• 药理与临床 •

川芎苯酞类成分对氧糖剥夺/再灌注诱导 MDCK-MDR1 细胞损伤的作用及机制

刘姗姗，郑　琴，岳鹏飞，杨　明，帅书苑，刘小金，胡鹏翼*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室，创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室，江西 南昌 330004

摘　要：目的　探讨川芎中 3 个苯酞类成分藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对氧糖剥夺/再灌注诱导 MDR1 转染犬肾细胞（MDCK-MDR1）损伤的作用及机制。**方法**　采用氧糖剥夺/再灌注诱导 MDCK-MDR1 细胞损伤模型，给予藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 进行干预，采用 MTT 法检测细胞存活率；采用试剂盒检测细胞上清液中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）释放率；采用流式细胞术检测细胞凋亡率；采用 Western blotting 法检测细胞紧密连接蛋白如 claudin-5、occludin、ZO-1 以及外排蛋白 P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）和葡萄糖转运蛋白-1（glucose transporter-1，GLUT-1）表达情况；以芍药苷为探针药物，研究藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对芍药苷在氧糖剥夺/再灌注诱导的 MDCK-MDR1 细胞上跨膜转运的影响。**结果**　与模型组比较，洋川芎内酯 I（80 μg/mL）显著提高 MDCK-MDR1 细胞存活率（P＜0.05）；洋川芎内酯 I（40、80 μg/mL）显著抑制细胞上清液中 LDH 释放率（P＜0.05、0.01）；藁本内酯（20、40 μg/mL）和洋川芎内酯 I 显著抑制细胞凋亡率（P＜0.01）；藁本内酯（20 μg/mL）和洋川芎内酯 I 显著上调 claudin-5 蛋白表达水平（P＜0.05、0.01）；藁本内酯（20、40 μg/mL）、洋川芎内酯 A（20 μg/mL）和洋川芎内酯 I（40、80 μg/mL）显著上调 occludin 蛋白表达水平（P＜0.01）；藁本内酯（20 μg/mL）和洋川芎内酯 I（40 μg/mL）显著上调 ZO-1 蛋白表达水平（P＜0.05、0.01）；藁本内酯、洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）和洋川芎内酯 I 显著下调 GLUT-1 蛋白表达水平（P＜0.01）；藁本内酯（20 μg/mL）、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I（20 μg/mL）显著下调 P-gp 蛋白表达水平（P＜0.01）；藁本内酯（20 μg/mL）、洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）和洋川芎内酯 I 显著促进芍药苷跨膜转运（P＜0.05、0.01）。**结论**　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 能够上调紧密连接蛋白表达，抑制氧糖剥夺/再灌注诱导的 MDCK-MDR1 细胞损伤，促进探针药物的跨膜转运。

关键词：藁本内酯；洋川芎内酯 A；洋川芎内酯 I；氧糖剥夺/再灌注；MDCK-MDR1 细胞

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)10 - 2958 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.012

Effect and mechanism of phthalides from *Ligusticum chuanxiong* on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced MDCK-MDR1 cell injury

LIU Shan-shan, ZHENG Qin, YUE Peng-fei, YANG Ming, SHUAI Shu-yuan, LIU Xiao-jin, HU Peng-yi

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory of Innovation Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective　To explore effect and mechanism of three phthalide components including ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I from *Ligusticum chuanxiong* on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced MDCK-MDR1 cell injury. **Methods** MDCK-MDR1 cells injury model was induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion, and ligustilide, senkyunolide A and

收稿日期：2020-12-19

基金项目：国家自然科学基金项目（81760714）；国家自然科学基金项目（82060719）；江西省自然科学基金项目（20171BAB205093）；江西省博士后项目（2017KY08）；江西省卫生厅项目（2016A012）；江西省一流学科项目（JXSYLXK-ZHYAO091）；江西省博士启动基金项目（2018WBZR003）

作者简介：刘姗姗（1994—），女，硕士研究生，研究方向为中药药剂学。Tel: 18702535451　E-mail: jxnklss@126.com

***通信作者：**胡鹏翼（1982—），女，副教授，博士，硕士研究生导师，从事中药跨膜转运、药物新剂型与新技术研究。Tel: (0791)87118658　E-mail: hpy820515@126.com

senkyunolide I were used for intervention. MTT was used to detect cell survival rate; Kit was used to detect lactate dehydrogenase (LDH) release rate in cell supernatant; Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate; Western blotting was used to detect cellular tight junction proteins such as claudin-5, occludin, ZO-1 and efflux protein P-glycoprotein (P-gp) and glucose transporter-1 (GLUT-1) protein expression; Paeoniflorin was used as a probe drug to study effect of ligustilide, senkyunolide A and senkyunolide I on transmembrane transport of paeoniflorin in MDCK-MDR1 cells induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion. **Results** Compared with model group, senkyunolide I (80 μg/mL) significantly increased survival rate of MDCK-MDR1 cells (P < 0.05); Senkyunolide I (40, 80 μg/mL) significantly inhibited LDH release in supernatant of MDCK-MDR1 cells (P < 0.05, 0.01); Ligustilide (20, 40 μg/mL) and senkyunolide I significantly inhibited apoptosis rate of MDCK-MDR1 cells (P < 0.01); Ligustilide (20 μg/mL) and senkyunolide I significantly up-regulated claudin-5 expression (P < 0.05, 0.01); Ligustilide (20, 40 μg/mL), senkyunolide A (20 μg/mL), and senkyunolide I (40, 80 μg/mL) significantly up-regulated occludin expression (P < 0.01); Ligustilide (20 μg/mL) and senkyunolide I (40 μg/mL) significantly up-regulated ZO-1 expression (P < 0.05, 0.01); Ligustilide, senkyunolide A (40, 80 μg/mL) and senkyunolide I significantly down-regulated GLUT-1 expression (P < 0.01); Ligustilide (20 μg/mL), senkyunolide A and senkyunolide I (20 μg/mL) significantly down-regulated P-gp expression (P < 0.01); Ligustilide (20 μg/mL), senkyunolide A (40, 80 μg/mL) and senkyunolide I significantly promoted the transmembrane transport of paeoniflorin (P < 0.05, 0.01). **Conclusion** Ligustilide, senkyunolide A and senkyunolide I can up-regulate tight junction proteins expressions, inhibit damage of MDCK-MDR1 cells induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion, and promote the transmembrane transport of probe drugs.

Key words: ligustilide; senkyunolide A; senkyunolide I; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; MDCK-MDR1 cells

脑卒中具有极高的致死率和致残率，其发病机制复杂，细胞凋亡、氧化应激和炎性反应等均为导致脑卒中病情加重的重要原因。美国脑卒中协会揭示缺血性脑卒中是脑卒中最常见的形式，占所有脑卒中病例的 87%[1-2]。目前溶栓、降纤为脑卒中主要治疗手段，但血液循环恢复后，神经元损伤，再灌注损伤加重脑梗死程度，导致神经功能障碍，这一病理过程为脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury，CIRI）。CIRI 会损伤大脑的血脑屏障，血脑屏障功能紊乱可导致严重继发性损伤如炎性损伤、脑水肿等，因此，血脑屏障的保护和恢复被认为是减少脑损伤的新型治疗策略。

补阳还五汤、天麻钩藤汤、血府逐瘀汤、圣愈汤、当归芍药散[3-5]在防治 CIRI、保护血脑屏障完整性、抑制细胞凋亡、抑制炎性反应等方面都具有一定的疗效。补阳还五汤和血府逐瘀汤中含有赤芍和川芎，圣愈汤和当归芍药散中含有川芎和白芍，芍药苷为赤芍和白芍的活性成分，可减轻急性脑梗死大鼠的组织损伤程度，抑制缺血后脑组织中氧自由基的形成，降低脂质过氧化程度[6]。课题组前期研究表明，川芎中的 3 个苯酞类成分藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 可增加芍药苷、天麻素和松果菊苷在 MDR1 转染犬肾细胞（MDCK-MDR1）模型上的跨膜转运，其机制与下调 P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）、claudin-5 和 ZO-1 表达有关[7-9]。本研究采用氧糖剥夺/再灌注（oxygen-glucose deprivation/reperfusion，OGD/R）诱导 MDCK-MDR1 细胞建立体外脑缺血再灌注损伤模型，探讨藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 OGD/R 损伤 MDCK-MDR1 细胞的保护作用以及对配伍药物芍药苷跨膜转运的影响，为其防治缺血性脑血管疾病提供依据。

1 材料

1.1 细胞

MDCK-MDR1 细胞购自上海中亚生物基因研究所。

1.2 药品与试剂

对照品藁本内酯（批号 wkqq9011005，质量分数＞98%）、洋川芎内酯 I（批号 DST190902-009，质量分数＞98%）、洋川芎内酯 A（批号 PCS0323，质量分数＞98%）、芍药苷（批号 S-010-180710，质量分数＞98%）购自成都瑞芬思生物科技有限公司；3460 型 Transwell 小室（孔径 0.4 μm，直径 12 mm，表面积 1.12 cm^2）、培养瓶购自美国 Costar 公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒（批号 KG02448）、高糖 DMEM 培养基（批号 KGM12800S-500）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；无糖 DMEM 培养基（批号 10566-016）购自美国 Gibco 公司；胎牛血清、非必需氨基酸、Hank’s 平衡盐溶液（Hank’s balanced salt solution，HBSS）购自美国 Gibco 公司；RIPA 裂解液（批号 C1053）购自北京普利莱基因技术有限公司；PVDF 膜（批

号 IPVH00010）购自美国 Millipore 公司；BCA 蛋白定量试剂盒（批号 CW0014S）购自北京康为世纪生物科技有限公司；超敏发光液（批号 RJ239676）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；P-gp 抗体（批号 ab170904）、ZO-1 抗体（批号 ab96587）、occludin 抗体（批号 ab167161）、葡萄糖转运蛋白-1（glucose transporter-1，GLUT-1）抗体（批号 ab115730）购自美国 Abcam 公司；claudin-5 抗体（批号 29235）购自美国 SAB 公司；β-actin 抗体（批号 TA-09）、HRP 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体（批号 L3032-2）、HRP 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体（批号 L3012-2）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；乙腈为 HPLC 级；水为双蒸水。

1.3 仪器

AB Triple Quad 4500 复合三重四极杆线性离子阱质谱，配备 ESI 离子源及 Analyst 1.6 数据处理软件（美国 AB SCIEX 公司）；BT25S 型十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；3-18K 型高速冷冻离心机（美国 Sigma 公司）；SW-CJ-2F 型超净工作台（苏州净化设备有限公司）；CO_2 恒温培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；YCP-10S 型三气培养箱（长沙华曦电子科技有限公司）；Eclipse TS100 型倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；HHS 型恒温水浴锅（上海博迅实业有限公司）；TDZ4A-WS 型台式低速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；血球计数板（上海求精生化试剂仪器有限公司）；MERS00002 型跨膜电阻仪（美国 Millipore 公司）；WD-2102B 型全自动酶标仪（北京六一生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 MDCK-MDR1 细胞培养

MDCK-MDR1 细胞用含 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸和 1%双抗的高糖 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。隔天更换培养基，当细胞融合度达到 80%～90%，弃去培养基，用 37 ℃的 HBSS 溶液洗涤 2 次，以 0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸（EDTA）消化。

2.2 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞，以 1×10^5/mL 接种至 96 孔板中，设置对照组，模型组，藁本内酯低、中、高剂量（20、40、80 μg/mL）组，洋川芎内酯 A 低、中、高剂量（20、40、80 μg/mL）组和洋川芎内酯 I 低、中、高剂量（20、40、80 μg/mL）组[9]。对照组加入高糖 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养；模型组和各给药组加入无糖 DMEM 培养基，于 95% N_2、5% CO_2、37 ℃三气培养箱中培养 6 h 造成 OGD 损伤；藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I 溶于无水乙醇配制成质量浓度为 10 mg/mL 的母液，以高糖 DMEM 培养基稀释至相应质量浓度。各给药组再加入相应药物，模型组加入不含药物的高糖 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 12 h 进行再灌注[10]。再灌注结束后，弃去上清液，每孔加入 20 μL MTT（5 mg/mL）溶液，孵育 4 h，加入 150 μL 二甲基亚砜（DMSO），振荡 10 min，采用酶标仪检测 490 nm 处吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率 = A_{给药}/A_{对照}$$

2.3 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞上清液 LDH 释放率的影响

按“2.2”项下方法处理细胞，收集上清液，按试剂盒说明书测定细胞上清液 LDH 释放率。

2.4 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞，以 1×10^6/mL 接种至 6 孔板中，按“2.2”项下方法处理细胞，收集细胞，加入 100 μL 结合缓冲液，制成 1×10^6/mL 的细胞悬液，加入 5 μL Annexin V-FTTC 和 5 μL 碘化丙啶（PI），室温避光放置 15 min，加入 400 μL 结合缓冲液，1 h 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞 ZO-1、claudin-5、occludin、P-gp 和 GLUT-1 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞，以 1×10^6/mL 接种至 6 孔板中，按“2.2”项下方法处理细胞，收集细胞，加入 RIPA 裂解液，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度，加入上样缓冲液，95 ℃煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂奶粉封闭 2 h，加入 ZO-1 抗体（1∶500）、claudin-5 抗体（1∶500）、occludin 抗体（1∶50 000）、P-gp 抗体（1∶1000）、GLUT-1 抗体（1∶100 000）和 β-actin 抗体（1∶2000），4 ℃孵育 24 h，TBST 洗涤 3 次；加入 HRP 辣根酶标

记山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体（1∶5000）孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，加入 ECL 发光试剂显影，采用 Image J 和 Quantity One 软件对蛋白条带进行灰度扫描及图像分析。

2.6 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对芍药苷在 MDCK-MDR1 细胞跨膜转运的影响

取处于对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞，以 2.5×10^5/mL 接种至 Transwell 小室，0.5 mL/孔，培养 7 d，每 2 天换液 1 次，测定细胞跨膜电阻值，当跨膜电阻值＞300 Ω/cm² 时，按“2.2”项下方法处理细胞，吸去 Transwell 小室内培养基，PBS 洗涤 2 次，加入 0.5 mL 含芍药苷（200 μg/mL）的高糖 DMEM 培养基，Transwell 下室加入 1.5 mL 高糖 DMEM 培养基，培养 4 h，吸取 200 μL 下室培养基，加入 180 μL 甲醇，涡旋 3 min，16 000 r/min 离心 10 min，取上清液，按课题组前期方法 LC-MS 系统测定芍药苷质量浓度[7]，计算芍药苷的表观渗透系数（P_{app}）。

$$P_{app}=dQ/(dt\cdot A\cdot C_0)$$

dQ/dt 为转运时间 dt 内的药物转运速率（μg/s）；A 为细胞单层表面积（cm²）；C_0 为 Transwell 小室内芍药苷的初始质量浓度（μg/mL）

2.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，计数资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，完全随机设计的多个样本均数比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）进行处理，两组间相互比较，满足方差齐性时用 LSD 检验，不满足方差齐性时用 T^2 检验。

3 结果

3.1 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞形态的影响

如图 1 所示，对照组 MDCK-MDR1 细胞清晰透亮，呈“铺路石”状，排列紧密，紧密连接清晰可见。与对照组比较，模型组细胞间隙增大，藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I 组随着剂量增加，细胞间隙明显增大；藁本内酯（80 μg/mL）、洋川芎内酯 A（80 μg/mL）组细胞整体回缩变圆，贴壁细胞数减少，紧密连接破坏严重；洋川芎内酯 I 组细胞形态与对照组相近，呈“铺路石”状，排列紧密。

3.2 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞存活率的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组 MDCK-MDR1 细胞存活率显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，藁本内酯（80 μg/mL）组、洋川芎内酯 A 组细胞存活率显著降低（$P<0.01$），洋川芎内酯 I（80 μg/mL）组细胞存活率显著升高（$P<0.05$）。表明洋川芎内酯 A（20～80 μg/mL）对细胞毒性较大，洋川芎内酯 I 在同等质量浓度范围内细胞毒性较小，且高剂量可提高 OGD/R 损伤的细胞存活率。

3.3 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞上清液 LDH 释放率的影响

以细胞上清液中 LDH 释放作为细胞损伤的指标，结果如图 3 所示，与对照组比较，模型组细胞上清液中 LDH 释放率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，藁本内酯（40、80 μg/mL）组、洋川芎内

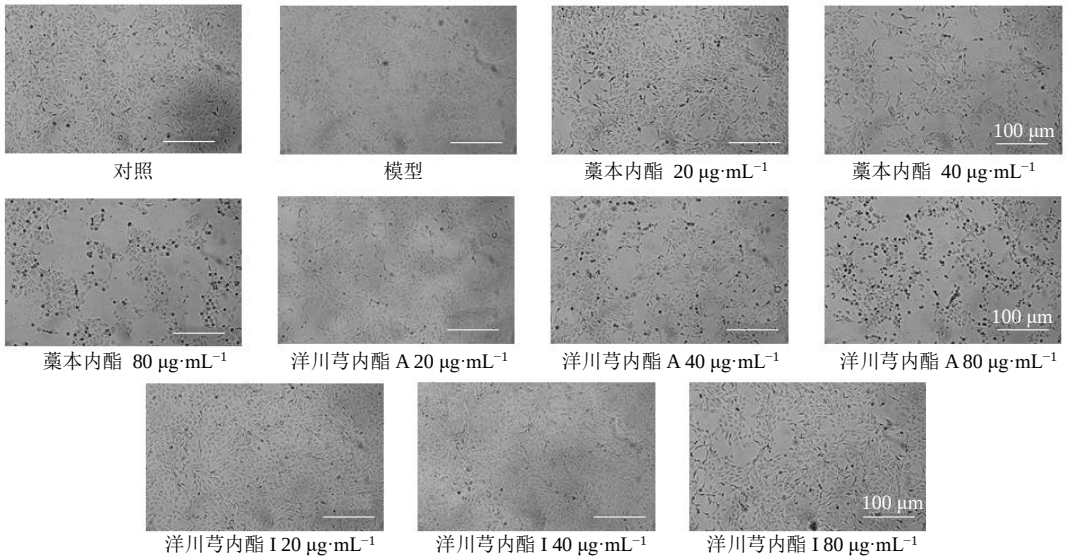
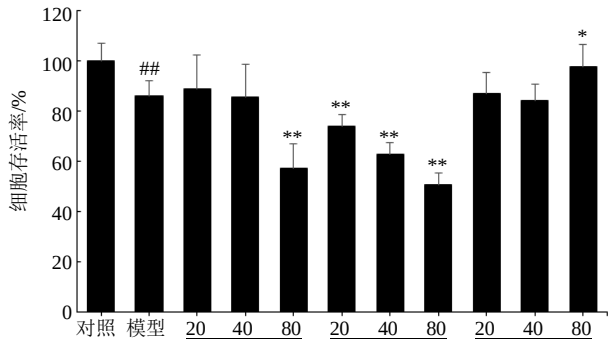


图 1 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞形态的影响 (×100)

Fig. 1 Effect of ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I on morphology of MDCK-MDR1 cells (× 100)



与对照组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01；与模型组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01，下图同

$^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* model group, same as belows

图 2　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2　Effect of ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I on survival rate of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

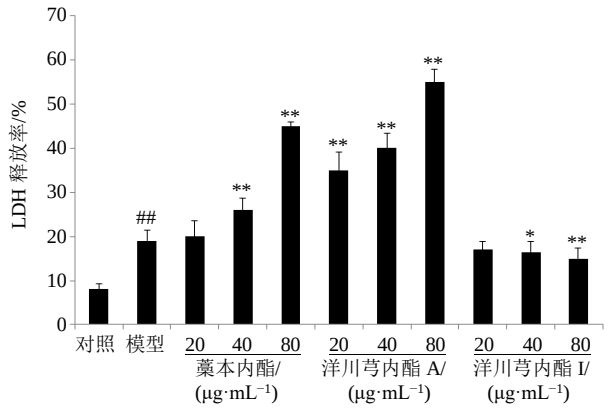


图 3　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞上清液 LDH 释放率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3　Effect of ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I on LDH release rate in supernatant of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

酯 A 组细胞上清液中 LDH 释放率显著升高（P＜0.01），洋川芎内酯 I（40、80 μg/mL）组细胞上清液中 LDH 释放率显著降低（P＜0.05、0.01）。表明洋川芎内酯 I 可改善 OGD/R 诱导的细胞损伤。

3.4　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞凋亡的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组细胞凋亡率显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，藁本内酯（20、40 μg/mL）组、洋川芎内酯 I 组细胞凋亡率显著降低（P＜0.01），藁本内酯（80 μg/mL）组、洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）组细胞凋亡率显著升高（P＜0.05、0.01）。

3.5　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞 ZO-1、claudin-5、occludin、P-gp 和 GLUT-1 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组细胞 claudin-5、occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01），GLUT-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，藁本内酯（20 μg/mL）组细胞 claudin-5、occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01），GLUT-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）；藁本内酯（40 μg/mL）组细胞 claudin-5、ZO-1 和 GLUT-1 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01），occludin 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01）；藁本内酯（80 μg/mL）组细胞 claudin-5、occludin、ZO-1 和 GLUT-1 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01），P-gp 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01）；洋川芎内酯 A（20 μg/mL）组细胞 claudin-5、ZO-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01），occludin 和 GLUT-1 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01）；洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）组细胞 claudin-5、occludin、ZO-1、GLUT-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）；洋川芎内酯 I（20 μg/mL）组细胞 claudin-5 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01），GLUT-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）；洋川芎内酯 I（40 μg/mL）组细胞 claudin-5、occludin、ZO-1 和 P-gp 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01），GLUT-1 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）；洋川芎内酯 I（80 μg/mL）组细胞 claudin-5、occludin 和 P-gp 蛋白表达水平显著升高（P＜0.01），ZO-1 和 GLUT-1 蛋白表达水平显著降低（P＜0.01）。

3.6　藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对芍药苷在 MDCK-MDR1 细胞跨膜转运的影响

以芍药苷为探针药物[11]，研究藁本内酯、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I 对芍药苷在 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞上跨膜转运的影响，如图 6 所示，与对照组比较，模型组细胞紧密连接受损，细胞膜通透性增加，芍药苷 P_{app} 显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，藁本内酯（20 μg/mL）组、洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）组和洋川芎内酯 I 组芍药苷 P_{app} 显著升高（P＜0.05、0.01），促进芍药苷的跨膜转运。

4　讨论

脑卒中是我国成年人致死、致残的首位病因，

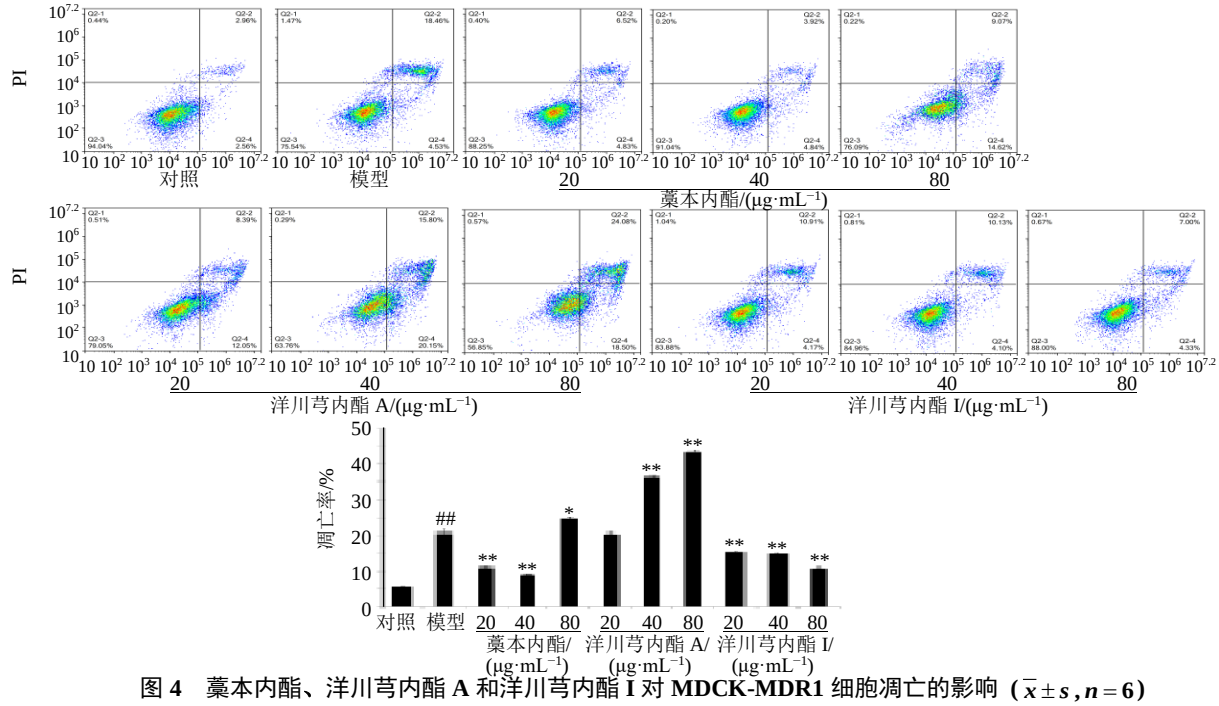


图 4 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 4 Effect of ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I on apoptosis of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

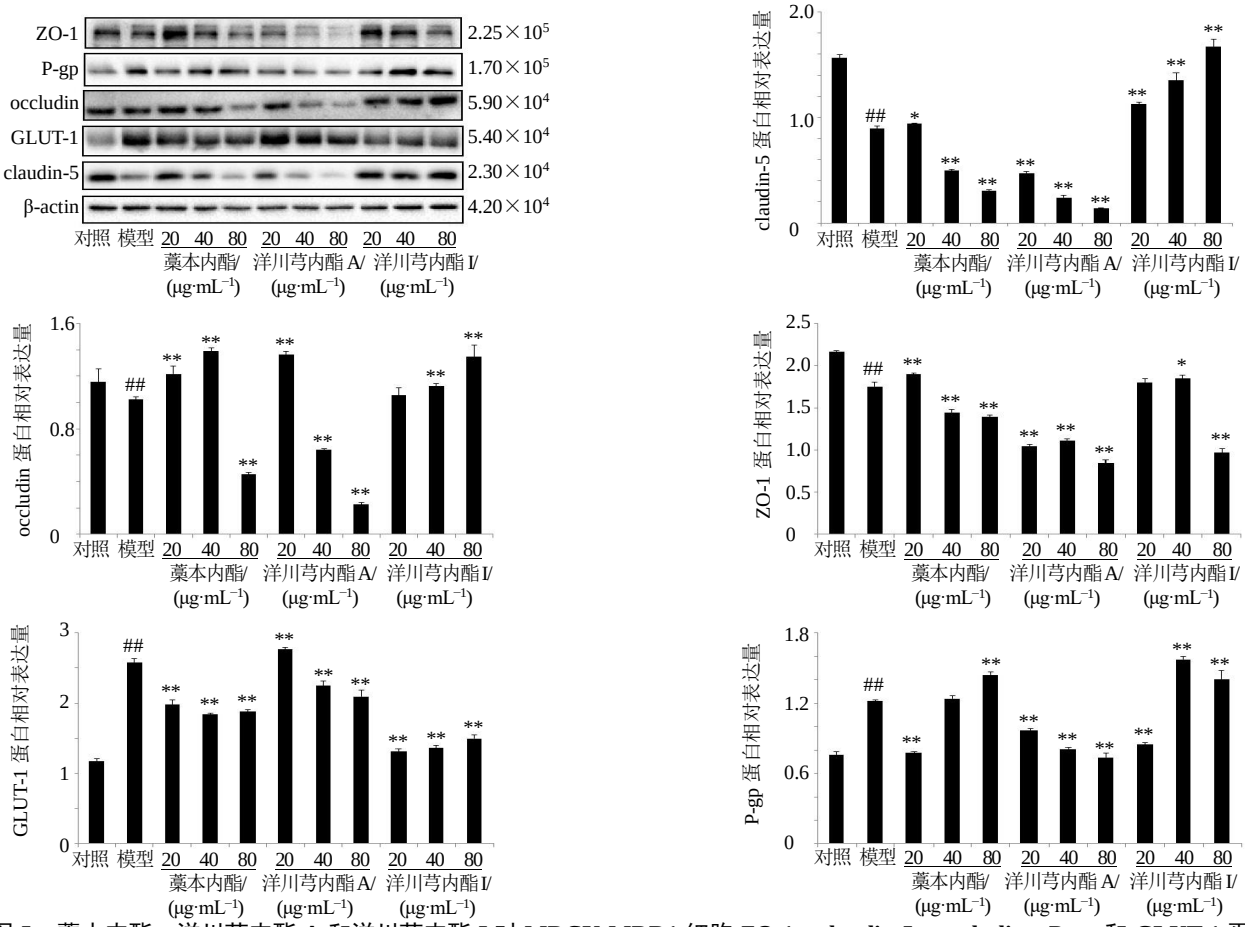


图 5 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对 MDCK-MDR1 细胞 ZO-1、claudin-5、occludin、P-gp 和 GLUT-1 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5 Effect of ligustilide, senkyunolide A and senkyunolide I on ZO-1, claudin-5, occludin, P-gp, and GLUT-1 protein expressions in MDCK-MDR1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

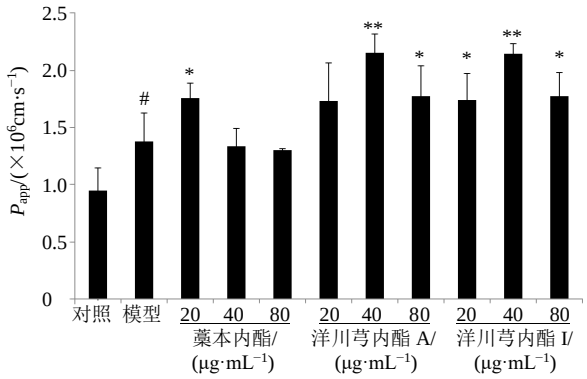


图 6 藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 对芍药苷在 MDCK-MDR1 细胞跨膜转运的影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

Fig. 6 Effect of ligustilide, senkyunolide A, and senkyunolide I on transport of paeoniflorin across membrane of MDCK-MDR1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

也是我国疾病致寿命损失的首位病因。目前最有效的治疗手段是溶栓、降纤，但脑组织在缺血状态下恢复供血，会加重脑损伤，病情进一步恶化，从而出现 CIRI，抑制细胞凋亡可以缓解缺血再灌注造成的伤害[12]。本研究结果表明，洋川芎内酯 A 和藁本内酯（80 μg/mL）会加剧 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞损伤，洋川芎内酯 I（80 μg/mL）显著升高 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞存活率；洋川芎内酯 I（40、80 μg/mL）显著抑制 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞上清液中 LDH 释放率，藁本内酯（40、80 μg/mL）和洋川芎内酯 A 显著促进 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞上清液中 LDH 释放；藁本内酯（20、40 μg/mL）和洋川芎内酯 I 显著抑制细胞凋亡，藁本内酯（80 μg/mL）和洋川芎内酯 A（40、80 μg/mL）显著促进细胞凋亡。因此，与藁本内酯和洋川芎内酯 A 相比，洋川芎内酯 I 在相同质量浓度下对 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞毒性较小，可抑制 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞凋亡和 LDH 释放，从而提高细胞膜的稳定性，保护受损细胞。低剂量藁本内酯具有类似洋川芎内酯 I 的作用，高剂量藁本内酯加速细胞损伤。洋川芎内酯 A（20～80 μg/mL）对 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞毒性较大，促进细胞凋亡和 LDH 释放。

血管内皮细胞间的紧密连接是血脑屏障维持结构与功能的重要基础。紧密连接蛋白 ZO-1 是其重要组成蛋白之一，血脑屏障的变化与 ZO-1 水平密切相关[13]。Claudin-5 是血脑屏障中最主要的跨膜蛋白，是紧密连接蛋白的主要组成部分，主要在脉络膜丛和脑毛细血管的内皮细胞中高表达[14-15]。Occludin 是一种由细胞内氨基和羧基末端组成的四通路跨膜蛋白，也是细胞旁屏障的功能成分[16]。血脑屏障的损伤在 CIRI 的发生发展中起重要作用。缺血性脑卒中再灌注后，缺血区线粒体能量代谢障碍、呼吸链受阻，导致活性氧自由基（reactive oxygen species，ROS）大量产生，ROS 攻击细胞膜并破坏细胞骨架，降解跨膜蛋白和胞质附着蛋白，破坏紧密连接蛋白复合体（tight junction protein systerm，TJPs），从而破坏血脑屏障[17]。炎性反应是缺血性脑卒中再灌注后损伤发生发展的重要病理过程，CIRI 引起炎性因子如肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）和 IL-6 大量释放，TNF-α 和 IL-1β 刺激中性粒细胞进一步产生炎性因子，从而诱发炎性级联反应，导致 TJPs 结构损坏，进而增加血脑屏障通透性[18-19]。通过药物干预保护脑 CIRI 大鼠 TJPs 结构能够有效降低血脑屏障通透性并缓解脑水肿，减轻 CIRI[20]。藁本内酯（5、10、20 μmol/L）能够通过上调紧密连接蛋白表达，保护 OGD 诱导的体外血脑屏障共培养细胞损伤[21]。本研究结果表明，20 μg/mL 藁本内酯能够通过上调紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白表达水平，恢复 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞生物屏障功能，但随剂量增加，紧密连接蛋白表达水平降低，血脑屏障膜通透性增加；洋川芎内酯 I（20～80 μg/mL）可上调紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白表达水平，恢复 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞生物屏障功能；洋川芎内酯 A（20～80 μg/mL）下调紧密连接蛋白表达水平，加剧血脑屏障损伤。

P-gp 是一种跨膜糖蛋白，在肝、肠、脑、肾、等组织中表达，P-gp 可通过促进外源性化合物外排，对组织器官起到保护作用[22]。缺血性脑卒中使 P-gp 水平显著升高，导致神经保护药物生物利用度降低、疗效减小[23]。抑制 P-gp 蛋白表达，可以增加 P-gp 底物维拉帕米细胞内质量浓度[24]。本研究结果显示，洋川芎内酯 A（20～80 μg/mL）可抑制外排蛋白 P-gp 表达水平，增加配伍药物的跨膜转运，从而提高疗效。20 μg/mL 藁本内酯、洋川芎内酯 I 可下调 P-gp 蛋白表达水平，但剂量升高时，可上调 P-gp 蛋白表达水平，不利于配伍药物的跨膜转运。

缺血性脑卒中大鼠缺血后葡萄糖水平降低，再灌注后葡萄糖水平略有提升，但再灌注 24 h 后仍未

恢复到基线水平[25]；由于缺血再灌注后大脑的能量需求增加，葡萄糖及其代谢显著影响缺血性脑卒中的疗效和长期恢复[26-27]，增加血脑屏障葡萄糖转运，缓解能量代谢障碍，可减少神经元死亡[28]。本研究结果显示，与对照组比较，模型组 GLUT-1 蛋白表达水平显著升高，表明葡萄糖需求增加，细胞代偿性上调 GLUT-1 用于自我修复。尼古丁/可替宁和含有尼古丁的电子烟蒸气可以显著降低缺血性脑卒中大脑葡萄糖的利用，加剧病情，其机制与下调 GLUT-1 蛋白表达水平有关[29]。与模型组比较，20 μg/mL 洋川芎内酯 A 显著增加 GLUT-1 蛋白表达水平，藁本内酯（20～80 μg/mL）、洋川芎内酯 I（20～80 μg/mL）和洋川芎内酯 A（40～80 μg/mL）均显著抑制 GLUT-1 蛋白表达水平，由于藁本内酯、洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 A 均可不同程度地下调 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞 GLUT-1 蛋白表达水平，减少细胞对葡萄糖的需求，因此可能加剧细胞损伤，但仍需进一步研究验证。

课题组前期研究表明芍药苷为难透血脑屏障的药物，其跨膜转运以被动扩散为主，兼有主动转运，为 P-gp 蛋白的底物，受到 P-gp 的外排作用。本研究结果表明，藁本内酯（20 μg/mL）显著增加芍药苷在 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞上的跨膜转运，藁本内酯（20 μg/mL）可上调紧密连接蛋白 ZO-1、claudin-5 和 occludin 表达水平，恢复血脑屏障的生物屏障功能，减小芍药苷的细胞间隙转运，但可能由于以抑制 P-gp 蛋白表达、增加芍药苷跨膜转运为主，最终表现为芍药苷跨膜转运增加。藁本内酯（80 μg/mL）可以显著减少芍药苷在 OGD/R 诱导的 MDCK-MDR1 细胞上的跨膜转运，由于藁本内酯（80 μg/mL）下调紧密连接蛋白 ZO-1、claudin-5 和 occludin 蛋白表达水平，增加膜通透性，增加芍药苷的细胞间隙转运，但可能由于以上调 P-gp 蛋白表达水平、减少芍药苷跨膜转运为主，最终表现为芍药苷跨膜转运减小。洋川芎内酯 A 促进芍药苷跨膜转运，可能与洋川芎内酯 A 抑制紧密连接蛋白和 P-gp 外排蛋白表达水平有关；洋川芎内酯 I 细胞毒性最低，使细胞紧密相连，显著上调 P-gp 蛋白表达，但仍增加了芍药苷的转运，可能与其他机制有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zeng C S, Wang D S, Chen C, *et al*. Zafirlukast protects blood-brain barrier integrity from ischemic brain injury [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 316: 108915.

[2] Tressera-Rimbau A, Arranz S, Eder M, *et al*. Dietary polyphenols in the prevention of stroke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7467962.

[3] Hsu W H, Shen Y C, Shiao Y J, *et al*. Combined proteomic and metabolomic analyses of cerebrospinal fluid from mice with ischemic stroke reveals the effects of a Buyang Huanwu Decoction in neurodegenerative disease [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0209184.

[4] Dou B, Zhou W, Li S, *et al*. Buyang Huanwu Decoction attenuates infiltration of natural killer cells and protects against ischemic brain injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1286-1300.

[5] Shen Y C, Lu C K, Liou K T, *et al*. Common and unique mechanisms of Chinese herbal remedies on ischemic stroke mice revealed by transcriptome analyses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 370-382.

[6] Wu W, Qiu C, Feng X, *et al*. Protective effect of paeoniflorin on acute cerebral infarction in rats [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(8): 702-709.

[7] 胡鹏翼, 刘丹, 郑琴, 等. 川芎活性成分对天麻素在 MDCK-MDR1 细胞上跨膜转运的影响及机制 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(14): 1234-1240.

[8] Hu P Y, Liu D, Zheng Q, *et al*. Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through Mdck-Mdr1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 300.

[9] Zheng Q, Tang Y, Hu P Y, *et al*. The influence and mechanism of ligustilide, senkyunolide I, and senkyunolide A on echinacoside transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(3): 426-435.

[10] Hu S N, Wu Y L, Zhao B, *et al*. *Panax notoginseng* saponins protect cerebral microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced barrier dysfunction via activation of PI3K/Akt/Nrf2 antioxidant signaling pathway [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2781.

[11] Kokubu Y, Yamaguchi T, Kawabata K. *In vitro* model of cerebral ischemia by using brain microvascular endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 577-583.

[12] 徐文韬, 李一阳, 倪光夏. 脑缺血再灌注后血脑屏障损伤及针灸干预机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学

报, 2017, 19(8): 53-59.

[13] Wang Y, Peng F, Xie G, *et al*. Rhubarb attenuates blood-brain barrier disruption via increased zonula occludens-1 expression in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 250-256.

[14] Morita K, Sasaki H, Furuse M, *et al*. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(1): 185-194.

[15] Nitta T, Hata M, Gotoh S, *et al*. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(3): 653-660.

[16] Zhang G S, Tian Y, Huang J Y, *et al*. The γ-secretase blocker DAPT reduces the permeability of the blood-brain barrier by decreasing the ubiquitination and degradation of occludin during permanent brain ischemia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(1): 53-60.

[17] Wang X, Liu Y, Sun Y, *et al*. Blood brain barrier breakdown was found in non-infarcted area after 2h MCAO [J]. *J Neurol Sci*, 2016, 363: 63-68.

[18] He Y H, Xiao Y F, Yang X F, *et al*. SIRT6 inhibits TNF-α-induced inflammation of vascular adventitial fibroblasts through ROS and Akt signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1): 88-97.

[19] 陆正齐. 血脑屏障在缺血性卒中病程中的破坏与保护策略 [J]. 中山大学学报: 医学版, 2019, 40(5): 641-647.

[20] 牛晓珊, 杨丽娟, 补娟. 刺槐素对小鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2020, 27(5): 572-575.

[21] Wu S, Wang N, Li J, *et al*. Ligustilide ameliorates the permeability of the blood-brain barrier model *in vitro* during oxygen-glucose deprivation injury through HIF/VEGF pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73(5): 316-325.

[22] Yano K, Tomono T, Ogihara T. Advances in studies of P-glycoprotein and its expression regulators [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(1): 11-19.

[23] DeMars K M, Yang C J, Hawkins K E, *et al*. Spatiotemporal changes in P-glycoprotein levels in brain and peripheral tissues following ischemic stroke in rats [J]. *J Exp Neurosci*, 2017, 11: 1179069517701741.

[24] Fang W, Lv P, Geng X, *et al*. Penetration of verapamil across blood brain barrier following cerebral ischemia depending on both paracellular pathway and P-glycoprotein transportation [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(1): 23-30.

[25] 张潇. 人参皂苷 Rd 对大鼠脑缺血后细胞间液生物活性小分子含量的影响 [D]. 西安: 第四军医大学, 2010.

[26] Vannucci S J, Seaman L B, Vannucci R C. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(1): 77-81.

[27] McCall A L, van Bueren A M, Nipper V, *et al*. Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(1): 69-76.

[28] 毛捷, 陈劲草, 黄军, 等. GM1 对大鼠脑缺血再灌注损伤的谷氨酸、天门冬氨酸、乳酸及葡萄糖含量的影响 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(3): 193-196.

[29] Sifat A E, Vaidya B, Kaisar M A, *et al*. Nicotine and electronic cigarette (E-Cig) exposure decreases brain glucose utilization in ischemic stroke [J]. *J Neurochem*, 2018, 147(2): 204-221.

[责任编辑 李亚楠]