

脑心通胶囊对缺糖缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用及其机制

王海燕, 周惠芬, 何 昱, 杨洁红, 虞 立, 李 畅, 万海同*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: **目的** 探讨脑心通胶囊(NXT)对乳鼠缺糖缺氧损伤脑微血管内皮细胞(rBMECs)的体外保护作用及其机制。**方法** 原代培养 rBMECs, 进行兔抗鼠 VIII 因子鉴定, MTT 筛选出 NXT 肠吸收液体外保护 rBMECs 的质量浓度范围, 优选出 3 个质量浓度进行实验。实验设对照组、模型组、尼莫地平(200 $\mu\text{g/mL}$)组、不同质量浓度(62.50、125.00、250.00 mg/L) NXT 肠吸收液组、NXT 肠吸收液(250.00 mg/L)和 LY294002(20 $\mu\text{mol/L}$, PI3K/Akt 通路抑制剂)共作用组。倒置显微镜下观察 rBMECs 形态, 按照 ELISA 试剂盒方法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达水平, Hoechst33342 染色荧光显微镜观察细胞凋亡情况, 流式细胞仪检测各组 rBMECs 的早期凋亡率, Western blotting 法检测 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白的表达情况。**结果** 与模型组相比, NXT 不同质量浓度给药组均能显著改善 rBMECs 的形态, 降低细胞上清液中 LDH、MMP-9 的量, 显著降低 rBMECs 的凋亡数和早期凋亡率, 可显著抑制 PI3K/Akt 通路中 p-Akt、Bcl-2 的表达上调及 Bax 的表达下降, 抑制 Caspase-3 活性。PI3K/Akt 信号通路的特异性抑制剂 LY294002 的加入, 阻断了该通路信号的传导, 显著降低了 NXT 的保护作用。**结论** NXT 对缺糖缺氧致 rBMECs 损伤具有抗凋亡保护作用, 其作用机制与 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 脑心通胶囊; 脑微血管内皮细胞; 缺糖缺氧损伤; 凋亡; PI3K/Akt

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3318-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.018

Protective effects and mechanism of Naoxintong Capsules on rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs) induced by oxygen-glucose deprivation

WANG Hai-yan, ZHOU Hui-fen, HE Yu, YANG Jie-hong, YU Li, LI Chang, WAN Hai-tong

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects and mechanism of Naoxintong Capsules (NXT) on primary cultured neonate rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs) induced by oxygen-glucose deprivation. **Methods** The primary cultured rBMECs model was established and the identification of rabbit anti-rat VIII factor was carried out. MTT was used to screen out the concentration range of NXT intestinal absorption solution to protect rBMEC *in vitro*, three doses were selected for experiment. The experimental groups were divided into control group, model group, nimodipine group (200 $\mu\text{g/mL}$, NXT intestinal absorption solution group (62.50 mg/L, 125.00 mg/L, and 250.00 mg/L), and NXT intestinal absorption solution (250.00 mg/L) and LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$, PI3K/Akt pathway inhibitor) co-administration group. The morphology of rBMECs was observed under inverted microscope. The expression of lactate dehydrogenase (LDH) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the cell supernatant was detected by ELISA kit. The apoptosis was observed by Hoechst33342 staining fluorescence microscope. The early apoptotic rate of rBMECs in each group was detected by FCM, and the expression of PI3K/Akt signaling pathway key proteins was detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the administration of NXT could significantly improve the morphology of rBMECs, decrease the intracellular levels of LDH and MMP-9, significantly reduce the number of apoptotic cells and early apoptotic rate of rBMECs, and inhibit the expression of p-Akt, Bcl-2 upregulation, decrease the expression of Bax, and inhibit caspase-3 activity. The addition of LY294002, a specific inhibitor of PI3K/Akt signaling pathway, blocked the signal transduction of this pathway and significantly reduced the protective effect of NXT. **Conclusion** NXT have protective effects on rBMECs induced by oxygen-glucose deprivation, and its mechanism is related to the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Naoxintong Capsules; rat brain microvascular endothelial cells; oxygen-glucose deprivation; apoptosis; PI3K/Akt

收稿日期: 2017-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81630105); 浙江省自然科学基金项目(LZ17H270001, LZ18H270001); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目资助

作者简介: 王海燕(1992—), 女, 山东滨州人, 主要从事中药药理及药动学研究。E-mail: 13735438021@163.com

***通信作者** 万海同 Tel: (0571)86613711 E-mail: whtong@126.com

缺血性脑损伤是最常见的脑血管疾病,主要以葡萄糖代谢紊乱和脑细胞供氧不足为特征,最终导致血液循环受阻,危害人类身体健康^[1]。在缺血性脑损伤的病理生理过程中,细胞的坏死或程序性凋亡是导致机体内环境紊乱的关键环节^[2],因此,抗细胞凋亡已经成为治疗缺血性脑损伤的一个重要靶点。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)主要参与调节多种细胞的周期、存活以及凋亡过程,其与缺血性脑损伤关系密切,机体的损伤会促进其通路关键蛋白 Akt 的活化,对促进细胞存活和抑制细胞凋亡发挥着关键作用^[3]。PI3K/Akt 这一信号通路对探究脑缺血疾病的发生机制意义重大。

脑心通胶囊(NXT)是由黄芪、丹参、川芎、赤芍、当归等十余种中药配成的复方,其中以黄芪益气以助血运,辅以丹参、当归等逐瘀散结、行气通络^[4]。大量临床研究表明,NXT 在治疗气虚血瘀、溶解血栓以及改善脑部供血障碍方面有显著的疗效^[5-6]。但对其抗缺血性脑损伤作用机制的报道相对较少。本实验采用原代培养乳鼠脑微血管内皮细胞(rat brain microvascular endothelial cells, rBMECs),建立缺糖缺氧损伤模型,在细胞水平上探讨 NXT 对 rBMECs 的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠,雄性,体质量(260±10)g;SD 乳鼠,雌雄共用,3~5 日龄,均由浙江省医学科学研究院提供,许可证号 SCXK(浙)2014-0001。

1.2 药品与试剂

NXT(陕西步长制药有限公司,批号 170322,规格为每粒 0.4 g);尼莫地平注射液(拜耳医药保健公司,批号 BXHJXB1,规格:50 mL,10 mg);DMEM 高糖培养液(吉诺生物医药技术有限公司);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、II 型胶原酶、PBS 缓冲液、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物技术有限公司);大鼠基质金属蛋白酶 9(MMP-9)ELISA 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司);FITC 标记山羊抗兔 IgG、碘化丙锭(PI)、Folin-酚试剂、兔抗鼠 VIII 因子相关抗原抗体、Hoechst33342 染色液(上海碧云天生物技术研究);0.25% Trypsin & 0.02% EDTA(吉诺生物医药技术有限公司);FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国);其余试剂均为市售分析纯。PI3K 抑制剂 LY294002

(MCE 公司,批号 154447-36-6)。

1.3 主要仪器

DMI4000B 荧光倒置显微镜(德国徕卡公司);E34297300505 流式细胞仪(BD 公司,美国);LDZ5-2 型低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);Molecular Devices Spectra-MAX Plus 384 酶标仪(MD 公司,美国);3111CO2 细胞培养箱(Thermo 公司,美国);Hoefer 电泳仪(Amersham Biosciences 公司);凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司);SX-500 高压灭菌锅(Tomy 公司,日本);6、12、96 孔细胞培养板、25 cm² 细胞培养瓶(Corning 公司,美国);Eppendorf 移液枪;自制缺氧盒。

2 方法

2.1 rBMECs 的原代培养^[7]

取 10 只 3~5 日龄的 SD 乳鼠,脱颈椎处死,于盛有 75%乙醇的烧杯内浸泡 3 min,取出脑组织放入预冷的 PBS 中,分离大脑皮质,剪成 1 mm³ 大小的组织碎块,转移到 15 mL 离心管中,加入胰酶,放入培养箱中消化 20 min(每隔 5 min 轻摇 1 次),终止消化(10% FBS 的 DMEM 高糖培养基),80 目和 200 目筛网过筛,收集滤液置于离心管中,1 000 r/min 离心 6 min,弃上清液,加入适量 0.1% II 型胶原酶,培养箱孵育 15 min 后终止消化,离心,细胞悬液以 1×10⁶ 个/mL 的密度接种于细胞培养瓶中,于培养箱中培养。3 d 全量换液 1 次,以后每隔 2 d 半量换液,待其长成铺路石状致密单层时进行传代培养,3~4 代的细胞可用于后续实验。

2.2 rBMECs 的鉴定^[8]

待 rBMECs 长成铺路石状致密单层时,用 95% 冷乙醇固定 5 min, PBS 洗 3 遍,吸干,50 μg/mL PI 染料和稀释 10 倍的兔抗鼠第 VIII 因子抗体加入细胞,37 °C 湿盒反应 30 min, PBS 洗去未结合的抗体,再滴加羊抗兔 IgG-FITC 的二抗进行湿盒反应 30 min, PBS 漂洗,以只加二抗和 PI 处理的细胞作为阴性对照,缓冲甘油封片后于倒置荧光显微镜下观察,拍照并保存。

2.3 NXT 供试药液和肠吸收液的制备^[9-10]

称取 NXT 胶囊内容物粉末 300 g,加 6 000 mL 95%乙醇,加热回流,抽滤,滤液定容至 6 000 mL,旋转蒸发仪蒸发至干,加 1 800 mL Tyrode 缓冲液,超声使其复溶,得到 NXT 供试药液(NXT 供试药液中含有芍药苷 449.19 mg/L、阿魏酸 34.57 mg/L、

丹酚酸 B 136.69 mg/L、羟基红花黄色素 A 20.57 mg/L)。SD 大鼠禁食 12 h, 10%水合氯醛 ip 麻醉。将大鼠固定, 打开腹腔, 腹主动脉采血后, 小心剥离大鼠肠管间的肠系膜。剪空肠和回肠各 10 cm 于 37 °C Tyrode 缓冲液中冲洗, 至流出液不再浑浊。将自制硅胶套管插入肠管扎紧, 翻转肠道, 放入 0 °C Tyrode 缓冲液的麦氏浴管中, 同时供应 95% O₂ 和 5% CO₂, 肠管中注入 3 mL Tyrode 缓冲液, 平衡 5 min, 然后将麦氏浴管中 Tyrode 缓冲液换成 NXT 供试药液 20 mL, 180 min 后从肠囊中取样 500 μL, 加入等体积的 Tyrode 缓冲液, -20 °C 保存用于后续实验。

2.4 rBMECs 缺糖缺氧损伤模型的构建^[11]

第 3 代 rBMECs, 以 1×10⁶ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中, 放置细胞培养箱中培养。显微镜下观察到孔板中细胞密度大于 90% 时, 吸出培养液, PBS 洗涤 2~3 次, 加入无糖 Earle's 液。将 6 孔板置于自制缺氧盒中, 充入 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 待缺氧盒内氧气流降到 1% 以下时, 将缺氧盒放回培养箱, 继续培养 4 h, 建立 rBMECs 缺糖缺氧损伤模型。

2.5 给药处理

利用 MTT 法对 NXT 肠吸收液及 PI3K 抑制剂 LY294002 的浓度进行筛选^[12-14], 预试验确定给药浓度。每组设 5 个复孔。对照组每孔加入 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 模型组加入同样体积的无糖 Earle's 液, NXT 治疗组加入不同质量浓度的 NXT 肠吸收液, NXT 肠吸收液和 LY294002 共作用组在 NXT 肠吸收液作用前 12 h, 每孔加入 1 mL LY294002 抑制剂。对照组细胞放回培养箱中培养, 其他各组细胞均按照“2.4”项方法构建 rBMECs 缺糖缺氧损伤模型, 用于后续实验。

2.6 细胞培养液中 LDH 外漏量和 MMP-9 水平的测定

实验设对照组、模型组、尼莫地平 (200 μg/mL) 组、不同质量浓度 (62.50、125.00、250.00 mg/L) NXT 肠吸收液组, 每组设 5 个复孔。取 6 孔板中各组 rBMECs 上清液于 EP 管中, -20 °C 保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算 LDH 外漏量和 MMP-9 水平。

2.7 Hoechst33342 染色荧光显微镜观察细胞凋亡情况

将培养的第 3 代 rBMECs 传代于已放置载玻片的 24 孔板内, 待细胞长成致密单层后, 弃培养液,

用 PBS 漂洗 2 次。分组及给药方法同“2.6”项, 除对照组外, 其他各组细胞按照“2.4”项方法构建 rBMECs 缺糖缺氧损伤模型, 吸弃细胞培养液, 4% 的福尔马林缓冲液固定 10 min, PBS 漂洗后, 加染料, 室温孵育 20 min, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.8 流式细胞仪检测 rBMECs 的早期凋亡率

细胞分组及给药方法同“2.6”项, 弃 6 孔板中培养液, PBS 漂洗 2 次, 胰酶消化并收集各组细胞, 预冷 PBS 洗 2 次, 加入 1×Binding Buffer 缓冲液重悬细胞, 制成密度为 1×10⁶ 个/mL 的细胞悬液。Falcon 试管中依次加入 100 μL 细胞悬液、5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 混匀, 避光孵育 15 min, 再加入 400 μL 1×Binding Buffer 缓冲液。1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 计算早期凋亡率。

2.9 Western blotting 法检测 p-Akt、Akt、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达

实验设对照组、模型组、NXT 肠吸收液 (250 mg/L) 组以及 NXT 肠吸收液 (250 mg/L) 和 LY294002 (20 μmol/L) 共作用组, 每组设 5 个复孔, 药物处理方法同“2.5”项, 造模方法同“2.4”项, 弃 6 孔板中培养液, PBS 洗 2 遍, 每孔加入 150 μL 蛋白裂解液, 冰上迅速震荡, 每 5 分钟 1 次, 用细胞刮刀刮取细胞, 裂解 40 min, 用 200 μL 的枪头 (调至 2/3) 吹打孔内裂解液, 直至不再有黏稠感。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清至新 EP 管中。按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 取 50 μg 总蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至二氟乙烯膜, 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h (4 °C), 一抗 (1:1 000) 孵育过夜, 洗膜后加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, ECL 试剂以 1:1 的比例混合后再孵育 1 min, 保鲜膜包被后再转至 X 线片曝光机内曝光 3 min, 实验用 β-actin 为内参。分别独立重复 6 次, 通过 Bio-Rad 凝胶成像分析系统分析目的蛋白的表达情况。

2.10 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。先对数据进行方差齐性检验, 不同组间比较用单因素方差分析, 若方差齐, 用 LSD 检验; 若方差不齐, 转换数据使之方差齐, 再用同样方法进行分析。

3 结果

3.1 NXT 肠吸收液和抑制剂 LY294002 对 rBMECs 的毒性考察

根据细胞存活率大于 90%, 得出 NXT 肠吸收

液非细胞毒性浓度为 31.25~250.00 mg/L, 最终选择 NXT 肠吸收液 62.50、125.00、250.00 mg/L 及抑制剂 LY294002 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行实验。

3.2 rBMECs 鉴定

阴性对照组 rBMECs 细胞核显示红色荧光 (PI 染色), 但胞质没有绿色荧光。相同条件下, 经过兔抗鼠 VIII 因子及二抗处理的 rBMECs 扫描后发现细胞核出现红色荧光的同时, 细胞质出现强绿色荧光, 表明细胞中含有特异性 VIII 因子。经统计, 大于 95% 的细胞为 rBMECs。结果见图 1。

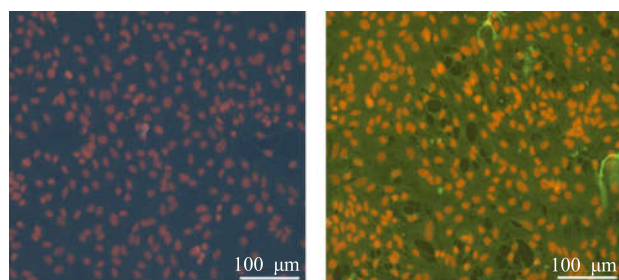


图 1 兔抗鼠 VIII 因子鉴定 rBMECs ($\times 100$)
Fig. 1 Identification of rBMECs by rabbit anti-rat factor VIII ($\times 100$)

3.3 对缺糖缺氧损伤 rBMECs 形态的影响

倒置显微镜下观察各组细胞。对照组的 rBMECs 大多呈短梭形或多角形, 紧密排列成典型的铺路石状; 与对照组相比, 模型组 rBMECs 体积明显皱缩, 胞体折光性显著下降, 胞间间隙变大, 出现大量空泡; 与模型组相比, 尼莫地平和 NXT 不同质量浓度给药组的 rBMECs 形态更饱满, 光晕更明显, 空泡也明显减少, 表明药物治疗有效地减轻了缺糖缺氧对 rBMECs 的损伤, 且有浓度依赖性。结果见图 2。

3.4 对缺糖缺氧损伤 rBMECs LDH 外漏量和 MMP-9 水平的影响

与对照组相比, 模型组中 LDH 释放量显著增加 ($P < 0.01$), 表明缺糖缺氧使细胞膜受损, 通透性增加, 清除氧自由基的能力减弱。与模型组相比, 尼莫地平和 NXT 不同质量浓度给药组均能降低细胞上清液中 LDH 的量, 差异显著 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组 rBMECs 中 MMP-9 的表达显著上调 ($P < 0.01$), 说明细胞外基质的动态平衡被破坏。与模型组相比, 尼莫地平和 NXT 不同质量浓度给药组可以显著下调 MMP-9 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

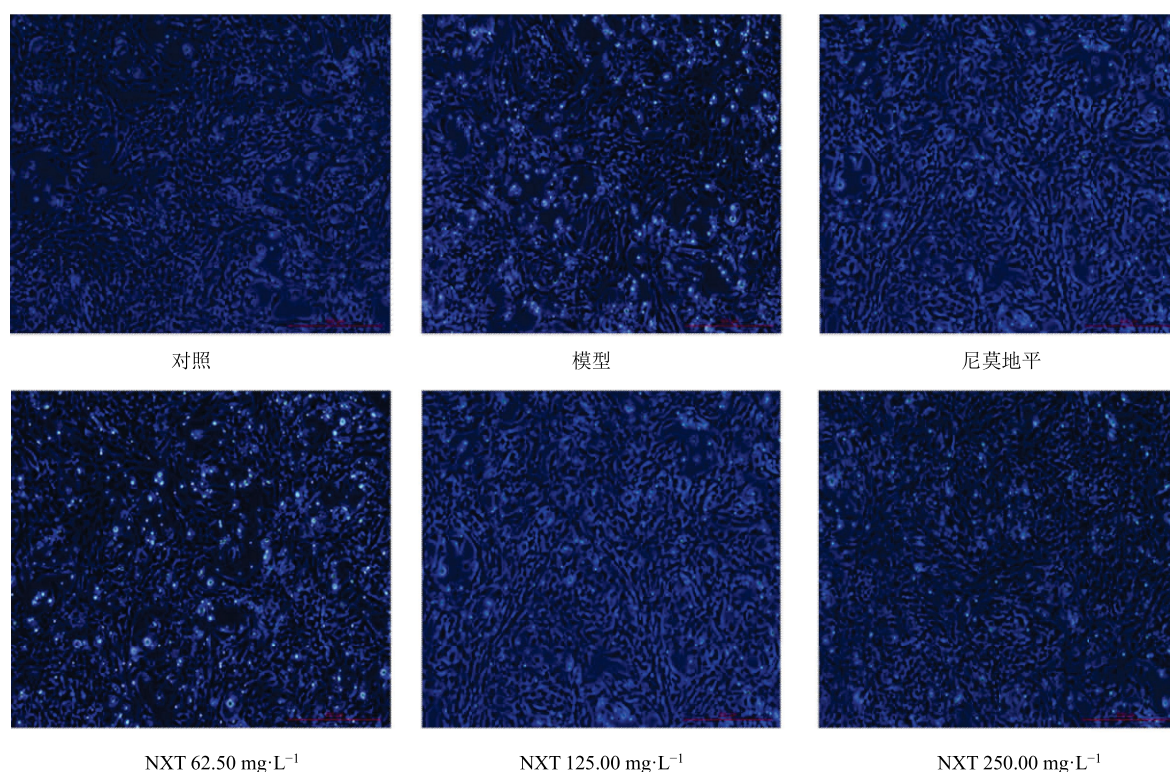


图 2 各组 rBMECs 的形态学观察 ($\times 50$)
Fig. 2 Morphological observation of rBMECs in each group ($\times 50$)

表 1 NXT 对缺糖缺氧损伤的 rBMECs 中 LDH 外漏量和 MMP-9 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of NXT on LDH leakage and MMP-9 level in rBMECs injured by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	LDH/(U·L ⁻¹)	MMP-9/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	35.36 ± 1.21	71.78 ± 3.10
模型	—	71.48 ± 2.35**	96.59 ± 1.52**
尼莫地平	200.00	42.57 ± 4.69 ^{##}	57.47 ± 2.54 ^{##}
NXT	62.50	56.28 ± 2.11 ^{##}	91.10 ± 1.14 [#]
	125.00	43.31 ± 2.33 ^{##}	81.74 ± 4.24 ^{##}
	250.00	37.15 ± 1.15 ^{##}	76.98 ± 3.56 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同
^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.5 对缺糖缺氧损伤 rBMECs Hoechst33342 染色的影响

荧光显微镜下观察 Hoechst33342 染色结果, 凋亡的细胞显示为亮点及细胞核形态的改变, 亮点的数量、体积以及细胞核形态改变的程度与细胞凋亡的程度呈正相关关系。结果可见, 对照组细胞呈淡蓝色, 伴有极少量的亮点, 细胞核完整, 大多呈规则的圆形。缺糖缺氧损伤的模型组 rBMECs 出现大量亮点, 且细胞核大多呈现皱缩状态及碎块状致密浓染, 细胞凋亡严重。较模型组而言, 尼莫地平组细胞状态明显改善, 不同质量浓度的 NXT 给药组中碎片状亮蓝色荧光也不同程度的减少, 细胞核轮廓明显变清晰且规则, 以高质量浓度 NXT 给药组最显著。结果见图 3。

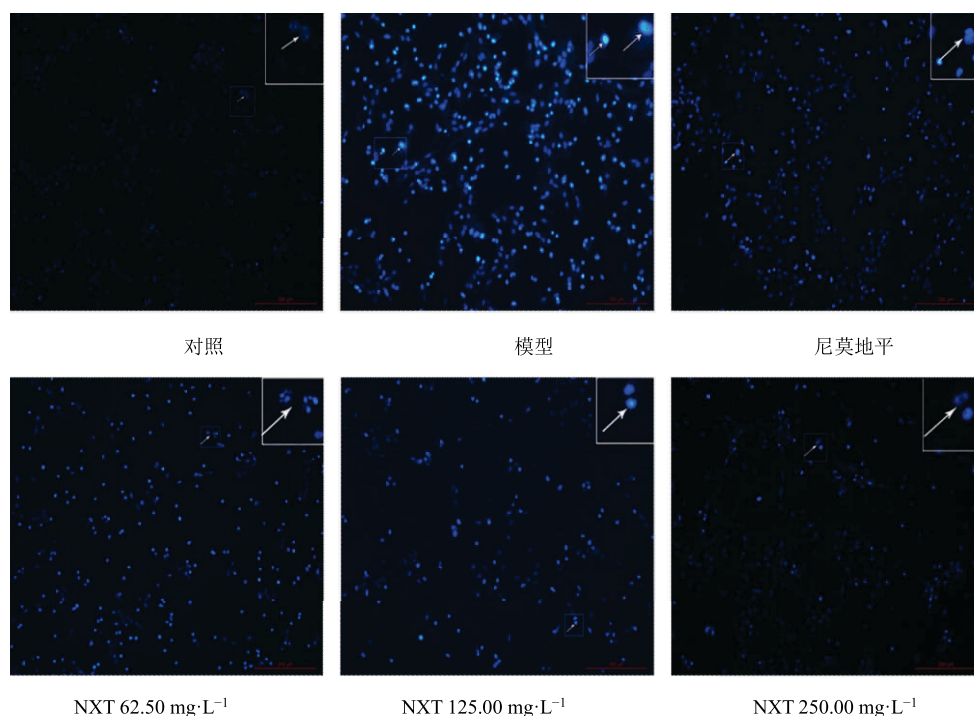


图 3 Hoechst 染色后各组 rBMECs 的凋亡情况 ($\times 100$)

Fig. 3 Apoptosis of rBMECs in each group after Hoechst staining ($\times 100$)

3.6 对缺糖缺氧致损伤 rBMECs 早期凋亡率的影响

与对照组相比, 模型组 rBMECs 的早期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 尼莫地平组和 NXT 不同质量浓度给药组 rBMECs 的早期凋亡率显著下降 ($P < 0.01$)。表明 NXT 可以明显抑制缺糖缺氧损伤造成的 rBMECs 早期凋亡进程, 减少细胞凋亡数, 且呈现浓度依赖性。结果见表 2 和图 4。

3.7 对缺糖缺氧致损伤的 rBMECs p-Akt、Akt、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组 p-Akt/Akt、Bax 和

表 2 NXT 对缺糖缺氧损伤的 rBMECs 早期凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of NXT on early apoptosis of rBMECs induced by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	早期凋亡率/%
对照	—	5.61 ± 2.09
模型	—	59.77 ± 3.80**
尼莫地平	200.00	26.13 ± 4.98 ^{##}
NXT	62.50	37.80 ± 3.22 ^{##}
	125.00	34.42 ± 3.88 ^{##}
	250.00	23.67 ± 2.34 ^{##}

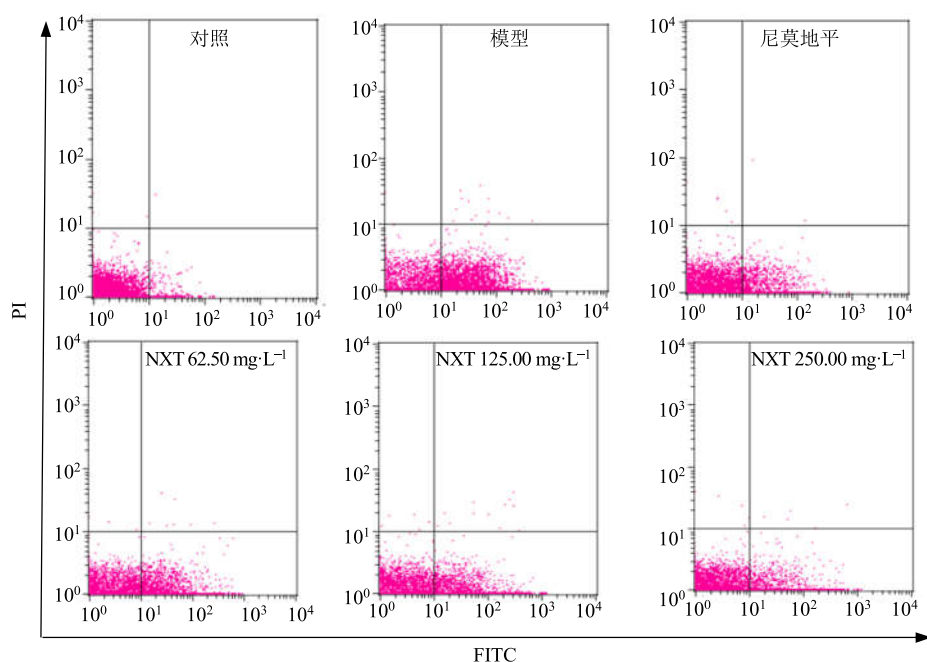


图 4 NXT 对缺糖缺氧损伤的 rBMECs 早期凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of NXT on early apoptosis of rBMECs induced by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Caspase-3 蛋白的表达均显著升高, Bcl-2 的表达显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组相比, NXT 给药组可以显著提高 p-Akt/Akt 和 Bcl-2 的表达, Bax 和 Caspase-3 蛋白也有显著性下降 ($P < 0.01$)。表明 NXT 可以显著促进缺糖缺氧损伤 rBMECs 中 Akt 的磷酸化水平, 抑制促凋亡基因的表达。而 PI3K/Akt 通路特异性抑制剂 LY294002 的加入, 使 NXT 对 rBMECs 的保护作用受到抑制, p-Akt/Akt 和 Bcl-2 的表达显著下降, Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达显著提高 ($P < 0.01$)。结果见图 5。

4 讨论

缺血性脑损伤是葡萄糖代谢失调和氧气供应量不足引发的脑细胞损伤, 并逐步导致脑组织破坏, 最终造成脑内微环境紊乱的现象。血脑屏障作为脑内微环境的重要生理屏障, 其主要的结构是 rBMECs, rBMECs 的破坏被认为是常见脑血管疾病的始动和关键环节^[15]。脑损伤发生之后, 脑部微血管挛缩, 内皮细胞体积缩小、胞间间隙变大, 逐渐形成血栓, 进一步加重缺血性损伤, 导致脑细胞的坏死或程序性凋亡。血脑屏障被破坏, 有害物质穿越屏障进入脑部参与血液循环, 造成整个脑部微环境的紊乱。细胞凋亡是受内在遗传机制的控制, 细胞自动结束生命的过程, 在整个脑损伤过程中起关键性作用^[16]。

MMP-9 作为金属蛋白水解酶家族之一, 是降解 IV 型胶原最主要的酶, 在内皮血管生成的早期血管基底膜的降解中起重要作用^[17], 目前认为与脑缺血后造成的血脑屏障损伤关系密切, 抑制 MMP-9 的活性可以在一定程度上减轻血脑屏障损伤, 进一步缓解缺血性脑损伤^[18]。LDH 是一种存在于大多数细胞胞质中的可溶性酶, 脑损伤发生后, 脑细胞受损, 释放出大量 LDH 进入血液循环。培养上清液中 LDH 的活性会随着质膜损伤和凋亡细胞数的增多而变大, 其外漏量可间接反映细胞膜的完整性, 是检测细胞凋亡的一个重要指标^[19]。本实验结果显示, 与模型组相比, NXT 不同质量浓度治疗组均可显著改善缺糖缺氧损伤 rBMECs 的形态, 降低 rBMECs 培养液中 MMP-9 和 LDH 的量, 显著减少细胞凋亡数, 并呈现质量浓度依赖性。表明 NXT 可以抑制缺血性脑损伤后 rBMECs 的凋亡, 对 rBMECs 有显著的保护作用。

PI3K/Akt 是一条与癌症治疗密切相关的信号通路, 临床上已广泛应用并取得不错的效果^[20-21]。近几年研究表明, 在治疗脑缺血损伤等脑部疾病方面, PI3K/Akt 信号通路同样发挥着不可估量的作用。PI3K/Akt 信号通路对细胞有促存活、抗凋亡的作用^[22], 其下游靶激酶 Akt 在 PI3K 被激活之后会迅速发生磷酸化, 活化的 Akt 会调节一系列下游凋亡

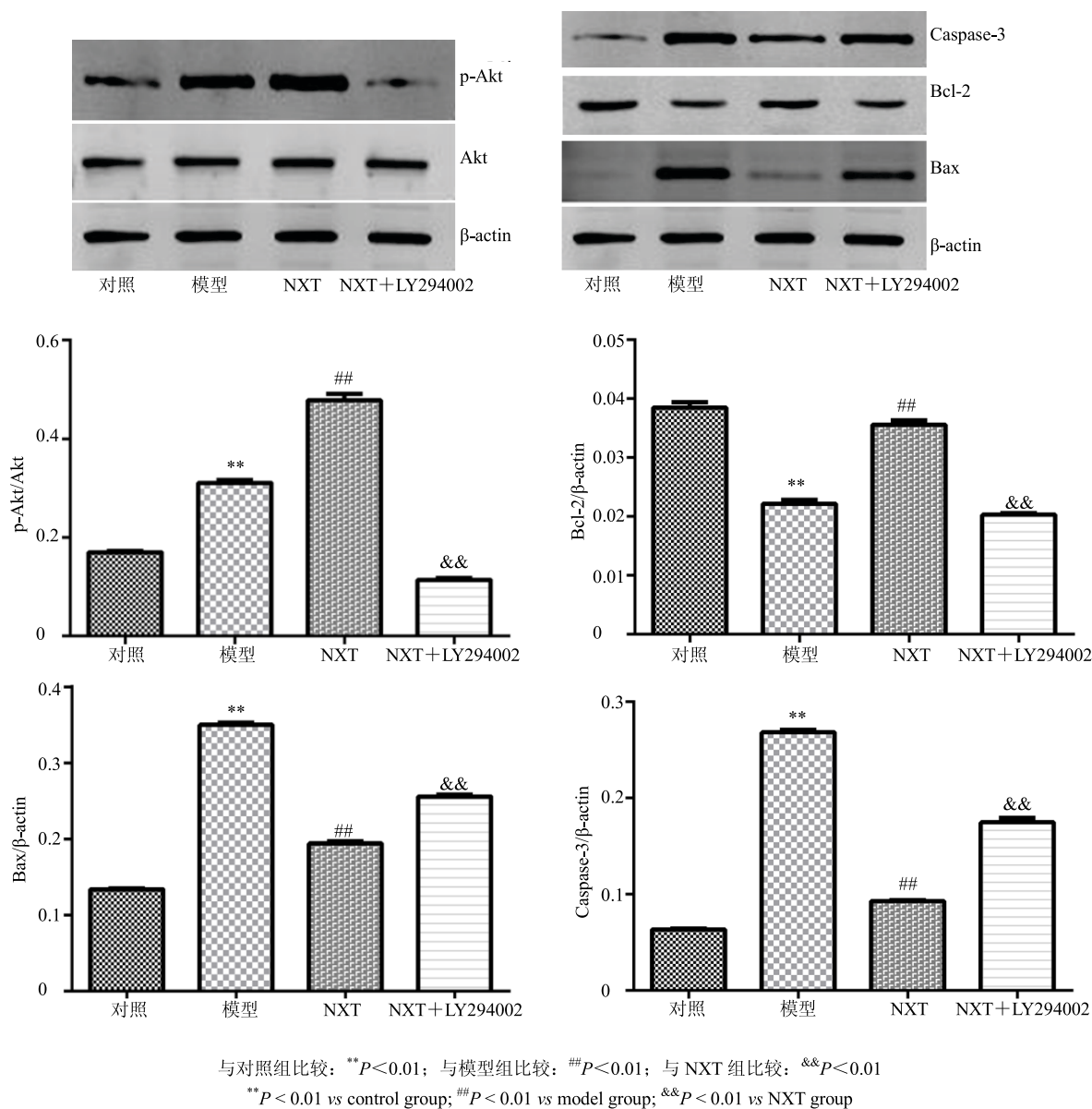


图 5 各组 rBMECs p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Protein expression of p-Akt, Akt, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in rBMECs of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

相关基因: Caspase-3、Bcl-2、Bax 等的表达,从而调节细胞的凋亡进程。LY294002 是 PI3K/Akt 通路的特异性抑制剂,通过抑制 PI3K 的活化来抑制下游蛋白 Akt 的磷酸化,从而阻断 PI3K/Akt 整个通路信号的传导,抑制抗凋亡的发生^[23]。Caspase-3 是 Akt 下游的靶基因, Bcl-2 位于线粒体膜上,是 PI3K/Akt 通路下游的抗凋亡基因,对应的 Bax 是促凋亡基因。研究结果显示, NXT 可显著抑制缺糖缺氧损伤诱导的 p-Akt、Bcl-2 表达上调及 Bax 表达下降,抑制 Caspase-3 活性,但 NXT 和 LY294002 共同干预细胞时, p-Akt、Bcl-2、Bax 以及 Caspase-3 的表达变化明显受到抑制,

NXT 的保护作用不再显著。

综上所述, NXT 可显著改善缺糖缺氧损伤致 rBMECs 的形态破坏,抑制 rBMECs 的凋亡,对 rBMECs 损伤有良好的保护作用。抑制剂 LY294002 通过抑制 Akt 蛋白的磷酸化来阻断 PI3K/Akt 信号通路,显著抑制了 NXT 的保护作用。实验结果表明 NXT 对缺糖缺氧致 rBMECs 损伤具有抗凋亡保护作用,其作用机制与 PI3K/Akt 信号通路有关。

参考文献

- [1] 张学非, 曹泽戎, 许治良, 等. 银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16):

- 2943-2948.
- [2] Imai T, Mishiro K, Takagi T, *et al.* Protective effect of bendavia (SS-31) against oxygen/glucose-deprivation stress-induced mitochondrial damage in human brain microvascular endothelial cells [J]. *Curr Neurovascul Res*, 2017, 14(1): 53-59.
- [3] Cui J, Wang J, Zheng M, *et al.* Ginsenoside Rg₂ protects PC12 cells against β -amyloid25-35-induced apoptosis via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. *Chemico-Biol Inter*, 2017, 275: 152-161.
- [4] Wang Y, Yan X, Mi S, *et al.* Naioxintong attenuates Ischaemia/reperfusion Injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(1): 4-12.
- [5] 薛妍. 脑心通对人脑微血管内皮细胞的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [6] 陈付艳, 田忠惠. 灯银脑通胶囊联合脑心通胶囊治疗脑梗死恢复期的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(1): 38-41.
- [7] 杨珍, 周惠芬, 周鹏, 等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1326-1332.
- [8] 周鹏, 周惠芬, 何昱, 等. 丹红注射液对乳鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2013, 44(19): 2727-2731.
- [9] 黄慧辉, 张小燕, 沈娟, 等. 菝葜抗炎有效部位群在大鼠肠外翻试验中的吸收特性考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 96-99.
- [10] 黄斌, 李耿, 郭宇飞, 等. 脑心通胶囊中4个成分肠吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(6): 889-893.
- [11] 杜成昊, 万海同, 杨洁红, 等. 丹红注射液对缺氧缺糖致乳鼠海马神经元细胞损伤的保护作用 [J]. *中药材*, 2017, 40(1): 198-203.
- [12] 耿亚, 杨洪军, 马月香, 等. 基于“肠外翻-心肌细胞”联用模型的益气活血方药效学作用评价及机制探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(20): 3821-3827.
- [13] 陈晓鹏, 李昂, 褚扬, 等. 养血清脑颗粒中有效成分的肠外翻吸收研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(4): 159-162.
- [14] Wang L Q, He Y, Wan H F, *et al.* Protective mechanisms of hypaconitine and glycyrrhetic acid compatibility in oxygen and glucose deprivation injury [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18(7): 586-596.
- [15] Page S, Munsell A, Alahmad A J. Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junction complexes in stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells [J]. *Fluids Barr CNS*, 2016, 13(1): 16.
- [16] 黄小平, 欧阳国, 丁煌, 等. 黄芪甲苷与三七有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和内质网应激的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2257-2264.
- [17] Ranzato E, Martinotti S, Volante A, *et al.* The major Boswellia serrata, active 3-acetyl/1-keto- β -boswellic acid strengthens interleukin/ α upregulation of matrix metalloproteinase-9 via JNK MAP kinase activation [J]. *Phytomedicine*, 2017, 36(1): 176-182.
- [18] Maghsood F, Mirshafiey A, Farahani M M, *et al.* Dual effects of cell free supernatants from *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG in regulation of MMP-9 by up-regulating TIMP-1 and down-regulating CD147 in PMA differentiated THP-1 cells [J]. *Cell J*, 2018, 19(4): 559-568.
- [19] Jiang W W, Huang B S, Han Y, *et al.* Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats [J]. *Febs Open Biol*, 2017, 7(11): 1686-1695.
- [20] Wei H, Peng Z, Gu J, *et al.* NEDD4-1 protects against ischaemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis via the PI3K/Akt pathway [J]. *Apopt Int J Programmed Cell Death*, 2016, 22(3): 1-12.
- [21] Gan Y, He L, Yao K, *et al.* Knockdown of HMGN5 increases the chemosensitivity of human urothelial bladder cancer cells to cisplatin by targeting PI3K/Akt signaling [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6463-6470.
- [22] 蔡俊, 张继平, 姚晖, 等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(6): 122-126.
- [23] 潘晔, 殷佳, 蔡雪朦, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨中医药治疗冠心病的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 4100-4104.