺氧状态下血塞通注射液调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖和分化

3 讨论

本研究的目的是探讨血塞通注射液对缺氧状态下神经干细胞活性、增殖和分化的影响,同时探讨其作用机制。研究发现,血塞通注射液的参考治疗浓度为 0.8 ~ 1 g/L^[16-17],我们的研究结果表明,血塞通注射液与增殖培养基中的 NSCs 共同培养,可提高缺氧状态下 NSCs 的细胞活性,其最佳浓度为 1 g/L。血塞通注射液与分化培养基中的 NSCs 共同培养,能显著提升 NSCs 的分化能力。进一步机制研究发现,缺氧状态下血塞通注射液可调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖和分化。

近年来,祖国中医药治疗神经系统病变的药物越来越受重视,其中,主要成分为三七总皂苷的血塞通注射液已广泛应用于临床,血塞通注射液具有抑制血小板聚集,改善脑血供、促进脑功能恢复的作用^[18]。虽然在许多神经系统疾病的动物和细胞模型中,血塞通注射液是一种潜在的保护因子,临床实践也证明了其药物安全性^[19],但它药物作用的机制并没有得到足够的关注。

自从 1992 年 Reynolds 首次提出 NSCs 的概念后,通过 NSCs 治疗神经系统疾病,给脑损伤后神经功能的恢复带来了新希望^[2]。实验表明^[20-23],大脑缺氧发生后,内源性 NSCs 的增殖、分化以及迁徙过程均受到缺氧因素的影响,从而诱发细胞程序性凋亡,影响脑损伤后神经功能的恢复。HIF-1 α 是细胞内的一种转录因子,无缺氧状态下可被泛素化蛋白酶降解,但是缺氧状态下泛素化蛋白酶大部分被抑制,因此在缺氧状态下胞质内存在 HIF-1 α 并可发挥作用。HIF-1 α 可以启动与细胞存活相关的多种基因的表达,从而发挥神经保护作用^[24]。VEGF 是一种细胞因子,可促进内皮细胞的生长,与神经损伤的修复密切相关^[25],有文献证实,在脑缺氧环境中,VEGF 能够促进 NSCs 向脑损伤区域迁移^[26],并且能促进神经元增殖和新血管的形成^[27],有效地保护脑损伤区域的神经功能。Harms KM 等^[28]发现,NSCs 通过激活 HIF-1 α -VEGF 信号通路在缺氧缺血环境促进神经元存活,在中风后促进神经元的存活中的发挥重要作用。

在本研究中,我们发现血塞通注射液与 NSCs 共培养,在缺氧状态下 Western blot analysis 显示 HIF-1 α 蛋白水平在 NSC 分化过程中显著升高,同时 Quantitative RT-PCR 显示 VEGF 表达量也升高。揭示缺氧状态下血塞通注射液可能调控 HIF-1 α -VEGF 通路促进 NSCs 增殖和分化,本研究有一定的局限性,后续研究需要设置模拟剂、抑制剂等组别进行观察,以及补充敲除 HIF-1 α 基因的实验结果。由于本研究是在体外进行的,因此在体内缺氧条件下进一步探讨血

塞通注射液对 NSCs 的影响仍有必要。虽然在我们的研究中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平发生了显著的变化,但是目前尚不清楚血塞通注射液在 NSCs 中调控 HIF-1 α -VEGF 通路的潜在机制,需要进一步研究来揭示这一具体机制。

参考文献:

- [1] Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(18): 2076-2097.
- [2] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [3] Ikeda T, Iwai M, Hayashi T, et al. Limited differentiation to neurons and astroglia from neural stem cells in the cortex and striatum after ischemia/hypoxia in the neonatal rat brain[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(3 Pt 1): 849-856.
- [4] Sochocka E, Juurlink BH, Code WE, et al. Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and 'recovery' from hypoxia, substrate deprivation and simulated ischemia[J]. *Brain Res*, 1994, 638(1-2): 21-28.
- [5] Bickler PE. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms[J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(Pt 18): 3243-3249.
- [6] Kokaia Z, Darsalia V. Neural stem cell-based therapy for ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(3): 272-278.
- [7] Jones EV, Bouvier DS. Astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in CNS remodelling during development and disease[J]. *Neural Plast*, 2014, 2014: 321209.
- [8] Wan F, Niu X, Song YL, et al. The role of chinese herbs and acupuncture on the inflammation reaction after cerebral ischemia[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(6): 709-719.
- [9] 张金生, 张宝霞, 杜梅梅, 等. 血塞通胶囊对大鼠梗死脑组织自体神经干细胞修复和再生的影响[J]. *中医杂志*, 2014, 55(17): 1494-1497.
- [10] 周文婷. HIF-1 活性调控机制的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2020, 51(6): 443-448.
- [11] Carrica L, Li L, Newville J, et al. Genetic inactivation of hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) in adult hippocampal progenitors impairs neurogenesis and pattern discrimination learning[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 157: 79-85.
- [12] Cunningham LA, Candelario K, Li L. Roles for HIF-1 α in neural stem cell function and the regenerative response to stroke[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(2): 410-417.
- [13] Li L, Candelario KM, Thomas K, et al. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(50): 16713-16719.
- [14] 范雪, 屈艺, 母得志, 等. 缺氧缺血性脑病中血管内皮生长因子作用的研究进展[J]. *中华妇幼临床医学杂志: 电子版*, 2016, 12(4): 453-457.
- [15] 马浚宁, 高俊玮, 侯博儒, 等. 糖氧剥夺对神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(6): 876-882.
- [16] 李东建, 崔宏彬. 重组人促红细胞生成素联合阿司匹林血塞通注射液治疗急性缺血性脑梗死疗效观察[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(24): 4033-4035.
- [17] 王志强, 李斌, 穆珊珊, 等. 5 种活血化瘀类中药注射液对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用研究[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(11): 2356-2364.
- [18] 韩淑娴, 游云. 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(5): 818-822.
- [19] He Y, Gao XM, Li L, et al. Safety of the Xuesaitong injection in China: results from a large-scale multicentre post-marketing surveillance study in a real-world setting[J]. *Curr Med Res Opin*, 2020, 36(12): 1947-1953.
- [20] Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, et al. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(3): 191-198.
- [21] Huang L, Zhang LB. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 173: 1-17.
- [22] Večeřa J, Procházková J, Šumberová V, et al. Hypoxia/Hif1 α prevents premature neuronal differentiation of neural stem cells through the activation of Hes1[J]. *Stem Cell Res*, 2020, 45: 101770.
- [23] 杨静, 陈宇, 庞一强. 低氧预适应对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的 BV2 细胞的保护作用及对其 NLRP3 表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(2): 159-162.
- [24] De Filippis L, Delia D. Hypoxia in the regulation of neural stem cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(17): 2831-2844.
- [25] Feng Y, Ju Y, Cui J, Wang L. Bone marrow stromal cells promote neuromotor functional recovery, via upregulation of neurotrophic factors and synapse proteins following traumatic brain injury in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 654-660.
- [26] 段淑荣, 徐冉, 郝丹丹, 等. VEGF、SDF-1 对神经干细胞迁移作用的研究[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(2): 110-115.
- [27] Meng ZY, Kang HL, Duan W, et al. MicroRNA-210 promotes accumulation of neural precursor cells around ischemic foci after cerebral ischemia by regulating the SOCS1-STAT3-VEGF-C pathway[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(5): e005052.
- [28] Harms KM, Li L, Cunningham LA. Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1 α -regulated VEGF signaling[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9767.

收稿日期: 2021-12-17; 修回日期: 2022-02-28