

• 实验研究 •

丹参多酚酸与三七总皂苷合用保护 OGD/R 损伤胶质细胞线粒体、促进神经因子表达作用研究^{*}

曹玉爽, 徐 耀, 杨 娟, 袁 庆, 姚荣妹, 柴丽娟, 胡利民[△]

(天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301600)

摘要: **目的** 探讨丹参多酚酸(Salvianolate Acid, SAL)和三七总皂苷(Panax Notoginseng Saponins, PNS)合用保护氧糖剥夺/复氧复糖(Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation, OGD/R)损伤后星形胶质细胞线粒体、促进神经营养因子表达的作用及机制。**方法** 大鼠星形胶质细胞原代培养,建立 OGD/R 损伤模型。Cell counting kit-8 (CCK-8)法检测星形胶质细胞活力,流式细胞仪检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)释放量、胞内 Ca²⁺ 浓度、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 变化,实时定量 PCR (real time polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白质免疫印迹(western blot, WB)法检测 HIF-1 α 、PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGF-1 α)的表达情况。**结果** 胶质细胞 OGD/R 条件确定为 OGD4h/R24h,给药浓度确定为 SAL 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、PNS 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与 OGD/R 组相比, SAL 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、PNS 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、SAL 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 PNS 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 合用均能增强损伤后星形胶质细胞活力($P<0.05$),升高 MMP,降低 ROS 释放量($P<0.05$),降低损伤后星形胶质细胞 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达,升高磷脂酰肌醇激酶(PI3K)磷酸化水平($P<0.05$);SAL 还可升高 mTOR 蛋白磷酸化水平($P<0.05$),PNS 可提高 Akt 磷酸化水平($P<0.05$),增加损伤星形胶质细胞 BDNF mRNA 表达($P<0.05$);SAL、SAL 与 PNS 合用能增加损伤后星形胶质细胞 BDNF、NGF、IGF-1 α mRNA 表达($P<0.05$)。**结论** 丹参多酚酸和三七总皂苷组分合用可保护 OGD/R 损伤后星形胶质细胞线粒体、促进胶质细胞表达神经营养因子 BDNF、NGF、IGF-1 α 。

关键词: 丹参多酚酸;三七总皂苷;星形胶质细胞;氧糖剥夺/复氧复糖;线粒体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2021)04-0001-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.04.001

Study on the Effects of SAL and PNS on Protecting Glial Mitochondria and Promoting the Expression of Neural Factors

CAO Yushuang, XU Yao, YANG Juan, YUAN Qing, YAO Rongmei, CHAI Lijuan, HU Limin

(State Key Laboratory of Component Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect and mechanism of the combination of Salvianolic Acid(SAL) and Panax Notoginseng Saponins (PNS) on the protection on astrocytes mitochondria and promotion of the expression of neurotrophic factor after Oxygen Glucose Deprivation/Reoxygenation(OGD/R) injury. **Methods** The activity of primary cultured rat astrocytes were detected by Cell counting Kit-8 (CCK-8) method. The release of reactive oxygen species (ROS), intracellular Ca²⁺ concentration and mitochondrial membrane potential(MMP) were detected by flow cytometry. And real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot(WB) methods were used to detect HIF-1 α , PI3K/Akt/mTOR signaling pathway proteins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), insulin-like growth

收稿日期: 2021-07-22

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金(81573644)

第一作者简介: 曹玉爽(1997-),女,在读硕士研究生,研究方向:脑血管药物药理。

[△]通信作者: 胡利民, E-mail: hulinimth@126.com

factors (IGF-1 α). **Results** The OGD/R condition of glial cells was determined as OGD 4h/R24h and the concentration of SAL25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and PNS6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were determined. Compared with OGD/R group, the combined use of SAL25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, PNS 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, SAL25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and PNS 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could enhance the activity of astrocytes after injury, increase the MMP of astrocytes after injury. Decreased ROS release, decrease HIF-1 α mRNA and protein expression in astrocytes after injury, increase Phosphatidylinositol 3-kinases(PI3K) phosphorylation level($P<0.05$). In addition, SAL also can increase the phosphorylation level of mTOR protein, and PNS increase the phosphorylation level of Akt, and significantly increased the expression of BDNF mRNA in injured astrocytes ($P<0.05$). Combined use of SAL and PNS significantly increase the mRNA expression of BDNF, NGF and IGF-1 α in astrocytes after injury ($P<0.05$). **Conclusion** Combined salvianolic acid and pantoginseng saponins can protect the mitochondria of astrocytes after OGD/R injury, promote the expression of neurotrophic factors BDNF, NGF and IGF-1 α .

KEY WORDS: Salvianolic Acid; Panax Notoginseng Saponins; astrocytes; Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygen-Glucose Rehydration; mitochondria

中风是全球第二大死亡原因,多为缺血性中风^[1]。生理状态下的大脑活动高度依赖能量,线粒体作为能量供应的介导者,将能量需求与 ATP 供应相匹配,调节 Ca^{2+} 信号,协调局部代谢^[2]。但缺血性中风发生过程中,脑内环境稳态遭到破坏,线粒体代谢障碍、信号转导改变等的相应发生最终导致细胞的凋亡和坏死,造成人体出现某些难以恢复的机能障碍^[3-4]。在此过程中,星形胶质细胞激活可上调神经生长因子的分泌以及多种蛋白质的合成,增加谷氨酸摄取能力,有助于脑缺血后受损神经元的修复和再生;但脑缺血再灌注损伤也会导致星形胶质细胞功能受损,继而加重神经元的死亡^[5-8]。因此保护脑缺血/再灌注后星形胶质细胞结构与功能的完整性是研究的热点之一。

注射用丹参多酚酸和血栓通注射液在临床上常用于治疗缺血性中风,研究证明,前者对缺血性脑中风恢复期有很好的治疗效果^[9],后者可改善脑梗死患者的炎症损伤和神经受损^[10],疗效显著,但研究对其作用的机制了解较少^[11-12]。本研究以中风后星形胶质氧化为关注点,探讨上述二药的组分丹参多酚酸和三七总皂苷合用对胶质细胞线粒体的保护作用及机制,并进一步研究胶质细胞受到保护后神经营养因子的表达情况,以更好地阐释丹参多酚酸和三七总皂苷在脑缺血再灌注损伤中的保护机制。

1 材料

1.1 材料与试剂 注射用丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司),注射用血栓通(冻干)(广西梧州制药(集团)股份有限公司),DMEM/F12、特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),Hanks、D-Hanks、0.25%胰蛋白酶、L-谷氨酰胺(L-glutamine, L-Glu)、青霉素-链霉素(Penicillin-Streptomycin Solution, PS)均购

自美国 Gibco 公司,多聚甲醛、牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA)、山羊血清、EBSS、TBST、电转液、bicinchoninic acid(BCA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),Trizol 试剂、Tetramethylrhodamine(TMRM)、CM-H2DCFDA(美国 Invitrogen 公司),Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit(武汉塞维爾生物科技有限公司),SYBR GREEN PCR master Mix(美国 Applied Biosystem 公司),鞘液(美国 BD 公司),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),Anti-GFAP(英国 Abcam 公司),Anti-HIF-1 α (美国 Abcam 公司),Anti- β -actin, Anti-Akt/p-Akt, Anti-mTOR/p-mTOR, Anti-PI3K/p-PI3K, Anti-p44/42/p-p44/42(美国 CST 公司),羊抗鼠 IgG 抗体-HRP、羊抗兔 IgG 抗体-HRP(北京中杉金生物科技有限公司),Fluo-3, AM(凯基生物)。

1.2 主要仪器 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司),离心机(德国 Eppendorf 公司),倒置荧光显微镜(日本尼康公司),倒置相差显微镜(美国 Zeiss 公司),缺氧小室(加拿大 STEMCELL Technologies),多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司),实时荧光定量 PCR 仪、C1000PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD),微量核酸分析仪(日本马康 Malcom),Western Blot 电泳槽/转膜仪(上海天能),Western Blot 凝胶成像系统(美国 GE 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD),恒温摇床(中国巴玖公司)。

2 方法

2.1 大鼠原代星形胶质细胞的培养与鉴定

2.1.1 大鼠原代星形胶质细胞的培养 培养方法参照相关文献^[13-15],将大鼠酒精浸泡处死后,断头,

将脑组织取出放入预冷的 PBS 中,取出脑膜及大血管,分离两侧皮质,用灭菌液(含 5% PS 的 PBS)清洗两次并剪碎至呈乳糜状,加入 0.25% EDTA 消化 10 min 再以全培(1% PS+1% L-Glu+15% FBS+83% DMEM/F12)终止消化。离心后重悬,过 200 目细胞筛,将所得滤液再次离心、全培养基重悬后,接种于培养瓶中,CO₂ 恒温培养箱中培养 1 h 后,收集上层培养液。转移至新的培养瓶继续培养,每 3 d 换液 1 次。8~9 d 后置于气浴摇床中 260 r/min 震摇 20 h 弃去培养液即可传代备用。本实验选用二代及以上细胞。

2.1.2 大鼠原代星形胶质细胞的鉴定 倒置显微镜下细胞生长状态,待生长至约 70%~80%时,用预冷 PBS 清洗细胞,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗去多聚甲醛后加入封闭液(5%山羊血清+0.3% Triton X-100+PBS)于室温封闭 60 min,随后加入 anti-GFAP 抗体(1:250 稀释),4℃过夜孵育。次日吸弃一抗,PBS 洗涤 2 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温避光孵育 30 min,再以 PBS 清洗后加入 DAPI 核染液室温放置 2 min,即可置于荧光显微镜下观察拍照。

2.2 OGD/R 模型的建立与药物有效浓度的筛选

2.2.1 OGD/R 模型的建立 将细胞接均匀种于 96 孔板中,接种密度 1×10^5 个/cm²,待生长至 80%将其分为 Con 组和 OGD/R 组并进行以下处理。

Con 组:将细胞培养液更换为新鲜的 DMEM/F12 全培养基,置于 CO₂ 培养箱中培养相应时间后更换为含 7.5%血清全培养基。

OGD/R 组:将培养液更换为 EBSS 平衡盐溶液,放入缺氧小室并通入 95% N₂、5% CO₂ 气体 5 min,而后再将缺氧小室置于 37℃恒温箱中培养。在氧糖剥夺 2、3、4 h 后,打开缺氧小室,将细胞上层 EBSS 更换含 7.5%血清全培养基做复氧处理 2、3、4、24、48、72 h。弃去培养液,在 96 孔板中加入 CCK-8 工作液 37℃孵育 60 min,450 nm 波长检测吸光度。

2.2.2 药物对正常培养和 OGD/R 处理胶质细胞活力的影响 细胞接种情况同上,待生长至 80%,将培养液更换为含不同浓度丹参多酚酸组分(1.625、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg·mL⁻¹)或三七总皂苷组分(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 μg·mL⁻¹)的含药培养基正常培养 24h,CCK-8 法检测

细胞活力,筛选药物的无毒性剂量。

药物对 OGD/R 处理胶质细胞活力的影响:根据“2.2.1”所确定的 OGD/R 模型条件,给予不同浓度含药培养基干预 24 h 后 CCK-8 法检测细胞活力,筛选药物的有效剂量。

2.3 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞的保护作用与机制

2.3.1 流式细胞术检测星形胶质细胞线粒体膜电位 将细胞均匀接种于 6 孔板中,种植密度为 1×10^5 个/cm²,待细胞生长至 80%时,根据“2.2.1”所确定的模型条件,将细胞为 Con 组、OGD/R 组和给药组。OGD/R 组和给药组做氧糖剥夺处理,复氧复糖时给药组另加入“2.2.2”所确定的剂量的药物。复氧复糖处理后加入 TMRM 工作液 1 mL/孔,37℃避光孵育,30 min 后对细胞进行消化处理,离心后以 PBS 重悬细胞,流式分析。

2.3.2 流式检测星形胶质细胞包内钙离子浓度 细胞处理同“2.3.1”,复氧复糖处理后加入含 Fluo-3,AM 的培养液避光孵育 30 min,再加入 HBSS 避光孵育 20 min,胰酶消化制成单细胞悬液,离心后以 HBSS 重悬细胞,流式检测。

2.3.3 流式检测星形胶质细胞 ROS 释放量 细胞处理同“2.3.1”,复氧复糖处理后加入 CM-H₂DCFDA 工作液,避光孵育 30 min,清洗细胞后可直接用于荧光拍照(488/525)或同制成单细胞悬液进行流式分析。

2.3.4 RT-PCR 法检测 HIF-1α mRNA 的表达 细胞处理同“2.3.1”,复氧复糖后 Trizol 试剂提取总 RNA,超微量核酸分析仪 560 nm/580nm 定量分析。按照 Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书和 SYBR GREEN PCR Master Mix 试剂盒说明书进行逆转录和扩增(HIF-1α 引物序列为 F:CCGATGGAAGCACTAGACA;R:CAAAGCGACA-GATAACACG),检测 HIF-1α 的 mRNA 表达情况。

2.3.5 Western Blot 法检测 HIF-1α、PI3k 信号通路蛋白的表达 细胞处理同“2.3.1”,复氧复糖处理后加入蛋白酶裂解液提取总蛋白,利用 BCA 试剂盒定量并加热 100℃,10 min 使其变性。12% SDS-PAGE 胶进行电泳(170 V,45 min)、而后 250 mA 将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 1:1 000 稀释的一抗(HIF-1α、PI3k、Akt、mTOR 抗体)4℃孵育过夜,TBST,5 min 每次清洗后 3 次后,加入二抗

(1:10 000) 室温孵育 1 h,ECL 显影,GE 凝胶成像系统成像。

2.4 药物对 OGD/R 损伤后星形胶质细胞神经营养因子表达的影响 RT-PCR 法检测 BDNF、NGF、IGF-1 α mRNA 的表达,实验方法同前。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

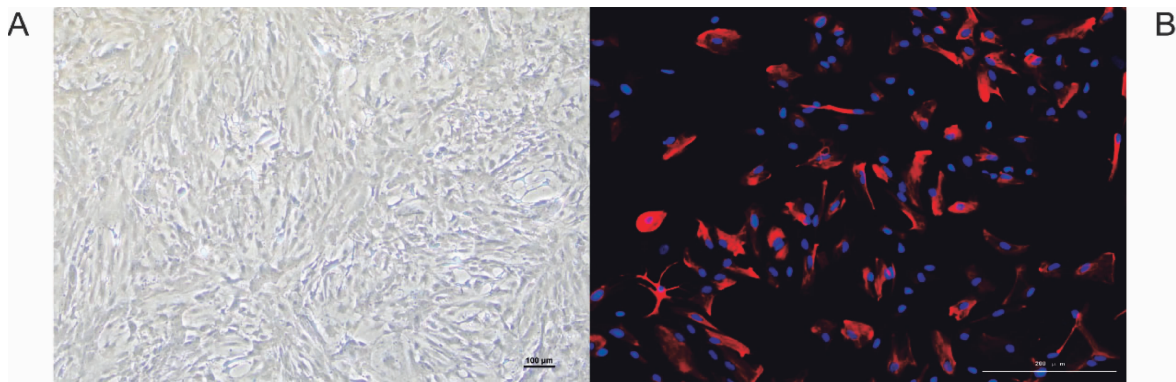
Gene	Primer Pair (5'-3')
	F,forward; R,reverse
GAPDH	F: CTTCACCACCATGGAGAAGGC
	R: GGCATGGACTGTGCTCATGAG
NGF	F: GGACGCAGCTTTCTATCCTGG
	R: CCCTCTGGGACATTGCTATCTG
BDNF	F: CTGTATCAAAAGGCCAACTGAA
	R: GTGTCTATCCTTATGAATCGCCA
IGF-1 α	F: TGTAACGACGGCCAGT
	R: CAGGAAACAGCTATGA

2.5 统计方法 SPSS17.0 统计软件分析数据,表示结果,one-way ANOVA(单因素方差分析)分析数据, $P<0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 大鼠原代星形胶质细胞的培养与鉴定 如图 1 所示,星形胶质细胞在培养瓶中培养 7 d 后,星形胶质细胞形状多为不规则多角形,可见粗短枝状胞突,胞体大而扁平,符合神经胶质细胞生长特性。神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)荧光染色阳性,表明研究培养星形胶质细胞成功,且纯度较高,可用于后续实验。

3.2 细胞 OGD/R 模型建立与药物有效浓度筛选
3.2.1 氧糖剥夺不同时间对星形胶质细胞活力的影响 如图 2A-C 所示,与 Con 组相比,OGD 2 h/R 48、72 h,OGD 3 h/R 2、3、4、24、48、72 h,OGD 4 h/R 2、3、4、24、48 h 细胞活力均显著下降 ($P<0.05$)。故研究采用 OGD 4 h /R 24 h 作为星形胶质细胞缺氧复氧处理模型。



注:A. 星形胶质细胞,bar 100 μm ;B. GFAP 荧光染色,bar 200 μm 。

图 1 原代星形胶质细胞的生长情况与鉴定

3.2.2 药物对正常星形胶质细胞活力的影响 如图 2D-E 所示,与 Con 组相比,丹参多酚酸组分在 1.625~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内对细胞活力没有显著性差异($P>0.05$),三七总皂苷组分在 3.125~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对细胞活力均没有显著性差异($P>0.05$),提示本实验所选药物浓度对细胞没有毒性。

3.2.3 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞活力的保护作用 如图 2F-H 所示,与 Con 组相比,OGD/R 组星形胶质细胞的活力显著降低($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丹参多酚酸组分显著提高星形胶质细胞活力($P<0.05$);三七总皂苷组分所选取浓度均能

显著提高受损细胞活力($P<0.05$)。故选取丹参多酚酸组分 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和三七总皂苷组分 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行后续实验。

3.3 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞的线粒体的保护作用

3.3.1 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞线粒体膜电位、胞内钙离子浓度及 ROS 释放量的影响 结果如图 3 所示,A-C: 与 Con 组相比,OGD/R 组星形胶质细胞荧光强度降低,线粒体膜电位降低;与 OGD/R 组相比,丹参多酚酸组分(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、三七总皂苷组分(6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与三七

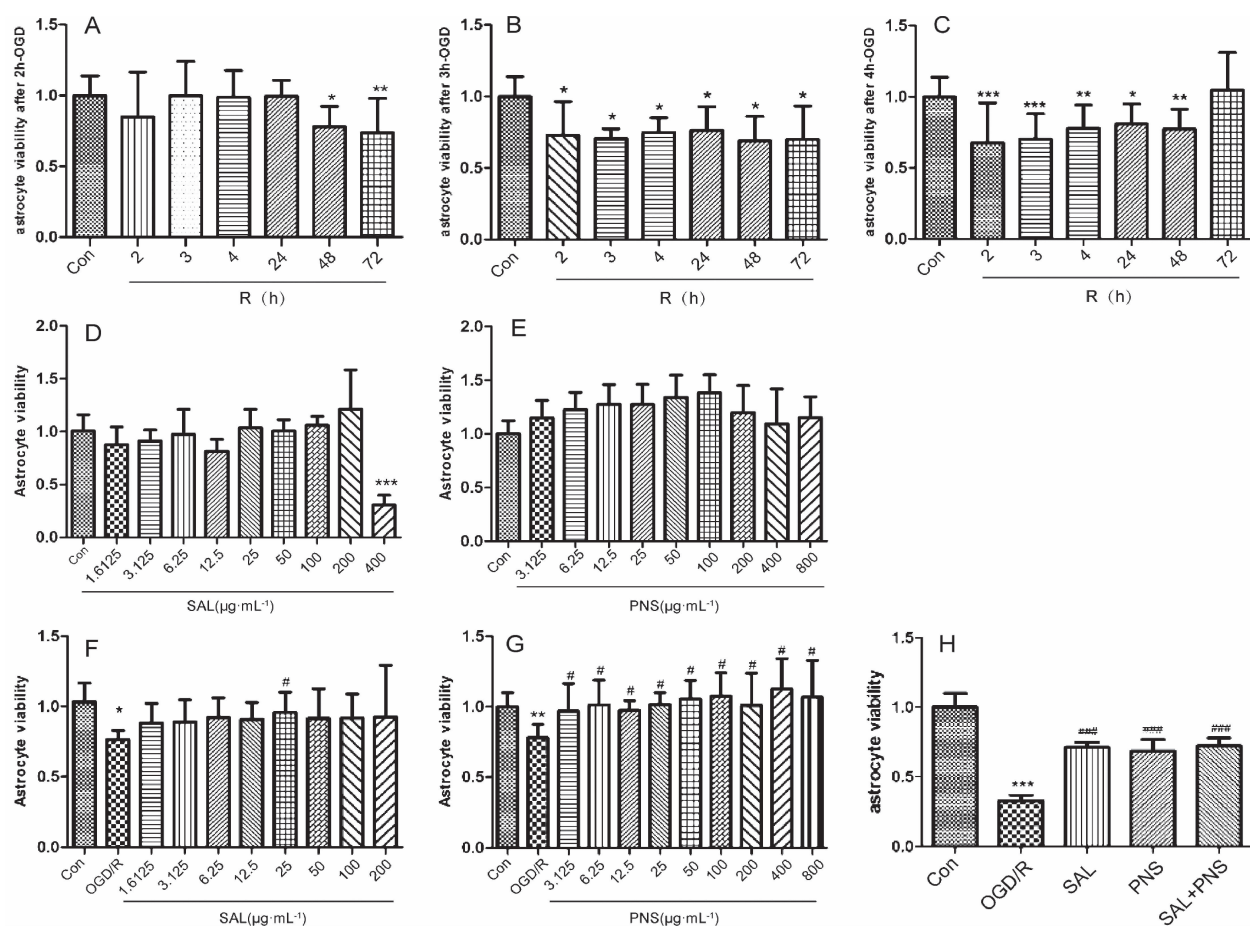


图 2 药物及不同 OGD/R 时间对星形胶质细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=18$)

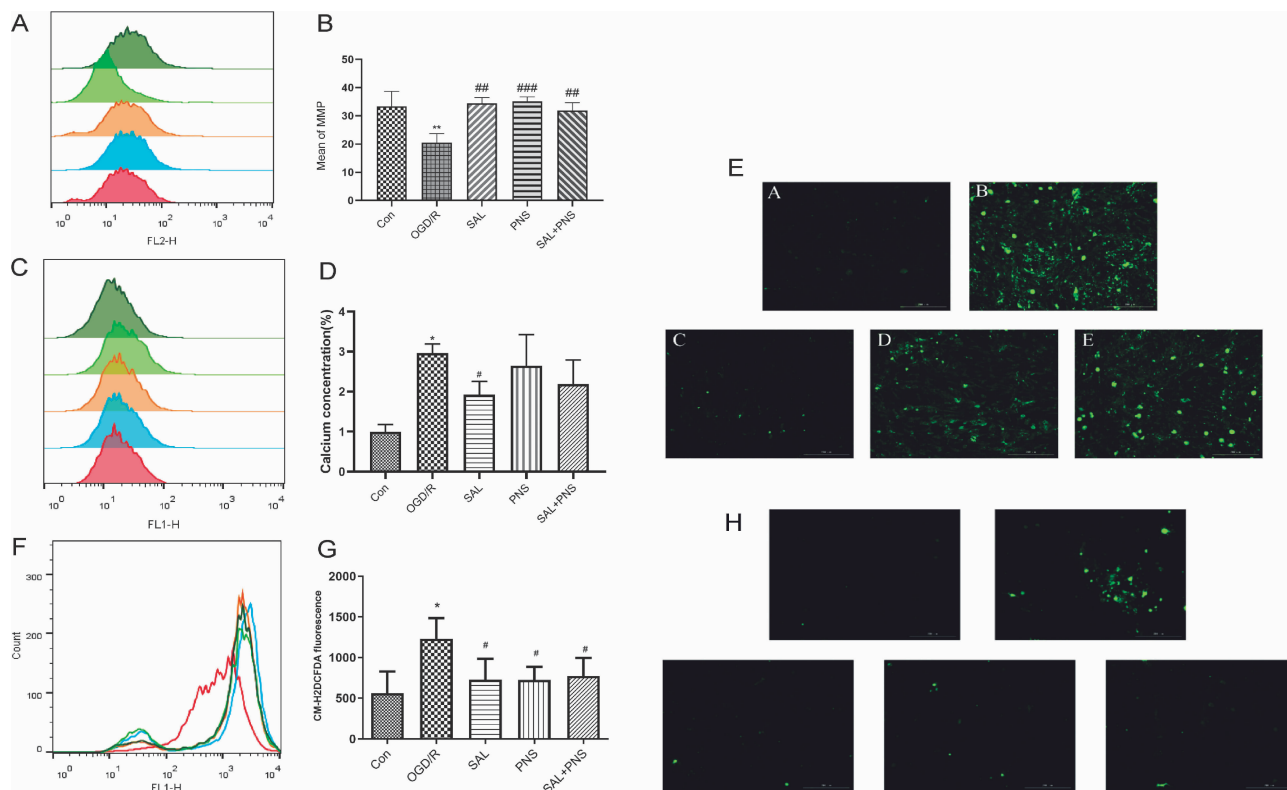


图 3 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞线粒体的影响

总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均可升高 OGD/R 损伤后星形胶质细胞的线粒体膜电位。流式细胞仪检测细胞内 Ca^{2+} 浓度,与 Con 组相比,OGD/R 组星形胶质细胞内荧光强度增强, Ca^{2+} 浓度升高 ($P < 0.05$);与 OGD/R 组相比,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)可显著降低胞内 Ca^{2+} 浓度($P < 0.05$);三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均可对 Ca^{2+} 浓度无影响($P > 0.05$)。F-H:与 Con 组相比,OGD/R 组细胞 ROS 释放量显著增加($P < 0.05$);与 OGD/R 组相比,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均可显著降低 OGD/R 损伤星形胶质细胞 ROS 的释放量($P < 0.05$)。可见,丹参多酚酸、三七总皂苷及其合用可显著降低 OGD/R 损伤后星形胶质细胞的 ROS 释放,提高线粒体膜电位。

3.3.2 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞 HIF-1 α 、PI3K/Akt/mTOR 通路的作用 RT-PCR 与 Western Blot 结果如图 4 所示,A-B:与 Con 组相比较,OGD/R 组细胞 HIF1 α mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);与 OGD/R 组相比,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均可显著降低 OGD/R 损伤星形胶质细胞 HIF-1 α 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。

C-E:与 Con 组比较,OGD/R 组能显著降低星形胶质细胞 PI3K/Akt 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$);与 OGD/R 组比较,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均能升高 PI3K 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$);三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)能显著升高 Akt 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$),丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用对 Akt 蛋白磷酸化水平有升高作用,但不具有显著性差异($P > 0.05$);与 Con 比较,OGD/R 组 mTOR 磷酸化水平略有升高但不具有显著性差异($P > 0.05$);与 OGD/R 组相比较,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)能显著升高 mTOR 磷酸化水平($P < 0.05$);而三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参多酚酸($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与三七总皂苷($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用对 mTOR 蛋白磷酸化水平的改变无显著性差异($P > 0.05$)。可见,丹参多酚酸和三七总皂苷对损伤星形胶质细胞的作用途径可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关。

3.4 药物对 OGD/R 损伤后星形胶质细胞神经营养因子表达的影响 RT-PCR 结果如图 5 所示,与 Con 组相比较,OGD/R 组细胞 BDNF、IGF-1 α mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$),IGF-1 α mRNA 无显著差异 ($P > 0.05$);与 OGD/R 组相比,丹参多酚酸组分($25 \mu\text{g} \cdot$

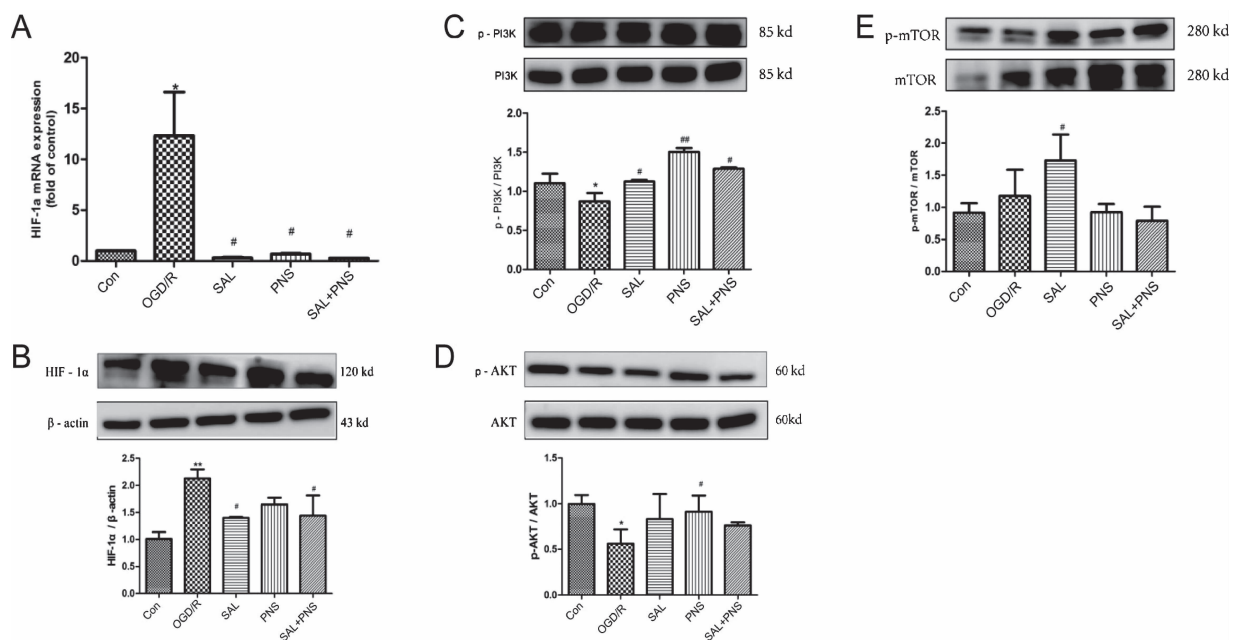


图 4 药物对 OGD/R 损伤星形胶质细胞 HIF-1 α 、PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

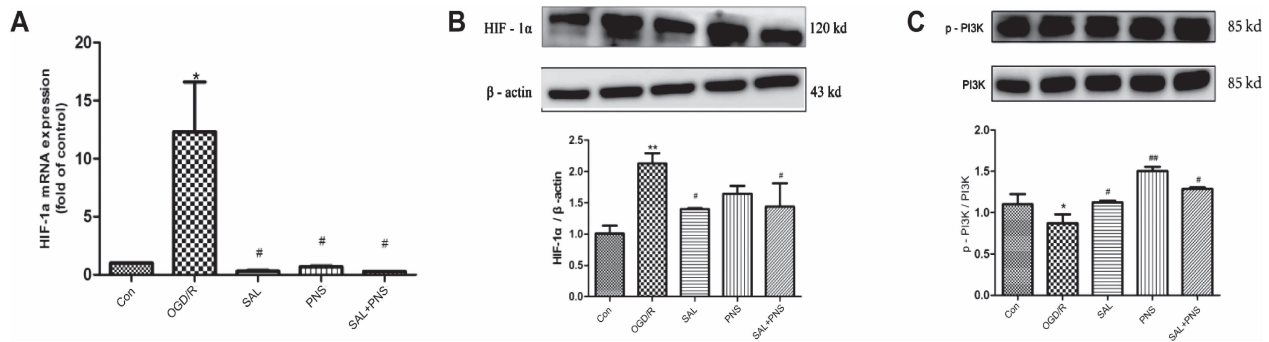


图5 药物对 OGD/R 损伤后胶质细胞神经营养表达的影响

mL^{-1})单用和与三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)合用均可显著提高 OGD/R 损伤后星形胶质细胞 BDNF、NGF、IGF-1 α mRNA 的表达($P < 0.05$);三七总皂苷组分($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)可显著升高 OGD/R 损伤星形胶质细胞 BDNF mRNA 表达($P < 0.05$),对 NGF、IGF-1 α mRNA 有上调趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。可见,丹参多酚酸、三七总皂苷及其合用可增加胶质细胞神经营养因子的表达。

4 讨论

中风是由脏腑失调,气血逆乱,直冲犯脑引起的脑脉痹阻或血溢脑脉之外,临床以半身不遂、口舌歪斜、言语謇涩或不语等为常见症状。因其高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率和多并发症的“四高一多”的特点,一直为研究热点。近年来,中医药在中风方面研究较多,凸显了中医药独特、良好的发展前景。

注射用丹参多酚酸由丹参多酚酸组成,具有活血通络的功效,常用于中风病恢复期瘀血阻络证。研究发现,注射用丹参多酚酸可有效改善患者的早期临床症状、促进远期神经功能恢复,安全性高,值得临床推广使用^[16-17]。血栓通注射液的主要成分是三七总皂苷,具有活血化瘀、扩张血管、改善血液循环的功效,常用于脑血管病后遗症。研究表明,血栓通注射液的辅助治疗可以促进患者神经功能恢复,改善血液流变学指标,提高患者的生活自理能力^[18-19]。

尽管疗效显著,注射用丹参多酚酸和血栓通注射液的作用机制尚不十分明确。胶质细胞作为脑中最丰富的细胞^[20],在维持大脑的正常生理状态中起重要作用^[21-22]。然而,在缺血性损伤时,星形胶质细胞分泌炎症因子,例如血管内皮生长因子(VEGF),基质金属蛋白酶(MMPs),直接或间接地加剧脑损伤,破坏血脑屏

障。此外还可通过释放营养因子维持 BBB 稳态,支持和保护神经元,还可通过调节离子平衡来维持内环境稳态^[23],为葡萄糖和其它代谢物在血液和神经元之间的传播提供途径^[24-25]。因此,本实验立足于药物对星形胶质细胞的保护作用,研究其发挥疗效的作用机制。

4.1 药物对损伤后胶质细胞线粒体的保护 线粒体是活性氧 ROS 的产生场所和靶点,也是 ATP 水平和钙稳态的调节剂,是细胞代谢的重要场所。线粒体膜电位(MMP)维持线粒体进行磷酸化、决定三磷酸腺苷产生,膜电位的稳定利于维持细胞的生理功能。研究近年来发现,伴随 MMP 的下降,细胞在不同因子作用下发生凋亡,该下降早于 DNA 片段化,在细胞凋亡早期病理变化以前就开始。中风发生时,氧和葡萄糖的缺乏会造成能量衰竭、线粒体功能障碍、ROS 增加。研究利用流式细胞仪观察 OGD/R 后胶质细胞的线粒体膜电位、细胞内钙离子以及 ROS 的变化。结果显示,丹参多酚酸、三七总皂苷、丹参多酚酸与三七总皂苷合用可通过调节星形胶质细胞 ROS 释放量、胞内钙离子浓度、线粒体膜电位改善缺血再灌注造成的损伤。

PI3K/Akt 途径是细胞相应胞外生存和生长的信号的转导途径。催化亚基 p110 和调节亚基 p85 构成二聚体磷脂酰肌醇激酶(PI3K),当 PI3K 与 EGF 生长因子等受体结合后,可活化 Akt, Akt 激活后促进或抑制下游蛋白如 Caspase9、Bad 等凋亡蛋白的表达,从而调节细胞的增殖、分化、凋亡和迁移。PI3K/Akt 下游靶点为雷帕霉素靶蛋白(mTOR),mTOR 的下游转录因子则包括了 c-Myc、FoxO、HIF-1 α 等明星分子。研究结果显示丹参多酚酸组分、三七总皂苷组分、丹参多酚酸与三七总皂苷合用可通过抑制 PI3K/Akt/

mTOR 通路发挥药效作用。

4.2 药物对损伤后胶质细胞分泌神经营养因子的影响
BDNF 和 NGF 属于神经营养因子家族,在神经元的生长和分化过程中至关重要。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是几乎所有组织中都存在的多能生物活性物质。这些活跃在大脑中的分子涉及能量和葡萄糖稳态等多种调节机制,影响机体不同的病理和生理过程,包括神经元的存活、学习、记忆和损伤修复等。本实验采用 RT-PCR 方法,以 BDNF、NGF 和 IGF-1 α 的表达作为评价指标,发现丹参多酚酸和三七总皂苷组分及其合用对 OGD/R 损伤星形胶质细胞神经营养因子表达的促进作用。

关于中风病的治疗药物研究已展开多年,目前被 FDA 认证有效的治疗药物只有一个,即重组人纤溶酶原激活物^[26],但因受时间窗限制,临床上真正得到治疗的患者相对较少。中药不乏活血化瘀、醒脑开窍的良药,但因作用机制研究相对较少,使其临床应用受到限制,因此中药的发病机制阐明是目前中药发展和推广中亟待解决的一大问题。本实验研究发现,丹参多酚酸、三七总皂苷、丹参多酚酸与三七总皂苷合用可通过保护 OGD/R 损伤后星形胶质细胞线粒体、促进神经营养因子的表达发挥治疗作用,为中药治疗中风的作用机制阐释提供了理论依据。

参考文献:

- [1] MUKDA S, TSAI C Y, LEU S, et al. Pinin protects astrocytes from cell death after acute ischemic stroke via maintenance of mitochondrial anti-apoptotic and bioenergetics functions[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 43.
- [2] LI X W, LI Y L, ZHANG Z Q, et al. Mild hypothermia facilitates mitochondrial transfer from astrocytes to injured neurons during oxygen-glucose deprivation/reoxygenation [J]. Neurosci Lett, 2021, 756: 135940.
- [3] CAI Y, YANG E Y, YAO X H, et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Redox Biol, 2021, 38: 101792.
- [4] ZHANG Y F, HE Y C, WU M L, et al. Rehmapicroside ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via attenuating peroxynitrite-mediated mitophagy activation[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 160: 526-539.
- [5] ITO M, KOMAI K, MISE-OMATA S, et al. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery[J]. Nature, 2019, 565(7738): 246-250.
- [6] FREITAS-ANDRADE M, WANG N, BECHBERGER J F, et al. Targeting MAPK phosphorylation of Connexin43 provides neuroprotection in stroke[J]. J Exp Med, 2019, 216(4): 916-935.
- [7] TURNQUIST C, HORIKAWA I, FORAN E, et al. p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(9): 1515-1528.
- [8] BEGUM G, SONG S S, WANG S X, et al. Selective knockout of astrocytic Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 reduces astrogliosis, BBB damage, infarction, and improves neurological function after ischemic stroke [J]. Glia, 2018, 66(1): 126-144.
- [9] 李德坤, 苏志刚, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸药理作用及临床应用研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 353-361.
- [10] 袁庆, 殷孟兰, 赵磊, 等. 注射用血栓通对脑缺血损伤的药理研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(16): 2521-2524.
- [11] 张燕欣, 梁佳威, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中的药理作用及机制研究概述[J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1469-1479.
- [12] 刘禹, 邵海宇, 王琦. 三七总皂苷结合针灸干预对急性缺血性脑卒中大鼠血脑屏障的保护作用及对 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(4): 649-652.
- [13] 袁庆, 胡利民, 贾壮壮, 等. 心脑血管舒通胶囊及有效组分对原代培养大鼠星形胶质细胞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1627-1628.
- [14] 马悦, 李文, 李振舒, 等. 新生大鼠大脑皮质星形胶质细胞纯化及培养方法的改进 [J]. 卫生研究, 2019, 48(5): 795-798.
- [15] 沈慧, 许琪. 两种体外培养星形胶质细胞的比较[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(4): 524-528.
- [16] 陈肖. 注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中的疗效与安全性[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2021, 42(4): 303-305.
- [17] 张娟, 赵路清, 胡风云, 等. 注射用丹参多酚酸对大面积脑梗死患者血管新生促进作用及对脑灌注改善作用的观察研究[J]. 中风与神经疾病杂志, (下转第 21 页)

- 动型抽动障碍的相关性研究[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(2): 44-46.
- [7] 范菲, 韩斐, 汪琼. 抽动障碍儿童血清 TNF- α 和 IL-6 的表达[J]. 江苏医药, 2017, 43(14): 1005-1007.
- [8] 李宏贵, 赖东兰, 李宜瑞. 李宜瑞从风痰辨治儿童抽动障碍经验介绍[J]. 新中医, 2019, 51(9): 325-326.
- [9] 李晨, 肖淑琴. 肖淑琴主任医师从痰瘀论治小儿抽动症经验[J]. 西部中医药, 2019, 32(10): 9-11.
- [10] 刘以敏. 融合寒温活用古方治儿疾——刘以敏学术思想与临床经验集[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 48-49.
- [11] 徐寅, 唐彦. 止抽汤对抽动症模型大鼠的行为影响[J]. 中国医药指南, 2016, 14(14): 54-55.
- [12] 景晓玉, 王渝评, 唐彦. 止抽汤对抽动障碍模型大鼠抽动行为及纹状体多巴胺的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 585-586.
- [13] NAPIER T C, ISTRE E D. Methamphetamine-induced sensitization includes a functional upregulation of ventral pallidal 5-HT_{2A/2C} receptors[J]. Synapse, 2008, 62(1): 14-21.
- [14] DIAMOND B L, REYES M G, BORISON R. A new animal model for Tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982, 35: 221-225.
- [15] 马福祺, 曹娜, 王丽霞, 等. 多发性抽动症模型研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(3): 285-288.
- [16] 刘艳艳, 陈燕惠. 亚氨基二丙腈构建的抽动障碍大鼠脑组织 IL-6 及 TNF- α 变化及意义[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(5): 340-343.
- [17] 李葛, 韩根成. 外周免疫系统与中枢神经系统疾病交互影响的机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(22): 2689-2693.
- [18] 冯梓乔, 张云桥, 游旭, 等. IL-6 在精神分裂症中的研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(5): 150-153.
- [19] 张婷, 李继君, 孙克兴, 等. 钩藤碱对 LPS 诱导的多巴胺能神经元及胶质细胞炎症及 TNF- α 和 IL-1 β 影响[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(2): 6-10.
- [20] 张梦娇, 王春艳, 黄亚若, 等. 玉屏风散对抽动模型大鼠的影响[J]. 药学与临床研究, 2019, 27(3): 166-170.
- [21] 高汉媛, 史正刚, 李小芹, 等. 菖蒲郁金汤对 TS 模型大鼠抗抽动效应及脑组织 IL-6、TNF- α 的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 135-138.
- (上接第8页) 2021, 38(7): 617-622.
- [18] 汪飞. 血栓通注射液辅助治疗高龄缺血性脑卒中临床研究[J]. 新中医, 2019, 51(12): 92-94.
- [19] 王伟霞, 刘万里. 血栓通注射液静滴联合尿激酶溶栓治疗急性脑梗死患者的疗效分析[J]. 临床研究, 2021, 29(7): 122-124.
- [20] LEE J H, KIM J Y, NOH S, et al. Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis[J]. Nature, 2021, 590(7847): 612-617.
- [21] MESERVEY L M, TOPKAR V V, FU M M. mRNA Transport and local translation in glia[J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(6): 419-423.
- [22] YAO L L, HU J X, LI Q, et al. Astrocytic neogenin/netrin-1 pathway promotes blood vessel homeostasis and function in mouse cortex[J]. J Clin Invest, 2020, 130(12): 6490-6509.
- [23] SONG S S, HUANG H C, GUAN X D, et al. Activation of endothelial Wnt/ β -catenin signaling by protective astrocytes repairs BBB damage in ischemic stroke[J]. Prog Neurobiol, 2021, 199: 101963.
- [24] NAM M H, CHO J, KWON D H, et al. Excessive astrocytic GABA causes cortical hypometabolism and impedes functional recovery after subcortical stroke[J]. Cell Rep, 2020, 32(1): 107861.
- [25] TIMPER K, DEL RÍO-MARTÍN A, CREMER L, et al. GLP-1 receptor signaling in astrocytes regulates fatty acid oxidation, mitochondrial integrity, and function[J]. Cell Metab, 2020, 31(6): 1189-1205.
- [26] MAN S M, XIAN Y, HOLMES D N, et al. Association between thrombolytic door-to-needle time and 1-year mortality and readmission in patients with acute ischemic stroke[J]. JAMA, 2020, 323(21): 2170-2184.