

网络出版时间:2022-09-16 18:48 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20220915.1515.012.html>

◇心血管药理学◇

丹酚酸 B、人参皂苷 Rg1 及三七皂苷 R1 对氧糖剥夺/复氧复糖损伤星形胶质细胞的保护作用

杨娟,曹玉爽,徐耀,杜鑫苑,张彤,郭莉琛,袁庆,柴丽娟,胡利民

(天津中医药大学中医药研究院、天津市中药药理学重点实验室、方剂学教育部重点实验室,天津 301600)

doi:10.12360/CPB202111071

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2022)10-1466-07

中国图书分类号:R-332; R284.1; R322.81; R329.24;
R852.15

摘要:目的 探讨丹酚酸 B(salvianolate acid B,Sal B)、人参皂苷 Rg1(ginsenoside Rg1,Rg1)及三七皂苷 R1(notoginsenoside R1,R1)对氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)损伤大鼠星形胶质细胞保护作用及其机制的影响。方法 培养并鉴定原代大鼠星形胶质细胞,建立 OGD/R 损伤模型,分为对照组、模型组、Sal B、Rg1、R1 给药组($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。CCK-8 测定细胞活力;流式细胞术测定线粒体膜电位、ROS 释放量和钙离子浓度;RT-PCR 测定 IGF1 α 、BDNF、NGF 神经营养因子 mRNA 表达水平;免疫印迹法测定 PI3K、AKT、STAT3 蛋白磷酸化表达水平。**结果** OGD/R 组细胞活力显著降低,ROS 释放量及钙离子浓度增加,线粒体膜电位降低,p-STAT3,p-PI3K,p-AKT 表达下降,Sal B、Rg1、R1 显著提高受损细胞活力,不同程度的调节 ROS 释放量、钙离子浓度、线粒体膜电位,Sal B 及 Rg1 增加 p-STAT3, p-AKT 的表达;OGD/R 组 BDNF、NGF mRNA 表达明显降低,Sal B、Rg1、R1 均可显著升高受损细胞 BDNF mRNA 的表达;Rg1 可提高 NGF mRNA 表达;Sal B 升高 IGF1 α mRNA 表达。**结论** Sal B、Rg1、R1 通过调节 PI3K/AKT、STAT3 信号通路降低 OGD/R 损伤后星形胶质细胞氧化应激反应,降低细胞内钙离子超载发挥星形胶质细胞保护作用,增加星形胶质细胞神经营养因子的释放量,可能进一步发挥神经元保护作用。

关键词:丹酚酸 B;人参皂苷 Rg1;三七皂苷 R1;星形胶质细胞;氧糖剥夺/复氧复糖;氧化损伤;神经营养因子

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



收稿日期:2022-02-17,修回日期:2022-04-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 81573644)

作者简介:杨娟(1995-),女,硕士生,研究方向:脑血管药理,E-mail:yj199512270808@163.com;

柴丽娟(1976-),女,博士,副研究员,研究方向:中药药理学,通信作者,E-mail:yj199512270808@163.com;

胡利民(1966-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学,通信作者,E-mail:hulimin@tjutcm.edu.cn

缺血性脑卒中损伤的生理病理过程复杂多样,主要涉及细胞凋亡、氧化应激、细胞内钙离子超载等,这些机制发生在不同时期,但又相互联系,最终引发缺血中心区域组织的不可逆损伤^[1]。星形胶质细胞约占脑胶质细胞的一半,是胶质细胞中最丰富的亚型,对成人中枢神经系统的功能至关重要,执行多种功能,如维持正常的脑功能,形成血脑屏障,控制和支持神经元,循环神经递质,以及与其他细胞通信^[2],因此研究星形胶质细胞具有重要的意义。

丹参三七是临幊上常用的药对,目前在预防和治疗心脑血管疾病中使用较为频繁,Sal B 是丹参水溶性酚酸类成分^[3],研究表明其抗脑缺血/再灌注损伤作用机制主要为血流动力学的改善、氧化损伤减轻;改善能量代谢障碍、减轻脑部水肿;维持血脑屏障完整性等^[4]。Rg1 和 R1 均是三七总皂苷类成分,具有广泛的药理活性,可改善急性缺血性脑卒中后血脑屏障通透性,减少脑梗死体积和神经功能缺损等^[5-6]。课题组前期研究结果显示,Sal B、Rg1、R1 可透过血脑屏障且在脑脊液中含量较高,故在本研究中建立氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)模型在体外模拟缺氧缺血损伤,探讨 Sal B、Rg1、R1 能否通过降低氧化应激反应和钙离子超载,发挥保护星形胶质细胞的作用,从而进一步提高星形胶质细胞神经营养因子的释放。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24 h 内新生 Wistar 乳鼠,雌雄均可,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,使用许可证号:SCXK(京)2016-0006。

1.2 药品与试剂 丹酚酸 B(salvianolic acid B,Sal B),生产批号:18062901;人参皂苷 Rg1(ginsenoside Rg1),生产批号:18071601;三七总皂苷 R1(notoginsenoside R1),生产批号:18020908;以上药物均由成都菲普德生物科技有限公司提供,产品纯度≥98%。L-谷氨酰胺、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。BCA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

Anti-GFAP(美国 Abcam 公司)、Anti-PI3K/p-PI3K、Anti-AKT/p-AKT、Anti-STAT3/p-STAT3(美国 CST 公司)。CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所)。Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit(武汉赛维尔生物科技有限公司)。SYBR GREEN PCR master Mix(美国 Applied Biosystem 公司)。Tetramethylrhodamine(TMRM)、CM-H2DCFDA(美国 Invitrogen 公司)、Fluo-3, AM(凯基生物)。

1.3 仪器 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(美国 Zeiss 公司);缺氧小室(加拿大 STEMCELL Technologies);倒置荧光显微镜(美国 BioTek 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIORAD 公司);流式细胞仪(美国 BD, FACS Calibur);Western blot 凝胶成像系统(美国 GE 公司)。

1.4 方法

1.4.1 星形胶质细胞分离、培养及鉴定 星形胶质细胞原代培养参考汤婷婷等^[7]方法,取 5 只 Wistar 大鼠乳鼠,75%乙醇浸泡消毒处死,无菌条件下眼科剪打开颅骨取出全脑,置于预冷的 D-Hanks 中去除脑膜。而后用含 5% 青霉素 - 链霉素的 D-Hanks)浸泡 2 次,2 min/次。眼科剪剪碎组织成 1 mm³ 的乳糜状,加入浓度为 0.25% 的胰酶 5 mL,37 °C、90 r · min⁻¹ 条件下恒温震荡消化 10 min。加入 5 mL 培养基(15% FBS + 1% 青霉素 - 链霉素 + 1% L-谷氨酰胺 + 83% DMEM/F12)终止消化,混匀。1 000 r · min⁻¹ 离心,10 min。加 10 mL 培养基重悬,过 200 目筛网。再次离心、重悬,接种细胞于 75 cm² 培养瓶,CO₂ 培养箱 5% CO₂、37 °C 培养 1 h 后,将上层培养基转移至新的细胞培养瓶中,每 3 d 换液 1 次,待细胞融合后将细胞培养瓶放在摇床上 260 r · min⁻¹ 转速下震荡 20 h,弃去原培养基,D-Hanks 洗涤细胞两次,加入浓度为 0.25% 的胰酶消化,传代备用。在倒置相差显微镜下观察细胞形态并用免疫荧光鉴定法对其进行纯度鉴定(胶质纤维酸性蛋白,GFAP)。

1.4.2 OGD/R 模型的建立及分组 将细胞种子于 96 孔板中,待细胞生长至融合时,根据魏爱宣等^[8]的实验方法进行细胞 OGD/R 造模。

对照组(con)将原培养基置换为新配制的 DMEM/F12 培养基,放于 CO₂ 培养箱 5% CO₂、37 °C 培养,4 h 后换为血清浓度减半的培养基培养 24 h;模型组将原培养基置换为 EBSS 平衡盐溶液,置于缺氧小室中,通入 95% N₂、5% CO₂ 气体,5 min 后放恒温摇床(37 °C)培养 4 h,而后从缺氧小室中取出细胞,将 EBSS 平衡盐溶液置换为血清浓度减

半的培养基,放在 CO₂ 恒温培养箱 24 h;给药组在模型组的基础上,复氧时换为含有 Sal B、Rg1 或 R1 的血清浓度减半的培养基,根据课题组前期研究及北京中医药大学相关的研究^[9],在此我们选择的给药浓度为 10 μmol · L⁻¹。

1.4.3 CCK-8 测定细胞活力 将星形胶质细胞按 1 × 10⁵ 个 / cm² 密度接种于 96 孔板中,置于 CO₂ 培养箱培养,待细胞长至融合后,分别将原培养基置换为含有 10 μmol · L⁻¹ Sal B、Rg1、R1 的培养基继续培养,24 h 后弃去细胞培养基,100 μL DMEM(含 10% CCK-8)孵育 30 min,酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度。

Sal B、Rg1 及 R1 对 OGD/R 星形胶质细胞活力的影响同前,按照“1.4.2”处理方法对细胞进行 OGD,复氧时将细胞培养基置换为含有 10 μmol · L⁻¹ Sal B、Rg1 或 R1 的血清浓度减半的培养基。24 h 后弃去原培养基,CCK-8 检测细胞活力。

1.4.4 流式细胞术检测星形胶质细胞 ROS 的释放量、线粒体膜电位和钙离子浓度 将星形胶质细胞按 1 × 10⁵ 个 / cm² 密度接种于 6 孔板中,按照“1.4.2”所述进行分组处理,PBS 洗涤细胞,分别加入 100 nmol · L⁻¹ TMRM 工作液,5 μmol · L⁻¹ CM-H2DCFDA 工作液和 0.25 μmol · L⁻¹ Fluo-3, AM 工作液 37 °C 避光孵育 30 min,胰酶消化,将细胞收集于离心管中,流式细胞仪测定细胞 ROS 的释放量,线粒体膜电位和钙离子浓度。

1.4.5 RT-PCR 法测定星形胶质细胞 IGF1a、BD-NF、NGF mRNA 的表达 将星形胶质细胞按 1 × 10⁵ 个 / cm² 密度接种于 6 孔板中,按照“1.4.2”所述进行分组处理,用预冷的 PBS 洗涤细胞,TRIzol® reagent 试剂盒提取总 RNA,超微量核酸分析仪测定 RNA 样品浓度,采用 Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒逆转录合成 cDNA,按照 SYBR GREEN PCR Master Mix 试剂盒说明书步骤依次加入反应物,在 Real Time PCR 仪上检测各样本基因表达,将 mRNA 水平标准化为 GAPDH 水平,用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达水平。

1.4.6 Western blot 法测定星形胶质细胞 p-PI3K、p-AKT、p-STAT3 蛋白的表达 将星形胶质细胞按 1 × 10⁵ 个 / cm² 密度接种于 6 孔板中,按照“1.4.2”所述进行分组处理,弃去培养基,用 PBS 洗涤细胞,加入 100 μL 细胞裂解液(含 1% PMSF)提取总蛋白并进行蛋白定量;将 10 μg 样品加到聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行分离,采用湿转法将目的蛋白转至 PVDF 膜上,用脱脂奶粉 5% 封闭,分别加入 p-

STAT3 (1:1 000)、STAT3 (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、AKT (1:1 000) 抗体, 4 ℃ 孵育过夜; 用 TBST 洗涤条带 4 次, 5 min/次, 而后加入二抗 (1:10 000), 室温摇床孵育 1 h, 洗涤后用 ECL 化学显色试剂在显影仪中曝光, 通过 ImageJ 处理系统分析目的蛋白条带灰度值并计算相应蛋白表达量。

1.4.7 统计学方法 基于 SPSS 18.0 统计, 实验数据均表示为 $\bar{x} \pm s$, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 星形胶质细胞形态学观察及鉴定 如 Fig 1, 光镜下观察培养 7 d 的星型胶质细胞, 形状主要为不规则多角形, 可见粗短枝状胞突, 胞体大而扁平, 符合神经胶质细胞生长特性; 胶质细胞特异性蛋白 GFAP 免疫荧光染色呈阳性, 表明纯度较高的原代星形胶质细胞培养成功, 可以用于后续实验。

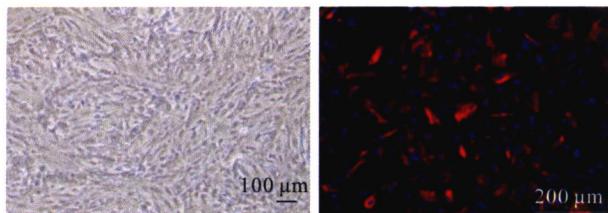


Fig 1 Left: Astrocyte morphology under light microscope, bar = 100 μm . Right: Immunofluorescence identification of astrocytes (GFAP), bar = 200 μm

2.2 Sal B、Rg1、R1 对星形胶质细胞活力的影响

如 Tab 1 所示, 与 con 组比较, Sal B、Rg1、R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对正常星形胶质细胞活力差异均没有显著性 ($P > 0.05$), 表明实验所选药物浓度对细胞没有毒性。OGD/R 组星形胶质细胞活力与 con 组比较明显降低 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, Sal B、Rg1、R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均能明显提高 OGD/R 受损胶质细胞的活力 ($P < 0.05$), 表明选择的 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以用于后续实验。

Tab 1 Effects of Sal B, Rg1, R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on viability of normal and OGD/R-injured astrocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| Group | Normal cell viability (% of con) | OGD/R-injured cell viability(% of con) |
|-------|-------------------------------------|---|
| Con | 1.00 \pm 0.08 | 1.00 \pm 0.04 |
| OGD/R | - | 0.43 \pm 0.07* |
| Sal B | 0.93 \pm 0.04 | 0.56 \pm 0.05# |
| Rg1 | 0.87 \pm 0.03 | 0.66 \pm 0.09## |
| R1 | 0.91 \pm 0.07 | 0.67 \pm 0.09## |

* $P < 0.05$ vs con; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OGD/R

2.3 Sal B、Rg1、R1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞

ROS 释放量的影响 脑缺血发生后, 损伤的星形胶质细胞释放大量 ROS, H₂O₂ 是其主要成分, 具有不带电荷、稳定以及可自由弥散等特点, 可以任意穿过细胞膜, 进一步导致损伤, 本研究通过检测星形胶质细胞中 ROS 的产生来评估氧化损伤, 如 Fig 2 所示, OGD/R 组细胞 ROS 释放量较 con 组明显增加 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组相比, Sal B、Rg1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均可明显降低 OGD/R 损伤星形胶质细胞 ROS 的释放量 ($P < 0.05$), 表明 Sal B、Rg1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以减轻星形胶质细胞的氧化损伤。

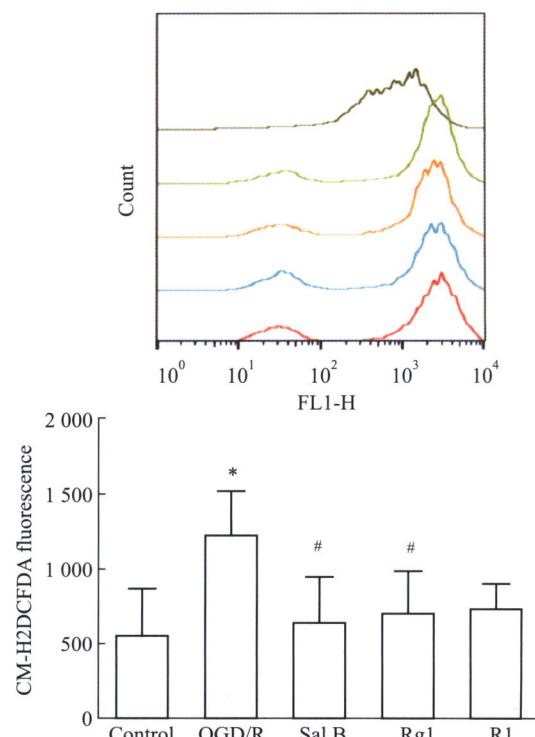


Fig 2 Effects of Sal B, Rg1, R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on ROS of astrocytes injured by OGD/R detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs con; # $P < 0.05$ vs OGD/R.

2.4 Sal B、Rg1、R1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位可以影响线粒体中钙离子的摄取, 是细胞主要钙离子调节器, 细胞内线粒体膜电位升高会导致钙离子浓度增加, 钙超载线粒体和后续功能障碍诱导细胞死亡。本研究中用流式细胞术检测了细胞线粒体膜电位, 结果如 Fig 3 所示, 与 con 组相比, OGD/R 组星形胶质细胞线粒体膜电位降低 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组相比, Sal B、Rg1、R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均可升高 OGD/R 损伤后星形胶质细胞的线粒体膜电位 ($P < 0.05$), 表明 Sal B、Rg1、R1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以抑制损伤星形胶质细胞线粒体膜电位的降低, 对细胞发挥保护作用。

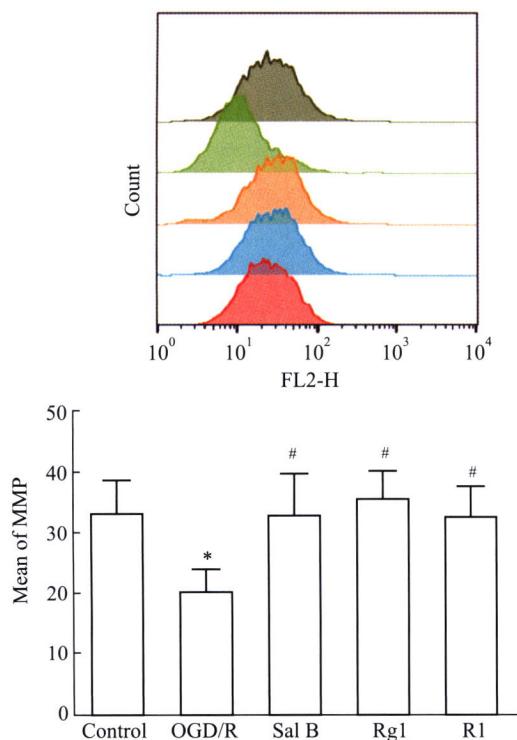


Fig 3 Effects of Sal B, Rg1 and R1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on mitochondrial membrane potential of OGD/R injured astrocytes detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs con; # $P < 0.05$ vs OGD/R.

2.5 Sal B、Rg1、R1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞钙离子浓度的影响 研究进一步对细胞内钙离子浓度进行了检测,如 Fig 4,发现与 con 组相比,OGD/R 组星形胶质细胞钙离子浓度明显升高($P < 0.05$);与 OGD/R 组相比,Sal B($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可明显降低 OGD/R 损伤星形胶质细胞钙离子浓度($P < 0.05$),抑制钙离子超载。

2.6 Sal B、Rg1、R1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞神经生长因子分泌的影响 星形胶质细胞分泌的 BDNF、NGF、IGF1 α 对于成年大脑中特定神经元群体的存活,维持和再生很重要,本研究采用 RT-PCR 方法检测 Sal B、Rg1、R1($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对损伤星形胶质细胞神经营养因子 BDNF、NGF、IGF1 α 分泌的影响(Fig 5),与 con 组相比,OGD/R 组细胞 BDNF、NGF mRNA 表达明显降低($P < 0.05$),对 IGF1 α mRNA 无明显降低($P > 0.05$);与 OGD/R 组相比,Sal B、Rg1、R1($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)均可明显升高 OGD/R 损伤星形胶质细胞 BDNF mRNA 的表达($P < 0.05$);Rg1 可提高 NGF mRNA 表达($P < 0.05$);Sal B 可明显升高 OGD/R 损伤星形胶质细胞 IGF1 α mRNA 表达($P < 0.05$),发现不同的活性成分对 BDNF、NGF、IGF1 α mRNA 有不同程度的调节作用。

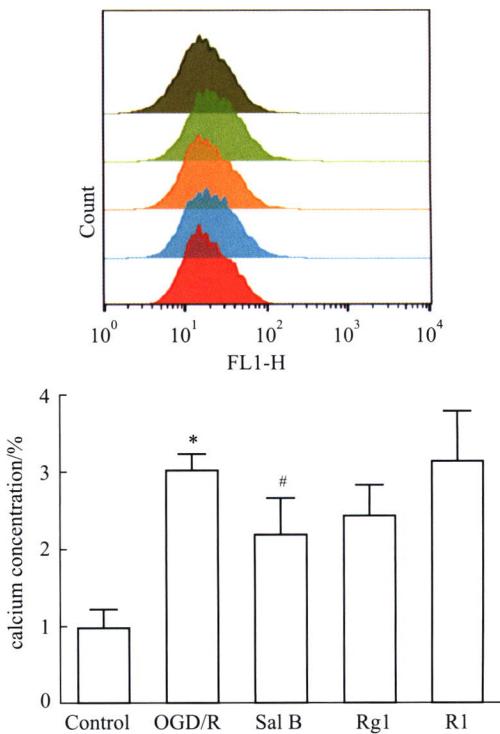


Fig 4 Effects of Sal B, Rg1 and R1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on calcium concentration of OGD/R injured astrocytes detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs con; # $P < 0.05$ vs OGD/R.

2.7 Sal B、Rg1、R1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞 PI3K、AKT、STAT3 蛋白磷酸化的影响 现已有研究表明,抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活能增加大鼠的超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛水平,降低氧化应激损伤。STAT3 缺失的星形胶质细胞产生高水平的 ROS,导致细胞死亡增加。本研究探讨了 Sal B、Rg1、R1 对受损星形胶质细胞 PI3K/AKT、STAT3 机制的调节。如 Fig 6A – B 所示,与 con 组比较,OGD/R 组胶质细胞 PI3K、AKT 蛋白磷酸化水平低($P < 0.05$),与 OGD/R 组相比 Sal B、Rg1、R1 可明显升高 p-AKT 蛋白的表达($P < 0.05$)。如 Fig 6C 所示,与 con 组相比,OGD/R 组 STAT3 蛋白磷酸化水平降低($P < 0.05$);与 OGD/R 组相比,Sal B、Rg1($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)能升高 OGD/R 损伤后 STAT3 蛋白磷酸化水($P < 0.05$)。

3 讨论

脑卒中是全球第二大死亡原因,是一种有极高致残率和致死率的脑血管疾病,缺血性脑卒中占比 85%^[10]。星形胶质细胞数量庞大,约占脑细胞的一半,是胶质细胞中最丰富的亚型^[11]。目前,关于星形胶质细胞在脑卒中中的研究越来越多,有望成为治疗脑卒中的重要靶点。

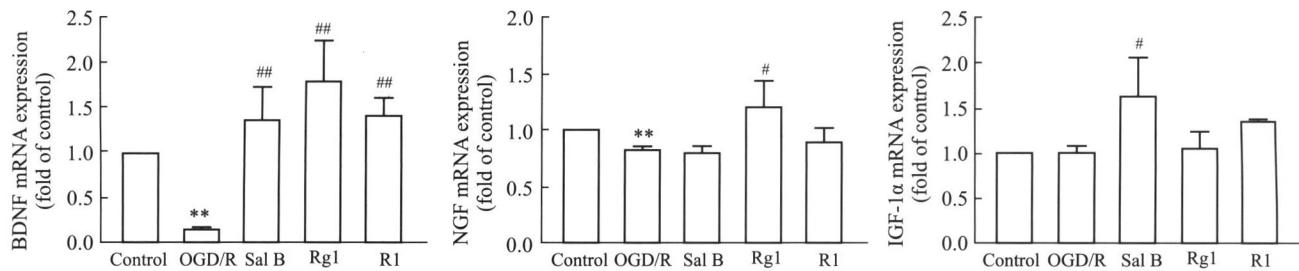


Fig 5 Effects of Sal B, Rg1 and R1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on mRNA expression of BDNF, NGF and IGF1 α in astrocytes injured by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$** P < 0.01$ vs con; $^* P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$ vs OGD/R.

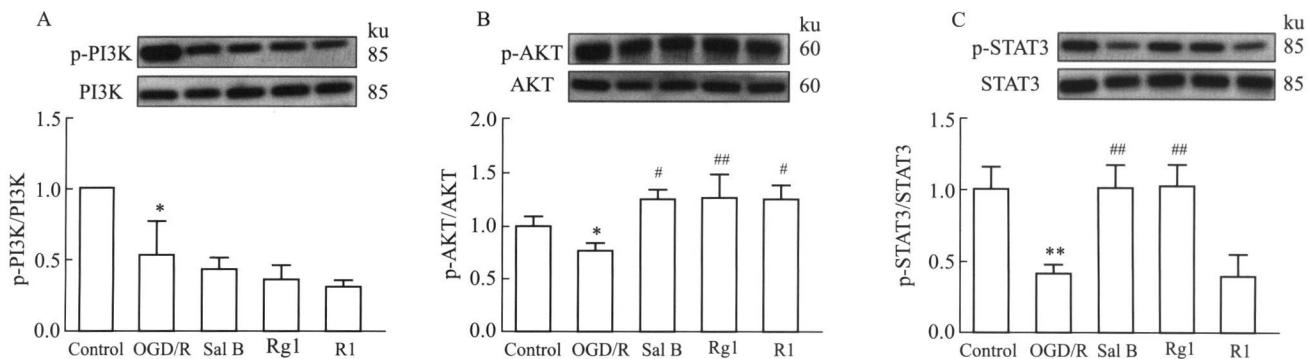


Fig 6 Effects of Sal B, Rg1 and R1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on phosphorylation of STAT3, PI3K, AKT protein in astrocytes injured by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$ vs con; $^* P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$ vs OGD/R.

现已有大量关于丹参及三七的研究报道,部分研究关于其活性成分 Sal B、Rg1、R1, 王国军等^[12]研究表明, Sal B 可通过减轻缺血/再灌注模型大鼠的神经功能缺损症状,使大鼠脑组织梗死体积减小,提高大鼠脑组织中 SOD、CAT、GSH-Px 等的活力而起到脑保护作用;林超等^[13]通过体外实验证明, Sal B 对氧自由基有清除作用,从而发挥抗氧化作用;有研究发现 Rg1 也可通过提高细胞内抗氧化酶的表达来增强抗氧化能力进而降低 ROS 的产生和线粒体膜去极化^[14]; Meng 等^[15]研究发现, R1 可通过抗细胞凋亡和氧化减小脑梗死面积,发挥脑保护作用。以前期研究为基础,我们进一步探讨 Sal B、Rg1、R1 在受损星形胶质细胞保护方面是否也发挥作用。

STAT3 作为 ROS 重要的调控因子,我们对其进行研究,发现 Sal B、Rg1、R1 可以通过 STAT3 信号通路调控细胞内 ROS 水平,降低氧化损伤。研究表明,PI3K/AKT 信号通路通过磷酸化激活下游相关生存蛋白在神经保护中起着重要作用^[16],我们关于 Sal B、Rg1、R1 对受损星形胶质细胞的保护作用机制也进行了探讨,发现 OGD/R 可使细胞 PI3K、AKT 蛋白磷酸化水平降低,Sal B、Rg1、R1 可显著提高 AKT 蛋白磷酸化水平,由于信号通路是一个级联

放大的过程,我们推测 Sal B、Rg1、R1 通过 PI3K/AKT 信号通路发挥保护星形胶质细胞的作用。本研究发现,Sal B、Rg1、R1 通过调节 PI3K/AKT、STAT3 信号通路降低 OGD/R 损伤后星形胶质细胞 ROS 的释放量,降低由 ROS 升高引起的钙超载及线粒体功能障碍,发挥星形胶质细胞保护作用,增加受损星形胶质细胞神经营养因子的释放,可能进一步对神经发挥保护作用。但是结果显示 Sal B 和 Rg1、R1 的作用具有差异性,提示我们不同活性成分可能通过同一或不同的作用途径发挥疗效。

参考文献:

- Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions [J]. *Nat Neurosci*, 2011, **14**(11): 1363–8.
- Zhang S, Shang D, Shi H, et al. Function of astrocytes in neuroprotection and repair after ischemic stroke [J]. *Eur Neurol*, 2021, **84**(6): 426–34.
- 卢万鹏, 温振帆, 刘家园, 等. 丹酚酸 B 对 ApoE 敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善运用及其机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, **36**(1): 31–7.
- Lu W F, Wen Z F, Liu J Y, et al. Improvement and mechanism of salvianolic acid B on non-alcoholic fatty liver in ApoE knockout mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, **36**(1): 31–7.
- 方蕾, 杨美娟, 蒋玉凤. 丹酚酸 B 对脑缺血/再灌注损伤小

- 鼠血管保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 3060-2.
- [4] Fang L, Yang M J, Jang Y F, et al. Protective effect of salvianolic acid B on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(12): 3060-2.
- [5] Liu B, Li Y, Han Y, et al. Notoginsenoside R1 intervenes degradation and redistribution of tight junctions to ameliorate blood-brain barrier permeability by Caveolin-1/MMP2/9 pathway after acute ischemic stroke[J]. Phytomedicine, 2021, 90: 153660.
- [6] Fu Y, Xing R, Wang L, et al. Neurovascular protection of salvianolic acid B and ginsenoside Rg1 combination against acute ischemic stroke in rats[J]. Neuroreport, 2021, 32(13): 1140-6.
- [7] 汤婷婷, 官志忠, 禹文峰. SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞的体外原代培养[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39(2): 158-61.
- [7] Tang T T, Guan Z Z, Yu W F. Primary culture of astrocytes in the cerebral cortex of SD rats *in vitro*[J]. J Guiyang Med Coll, 2014, 39(2): 158-61.
- [8] 魏爱宣, 李昕华, 同世军, 等. 大鼠皮层星形胶质细胞原代培养、鉴定及氧糖剥夺模型的建立[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(3): 340-2.
- [8] Wei A X, Li X H, Yan S J, et al. Primary culture, identification and establishment of oxygen and glucose deprivation model of rat cortical astrocytes[J]. Chin J Gerontol, 2010, 30(3): 340-2.
- [9] 徐梦. 人参皂苷 Rb1 和 Rg1 对 OGD/R 损伤星形胶质细胞线粒体的影响及其机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [9] Xu M. The effect of ginsenosides Rb1 and Rg1 on the mitochondria of astrocytes damaged by OGD/R and its mechanism[D]. Beijing: Beijing Univ of Trad Chin Med, 2020.
- [10] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-58.
- [11] Wang X, Xuan W, Zhu Z Y, et al. The evolving role of neuro-immune interaction in brain repair after cerebral ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(12): 1100-14.
- [12] 王国军, 张琳成, 陈冰, 等. 丹参中丹酚酸 B 对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1566-8.
- [12] Wang G J, Zhang L C, Chen B, et al. Study on protective effect of salvianolic acid B in salvia miltiorrhiza on cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(7): 1566-8.
- [13] 林超, 刘兆国, 钱星, 等. 丹酚酸 B 在心血管疾病中药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(4): 449-52.
- [13] Lin C, Liu Z G, Qian X, et al. Research progress on pharmacological effects of salvianolic acid B in cardiovascular diseases[J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(4): 449-52.
- [14] Xie C L, Li J H, Wang W W, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside-Rg1 on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by downregulating protease-activated receptor-1 expression[J]. Life Sci, 2015, 121: 145-51.
- [15] Meng X, Wang M, Wang X, et al. Suppression of NADPH oxidase-and mitochondrion-derived superoxide by Notoginsenoside R1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through estrogen receptor-dependent activation of Akt/Nrf2 pathways[J]. Free Radic Res, 2014, 48(7): 823-38.
- [16] Park H H, Han M H, Choi H, et al. Mitochondria damaged by oxygen glucose deprivation can be restored through activation of the PI3K/Akt pathway and inhibition of calcium influx by amlodipine camsylate[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15717.

The protective effects of salvianolic acid B, ginsenoside Rg1 and notoginsenoside R1 on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and reoxygenation of astrocytes

YANG Juan, CAO Yu-shuang, XU Yao, DU Xin-yuan, ZHANG Tong, GUO Li-chen,

YUAN Qing, CHAI Li-juan, HU Li-min

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of TCM; Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology; Key Laboratory of Pharmacology of TCM Formulae, Ministry of Education, Tianjin 301600, China)

Abstract: Aim To investigate the protective effects of salvianolate acid B (Sal B), ginsenoside Rg1 (Rg1) and notoginsenoside R1 (R1) on astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury and the underlying mechanism. Methods Primary rat astrocytes were cultured and identified to establish OGD/R injury model. The cells were divided into control group, model group and Sal B, Rg1 and R1 treatment groups ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The CCK-8 cell proliferation-toxicity test kit was used to detect the cell viability of astrocytes, and flow cytometry to detect mitochondrial membrane potential, ROS release and intracellular calcium concentration. RT-PCR was employed to detect the mRNA expression of BDNF, NGF, IGF1 α in astrocytes. Western blot was used to detect the phosphorylation of PI3K, AKT and STAT3 protein in astrocytes. Results OGD/R significantly decreased cell viability. ROS release and intracellular

calcium concentration increased. PI3K/AKT/STAT3 signaling pathway was involved in the protective effect of Sal B, Rg1 and R1 on OGD/R injury. Conclusion Sal B, Rg1 and R1 have protective effects on OGD/R injury of rat astrocytes, which may be related to the regulation of PI3K/AKT/STAT3 signaling pathway.

PINK1 介导的线粒体自噬对大鼠骨髓内皮祖细胞衰老及其功能的影响

唐 蜜,石永芳,肖 珍,梁 梅,秦 璞

(贵州医科大学基础医学院,贵州贵阳 550025)

doi:10.12360/CPB202111045

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2022)10-1472-09

中国图书分类号:R-332; R329.24; R339.38; R345.57; R394.2

摘要:目的 采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术敲减大鼠骨髓内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 中磷酸酶和张力蛋白同源物诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1), 探讨 PINK1 介导的线粒体自噬对 EPCs 衰老及其功能的影响。方法 分离培养大鼠骨髓 EPCs 并鉴定, EPCs 计数后随机分为空白组、阴性对照组 (NC siRNA) 和 PINK1 转染组 (PINK1 siRNA)。qRT-PCR 与 Western blot 检测各组 PINK1 mRNA 与蛋白的表达情况; 以最佳敲减时间为据点选择不同时间点模拟衰老进程, SA-β-半乳糖苷酶染色法及 p16 蛋白表达评估细胞衰老情况; CCK-8、Transwell 小室、体外血管生成试剂盒检测细胞增殖、迁移、成血管功能; 流式细胞术检测细胞 ROS 水平, Western blot 检测 PINK1、Parkin、LC3、p62 的表达, 透射电镜观察线粒体及自噬小体情况。

结果 转染 PINK1 siRNA 48 h 后, PINK1 被有效敲减。转染 48 h 和 96 h 后, 与空白组相比, PINK1 siRNA 组衰老细胞蓝染阳性率和 p16 蛋白表达水平均明显上升; 细胞增殖、迁移和成血管功能明显降低, ROS 水平明显升高; PINK1、Parkin、LC3 蛋白表达明显下调, 而 p62 蛋白明显上调; 透射电镜下 PINK1 siRNA 组线粒体肿胀变形, 自噬小体减少。**结论** PINK1 基因的下调会加剧 EPCs 的衰老, PINK1 介导的线粒体自噬可能参与并调节了 EPCs 的衰老和功能。

关键词: 内皮祖细胞; 磷酸酶和张力蛋白同源物诱导激酶 1; 线粒体自噬; 细胞衰老; 细胞功能; 活性氧

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



随着人口老龄化速度加剧, 冠心病、心梗等缺血性心血管疾病的发病率与死亡率逐年攀升, 如何有效防治其发生发展具有重要的意义。近年来利用内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 介导的心血管治疗已成为再生医学研究的热点^[1-2]。EPCs 作为主要定居于骨髓, 具有游走特性并能自我更新, 增殖分化为血管内皮的前体细胞, 在缺血缺氧等病理生理的作用下, 可随着血液循环募集至缺血组织, 修复损伤血管^[3]。随着研究的不断深入, 通

收稿日期:2022-03-08,修回日期:2022-05-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 81860872);贵州省中医药管理局、民族医药科学技术研究课题资助项目(No QZYY2021-033)

作者简介:唐 蜜(1993-),女,硕士生,研究方向:心血管药理学及干细胞相关研究, E-mail: 1214916143@qq.com;
秦 璞(1982-),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中医药防治心脑血管疾病,通信作者, E-mail: 75871083@qq.com

calcium ion concentration of astrocytes, mitochondrial membrane potential and p-STAT3, p-PI3K, p-AKT expression decreased in OGD/R group. Sal B, Rg1 and R1 significantly increased the viability of damaged cells, and regulated ROS release, calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential to varying degrees. Sal B and Rg1 increased the expression of p-STAT3 and p-AKT. The expression of BDNF and NGF mRNA in OGD/R group significantly decreased, and Sal B, Rg1 and R1 could significantly increase the expression of BDNF mRNA in damaged cells. Rg1 could increase NGF mRNA expression. Sal B increased the

expression of IGF1α mRNA. **Conclusions** Sal B, Rg1, and R1 reduce the oxidative stress response of astrocytes after OGD/R injury by regulating the PI3K/AKT and STAT3 signaling pathway, reduce intracellular calcium overload, and play a protective role in astrocytes, increase the release of astrocyte neurotrophic factor, which may further play a protective role in neurons.

Key words: salvianolate acid B; ginsenoside Rg1; notoginsenoside R1; astrocytes; OGD/R; oxidative damage; neurotrophic factor