

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

周 鹏¹, 周惠芬¹, 何 昱¹, 张宇燕¹, 杨洁红¹, 赵 涛², 付 巍², 邢攀科², 万海同^{1*}

1. 浙江中医药大学 心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053

2. 山东步长制药有限公司, 山东 菏泽 274000

摘 要: **目的** 研究丹红注射液对缺氧致原代培养的乳鼠脑微血管内皮细胞 (rBMECs) 损伤的保护作用。**方法** 原代培养 rBMECs, 并对其进行兔抗鼠 VIII 因子鉴定。实验设对照组, 缺氧模型组, 丹红注射液低、中、高剂量 (25、50、100 $\mu\text{L/mL}$) 组, 给药后, rBMECs 缺氧 4 h。显微镜下观察细胞形态; 流式细胞仪检测细胞凋亡率及 DNA 的量, 按试剂盒方法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平、细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。**结果** 丹红注射液 50、100 $\mu\text{L/mL}$ 可显著对抗缺氧造成的损伤, 明显改善 rBMECs 形态, 使缺氧所致细胞凋亡数明显减少, 有效抑制缺氧诱导的 rBMECs 发生 G₁/S 期阻滞, 抑制 LDH 释放, 增强 SOD 活性。**结论** 丹红注射液对缺氧所致原代培养的 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、抑制细胞凋亡有关。

关键词: 丹红注射液; 乳鼠脑微血管内皮细胞; 缺氧; 抗氧化; 细胞凋亡

中图分类号: R972.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)19-2727-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.018

Protection of Danhong Injection on brain microvascular endothelial cells injury by hypoxia in neonate rats

ZHOU Peng¹, ZHOU Hui-fen¹, HE Yu¹, ZHANG Yu-yan¹, YANG Jie-hong¹, ZHAO Tao², FU Wei², XING Pan-ke², WAN Hai-tong¹

1. Institute of Cardiovascular-Cranial Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Heze Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Heze 274000, China

Abstract: Objective To study the protective effect of Danhong Injection (DI) on primary cultured neonate rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs) injury. **Methods** The primary cultured rBMEC model was established and the identification of rabbit anti rat VIII factor was carried out. The cells were divided into control, model, low-, mid-, and high-dose (25, 50, and 100 $\mu\text{L/mL}$) DI groups in hypoxic condition for 4 h after administration. The cell morphology was observed under microscope, the apoptosis rate and DNA content were determined by flow cytometry, and the lactate dehydrogenase (LDH) level in cultural supernatants and cell superoxide dismutase (SOD) activity were detected according to the kit methods. **Results** DI (50 and 100 $\mu\text{L/mL}$) could alleviate the rBMEC damage induced by hypoxia remarkably, improve the cell morphology of rBMECs, decrease the apoptosis significantly, inhibit the blockage of rBMECs in G₁/S phase and the leakage of LDH, and increase the SOD activity. **Conclusion** DI plays a significant role in the protection on injured primary cultured rBMECs induced by hypoxia, and the mechanism may be related to the enhancement of cellular anti-oxidative capacity and the inhibition of apoptosis.

Key words: Danhong Injection; neonate rat brain microvascular endothelial cells; hypoxia; anti-oxidation; apoptosis

缺血性中风是指血管阻塞引起脑缺血、缺氧损伤进而导致局灶或全脑的功能障碍, 具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高等特点, 是威胁人

类健康的重大疾病之一^[1]。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^[2]。血管

收稿日期: 2013-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173647, 81373898, 81274176); 浙江省自然科学基金资助项目 (LR12H27001); 浙江省科技厅项目 (2013C33244); 浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科项目 (2012-XK-A06)

作者简介: 周 鹏, 男, 主要从事中药有效成分分离及药效学研究。Tel: (0571)86633179 E-mail: zz198966@163.com

***通信作者** 万海同 Tel: (0571)86613711 E-mail: wanhaitong@zjctcm.net

内皮细胞自稳态调控失衡和微血管损伤是缺血缺氧性损伤的重要发病机制之一。脑微血管内皮细胞(rBMECs)及其紧密连接是血脑屏障的结构基础,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^[3]。

丹红注射液(Danhong Injection, DI)是由丹参、红花组成的复方制剂,近年来在临床上用于治疗瘀血闭阻所致的胸痹及中风获得肯定疗效^[4]。前期研究表明,丹红注射液对大鼠脑部缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,具有改善微循环、抗凝溶栓、抗氧化作用^[5-6]。本实验采用原代培养的乳鼠rBMECs,建立缺氧损伤模型,从细胞水平上探讨丹红注射液对缺氧所致rBMECs损伤的保护作用及其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹红注射液,规格10 mL/支,菏泽步长制药有限公司,批号12091021; M199培养基、胎牛血清, Gibco公司; D-Hank's液、II型胶原酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、FITC标记山羊抗兔IgG、碘化丙啶(PI)、Folin-酚试剂、兔抗鼠VIII因子相关抗原抗体、胰蛋白酶,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所; FITC Annexin V细胞凋亡检测试剂盒、PI/RNase Staining缓冲液试剂盒, BD公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物

SD大鼠,雌雄兼用,3~5日龄,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供,许可证号SCXK(沪)2008-0016,上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.3 仪器

SW-CJ-2D净化工作台,苏州净化设备有限公司; 3111型CO₂培养箱, Thermo Scientific公司; DMI 4000B荧光倒置显微镜,德国徕卡公司; LDZ5-2型低速自动平衡离心机,北京京立离心机有限公司; TU-1900双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司; Thermo Scientific Varioskan Flash酶标仪、BD FACSCalibur流式细胞仪,美国BD公司; Eppendorf移液枪,自制缺氧罐。

2 方法

2.1 rBMECs的培养

参考叶立等^[7]培养rBMECs的方法并加以改

进。取8只3~5日龄SD乳鼠,脱颈椎处死,置于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线剪开颅骨,剔除硬脑膜,取出大脑半球,去除小脑和脑干。将脑组织立即放入含冷D-Hank's液的培养皿中,尽量去除软脑膜、大血管、白质组织, D-Hank's液漂洗3次后将大脑皮质移入无菌的培养皿中,剪碎至1 mm³(以上操作在冰袋上进行)。剪碎的灰质组织用含乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰蛋白酶在37℃下消化20 min, 5 min摇1次,加入含有10%胎牛血清的M199培养液终止消化,吹打均匀,依次通过80、200目不锈钢筛滤过。收集200目上的团块滤液,1 000 r/min离心10 min。沉淀悬浮于0.1% II型胶原酶溶液中,吹打均匀,37℃消化25 min, 5 min摇1次,1 000 r/min离心10 min。将下层沉淀用M199培养基漂洗1次,再次离心,沉淀用M199完全培养基悬浮,接种到细胞培养瓶中,37℃、5% CO₂培养箱内静置培养,4 d后首次换液,以后每2 d换液1次,7~8 d细胞生长成致密单层,出现“铺路石”征象后可进行传代培养,以2~3代细胞用于实验。用培养基将传至第3代的rBMECs调至1×10⁵/mL, 1 mL/孔,接种至6孔板上,置5% CO₂培养箱中于37℃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 rBMECs鉴定^[8]

将生长的细胞致密单层用95%冷乙醇固定5 min, PBS洗3遍,吸干,加稀释10倍的一抗(兔抗鼠第VIII因子抗体)和50 μg/mL PI染料盖住细胞层,37℃湿盒反应30 min, PBS洗3遍,洗去未结合的抗体,滴加荧光素标记的二抗(羊抗兔IgG-FITC),37℃湿盒反应30 min, PBS洗去未结合的荧光标记二抗。以不加一抗、只加二抗和PI处理的细胞作为阴性对照;加缓冲甘油封片置于倒置荧光显微镜下观察(×200),调节荧光显微镜视野拍照并保存。

2.3 分组、给药与造模

经MTT实验确定丹红注射液的细胞毒性剂量范围,预实验确定给药剂量。取丹红注射液和无血清M199培养基分别配成高、中、低剂量(100、50、25 μL/mL)的含药无血清培养基。取长成致密单层的rBMECs,分为对照组、模型组和丹红注射液高、中、低剂量组,每组6个复孔。给药前轻轻吸去6孔板中的培养基,用PBS洗涤2次,对照组加入

M199 完全培养基 1 mL, 模型组加入无血清 M199 完全培养基 1 mL, 丹红注射液各组分别加入含相应剂量的丹红注射液的无血清 M199 培养基 1 mL。对照组 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内静置培养 4 h; 其他各组均置于 37 ℃ 的自制密闭缺氧罐中, 持续通入 95% N₂+5% CO₂ 的混合气体, 充满缺氧罐, 15 min 后封口膜密封缺氧罐接口, 置于 37 ℃ 恒温箱中 4 h, 倒置显微镜下观察 (×200) 各组细胞形态。

2.4 LDH 的量和 SOD 活性检测

取各组细胞培养上清液 20 μL, 按试剂盒说明书操作, 检测 440 nm 处吸光度 (A) 值, 计算 LDH 的量。

去除各组细胞培养基, PBS 洗 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 终止消化后消化液分成 2 份, 离心收集细胞, 其中 1 份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。

2.5 流式细胞仪检测 rBMECs 细胞周期及早期凋亡

取“2.4”项下另 1 份细胞, 每组设 3 个复管, 以 70%乙醇、-20 ℃ 固定 2 h, PBS 和 Stain 缓冲液分别洗细胞 1 次, PI 染色 30 min, 流式细胞仪检测。同法每组设 3 个复管, 加 Annexin V Binding 缓冲液 500 μL, 振荡成单细胞悬液, FITC Annexin/PI 双染后, 流式细胞仪检测。

2.6 统计学处理

数据用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 数据用

$\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间两两比较采用 LSD 单因素方差分析。

3 结果

3.1 rBMECs 鉴定

对照组细胞只有细胞核显示红色荧光 (PI 染色), 而胞质不出现绿色荧光。在参数完全相同条件下, 对用 VIII 因子及二抗处理的细胞样品进行扫描, 可见细胞核出现红色荧光, 且细胞质出现强绿色荧光, 表明细胞含有 VIII 因子, 可认为是内皮细胞。通过细胞计数统计, 几乎 100% 的细胞均为 rBMECs。结果见图 1。

3.2 对缺氧损伤的 rBMECs 形态学的影响

对照组 rBMECs 呈梭形或多角形, 轮廓清楚, 形态饱满, 生长旺盛成铺路石状。模型组细胞体积明显缩小, 与周围的细胞脱离, 出现越来越多的凋亡及坏死细胞。丹红注射液能有效地减轻缺氧对细胞形态的损伤, 且呈剂量相关性。结果见图 2。

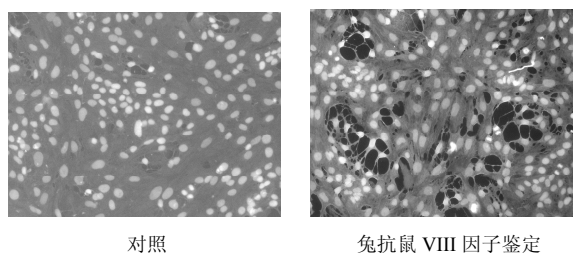


图 1 兔抗鼠 VIII 因子鉴定 rBMECs

Fig. 1 rBMECs of rabbit anti rat factor VIII identification

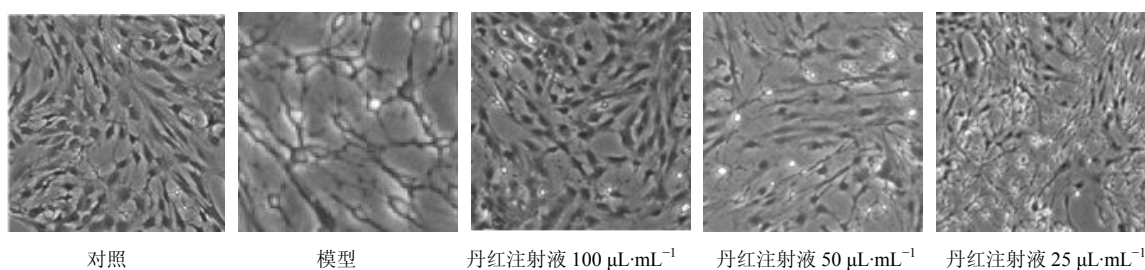


图 2 各组 rBMECs 形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of rBMECs in each group

3.3 对缺氧损伤的 rBMECs 中 LDH 量与 SOD 活性的影响

与对照组相比, 模型组 rBMECs 由于缺氧促进 LDH 的释放, 细胞 SOD 活性降低 ($P<0.01$), 表明细胞膜受到了明显损伤, 通透性增加, 清除氧自由基的能力下降。丹红注射液 100、50 μL/mL 均能显著抑制细胞上清液中 LDH 的增加 ($P<0.01$), 并

显著增强 SOD 的活性 ($P<0.01$); 剂量为 25 μL/mL 时作用显著 ($P<0.05$)。结果见表 1。

3.4 对缺氧损伤的 rBMECs 早期凋亡的影响

对照组早期凋亡 rBMECs 仅有 5.49%; 缺氧模型组则高达 65.49%; 丹红注射液 100、50 μL/mL 作用 rBMECs 4 h 后, 早期凋亡细胞分别为 20.74%、41.65%, 与模型组相比差异显著 ($P<0.01$); 而丹

表1 丹红注射液对缺氧损伤的 rBMECs LDH 释放、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of DI on LDH leakage and SOD activity in rBMECs injured by hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数 / ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LDH / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	75.04 ± 4.85	59.37 ± 3.80
模型	—	112.39 ± 3.42 ^{△△}	26.21 ± 2.74 ^{△△}
丹红注射液	100	86.91 ± 3.92 ^{**}	50.86 ± 1.47 ^{**}
	50	95.64 ± 4.52 ^{**}	42.72 ± 1.26 ^{**}
	25	106.46 ± 5.20 [*]	29.38 ± 1.29 [*]

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

红注射液 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组则未见明显的细胞凋亡抑制作用, 表明丹红注射液高、中剂量能够明显抑制缺氧诱导的 rBMECs 早期凋亡的进程。结果见图 3、表 2。

3.5 对 rBMECs 细胞周期的影响

与对照组比较, 模型组 G_1 期 rBMECs 显著增加 ($P < 0.01$), S 期细胞显著减少 ($P < 0.01$), 表明缺氧可诱导 rBMECs 细胞发生 G_1/S 期阻滞。与模型组相比, 丹红注射液 100、50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组显著增加 S 期细胞 ($P < 0.01$), 减少 G_1 期细胞 ($P < 0.01$); 而 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组未见显著改变, 表明丹红注射液高、中剂量能有效抑制缺氧诱导的 rBMECs 发生 G_1/S 期阻滞。结果见表 2。

4 讨论

血脑屏障在维持大脑内环境 and 功能方面起着极

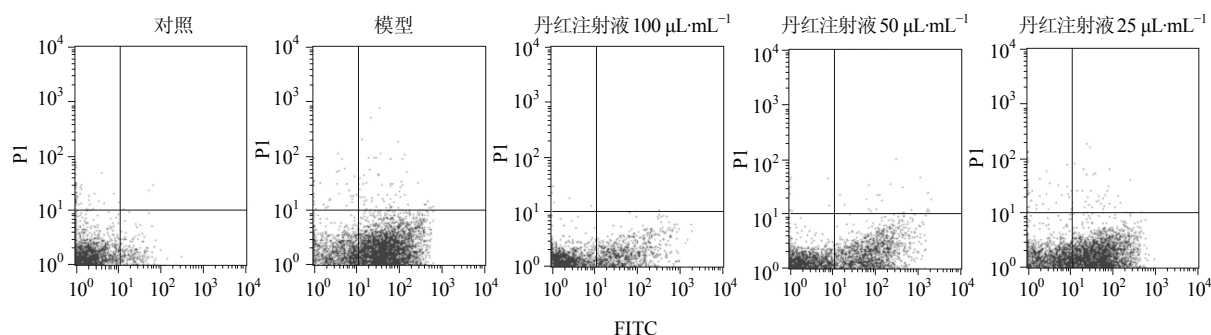


图3 丹红注射液对缺氧诱导的 rBMECs 早期凋亡的影响

Fig. 3 Effect of DI on early apoptosis of rBMECs injured by hypoxia

表2 丹红注射液对缺氧损伤的 rBMECs 早期凋亡率及细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of DI on early apoptosis and cell cycle of rBMECs injured by hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数 / ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞凋亡率 / %	细胞周期 / %		
			G_1 期	S 期	G_2 期
对照	—	7.74 ± 1.32	72.09 ± 1.79	21.53 ± 1.31	6.38 ± 0.48
模型	—	63.81 ± 4.34 ^{△△}	88.47 ± 2.87 ^{△△}	5.42 ± 1.62 ^{△△}	6.11 ± 1.73
丹红注射液	100	18.70 ± 2.55 ^{**}	73.84 ± 1.45 ^{**}	19.36 ± 1.13 ^{**}	6.80 ± 0.68
	50	40.45 ± 4.02 ^{**}	76.78 ± 1.53 ^{**}	13.14 ± 1.55 ^{**}	10.08 ± 1.05
	20	59.69 ± 4.17	86.98 ± 2.16	7.58 ± 1.20	5.44 ± 1.03

为重要的作用, 血脑屏障受到破坏是缺血缺氧损伤性脑病发生的重要病理生理基础。减轻缺血缺氧后血脑屏障的损伤是防治脑血管疾病继发性脑损伤的重要手段, 也是研发脑保护药物的主要靶点^[9]。

脑缺血缺氧时, 腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 合成减少, 使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶功能减弱, 大量 Na^+ 内流, K^+ 外流, 细胞膜电位下降, 产生去极化。细胞膜去

极化, 释放兴奋性氨基酸, 引发大量的 Ca^{2+} 内流, 导致细胞内游离 Ca^{2+} 超载。细胞内 Ca^{2+} 超载在缺氧性神经元凋亡的发生中起关键作用。缺血缺氧后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 可活化 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶, 使核染色质 DNA 降解成单个或寡核苷酸小体, 诱导细胞凋亡。同时过量 Ca^{2+} 沉积于线粒体, 使线粒体氧化磷酸化失耦联进一步加重, 膜

电位丧失,呼吸链解体,导致细胞能量的严重丢失,产生的大量自由基与脂质、蛋白质、核酸发生反应,引起膜脂质过氧化,导致膜损伤^[10-12]。

缺氧发生时, Ca^{2+} 大量内流引起脑细胞损伤,血脑屏障破坏,激活一系列的酶促反应,造成细胞内 LDH 大量外释,且诱导脑细胞的进一步损伤,产生大量氧自由基,诱导细胞凋亡,因此通过细胞上清液中 LDH 水平的测定,可以反映细胞膜的通透性和完整性等。本实验结果表明,丹红注射液对由缺氧所致 rBMECs 损伤具有保护作用,能明显抑制细胞上清液中 LDH 量的增加,保护细胞膜的稳定性,显著增强细胞内 SOD 的活性,改善能量代谢,有效抑制缺氧诱导的 rBMECs 发生 G₁/S 期阻滞和早期凋亡,且使受损细胞形态得到明显改善。

综上所述,丹红注射液对缺氧所致乳鼠 rBMECs 损伤具有显著的保护作用,其机制可能与抑制细胞凋亡、减少氧自由基生成、提高细胞对氧自由基的清除能力有关。

参考文献

- [1] Pollak J, Doyle K P, Mamer L, *et al.* Stratification substantially reduces behavioral variability in the hypoxic-ischemic stroke model [J]. *Brain Behavior*, 2012, 2(5): 698-706.
- [2] 张国平, 孙梅, 杨洁红, 等. 川芎嗪对缺氧人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 71-73.
- [3] 李王吾, 彭亮, 黄胜和, 等. 体外血脑屏障模型的建立及发展 [J]. 广东医学, 2009, 30(4): 647-648.
- [4] 章庆红. 丹红注射液临床应用研究 [J]. 河北医药, 2010, 32(20): 2909-2911.
- [5] He Y, Wan H T, Du Y G, *et al.* Protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 387-394.
- [6] 韩素环. 丹红注射液治疗脑卒中恢复期瘀血闭阻症的疗效观察 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 461-462.
- [7] 叶立, 李建宇, 李月鹏, 等. 灯盏花素对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 955-957.
- [8] 高永红, 袁拯忠, 牛福玲, 等. 脑微血管内皮细胞体外缺血再灌注模型的建立及牛胆酸的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 930-932.
- [9] KIM K S. Microbial translocation of the blood-brain barrier [J]. *Int J Parasitol*, 2006, 36(5): 607-614.
- [10] 刘郁, 张海鹏. 缺血缺氧性脑损伤病理机制 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(7): 496-497.
- [11] 季宇彬, 江剑, 高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2051-2055.
- [12] Wang Z, Tang X, Li Y, *et al.* 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits the apoptotic responses in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(1): 9-17.