

灯盏花素对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用

叶立¹, 李建宇², 李月鹏², 顾军^{2*}

1. 天津医科大学总医院, 天津 300052

2. 武警医学院 药物化学教研室, 天津 300162

摘要: 目的 观察灯盏花素对谷氨酸致原代培养的大鼠脑微血管内皮细胞 (rBMECs) 损伤的保护作用。方法 灯盏花素 (200、100、50 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 rBMECs 24 h 后, 加入谷氨酸 (终浓度为 1 mmol/L) 培养 18 h, MTT 法检测 rBMECs 细胞活性, 并按试剂盒方法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平、细胞中丙二醛 (MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。结果 谷氨酸 (1 mmol/L) 使原代培养的 rBMECs 明显受到损伤, 灯盏花素高、中浓度 (200、100 $\mu\text{mol/L}$) 可显著对抗谷氨酸造成的 rBMECs 损伤, 抑制 LDH 释放, 降低 MDA 水平, 增强 SOD 活性。结论 灯盏花素对谷氨酸所致原代培养的 rBMECs 损伤具有明显的保护作用, 其机制与增强细胞抗氧化能力有关。

关键词: 灯盏花素; 谷氨酸; 大鼠脑微血管内皮细胞 (rBMECs); 抗氧化; 乳酸脱氢酶 (LDH)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0955-03

Protection of scutellarin on rat brain microvascular endothelial cells injury

YE Li¹, LI Jian-yu², LI Yue-peng², GU Jun²

1. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Department of Medicinal Chemistry, Medical Collage of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Key words: scutellarin; glutamic acid; rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs); anti-oxidant; lactate dehydrogenase (LDH)

血管内皮细胞自稳态调控失衡和微血管损伤是缺血性损伤的重要发病机制之一。血管内皮细胞具有维持管壁通透性、防止凝血和血栓形成的生理功能, 干预多种与血管有关的生理和病理生理过程^[1-2]。脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) 及其紧密连接是血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的结构基础, 具有与外周血管内皮细胞不同的独有特征, 是研究脑血管疾病的最佳细胞模型。

灯盏花素 (scutellarin), 又称野黄芩苷, 是菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 提取物中的主要成分, 属黄酮类化合物。现代药理实验表明, 灯盏花素具有扩张血管、增加冠脉流量和脑血流量、降低脑血管阻力、提高血脑屏障通透性以及对抗由二磷酸腺苷引起的小板凝集等作用^[3-4]。灯盏花素制剂用于临床已多年, 其中灯盏花素注射剂用于治疗中风、冠心病、心绞痛等疾

病, 是治疗心脑血管疾病, 特别是脑栓塞疾病的较好药物^[5]。但灯盏花素对脑血管内皮细胞是否具有保护作用尚未见报道。本研究采用原代培养的大鼠脑微血管内皮细胞 (rBMECs) 模型, 观察灯盏花素对谷氨酸所致 rBMECs 损伤的保护作用, 并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

灯盏花素 (批号 090801, 南京泽朗医药科技有限公司); 胰蛋白酶 (Difco)、MTT, 北京鼎国生物技术开发中心; DMEM/F-12 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, 中国医学科学院血液病研究所; 胰蛋白酶、胶原酶 II、谷氨酸, Sigma 公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO), Aldrich 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为市售分析纯。灯盏花素用 DMSO 溶解, 配制成 10 mmol/L 母

收稿日期: 2010-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20902110); 天津市自然科学基金资助项目 (10JCYBJC14700); 武警医学院重点课题 (WYZ201101)

作者简介: 叶立 (1966—), 女, 天津人, 副主任药师, 硕士, 研究方向为心脑血管药理。Tel: (022)60363162 E-mail: lilyyeh@126.com

*通讯作者 顾军 Tel: (022)60578187 E-mail: gjonly@eyou.com

液, 加药前用 DMEM/F-12 培养基稀释。

1.2 动物

SD 大鼠, 雌雄兼用, 7~10 日龄, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCK- (军) 2002-001。

1.3 主要仪器

SW—CJ—1F 医用型超净工作台, Forma 3111 CO₂ 培养箱 (美国), Olympus CK—40 倒置相差显微镜、Olympus CH—2 显微镜 (日本), HG303—3A 电热恒温培养箱, LD5—2A 普通离心机, BIORAD 680 酶标仪 (美国), UV—1601 紫外可见分光光度计 (日本岛津), SH—5 加热磁力搅拌器 (北京金北德工贸有限公司), FA2004 电子天平 (上海精科天平), Mias 2000 图像分析系统 (四川大学), CYS—1 型数字式测氧仪 (北京中仪器材)。

2 方法

2.1 rBMECs 的分离与原代培养^[6]

6 只 7~10 日龄 SD 大鼠, 雌雄兼用, 脱颈处死, 置 75% 冰乙醇中浸泡 3~5 min 后, 于超净工作台无菌条件下, 沿大鼠脑正中中线剪开颅骨, 剔除硬脑膜, 取出大脑半球, 去除小脑和脑干。将取出的脑组织立即放入盛有冰磷酸缓冲液 (PBS) 的培养皿中, 尽量去除软脑膜、大血管、白质组织, 剪碎至 1 mm³ (以上操作在冰板上进行)。剪碎的灰质组织用 PBS 液漂洗 3 次, 再用 0.05% 胰蛋白酶 (pH 7.8) 37 °C 消化 25 min, 5 min 摇 1 次, 加入含有小牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化, 吹打混匀, 依次通过 100、200 目的尼龙筛滤过, 收集 200 目尼龙筛上细胞团块, 1 000 r/min 离心 5 min。将沉淀复悬于 0.1% 胶原酶 II 溶液中, 吹打混匀, 37 °C 消化 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min。将下层沉淀用培养基漂洗 1 次, 再次离心, 沉淀用培养基悬浮, 接种至细胞培养瓶中, 静置培养 (37 °C、5% CO₂) 4 d 后换液, 可见梭形贴壁细胞。以后每 2 天换液 1 次, 约 14 d 细胞铺满培养瓶, 可进行传代培养。取传至 2 代的细胞用于实验。用培养基将传至第 2 代的 rBMECs 调至 1×10⁵/mL, 1 000 μL/孔, 接种至 24 孔板上, 置 5% CO₂ 培养箱中于 37 °C 培养, 每 2 天换液 1 次, 直至细胞长成致密单层后用于以下实验。

2.2 分组与给药

取 10 mmol/L 灯盏花素溶液, 用无血清 DMEM/F-12 液稀释至终浓度分别为 200、100、50 μmol/L

的含药培养基。取长成致密单层的 rBMECs, 分为对照组、模型组和灯盏花素高、中、低浓度 (200、100、50 μmol/L) 组, 每组 3 个复孔。给药前轻轻吸去 24 孔板中的培养基, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用含药培养基继续培养。24 h 后, 将谷氨酸直接加入培养板中 (终浓度为 1 mmol/L), 对照组加入等体积的培养基, 于培养箱中培养 30 min 后将培养基完全去除, 用 PBS 洗涤 2 次, 再恢复正常培养基, 继续培养 18 h 后进行检测。

2.3 MTT 法检测细胞存活情况

吸去 24 孔板内培养基, 加入无血清培养基 450 μL, 每孔中再加入 MTT 溶液 (5 g/L) 50 μL, 摇床内 37 °C 温孵 4 h, 吸去含 MTT 的培养基, 每孔加入 DMSO 液 200 μL, 温孵 10 min, 每孔取 150 μL 移至 96 孔板中, 用酶标仪于 570~690 nm 检测各孔的吸光度 (*A*) 值。

2.4 LDH 的测定

取各组细胞培养上清液 10 μL, 按说明书操作, 在 490 nm 测定 *A* 值。

2.5 SOD 活性及 MDA 水平的测定

造模后, 去除培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液振荡, 使细胞裂解, 收集裂解液, 按试剂盒说明书方法测定 SOD 活性及 MDA 水平。

2.6 统计学处理

数据用 SPSS 13.0 统计软件处理, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对谷氨酸损伤的大鼠 rBMECs 存活情况的影响

预试验结果显示, 灯盏花素 100~500 μmol/L 无明显的细胞毒作用, 确定灯盏花素作用浓度为 200、100、50 μmol/L。

MTT 结果显示, 1 mmol/L 谷氨酸引起细胞损伤 ($P < 0.01$), 灯盏花素 200、100 μmol/L 均能明显对抗谷氨酸对 rBMECs 的损伤作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 而灯盏花素 50 μmol/L 未见明显的保护作用 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

3.2 对谷氨酸损伤的大鼠 rBMECs 释放 LDH 的影响

表 1 结果显示, 1 mmol/L 谷氨酸促进细胞 LDH 的释放 ($P < 0.01$), 表明细胞膜受到了明显的损伤, 通透性增加。灯盏花素 200、100 μmol/L 均能明显抑制细胞上清液中 LDH 的增加 ($P < 0.01$), 灯盏花素 50 μmol/L 组也有一定的抑制作用 ($P < 0.05$)。

表1 灯盏花素对谷氨酸损伤的 rBMECs 细胞存活、LDH 释放、SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 1 Effect of breviscapine on cell survival, leakage of LDH, SOD activity, and MDA level in rBMECs injured by glutamic acid ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A	LDH/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	$1.03 \pm 0.05^{**}$	$58.90 \pm 6.19^{**}$	$73.63 \pm 6.40^{**}$	$3.03 \pm 0.55^{**}$
模型	—	0.52 ± 0.04	94.03 ± 9.80	38.74 ± 3.85	7.52 ± 0.74
灯盏花素	200	$0.84 \pm 0.09^{**}$	$65.84 \pm 6.41^{**}$	$68.41 \pm 6.99^{**}$	$4.52 \pm 0.94^{**}$
	100	$0.75 \pm 0.05^{*}$	$70.87 \pm 8.26^{**}$	$60.21 \pm 5.41^{**}$	$4.90 \pm 1.05^{*}$
	50	0.69 ± 0.12	$78.64 \pm 6.75^{*}$	45.50 ± 4.48	5.97 ± 1.22

与模型组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group

3.3 对谷氨酸损伤的大鼠 rBMECs 的 SOD 活性和 MDA 水平的影响

表1结果显示, 1 mmol/L 谷氨酸造成细胞内 SOD 活性降低、MDA 水平明显增加 ($P<0.01$), 说明 rBMECs 清除氧自由基的能力下降。灯盏花素 200 $\mu\text{mol/L}$ 能明显增强细胞内 SOD 的活性、降低细胞内 MDA 水平 ($P<0.01$), 灯盏花素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时也可明显增加 SOD 活性 ($P<0.01$)、降低 MDA 水平 ($P<0.05$), 而浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时未见明显作用 ($P>0.05$)。

4 讨论

BBB 在维持大脑内环境 and 功能方面起着极其重要的作用, BBB 的破坏是缺血-再灌注损伤性脑病发生的重要病理生理基础。减轻脑缺血-再灌注后 BBB 的损伤可能是防治脑血管疾病继发性脑损伤的重要手段, 也是研究和开发脑保护药物的主要靶点^[7]。

谷氨酸是中枢神经系统中的兴奋性氨基酸, 在脑内的浓度相当高。脑缺血时, 大量的谷氨酸释放到细胞外。谷氨酸过度兴奋其特异性受体可导致钙大量内流和一系列生化改变, 如线粒体钙超载和线粒体膜去极化。细胞内 Ca^{2+} 超载导致一系列的毒性反应, 如激活 Ca^{2+} 依赖性酶, 触发花生四烯酸代谢瀑布、黄嘌呤氧化酶系活化, 产生活性氧自由基, 造成细胞损伤。活性氧自由基可抑制谷氨酸转运体的功能, 加剧胞外谷氨酸的堆积, 增强谷氨酸的毒性作用, 形成恶性循环^[8]。本实验结果表明, 灯盏花素对由谷氨酸所致 rBMECs 损伤具有保护作用。MTT 检测结果显示, 灯盏花素能够提高细胞活性, 减轻细胞损伤。

缺血和缺氧同时发生时, Ca^{2+} 大量内流引起脑细胞损伤, BBB 破坏, 激活一系列的酶促反应, 造成细胞内 LDH 大量外释, 并且诱导脑细胞的进一步损伤, 通过细胞上清液中 LDH 水平的测定, 可

以反映细胞膜的通透性和完整性^[9]。本研究结果表明, 灯盏花素能明显抑制细胞上清液中 LDH 的增加, 很好地保护了细胞膜的稳定性。本实验结果还表明灯盏花素能够增加细胞内 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 改善能量代谢。

综上所述, 灯盏花素对由谷氨酸所致大鼠 rBMECs 损伤具有明显保护作用, 其机制可能与减少氧自由基生成, 提高细胞对氧自由基的清除能力及维持内皮功能有关。

参考文献

- [1] Hawkins B T, Davis T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2): 173-177.
- [2] 王维亭, 徐向伟, 何小云, 等. 内皮损伤引起血小板沉积测定方法的建立与应用 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 101-103.
- [3] 杨莉. 灯盏花制剂的临床应用 [J]. *四川中医*, 2007, 25(3): 40-42.
- [4] 石森林, 张韩清, 储利胜, 等. 灯盏花素不同途径给药对大鼠实验性脑缺血防治作用的比较研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(2): 274-275.
- [5] 裘晓华. 灯盏花素注射液治疗急性脑梗死 55 例临床观察 [J]. *中草药*, 2000, 31(9): 696.
- [6] 孙文萍, 汤雪晴. 大鼠脑微血管内皮细胞的培养与鉴定 [J]. *医学综述*, 2008, 14(23): 3660-3662.
- [7] Fujimura M, Gache Y, Fujimura M Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Brain Res*, 1999, 842(1): 92-100.
- [8] 赵冬梅, 黄飞, 张璐萍, 等. 神经生长因子对谷氨酸介导的基底核神经元损伤的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2008, 24(1): 76-80.
- [9] Kristian T, Siesjö B K. Calcium-related damage in ischemia [J]. *Life Sci*, 1996, 59(5): 357-367.