

· 实验研究 ·

DOI:10.11656/j.issn.1673-9043.2014.01.07

心脑血管舒通及其单体成分对内毒素 激活的小胶质细胞的影响^{*}

卢国彦,杨红云,王少峡,胡利民

(天津中医药大学重点实验室,现代中药发现国家重点实验室,天津市中药药理学重点实验室,
教育部方剂学重点实验室,天津 300193)

摘要:[目的]研究心脑血管舒通及其单体成分对小胶质细胞(BV-2)的影响及其作用机制。[方法]实验分为对照组、脂多糖刺激组、加药组,检测心脑血管舒通(不同稀释倍数的脑血管舒通及其单体成分)对小胶质细胞活力及脂多糖(LPS)诱导小胶质细胞一氧化氮(NO)产生的影响。[结果]心脑血管舒通对LPS诱导的小胶质细胞NO的产生无明显抑制作用,在脑血管舒通13种单体成分中,伪原薯蓣皂苷、支链皂苷元、薯蓣皂苷元可以在不影响细胞活力的情况下抑制NO产生。[结论]心脑血管舒通部分单体成分抑制激活小胶质细胞NO的产生可能是心脑血管舒通发挥神经保护作用机制之一。

关键词:心脑血管舒通;一氧化氮;炎症介质;小胶质细胞

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-9043(2014)01-0019-03

小胶质细胞是中枢神经系统的巨噬细胞,具有免疫防御和参与中枢神经系统的炎症反应,且具有吞噬功能和一定的迁移能力,激活增殖后,可清除脑内细胞外的氧化蛋白,吞噬细胞碎屑和破碎的髓鞘,促进组织修复^[1]。在生理条件下,休眠的小胶质细胞有平衡神经系统和支持神经细胞的重要作用。抑制小胶质细胞过度活化所引起的炎症反应可以作为治疗和缓解神经退行性疾病和脑损伤的重要途径之一^[2-3]。

心脑血管舒通成分为蒺藜总皂苷,具有舒利血脉、平肝解郁、活血祛风的药理作用,现代研究发现蒺藜皂苷有降血脂、抗衰老、抗脂质过氧化作用,有改善脑循环,保护缺血脑组织的作用等^[4],其作用机制尚不明确。本实验采用脂多糖(LPS)激活小胶质细胞,考察其抗神经炎症的作用及物质基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 小胶质细胞系BV-2(北京协和医科大学),心脑血管舒通(吉林敖东股份有限公司),(25R)-26-O-β-D-吡喃葡萄糖基-5α-呋甾-3β,22α,26-

三醇-3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-[β-D-吡喃木糖基-(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)-[α-L-鼠李糖基-(1→2)]-β-D-吡喃半乳糖基(L1化合物)、海柯皂苷元-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-[β-D-木糖基-(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃半乳糖基(L2化合物)、(25R)-5α-螺甾-3β,26-二醇-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-[β-D-吡喃木糖基-(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)-β-D-吡喃半乳糖基和(25R)-5α-螺甾-3β,26-二醇-3-O-β-D-吡喃半乳糖基-(1→2)-[β-D-吡喃木糖基-(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)-β-D-吡喃半乳糖基的混合物(L3化合物)、替告皂苷元-3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-[β-D-吡喃木糖基-(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖基(1→4)-[α-L-鼠李糖基(1→2)]-β-D-吡喃半乳糖基(L4化合物)(马百平老师惠赠),其他心脑血管舒通单体(中新药业),DMEM培养基、胎牛血清(Gibco,USA),一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天),Cell Counting Kit-8(CCK-8,DOJINDO,Japan),LPS(碧云天)。
1.2 实验分组 空白对照组(二甲亚砜,终浓度V/V 1:1 000)、LPS模型组(终浓度0.1 μg/mL)、心脑血管舒通(终浓度为50、10、1、0.1 μg/mL)加LPS组、心脑血管舒通单体(10 μmol/L)加LPS组、阳性对照(终浓度为10 μmol/L)加LPS组。

^{*}基金项目:重大新药创制(2011ZX09201-201)。

作者简介:卢国彦(1986-),女,硕士研究生,主要从事中药药理学研究。

通讯作者:胡利民,E-mail: hulinmin@126.com。

1.3 心脑舒通对小胶质细胞活力的影响 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 接种到 96 孔板过夜, 小胶质细胞加入不同浓度的心脑舒通 (终浓度分别为 50、10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$) 及其单体 (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h 后弃上清, 加入 CCK-8 (终浓度 V/V 1:10) 孵育 0.5 h 后于 450 nm 处测定吸光度。

1.4 心脑舒通对小胶质细胞 NO 产生的影响 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 接种到 48 孔板过夜, 加入不同浓度的心脑舒通 (终浓度分别为 50、10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$) 后, 预孵 0.5 h, 然后加入 LPS (终浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激, 培育 24 h 后收集细胞上清, Greiss 法检测 NO 浓度。

1.5 心脑舒通单体对小胶质细胞 NO 产生的影响 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 接种到 48 孔板过夜, 加入心脑舒通单体 (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$) 后, 预孵 0.5 h, 然后加入 LPS (终浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$)。培育 24 h 后收集细胞上清, Greiss 法检测 NO 浓度。

1.6 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 检测心脑舒通对小胶质细胞活力的影响结果 与空白对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 心脑舒通 (0.1~50 $\mu\text{g/mL}$) 没有细胞毒作用, 见表 1。

表 1 心脑舒通对小胶质细胞活力的影响

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度
空白对照组	-	0.532 9 $\pm$ 0.043 2
心脑舒通混合物	50	0.487 3 $\pm$ 0.043 9
	10	0.528 5 $\pm$ 0.104 1
	1	0.585 7 $\pm$ 0.036 4
	0.1	0.648 9 $\pm$ 0.077 2

注: $n=3$, 结果重复 3 次, 趋势一致。

2.2 Greiss 法检测心脑舒通对小胶质细胞分泌 NO 的影响结果 与 LPS 模型组相比, 阳性对照组能明显抑制 NO 的释放, 心脑舒通对 NO 的释放没有抑制作用。见表 2。

2.3 CCK-8 检测心脑舒通单体成分对小胶质细胞活力影响结果 与空白对照组相比, 伪原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、支脱皂苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元、L1 化合物没有细胞毒作用, 纤细原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、L2 化合物、L3 化合

物、L4 化合物有细胞毒作用, 见表 3。

表 2 心脑舒通对小胶质细胞 NO 的影响

组别	浓度	NO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	-	-1.488 6 $\pm$ 0.223 4
阳性对照组	10 $\mu\text{mol/L}$	5.710 8 $\pm$ 0.966 0**
LPS 模型组	0.1 $\mu\text{g/mL}$	12.959 2 $\pm$ 1.375 2 ^{##}
心脑舒通混合物	50 $\mu\text{g/mL}$	15.271 2 $\pm$ 0.896 4
	10 $\mu\text{g/mL}$	14.214 1 $\pm$ 0.583 5
	1 $\mu\text{g/mL}$	13.204 2 $\pm$ 1.007 6
	0.1 $\mu\text{g/mL}$	13.799 0 $\pm$ 0.828 7

注: 与空白对照组比较, ^{##} $P < 0.005$; 与 LPS 模型组比较, ** $P < 0.005$, $n=3$, 结果重复 3 次, 趋势一致。

表 3 心脑舒通单体成分对小胶质细胞活力的影响

组别	吸光度	组别	吸光度
空白对照组	1.354 7 $\pm$ 0.057 2	原薯蓣皂苷	1.256 1 $\pm$ 0.204 7
伪原薯蓣皂苷	1.309 8 $\pm$ 0.088 1	薯蓣皂苷元	1.490 0 $\pm$ 0.157 4
甲基原薯蓣皂苷	1.250 3 $\pm$ 0.066 8	L1 化合物	1.346 3 $\pm$ 0.164 7
纤细原薯蓣皂苷	1.101 7 $\pm$ 0.094 6*	L2 化合物	0.523 9 $\pm$ 0.067 3**
支脱皂苷元	1.416 4 $\pm$ 0.108 6	L3 化合物	0.459 7 $\pm$ 0.081 9**
海柯皂苷元	1.435 6 $\pm$ 0.154 7	L4 化合物	0.258 8 $\pm$ 0.023 5**
薯蓣皂苷	0.440 8 $\pm$ 0.155 3**		

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.005$, * $P < 0.05$ 。 $n=3$, 结果重复 3 次, 趋势一致。

2.4 Greiss 法检测心脑舒通单体成分对小胶质细胞分泌 NO 的影响结果 与 LPS 模型组相比, 阳性对照组能明显抑制 NO 的释放, 伪原薯蓣皂苷、支脱皂苷元、薯蓣皂苷元、L1 化合物能抑制 NO 的释放, L2 化合物、L3 化合物、L4 化合物也能抑制 NO 的产生, 但结合 2.3, 其抑制作用可能是细胞毒性产生的, 见表 4。

表 4 心脑舒通单体成分对小胶质细胞 NO 的影响

组别	NO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	组别	NO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	-1.101 3 $\pm$ 0.247 1	海柯皂苷元	15.937 9 $\pm$ 2.211 7
阳性对照组	10.893 8 $\pm$ 0.944 2**	原薯蓣皂苷	16.877 5 $\pm$ 1.173 8
LPS 模型组	14.589 9 $\pm$ 0.687 4 ^{##}	薯蓣皂苷元	11.756 5 $\pm$ 1.111 0**
伪原薯蓣皂苷	13.289 2 $\pm$ 0.706 7*	L1 化合物	12.777 8 $\pm$ 0.549 4**
甲基原薯蓣皂苷	15.031 0 $\pm$ 0.902 1	L2 化合物	-0.962 4 $\pm$ 0.548 9**
纤细原薯蓣皂苷	15.516 3 $\pm$ 0.505 5	L3 化合物	-1.356 2 $\pm$ 0.592 8**
支脱皂苷元	9.573 5 $\pm$ 1.333 7**	L4 化合物	-0.910 1 $\pm$ 1.156 2**

注: 与空白对照组比较, ^{##} $P < 0.005$; 与 LPS 模型组比较, ** $P < 0.005$, * $P < 0.05$ 。 $n=3$, 结果重复 3 次, 趋势一致。

3 讨论

心脑舒通对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的产生无明显抑制作用, 在心脑舒通 13 种单体成分中,

伪原薯蓣皂苷、支脱皂苷元、薯蓣皂苷元可以在不影响细胞活力的情况下抑制 NO 产生。

小胶质细胞是中枢神经系统的巨噬细胞,具有免疫防御和炎症反应^[5]。脂多糖能激活休眠的小胶质细胞产生的大多数物质,如 NO、活性氧、白介素-1 β 等,都具有神经毒性,可导致神经元死亡^[6]。实验研究表明,不影响细胞活力的前提下,心脑血管舒通部分单体成分能有效抑制小胶质细胞 NO 的释放^[7-8]。因此,心脑血管舒通抑制小胶质细胞炎症介质的释放可能是其发挥神经保护作用的机制之一。

参考文献:

- [1] 景浩然,胡利民,王少峡,等.丹红注射液及其活性组分对脂多糖诱导的小胶质细胞 NO 分泌的抑制作用[J].现代药物与临床,2013,28(3):285-287.
- [2] Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, et al. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway[J]. Neurobiol Dis, 2002, 11(2): 257-74.
- [3] van Rossum D, Hanisch UK. Microglia[J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(3): 393-411.
- [4] 张 锦.心脑血管舒通对大鼠急性多梗脑缺血的保护作用及机理研究[D].北京:北京中医药大学,2005.
- [5] Li J, Zhang SY, Lu M, et al. Hydroxysafflor yellow A suppresses inflammatory responses of BV2 microglia after oxygen-glucose deprivation[J]. Neuroscience Letters, 2013, 535: 51-56.
- [6] 景浩然,柴丽娟,郭 虹,等.大黄酸对内毒素激活小胶质细胞的影响[J].天津中医药大学学报,2012,31(1):34-35.
- [7] 陶 冶,张允岭,刘 超,等.心脑血管舒通胶囊对急性脑缺血再灌注大鼠皮质单胺类神经递质的影响[J].天津中医药,2008,25(6):503-505.
- [8] 蔡 静,祁 冰,侯丽辉,等.妍婷颗粒对脂多糖诱导小鼠脾细胞产生 TNF- α 的影响[J].天津中医药,2009,26(2): 142-144.

(收稿日期:2013-09-28)

Effect of Xinnao Shutong and its monomer on Lipopolysaccharides activated microglia cells

LU Guo-yan, YANG Hong-yun, WANG Shao-xia, HU Li-min

(Key Laboratory of Tianjin University of TCM, State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine,
Tianjin Key Laboratory of Chinese medicine Pharmacology, Key Laboratory of Pharmacology of
Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the effects of Xinnao Shutong and its monomer composition on microglia (BV-2) and its mechanism. [Methods] The experiment was divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) group, dosing group. The effect of Xinnao Shutong (different dilution multiples of Xinnao Shutong and its monomer composition) on cellular activity and the production of nitric oxide (NO) in microglia cell induced by lipopolysaccharide (LPS). [Results] Xinnao Shutong could not significantly inhibit the microglia in releasing NO induced by LPS. Among the 13 kinds of monomer composition of Xinnao Shutong, Pseudoprotodioscin, Gitogenin, Diosgenin could inhibit NO secretion without affecting the cell vitality. [Conclusion] Some monomer composition of Xinnao Shutong can inhibit the releasing of NO in activated microglia. It may be one of the mechanisms of neural protection.

Key words: Xinnao Shutong; NO; inflammatory mediators; microglial cell