

通络救脑注射液对脑微血管内皮细胞活性影响的特征^{*}

青雪梅 李卫红 侯金才 胡京红 李澎涛

(北京中医药大学基础医学院 北京 100029)

摘要 目的: 观察通络救脑注射液对培养的正常及缺血脑微血管内皮细胞的活性影响, 揭示其通络作用的效应靶点与特征。方法: 原代培养大鼠脑皮质微血管内皮细胞, 传至第三代, 分为正常及拟缺血组, 采用培养基氧糖剥夺(OGD)法建立拟缺血模型。通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色分析法测定不同浓度的通络救脑注射液对正常及OGD内皮细胞的活性影响。结果: 通络救脑注射液作用于正常脑微血管内皮细胞, 与未加药组比较, 小剂量药物抑制细胞活性趋势, 大剂量促进细胞活性趋势, 剂量总趋势呈反抛物线形; 通络救脑注射液作用于OGD组脑微血管内皮细胞, 小剂量范围促进内皮细胞的增殖活性, 呈显著和极显著差异, 而大剂量组则抑制细胞活性, 剂量总趋势呈抛物线形。结论: 通络救脑注射液对正常及缺血脑微血管内皮细胞具有双向调节作用, 药物剂量与细胞增殖活性呈非线性关系。大剂量与小剂量可能是不同的作用机制, 反映了中药复方药效的多维性。

关键词: 通络救脑注射液; 脑微血管内皮细胞; 氧糖剥夺; MTT

Effects of Tongluojiunao Injection on the Activity of Rat Cerebral Microvascular Endothelial Cells

QING Xue-mei, LI Wei-hong, HOU Jin-cai, HU Jing-hong, LI Peng-tao

School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT Objective: To study the influence of Tongluojiunao (TLJN) injection on the normal cultivated rat cerebral microvascular endothelial cells (CMECs) and ischemic model ones respectively, and to indicate its effect target and characteristics. **Methods:** Cerebral microvascular endothelial cells isolated from the male SD rats were primarily cultured and subcultured to the third generation for experiment and divided into normal and ischemic sets for study. The oxygen and glucose deprivation (OGD) method was adopted to construct ischemic model in vitro. The effects of TLJN injection of different concentration on the CMECs activity were determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric method. **Results:** On the normal cells group, the activity of cells was reduced by low dose of TLJN injection, but promoted by its large dose. It was then concluded that counter para-curve relationship existed between cell activity and drug dosage. On the other hand, Low dose of TLJN injection increased the activity of cells in the ischemic model group with significant deviation compared with negative control samples without TLJN injection, while large dose of TLJN injection reduced its activity with a para-curve relationship to the total dosage. **Conclusion:** TLJN injection had two-ways regulation on both the normal cerebral microvascular endothelial cells and ischemic model ones, and there was non-linear relationship between drug dosage and cell generation activity. Low dosage and large dosage might have two different action mechanisms, which shows the multiple dimensional pharmacodynamic feature of the compound formula of traditional Chinese medicine (TCM).

Key words: Tongluojiunao injection (TLJN injection); Cerebral microvascular endothelial cells (CMECs); Oxygen and glucose deprivation (OGD); MTT colorimetric method

通络救脑注射液由栀子苷和三七总皂苷制成, 是治疗缺血性脑病的中药新药。已完成验收的“十五”国家攻关课题“通络救脑注射液临床前研究”在保护大鼠脑缺血组织损伤中获得了优良效果, 并在“863”项目支持下的临床试验进一步肯定了其抗缺血损伤的效应。本实验进一步从细胞学角度深入研究其解毒通络作用的效应, 对于阐明“解毒通络”治疗脑缺血损伤的优势和深化“毒损脑络”病机理论具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性SD大鼠, 体重60-80g, 维通利华。级别SPF/VAF, 合格证号: SCXK京2002-0003

1.2 主要试剂配制:

完全培养液成分: 高糖DMEM基础培养基(GIBCO公司), 胎牛血清20%; ECGS (SIGMA公司) $75\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 肝素钠 $4 \times 10^4 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; 青霉素 $1 \times 10^5 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; 链霉素 $1 \times 10^5 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; 胰岛素 $200 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; L-谷氨酰胺 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。调pH为7.2, 0.22 μm 滤器过滤除菌, 4℃两周内使用, 正常细胞培养用。冲洗液成分: DMEM, 10%新生牛血清, 青霉素 $1 \times 10^5 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; 链霉素 $1 \times 10^5 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$; 0.22 μm 滤器过滤除菌, 原代取材时做缓冲液用。

Krebs液的配制: NaCl $119\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; KCl $4.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; KH₂PO₄ $1.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; NaHCO₃ $25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; CaCl₂ $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; MgCl₂ $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。超纯水溶解, 调pH为7.2, 0.22 μm 滤器过滤除菌, 临用前配制, 做为OGD组细胞的培养液。

1.3 脑微血管内皮细胞的培养

无菌条件下打开大鼠颅骨, 取出双侧大脑半球, 置预冷的

* 基金项目: 国家“973”项目, 通络方药对脑缺血损伤的脑组织保护作用的微血管机制研究(2005CB523311)

国家自然科学基金资助项目, 从络脉论治脑神病的生物学基础研究(30572284)

作者简介: 青雪梅, (1969-), 女, 博士研究生, 副主任医师

通讯作者: 李澎涛, 博士导师, 北京中医药大学基础医学院(100029) Email: LPTao@263.net

(收稿日期 2006-02-17 接受日期 2006-03-12)

冲洗液中,仔细剔除软脑膜和表面血管,祛除白质,收集皮质。剪碎成 1mm³ 的小块,置于手动玻璃匀浆器中,冰上操作上下匀浆约 25 次。依次通过 80 目和 200 目尼龙网过滤,收集 200 目滤网上微血管段。用 0.1% 胶原酶 37℃ 消化 30min。离心后冲洗液冲洗两遍,再离心后将微血管段重悬于完全培养基中,接种于 2% 明胶(SIGMA 公司)预先包被的培养瓶中,37℃、5% CO₂ 培养箱静置培养 48h 后,第一次换液。待细胞基本融合成片后,进行消化传代,消化液为 0.125% 的胰蛋白酶-0.02% EDTA (1:1)。本实验用第三代细胞,传至 96 孔培养板(COSTAR 公司)。台盼蓝计活细胞数调整传代密度为 $1 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$, 37℃、5% CO₂ 培养 24h 后,用于实验。

1.4 拟缺血模型建立

根据不同缺氧时间点细胞活性的预实验测定,确定了缺氧模型最佳时程为 6h。本实验采用氧糖剥夺法模拟在体缺血,以 D-Hank's 冲洗细胞 2 遍,换 Kreb's 溶液,置于自制的 37℃ 密闭缺氧罐中。罐体上下端分别有进排气口,进气口外接 93% N₂+7% CO₂ 二元气罐,出气口外接水瓶,液面封闭,观察气体流通情况。罐体容积为 15L,先点燃蜡烛耗尽 O₂,待熄灭后持续通入 93% N₂+7% CO₂。首先大流量 5 L·min⁻¹, 20min 充分置换空气后,以 0.5 L·min⁻¹ 小流量维持。

1.5 通络救脑注射液干预

通络救脑注射液系内蒙古康源药业有限公司提供,批号为 04061011。将实验细胞分为正常(N)和拟缺血(OGD)两组,观察药物对不同状态的细胞活性影响。该注射液含原药有效成份为 7.7mg/mL,本实验采用了体积含量为计算单位,即每毫升培养液中加入注射液的微升值。对于正常组细胞,稀释药物的溶剂是 DMEM 液。干预细胞的终浓度($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别是 0、0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、16、32、64,首先系列稀释成 10× 终浓度。每孔细胞加完全培养液 90 μL 和 10 μL 含药的 DMEM 液。0 浓度即未加药溶剂对照组,并设无细胞(调零孔)空白对照。每组复孔 7 个,置 37℃、5% CO₂ 培养 12h,终止培养做 MTT 检测。

对于 OGD 组细胞,做拟缺血造模前预用药 6 小时,给药方式同正常组。造模时弃去完全培养液,以 D-Hank's 冲洗细胞 2 遍,换 Kreb's 溶液,缺氧同时继续给药,稀释药物的溶剂换成 Kreb's 溶液。干预细胞的终浓度($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)同 N 组,分别是 0、0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、16、32、64,提前用 Kreb's 液系列稀释注射液成 10× 终浓度。每孔细胞加 Kreb's 液 90 μL 和 10 μL 含药的 Kreb's 液。0 浓度即未加药的溶剂对照组,并设无细胞(调零孔)空白对照,每组复孔 7 个。置 37℃、93% N₂+7% CO₂ 自制的密闭缺氧罐中培养 6 小时,终止培养做 MTT 检测。

7% CO₂ 自制的密闭缺氧罐中培养 6 小时,终止培养做 MTT 检测。

1.6 MTT 比色法测定

弃去培养基,每孔加入 DMEM100 μL , MTT20 μL ,继续置培养箱中孵育 4h。吸弃孔内液体,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL ,振荡器振荡 10min,充分溶解甲臢产物。酶标仪(BECKMAN USA)570nm 波长测量,参比波长 620nm,无细胞对照孔调零,测定各孔光密度(OD)值。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析。剂量趋势做多项式曲线逐步回归,拟合三次重复实验数据。

2 结果

如图 1 所示,OGD 未加药对照组与正常未加药对照组比较,活性明显降低,有极显著差异($P < 0.01$)。

如图 1 和图 2 所示,通络救脑注射液作用于正常组脑血管内皮细胞,给药浓度 0.1 μL 、2 μL 、4 μL 、16 μL 组与 0 浓度对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$),表现为抑制细胞活性。大剂量组 64 μL 表现为促进细胞活性,与对照比较有极显著差异($P < 0.01$)。剂量总趋势非线性依赖呈反抛物线形,表现为小剂量范围抑制细胞活性,大剂量促进细胞活性。

药物作用于 OGD 组内皮细胞,如图 1 和图 3 所示。与 0 浓度对照组比较,小剂量组促进内皮细胞的活性,0.5 μL 、2 μL 、4 μL 、8 μL 各组有极显著和显著性差异。而大剂量组 32 μL 、64 μL 则抑制细胞活性,呈显著和极显著差异,剂量总趋势呈抛物线形。

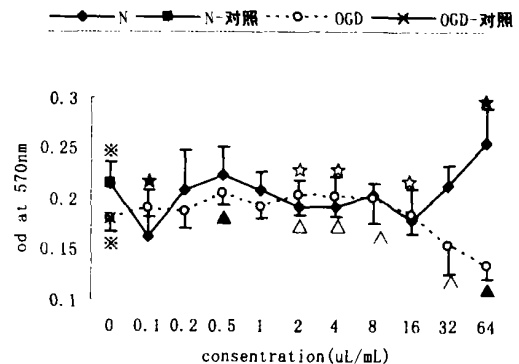


图 1 通络救脑注射液不同浓度对各组脑血管内皮细胞的 MTT 测定
注: N- 对照与 OGD- 对照比较 * $P < 0.01$; N 组与 N- 对照比较 * $P < 0.01$, ☆ $P < 0.05$; OGD 组与 OGD- 对照比较 ▲ $P < 0.01$, △ $P < 0.05$

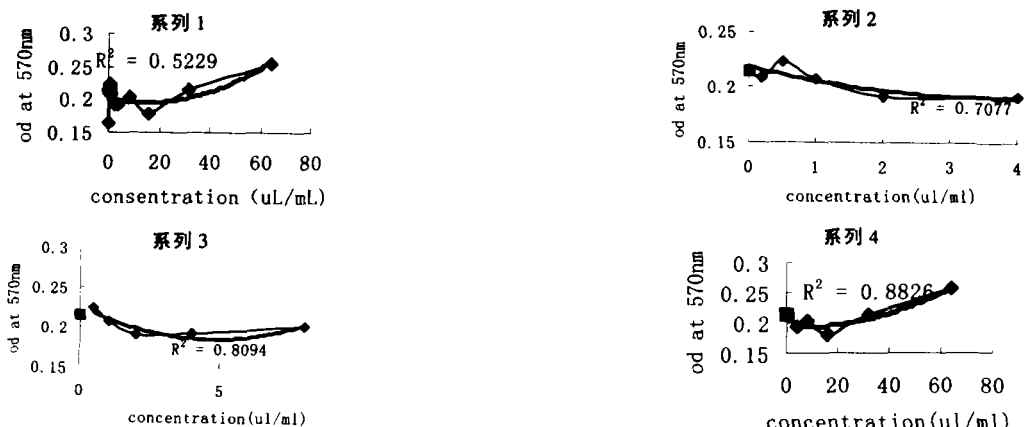


图 2 通络注射液不同浓度作用于正常脑血管内皮细胞的 MTT 值逐步回归

注: 系列 1 示总趋势; 系列 2 示小剂量; 系列 3 示中剂量; 系列 4 示大剂量。

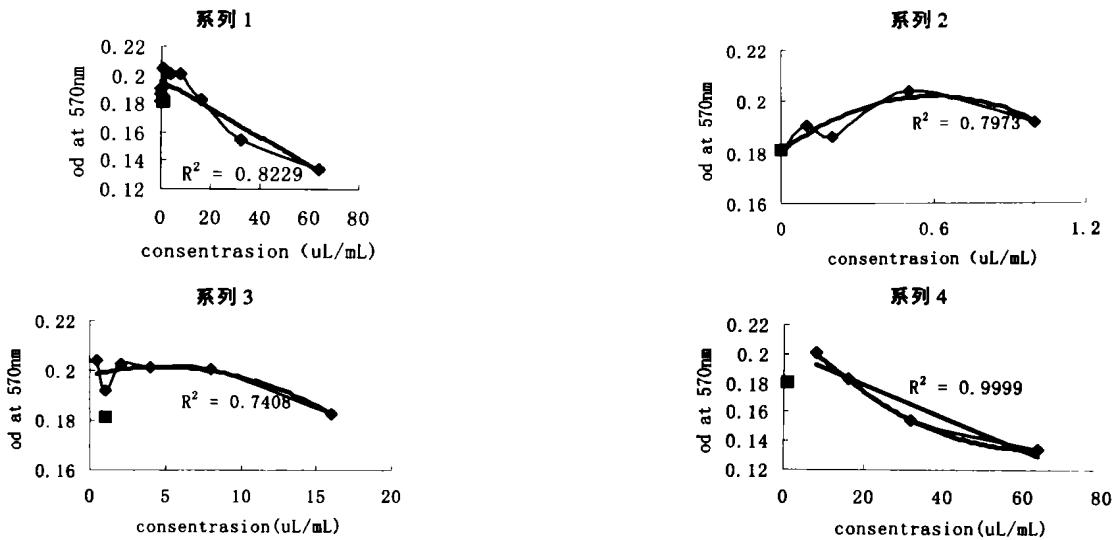


图3 通路注射液不同浓度对 OGD 组脑微血管内皮细胞的 MTT 值逐步回归

注: 系列 1 示总趋势; 系列 2 示小剂量; 系列 3 示中剂量; 系列 4 示大剂量。

图 4 与图 5 所示第二次重复实验, 图 6 所示第三次重复实验。重复三次实验, 剂量与活性相关总趋势基本一致, 非线性依赖, 曲线逐步回归其拟和相关系数 R^2 介于 0.71-0.99。对于拟缺血组细胞, 小剂量范围 ($0.5 \sim 8 \mu\text{L} \cdot \text{ML}^{-1}$) 的药物均促进细胞活性, 有统计学意义; 较大剂量有抑制活性趋势, 首次实

验有显著差异, 其余两次无显著差异。对于正常组细胞, 与未加药组比较, 第二次实验表现为小剂量抑制细胞活性无显著差异, 而大剂量促进细胞活性有显著差异。重复第三次实验为小剂量抑制细胞活性有显著差异, 而大剂量促进细胞活性无显著差异。

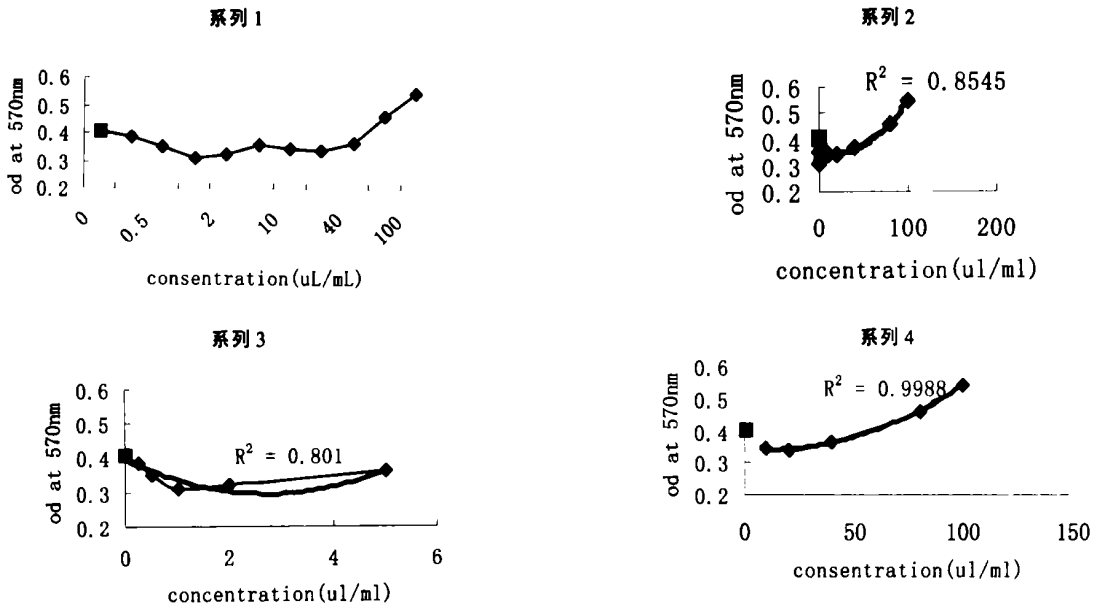


图4 通路注射液不同浓度对正常组脑微血管内皮细胞的 MTT 值逐步回归(2)

注: 系列 1 示原始点图; 系列 2 示总趋势; 系列 3 示小剂量; 系列 4 示大剂量。

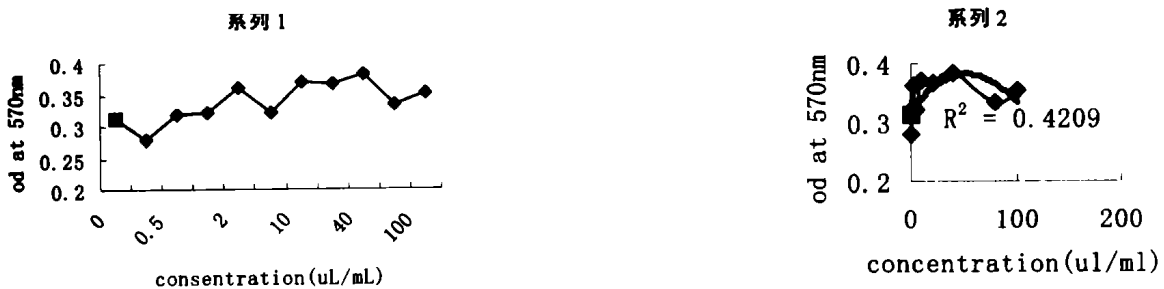




图 5 通路注射液不同浓度对 OGD 组脑微血管内皮细胞的 MTT 值逐步回归(2)
注: 系列 1 示原始点图; 系列 2 示总趋势; 系列 3 示小剂量; 系列 4 示大剂量。

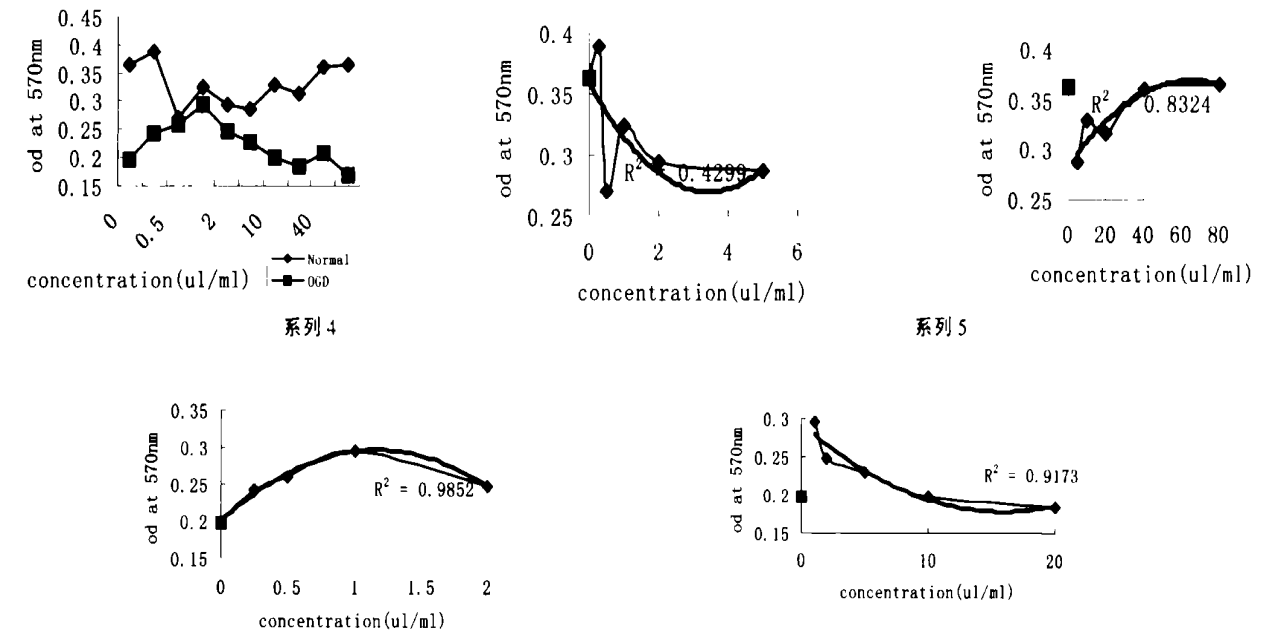


图 6 通路注射液不同浓度对各组脑微血管内皮细胞的 MTT 值逐步回归(3)
注: 系列 1 示 N 组及 OGD 组原始点图; 系列 2 示 N 组小剂量、系列 3 示 N 组大剂量; 系列 4 示 OGD 组小剂量、系列 5 示 OGD 组大剂量

3 讨论

本实验建立了脑微血管内皮细胞拟缺血模型, 方法稳定可靠。拟缺血对照组与正常对照组比较, 活性明显降低有极显著差异。说明培养基氧糖剥夺造成内皮细胞损伤, 提示拟缺血损伤模型成功。研究表明通路救脑注射液小剂量范围可改善拟缺血脑微血管内皮细胞损伤的活性, 但对缺血的保护并非剂量线性依赖, 大剂量有抑制细胞活性的趋势。对正常内皮细胞的药效与拟缺血组相反, 相对大剂量反而促进细胞活性, 三次重复实验的规律基本一致。通路救脑注射液对正常及缺血脑微血管内皮细胞具有双向调节作用, 探讨这一有趣现象可能与通路救脑注射液的成分非单一性有关。正常内皮细胞与拟缺血细胞是两种不同的功能状态, 对微环境反应不同, 细胞分泌的活性物质会表现出量及质的差异。该现象提示不同药效成分的受体可能在正常与缺血两种状态的表达具有显著差异, 大剂量与小剂量可能是不同的作用机制, 折射出中药复方药效的多维性。

通路救脑注射液的主要有效组分是栀子苷和三七总皂

苷, 栀子苷是栀子的主要活性成分, 栀子具有清热泻火、凉血解毒的功用。国内外研究表明, 栀子苷有抗炎和抗凝血活性^[1,2], 并具有解毒、抗氧化、抗肿瘤作用^[3,4]。三七总皂苷是从我国名贵中药三七中提取的有效活性成分。三七的主要功效是活血止血, 《本草新编》认为亦具有补益功效。现代药理证实三七皂苷具有清除自由基, 减轻脂质过氧化, 抑制 Ca²⁺内流, 抑制血小板聚集, 扩张血管, 改善微循环等抗炎作用^[5]。在药物是否透过血脑屏障的基础研究中已证明栀子苷能够透过血脑屏障^[6,7], 三七总皂苷未见相关报导。由本实验可知, 通路救脑注射液在拟缺血内皮细胞损伤状态下具有可靠的维护微血管内皮功能的作用, 对于改善脑微灌流具有实际意义, 可以认为是本药解毒通路作用的一个方面的体现。更有意义的是这种脑微血管内皮细胞的作用有可能启动进一步的脑保护效应。

脑缺血损伤是众多脑系疾病的共同病机, 通路救脑注射液是治疗缺血性脑病行之有效的药物, 解析通路救脑注射液的作用机制能够启迪中药新药的研发。药物能否透过血脑屏障成为制约脑病新药研发的瓶颈, 一个不争的事实是许多中

(下转第 12 页)

4 讨论

通常交叉验证相关系数 $q_2 > 0.5$ 即表明由相应的变量所建立的模型具有较好的预测能力^[7], 本模型 q_2 值为 0.705, 表明该模型具有较好的预测能力。

从图 3 中可以看出: 在此 CoMSIA 模型中, 取代基处于 4 位时, 取代基体积越大, 正电性越大, 有利于提高化合物保留时间值; 取代基位于 7 位时, 取代基体积越小, 越则利于提高化合物保留时间值。取代基位于 4'、7 位时, 取代基正电性越大, 越有利于提高化合物保留时间。此外, 从表 3 中可以看出, 立体场的贡献比静电场的贡献大, 所以立体场对保留时间的影响程度比静电场要大。

例如化合物 DG 和化合物 LG, 前者 7 位取代基的体积比后者的小, 前者 4 位取代基体积及正电性皆比后者的大, 因此前者比后者保留时间较长。化合物 Acacetin 和化合物 Apigenin, 前者 4 位取代基为甲氧基, 比后者的 4 位取代基羟基正电性大, 因此前者比后者保留时间长。

氢键给体位于 3'、4'、6、7 位时, 有利于提高化合物保留时间。氢键受体位于 3'、4'、4、5、6、7 位时, 有利于提高化合物保留时间。黄酮化合物多含有羟基, 可以形成分子内氢键, 降低化合物极性, 延长化合物色谱保留时间。

5 结论

本文通过对黄酮类化合物在 HPLC 色谱柱上的保留时间和三维结构的 QSRR 研究, 结合黄酮类化合物富含羟基、易形成分子内氢键的特点, 建立了较好的三维结构-保留时间的 CoMSIA 模型, 探讨了黄酮化合物色谱保留时间预测的新方法。通过此实验, 可以指导对同类未知成分的保留时间进行预测, 并提供相关的结构类别信息, 为进一步通过 QSRR 方法指导同类化合物保留时间预测提供了依据。

(上接第 18 页)

药有效组分可能不透过血脑屏障却发挥良好的临床疗效。脑微血管内皮细胞是血脑屏障的主要基础结构, 是药物直接作用的靶细胞, 既是效应器, 又具有强大的分泌功能。药物是否直接改善内皮细胞功能而调节微血管机制, 或是通过内皮细胞介导而发挥影响神经细胞功能都亟待探知。首先以脑微血管内皮细胞为切入点, 探索药物对内皮细胞的作用机制, 进而研究内皮的分泌情况及其活性物质介导而影响神经细胞功能的作用机制, 阐明中药在可能不透过血脑屏障的情况下发挥疗效的另一作用途径, 无疑会为治疗脑系疾病的药物研究提供新思路。

参考文献

- [1] Koo HJ, Lee S, Shin KH, Kim BC, Lim CJ, Par. Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of *Gardenia jasminoides* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(5): 467-469

References

- [1] Kaliszan, Roman, Quantitative Structure - Retention Relationships, *Anal. Chem.*, 1992, 64(11): 619-631
- [2] Tian Xiaojuan, Ph. D. Thesis, Peking University School of Pharmaceutical Sciences, 2005: 56-57. [田晓娟. 北京大学药学院博士学位论文, 2005: 56-57]
- [3] Gu Yan, Chen Minbo, Dong Xicheng, Chen Haifeng, Zeng Baoshan, Feng Chuanli, Yu Biao, Hui Yongzhen. 3D-QSAR Studies of Saponins. *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2000, 58(12): 1534-1539. [谷妍, 陈敏伯, 董喜城, 陈海峰, 曾宝珊, 冯传莉, 俞颀, 惠永正. 皂甙的三维定量构效关系研究. 化学学报 (Huaxue Xuebao), 2000, 58(12): 1534-1539]
- [4] Zou Xiajuan, Lai Luhua, Jin Guiyu, Huang Guiqin. Studies on the 3D-QSAR of Nover 1-aryl-1, 4-dihydro-3-acylhydrazinocarbonyl-6-methyl-4-pyridazinones. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2002, 18(6): 513-516. [邹霞娟, 来鲁华, 金桂玉, 黄桂琴. 新型含哒嗪酮基胍类化合物的 3D-QSAR 研究. 物理化学学报 (Wuli Huaxue Xuebao), 2002, 18(6): 513-516]
- [5] Lin Zhongjie, Liu Shuqian. The Latest Research Development of Three Dimensional Quantitative Structure-activity Relationship. *Journal of HeBei University of Science and Technology*, 1999, 20(1): 17-21. [刘仲杰, 刘叔倩. 三维定量构效关系最新研究进展. 河北科技大学学报 (Hebei Keji Daxue Xuebao), 1999, 20(1): 17-21]
- [6] Hou Tingjun, Xu Xiaojie. Recent Progress in Comparative Molecular Field Analysis. *Progress in Chemistry*, 2001, 13(6): 436-440. [侯廷军, 徐筱杰. 比较分子场分析方法研究的最新进展. 化学进展 (Huaxue Jinzhan), 2001, 13(6): 436-440]
- [7] Wan Shengbiao, Yi Xiang, Guo Zongnu. Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship of Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2001, 36(6): 423-426. [万升标, 易翔, 郭宗儒. 1-咪唑基苯并二氮杂卓类法呢基蛋白转移酶抑制剂的三维定量构效关系研究. 药学报 (Yaoxue Xuebao), 2001, 36(6): 423-426]

- [2] Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model [J]. *Planta Med*, 2001, 67(9): 807-810
- [3] Kuo WH, Wang CJ, Young SC, et al. Differential induction of the expression of GST subunits by geniposide in rat hepatocytes [J]. *Pharmacology*, 2004, 70(1): 15-22
- [4] Lee MJ, Hsu JD, Wang CJ. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by geniposide [J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(2): 411-416
- [5] 王根发, 王文安, 周永炜等. 三七皂苷对脑缺血对大鼠再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国临床康复, 2002, (09), P42-43
- [6] 高永红, 王永炎, 肖盛元等. 清开灵有效组分透过模拟血脑屏障的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, (02), P38-40
- [7] 曹进, 徐燕, 张永知等. 清开灵注射液指标成分的体内样品分析 [J]. 中医药学刊, 2003, (11), P186-187+190