

版社, 2002: 771-779.

[5] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准 (第1卷) [S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008: 158-159.

[6] 梁启成, 钟 鸣. 中国壮药学[M]. 南宁: 广西民族出版社, 2005: 318-319.

[7] Li J, Liu Y, Li J Q, *et al.* Chemical constitutens from the rhizomes of *Curcuma kwangsiensis* [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(5): 329-333.

[8] 黄兴振, 朱 丹, 蒋伟哲, 等. 响应面法优化表面活性剂协助提取广西莪术中姜黄素[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(22): 1885-1889.

[9] 黄凤香, 廖 迎, 曾建红, 等. 广西莪术多糖水提取工艺优化及不同产地多糖含量测定[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(16): 3947-3950.

[10] 王柳萍, 梁灿明, 李月儿, 等. 广西莪术化学成分研究[J]. 广西中医药, 2016, 39(2): 78-80.

[11] 潘 莹, 江海燕, 何春风. 不同地区市售广西产莪术饮片挥发油的成分分析[J]. 中成药, 2009, 31(8): 附7-附8.

[12] 肖 旺, 曾建红, 陈 旭. 广西莪术多糖对2型糖尿病大鼠的降糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 144-147.

[13] Arsian R, Bor Z, Bektas N, *et al.* Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientail* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model[J]. *Thromb Res*, 2011, 127(3): 210-213.

[14] 胡三觉, 田巧莲, 顾建文, 等. 一种新的体内血栓形成动物模型[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14(10): 541-542.

[15] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 710-711, 144-145.

[16] Kurz K D, Main B W, Sandusky G E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride[J]. *Thromb Res*, 1990, 60(4): 269-80.

[17] 李家增, 贺石林, 王鸿利. 临床血栓病学[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2014: 8-15, 84-88.

[18] 赵菲菲, 蒯良才, 杨 馨, 等. 白及非多糖组分对大鼠血小板活化及血液流变学的影响[J]. 中成药, 2017, 39(2): 244-249.

[19] 王育苗. 血府逐瘀汤对血栓形成及血液流变学的影响[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(3): 108-109.

氢溴酸樟柳碱对慢性脑缺血损伤大鼠氧化应激及细胞凋亡的影响

陈丹丹^{1,2}, 谢晓芳^{1,3*}, 李梦婷¹, 张世洋¹, 于 思¹, 万 峰⁴, 彭 成^{1,3*}
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 雅安职业技术学院药学检验系, 四川 雅安 625000; 3. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137; 4. 成都第一制药有限公司, 四川 成都 610031)

摘要: **目的** 研究氢溴酸樟柳碱对慢性脑缺血损伤大鼠氧化应激及细胞凋亡的影响。**方法** 体内实验中, 双侧颈总动脉结扎建立大鼠慢性脑缺血模型, 大鼠分为假手术组, 模型组, 阳性对照组, 氢溴酸樟柳碱高、中、低剂量组 (1.2、0.6、0.3 mg/kg), 测定脑组织与血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、乳酸脱氢酶 (LDH)、一氧化氮合酶 (iNOS) 活性、微量还原型谷胱甘肽 (GSH)、一氧化氮 (NO) 含量。体外实验中, CoCl₂ 处理 PC12 细胞以建立化学性缺氧模型, 大鼠分为对照组, 模型组, 阳性组, 氢溴酸樟柳碱高、中、低剂量组 (100、50、25 μmol/L), 采用 Hoechst33342 荧光染色, 荧光显微镜观察细胞凋亡情况, 免疫荧光染色、Western blotting 法检测 P53 蛋白表达。**结果** 体内实验显示, 氢溴酸樟柳碱干预后大鼠血清 SOD 活性增加, iNOS 活性降低, 脑组织 GSH 含量升高。体外实验显示, 氢溴酸樟柳碱干预后能降低 LDH、NO 释放, 减少凋亡细胞数目及 P53 表达。**结论** 氢溴酸樟柳碱能提高慢性脑缺血大鼠抗氧化作用, 减少神经细胞凋亡, 其作用机制与减少 P53 蛋白表达有关。

关键词: 氢溴酸樟柳碱; 慢性脑缺血损伤; 抗氧化; 抗细胞凋亡; PC12 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1242-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.003

收稿日期: 2017-12-17
基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2016SZ0027)
作者简介: 陈丹丹 (1986—), 女, 博士, 讲师, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究。E-mail: chengdan88@126.com
* **通信作者:** 谢晓芳 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: xxf14544@163.com
彭 成 (1964—), 男, 博士, 研究员, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究。E-mail: pengchengchengdu@126.com

Oxidant stress and opoptotic effects of anisodine hydromide on rats with chronic cerebral ischemic injury

CHEN Dan-dan^{1,2}, XIE Xiao-fang^{1,3*}, LI Meng-ting¹, ZHANG Shi-yang¹, YU Si¹, WAN Feng⁴, PENG Cheng^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Department of Pharmacological Assessment, Ya' an Vocational College, Ya' an 625000, China; 3. State Key Laboratory Breeding Base for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China; 4. Chengdu No. 1 Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610031, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the oxidant stress and opoptotic effects of anisodine hydromide (AH) on chronic cerebral hypoperfusion (CCH) rats. **METHODS** *In vivo* CCH models were established in adult male Sprague-Dawley rats by permanent ligation of bilateral common carotid arteries [two-vessel occlusion (2-VO)] surgery. Rats were randomly divided into six groups, sham group, model group, positive group of n-butylphthalide and sodium chloride injection, and AH groups (1.2 mg/kg high-dose group, 0.6 mg/kg medium-dose group, and 0.3 mg/kg low-dose group). Antioxidant indices including the activity of SOD, CAT, LDH and iNOS and the content of GSH and NO were measured. In the *in vitro* trial, PC12 cells were divided into control group, model group, positive group of n-butylphthalide, and AH groups (100 μmol/L high-dose group, 50 μmol/L medium-dose group, and 25 μmol/L low-dose group), and the hypoxic models were established by treating PC12 cells with CoCl₂. The cells had their release of NO and LDH detected, their cellular apoptosis determined by Hoechst 33342 fluorescence staining, and the expression of P53 protein identified by IF (immunofluorescence) and Western blotting method. **RESULTS** The *in vivo* trial revealed AH's enhancement in serum SOD activity and inhibition in serum iNOS activity of the CCH rats, and its power in the cerebral GSH and LDH release reduction. The *in vitro* trial showed the resultant lower LDH and NO release, decreased number of neuro-apoptosis, and inhibited P53 protein expression after AH intervention. **CONCLUSION** The antioxidant and antiapoptotic effects of AH on CCH rats may be associated with down regulation of P53 protein.

KEY WORDS: anisodine hydromide (AH); chronic cerebral ischemic injury; oxidation stress; opoptosis; PC12 cells

慢性脑缺血是一种常见的脑血管病理状态，与大部分脑血管疾病或神经退行性病变相关，如硬脑膜动静脉瘘、脑动静脉畸形、阿尔茨海默症等^[1]。茛菪烷类生物碱（如樟柳碱、山茛菪碱、东茛菪碱、阿托品等）是从茄科植物中提取分离出的成分^[2]，广泛应用于感染中毒性休克、爆发性流脑、脑血栓等疾病^[3]，可通过抗氧化损伤及抗凋亡而对抗急性脑缺血再灌注损伤^[4-5]。

樟柳碱是从茄科植物唐古特山茛菪 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher（即山茛菪）根中分离出的茛菪烷类生物碱，氢溴酸樟柳碱为其氢溴酸盐。岳天立等报道，大鼠静脉注射樟柳碱 30 min 后，药物在纹状体、大脑皮层及海马有较高分布，表明该成分能透过血脑屏障^[6]；药代动力学研究结果显示，樟柳碱具有较高的生物利用度^[7]，显示了在治疗中枢神经疾病方面的优越性；徐伟

等^[8]发现，于颈动脉夹闭前、缺血后和再灌注后 30 min 腹腔注射 0.5 mg/kg 樟柳碱时，可减轻大鼠急性脑缺血再灌注损伤。然而，以樟柳碱为代表的茛菪烷类生物碱能否对抗慢性脑缺血所致机体氧化损伤及细胞凋亡尚未见报道，故本实验将探讨氢溴酸樟柳碱对慢性脑缺血损伤大鼠抗氧化作用及细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 药物 氢溴酸樟柳碱 (AH) 由成都第一药业有限公司提供，含有量 99%，批号 140903，使用时超纯水充分溶解，稀释成 1.2、0.6、0.3 mg/mL，并过 0.22 μm 微孔滤膜。阳性药物为丁苯酞氯化钠注射液（石药集团恩必普药业有限公司）。

1.2 动物及细胞 SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量 (300 ± 20) g，由四川省中医药科学院实验动物中心提供，质量合格证号 SCXK（川）2013-19。大

鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12) 购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.3 试剂 一氧化氮合酶 (NOS)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、乳酸脱氢酶 (LDH)、微量还原型谷胱甘肽 (GSH); 蛋白定量测试盒均购自南京建成生物工程研究所; 一氧化氮 (NO) 测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗 P53 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 鼠抗 β -actin 抗体、辣根标记山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG 均购自北京中山金桥生物技术有限公司; Hoechst 33342 染液 (上海碧云天生物技术有限公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 小牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司); CoCl_2 (美国 Sigma 公司)。

1.4 仪器 Enspire 多标记微孔板检测仪 (珀金埃尔默新加坡有限公司); TDZ4A-WS 台式低速离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司); 1384 型超净工作台、3111 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ImageXpress micro XLS 高内涵 (HCS) 分析系统 (美国 Molecular Devices 公司); DM3000 荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 模型建立 100 只大鼠按体质量随机分为假手术组 (10 只) 和造模组 (90 只), 造模组术前禁食 12 h、禁水 4 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.35 mL/100 g) 麻醉, 颈部正中行约 1.5 ~ 2 cm 的纵行切口, 于气管两侧找到左右颈总动脉, 5 号丝线结扎以完全阻断血流, 术中和术后保持室温 (25 $^{\circ}\text{C}$ 左右), 同时白炽灯照动物使其肛温维持在 (37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 直到大鼠恢复活动; 假手术组除不结扎血管外, 其余操作同手术组, 完全苏醒后给予正常喂养。手术后, 肌肉注射青霉素 (200 000 U/d), 连续 3 d。结果, 造模动物存活率约 50%。

2.2 分组及给药 造模 7 周后, 造模组大鼠按体质量随机分为模型组, 阳性组 (丁苯酞), 氢溴酸樟柳碱高、中、低剂量组 (1.2、0.6、0.3 mg/kg), 模型组和假手术组尾静脉注射生理盐水, 阳性组静脉注射丁苯酞氯化钠注射液 (2 mg/kg), 氢溴酸樟柳碱高、中、低剂量组分别给予氢溴酸樟柳碱 1.2、0.6、0.3 mg/kg, 尾静脉注射 10 d, 肌肉注射 5 d。

2.3 血液及脑组织抗氧相关指标检测 实验结束后麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 分离血清, 然后断头处死, 取额叶脑组织约 100 mg, 按 1 : 9 比例加入冰冷生理盐水, 制成 10% 脑组织匀浆, 3 000 r/min

离心 15 min, 取上清液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存, 按试剂盒说明书测定脑组织匀浆 LDH 活性、GSH 含量, 血清 SOD、CAT、iNOS 活性及 NO 含量。

2.4 细胞培养、造模及给药 PC12 细胞采用含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 选取对数生长期细胞进行实验, 设立对照组, 模型组, 阳性药组 (丁基苯酞 130 $\mu\text{mol/L}$), 氢溴酸樟柳碱高、中、低剂量组 (100、50、25 $\mu\text{mol/L}$)。造模方法参考文献 [9], 除对照组细胞给予 DMEM 培养基外, 其余各组在给予 500 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 造模 DMEM 培养液的同时加入 130 $\mu\text{mol/L}$ 丁基苯酞, 100、50、25 $\mu\text{mol/L}$ 氢溴酸樟柳碱, 共培养 24 h。

2.5 细胞上清液 LDH 及 NO 检测 采用 48 孔板, 按“2.4”项下方法造模、给药, 药物作用结束后吸出培养基, 每孔加入 100 μL 无血清的 DMEM, 培养 24 h, 取上清液检测 LDH 活性及 NO 含量。

2.6 细胞凋亡检测 采用 96 孔板, 按“2.4”项下方法造模、给药, 药物作用结束后, 每孔加入 Hoechst33342 荧光染料 (10 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 将染色好的细胞于荧光显微镜下观察拍照。

2.7 细胞内 P53 表达检测 采用 96 孔板, 按“2.4”项下方法造模、给药, 药物作用结束后, PBS 洗涤, 95% 乙醇固定 25 min, PBS 洗涤, 0.5% Triton X-100 透化 15 min, PBS 洗涤, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 35 min, PBS 洗涤, 兔抗 P53 按 1 : 200 比例稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内过夜, PBS 洗涤, FITC 标记山羊抗兔 IgG 按 1 : 64 比例稀释, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤, Hoechst33342 染核 15 min, PBS 洗涤、封液。将染色好的细胞进入高内涵筛选系统获取图像, 使用 MultiWavelength Cell Scoring 分析模块计算每个细胞 P53 蛋白的荧光强度。

2.8 P53 蛋白表达检测 采用直径 60 cm 的培养皿培养细胞, 按“2.4”项下方法造模、给药, 药物作用结束后, PBS 洗涤, 冰上裂解, 离心, 收集上清液, 加入 SDS 上样缓冲液, 煮沸使蛋白变性。取蛋白样品 20 μL , 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 然后电转 (湿转) 至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 孵育一抗兔抗 p53, 鼠抗 β -actin (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 3 次, 孵育二抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 及山羊抗小鼠 IgG (1 : 5 000) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 电化学发光 (ECL) 显影液对

PVDF 膜进行显色发光处理, Bio-Rad 图像分析系统对蛋白条带成像, Image-Lab 软件进行相关条带灰度值的分析, 以 β -actin 为内标。

2.9 统计学方法 实验数据采用 SPSS 17.0 软件分析, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示各定量指标的平均值和分散程度。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

表 1 氢溴酸樟柳碱对 SOD、CAT、LDH 活性及 GSH 含有量的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

Tab. 1 Effects of AH on SOD, CAT, LDH activities and GSH content $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	CAT/ (U·mg prot ⁻¹)	GSH/ (μmol·g prot ⁻¹)	LDH/ (U·g prot ⁻¹)
假手术组	—	134.47 ± 7.00	198.78 ± 85.68	26.60 ± 6.81	10 831 ± 1 444
模型组	—	118.90 ± 13.52	148.65 ± 54.37	21.84 ± 5.88	12 549 ± 3 061
阳性组	2.0	137.26 ± 36.76	201.21 ± 89.42	32.86 ± 11.53 *	12 948 ± 2 164
氢溴酸樟柳碱高剂量组	1.2	132.68 ± 28.73	184.78 ± 60.18	32.25 ± 10.10 *	12 337 ± 2 737
氢溴酸樟柳碱中剂量组	0.6	111.67 ± 14.81	120.50 ± 29.13	26.01 ± 9.99	9 966 ± 7 572 *
氢溴酸樟柳碱低剂量组	0.3	125.26 ± 16.68	121.91 ± 23.19	23.80 ± 6.00	11 818 ± 1 024

注:与模型组比较, * $P < 0.05$

3.2 对 SOD、CAT、iNOS 活性及 GSH、NO 含有量的影响 由表 2 可知, 与假手术组比较, 模型组 SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.01$), iNOS 活性

表 2 氢溴酸樟柳碱对 SOD、CAT、iNOS 活性及 GSH、NO 含有量的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

Tab. 2 Effects of AH on SOD, CAT, iNOS activities and GSH, NO contents $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mL ⁻¹)	CAT/ (U·mL ⁻¹)	GSH/ (μmol·L ⁻¹)	NO/ (μmol·L ⁻¹)	iNOS/ (U·mL ⁻¹)
假手术组	—	308.01 ± 13.77	3.64 ± 0.74	16.57 ± 10.35	2.40 ± 0.72	15.86 ± 2.45
模型组	—	279.43 ± 14.61 ▲▲	2.08 ± 0.65 ▲▲	8.20 ± 3.43	2.61 ± 0.97	20.65 ± 2.26 ▲▲
阳性组	2.0	301.45 ± 24.26 *	2.55 ± 0.82	10.62 ± 6.63	2.24 ± 0.61	17.25 ± 2.40 *
氢溴酸樟柳碱高剂量组	1.2	300.27 ± 13.45 *	2.28 ± 0.56	13.51 ± 7.44	2.48 ± 1.52	19.35 ± 2.98
氢溴酸樟柳碱中剂量组	0.6	293.38 ± 17.77	2.43 ± 0.91	10.62 ± 3.62	1.70 ± 1.37	18.09 ± 2.73
氢溴酸樟柳碱低剂量组	0.3	286.83 ± 30.92	2.60 ± 0.54	10.30 ± 7.72	1.99 ± 1.23	16.82 ± 3.59 **

注:与假手术组比较, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 对缺氧损伤 PC12 细胞 LDH 及 NO 释放的影响 由表 3 可知, 与对照组比较, 模型组细胞 LDH 活性及 NO 含有量均显著提高 ($P < 0.01$); 氢溴酸樟柳碱高剂量组能显著降低 LDH 释放 ($P < 0.01$), 同时各剂量组均能显著降低 NO 含有量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 氢溴酸樟柳碱对 LDH、NO 释放的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

Tab. 3 Effects of AH on release of LDH and NO $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

组别	剂量/ (μmol·L ⁻¹)	LDH/ (U·gprot ⁻¹)	NO/ (μmol·gprot ⁻¹)
对照组	—	78.16 ± 30.03	2.45 ± 0.30
模型组	—	162.16 ± 52.21 ▲▲	3.54 ± 0.76 ▲▲
阳性组	130	98.86 ± 41.77 *	2.36 ± 0.44 **
氢溴酸樟柳碱高剂量组	100	95.02 ± 41.12 **	2.46 ± 0.50 **
氢溴酸樟柳碱中剂量组	50	146.29 ± 24.68	2.58 ± 0.67 **
氢溴酸樟柳碱低剂量组	25	152.64 ± 52.48	2.62 ± 0.67 *

注:与对照组比较, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 结果

3.1 对 SOD、CAT、LDH 活性及 GSH 含有量的影响 由表 1 可知, 与假手术组比较, 模型组 SOD、CAT 活性及 GSH 含有量均有降低趋势, LDH 活性有升高趋势; 氢溴酸樟柳碱高剂量组能显著提高 GSH 含有量 ($P < 0.05$), 而中剂量组能显著降低 LDH 活性 ($P < 0.05$)。

显著增加 ($P < 0.01$); 氢溴酸樟柳碱高剂量组可显著提高 SOD 含有量 ($P < 0.05$), 而低剂量组能显著降低 iNOS 活性 ($P < 0.01$)。

3.4 对缺氧损伤 PC12 细胞细胞凋亡的影响 如图 1 所示, 正常对照组大多细胞染色呈淡蓝色, 形态饱满, 少量细胞染色质固缩而被深染; 慢性低氧损伤后, 细胞出现明显的染色质固缩, 核呈致密浓染, 蓝色荧光增强, 显示凋亡细胞数目明显增加; 与模型组比较, 氢溴酸樟柳碱各剂量组能不同程度减少细胞凋亡发生。

3.5 对 P53 蛋白表达的影响 由结果可知, 与对照组比较, 模型组细胞 P53 表达显著升高 ($P < 0.01$); 经氢溴酸樟柳碱干预后, 细胞平均荧光强度降低, 在高剂量下最明显, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。Western blot 结果与免疫荧光结果一致, 见图 2 ~ 3, 结果见表 4。

4 讨论

随着人口老龄化, 与年龄相关的脑血管疾病 (如脑缺血、阿尔茨海默症等) 已成为世界关注的

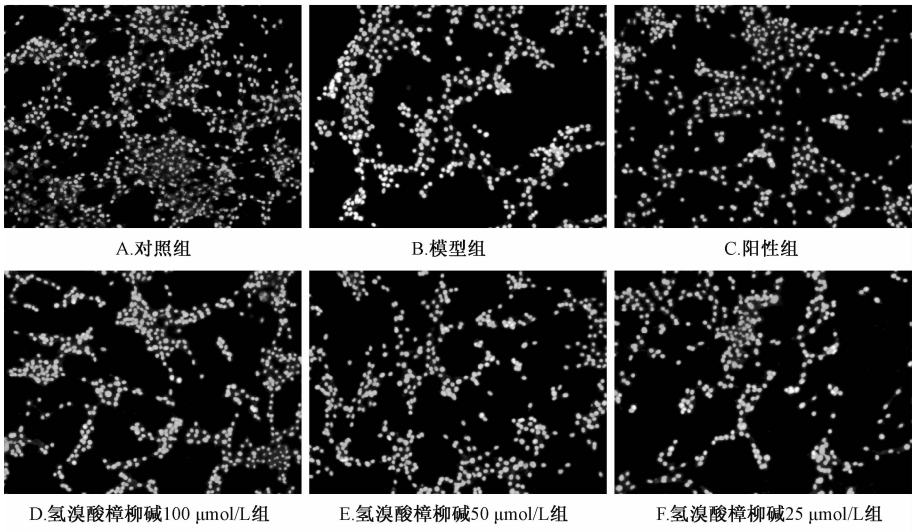


图 1 PC12 细胞 Hoechst33342 染色结果 (×100)
Fig. 1 Results of Hoechst33342 staining on PC12 cells (×100)

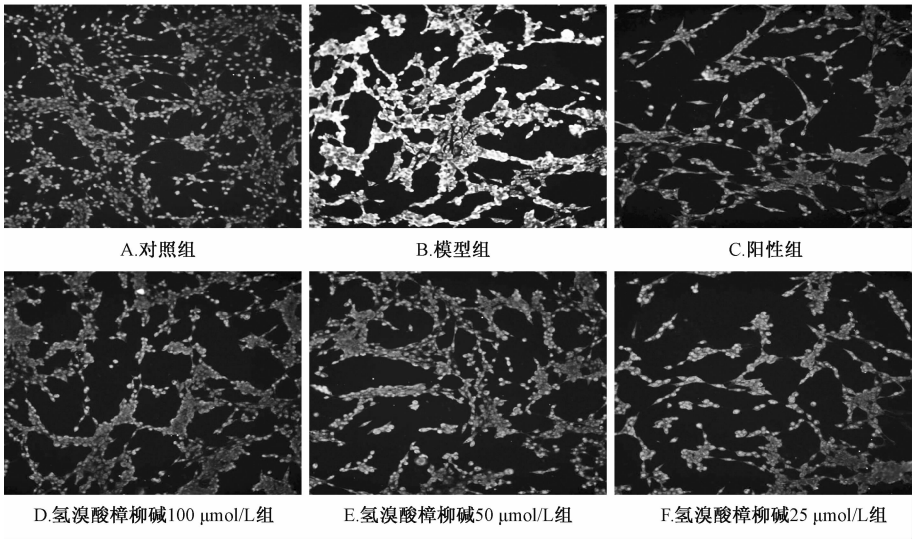


图 2 P53 蛋白表达 (免疫荧光, ×200)
Fig. 2 Protein expressions of P53 (immunofluorescence, ×200)

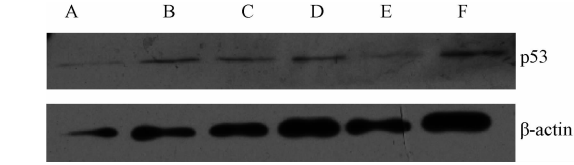
表 4 氢溴酸樟柳碱对 P53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Tab. 4 Effect of AH on P53 protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	P53 平均荧光强度	P53/ β -actin
对照组	—	946.40 \pm 47.95	0.73 \pm 0.13
模型组	—	2 005.41 \pm 311.36 ^{▲▲}	1.98 \pm 0.29
阳性组	130	1 375.82 \pm 83.21	1.41 \pm 0.18
氢溴酸樟柳碱高剂量组	100	1 326.25 \pm 192.47 [*]	0.80 \pm 0.02
氢溴酸樟柳碱中剂量组	50	1 444.57 \pm 111.68	0.94 \pm 0.14
氢溴酸樟柳碱低剂量组	25	1 547.18 \pm 227.02	1.21 \pm 0.09

注:与对照组比较,▲▲ $P < 0.01$;与模型组比较, $^*P < 0.05$

主要健康问题^[10-11]。慢性脑缺血是大部分脑血管疾病共同的病理因素,在诸多复杂病因中,神经细胞氧化应激损伤最为被熟知,神经系统(尤其是

1246



注: A 为对照组, B 为模型组, C 为阳性组, D 为氢溴酸樟柳碱 100 $\mu\text{mol/L}$ 组, E 为氢溴酸樟柳碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 组, F 为氢溴酸樟柳碱 25 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 3 P53 蛋白表达 (Western blot)
Fig. 3 Protein expressions of P53 (Western blot)

中枢神经系统) 由于缺少氧气和能量储备, 故比其他系统更容易受到氧化应激的损伤^[12]。

在正常生理状态下, SOD、GSH、CAT 等作为

机体内抗氧化体系成员，共同维持自由基代谢平衡，但在脑缺血过程中过量自由基的生成会打破平衡，引起氧化应激，继而通过脂质过氧化、蛋白质变性和/或 DNA 修饰等途径促使神经细胞坏死，也可以通过线粒体、内质网或死亡受体等途径启动神经细胞凋亡^[13-14]。NO 广泛参与体内的生理与病理活动，当脑缺血时，其过度生成会导致 DNA 损伤，从而抑制线粒体呼吸以及降低含铁硫蛋白的酶活性，故抑制其过度表达有助于缺血损伤区血流的改善。一氧化氮合酶（NOS）作为 NO 合成过程中的重要限速酶^[15]，其同工酶有 3 种亚型，即在正常状态下表达的神经元型一氧化氮合酶（nNOS）和内皮型一氧化氮合酶（eNOS），以及在损伤后诱导表达的诱导型一氧化氮合酶（iNOS），其中 iNOS 主要由被激活的胶质细胞及中性粒细胞和巨噬细胞释放产生，一般在脑缺血中后期大量生成，而且持续较长时间，是脑缺血中后期脑损伤加重的重要因素^[16]。本实验发现，氢溴酸樟柳碱干预后可使慢性脑缺血大鼠血清 SOD 活性增加，iNOS 活性降低，脑组织 GSH 含量增加，同时体外实验显示，氢溴酸樟柳碱减少缺氧损伤 PC12 细胞 LDH 及 NO 释放，表明该成分能提高慢性脑缺血大鼠的抗氧化作用。

近年来，人们不断将缺血性脑病与 p53 基因或蛋白联系起来，P53 蛋白的高表达是阿尔茨海默病患者脑中的标记，尤其是在氧化应激损伤患者脑组织中高表达^[17-18]。研究表明，细胞凋亡涉及许多信号通路，凋亡前蛋白 P53 诱导是其中之一，脑缺血导致 DNA 损伤，P53 控制的细胞色素 C 从线粒体中释放出来，并与凋亡蛋白激活因子结合，导致凋亡诱导因子活化，最终引起细胞凋亡，故 P53 激活时可诱发凋亡，反之则抑制凋亡^[19-20]。本实验结果表明，缺氧损伤神经细胞模型细胞 P53 表达显著升高，而氢溴酸樟柳碱干预后有所降低，免疫荧光、Western blot 检测结果一致，结合 Hoechst33342 荧光染色定性分析结果，表明氢溴酸樟柳碱能通过降低 P53 的表达来减少凋亡的发生。

与其他莨菪类生物碱比较，樟柳碱的解痉作用与山莨菪碱近似，抑制唾液分泌及扩瞳作用弱于阿托品而强于山莨菪碱，毒性也小于山莨菪碱及阿托品，具有明显缓解有机磷毒性的作用，其机制大多与 M 受体的阻断有关，相关药物在临床上主要用于闭塞性脑血管病、偏头痛、眼底病、急性有机磷中毒、晕动病、中药麻醉等方面^[21]。本研究显

示，氢溴酸樟柳碱能提高慢性脑缺血大鼠抗氧化作用，抑制细胞凋亡，其作用机制可能与减少凋亡相关蛋白 P53 的表达有关，这为莨菪类生物碱在慢性脑缺血相关疾病方面的研究与应用提供思路。

参考文献：

[1] Luo P, Zhang X, Lu Y, *et al.* Fluoxetine ameliorates cognitive impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion via down-regulation of HCN2 surface expression in the hippocampal CA1 area in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2016, 140: 1-7.

[2] 肖培根, 夏光成, 何丽一. 几种主要莨菪烷类生物碱在中国茄科植物中的存在[J]. *植物学报*, 1973, 15(2): 187-194.

[3] 李 珉. 莨菪类药物的临床应用[J]. *中国农村医学*, 1995, 23(3): 45-46.

[4] 陈 群, 曾因明, 许鹏程, 等. 亚低温复合山莨菪碱对脑缺血再灌注期间羟自由基产生的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 1999, 19(8): 509.

[5] 周代星, 邓善珍. 山莨菪碱对急性完全性脑缺血再灌注后脑组织 Ca^{2+} 、MDA 含量、SOD 活性及超微结构的影响[J]. *急诊医学*, 1998, 7(1): 32-34.

[6] 岳天立, 王桂芬, 宋振玉. ^3H -东莨菪碱和 ^3H -樟柳碱代谢的比较[J]. *药学报*, 1979, 14(4): 208-217.

[7] Tian F J, Li C Y, Wang X, *et al.* Comparative study on pharmacokinetics of a series of anticholinergics, atropine, anisodamine, anisodine, scopolamine and tiotropium in rats[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2015, 40(3): 245-253.

[8] Xu W, Deng Y F. Effect of anisodine on acute forebrain ischemia-reperfusion damage in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, 17(2): 161-163.

[9] 曾季平, 王立祥, 胡晓燕, 等. 氯化钴对 PC12 细胞的凋亡作用[J]. *卫生毒理学杂志*, 2005, 19(2): 105-107.

[10] Gammon K. Neurodegenerative disease: brain windfall [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 299-300.

[11] Chen R L, Balami J S, Esiri M M, *et al.* Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(5): 256-265.

[12] Peters M, Wielsch B, Boltze J. The role of SUMOylation in cerebral hypoxia and ischemia [J]. *Neurochem Int*, 2017, 107: 66-77.

[13] Wang K, Chen Z, Huang J, *et al.* Naringenin prevents ischaemic stroke damage via anti-apoptotic and anti-oxidant effects [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(8): 862-871.

[14] Nanetti L, Raffaelli F, Vignini A, *et al.* Oxidative stress in ischaemic stroke [J]. *Eur J Clin Invest*. 2011, 41(12): 1318-1322.

[15] 刘永刚, 王 婧, 李芳君, 等. 白藜芦醇对脑缺血-再灌注损伤大鼠脑组织及血清中 NO 含量及 NOS、iNOS 活性及黏附分子的影响[J]. *中药材*, 2010, 33(10): 1609-1611.

[16] Zeng W X, Han Y L, Zhu G F, *et al.* Hypertonic saline at-

tenuates expression of Notch signaling and proinflammatory mediators in activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia and hypoxic BV-2 microglia [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18(1): 32.

[17] Shahin S, Banerjee S, Singh S P, *et al.* 2.45 GHz microwave radiation impairs learning and spatial memory via oxidative/nitrosative stress induced p53-dependent/independent hippocampal apoptosis: molecular basis and underlying mechanism[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 148(2): 380-399.

[18] Chtourou Y, Aouey B, Kebieche M, *et al.* Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-me-

diated NF- κ B and p53 signaling pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 239: 76-86.

[19] Khan M M, Ishrat T, Ahmad A, *et al.* Sesamin attenuates behavioral, biochemical and histological alterations induced by reversible middle cerebral artery occlusion in the rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 183(1): 255-263.

[20] Ji X, Luo Y, Ling F, *et al.* Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 1734-1747.

[21] 曾 南, 周玖瑶. 药理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 70.

葛根素对高糖诱导 HUVEC-12 细胞氧化损伤的保护作用

张 婷¹, 张 慧², 宋小锋¹, 石晓卫^{1*}
(1. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453000; 2. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453000)

摘要: **目的** 研究葛根素对高糖诱导人脐静脉内皮细胞 HUVEC-12 氧化损伤的保护作用。**方法** 用含 100 mmol/L 葡萄糖和 10、25、50 μ mol/L 葛根素的培养基共同孵育 HUVEC-12 细胞 36 h 后, 测定细胞存活率, 细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 活性, 细胞内活性氧 (ROS) 水平及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平。qPCR 检测细胞中 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达, 酶联免疫吸附法检测培养液中 SIRT1、PGC-1 α 蛋白含量。**结果** 葛根素可增加 HUVEC-12 细胞存活率, 抑制细胞 LDH 释放, 清除 ROS, 降低 MDA 含量与 Caspase-3 活性, 增加 SOD、CAT 活性和 GSH 含量。同时, 葛根素还能提高 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达及蛋白含量。**结论** 葛根素能通过激活 SIRT1/PGC-1 α 通路来保护高糖诱导 HUVEC-12 细胞氧化损伤。

关键词: 葛根素; 高糖; 氧化损伤; HUVEC-12 细胞; SIRT1/PGC-1 α 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1248-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.004

Protective effects of puerarin on high glucose-induced oxidative injury in HUVEC-12 cells

ZHANG Ting¹, ZHANG Hui², SONG Xiao-feng¹, SHI Xiao-wei^{1*}
(1. Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China; 2. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the action mechanism of puerarin's protective effects against oxidative stress of HUVEC-12 cells induced by high glucose. **METHODS** HUVEC-12 cells cultured with 100 mmol/L glucose medium and 10, 25, 50 μ mol/L puerarin for 36 h had the cell proliferation, the levels of lactate dehydrogenase (LDH), intracellular reactive oxygen species (ROS), the activities of caspase-3, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) measured. The mRNA

收稿日期: 2017-07-03
基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1604179); 2016 年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划支持项目 (2016GGJS-220)
作者简介: 张 婷 (1986—), 女, 硕士, 讲师, 从事中药活性成分及药效学研究。E-mail: eward1986@163.com
* 通信作者: 石晓卫 (1982—), 男, 硕士, 副教授, 从事细胞分子生物学研究。Tel: (0373) 7375205, E-mail: tege377@163.com