

·学生园地·

DOI: 10.11656/j.issn.1673-9043.2015.04.14

心脑舒通对缺氧/复氧损伤神经细胞的保护作用及其机制研究*

马萌萌, 胡利民, 王乔悦, 杨红云, 王旭梅, 郭虹

(天津中医药大学中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地
天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193)

摘要: [目的] 研究心脑舒通对缺氧/复氧损伤神经细胞的保护作用及其机制。[方法] 体外培养 Neuro-2a 细胞, 分为正常对照组、缺氧/复氧损伤模型组、心脑舒通 (10、25、50 mg/L) 给药组, 建立缺氧缺糖 (OGD) 4 h/复氧复糖 (Rep) 24 h 损伤模型, 检测心脑舒通对各组细胞增殖活力、乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出量、活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响。[结果] 与缺氧/复氧组比较, 心脑舒通可以明显增加 Neuro-2a 细胞活力, 减少 LDH 漏出, 降低 ROS 水平, 增强线粒体膜电位。[结论] 心脑舒通对缺氧/复氧损伤神经细胞具有明显保护作用, 其机制与其影响活性氧水平和线粒体膜电位有关。

关键词: 心脑舒通; 神经保护; 缺氧/复氧; Neuro-2a 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2015)04-0245-03

心脑舒通为蒺藜植物地上部分有效部位的提取物, 其主要成分是蒺藜总皂苷, 具有活血化瘀, 舒利血脉的药理作用^[1]。现代研究表明蒺藜皂苷具有抗肿瘤、提高耐缺氧能力、增强免疫功能、保护视网膜神经细胞及中枢神经系统、保护心肌、抗脑缺血等作用^[2], 其中抗脑缺血这一作用与其降低血小板聚集性及抗凝血有关^[3]。临床研究也证实, 心脑舒通可以改善血液流变性, 改善缺血性心脑血管组织的供血, 对预防和治疗缺血性心脑血管疾病具有良好的应用前景^[4-7]。但近年来对其药理研究较少, 对其作用机制尚不明确。因此本实验采用缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞模型, 初步探讨心脑舒通的神经保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 小鼠脑神经瘤细胞株 Neuro-2a, 北京协和医科大学; 心脑舒通, 吉林敖东股份有限公司 (批号 Z22021965); MEM 培养液, Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS), BI 公司; Cell Counting Kit

(CCK-8), 日本同仁化学研究所; 活性氧检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒, 上海碧云天生物技术研究所。

1.2 仪器 CO₂ 恒温培养箱, 德国 Thermo 公司; FlexStation 3 多功能酶标仪, 美国 MD 公司; 全自动生化分析仪, 日本东芝公司。

2 方法

2.1 Neuro-2a 细胞培养与处理 Neuro-2a 细胞培养于含有 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 0.1 g/L 链霉素, 2 mmol/L L-谷氨酰胺的 MEM 完全培养基中。将处于对数生长期的 Neuro-2a 细胞消化并吹打成单细胞悬液, 调整细胞密度至每毫升 4×10^5 个接种于 96 孔板中。细胞分组及处理如下: 1) 正常对照组: 将完全培养基替换为 MEM 培养液, CO₂ 培养箱中正常培养 4 h 后, 替换为完全培养基继续培养 24 h。2) 缺氧/复氧损伤模型组: 将完全培养基替换为 D-Hank's 平衡盐溶液, 置于充满 95% N₂-5% CO₂ 混合气体的缺氧小室孵育 4 h 后, 置换为完全培养基继续培养 24 h。3) 心脑舒通给药组: 将完全培养基分别置换为含有不同浓度心脑舒通 (10、25、50 mg/L) 的 D-Hank's 溶液, 置于充满 95% N₂-5% CO₂ 混合气体的缺氧小室孵育 4 h 后, 再分别置换为含不同浓度心脑舒通 (10、25、50 mg/L) 的完全培养基继续培养 24 h。

* 基金项目: 国家科技重大专项项目-重大新药创制 (2011ZX09201); “十二五”期间天津市高等学校“创新团队培养计划” (TD12-5035)。

作者简介: 马萌萌 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事中药神经药理研究。

通讯作者: 郭虹, E-mail: cacti1983@163.com。

2.2 细胞活力、LDH漏出量检测 细胞分组处理后,收取上清液,全自动生化仪测定上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量。培养板中每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的 MEM 培养液,37 °C 孵育 30 min,酶标仪 450 nm 波长检测各孔吸光度(A)。

2.3 活性氧水平检测 细胞分组处理后,弃去上清液,细胞用 MEM 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 1:1 000 稀释的 DCFH-DA,使终浓度为 10 μg/L。37 °C 避光孵育 20 min, MEM 洗涤细胞 3 次,酶标仪 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长测定荧光强度值。

2.4 线粒体膜电位检测 细胞分组处理后,弃去上清液,细胞用 MEM 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 1:500 稀释的 JC-1,37 °C 避光孵育 20 min, MEM 洗涤细胞 3 次,酶标仪 490 nm 激发波长,530 nm 发射波长测定 JC-1 单体荧光强度值,525 nm 激发波长,590 nm 发射波长测定 JC-1 聚合物荧光强度值,结果用 JC-1 聚合物与 JC-1 单体荧光强度比值表示。

2.5 统计学处理 数据采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较若方差齐采用 LSD 法,若方差不齐用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞活力、LDH 漏出量的影响 与正常对照组比较,缺氧/复氧损伤模型组细胞活力明显降低($P < 0.01$),LDH 漏出量明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,心脑舒通 25、50 mg/L 组可以显著增加细胞活力($P < 0.01$),减少 LDH 漏出量($P < 0.05, P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 心脑舒通对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞活力、LDH 漏出量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	细胞活力(A)	LDH(U/L)
对照组	-	0.87±0.03	187.33± 1.53
模型组	-	0.34±0.05**	264.33±20.40**
心脑舒通	50 mg/L	0.50±0.07 ^{###}	220.67±13.87 ^{###}
	25 mg/L	0.45±0.07 ^{##}	233.67±13.58 [#]
	10 mg/L	0.33±0.03	262.67± 9.5

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{###} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$ 。

3.2 对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞活性氧水平、线粒体膜电位的影响 与正常对照组比较,缺氧/复氧损伤模型组活性氧(ROS)水平显著升高($P < 0.05$),线粒体膜电位明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,心脑舒通 10、25、50 mg/L 组均可显著降低 ROS 水平($P <$

0.05),且 25、50 mg/L 组还可明显增加线粒体膜电位($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 心脑舒通对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞活性氧、细胞线粒体膜电位水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	ROS(荧光强度)	线粒体膜电位($F_{(525\ 590)}/F_{(490\ 530)}$)
对照组	-	429.98±18.29	0.71±0.11
模型组	-	506.92±42.66*	0.36±0.05**
心脑舒通	50 mg/L	444.10±24.66 [#]	0.50±0.04 [#]
	25 mg/L	443.16±50.29 [#]	0.48±0.08 [#]
	10 mg/L	442.63±25.72 [#]	0.45±0.03

注:与对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来有研究表明,心脑舒通可改善血液流变性、促进脑血循环及微循环、防止心脑血管并发症,临床上已经广泛应用于心脑血管疾病及中风后遗症的预防和治疗^[8-10]。药理实验研究证实,心脑舒通可以改善微管蛋白和微管结合蛋白的表达,维护细胞骨架的结构^[11];有效调控急性脑缺血再灌注病理过程中的血管新生,促进病理损伤的修复^[12];改善大鼠皮质单胺类神经递质如肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺的紊乱^[13];增高氧化应激 PC12 细胞 NF-κB 水平;改善 AD 大鼠空间记忆障碍^[14]。脑缺血再灌注损伤还会引发一系列炎症反应发生^[15-16],心脑舒通可以降低脑组织和血清内白介素-1β(IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量^[17],调控凋亡相关的蛋白表达,降低脑组织中神经细胞的凋亡率^[18]。本文探讨了心脑舒通对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞增殖活力、乳酸脱氢酶(LDH)漏出量、活性氧簇水平和线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响。

在正常情况下细胞内 LDH 的漏出量很低,但细胞受到损伤后由于细胞膜的通透性发生了改变,细胞释放到培养液中的 LDH 会显著增多。在脑缺血再灌注损伤过程中神经细胞损伤,会产生大量活性氧簇(ROS),ROS 包括氧的单电子还原产物($O^{\cdot-}$ 、 $HO_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot})、氧的双电子还原物(H_2O_2)、烷烃过氧化物均裂产物(RO^{\cdot} 、 ROO^{\cdot})、处于激发态的氧、单线态氧和羰基化合物等。ROS 可灭活细胞内重要的酶及蛋白、破坏膜结构使细胞内环境发生改变、直接氧化损伤 DNA 分子造成细胞损伤^[19]。线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的标志之一^[20-21]。

本实验结果证实心脑舒通 25、50 mg/L 组可以明显增加缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞活力、减少 LDH 漏出量;心脑舒通 10、25、50 mg/L 组可显著降

低细胞 ROS 水平; 心脑血管舒通 25、50 mg/L 组可显著提高线粒体膜电位。表明心脑血管舒通对缺氧/复氧损伤 Neuro-2a 细胞具有保护作用,其机制与其影响活性氧水平和线粒体膜电位有关,这一结果为更深入研究心脑血管舒通的神经保护作用奠定了一定基础。

参考文献:

[1] 卢国彦,杨红云,王少峡,等. 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[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(1): 19-21.

[2] 齐建红. 蒺藜皂苷的药理作用研究新进展[J]. 西安文理学院学报, 2013, 16(3): 26-29.

[3] 王秀华,李红,温克,等. 注射用蒺藜皂苷的抗脑缺血作用[J]. 吉林大学学报, 2004, 30(1): 60-62.

[4] 曲晶. 心脑血管舒通胶囊的临床应用综述[J]. 药物研究, 2012, 8(7): 60.

[5] 秦鼎,李丰升,陈俊红. 心脑血管舒通胶囊治疗中风后遗症 78 例临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(11): 1327-1328.

[6] 王宁. 心脑血管舒通胶囊对急性脑梗死病人 GMP-40、D-二聚体及血小板聚集率的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(7): 808-809.

[7] 张允岭,刘超,刘雪梅,等. 心脑血管舒通胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑微循环调节活性物质变化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(7): 450-453.

[8] 宋彦君. 心脑血管舒通胶囊治疗慢性脑供血不足疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(9): 1055-1057.

[9] 于春岩,彭丽莉,于静远. 心脑血管舒通胶囊治疗高黏血症的临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(10): 1160, 1260.

[10] 刘志坚. 心脑血管舒通胶囊治疗中风后遗症临床观察[J]. 中外

医学研究, 2012, 10(7): 59-60.

[11] 刘雪梅,张允岭,柳洪胜. 心脑血管舒通胶囊对大鼠缺血再灌注脑损伤后细胞骨架的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 1726-1729.

[12] 张允岭,刘超,刘雪梅. 心脑血管舒通胶囊对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 VEGF、VEGFR2 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 587-589.

[13] 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.

[14] 王永斌,甘云波. 蒺藜总皂苷对 AD 大鼠的影响[J]. 咸宁学院学报, 2011, 25(5): 379-381.

[15] 王萍,张密霞,庄朋伟,等. 脑缺血再灌注损伤的炎症反应机制研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(5): 317-320.

[16] 景浩然,杨红云,王少峡,等. 大黄酚对 LPS 诱导小胶质细胞炎性因子分泌的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 2(3): 148-150.

[17] 刘雪梅,张允岭,柳洪胜,等. 心脑血管舒通胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后 IL-1 β 、TNF- α 与神经细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(10): 870-873.

[18] 张允岭,刘雪梅,柳洪胜,等. 心脑血管舒通胶囊对大鼠缺血再灌注脑损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10): 1188-1191.

[19] 郭碧花. 活性氧诱导细胞凋亡作用机理的研究进展[J]. 川北医学院学报, 2002, 17(4): 166-169.

[20] Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis[J]. Current Opinion in Neurobiology, 1996, 6: 667-672.

[21] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments[J]. Neuron, 2010, 67(2): 181-198.

(收稿日期: 2015-03-14)

Protective effect of Xinnao Shutong on hypoxia / reoxygenation injured nerve cells and its mechanism

MA Meng-meng, HU Li-min, WANG Qiao-yue, YANG Hong-yun, WANG Xu-mei, GUO Hong

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the protective effect of Xinnao Shutong on hypoxia / reoxygenation injured nerve cells and its mechanism. [Methods] Neuro-2a cells were cultured in vitro, divided into control, model, low-dose, mid-dose and high-dose Xinnao Shutong (10, 25, 50 g/mL) groups. Establishing OGD 4 h / Rep 24 h damage model, detecting cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) leakage, reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). [Results] Compared with model group Xinnao Shutong can significantly increase the Neuro-2a cell activity, reduce the leakage of LDH, decrease the level of ROS, enhance the mitochondrial membrane potential. [Conclusion] Xinnao Shutong has obvious protective effect on hypoxia/reoxygenation injured nerve cells, and the mechanism is related to influence ROS level and mitochondrial membrane potential on Neuro-2a.

Keywords: Xinnao Shutong; neuroprotection; hypoxia/reoxygenation; Neuro-2a