

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

景浩然, 胡利民*, 王少峡, 杨红云, 韩 虞, 王鸿远

天津中医药大学 中医药研究院 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** 研究丹红注射液及其单体成分对小鼠小胶质细胞株 (BV-2 细胞) 的影响及其作用机制。 **方法** 实验分为对照组、脂多糖 (LPS) 刺激组、加药组, 检测不同稀释倍数的丹红注射液、水和醋酸乙酯萃取物及其单体成分对小胶质细胞活力及 LPS 诱导小胶质细胞一氧化氮 (NO) 产生的影响。 **结果** 丹红注射液及醋酸乙酯萃取物对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的产生没有抑制作用, 但是丹红注射液水萃取物以及丹酚酸 A 可以在不影响细胞活力的情况下抑制 NO 产生。 **结论** 丹红注射液水萃取物中的某些成分以及丹酚酸 A 抑制激活小胶质细胞 NO 的产生可能是丹红注射液神经保护作用的机制之一。

关键词: 丹红注射液; 丹酚酸 A; 小胶质细胞; 一氧化氮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)03-0285-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.006

Inhibition of Danhong Injection and its active components on NO secretion in microglia induced by lipopolysaccharide

JING Hao-ran, HU Li-min, WANG Shao-xia, YANG Hong-yun, HAN Yu, WANG Hong-yuan

Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the effect and its mechanism of action of Danhong Injection and its monomer components on microglia BV-2 of mice. **Methods** The experiment was divided into control, lipopolysaccharide (LPS), and dosing groups. The effects of Danhong Injection, water extract, ethyl acetate extract, and monomer compounds on microglia cell viability and LPS-induced NO production were detected. **Results** Danhong Injection and its ethyl acetate extract had no inhibitory effect on NO production of LPS-induced microglia, but water extract of Danhong Injection and its active component salvianolic acid A affected NO production without affecting cell viability. **Conclusion** The monomer components from Danhong Injection and salvianolic acid A inhibition NO production in activating microglia may be one of the neuroprotective effect mechanisms for neuroprotection of Danhong Injection.

Key word: Danhong Injection; salvianolic acid A; microglia; NO

小胶质细胞是中枢神经系统具有免疫活性的巨噬细胞, 是脑内免疫监视和内源性免疫防御的关键成分^[1]。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]。丹红注射液临床上可用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死, 瘀血型肺心病、缺血性脑病、脑血栓^[4]。另有研究表明, 临床上用丹红注射液改善脑梗死患者的运动功能^[5]。本研究就丹红注射液的神经保护作用机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂

小鼠小胶质细胞株 (BV-2 细胞) 购自中国医学科学院基础研究所; 丹红注射液 (批号 110247, 规格 10 mL/支) 由菏泽步长制药有限公司提供; 丹红注射液水、醋酸乙酯萃取物由丹红注射液 207 mL, 用醋酸乙酯萃取, 得醋酸乙酯层 1.37 g, 水层 9.03 g; 单体成分丹酚酸 A、丹酚酸 C、紫草酸、迷迭香酸、原儿茶醛、原儿茶酸和咖啡酸经 HPLC 法检测, 质

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2012ZX09101201, 2012ZX09101202, 2011ZX09201-201); 天津市卫生局课题 (2010KZ120)

作者简介: 景浩然 (1987—), 女, 山西运城人, 天津中医药大学药理专业在读硕士研究生。E-mail: jinghaoran7885@163.com

*通信作者 胡利民 (1966—), 男, 内蒙古人, 研究员, 主要从事神经药理学、中医内科学等方面的研究。E-mail: huliminth@126.com

量分数 ≥ 96%，由天津国际生物医药联合研究院提供；DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、双抗、胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司；Griess 法 NO 检测试剂盒购自碧云天公司，CCK-8 试剂盒由同仁化学提供；培养瓶、细胞培养板等产品购自 Corning 公司。

1.2 BV-2 细胞的培养

细胞复苏后培养于 Corning T25 培养瓶，培养液为 DMEM+10% FBS+1%双抗，接种于培养瓶 48 h 后更换新的培养基，24 h 后胰酶消化传代。培养条件：5% CO₂、95%空气，37 °C 饱和湿度。

1.3 实验分组

丹红注射液用 DMEM 分别稀释 200、500、1 000 倍，得各稀释液；丹红注射液醋酸乙酯萃取物和水萃取物均用二甲亚砜 (DMSO) 制备 10 μg/mL 溶液；丹红注射液中单体成分丹酚酸 A、丹酚酸 C、紫草酸、迷迭香酸、原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸均用 DMSO 配制成 10 μmol/L 的溶液。

1.4 Griess 法检测 NO

不同受试药预处理小胶质细胞 0.5 h 后，加入 0.1 μg/mL LPS，受试药和 LPS 共同孵育 24 h 后 Griess 法检测 NO 的含量。取 50 μL 细胞培养上清加入 96 孔平底酶标板中，按照 NO 试剂盒操作方法加入试剂，室温避光孵育 10 min，酶标仪 540 nm 波长处读取吸光度 (A) 值，依照公式 $C = (A - 0.057) / 0.0067$ 计算 NO 的浓度 (μmol/L)。

1.5 数据分析

所有实验每次单独进行统计分析 (n=6)，独立重复 3 次。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.5 软件进行数据处理，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

LPS 处理小胶质细胞 24 h 后，与对照组相比，细胞培养液中 NO 的水平显著升高近 3 倍以上 (P < 0.001)，说明 LPS 诱导的小鼠小胶质细胞株 BV-2 细胞炎症模型建立成功。与 LPS 组比较，丹红注射液的水提物 (10 μg/mL)、丹酚酸 A (10 μmol/L) 可以显著抑制 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的分泌；丹红注射液的稀释液、醋酸乙酯提取物 (10 μg/mL) 以及其他单体成分 (10 μmol/L) 对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的产生没有抑制作用。见表 1~3。

3 讨论

小胶质细胞主要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

表 1 丹红注射液对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的分泌的作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Danhong Injection on NO excretion in LPS-induced microglia ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	NO/(μmol·L ⁻¹)
对照	0.89 ± 0.23
LPS	33.88 ± 1.31***
LPS+丹红注射液 (稀释 1 000 倍)	35.43 ± 1.80
LPS+丹红注射液 (稀释 500 倍)	34.52 ± 6.25
LPS+丹红注射液 (稀释 200 倍)	34.86 ± 0.81

与对照组比较: ***P < 0.001

***P < 0.001 vs control group

表 2 丹红注射液萃取物对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Danhong Injection extract on NO excretion in LPS-induced microglia ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	NO/(μmol·L ⁻¹)
对照	3.19 ± 0.58
LPS	17.49 ± 2.04***
LPS+丹红注射液水萃取物 (10 μg/mL)	12.35 ± 1.11 [△]
LPS+丹红注射液醋酸乙酯萃取物 (10 μg/mL)	17.01 ± 2.52

与对照组比较: ***P < 0.001; 与 LPS 组比较: [△]P < 0.05

***P < 0.001 vs control group; [△]P < 0.05 vs LPS group

表 3 丹红注射液中单体成分对 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of monomer compounds in Danhong Injection on NO excretion in LPS-induced microglia ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	NO/(μmol·L ⁻¹)
对照	0.94 ± 0.68
LPS	23.80 ± 1.22***
LPS+10 μL 丹酚酸 A	15.65 ± 2.19 ^{△△}
LPS+10 μL 丹酚酸 C	24.78 ± 1.97
LPS+10 μL 紫草酸	22.10 ± 2.33
LPS+10 μL 迷迭香酸	24.23 ± 1.91
LPS+10 μL 原儿茶醛	20.44 ± 3.73
LPS+10 μL 原儿茶酸	21.69 ± 1.20
LPS+10 μL 咖啡酸	23.76 ± 2.84

与对照组比较: ***P < 0.001; 与 LPS 组比较: ^{△△}P < 0.01

***P < 0.001 vs control group; ^{△△}P < 0.01 vs LPS group

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。当神经退行性疾病和脑损伤发生时,小胶质细胞会过度活化,释放大量的炎症因子引起神经系统的病理变化,损伤神经元的正常功能,从而促进疾病的恶化^[6-7]。

丹红注射液是丹参、红花按科学配方提取的复方制剂,用于瘀血闭阻所致的胸痹及中风,还可用于治疗缺血性脑病、脑血栓^[8-9]。研究表明,丹红注射液对治疗心脑血管疾病有重要意义,但大多进行的都是临床试验和在体动物研究^[10-13],尤其是关于丹红注射液治疗脑缺血等疾病的研究在体实验居多^[14-16],关于细胞水平的机制研究则很少。本研究主要通过考察丹红注射液(不同稀释倍数、萃取物以及不同单体成分)对LPS诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用,探究丹红注射液的神经保护作用。结果表明丹红注射液的水提物以及部分单体成分可以显著地抑制LPS诱导的小胶质细胞的NO的分泌,这表明丹红注射液可以通过抑制小胶质细胞的活化来发挥其神经保护作用。这为丹红注射液用于治疗中风、缺血性脑病以及脑血栓提供实验支持。因此丹红注射液单体成分抑制激活小胶质细胞NO的产生可能是丹红注射液神经保护作用的机制之一。

参考文献

[1] Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, et al. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 202(1/2): 13-23.

[2] Giovannini M G, 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): 257-274.

[3] van Rossum D, Hanisch U K. Microglia [J]. *Metab Brain Dis*, 2004, 19(3/4): 393-411.

[4] 韩素环. 丹红注射液治疗脑卒中恢复期瘀血闭阻证的疗效观察 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(6): 461-462.

[5] 王 溯, 夏俊杰. 大剂量丹红注射液促进急性脑梗死大鼠运动功能改善的研究 [J]. *继续医学教育*, 2010(4): 64-66.

[6] Jung J S, Shin K O, Lee Y M, et al. Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(6): 1016-1026.

[7] Matsushita Y, Omotuyi I O, Mukae T, et al. Microglia activation precedes the anti-opioid bdnf and nmda receptor mechanisms underlying morphine analgesic tolerance [J]. *Curr Pharm Des*, 2013. [Epub ahead of print].

[8] 李伟伟, 王鸣池, 于盼盼, 等. 丹红注射液联合消栓通络胶囊治疗脑梗死临床研究 [J]. *中医学报*, 2013(1): 108-109.

[9] 张伟丹, 王吉凤. 丹红注射液治疗急性脑梗死的近期疗效观察 [J]. *中国现代药物应用*, 2011, 5(6): 14-15.

[10] 董立丽. 丹红注射液的临床应用进展 [J]. *海南医学*, 2010, 21 (2): 115-117.

[11] 席晓华, 赵满荣, 史万英. 丹红注射液对糖尿病并心脑血管疾病患者内皮功能的影响 [J]. *河北中医*, 2007, 29(9): 833-834.

[12] 李中心, 袁义伦, 蒋振营, 等. 丹红注射液治疗老年骨折患者的疗效观察 [J]. *医药论坛杂志*, 2010(11): 100-101.

[13] 王小平, 刘 峰, 杨东华, 等. HPLC-MS法测定大鼠注射丹红注射液后血浆中3种酚酸类成分 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 275-278.

[14] 韩永鹏, 安 芸. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(5): 388-390.

[15] 陈 琳, 梁江红. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后TGF-β₁表达的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(1): 59-61.

[16] 米秀娟, 李光勤. 丹红注射液对局灶性脑缺血大鼠神经功能恢复的影响及其机制研究 [J]. *中国全科医学*, 2010, 13(8): 870-873.