

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.21.016

通络救脑注射液及其单体成分对缺氧诱导损伤神经元的影响

王 筠¹, 侯金才², 向丽华¹, 鞠大宏^{1*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 中国中医科学院西苑医院)
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102679); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目 (ZZ070824)

摘要 目的 探讨通络救脑注射液保护神经元的可能作用机制。方法 制备小胶质细胞氧糖剥夺条件液、通络救脑条件液、栀子苷条件液、人参皂苷 Rg1 条件液, 将神经元分为正常对照组、氧糖剥夺组、正常条件液组、氧糖剥夺条件液组、通络救脑条件液组、栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组, 其中正常对照组采用常规神经元培养液, 氧糖剥夺组采用无糖 DMEM 培养液, 其余 5 组按照处理条件分别使用对应的小胶质细胞条件培养液, 条件培养液添加为 100%, 作用时长为 6 h。比较各组神经元细胞活性、乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率、神经元 NMDAR1 及 caspase-3 的表达水平。结果 与正常对照组比较, 氧糖剥夺组和氧糖剥夺条件液组神经元细胞活性明显下降, LDH 漏出率明显增加, 神经元 NMDAR1 和 caspase-3 表达均明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与氧糖剥夺组比较, 通络救脑条件液组、栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组神经元细胞活性明显提高, 通络救脑条件液组和栀子苷条件液组 LDH 漏出率降低、NMDAR1 表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 通络救脑条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组 caspase-3 表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 通络救脑注射液及其单体成分(栀子、三七有效组分)可通过调节小胶质细胞的分泌成分,降低 LDH 漏出率及神经元 NMDAR1、caspase-3 的表达水平,提高神经元活性,逆转损伤小胶质细胞可能对神经元造成的影响,从而发挥神经元的保护作用,并且通络救脑注射液有整合调节的治疗优势。

关键词 通络救脑注射液; 小胶质细胞; 神经元; 栀子苷; 人参皂苷 Rg1

小胶质细胞是中枢神经系统唯一具有免疫活性的细胞。生理条件下,小胶质细胞处于相对静息状态,呈分支状,胞体小,具有伸向各个方向的细胞突起,可分泌和释放生长因子,维持神经元生存、生长和分化。同时,小胶质细胞通过其突起不断监测着大脑微环境的变化,呈现出小胶质细胞直接与神经元的多个突触裂直接接触的状态^[1]。小胶质细胞与神经元的这种结构是维持大脑功能正常的生理基础,同时也是病理损伤的关键环节。缺血性中风严重危害着人类健康,随着对该病的临床观察与实践总结,逐渐形成了缺血性中风“毒损脑络”的病机假说^[2]。通络救脑注射液是针对缺血性脑中风“毒损脑络”病机而研发的,既往研究结果显示,其能够有效增加脑微血管内皮细胞的活性、改善其分泌状态,发挥脑保护作用^[3],其主要有效

成分为栀子苷和人参皂苷 Rg1。本文探讨这两种有效成分对小胶质细胞的影响,明确中药有效组分配伍治疗缺血性中风的可能药效学机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

通络救脑注射液由天津红日药业股份有限公司提供,批号为 090602,由栀子和三七提取配制而成,含总有效成分 7.7 mg/ml,其主要有效成分为栀子苷 4.95 mg/ml,人参皂苷 Rg1 1.02 mg/ml。栀子苷(批号 090602)及人参皂苷 Rg1(批号 110703-201027)由中国食品药品检定研究院提供,2-(2-甲氧基-4-硝基苯)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐(CCK-8)试剂(批号 CK04-11)购于日本同仁化学研究所,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 C0016)购于碧云天生物技术研究所,caspase-3(批号 BS7004)购于 Bioworld 公司, β -actin(批号 ab1801)购于 Abcam

* 通讯作者: judahong@126.com, (010) 84024005

公司, N-甲基-D-门冬氨酸受体 (NMDAR1, 批号 2329-1) 购于 Epitomics 公司, 二抗均购自中杉金桥公司。小鼠小胶质细胞株 BV2 及神经元细胞株 Neuro-2a 购自上海延诚生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

Thermo 3111 二氧化碳培养箱, 赛默飞世尔科技公司; Infinite 200 全波长多功能酶标仪, Tecan 帝肯公司; TDL-5-A 型低速离心机, 上海金鹏分析仪器有限公司; 3K30G 型超速冷冻离心机, Sigma 公司; 1658001 型垂直电泳仪, Bio-Rad 公司; Phoretix 1D 凝胶分析系统, GE health 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠小胶质细胞株 BV2 及神经元细胞株 Neuro-2a (1.5×10^5 个/ml) 以含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM/F12 的培养基种植于底面积为 75cm^2 的培养瓶内, 置于 5% CO_2 、37℃ 饱和湿度孵箱培养, 长成 80% 融合状态时以 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化传代, 每 3 天传代 1 次。

2.2 氧糖剥夺模型建立

采用糖氧剥夺模型^[4], 小胶质细胞或神经元细胞传代 48 h 后, 用无糖的 DMEM 培养液置换原培养基, 放入低氧培养箱 (气体含量为 93% N_2 , 7% CO_2), 37℃ 继续培养 6 h。

2.3 小胶质细胞条件培养液制备

将第三代的小胶质细胞调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 接种至 5 个 75cm^2 的培养瓶中, 分为正常对照组、氧糖剥夺组、通络救脑注射液组、栀子苷组、人参皂苷 Rg1 组。除正常对照组外, 其余 4 组进行氧糖剥夺处理, 通络救脑注射液组、栀子苷组和人参皂苷 Rg1 组分别加入终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 对应的药物 (各有效组分终浓度与通络救脑注射液组中的终浓度一致, 即按比例折算), 作用 6 h 后收集各组的培养液, 并于室温下 1000 转/min 离心除去细胞碎片, 收集上清液后备用。

2.4 分组与给药

将神经元细胞分为正常对照组、氧糖剥夺组、正常条件液组、氧糖剥夺条件液组、通络救脑条件液组、栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组, 其中正常对照组采用常规神经元培养液, 氧糖剥夺组采用无糖 DMEM 培养液, 其余 5 组按照处理条件分别使用对应的小胶质细胞条件培养液, 条件培养液添加为 100%, 神经元各组所用细胞量及复孔

数根据不同的实验检测指标而定, 作用时长为 6 h。

2.5 神经元细胞活性检测

将密度为 1×10^5 /ml 的神经元细胞接种至 96 孔板, 每组 6 个复孔, 经各种小胶质细胞的条件液孵育结束后, 各组弃去原培养液, 各孔统一换成 DMEM/F12, 并加入 10 μl CCK-8 试剂, 37℃ 孵育 3 h, 于波长为 450 nm、参考波长 620 nm 处读出各孔 OD 值。

2.6 神经元 LDH 漏出率测定

将密度为 1×10^5 /ml 的神经元细胞接种至 96 孔板, 每组 6 个复孔, 经各种小胶质细胞的条件液孵育结束后, 向 96 孔板加样孔中加入 10 μl /孔的细胞上清液和标准品; 将底物缓冲液与氧化型辅酶 I 溶液以 5: 1 混合, 加入 60 μl /孔的混合液, 37℃ 水浴 15 min; 加入 60 μl /孔的 2, 4-二硝基苯肼溶液, 37℃ 水浴 15 min; 加入 150 μl /孔的终止液, 室温放置 3 min 后, 用酶标仪在 440 nm 波长读取 OD 值, 并根据标准品进行计算。

2.7 免疫印迹法检测神经元细胞 NMDAR1 和 caspase-3 的表达

将密度为 1×10^6 /ml 的神经元细胞接种至 6 孔板, 每组 3 个复孔, 经各种小胶质细胞的条件液孵育结束后, 收集各组不同方法处理后的神经元到 EP 管中, D-hank's 洗 2 次, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解约 20 min, 4℃ 下 12000 r/min 离心 20 min, BCA 法蛋白定量, 取上清按体积比加入 5 $\times$ loading buffer, 于 95℃ 水中煮沸 5 min。各组统一取蛋白样品 20 μg 进行 12.5% SDS-PAGE 电泳, 将蛋白用湿转法转移至 PVDF 膜, 经 5% 脱脂牛奶 37℃ 封闭 2 h 后, 分别加入 1: 500 稀释的 NMDAR1 一抗和 caspase-3 一抗 (内参为 1: 2000 的 β -actin) 进行 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 5 $\times$ 15 min, 再与 1: 1000 的羊抗兔二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜 5 $\times$ 15 min, 在膜上滴加 ECL 发光液后进行曝光、显影定影处理检测阳性信号。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。连续型变量采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时两组间均数比较采用 LSD 法, 方差不齐时两组间均数比较采用 Tamhane T_2 法。

3 结果

3.1 各组神经元细胞活性及 LDH 漏出率比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 氧糖剥夺组和氧

糖剥夺条件液组神经元细胞活性明显下降, LDH 漏出率明显增加 ($P < 0.01$)。与氧糖剥夺组比较, 通络救脑条件液组、栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组神经元细胞活性明显提高, 通络救脑条件液组、栀子苷条件液组 LDH 漏出率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)

表 1 各组神经元细胞活性及 LDH 漏出率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	细胞活性 (OD 值)	LDH 漏出率 (%)
正常对照组	6	0.712 ± 0.100	12.365 ± 1.476
氧糖剥夺组	6	0.248 ± 0.053*	35.161 ± 6.707*
正常条件液组	6	0.673 ± 0.105	14.162 ± 2.820
氧糖剥夺条件液组	6	0.195 ± 0.050*	45.568 ± 5.125*
通络救脑条件液组	6	0.478 ± 0.084 $\Delta\Delta$	21.488 ± 5.873 $\Delta\Delta$
栀子苷条件液组	6	0.351 ± 0.086 Δ	22.920 ± 3.287 $\Delta\Delta$
人参皂苷 Rg1 条件液组	6	0.472 ± 0.079 $\Delta\Delta$	29.374 ± 9.214

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与氧糖剥夺组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.2 各组神经元细胞 NMDAR1 和 caspase-3 表达比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 氧糖剥夺组和氧糖剥夺条件液组神经元细胞 NMDAR1 和 caspase-3 表达均明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与氧糖剥夺组比较, 通络救脑条件液组、栀子苷条件液组 NMDAR1 表达明显下降, 通络救脑条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组 caspase-3 表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组神经元细胞 NMDAR1 和 caspase-3 表达比较 (相对灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	NMDAR1	caspase-3
正常对照组	3	0.358 ± 0.047	0.191 ± 0.069
氧糖剥夺组	3	1.030 ± 0.310*	0.713 ± 0.071**
正常条件液组	3	0.362 ± 0.090	0.177 ± 0.032
氧糖剥夺条件液组	3	1.378 ± 0.262**	0.830 ± 0.122**
通络救脑条件液组	3	0.478 ± 0.084 Δ	0.243 ± 0.058 $\Delta\Delta$
栀子苷条件液组	3	0.330 ± 0.049 Δ	0.563 ± 0.066
人参皂苷 Rg1 条件液组	3	0.968 ± 0.240	0.393 ± 0.080 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与氧糖剥夺组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 讨论

小胶质细胞是脑源性的巨噬细胞, 在脑缺血时迅速增加并活化, 参与脑缺血的病理生理过程^[5]。缺血后神经元的凋亡是神经元死亡的重要形式之一^[6]。缺氧状态下的小胶质细胞会大量活化, 对神经元产生神经毒作用, 从而引起缺血后的神经元凋亡^[7]。近年来随着对中风病病因病机认识的深

化, 中医药对中风病的临床和科研显示出独特的优势^[8]。通络救脑注射液中栀子味苦性寒, 为气分之血药, 清热解毒, 通泻三焦之火; 三七味苦性温, 具有化瘀止血、活血定痛的作用。二者共奏承制调平、神机复用以维护脑微环境的功效。

本研究结果显示, 与正常对照组相比, 正常条件液组的神经元活性和 LDH 漏出率没有明显的变化, 表明对于正常培养的神经元, 小胶质细胞对其不发生影响; 而氧糖剥夺条件液组神经元的细胞活性明显下降, 漏出率明显增加, 其变化程度比单纯受到氧糖剥夺损伤更明显, 表明缺氧损伤后的小胶质细胞对神经元产生明显的毒性作用。通络救脑条件液组、栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组均可使神经元的活性得到不同程度的恢复, 同时降低神经元的 LDH 漏出率。但是栀子苷和人参皂苷 Rg1 两种方式处理后的小胶质细胞条件培养液对神经元的作用侧重点不同, 人参皂苷 Rg1 提升神经元活性更明显。而栀子苷降低神经元的 LDH 漏出率效果更明显, 综合二者使用的通络救脑条件液组可同时提高神经元活性及降低 LDH 漏出率, 提示通络救脑注射液处理后的小胶质细胞条件培养液可同时提高神经元的细胞活性和降低 LDH 漏出率, 显示了配伍使用的整体作用。

各种原因引起的脑缺血缺氧, 其受损局部组织的神经元可释放大量的兴奋性氨基酸 (EAA), 主要是谷氨酸 (Glu), 致使细胞间隙的 EAA 浓度很快增加, 而细胞间隙中超常量的 EAA 持续强烈地作用于细胞膜上的 Glu 受体亚型——NMDAR, 触发一系列 Ca^{2+} 依赖性反应, 造成神经元进一步损伤^[9], 因此认为在缺血性脑损伤中 NMDAR 发挥着关键作用。在脑缺血再灌注损伤的病理过程中, 神经元凋亡起着关键性作用, 通过多种通路转导凋亡信号, 进而激活 caspase 家族, 诱导细胞凋亡, 其中 caspase-3 是 caspase 级联瀑布下游最关键的凋亡蛋白酶, 在各种因素启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用^[10]。本研究中氧糖剥夺条件液组神经元 NMDAR1 和 caspase-3 表达亦发生明显的上调, 说明缺氧的小胶质细胞对神经元产生损伤及诱导凋亡的作用。栀子苷条件液组、人参皂苷 Rg1 条件液组可分别降低神经元的 NMDAR1 和 caspase-3 表达, 说明栀子苷和人参皂苷 Rg1 发挥作用有不同的侧重点。通络救脑条件液组可同时降低神经元 NMDAR1 和 caspase-3 的表达, 提示栀子苷有抑制受损神经元 NMDAR 的表达的作用, 而人参皂苷

Rgl 有抑制神经元凋亡的作用, 表现为降低 caspase-3 的表达, 推测通络救脑注射液整体上明显优于两个有效成分, 显示了中药组方配伍发挥整合调节的治疗优势。通络救脑注射液及其单体成分可通过调节小胶质细胞的分泌成分, 逆转损伤小胶质细胞可能对神经元造成的影响, 通过神经元周围微环境的改变, 而发挥神经元的保护作用。

参考文献

- [1] Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience [J]. PLoS Biol, 2010, 8(11): e1000527.
- [2] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义 [J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 1-6.
- [3] Wang J, Li PT, Du H, et al. Tong Luo Jiu Nao injection, a traditional Chinese medicinal preparation, inhibits MIP-1 β expression in brain microvascular endothelial cells injured by oxygen-glucose deprivation [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 151-157.
- [4] Wang J, Tang Y, Zhang W, et al. Insulin like growth

factor-1 (IGF-1) secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia [J]. FEBS J, 2013, 280(15): 3658-3668.

- [5] Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats [J]. Pediatr Res, 1996, 39(1): 39-47.
- [6] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Temporal profile of insitu DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(3): 389-397.
- [7] 冯涛, 朱克, 戚晓昆. 大鼠持续性脑缺血后小胶质细胞变化及其与神经元凋亡的关系 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2001, 18(4): 201-203.
- [8] 熊露, 田少霞, 范吉平, 等. 中医药治疗缺血性中风研究探讨 [J]. 中医杂志, 2004, 45(1): 5-7.
- [9] Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, et al. Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway [J]. Neuroinflammation, 2008, 5: 43. doi: 10.1186/1742-2094-5-43.
- [10] Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view [J]. Protein Sci, 2004, 13(8): 1979-1987.

Effects of Tongluo Jiunao Injection and Its Compositions on Neuron Damage Induced by Anoxia

WANG Jun¹, HOU Jincai², XIANG Lihua¹, JU Dahong¹

(1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To investigate the possible action mechanism of *Tongluo Jiunao Injection* in protecting neurons. **Methods** The microglia glucose deprivation (OGD) conditioned medium, *Tongluo Jiunao* conditioned medium, geniposide conditioned medium and ginsenoside-Rgl conditioned medium were prepared. The neurons were classified into the normal control group, OGD group, normal conditioned medium group, OGD conditioned medium group, *Tongluo Jiunao* conditioned medium group, geniposide conditioned medium group and ginsenoside-Rgl conditioned medium group. In normal control group, neurons were cultured in conventional way, OGD group was treated with glucose-free DMEM culture and the rest 5 groups were cultured in the responding microglia conditioned mediums. The conditioned mediums were added as 100% and the action time was 6 hours. The cell viability, leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) and expressions of NMDAR1 and caspase-3 of neurons in each group were compared. **Results** Comparing with the normal control group, the neuron viability was significantly decreased, LDH leakage rate was significantly increased and expressions of neuron NMDAR1 and caspase-3 were significantly increased in OGD group and OGD conditioned medium group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the OGD group, the neuron viability in *Tongluo Jiunao* conditioned medium group, geniposide conditioned medium group and ginsenoside-Rgl conditioned medium group was significantly increased, LDH leakage rate and expression of neuron NMDAR1 was significantly decreased in *Tongluo Jiunao* conditioned medium group and geniposide conditioned medium group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the expression of caspase-3 was significantly decreased in *Tongluo Jiunao* conditioned medium group and ginsenoside-Rgl conditioned medium group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Tongluo Jiunao Injection* and its monomer composition (efficient compositions of gardenia and panax notoginseng) can decrease LDH leakage rate and expressions of NMDAR1 and caspase-3, enhance the viability of neurons and reverse the possible impact of microglia damage on neurons by regulating the secretion of microglia. The neurons may be protected. In addition, *Tongluo Jiunao Injection* has the therapeutic advantage of integrated regulation.

Keywords *Tongluo Jiunao Injection*; microglia; neuron; geniposide; ginsenoside-Rgl

(收稿日期: 2013-11-06; 修回日期: 2014-02-08)

编辑: 邓 媛