

张弅宁,靳晓飞,唐敬龙,等. 毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 41-49.

Zhang XN, Jin XF, Tang JL, et al. Effect of calycosin on PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 41-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11.007

毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤

张弅宁,靳晓飞,唐敬龙,赵艳萌,周晓红,高维娟*

(河北中医学院,河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050091)

【摘要】 目的 探讨毛蕊异黄酮(calycosin)对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤的影响。**方法** 采用缺氧缺糖/复氧复糖(OGD/R)模型,将 PC12 细胞随机分为 5 组:正常对照组(control 组),缺氧缺糖/复氧复糖组(model 组),毛蕊异黄酮高、中、低剂量(0.140 μmol/L、0.070 μmol/L、0.035 μmol/L)组。倒置显微镜观察细胞形态变化;CCK-8 法检测细胞活力;LDH 法检测细胞乳酸脱氢酶漏出率;PI 荧光染色检测细胞膜完整性;免疫组化法检测 caspase-3 表达;Bax、Bcl-2 免疫荧光法检测细胞凋亡情况。**结果** Control 组细胞生长状态良好;与 control 组比较,model 组细胞数量减少,突触减少,细胞出现皱缩,胞膜破坏,细胞活性显著降低($P < 0.05$),乳酸脱氢酶漏出率显著升高($P < 0.05$),PI 红染细胞数增多($P < 0.05$),caspase-3 表达明显升高($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著升高($P < 0.05$);与 model 组比较,calycosin 中、低剂量组细胞数量均增多,突触增多,细胞较为规整,细胞活性显著提高($P < 0.05$),乳酸脱氢酶漏出率显著降低($P < 0.05$),PI 红染细胞数减少($P < 0.05$),caspase-3 表达显著降低($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著降低($P < 0.05$),且以上指标中剂量组效果更加显著;而高剂量组与模型组比较,以上指标差异均不明显($P > 0.05$)。**结论** 毛蕊异黄酮可优化缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞生长状态,提高细胞活力,抑制乳酸脱氢酶漏出,并通过降低 caspase-3 表达和 Bax/Bcl-2 比值抑制细胞凋亡,有效减轻细胞损伤,发挥保护作用。

【关键词】 毛蕊异黄酮;缺血性脑卒中;缺氧缺糖/复氧复糖;细胞凋亡;PC12 细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0041-09

Effect of calycosin on PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation

ZHANG Xuening, JIN Xiaofei, TANG Jinglong, ZHAO Yanmeng, ZHOU Xiaohong, GAO WeiJuan*
(Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease,
Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of calycosin on the injury of oxygen and glucose deprivation/reoxygenation PC12 cells. **Methods** PC12 cells were randomly divided into 5 groups: control group; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) (model group); and high, medium, and low (0.140 μmol/L, 0.070 μmol/L, 0.035 μmol/L) dose groups of calycosin. The CCK-8 method was used to detect cell viability, the lactate dehydrogenase

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873180);河北省中医药管理局科研计划项目(2019093);河北省教育厅青年基金项目(QN2018059);河北省研究生创新资助项目(CXZZSS2019066);河北中医学院优秀青年教师基础研究计划项目(YQ2018005);河北中医学院青年教师科研基金项目(QNZ2018001)。

【作者简介】 张弅宁(1990—),女,硕士研究生,专业:中西医结合临床。E-mail: 1142551926@qq.com

【通信作者】 高维娟(1966—),女,博士生导师,教授,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail: gwj6088@163.com

leakage rate in cells was determined with the LDH method, cell morphology was observed with an inverted microscope, cell membrane integrity was detected with PI fluorescence staining, caspase-3 expression was detected by immunohistochemistry, and Bax and Bcl-2 immunofluorescence staining was used to detect apoptosis. **Results** The cells in the control group grew well. Compared with the control group, the number of cells in the model group decreased, the cells appeared to shrink, cell membranes were destroyed, cell activity decreased significantly ($P < 0.05$), the lactate dehydrogenase leakage rate was significantly increased ($P < 0.05$), the number of PI red-stained cells increased significantly ($P < 0.05$), the expression of caspase-3 was significantly increased ($P < 0.05$), and the ratio of Bax/Bcl-2 increased significantly ($P < 0.05$). There were no significant differences observed between the model group and the high dose group ($P > 0.05$). However, the number of cells in the middle and low dose groups increased, the cells showed regular morphology, the membrane damage was reduced ($P < 0.05$), the cell viability was significantly increased ($P < 0.05$), the lactate dehydrogenase leakage rate was significantly decreased ($P < 0.05$), the number of PI red-stained cells decreased ($P < 0.05$), the expression of caspase-3 was significantly decreased ($P < 0.05$), and the ratio of Bax/Bcl-2 was significantly lower ($P < 0.05$). The changes in the above indicators were more significant in the middle dose group, with the differences between the high dose group and the model group not reaching statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusions** Calycosin can optimize the growth status of PC12 cells following injury through oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, improve cell viability, inhibit lactate dehydrogenase leakage, and inhibit cell apoptosis by reducing caspase-3 expression and the Bax/Bcl-2 ratio, effectively alleviating cell damage and playing a protective role.

【Keywords】 calycosin; ischemic stroke; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); apoptosis; PC12 cell

脑卒中(stroke)发病率逐年攀升,发病人群已经出现年轻化趋势,严重影响着居民身体健康和生 活质量,给患者家庭和社会造成了沉重的经济负担。脑卒中可分缺血性脑卒中和出血性脑卒中两大类,其中缺血性脑卒中更为多见。溶栓治疗是缺血性脑卒中的首选治疗方法,由于溶栓后缺血血管的再灌注,会给患者带来再次损伤,故疗效不佳。因此,寻求特效药物已成为防治缺血性脑卒中的研究重点。目前,临床上应用中药黄芪治疗缺血性脑卒中已取得良好效果,但其具体药效成分尚未完全证实,亟待探究。毛蕊异黄酮(calycosin)是黄芪黄酮类的有效单体成分,研究发现毛蕊异黄酮具有抗氧化、抗炎、抗病毒、保肝、延缓衰老等生物作用^[1],但其在缺血性脑卒中方面尚缺乏研究。本实验采用缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞模型,模拟神经元体外缺血再灌注的环境,在细胞水平,探讨毛蕊异黄酮对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤的影响,为筛选黄芪治疗缺血性脑卒中的药效成分提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系,经过神经生长因子 NGF 处理后具有神经元的相关特性)购自 Boster 公司。

1.2 主要试剂与仪器

毛蕊异黄酮购自上海士峰生物制品有限公司,20 mg/瓶,纯度 $\geq 98\%$; CCK-8 试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; Bcl-2 抗体、Bax 抗体、DAPI 染色剂、Cy3 和 Alexa Fluor488 荧光二抗均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; PI 染色剂购自美国 Sigma 公司; caspase-3 抗体购自 Gene Tex 公司; LDH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM 高糖培养液、胰蛋白酶购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司; Earle's 平衡盐溶液购自安徽雷根生物技术有限公司; 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。

SW-CJ-ID 型超净工作台购自苏州净化公司; Axio Observer 7 型倒置荧光显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司; DPX-9052B-1 型电热恒温培养箱购自上海福玛实验设备有限公司; 3111 型二氧化碳(CO₂)培养箱、Multiskan FC 型酶标仪、3131 型三气培养箱均购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及 PC12 细胞模型的建立

将 PC12 细胞随机分为 5 组: 正常对照组(control 组)、缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)组(model 组)、毛蕊异黄酮高剂量(0.140 $\mu\text{mol/L}$)组、毛蕊异

黄酮中剂量(0.070 $\mu\text{mol/L}$)组、毛蕊异黄酮低剂量(0.035 $\mu\text{mol/L}$)组。正常对照组采用 DMEM 培养液(10%胎牛血清)于 CO_2 培养箱内正常培养,其余各组细胞均建立缺氧缺糖/复氧复糖细胞模型:用无糖 Earle's 平衡盐溶液替代 DMEM 培养液,置于三气培养箱(94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2)内培养 2 h,即氧、糖剥夺 2 h,之后模型组更换为 DMEM 培养液,给药组则更换为含有不同浓度毛蕊异黄酮(0.140 $\mu\text{mol/L}$ 、0.070 $\mu\text{mol/L}$ 、0.035 $\mu\text{mol/L}$)的培养液,放入 CO_2 培养箱内继续培养 24 h,即复氧复糖 24 h。

1.3.2 CCK-8 法检测各组细胞活性

各组细胞以 $1 \times 10^6/\text{L}$ 的密度接种于 96 孔板,OGD/R 造模和给药处理后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于 CO_2 培养箱中孵育 50 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值。OD 值越大,细胞活性越强。细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率

造模和给药处理后,取出各组细胞,按照 LDH 试剂盒操作步骤,在 96 孔板中分别加入各组细胞上清液和 LDH 试剂,充分混匀,室温静置 5 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值,此为细胞上清液中的 LDH 含量。之后向原含有细胞的培养板内加入 1% Tritonx-100,室温破膜 20 min 后,取细胞培养液和 LDH 试剂混匀,室温静置 5 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值,此为细胞破膜液 LDH 释放量。LDH 漏出率(%)=上清 LDH/(上清 LDH+细胞破膜液 LDH) $\times 100\%$ 。

1.3.4 PI 荧光染色观察各组细胞膜完整性

配制 PI 工作液 20 $\mu\text{g/mL}$ 于 PBS 中,避光配置,现配现用,取出各组细胞爬片,PBS 清洗 1 min $\times$ 3 次,加入 PI 工作液,37 $^\circ\text{C}$ 电热恒温培养箱中避光孵育 30 min,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,待细胞爬片稍干后,封片,红染的细胞为阳性细胞,荧光显微镜下随机选取 6 个视野,观察各组细胞的荧光表达。PI 阳性细胞发生率=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 免疫组化法检测各组细胞 caspase-3 表达

细胞传代时,进行细胞爬片预培养,之后给予造模给药处理,取出各组细胞爬片,用含 4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液固定 25 min,室温干燥 5 min,PBS 清洗 2 min $\times$ 3 次,待爬片甩干后,每个爬片滴加 50~100 μL 0.2% Triton X-100 细胞破膜液,室温破

膜 20 min,5%山羊血清封闭 20 min,甩掉封闭液后,滴加 caspase-3 单克隆抗体(1:600),4 $^\circ\text{C}$ 过夜,洗去一抗,滴加山羊抗兔 IgG(1:200)二抗,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min,洗去二抗,DAB 显色 15 min,苏木素复染 10 min,脱水,透明,封片。显微镜下随机选取 6 个视野,采用 Image J 软件分析 caspase-3 平均光密度值,用积分光密度 IOD/Area 表示。

1.3.6 免疫荧光法检测各组细胞 Bax、Bcl-2 表达

各组细胞爬片、固定、破膜同上述免疫组化步骤,各组细胞破膜后,加 4% BSA 室温封闭 30 min,甩掉封闭液后,滴加 Bax 抗体(1:100)和 Bcl-2 抗体(1:100)50~100 μL 于爬片上,4 $^\circ\text{C}$ 过夜,洗去一抗,滴加山羊抗小鼠 IgG(1:300)和驴抗兔 IgG(1:200)二抗,室温避光孵育 60 min,洗去二抗,滴加 DAPI 染液室温避光 10 min,封片,荧光显微镜下随机选取 6 个视野,观察各组细胞的荧光表达。Bax 为红色荧光,Bcl-2 为绿色荧光,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 Bax 与 Bcl-2 的荧光强度值,并计算 Bax/Bcl-2 比值。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,各组数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

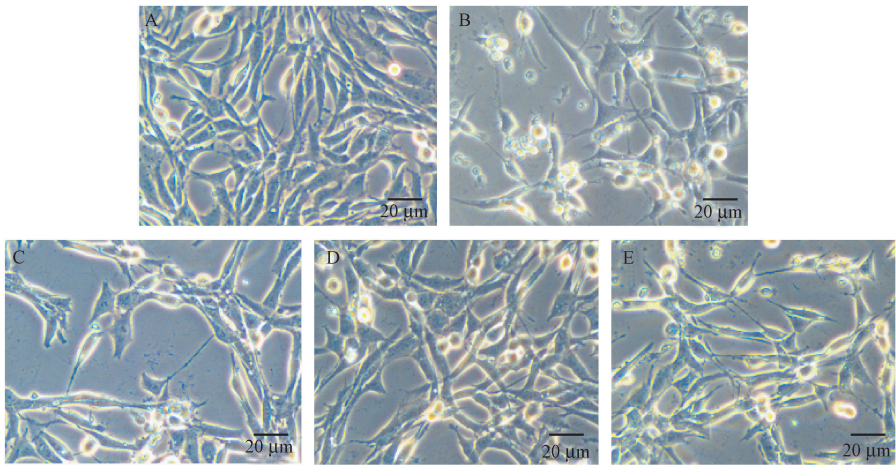
2 结果

2.1 倒置显微镜观察各组细胞形态

Control 组细胞形态饱满,折光性较好;与 control 组相比,OGD/R 处理后,PC12 细胞的折光性降低,突触减少,细胞干瘪,细胞数量减少;与 model 组相比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组显著改善 OGD/R 诱导的细胞损伤,PC12 细胞突触增多,胞体变圆,且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞恢复较好;calycosin 高剂量组与 model 组相比无明显差异。见图 1。

2.2 CCK-8 法检测各组细胞活性

与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞的活性明显降低($P < 0.05$);与 model 组对比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可显著提高 OGD/R 诱导的 PC12 细胞活性($P < 0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞活性较高($P < 0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组对比无显著性差异($P > 0.05$)。见图 2。

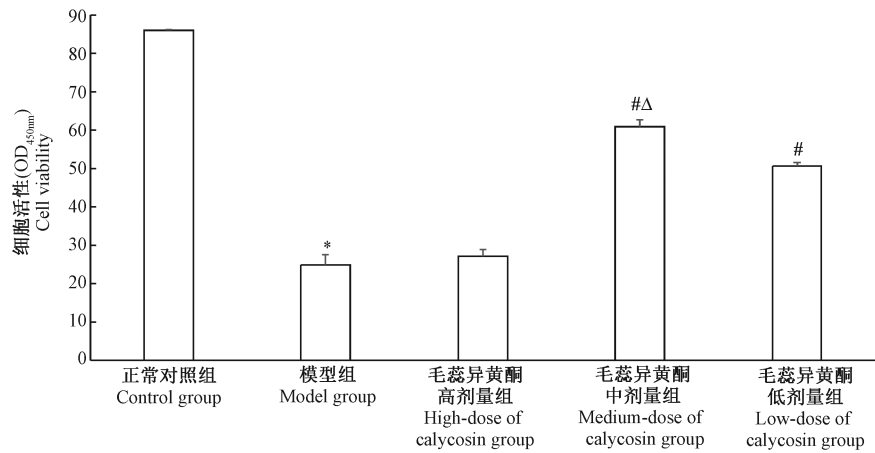


注:A:正常对照组;B:模型组;C:毛蕊异黄酮高剂量组;D:毛蕊异黄酮中剂量组;E:毛蕊异黄酮低剂量组。

图 1 倒置显微镜下观察各组细胞形态(×400)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group.

Figure 1 Observation of cell morphology in each group under an inverted microscope



注:与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$; 与毛蕊异黄酮低剂量组相比, Δ $P < 0.05$ 。

图 2 CCK-8 法检测各组细胞活性($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P < 0.05$.

Figure 2 Cell viability was determined in each group with CCK-8

2.3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率

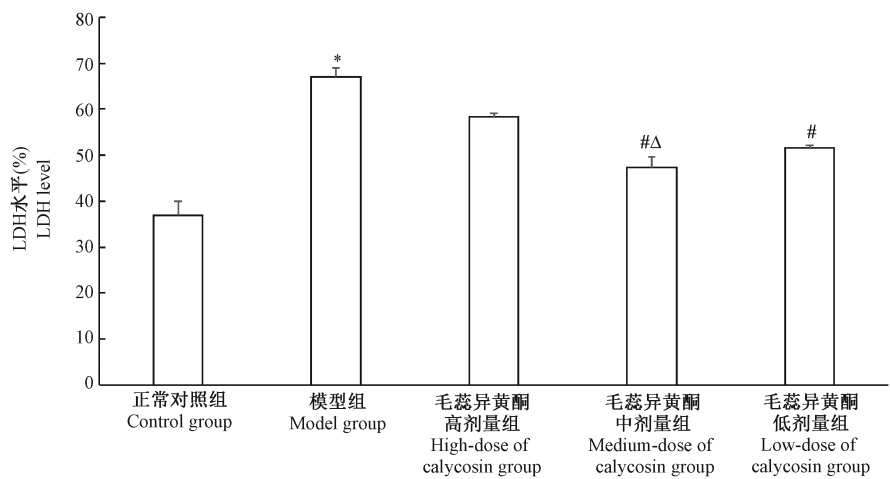
与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞的乳酸脱氢酶漏出率明显提高($P < 0.05$);与 model 组对比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可显著降低 OGD/R 诱导的 PC12 细胞乳酸脱氢酶漏出率($P < 0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组乳酸脱氢酶漏出率较低($P < 0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组对比无显著性差异($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 PI 荧光染色观察各组细胞胞膜完整性

PI 是一种不透膜的红色荧光染料,不能通过活细胞膜,但却能穿过破损的细胞膜而对核染色。与 control 组相比,OGD/R 处理后,PC12 细胞红染数明显增多($P < 0.05$);与 model 组相比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组红染细胞数减少($P < 0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞红染数较少($P < 0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组相比无明显差异($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 免疫组化法检测各组细胞 caspase-3 表达

与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞

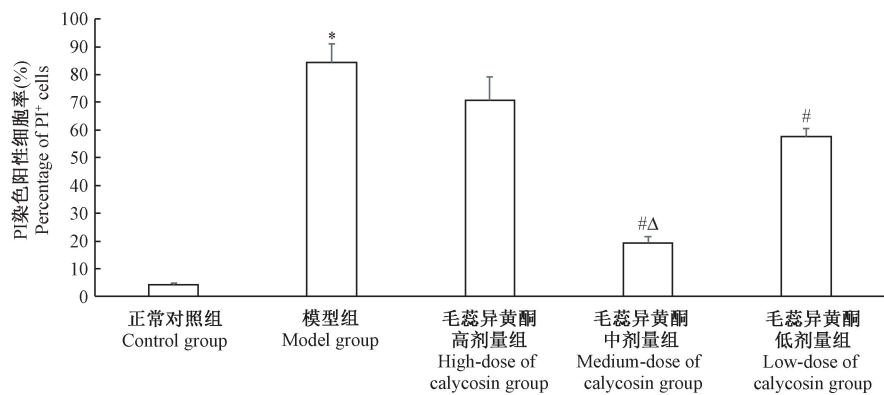
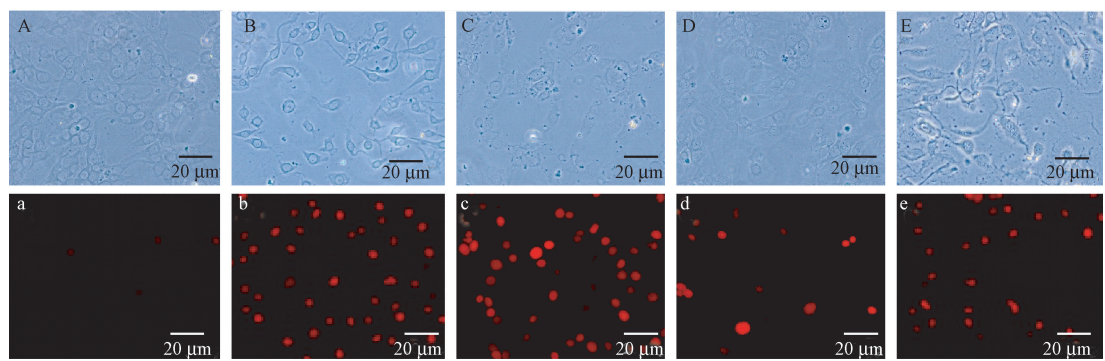


注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 3 Detection of the lactate dehydrogenase leakage rate with LDH



注:A、a;正常对照组;B、b;模型组;C、c;毛蕊异黄酮高剂量组;D、d;毛蕊异黄酮中剂量组;E、e;毛蕊异黄酮低剂量组。A~E:倒置荧光显微镜相差下拍摄图片($\times 400$);a~e:倒置荧光显微镜下拍摄的荧光图片($\times 400$)。与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 4 PI 荧光染色检测各组细胞膜完整性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A & a, Control group. B & b, Model group. C & c, High-dose of calycosin group. D & d, Medium-dose of calycosin group. E & e, Low-dose of calycosin group. A-E, Pictures taken under inverted fluorescence microscope with phase difference. a-e, Fluorescent images taken under inverted fluorescent microscope. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 4 PI fluorescence staining to detect cell membrane integrity in each group

caspase-3 表达显著升高 ($P<0.05$); 与 model 组相比, calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可明显减少 caspase-3 表达 ($P<0.05$), 且与 calycosin 低剂量组相比, calycosin 中剂量组 caspase-3 表达较低 ($P<0.05$); calycosin 高剂量组与 model 组对比差异不明显 ($P>0.05$)。见图 5。

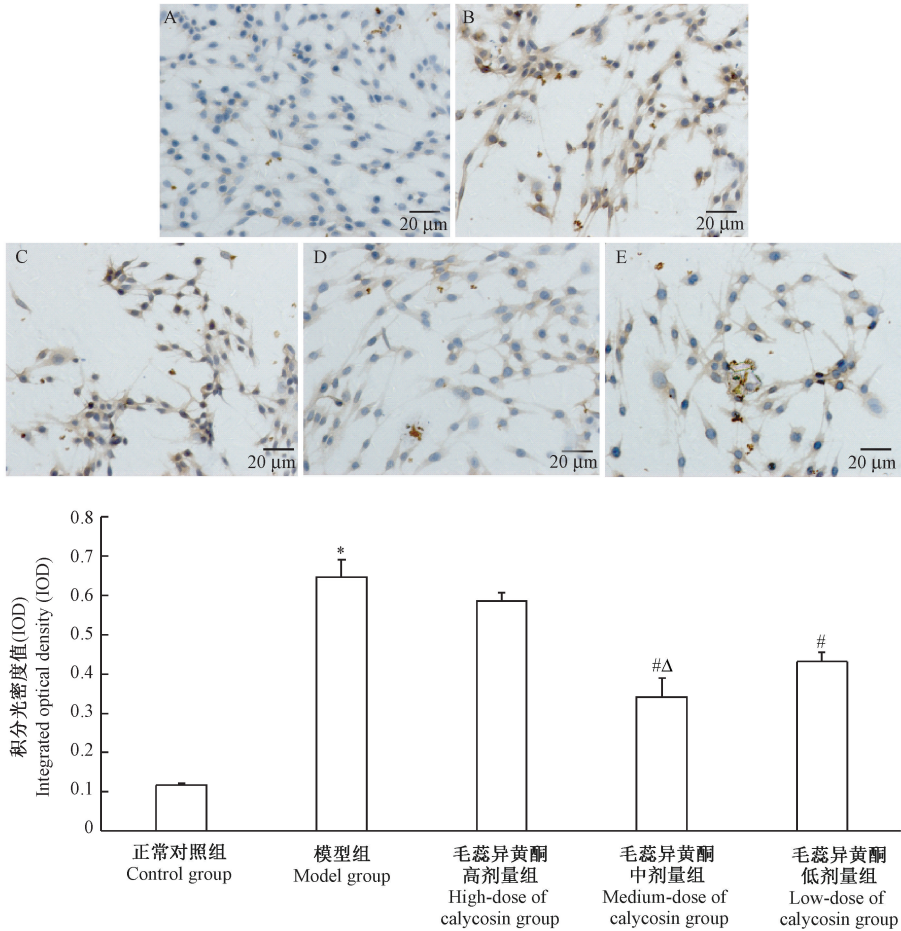
2.6 免疫荧光法检测各组细胞 Bax、Bcl-2 表达

与 control 组相比, OGD/R 处理后, 细胞出现凋亡, Bax/Bcl-2 比值明显升高 ($P<0.05$); 与 model 组相比, calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组 Bax/Bcl-2 比值明显降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡程度减轻, 且与 calycosin 低剂量组相比, calycosin 中剂量组降低更明显 ($P<0.05$); calycosin 高剂量组与 model 组

对比无显著差异 ($P>0.05$)。见图 6。

3 讨论

目前, 早期恢复血流是治疗缺血性脑卒中的最好方法, 但恢复血液供应也可能加剧缺血组织损伤, 产生较为严重的病理反应——脑缺血再灌注损伤, 其发生机制主要涉及细胞凋亡、钙超载、氧化应激、炎症反应等因素^[2], 各因素之间相互作用, 致使脑组织产生不可逆性损伤。脑缺血后再灌注引起的迟发型神经细胞死亡多以细胞凋亡为主, 在线粒体调控的细胞凋亡途径中, Bcl-2 蛋白家族发挥着关键作用, caspase-3 在启动线粒体途径细胞凋亡过程中扮演着重要角色。Bcl-2 家族蛋白可以与孔蛋白

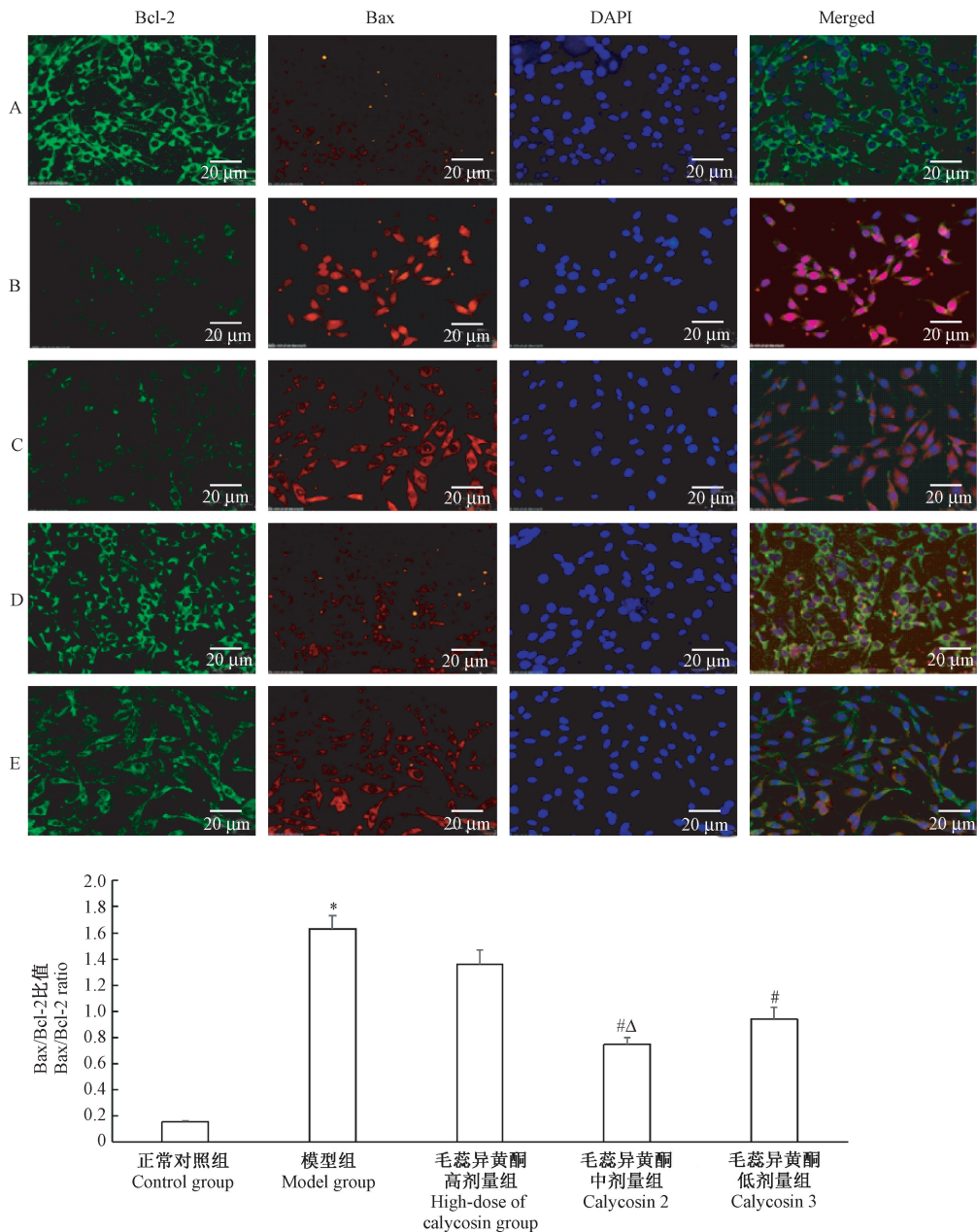


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: 毛蕊异黄酮高剂量组; D: 毛蕊异黄酮中剂量组; E: 毛蕊异黄酮低剂量组。与对照组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$; 与毛蕊异黄酮低剂量组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 5 免疫组化法观察各组细胞 caspase-3 表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 5 Immunohistochemical staining for caspase-3 expression in each group



注:A:正常对照组;B:模型组;C:毛蕊异黄酮高剂量组;D:毛蕊异黄酮中剂量组;E:毛蕊异黄酮低剂量组。绿色荧光:Bcl-2;红色荧光:Bax;蓝色荧光:DAPI。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比,Δ $P<0.05$ 。

图6 免疫荧光染色检测各组细胞 Bax 和 Bcl-2 的比值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group. Green fluorescence, Bcl-2. Red fluorescence, Bax. Blue fluorescence, DAPI. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 6 Detection of the Bax/Bcl-2 ratio by immunofluorescence staining

相互作用,使位于线粒体内、外膜的通透转换孔 PTP 开放,大量的有机溶质进入细胞内,导致线粒体内膜膨胀破裂,CytC、AIF 等释放入胞质,激活 caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[3]。Bax、Bcl-2 是 Bcl-

2 蛋白家族的重要成员,当细胞受到缺血等刺激时,位于胞质中的 Bax 向线粒体膜聚集,促使线粒体膜通透性改变,进而释放 CytC,诱导 caspase-3 活化,引起细胞凋亡;而 Bcl-2 作为一种与线粒体相关的膜

稳定蛋白,能够维持和保护膜的稳定性,与 Bax 形成异源二聚体,抑制 caspase-3 活化,阻止细胞凋亡的发生^[4,5]。

中药黄芪是临床常用补气要药,始载于《神农本草经》,具有保元补虚、益卫固表、利尿消肿的功效。大量医籍记载和实验发现,黄芪不仅具有补气保元的作用,还具有良好的活血化瘀之功。古代医家根据中医“气为血之帅”、“血为气之母”、“气能生血”、“气行则血行”等理论,常以黄芪配伍成方,治疗中风之半身不遂后遗症。补阳还五汤即为治疗中风的代表方剂,重用君药黄芪,意在气旺则血行,瘀去则络脉通畅,在临床上应用至今,尤其在治疗缺血性中风方面疗效显著^[6-10]。现代药理学研究发现,黄芪的主要活性成分包括黄酮、皂苷、多糖三大类成分^[11]。研究者通过大量离体或在体实验,对黄芪主要活性成分进行了深入研究,发现黄芪三大主要成分在抗炎、抗氧化、调控自噬、调节血压、促进干细胞增值、改善认知功能障碍等方面均发挥着重要作用,其中黄芪黄酮类成分更是受到越来越多的关注^[12-15]。

黄芪黄酮类化合物主要包括异黄酮、黄酮、异黄酮烷和紫檀烷四大类,毛蕊异黄酮(calycosin)是异黄酮类代表性有效单体成分,是检测黄芪质量的重要参考指标,具有抗氧化、促进细胞增殖、延缓衰老、抗炎、抗心肌肥厚等生物作用。LIU 等^[16]采用 B3LYP 方法对黄芪中毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷 4 种成分进行了研究,发现毛蕊异黄酮的抗氧化活性最为显著,其抗氧化性明显高于其它 3 种成分。朱嘉欢等^[17,18]研究表明毛蕊异黄酮与阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素联合应用时,可以明显降低衰老造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)衰老时细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平,能够抑制 HSCs 衰老和促进其增殖。赵海鹏等^[19]研究发现,毛蕊异黄酮可通过激活 AMPK 通路,抑制炎症因子 IL-6 和 IL-8 活性和 NF- κ B 的过度激活,从而减轻 PM2.5 诱导的小鼠肺泡上皮细胞系 MLE12 细胞损伤和炎症反应。

毛蕊异黄酮作为黄芪黄酮类的重要有效单体成分,在抗氧化、抗炎、促进细胞增殖、延缓衰老等方面均有应用,但是目前尚缺乏毛蕊异黄酮防治缺血性脑卒中方面的研究,亟需探索。本研究通过体外实验,建立 PC12 细胞的缺氧缺糖/复氧复糖(OGD/R)模型模拟神经细胞缺血再灌注环境,在细

胞水平,探讨了不同剂量(高剂量 0.140 $\mu\text{mol/L}$ 、中剂量 0.070 $\mu\text{mol/L}$ 、低剂量 0.035 $\mu\text{mol/L}$)毛蕊异黄酮对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤的影响。实验结果显示,毛蕊异黄酮中、低剂量组可明显提高 OGD/R 诱导的 PC12 细胞活力,降低乳酸脱氢酶漏出率,有效改善 OGD/R 引起的 PC12 细胞皱缩、膜破坏等现象,降低促凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax 表达,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,从而显著减轻 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤,其中毛蕊异黄酮中剂量组效果更为显著,而高剂量组与模型组比较无明显差异。表明毛蕊异黄酮可优化缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞生长状态,提高细胞存活率,抑制细胞凋亡,发挥保护作用,且其药物作用无剂量依赖性。目前,毛蕊异黄酮减轻 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤是本课题组针对毛蕊异黄酮在防治缺血性脑卒中方面的一个初步探讨,其具体作用机制尚不明朗,本课题组将继续深入探讨毛蕊异黄酮拮抗脑缺血再灌注损伤、发挥神经保护作用的分子机制,为黄芪治疗缺血性脑卒中药效成分的筛选提供更有力的实验依据。

参考文献:

- [1] Li S, Zhou XL, Dang YY, et al. Basal Ftl1 tyrosine kinase activity is a positive regulator of endothelial survival and vascularization during zebrafish embryogenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(2): 373-384.
- [2] Wang J, Han D, Sun M, et al. Cerebral ischemic postconditioning induces autophagy inhibition and a HMGB1 secretion attenuation feedback loop to protect against ischemia reperfusion injury in an oxygen glucose deprivation cellular model [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4162-4172.
- [3] Yatsushige H, Ostrowski RP, Tsubokawap T, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1436-1448.
- [4] Roth JM. Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke [J]. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2011, 24(3): 257-259.
- [5] Zhou F, Gao S, Wang L, et al. Human adipose -derived stemcells partially rescue the stroke syndromes by promoting spatial learning and memory in mouse middle cerebral artery occlusion mode [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6(1): 92-103.
- [6] 丛文杰,洪显钗,金珍珍,等.补阳还五汤辅助针灸治疗对中风神经功能的影响研究[J].中华中医药学刊,2019,37(1): 217-219.
- [7] Auyeung KK, Han QB, Ko JK. Astragalus membranaceus: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(1): 1-22.
- [8] 傅晓燕,雷珊珊,李雄英.黄芪配方颗粒对衰老大鼠认知功

能的影响及机制初探 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1184-1189.

[9] Bao H, Sun D, Qi P, et al. Astragaloside protects oxygen and glucose deprivation induced injury by regulation of microRNA-21 in retinal ganglion cell line RGC-5 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1826-1833.

[10] Yu W, Lv Z, Zhang L, et al. Astragaloside IV reduces the hypoxia-induced injury in PC-12 cells by inhibiting expression of miR-124 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 419-425.

[11] 李延勋, 栗章彭, 颜世利, 等. 膜荚黄芪化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2601-2607.

[12] Li Y, Yang Y, Zhao Y, et al. Astragaloside IV reduces neuronal apoptosis and parthanatos in ischemic injury by preserving mitochondrial hexokinase-II [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 251-263.

[13] Hu H, Yang R, Jin G, et al. Effect of astragaloside IV on neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease rat models [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 3106980.

[14] 王洪军, 于淼, 王云鹤, 等. 黄芪总黄酮对柯萨奇 B3 病毒感染心肌细胞内质网应激及促凋亡信号因子作用 [J]. 临床心

血管病杂志, 2016, 32(1): 70-73.

[15] 张怡, 周晓红, 靳晓飞, 等. 黄芪甲苷通过抑制细胞凋亡减轻缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 46-51.

[16] 刘靖丽, 于海东, 梁艳妮. 中药黄芪中黄酮类化合物抗氧化活性的 DFT 研究 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(1): 39-43.

[17] 朱嘉欢, 黄小平, 邓常清, 等. 黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究 [J]. 中草药, 2018, 50(1): 111-119.

[18] Li F, Tang R, Chen LB, et al. Effects of astragalus combined with angelica on bone marrow hematopoiesis suppressioninduced by cyclophosphamide in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(5): 598-609.

[19] 赵海鹏, 李小平, 雒晶晶, 等. 毛蕊异黄酮对 PM2.5 介导炎症反应的作用及其机制 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38(11): 2147-2152.

[收稿日期] 2019-06-19

(上接第 33 页)

[11] Virgilio E, Giarnieri E, Giovagnoli MR, et al. Long non-coding RNAs in the gastric juice of gastric cancer patients [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(9): 1239-1246.

[12] Agirre X, Meydan C, Jiang Y, et al. Long non-coding RNAs discriminate the stages and gene regulatory states of human humoral immune response [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 821.

[13] Shen X, Zhong J, Yu P, et al. YY1-regulated LINC00152 promotes triple negative breast cancer progression by affecting on stability of PTEN protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(2): 448-454.

[14] Ma P, Wang H, Sun J, et al. LINC00152 promotes cell cycle progression in hepatocellular carcinoma via miR-193a/b-3p/CCND1 axis [J]. Cell Cycle, 2018, 17(8): 974-984.

[15] 高聪, 林大勇, 韩勇, 等. 罗哌卡因对结肠癌细胞增殖和裸鼠人结肠癌皮下瘤生长的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 558-563.

[16] 于福华, 贾志凡, 浦佩玉, 等. YAP 调控人胶质瘤细胞生长的体外研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(11): 689-692.

[17] Fan F, He Z, Kong LL, et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(352): 352ra108.

[18] Yuan WC, Pepe-Mooney B, Galli GG, et al. NUAK2 is a critical YAP target in liver cancer [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4834.

[19] Zhang X, Li Y, Ma Y, et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1 α and sustains HIF-1 α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 216.

[20] Meng Z, Qiu Y, Lin KC, et al. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway [J]. Nature, 2018, 560(7720): 655-660.

[收稿日期] 2019-04-24