

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.24.014

益气通络颗粒对原代皮层神经元细胞活力、毒性及线粒体膜电势的影响

薛冰洁¹, 黄吉生², 陈进成¹, 马博¹, 刘建勋^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091; 2. 神威药业集团神威药物研究院)

摘要 目的 探讨益气通络颗粒治疗中风的可能作用机制。方法 将孕 18 天左右的大鼠麻醉后取出胎鼠, 提取原代皮层神经元细胞, 分为空白对照组、模型组及益气通络颗粒高、中、低剂量组 (分别加药 100、50 及 25 mg/ml, 加药体积为 100 μ l), 每组 5 孔。除空白对照组外, 其余各组均进行氧糖剥夺处理。氧糖剥夺 3 h、复氧 24 h 后, 观察各组神经元的细胞活力、细胞毒性、线粒体膜电势 (JC-1)、活性氧簇 (ROS) 及三磷酸腺苷 (ATP) 表达。结果 与空白对照组比较, 模型组细胞活力、线粒体膜电势、ATP 含量明显下降, 细胞毒性、ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组细胞活力、线粒体膜电势、ATP 含量明显上升, 细胞毒性、ROS 含量显著下降, 益气通络颗粒低剂量组细胞毒性亦显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与益气通络颗粒低剂量组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组细胞毒性、ROS 含量下降, 线粒体膜电势、ATP 含量均升高, 益气通络颗粒高剂量组细胞活力上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与益气通络颗粒中剂量组比较, 益气通络颗粒高剂量组细胞活力升高, ROS 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 益气通络颗粒能够显著提高缺氧神经元的细胞活力, 其机制可能是通过调节 ROS 和 ATP 的生成, 降低线粒体损伤。

关键词 益气通络颗粒; 氧糖剥夺模型; 线粒体膜电势; 活性氧簇; 三磷酸腺苷; 细胞活力; 细胞毒性

中风是世界范围内第二大致死疾病, 发病范围广, 具有发病急、致残率和死亡率高等特点^[1]。目前, 溶栓或手术是被广泛认可的治疗中风方法^[2]。然而, 溶栓疗法的治疗时间窗较窄, 对大多数患者存在局限性^[3-5]。益气通络颗粒由补阳还五汤化裁而成, 具有益气活血、祛瘀通络的功效, 适用于中风病气虚血瘀证患者。研究发现, 益气通络颗粒治疗中风病气虚血瘀证患者疗效显著, 且无明显毒副作用^[6], 并能显著改善大脑中动脉栓塞 (MCAO) 脑梗死大鼠神经功能学评分^[7]。正常剂量的活性氧簇 (ROS) 是细胞内的第二信使, 可通过信号通路的调节促进细胞生存。当大脑在缺血或再灌注时, 处于压力下的线粒体产生了大量的 ROS, 同时三磷酸腺苷 (ATP) 产量显著下降, 线粒体膜电势 (JC-1) 下降, 细胞活力变弱甚至凋亡或

坏死^[8]。本研究观察益气通络颗粒对缺氧神经元的细胞活力、细胞毒性以及 JC-1 的影响, 分析其对 ROS 及 ATP 生成的调控作用, 探讨益气通络颗粒治疗中风的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 孕鼠 1 只, 2 月龄, 200 ~ 250 g。购自维通利华公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0002)。本研究通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审查 (伦理号: 2018XLC003-1) 通过。

1.2 药物

益气通络颗粒由黄芪 833 g、丹参 417 g、川芎 250 g、红花 250 g、地龙 83 g 组成, 制成颗粒剂, 由神威药业集团有限公司提供, 批号: 15021131。益气通络颗粒提取物的制备: 益气通络颗粒 100 g 加蒸馏水 1000 g 煎煮 1 h, 过滤后去除沉淀, 蒸馏水清洗, 再过滤, 两次过滤液混合后浓缩至 10 ml,

基金项目: 国家自然科学基金 (81703747)

* 通讯作者: liujx0324@sina.com

等同于 100 g 益气通络颗粒。

精密量取益气通络颗粒提取液 1 ~ 50 ml 于离心管中, 于超净台内加无血清高糖 DMEM 培养液至 45 ml, 涡旋震荡使药物溶解, 静置 30 min 后混匀, 室温, 5000 r/min 离心 20 min, 离心半径 8 cm, 吸取上清液, 用 0.45 μ m 滤器无菌条件下过滤, 加入 5 ml 胎牛血清 (FBS) 混匀制成贮存液, 封口, 于 4℃ 冰箱内保存备用, 贮存液含益气通络颗粒提取物浓度为 200 mg/ml, 并且含 10% FBS。另制备不含 FBS 的益气通络颗粒药液, 制备过程同上, 浓度为 200 mg/ml。临用时将贮存液梯度稀释至所需浓度 100、50 及 25 mg/ml。

1.3 主要试剂及仪器

Hoechst 33342 (Invitrogen, 批号 H1399), Mitosox Red (批号 M36008)、JC-1 染料 (批号 T3168)、0.5% 青链霉素 (批号: 14025-092) 均为 Life Technologies 公司产品, CCK-8 试剂盒 (DOJINDO, 批号 CK04), 细胞毒性检测试剂盒 (Roche, 批号 11644793001), ATPlite 化学发光 ATP 检测试剂盒 (PerkinElmer, 批号 6016941), 胎牛血清 [FBS, 爱必信 (上海) 生物科技有限公司, 批号 20180717], DMEM 培养液 (货号 1951286)、DMEM/F12 溶液 (批号 11330500BT)、Neurobasal 培养基 (货号 21103049) 均为 Gibco 公司产品, 多聚赖氨酸 (碧云天生物技术有限公司, 货号 ST509)。

多功能酶标仪 (BioTek, 型号 STNERGYTMM4), 虹膜剪 (PELCO, 型号 13215), 荧光显微镜 (奥林巴斯, 型号 IX 81), 离心机 (Thermo, 型号 IEC CL31R), 解剖显微镜 (Weiscope, 型号 WSZ-600A), 培养箱 (SANYO, 型号 MCO175)。

1.4 原代皮层神经元细胞的提取及培养

将孕 18 天左右的 SD 大鼠用 4% 水合氯醛 (1 ml/100 g) 麻醉, 无菌条件下取出胚胎放入冰 Hank's 平衡盐溶液 (添加 0.5% 青链霉素) 中。取脑组织转移到添加有 0.5% 的青链霉素的 DMEM/F12 溶液中。解剖显微镜下分离取出大脑皮层, 仔细去除表面细微血管, 尽量干净。用虹膜剪将胚胎海马组织剪成碎块, 加入 0.125% 胰酶放入 37℃ 培养箱内消化 20 min。消化完成后, 用含血清的终止液终止消化, 然后取口径较细的巴氏吸管轻柔吹打制成细胞悬液, 使用 200 目尼龙网进行过滤。4℃、2200 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 5 min 后弃去上清, 用 Neurobasal 培养基重悬浮离心 (离心条件同上) 沉淀, 以 1×10^6 /ml 接种于多聚赖氨酸包被好

的 96 孔板 (每孔 100 μ l) 或者 6 孔板 (每孔 1 ml) 中, 放入 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养过夜。随后每 3 天半量换液。大鼠皮层神经元培养至 5 ~ 6 天可用于实验。

1.5 分组、造模及给药

将所有实验孔分为空白对照组、模型组及益气通络颗粒高、中、低剂量组, 每组设 5 个复孔。当神经元细胞出现 70% ~ 80% 融合时, 空白对照组和模型组加入 100 μ l 高糖 DMEM 培养基, 益气通络颗粒高、中、低剂量组分别给予 100 μ l 浓度为 100、50、25 mg/ml 相应的含 FBS 药液。24 h 后, 模型组换成低糖 DMEM, 加药组换成相应的不含 FBS 药液, 将细胞置于 1% 的 O₂、5% 的 CO₂ 条件下, 造模时间为 3 h, 之后将药液再次换为含 FBS 药液, 即复氧 24 h^[8]。模型成功的标准为 ROS 的含量与空白对照组相比增加了 1.5 倍^[9]。结果用各组吸光度值与模型组比值表示。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 CCK-8 法检测神经元细胞活力 在氧糖剥夺 3 h 后, 向 96 孔板的每孔中加入 10 μ l 的检测试剂, 37℃ 培养箱孵育约 1 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸收光。

1.6.2 神经元细胞毒性 通过检测乳酸脱氢酶 (LDH) 研究药物对氧糖剥夺所引起细胞毒性的影响。取培养基上清 50 μ l, 加到一块新的 96 孔板内, 然后再加入等量的检测试剂, 待颜色改变后使用酶标仪在 490 nm 处进行检测。结果用各组吸光度值与模型组比值表示。

1.6.3 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电势 根据试剂盒说明书进行。JC-1 是一种亲脂性的正离子荧光染料, 其在线粒体膜电势低的时候以单体形式存在, 显示为绿色; 而在线粒体膜电势较高的时候以复合体形式存在, 显示为红色。在氧糖剥夺后, 神经元与含 10 μ mol/L JC-1 的培养基共孵育 20 min。用 PBS 洗两次后立即使用多功能酶标仪检测荧光吸收, 并使用荧光显微镜进行拍照。分别在 529 nm 和 590 nm 检测绿色和红色荧光吸收值, 红色荧光与绿色荧光的比值即为线粒体膜电势。

1.6.4 Mitosox Red 荧光检测神经元线粒体内 ROS 含量 通过将原代神经元细胞进行氧糖剥夺后置于缺氧条件下 (1% O₂, 5% CO₂) 3 h, 导致 ROS 大量产生。使用 Mitosox Red 标记由线粒体产生的 ROS 和细胞核。在进行氧糖剥夺处理后, 原代神经元与 5 μ mol/L Mitosox Red 共孵育 10 min。孵育结束后去除过量的 Mitosox Red, 在常温下用 PBS

洗两遍。使用多功能酶标仪进行荧光值的分析。结果用各组荧光值与模型组荧光值比值表示。

1.6.5 ATP 检测 使用 ATPlite 化学发光法按照 ATP 检测试剂盒步骤检测 ATP 的释放。在进行氧糖剥夺及药物处理后, 神经元细胞使用 PBS 润洗, 然后每孔加入 100 μ l 的培养基及 50 μ l 的裂解液, 孵育 5 ~ 10 min 后, 每孔加入由试剂盒提供的 50 μ l 的底物, 静置 5 min 后使用多功能酶标仪检测 ATP 含量。结果用各组荧光值与模型组荧光值比值表示。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 处理数据, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行各组间比较, 如果数据满足方差齐性, 采用 Tukey's HSD 法进行, 否则采用 Games-Howell 进行分析。图片使用 Graph Pad Prism 5 进行绘制。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组原代皮层神经元细胞活力比较

图 1 示, 空白对照组的神经元胞体圆润, 神经突触相互连接; 模型组在氧糖剥夺处理后其神经元胞体出现皱缩, 且神经突触断裂, 而在益气通络颗粒作用以后, 神经元的胞体和突触形态均有所恢复。益气通络颗粒低剂量组与模型组相比, 其断裂的神经元突触有所减少, 且降低了神经元胞体的皱缩; 而益气通络颗粒中、高剂量组的神经元突触断裂进一步减少, 神经元胞体则更加圆润, 说明益气通络颗粒各剂量组均可显著改善缺氧神经元的形态。

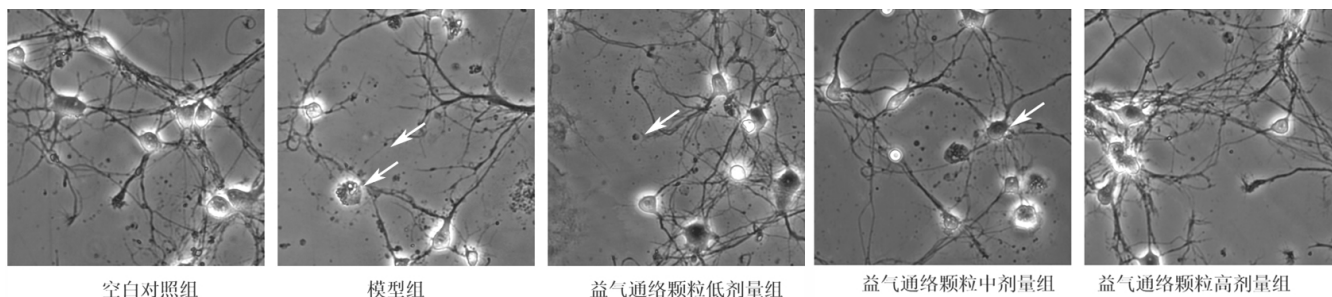


图 1 各组原代皮层神经元细胞形态图 (JC-1 荧光染色, $\times 200$)

表 1 各组原代皮层神经元细胞活力及毒性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞活力	细胞毒性	线粒体膜电势
空白对照组	5	1.80 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.13
模型组	5	1.00 $\pm$ 0.07 **	1.00 $\pm$ 0.11 **	0.57 $\pm$ 0.03 **
益气通络颗粒低剂量组	5	1.12 $\pm$ 0.09 **	0.78 $\pm$ 0.11 ** Δ	0.65 $\pm$ 0.01 **
益气通络颗粒中剂量组	5	1.26 $\pm$ 0.08 ** $\Delta\Delta$	0.50 $\pm$ 0.05 ** $\Delta\Delta\Delta$	0.78 $\pm$ 0.08 ** $\Delta\Delta\Delta$
益气通络颗粒高剂量组	5	1.51 $\pm$ 0.06 ** $\Delta\Delta\Delta$ #	0.44 $\pm$ 0.15 ** $\Delta\Delta\Delta$	0.83 $\pm$ 0.05 ** $\Delta\Delta\Delta$

注: 与空白对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, $\Delta\Delta$ P < 0.01; 与益气通络颗粒低剂量组比较, Δ P < 0.01; 与益气通络颗粒中剂量组比较, # P < 0.01

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组细胞活力明显下降, 细胞毒性显著升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组细胞活力明显上升、细胞毒性显著下降, 益气通络颗粒低剂量组细胞毒性亦显著下降 (P < 0.05 或 P < 0.01)。与益气通络颗粒低剂量组比较, 益气通络颗粒中剂量组细胞毒性下降, 益气通络颗粒高剂量组细胞活力上升, 细胞毒性下降 (P < 0.01), 且益气通络颗粒高剂量组细胞活力高于益气通络颗粒中剂量组 (P < 0.01)。

2.2 各组原代皮层神经元线粒体膜电势比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组线粒体膜电势显著下降 (P < 0.01); 与模型组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组的线粒体膜电势显著升高 (P < 0.01); 与益气通络颗粒低剂量组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组线粒体膜电势均升高 (P < 0.01), 但益气通络颗粒高、中剂量组线粒体膜电势比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2.3 各组原代皮层神经元线粒体 ROS 及 ATP 比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组 ROS 含量升高、ATP 含量降低 (P < 0.01); 与模型组比较, 益气通络颗粒各剂量组 ROS 含量降低、ATP 含量升高 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与益气通络颗粒低剂量组比较, 益气通络颗粒高、中剂量组 ROS 含量降低、ATP 含量升高 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且益气通络颗粒高剂量组 ROS 含量低于益气通络颗粒中剂量组 (P < 0.05)。

表 2 各组原代皮层神经元细胞 ROS、ATP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	ROS	ATP
空白对照组	5	0.24 ± 0.05	1.73 ± 0.04
模型组	5	1.00 ± 0.09*	1.00 ± 0.03*
益气通络颗粒低剂量组	5	0.76 ± 0.08*△△	1.16 ± 0.02*△
益气通络颗粒中剂量组	5	0.41 ± 0.10*△△▲▲	1.47 ± 0.06*△△▲
益气通络颗粒高剂量组	5	0.29 ± 0.05△△▲▲#	1.55 ± 0.10*△△▲

注: ROS, 活性氧簇; ATP, 三磷酸腺苷; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与益气通络颗粒低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与益气通络颗粒中剂量组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

中风病为本虚标实之证, 而气虚血瘀是缺血性中风的重要病机之一^[1]。益气通络颗粒是在补阳还五汤基础上化裁而成, 方中重用黄芪为君药, 大补脾胃之元气, 令气旺血行, 瘀络通; 丹参长于活血, 且有化瘀而不伤血之妙, 是为臣药; 川芎、红花活血祛瘀, 地龙通经活络, 均为佐药。补气药与活血药相配, 使气旺则血行, 活血而不伤正, 共奏补气活血通络之功。

现代医学认为, 线粒体的损伤发生在缺氧早期, 是缺氧引发病变的病理学基础^[12-13]。目前研究已经阐明了线粒体在细胞内的重要作用, 其行使着重要的细胞功能, 如 ATP 的生成, Ca^{2+} 稳态, ROS 生成及中和, 以及神经递质的合成和失活^[14-17]。线粒体是一个极易在缺氧中受到伤害的细胞器^[18]。线粒体膜电势是线粒体通透性的标志^[19-20], 因此, 线粒体膜电势的恢复被视为治疗有效性的标志。本研究结果显示, 益气通络颗粒高、中剂量均可以缓解缺氧造成的线粒体损伤, 表现为线粒体膜电势升高, 说明益气通络颗粒通过保护线粒体活性增强缺氧神经元的活力, 降低缺氧造成的神经元细胞损伤。

研究^[20-21]表明, 在各种神经相关性疾病中, ROS 的过量生成和神经死亡之间存在着密切的联系, 这些疾病包括肌肉萎缩、阿尔茨海默病、帕金森症、缺血性中风以及外伤性脑损伤。线粒体功能异常导致了大量的过氧亚硝酸根的产生, 其又促进 ROS 大量生成, 而这些 ROS 又会伤害线粒体复合体^[22,13]。由此产生的活性氧还可以破坏细胞内几乎所有的生物分子, 促进线粒体通透性转换孔的打开, 激活炎症和血栓形成的级联反应, 加重细胞损伤^[23]。本研究结果显示, 益气通络颗粒各剂量组

均可以显著抑制 ROS 的生成, 降低线粒体内的氧化水平, 减少缺氧对线粒体的损伤。与此同时, ATP 在益气通络颗粒的作用下显著升高, 说明益气通络颗粒对线粒体的产物 ROS 和 ATP 有很好的调节作用, 也反映了其对线粒体活性较好的保护作用。在本课题中, 我们使用 LDH 检测神经元的细胞毒性, 在正常细胞内 LDH 存在于细胞质内而不外漏。当细胞受到毒性的时候, 就会导致细胞膜破裂, 使得 LDH 进入到细胞外溶液中^[24], 通过检测细胞外的溶液中的 LDH 的含量, 推测由于缺氧引起的细胞毒性。细胞毒性的结果与通过 CCK-8 检测的细胞活力的结果一致, 均显示了益气通络颗粒对缺氧的神经元细胞的保护作用。

参考文献

- [1] MIJALOVIC MD, PAVLOVIC A, BRAININ M, et al. Post-stroke dementia—a comprehensive review [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 11. doi: 10.1186/s12916-017-0779-7.
- [2] 李娜娜, 丰宏林. 急性脑梗死患者静脉溶栓治疗及预后的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3221-3225.
- [3] ZERNA C, HEGEDUS J, HILL MD. Evolving treatments for acute ischemic stroke [J]. Circ Res, 2016, 118(9): 1425-1442.
- [4] HACKE W, DONNAN G, FIESCHI C, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials [J]. Lancet, 2004, 363(9411): 768-774.
- [5] THOMALLA G, SIMONSEN CZ, BOUTITTE F, et al. MRI-Guided thrombolysis for stroke with unknown time of onset [J]. N Engl J Med, 2018, 379(7): 611-622.
- [6] 张纲, 张华健, 刘军锋, 等. 益气通络颗粒治疗中风病(气虚血瘀证)Ⅲ期临床试验 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(10): 743-745.
- [7] 薛冰洁, 黄吉生, 马博, 等. 益气通络颗粒促气虚血瘀证脑梗大鼠血管新生的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4072-4078.
- [8] MAISES K. The bright side of reactive oxygen species: lifespan extension without cellular demise [J]. J Transl Sci, 2016, 2(3): 185-187.
- [9] DIAO J, WEI J, YAN R, et al. Rosmarinic Acid suppressed high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by ameliorating the mitochondrial function and activating STAT3 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 1024-1030.
- [10] 储倩雯, 李伟秋, 鲁史诗等. 利用低氧/厌氧工作站建立 H9C2 细胞缺氧复氧模型的探讨 [J]. 中国生化药理学杂志, 2016, 11(35): 11-15.
- [11] 陶根鱼, 杜晓泉. 益气活血法在缺血性中风病中的地

- 位 0. 陕西中医学院学报, 1998, 21(3): 1.
- [2] KAHL A, STEPANOVA A, KONRAD C, et al. Critical role of flavin and glutathione in complex mediated bioenergetic failure in brain ischemia/reperfusion injury [J]. Stroke, 2018, 49(5): 1223-1231.
- [3] AGGARWAL A, AGGARWAL P, KHATAKM, et al. Cerebral ischemic stroke: Sequels of cascade [J]. Int J Pharma Bio Sci, 2010, 1(3): 1-24.
- [4] BRINI M, CALI T, OTTOLINI D, et al. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(15): 2787-2814.
- [5] TAIT SW, GREEN DR. Mitochondrial regulation of cell death [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(9): pii: a008706. doi: 10.1101/cshperspect.a008706.
- [6] ZOROV DB, JUHASZOVA M, SOLLOTT SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. Physiol Rev, 2014, 94(3): 909-950.
- [7] ROWLEY NM, MADSEN KK, SCHOUSBOE A, et al. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control [J]. Neurochem-Int, 2012, 61(4): 546-558.
- [8] NOVGORODOV SA, RILEY CL, KEFFLER JA, et al. SIRT3 deacetylases ceramide synthases: implications for mitochondrial dysfunction and brain injury [J]. J Biol Chem, 2016, 291(4): 1957-1973.
- [9] PARRA V, EISNER V, CHIONG M, et al. Change in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis [J]. Cardiovasc Res, 2016, 77: 387-397.
- [10] LIU Q, LI X, LI L, et al. Ginkgolide K protects SH-SY5Y cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury by inhibiting the p38 and JNK signaling pathways [J]. Mol Med Rep, 2018, 18: 3185-3192.
- [11] VALKO M, LEIBFRITS D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(1): 44-84.
- [12] DUGAN LL, BEHRENS MM, ALI SS. Oxidative stress in hypoxic-ischemic brain injury [M] // Brain Hypoxia and Ischemia: with special emphasis on development. Humana Press, 2009, 45: 239-254.
- [13] THEODORE K, CHRISTOPHER PK, MAIKE K, et al. Ischemia/Reperfusion [J]. Comprehensive physiology, 2017, 7(1): 113-170.
- [14] 汤喜兰, 梁爱华, 于长安, 等. 细胞色素 P450 同工酶对马兜铃酸所致的细胞毒性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2164-2169.

Effects of *Yiqi Tongluo Granules* (益气通络颗粒) on Primary Cortical Neurons Cell Viability, Toxicity and Mitochondrial Membrane Potential

XUE Bingjie¹, HUANG Jisheng², CHEN Jincheng¹, MA Bo¹, LIU Jianxun¹

(1. Institute of Basic Medical Science, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091; 2. Research Institute of Shineway Pharmaceutical Group)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yiqi Tongluo Granules* (益气通络颗粒) in treating stroke. **Methods** The fetal rats were taken out after anesthesia at about 18 days of pregnancy, and the primary cortical neurons were extracted and divided into a blank control group, a model group, and a *Yiqi Tongluo Granules* high, medium and low dose groups (100, 50 and 25 mg/ml, the dosage volume was 100 μ l), 5 holes in each group. All groups but the blank control group were treated with oxygen and sugar deprivation. After 3 hours of oxygen glucose deprivation and 24 hours of reoxygenation, the cell viability, cytotoxicity, mitochondrial membrane potential (JC-1), reactive oxygen species (ROS), and adenosine triphosphate (ATP) expression were observed in each group of neurons. **Results** Compared with the blank control group, the cell viability, mitochondrial membrane potential, and ATP content of the model group were significantly reduced, and the cytotoxicity and ROS content were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, cell viability, mitochondrial membrane potential, and ATP content of *Yiqi Tongluo Granules* high, medium dose groups increased significantly, cytotoxicity and ROS content decreased significantly, and the cytotoxicity of *Yiqi Tongluo Granules* low dose group also decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with *Yiqi Tongluo Granules* low dose group, the cytotoxicity and ROS content of *Yiqi Tongluo Granules* high and medium dose groups decreased, and the mitochondrial membrane potential and ATP content increased, and cell viability of *Yiqi Tongluo Granules* high dose group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with *Yiqi Tongluo Granules* medium dose group, the cell viability of *Yiqi Tongluo Granules* high dose group increased, and the ROS content decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Yiqi Tongluo Granules* can significantly increase the cell viability of hypoxic neurons, and its mechanism may be to reduce mitochondrial damage by regulating ROS and ATP production.

Keywords *Yiqi Tongluo Granules* (益气通络颗粒); oxygen and glucose deprivation model; mitochondrial potential; reactive oxygen species; adenosine triphosphate; cell viability; cytotoxicity

(收稿日期: 2018-11-30; 修回日期: 2019-10-09)

编辑: 王利芬