

注射用血塞通对 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型 Lingo-1 表达的影响

吴爽¹, 张海艳², 杨田田³, 岑 锴⁴, 周东蕊¹, 朱陵群^{1*}

1. 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室和北京市重点实验室, 北京 100700

2. 北京市上地医院, 北京 100084

3. 山东大学附属省立医院, 山东 济南 250021

4. 北京中医药大学东直门医院 口腔科, 北京 100029

摘要:目的 建立 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型, 考察注射用血塞通对缺糖缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞存活、凋亡及 Lingo-1 mRNA 及蛋白表达的影响。方法 采用 RPMI 1640 无糖培养基和三气培养箱缺氧法制备 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型, CCK8 法测定细胞存活率, 确定最佳缺氧时间及最适注射用血塞通质量浓度, Annexin V-FITC/PI 双染法检测 SH-SY5Y 细胞凋亡率, 并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法测定 Lingo-1 mRNA 表达情况, Western blotting 法测定 Lingo-1 蛋白表达情况。结果 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型的最佳缺氧时间为 16 h, 注射用血塞通最适质量浓度为 640 mg/L, 在该质量浓度条件作用下, 血塞通组与模型组相比, SH-SY5Y 细胞的凋亡率显著降低, Lingo-1 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平均显著降低。结论 当 SH-SY5Y 细胞受到缺糖缺氧损伤后, 细胞凋亡率显著升高, Lingo-1 呈高表达状态, 血塞通可以明显减少缺糖缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞的凋亡, 同时抑制 Lingo-1 的高表达, 具有抑制凋亡和显著的神经保护作用。

关键词: 注射用血塞通; SH-SY5Y 细胞; 缺糖缺氧损伤模型; Lingo-1; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3859-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.018

Effects of Xuesaitong Injection on expression of Lingo-1 in SH-SY5Y cells after oxygen and glucose deprivation

WU Shuang¹, ZHANG Hai-yan², YANG Tian-tian³, CEN Kai⁴, ZHOU Dong-rui¹, ZHU Ling-qun¹

1. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Educational Ministry and Beijing, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

2. Beijing Shangdi Hospital, Beijing 100084, China

3. Affiliated Provincial Hospital of Shandong University, Jinan 250021, China

4. Department of Stomatology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish an oxygen and glucose deprivation model (OGD) of SH-SY5Y cells, and investigate the effects of Xuesaitong Injection on the cell survival, apoptosis rate of SH-SY5Y cells and the mRNA and protein expressions of Lingo-1. **Methods** The model was established using 1640 sugar-free medium and three-gas incubator. The cell survival rate was determined by CCK8 method to determine the optimal time for hypoxia and the optimal concentration of Xuesaitong Injection. The apoptosis rate of SH-SY5Y cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. The mRNA and protein expressions of Lingo-1 were determined by qRT-PCR and Western blotting, respectively, and the effect of Xuesaitong on Lingo-1 expression was finally determined. **Results** In this study, the optimal hypoxia time for the establishment of the OGD model of SH-SY5Y cells was 16 h and the optimum concentration of Xuesaitong Injection was 640 mg/L. The apoptosis rate of SH-SY5Y cells was significantly reduced, and the expression levels of lingo-1 mRNA and protein were decreased in the Xuesaitong group compared with the model group under the condition of this concentration. **Conclusion** The apoptosis rate was significantly increased and Lingo-1 was highly expressed when SH-SY5Y cells were damaged by oxygen and glucose deprivation. Xuesaitong can significantly reduce the

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81573926); 国家自然科学基金面上资助项目 (81173235); 国家自然科学基金面上资助项目 (30772803); 北京中医药大学在读研究生项目 (2018-JYBZZ-XS144)

*通信作者 朱陵群 Tel: (010)84013196 E-mail: lingqunzh@vip.sina.com

apoptosis of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation, and inhibit the high expression of lingo-1, which has the anti-apoptosis and significant neuroprotective effect.

Key words: Xuesaitong for injection; SH-SY5Y cells; oxygen and glucose deprivation; Lingo-1; apoptosis

SH-SY5Y 细胞系来源于人神经母细胞瘤株,因其具有分化程度低、繁殖快的特点,且该细胞的形态、生理生化功能均与正常神经细胞较为相似^[1],所以 SH-SY5Y 细胞常用来研究神经元分化的机制。缺氧缺血 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 损伤模型 (亦称氧糖剥夺模型) 常用于细胞缺氧缺血损伤后的体外研究^[2]。Lingo-1 作为脑内神经再生抑制因子,同时也是重要连接蛋白和主要活性分子,参与抑制神经元生长和髓鞘形成的信号转导。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是注射用血塞通冻干粉 (血塞通) 的主要有效成分,主要发挥活血祛瘀、通脉活络的功效,常用于治疗脑卒中偏瘫、瘀血阻络证,目前对 PNS 的研究较多,动物实验表明 PNS 发挥神经保护作用是通过减轻脑水肿、抑制神经元凋亡来实现的^[3-4],但其发挥作用的机制尚未完全明了。为探究血塞通对神经细胞缺氧缺糖的保护作用,同时建立 SH-SY5Y 细胞体外氧糖剥夺损伤模型,模拟脑梗死发病过程,本研究先通过细胞存活率 (CCK8 法) 探索最适缺氧时间和血塞通最佳药物作用浓度,Annexin V-FITC/PI 双染法检测 SH-SY5Y 细胞凋亡率,然后通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法测定 Lingo-1 mRNA 表达情况,Western blotting 方法测定 Lingo-1 蛋白表达,最终确定血塞通对 Lingo-1 表达的作用,以此探究血塞通发挥神经保护作用的作用途径和靶点。

1 材料

1.1 细胞

SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞,购于国家实验细胞资源共享服务平台。

1.2 药物

注射用血塞通冻干粉 (200 mg/支, PNS 质量分数 93%, 批号 16BB205, 昆明制药集团有限公司); AG1478 (Lingo-1 下游 EGFR 的特异性小分子抑制剂) 10 mmol/L (S2728) 购于 Selleck 公司。

1.3 主要试剂

RPMI 1640 培养基 (11875093)、胎牛血清 (10099141)、0.25% 胰蛋白酶 (25200056)、0.25% 不含 EDTA 胰蛋白酶 (15050065)、RPMI 1640 无糖培养基 (11879020)、青/链霉素双抗 (15140122)

购于 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, SH30256.01B) 购于美国 Hyclone 公司; CCK8 (CK04-500) 购于日本同仁研究所; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (KGA107) 购于南京凯基生物科技发展有限公司; GAPDH (ab9485) 购于 Abcam 公司; Lingo-1 抗体 (#48389) 购于 CST 公司; 蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (P1260)、ECL 超敏发光液 (P1020)、Trizol (T9424) 购于 Sigma 公司; GoScript™ 反转录试剂盒 (A5001)、GoTaq qPCR Master Mix (A6001) 购于 Progema 公司; 纯水、无水乙醇、氯仿由北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室提供。

1.4 主要仪器

酶标仪 (MULTISKAN MK3)、低温冷冻离心机 (Fresco 17)、紫外分光光度计 (Nanodrop 2000) 购于 Thermo 公司; 超净台购于新加坡 ESCO 公司; CO₂ 恒温细胞培养箱购于日本 Sanyo 公司; 三气培养箱 (MiniGalaxy A500) 购于英国 RSBiotech 公司; GeneAmp PCR 扩增仪 (9600)、荧光定量 PCR 仪 (7500) 购于美国 ABI 公司; 电热恒温水箱购于北京长风仪器仪表公司; 纯水机 (0074NL0048) 购于美国 Millipore 公司。

2 方法

2.1 SH-SY5Y 细胞缺氧缺血损伤模型的制备

取对数生长期 SH-SY5Y 细胞,消化离心重悬后,重新接种于新的细胞培养瓶/细胞培养板中,贴壁生长 24 h 至融合度 80%,吸弃培养液。用 PBS 轻柔漂洗 2 遍,换为无糖无血清的 RPMI 1640 培养基,分别放入三气培养箱 (37 °C、5% CO₂、1% O₂、94% N₂) 进行缺氧培养不同时间 (4、8、12、16、20、24 h),同时设正常培养细胞为对照组,缺氧培养及正常培养后收集细胞,将 1.0×10⁵ 个/mL 的细胞混悬液分别接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,随后每孔加入 CCK8 溶液 10 μL,摇床振荡混匀,放入 37 °C、CO₂ 培养箱培养 2 h。酶标仪 450 nm 波长处测定每孔的吸光度 (A) 值,计算存活率。

存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值

2.2 CCK8 法检测血塞通对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,接种于 96 孔

细胞培养板中,细胞密度 1.0×10^5 个/mL,每孔 100 μL ,放入 CO_2 培养箱过夜贴壁,细胞分为对照组、模型组和血塞通组,血塞通组加入终质量浓度分别为 0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56 mg/mL 的药物,对照组加入正常培养基,模型组加入无糖无血清的 RPMI 1640 培养基,模型组和血塞通组均于三气培养箱 (37°C 、5% CO_2 、1% O_2 、94% N_2) 进行缺氧培养 16 h,培养结束后每孔加入 CCK8 溶液 10 μL ,摇床振荡混匀,放入 37°C 、 CO_2 培养箱培养 2 h。酶标仪 450 nm 波长处测定每孔 A 值,计算存活率。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 SH-SY5Y 细胞凋亡

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,细胞密度 1.0×10^5 个/mL,接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 2 mL,放入 CO_2 培养箱过夜贴壁。细胞分为对照组、模型组、血塞通组、血塞通+AG1478 组、AG1478 组,对照组细胞继续用 RPMI 1640 完全培养基培养,并置于 37°C 、 CO_2 培养箱中培养,模型组细胞培养基换成 RPMI 1640 无糖无血清培养液,并置于三气培养箱中培养;血塞通组细胞培养基换成 RPMI 1640 无糖无血清培养液配制的终质量浓度为 0.64 mg/mL 的含血塞通药物培养基,并置于三气培养箱中培养;血塞通+AG1478 组细胞培养基换成 RPMI 1640 完全培养液配制的终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 (Lingo-1 下游 EGFR 的特异性小分子抑制剂) 培养基预处理 1 h, PBS 漂洗 2 遍,换成 RPMI 1640 无糖无血清培养液配制的终质量浓度为 0.64 mg/mL 的血塞通+1 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 培养基,并置于三气培养箱中培养;AG1478 组细胞换成 RPMI 1640 完全培养液配制的终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 培养基预处理 1 h, PBS 漂洗 2 遍,换成 RPMI 1640 无糖无血清培养液配制的终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 AG1478 培养基,并置于三气培养箱中培养。取出细胞后用 PBS 漂洗细胞 2 次,用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,低温冷冻离心机 1 000 r/min 离心 5 min,按照试剂盒说明书进行 Annexin V-FITC/PI 双染法测定细胞凋亡率。

2.4 qRT-PCR 检测 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 mRNA 的表达

细胞分组及加药处理同“2.3”项,将处理好的细胞用 PBS 漂洗 2 遍后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,离心收集细胞。提取细胞总 RNA 并用紫外分光光

度计测定 RNA 浓度,使用反转录试剂盒进行 RNA 反转录及 qPCR Master Mix 试剂盒进行扩增,Lingo-1 上游引物为 5'-CCAACAAGAC-CTTCGCTTTCATC-3',下游引物为 5'-GATGATGAGGGTCTTGATGTCGA-3',GAPDH 上游引物为 5'-GCGGGGCTCTCCAGAACATC-3',下游引物为 5'-TAGACGGCAGGTCAGGTCCA-3'。

2.5 Western blotting 检测 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 蛋白表达

细胞分组及加药处理同“2.3”项,将处理好的细胞用 PBS 漂洗 2 遍后,用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化,离心收集细胞。提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育,暗室发光后最终得到目的蛋白条带。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据先进行正态性检验和方差齐性检验,若符合正态和方差齐则采用单因素方差分析进行统计,组间分析采用 LSD 中的 Dunnett's post hoc 检验,非正态或方差不齐采用非参检验。

3 结果

3.1 CCK8 法确定最适缺氧时间

SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧后,随着时间延长,CCK8 测得的细胞存活率逐渐下降,缺氧 16 h 时,细胞存活率在 55.9%,此时既可以造成缺糖缺氧损伤,又可以保证大部分细胞的存活,因此,选 16 h 为细胞的最佳缺氧时间。缺氧 4、8、12、16、20、24 h 后细胞存活率分别为 $(85.9 \pm 2.4)\%$ 、 $(75.2 \pm 2.4)\%$ 、 $(66.3 \pm 2.0)\%$ 、 $(55.9 \pm 2.5)\%$ 、 $(50.2 \pm 2.8)\%$ 、 $(46.4 \pm 2.6)\%$ 。

3.2 CCK8 法确定血塞通最适作用质量浓度

血塞通对缺糖缺氧损伤的 SH-SY5Y 细胞起到了一定的保护作用,血塞通质量浓度为 0.04 mg/mL 时,细胞存活率为 66.8%,与模型组相比,存活率显著提高 ($P < 0.01$)。随着血塞通质量浓度的升高,SH-SY5Y 细胞存活率也逐渐升高。当血塞通质量浓度为 0.64 mg/mL 时,细胞存活率最高,为 81.8%,血塞通质量浓度再升高,存活率反而开始下降。因此,血塞通起保护作用的最佳质量浓度为 0.64 mg/mL,后续实验均用此质量浓度进行考察。结果见表 1。

3.3 对缺糖缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤后,凋亡率明显

表 1 血塞通对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Xuesaitong on cell viability of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.0 $\pm$ 0.0
模型	—	62.0 $\pm$ 2.8 ^{##}
血塞通	0.04	66.8 $\pm$ 1.8 ^{**}
	0.08	70.4 $\pm$ 5.0 ^{**}
	0.16	73.6 $\pm$ 3.3 ^{**}
	0.32	80.8 $\pm$ 2.8 ^{**}
	0.64	81.8 $\pm$ 3.0 ^{**}
	1.28	77.0 $\pm$ 1.7 ^{**}
	2.56	75.6 $\pm$ 6.5 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$, 表 2、3 同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as tables 2 and 3

升高 ($P < 0.01$)。血塞通可明显降低细胞的凋亡率 ($P < 0.01$)。当血塞通组细胞培养基中加入 AG1478 后, 明显抑制血塞通的保护作用。结果见表 2 和图 1。

表 2 血塞通对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Xuesaitong on apoptosis of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	ρ 或 C	细胞凋亡率/%
对照	—	10.60 $\pm$ 1.34
模型	—	35.15 $\pm$ 2.10 ^{##}
血塞通	0.64 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	19.77 $\pm$ 1.25 ^{**}
血塞通+AG1478	0.64 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	25.25 $\pm$ 1.34 ^{**}
AG1478	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	36.15 $\pm$ 1.57

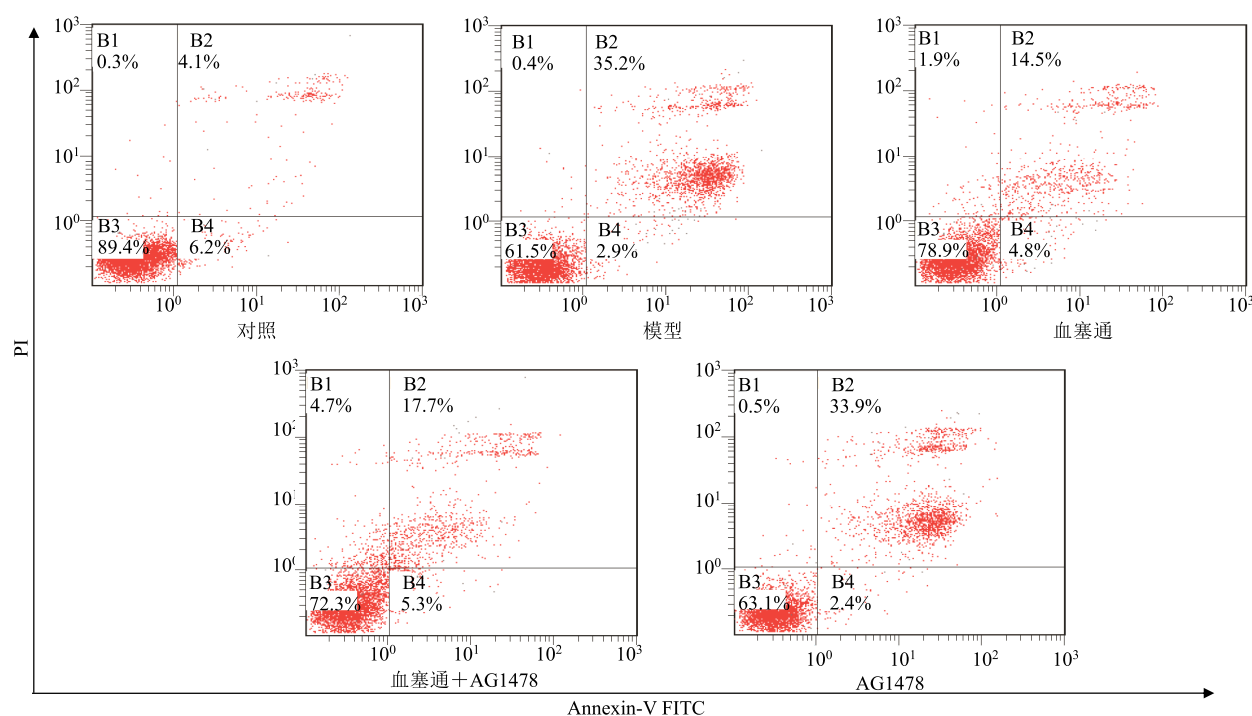


图 1 各组 SH-SY5Y 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染流式四象限图

Fig. 1 Four-quadrant plots of Annexin V-FITC/PI flow cytometry of SH-SY5Y cells

3.4 对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 mRNA 表达的影响

SH-SY5Y 细胞缺氧缺血损伤后, 模型组 Lingo-1 mRNA 表达与对照组相比, 明显升高 ($P < 0.01$)。血塞通组和血塞通+AG1478 组 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 mRNA 表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$), AG1478 组 Lingo-1 mRNA 表达与模型组未见差异, 血塞通+AG1478 组 Lingo-1 mRNA 表达

与血塞通组相比未见统计学差异。结果见表 3。

3.5 对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 蛋白表达的影响

SH-SY5Y 细胞缺氧缺血损伤后, 模型组 Lingo-1 蛋白的表达比对照组显著升高 ($P < 0.01$)。血塞通组 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 蛋白表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。血塞通+AG1478 组 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 蛋白表达水平较模型组降低

表 3 血塞通对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Xuesaitong on Lingo-1 mRNA expression of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ 或 C	Lingo-1 mRNA
对照	—	1.00 ± 0.03
模型	—	3.37 ± 0.33 ^{##}
血塞通	0.64 mg·mL ⁻¹	1.52 ± 0.11 ^{**}
血塞通+AG1478	0.64 mg·mL ⁻¹ + 1 μ mol·L ⁻¹	1.68 ± 0.19 ^{**}
AG1478	1 μ mol·L ⁻¹	3.14 ± 0.48

($P < 0.05$)。AG1478 组 Lingo-1 蛋白表达与模型组差异无统计学意义。血塞通+AG1478 组 Lingo-1 蛋白表达与血塞通组相比未见统计学差异。结果见图 2。

4 讨论

脑卒中是造成我国居民寿命缩短的首要疾病因素^[5], 脑梗死又称为缺血性脑卒中, 其发生率约为全部脑卒中的 80%^[6]。目前对脑梗死病理机制的研究较多, 治疗方面较为公认的是尽早恢复受损脑组织及缺血半暗带的血供、挽救濒死的神经细胞以恢复正常的神经功能^[7]。脑组织缺血性损伤后, 中枢

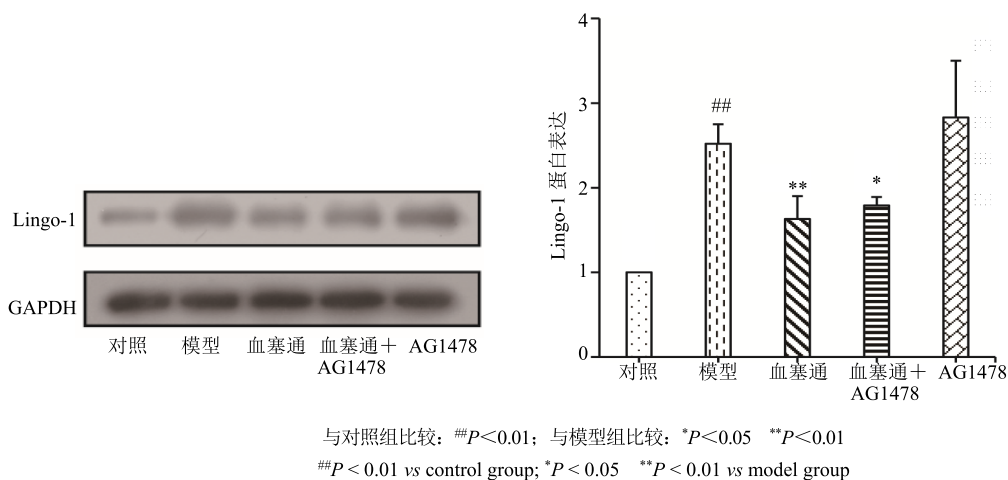


图 2 血塞通对缺氧缺血损伤 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Xuesaitong on Lingo-1 protein expression of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

神经系统亦发生损伤, 且经介入治疗后恢复难度也较大, 中枢神经系统再生能力差为其内在属性, 另一重要因素为髓鞘相关轴突生长抑制因子暴露, 抑制轴突再生、髓鞘形成, 延缓神经功能的恢复, 从而出现再生功能障碍^[8-9], 这也是缺血性脑卒中高致死率和高致残率的最主要原因。

神经功能的恢复应同等重视功能恢复和形态恢复, 而功能和形态恢复之间必然存在一定的物质基础, 现代研究发现, Lingo-1 是脑内神经再生抑制因子, 参与抑制神经元生长和髓鞘形成的信号转导。在 Lingo-1 缺失的动物模型中, 神经元和少突胶质细胞的存活、少突胶质细胞的分化、轴突和髓鞘的再生能力均明显改善^[10]。成年哺乳动物的中枢神经系统损伤后, Lingo-1 表达明显上调, 而抑制 Lingo-1 的表达, 可促进神经功能的恢复, 说明 Lingo-1 也能抑制神经再生, 为另一重要的抑制性因子^[11-12]。研究发现, Lingo-1 在神经干细胞成熟过程中具有调

节神经元凋亡的作用, 在分化的早期, 抗 Lingo-1 抗体的使用可显著减少细胞的凋亡, Lingo-1 抑制剂的应用可一定程度上减轻神经元的凋亡, 起到神经保护的作用^[13]。WNK3 蛋白是丝氨酸/苏氨酸激酶的一种, 广泛存在于大脑中, 进一步研究表明, Lingo-1 可能通过抑制 WNK3 激酶活性而增强神经元凋亡^[14]。这也揭示了神经元凋亡可能存在的新机制, 但其确切的内在机制仍值得深入研究与探讨^[15]。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在正常胚胎发育和组织损伤中发挥重要作用^[16]。它在大鼠和小鼠发育中的星形胶质细胞中呈高表达, 但随着星形胶质细胞的成熟, EGFR 也逐渐消失^[17-18], 当中枢神经系统局部缺血、肿瘤及神经退行性变等疾病发生时, 星形胶质细胞的 EGFR 表达水平升高^[19-20]。Lingo-1 可以通过胞质结构域中 EGFR 样酪氨酸磷酸化位点直接与 EGFR 结合, 抑制 EGFR 的表达^[10]。AG1478 是选

择性的小分子可逆性 EGFR 抑制剂^[21], 可抑制 EGFR 的磷酸化作用, 在 Lingo-1 及其下游 EGFR 信号通路中发挥抑制作用。Lingo-1 的发现, 为神经功能恢复的研究提供了新方向, 近年来成为神经再生障碍研究的热点^[22]。

血塞通注射剂广泛用于临床治疗脑卒中偏瘫、瘀血阻络证, 以及脑血管病后遗症, 临床效果较好。血塞通的主要药理成分是 PNS, 该药的作用靶点多, 机制复杂, 是临床与基础研究的热点^[23]。缺糖缺氧损伤模型为广泛研究神经细胞缺血损伤分子机制的细胞模型, 可较好地模拟大脑缺血缺氧损伤状态^[24]。笔者通过研究血塞通对 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型 Lingo-1 蛋白表达的影响, 从中药对神经功能重塑、重建的作用机制角度, 阐释中药良好疗效的物质基础。

本研究成功建立 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型, 并通过 CCK8 法确定模型的最佳缺氧时间为 16 h, 血塞通的最佳作用质量浓度为 640 mg/L。Annexin V-FITC/PI 双染结果显示, SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤后, 凋亡率较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 血塞通可明显降低细胞的凋亡率 ($P < 0.01$), 说明血塞通对 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤后的凋亡具有明显的抑制作用。经过 qRT-PCR 检测, 模型组 Lingo-1 mRNA 表达比对照组明显增加 ($P < 0.01$), 血塞通组和血塞通+AG1478 组 SH-SY5Y 细胞 Lingo-1 mRNA 表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 说明 SH-SY5Y 细胞在缺糖缺氧损伤后, Lingo-1 mRNA 表达增多, 血塞通能明显抑制 Lingo-1 mRNA 的表达。而与血塞通组相比, 血塞通+AG1478 组 Lingo-1 mRNA 表达并无显著差异, 说明应用 AG1478 后, 并未观察到对 EGFR 上游 Lingo-1 mRNA 的表达产生影响。经过 Western blotting 检测, 模型组 Lingo-1 蛋白的表达比对照组显著升高 ($P < 0.01$), 说明 SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧后, Lingo-1 蛋白表达增多, 这也验证了已有的研究结果^[25]。血塞通组 Lingo-1 蛋白表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 血塞通+AG1478 组 Lingo-1 蛋白表达水平也较模型组降低 ($P < 0.05$), 说明血塞通可抑制 SH-SY5Y 缺糖缺氧细胞 Lingo-1 蛋白的表达, 具有明显的神经保护作用。AG1478 组与模型组无差异, 说明 EGFR 的磷酸化作用受到抑制后, 没有影响到 Lingo-1 蛋白的表达, 提示 EGFR 的磷酸化水平与 Lingo-1 蛋白表达可能不存在反馈调节

机制, Lingo-1 与其下游信号通路之间的作用机制仍值得深入研究^[10]。

综上所述, SH-SY5Y 细胞缺糖缺氧损伤模型建立后, 细胞的存活率显著降低, 凋亡率显著升高, 同时, 细胞中 Lingo-1 mRNA 和蛋白的表达均明显增加, 血塞通能有效抑制细胞的凋亡, 对神经再生抑制因子 Lingo-1 的 mRNA 和蛋白表达起到明显抑制作用, 促进受损 SH-SY5Y 细胞的存活, 对抗凋亡, 从而起到神经保护作用。

参考文献

- [1] Fordel E, Thijs L, Martinet W, *et al.* Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: A step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions [J]. *Gene*, 2007, 398(1/2): 114-122.
- [2] 吴燕, 丁爱石, 吴丽颖, 等. 大鼠海马神经元体外缺糖缺氧模型的建立 [J]. 中国应用生理学杂志, 2003, 19(2): 94-97.
- [3] 贺旭, 刘英飞, 王伟, 等. 三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4695-4700.
- [4] 贺旭, 葛金文, 邓长青, 等. 三七总皂苷抑制大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元凋亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1337-1344.
- [5] Abajobir A A, Abbafati C, Abbas K M, *et al.* Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet*, 2017, 390(10100): 1151-1210.
- [6] 李皓亮. 依达拉奉治疗急性脑梗死的临床疗效观察 [J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(20): 13-14.
- [7] 梁庆. 脑梗死缺血/再灌注损伤机制的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2014, 27(24): 3263-3266.
- [8] Guzik-Kornacka A, van der Bourg A, Vajda F, *et al.* Nogo-A deletion increases the plasticity of the optokinetic response and changes retinal projection organization in the adult mouse visual system [J]. *Brain Struct Funct*, 2016, 221(1): 317-329.
- [9] 玛依拉·吐尔逊, 阿加·木合大, 萨努巴儿·买买提, 等. 神经生长抑制因子 Nogo-A 在大鼠脑梗死后功能恢复中的作用机制 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(8): 16-19.
- [10] Inoue H, Lin L, Lee X, *et al.* Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(36): 14430-14435.

- [11] 王 莉, 刘晓谷. LINGO-1 在中枢神经系统损伤性疾病中的研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(6): 835-838.
- [12] Bhatt A, Fan L W, Pang Y. Strategies for myelin regeneration: Lessons learned from development [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(14): 1347-1350.
- [13] Loov C, Fernqvist M, Walmsley A, *et al.* Neutralization of LINGO-1 during *in vitro* differentiation of neural stem cells results in proliferation of immature neurons [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29771.
- [14] Zhang Z, Xu X, Xiang Z, *et al.* LINGO-1 receptor promotes neuronal apoptosis by inhibiting WNK3 kinase activity [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(17): 12152-12160.
- [15] 张照环. LINGO-1 与 WNK 分子的相互作用在神经元突起延长和凋亡中的功能及分子机制的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [16] 王 娜, 栾材富. EGFR/PI3K/AKT 信号通路在肺癌中的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(14): 1984-1987.
- [17] Liu B, Neufeld A H. Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: From development to neural injury [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(16): 3523-3529.
- [18] Gomez-Pinilla F, Knauer D J, Nieto-Sampedro M. Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain: Development and cellular localization [J]. *Brain Res*, 1988, 438(1/2): 385-390.
- [19] Ciccolini F, Mandl C, Holzl-Wenig G, *et al.* Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR [J]. *Dev Biol*, 2005, 284(1): 112-125.
- [20] Nieto-Sampedro M, Gomez-Pinilla F, Knauer D J, *et al.* Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain astrocytes. Response to injury [J]. *Neurosci Lett*, 1988, 91(3): 276-282.
- [21] Han Y, Caday C G, Nanda A, *et al.* Tyrophostin AG 1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(17): 3859-3861.
- [22] 孟二艳, 邢宏义. 脑缺血后 LINGO-1 表达的动态变化及维甲酸对 LINGO-1 表达的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2014, 31(8): 684-686.
- [23] 丁德经. 分析注射用血塞通对急性脑梗死的疗效和对血栓形成的影响 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(25): 3-4.
- [24] Liu L, Zhu L, Zou Y, *et al.* Panax notoginseng saponins promotes stroke recovery by influencing expression of Nogo-A, NgR and p75NGF, *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(4): 560-568.
- [25] 黄浩然, 李光勤, 付 敏, 等. 运动训练对大鼠局灶脑梗死后脑内 LINGO-1 的表达及其对神经功能的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(2): 134-137.