

基于能量代谢分析益气解毒方对缺氧损伤的PC12细胞线粒体保护作用的机制

戴玉豪¹, 刘黎明¹, 刘陈¹, 吴文洁², 沈建英^{1*}, 李韶菁^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 安徽中医药大学, 合肥 230000)

[摘要] 目的: 采用 Seahorse 细胞能量代谢分析仪, 通过缺氧损伤的高分化大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞(PC12细胞)建立一种线粒体能量代谢评价方法并探究益气解毒方的线粒体保护作用。方法: 应用缺氧小室外构建PC12细胞损伤模型, 实验设置空白组, 模型组(Model), 益气解毒方高、中、低剂量组(25, 5, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; YQ高、中、低)及阳性药曲美他嗪组(TMZ), 每组3复孔, 实验重复3次。采用建立的能量代谢分析方法对细胞线粒体复合物活性进行检测, 筛选最佳给药浓度; 随后设置益气解毒方全方及各拆方组, 采用 Seahorse 细胞能量代谢分析仪检测有氧呼吸和糖酵解功能; 根据非线粒体呼吸值, 质子漏值, 基础呼吸值, 最大呼吸值, ATP生成量, 可提升呼吸能力检测值, 通过主成份分析(PCA)和变量重要性指标(VIP), 分析评价益气解毒方不同配伍组对缺氧损伤线粒体有氧呼吸作用效果; 通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞色素C(Cytochrome C), B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达。结果: 与其他浓度组比较, FCCP的最佳给药浓度为2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与模型组比较, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 益气解毒方全方能提升线粒体复合物活性($P<0.05$); 与模型组比较, 益气解毒方全方改善效果较好($P<0.01$); 在各拆方组中, 人参皂苷和栀子苷配伍效果较好($P<0.01$); VIP分析结果显示, 对于线粒体呼吸功能改善, 益气解毒方中栀子苷贡献度最大; 与模型组比较, 益气解毒方中、高剂量组线粒体细胞色素C的渗漏显著减少($P<0.01$), Bax蛋白的表达显著降低($P<0.01$), Bcl-2蛋白的表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 建立了一种细胞水平、高通量线粒体能量代谢多指标定量评价方法, 证明了益气解毒方全方能够显著改善缺氧损伤后PC12细胞线粒体能量代谢障碍, 而发挥这一作用的机制可能与线粒体凋亡保护相关。

[关键词] 益气解毒方; 配伍; Seahorse; 线粒体能量代谢; 缺氧模型

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0034-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220402

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211203.2203.006.html>

[网络出版日期] 2021-12-06 18:24

Mechanism of Yiqi Jiedu Prescriptions in Protection of Mitochondria in PC12 Cells Against Hypoxia Injury Based on Energy Metabolism

DAI Yu-hao¹, LIU Li-ming¹, LIU Chen¹, WU Wen-jie², SHEN Jian-ying^{1*}, LI Shao-jing^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an evaluation method for mitochondrial energy metabolism with Seahorse analyzer and investigate the protective effect of Yiqi Jiedu prescriptions (YQ) on mitochondria in rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells against hypoxia injury. **Method:** The PC12 cell injury model was induced *in vitro* using hypoxic chambers. Five groups were set up, *ie*, a control group, a model group (model), high- (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), medium- (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and low-dose (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) YQ groups, and a positive drug

[收稿日期] 20210917(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201-004); 国家重点研发计划项目(2017YFC1701900)

[第一作者] 戴玉豪, 硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 429187531@qq.com

[通信作者] * 李韶菁, 博士, 研究员, 从事中药组效关系和分子药理学研究, E-mail: shaojingli2004@126.com;

* 沈建英, 博士, 副研究员, 从事中药药理方向研究, E-mail: jyshen@icmm.ac.cn

trimetazidine (TMZ) group, with three replicate wells in each group. The experiment was repeated three times. The established method for energy metabolism analysis was used to assay the activity of mitochondrial complex in cells and screen the optimal dosing concentration. Subsequently, the YQ group and modified YQ groups were set up, and the aerobic respiration and glycolysis function were assayed by the Seahorse analyzer. According to the non-mitochondrial oxygen consumption, proton leakage, basal respiration, maximum respiration, ATP production, and potentially improved respiration, the effects of modified YQ groups on the aerobic respiration of mitochondria damaged by hypoxia were evaluated by principal component analysis (PCA) and variable importance in projection (VIP). The expression of cytochrome C, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) was detected by Western blot. **Result:** Compared with the groups of other concentrations, the optimal dosing concentration of carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) was $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the model group, the medium-dose YQ group showed enhanced mitochondrial complex activity ($P<0.05$). The YQ groups were superior to the model group in improvement ($P<0.01$). The combination of ginsenoside and geniposide showed the optimal effect among the modified YQ groups ($P<0.01$). VIP analysis revealed that for the improvement of mitochondrial respiratory function, the contribution of geniposide in YQ was the greatest. Compared with the model group, the high-dose YQ group displayed reduced leakage of mitochondrial cytochrome C ($P<0.01$), decreased expression of Bax protein ($P<0.01$), and increased expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** A cellular, high-throughput quantitative evaluation method for mitochondrial energy metabolism was established, which demonstrated that YQ could significantly improve the impaired mitochondrial energy metabolism in PC12 cells damaged by hypoxia, and the underlying mechanism might be related to the protection against mitochondrial apoptosis.

[Keywords] Yiqi Jiedu prescriptions; combination; Seahorse; mitochondrial energy metabolism; hypoxia model

中国是世界上缺血性脑中风(IS)负担较大的国家之一,而新发的脑中风之中IS占比近80%^[1]。IS是伴随着能量供应不足、细胞内钙的过度积累、氧化应激和炎症反应的多种复杂病理过程的组合效应^[2]。其中细胞能量代谢紊乱是造成大脑神经性损伤的主要原因,IS发病早期由于缺血导致葡萄糖和氧气向组织输送受损,极短时间内出现线粒体呼吸功能受损,有氧呼吸途径受阻,糖酵解启动维持能量供应导致三磷酸腺苷(ATP)产量锐减,而随着ATP的耗尽引发一系列继发性级联反应^[3],通常认为线粒体呼吸功能受损是IS早期的标志性事件^[4-6]。线粒体的损伤导致神经元的死亡,线粒体呼吸功能的保留对缺血后细胞存活和神经功能改善至关重要,因此以线粒体呼吸为作用靶点的脑微血管线粒体呼吸、电子传递链的解耦联等研究已成为IS药物开发的新方向^[3,7-9]。

传统的线粒体呼吸研究是基于离体线粒体氧电极方法进行^[10-11],研究通量低,实验时间长,使得研究受限。而目前Seahorse能量代谢分析仪因其高通量,精准定量成为国际公认的评价生物体能量代谢的金标准^[12-14],对线粒体有氧呼吸和无氧酵解可

实现多指标定量评价。

益气解毒方基于“毒损脑络”病机,是中医通过扶正祛邪方法治疗脑病的经验方,全方由人参、黄连、栀子3味中药组成。本课题组前期报道了该方对中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠的抗脑缺血保护作用^[15-17]。本研究采用Seahorse的高通量检测方法,以复方中3味组成中药的主要药效成分:人参总皂苷(Ginsenosides,用A表示),黄连素(Berberine,用B表示),栀子苷(Jasminoidin,用C表示)不同配伍组作为研究对象,深入探讨其对缺氧损伤的PC12细胞的线粒体保护作用及其配伍协同机制。

1 材料与方

1.1 药物 人参总皂苷(人参皂苷Rg, Re, Rd总含量 $\geq(40.55\pm 2.10)\%$,南京泽朗医药科技有限公司,批号为ZLSC2021061911);黄连素,栀子苷(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为J25GS155970, S17O11Y127293);阳性药选取曲美他嗪[TMZ,购于施维雅(天津)制药有限公司]与银杏叶提取物EGb761(德国威玛舒培博士药厂)。

1.2 细胞 PC-12细胞系,由中国中医科学院中药研究所林娜课题组惠赠,购于北京协和医学院细胞

资源中心。

1.3 试剂 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒, Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒(美国 Agilent 公司,批号分别为 103015-100, 103020-100); Cytochrome C 人抗兔抗体(美国 Invitrogen 公司,批号为 PA5-28856); B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号分别为 sc-7480, sc-8432); Bcl-2 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 3498T); 线粒体分离试剂盒, RIPA 裂解液, BCA 蛋白定量试剂盒, 脱脂奶粉, 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(碧云天生物科技有限公司,批号分别为 C3606, P0013C, P0012, P0216, A0208); 鱼藤酮(Rotenone), 5-二磷酸腺苷二钠(ADPN₂), 洋地黄皂苷(DIG), 琥珀酸脱氢酶, 抗霉素 A (Antimycin A)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 R8875, 1897, 300410, 1087360, A8674)。

1.4 仪器 Seahorse XFe96 型分析仪, 细胞微孔培养板及探针板(美国 Agilent 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); 27310 型缺氧处理小室(加拿大 Stemcell 公司); H-1850R 型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪仪器有限公司); FA2204B 型万级天平(上海精密科学仪器有限公司); 1658033 型蛋白电泳、电转仪(美国 Bio-Rad 公司); TS-3D 型水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); ChemiScope 3000mini 系列化学发光显影系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及模型制造 根据参考文献及前期预实验结果^[18-19]。取处于对数生长期的 PC12 细胞, 消化离心计数, 按 6.25×10^4 个/mL 接种于细胞培养板, 每孔体积 80 μ L, 接种完后室温放置 30 min 后移入培养箱。培养 12 h 后置于缺氧小室中, 填充 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合气体 6 h 进行氧气剥夺, 使缺氧室内氧气浓度维持在 1% 以下。后置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下复氧培养 24 h。

2.2 药物及试剂配制

2.2.1 试剂配制 按照试剂盒说明书配制试剂, 线粒体呼吸检测实验培养液: 配制 20 mL 实验所需培养液, 取 20 mL XF Base Medium 加入 90 mg 葡萄糖($0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 200 μ L 丙酮酸钠($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 400 μ L 谷氨酰胺($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。37 $^{\circ}$ C 水浴锅预热, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 将溶液 pH 调至 7.4。用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 备用, 需现配现用; 糖酵

解检测实验培养液: 配制 20 mL 实验所需培养液, 取 XF Base Medium 20 mL 加入谷氨酰胺($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 400 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴锅预热, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 将溶液 pH 调至 7.4。用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 于 4 $^{\circ}$ C 备用, 需现配现用。线粒体呼吸实验, 试剂加入顺序为 A. 寡霉素(oligomycin), B. 羰基氰化物 4-(三氟甲氧基)苯胺(FCCP), C. 鱼藤酮/抗霉素 A (Antimycin/Rotenone); 糖酵解实验, 试剂加入顺序为 A. 葡萄糖(glucose), B. oligomycin, C. 2-脱氧葡萄糖(2-DG)。

2.2.2 药物配制 基于按照实验室基于偏最小二乘法的数学模型设计研究得到的益气解毒方 3:2:0.5 最佳比例进行药物的配制^[15]。益气解毒方组方及各成分使用培养基溶解, 配制浓度分别为人参总皂苷(YQ-A, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 黄连素(YQ-B, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 栀子苷(YQ-C, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 人参总皂苷+黄连素(YQ-AB, $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 人参总皂苷+栀子苷(YQ-AC, $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 黄连素+栀子苷(YQ-BC, $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 人参总皂苷+黄连素+栀子苷(YQ-ABC, $2.73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 1.82 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 曲美他嗪(Tmz, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 配制益气解毒方全方组($1, 5, 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 所有药品均现用现配。

2.3 FCCP 浓度优化 FCCP 是一种解偶联剂, 为确定达到最大呼吸速率时 FCCP 的给药浓度, 设置 FCCP 浓度梯度给药方案为 A 孔, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oligomycin; B 孔, $0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C 孔, Antimycin/Rotenone $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每个浓度 6 个复孔。每个浓度 6 个复孔, 共 36 个孔。以确定 FCCP 的最佳浓度。

2.4 线粒体复合物活性检测 按照文献方法使用 Seahorse 检测线粒体复合物活性^[20], 取接种有 PC12 细胞的 Seahorse 培养板 2 块, 分为正常组和缺氧组, 缺氧组分为 Model, Tmz, YQ ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), YQ ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), YQ ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 每组设置 6 个复孔, 体积 80 μ L。加药后, 模型组置于缺氧小室中, 按上述方法进行模型的制作。取出两块培养板, 磷酸盐缓冲液(PBS) 80 μ L 清洗 1 遍, 更换线粒体呼吸液。按顺序分别往加样孔加入 $8 \times$ Rotenone (终浓度 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $9 \times$ ADP (终浓度 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Digitonin (终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + succinate (终浓度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $10 \times$ Antimycin A (终浓度 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $11 \times$ TMPD ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + ascorbate (终浓度

10 mmol·L⁻¹)。检测线粒体复合物 I, II 活性。

2.5 Seahorse 检测线粒体呼吸及糖酵解功能 为考察缺氧同时给药处理 6 h 线粒体呼吸曲线以及参数的差异(非线粒体呼吸值,质子漏值,基础呼吸值,最大呼吸值,ATP生成量,可提升呼吸能力),有氧呼吸检测按照模型组(缺氧损伤),人参总皂苷(A),黄连素(B),栀子苷(C)单独给药组 YQ-A, YQ-B, YQ-C, 两两配伍组 YQ-AB, YQ-AC, YQ-BC 和三药合用组 YQ-ABC 的顺序依次在 96 孔板上加入对应的药品,每组设置 6 复孔;糖酵解检测按照模型组、总方 YQ 组与阳性对照 Tmz 组的顺序加入对应的药品,每组设置 3 复孔。加样孔 A. oligomycin, B. FCCP, C. Antimycin/Rotenone。计算呼吸参数。

2.6 主成分分析及 VIP 分析 根据 Seahorse 检测所得到的线粒体的基础呼吸,质子漏,最大呼吸能力等氧化磷酸化检测指标,进行主成分分析(PCA)及变量重要性指标(VIP)。以评价益气解毒方各组成成分对缺氧损伤的 PC12 细胞的作用效果。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Cytochrome C, Bcl-2, Bax 蛋白的表达 将对数生长期的 PC12 细胞接种于 25 cm² 的细胞培养瓶中,分为空白组,缺氧损伤组与益气解毒方全方给药组(1, 5, 25 μmol·L⁻¹)待细胞生长至 80% 时进行缺氧损伤的模型制作,6 h 后将各组细胞分为两部分,一部分加入 RIPA 裂解液提取胞浆蛋白,用于检测 Cytochrome C 蛋白的表达;另一部分通过线粒体提取试剂盒提取细胞线粒体后加入 RIPA 裂解液提取线粒体蛋白,用于检测 Cytochrome C, Bcl-2, Bax 蛋白的表达。BCA 法统一定量蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转至 PVDF 膜。转膜结束后室温下脱脂奶粉封闭 1.5 h,随后用抗 Cytochrome C(1:2 000),抗 Bcl-2(1:2 000),抗 Bax(1:2 000)和抗 β-actin(1:3 000)4 °C 孵育过夜,第 2 天用 HRP 标记的二抗(1:1 000)室温孵育 1 h 后采用 ECL 发光法显影,使用 Image J 软件分析各目的蛋白的灰度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异分析,PCA 用 SPSS 23.0 进行分析,VIP 分析采用 SIMCA14.1 进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FCCP 最佳给药浓度确定 确定 FCCP 最佳给药浓度是保证 Seahorse XF 细胞代谢分析仪准确分析的基础,FCCP 的最佳浓度为最大限度增加耗氧

率(OCR)的浓度。相较 0.25, 0.5, 1 μmol·L⁻¹ 3 种浓度 FCCP 在给药浓度为 2, 3 μmol·L⁻¹ 时细胞呼吸速率达到最大值,4 μmol·L⁻¹ 时呼吸速率开始下降,因而选择 FCCP 浓度为 2 μmol·L⁻¹ 为最佳给药浓度进行后续实验。见表 1。

表 1 不同浓度 FCCP 下线粒体呼吸速率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Mitochondrial respiration rate at different concentrations of FCCP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	线粒体呼吸速率 /pmol·min ⁻¹
空白		42.48±0.22
FCCP	0.25	81.35±8.56 ¹⁾
	0.5	127.71±14.68 ¹⁾
	1	157.98±14.77 ¹⁾
	2	162.33±2.73 ¹⁾
	3	163.84±2.40 ¹⁾
	4	144.84±1.96 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 益气解毒方最佳给药浓度的确定 由预实验设置益气解毒方全方的 3 种给药浓度分别为 1, 5, 25 μmol·L⁻¹, 使用 Seahorse 检测线粒体复合物的活性以确定最佳给药浓度。PC12 细胞 6 h 缺氧后线粒体呼吸活性明显降低,加入 Rotenone 后,呼吸速率下降值即可以反映出线粒体复合物 I 的活性,可知模型组相对于正常组复合物 I 的活性显著下降,且在给予益气解毒方后复合物 I 的活性均有不同程度上升,浓度为 5 μmol·L⁻¹ 组活性上升最高;加入 ADP, DIG 和 succinate 后,线粒体呼吸速率上升值可以反映出线粒体复合物 II 的活性,模型组线粒体复合物 II 的活性显著下降,在给予不同浓度益气解毒方后,线粒体复合物 II 的活性均得到了明显提升,同样是浓度为 5 μmol·L⁻¹ 组活性上升最高。由此可以看出益气解毒方全方组对缺氧损伤的线粒体复合物具有保护作用,且最佳给药浓度为 5 μmol·L⁻¹。见表 2。

3.3 益气解毒方全方与拆方对线粒体呼吸功能的影响 在缺氧 6 h 后模型组线粒体基础呼吸急剧降低,且其最大呼吸能力,质子漏,ATP 产量均减少,线粒体耦联效率升高,表明线粒体功能受到了明显的损害。而益气解毒方全方组及各个拆方各组,其基础呼吸值均显著高于模型组,表明给药组线粒体有氧呼吸水平要明显高于模型组,且其最大呼吸能力、质子漏以及 ATP 生成量均高于模型组,可知益气解毒方对线粒体含量及其功能在缺糖缺氧应激

表2 线粒体复合物活性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Mitochondrial complex activities assay results ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	线粒体复合物 I 活性	线粒体复合物 II 活性
空白		38.42±1.54	86.54±7.04
Model		11.47±1.90 ¹⁾	15.92±3.67 ¹⁾
Tmz		11.42±4.54	15.13±7.37
YQ	25	12.40±1.47	17.58±0.55
	5	16.23±2.47 ²⁾	24.92±5.49 ²⁾
	1	14.49±1.76	21.91±2.16

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与Model组比较²⁾ $P<0.05$ 。

下造成的损伤均得到了不同程度的回调。见表3。

3.4 益气解毒方对糖酵解的影响 缺氧6 h后,阳性药TMZ组与益气解毒方组的细胞外酸化率(ECAR)相对于模型组明显升高,表明在缺糖缺氧

表3 缺氧损伤PC12细胞线粒体应激数据统计 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Mitochondrial stress data statistics of PC12 cells damaged by hypoxia ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	非线粒体呼吸值	质子漏值	基础呼吸值	最大呼吸值	ATP生成量	可提升呼吸能力
Model		14.18±0.19	2.15±0.54	12.12±0.39	16.43±0.26	9.97±0.29	18.50±0.49
YQ-A	5	16.66±0.26 ²⁾	3.11±0.55	15.18±0.19 ²⁾	25.41±0.34 ²⁾	12.06±0.45 ²⁾	26.89±0.22 ²⁾
YQ-B	5	15.77±0.47	2.75±0.44 ²⁾	15.32±0.59 ²⁾	24.81±0.96 ²⁾	12.57±0.55 ²⁾	25.26±0.09 ²⁾
YQ-C	5	18.35±0.33 ²⁾	4.11±0.42	19.35±0.92 ²⁾	25.39±0.77 ²⁾	15.24±0.56 ²⁾	24.39±0.54 ²⁾
YQ-AB	2.5+2.5	18.15±0.37 ¹⁾	3.12±0.40	17.39±0.51 ²⁾	28.13±0.68 ²⁾	14.27±0.35 ²⁾	28.89±0.36 ²⁾
YQ-AC	2.5+2.5	22.51±0.35 ²⁾	4.19±0.58 ¹⁾	21.74±1.27 ²⁾	23.43±1.52 ²⁾	17.55±0.78 ²⁾	24.20±0.61 ²⁾
YQ-BC	2.5+2.5	19.83±0.09 ²⁾	4.29±0.52 ²⁾	19.63±0.99 ²⁾	21.22±1.41 ²⁾	15.34±0.74 ²⁾	21.41±0.34 ²⁾
YQ-ABC	2.73+1.82+0.45	18.79±0.46 ¹⁾	3.31±0.36 ¹⁾	20.09±0.78 ²⁾	27.18±1.25 ²⁾	15.74±0.08 ²⁾	25.88±0.27 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

表4 线粒体糖酵解功能参数统计

Table 4 Statistics of mitochondrial glycolytic function parameters

组别	参数	非糖酵解酸化值	糖酵解值	酵解容量	酵解储备/%
Model	ECAR	2.72	8.16	3.94	47.44
TMZ-50	ECAR	1.33	11.09	8.06	72.63
YQ-5	ECAR	1.55	10.75	8.82	81.72

3.6 益气解毒方对缺氧损伤的PC12细胞的Cytochrome C蛋白表达及线粒体Cytochrome C, Bcl-2, Bax蛋白表达的影响 模型组与空白组比较,可检测到显著的细胞色素C由线粒体向胞浆的易位($P<0.01$),细胞色素C在线粒体和胞浆碎片中的比值为空白组的0.26倍。益气解毒方中、高剂量组与模型组比较,可显著降低细胞色素C由线粒体向胞浆的释放($P<0.01$)发挥抗凋亡作用从而保护线粒体。Bcl-2作为抗凋亡蛋白,其在空白组高表达;于缺氧损伤后表达量显著降低($P<0.01$)。与此同

应激下,细胞启动糖酵解,且给药组通过增加糖酵解水平,提高细胞ATP的合成。见表4。

3.5 PCA分析与VIP分析探究益气解毒方组合机理 采用线性偏最小二乘法(partial least squares)回归模型计算VIP,三种成分的VIP分析结果见表4。VIP值显示,在益气解毒方中,C的VIP值 >1 ,证明了栀子苷在益气解毒方改善线粒体呼吸这一环节中发挥最重要的作用。

采用PCA分析A,B,C三种成分及其相互配伍的综合作用,与模型组比较,给药组的线粒体呼吸能力均强于模型组;两药联用的效果均强于单药的效果,ABC三药联用的效果高于除AC联用的其他组别,表明了益气解毒方药物配伍对于缺氧的PC12细胞保护具有一定协同作用。见表5。

时,模型组中促凋亡蛋白Bax表达水平显著升高($P<0.01$)。模型组中Bax与Bcl-2的比值显著增加($P<0.01$),提示模型组中细胞凋亡显著。益气解毒方低、中、高剂量组均可明显降低Bax的表达($P<0.05, P<0.01$),提高Bcl-2的表达。见图1,2,表6。

4 讨论

目前临床治疗IS的药物因受时间窗限制应用具有局限性,新的给药策略与药物种类亟待开发,多药联合的协同给药方案是未来最有希望的药物开发方向之一^[21-22]。中药复方的配伍特点使其在联合给药上具有天然的优势。因此,本课题组前期选择了益气解毒方进行IS药效评价研究,发现其在动物实验中具有较好的疗效,且存在明显的配伍特点^[23]。

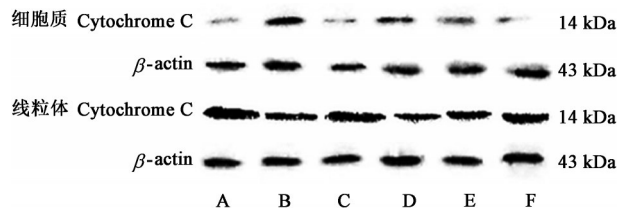
线粒体功能的评估对于了解细胞能量代谢相关疾病及对应药物的开发至关重要,耗氧量是最重要的评估指标之一^[24]。一种创新型膜材料的发展

表5 采用PCA与VIP方法对益气解毒方的线粒体呼吸功能保护作用的配伍分析 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Compounding analysis of protective effect of mitochondrial respiratory function of YQ using PCA and VIP method ($\bar{x}\pm s, n=6$) 分

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PCA得分	A成分PCA得分	B成分PCA得分	C成分PCA得分	VIP得分
Model		-0.93±0.05	-	-	-	-
YQ-A	5	-0.24±0.04 ¹⁾	-0.64±0.09	-	-	0.98±0.06
YQ-B	5	-0.31±0.06 ¹⁾	-	-0.64±0.14	-	0.99±0.02
YQ-C	5	0.20±0.003 ¹⁾	-	-	-0.15±0.27	1.02±0.07
YQ-AB	2.5+2.5	0.09±0.06 ¹⁾	0.09±0.17 ²⁾	0.16±0.08 ⁴⁾	-	-
YQ-AC	2.5+2.5	0.50±0.001 ¹⁾	0.25±0.37	-	0.42±0.41	-
YQ-BC	2.5+2.5	0.16±0.04 ¹⁾	-	-0.05±0.23 ³⁾	-0.53±0.35	-
YQ-ABC	2.73+1.82+0.45	0.29±0.07 ¹⁾	0.31±0.24 ²⁾	0.53±0.12 ⁴⁾	0.25±0.23	-

注:与Model组比较¹⁾ $P<0.01$;与YQ-A组比较²⁾ $P<0.01$;与YQ-B组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。



A. 空白组; B. Model组; C. Egb761组; D. YQ低剂量组; E. YQ中剂量组; F. YQ高剂量组(图2同)

图1 各组PC12细胞细胞色素C蛋白的表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of cytochrome C protein expression in each group of PC12 cells

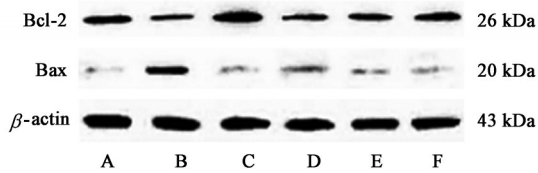


图2 各组PC12细胞Bcl-2/Bax蛋白表达

Fig. 2 Electrophoresis of Bcl-2/Bax protein expression of PC12 cells in each group

造就了Clark氧电极的产生,随后基于该法进行线粒体呼吸能力评估的研究不断开展,直到今天Clark氧电极法仍是一种线粒体呼吸能力评估的可靠标

准,但该法的缺点制约了对线粒体呼吸深层次的研究^[25]。其过程繁琐、低通量、损伤式的测量促使基于光学传感器探头的Seahorse XF细胞代谢分析仪的出现:该仪器能做到无创且同时测量细胞或离体线粒体的氧化磷酸化、糖酵解及ATP产生速率等反映生物代谢能量的变化指标^[26-27],是研究生物体能量代谢的有力工具。目前,Seahorse XF细胞代谢分析仪已经应用于癌症^[28]、衰老^[29]、糖尿病^[30]等研究中,其高通量无损伤的技术优势恰可满足本研究中药配伍实验需求。

本实验首先建立了PC12细胞Seahorse XF细胞代谢分析仪实验方法,确立了解偶联剂FCCP的最佳浓度,随后利用Seahorse检测了不同浓度益气解毒方下细胞的线粒体复合体活性,确立了全方作用的最佳浓度,然后定量检测了缺氧后细胞线粒体有氧呼吸和糖酵解功能的关键指标,说明缺氧可造成细胞线粒体能量代谢功能障碍,而在造模同时给予适量Tmz,益气解毒方后,线粒体有氧呼吸功能得到明显提升,包括基础呼吸值,最大呼吸值,以及质子漏值等线粒体应激相关指标均得到明显改善,糖

表6 益气解毒方对PC12细胞凋亡与线粒体呼吸相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Yiqi Jiedu prescriptions on expression of apoptosis and mitochondrial respiration-related proteins in PC12 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Cytochrome C (线粒体/细胞质)
空白		0.97±0.02	1.05±0.06	0.98±0.01
Model		3.55±0.38 ¹⁾	0.60±0.13 ¹⁾	6.18±0.17 ¹⁾
Egb761	4	1.59±0.59 ³⁾	0.97±0.25 ³⁾	1.80±0.78 ³⁾
YQ	1	3.18±0.41	0.73±0.21	4.51±0.49 ³⁾
	5	1.45±0.41 ³⁾	0.77±0.13 ³⁾	1.94±0.31 ³⁾
	25	1.24±0.27 ³⁾	1.17±0.16 ²⁾	1.02±0.60 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

酵解实验表明糖酵解水平增加,显著提高了线粒体呼吸水平和ATP的生成量,改善了缺氧造成的线粒体能量代谢障碍,发挥了明显的线粒体保护作用,且配伍研究发现组方表现明显优于各药单独作用,三药配伍表现出相对较好的协同作用,且栀子苷在组方中贡献度大。

“毒损脑络”是王永炎院士为解决临床脑病治疗提出的新型病机学说,其关键问题就是如何辨识“毒”以及如何解毒,益气解毒方是据此理论提出的临床经验方。在该方中,发挥“解毒”作用的有效成分为黄连素、栀子苷,发挥“益气”作用的有效成分为人参总皂苷,本课题组前期动物实验中发现IS急性期该方中占比较小的解毒类成分发挥了更大的保护功效^[15],说明在早期及时给予解毒治疗应能发挥较好协同作用。在进一步机制研究中发现,益气解毒方给药后可降低细胞色素C由线粒体向胞浆的释放、显著降低线粒体中Bax蛋白的表达,提高Bcl-2蛋白的表达,提示该方线粒体保护作用可能与抗线粒体凋亡作用相关。

综上所述,本研究通过一种新型的线粒体呼吸测量技术对益气解毒方缺氧造成的线粒体能量代谢障碍改善作用效果和配伍特点进行了研究,证明在IS疾病的早期给予“解毒”治疗可起到事半功倍之效,而这种功效的发挥可能与抗线粒体凋亡相关,该研究为解释益气解毒方配伍的科学性和临床应用提供了重要的依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [2] HOSSAIN M I, ROULSTON C L, STAPLETON D I. Molecular basis of impaired glycogen metabolism during ischemic stroke and hypoxia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97570.
- [3] HE Z, NING N, ZHOU Q, et al. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 146: 45-58.
- [4] SUCHADOLSKIENE O, PRANSKUNAS A, BALIUTYTE G, et al. Microcirculatory, mitochondrial, and histological changes following cerebral ischemia in swine[J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 2.
- [5] GRASMICK K A, HU H, HONE E A, et al.

- Uncoupling of the electron transport chain compromises mitochondrial oxidative phosphorylation and exacerbates stroke outcomes [J]. *J Neuroinfect Dis*, 2018, doi: 10. 4172/2314-7326. 1000283.
- [6] SIMS N R, MUYDERMAN H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 80-91.
- [7] ANDRABI S S, ALI M, TABASSUM H, et al. Pramipexole prevents ischemic cell death via mitochondrial pathways in ischemic stroke [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(8): dmm033860.
- [8] ANDRABI S S, PARVEZ S, TABASSUM H. Progesterone induces neuroprotection following reperfusion-promoted mitochondrial dysfunction after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(6): 787-796.
- [9] 杜肖,路畅,贺晓丽,等. 小续命汤有效成分组对脑缺血/再灌注大鼠恢复早期脑线粒体的保护作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(11): 2139-2145.
- [10] LI Z, GRAHAM B H. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 837: 63-72.
- [11] SILVA A M, OLIVEIRA P J. Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 810: 7-24.
- [12] IUSO A, REPP B, BIAGOSCH C, et al. Assessing mitochondrial bioenergetics in isolated mitochondria from various mouse tissues using Seahorse XF96 analyzer [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1567: 217-230.
- [13] SURE V N, SAKAMURI S, SPERLING J A, et al. A novel high-throughput assay for respiration in isolated brain microvessels reveals impaired mitochondrial function in the aged mice [J]. *Geroscience*, 2018, 40(4): 365-375.
- [14] KOOPMAN M, MICHELS H, DANCY B M, et al. A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(10): 1798-1816.
- [15] LI S, WU C, CHEN J, et al. An effective solution to discover synergistic drugs for anti-cerebral ischemia from traditional Chinese medicinal prescriptionse [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78902.
- [16] 文丽梅,李韶菁,吴传鸿,等. 益气解毒方对局灶性脑缺血大鼠线粒体损伤的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(3): 175-179.
- [17] 杨若聪,田朋朋,吴传鸿,等. 益气解毒方基于线粒体保护的抗缺血性脑卒中研究[J]. *世界中医药*, 2017,

- (11):200-204.
- [18] LIU X, ZHU X, CHEN M, et al. Resveratrol protects PC12 cells against OGD/R-induced apoptosis via the mitochondrial-mediated signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48 (4): 342-353.
- [19] 任民,徐革,彭伟,等. 三七皂苷R1对缺氧诱导PC12细胞损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 36 (12):1657-1660.
- [20] CLERC P, POLSTER B M. Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4): e34465.
- [21] WU Q, YAN R, SUN J. Probing the drug delivery strategies in ischemic stroke therapy [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1):1644-1655.
- [22] SUCHER N J. Insights from molecular investigations of traditional Chinese herbal stroke medicines: implications for neuroprotective epilepsy therapy [J]. *Epilepsy Behav*, 2006, 8(2):350-362.
- [231] 张锦,张允岭,郭蓉娟,等. 从“毒损脑络”到“毒损络脉”的理论探讨[J]. *北京中医药*, 2013, 32 (7): 483-486.
- [24] SILVA A M, OLIVEIRA P J. Evaluation of respiration with clark-type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1782:7-29.
- [25] SEVERINGHAUS J W, ASTRUP P B. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode [J]. *J Clin Monit*, 1986, 2(2):125-139.
- [26] PLITZKO B, LOESGEN S. Measurement of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in culture cells for assessment of the energy metabolism [J]. *Bio Protoc*, 2018, 8(10):e2850.
- [27] CUMMING B M, REDDY V P, STEYN A J C. The analysis of mycobacterium tuberculosis-induced bioenergetic changes in infected macrophages using an extracellular flux analyzer [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2184:161-184.
- [28] ZHANG J, ZHANG Q. Using seahorse machine to measure OCR and ECAR in cancer cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1928:353-363.
- [29] AMIEL E, EVERTS B, FRITZ D, et al. Mechanistic target of rapamycin inhibition extends cellular lifespan in dendritic cells by preserving mitochondrial function [J]. *J Immunol*, 2014, 193(6):2821-2830.
- [30] MILLMAN J R, DOGGETT T, THEBEAU C, et al. Measurement of energy metabolism in explanted retinal tissue using extracellular flux analysis [J]. *J Vis Exp*, 2019, doi:10. 3791/58626.
- [责任编辑 周冰冰]