

丹红注射液对脑缺血缺氧损伤的保护作用

李美娇, 郭虹, 刘青青, 景浩然, 王少峡, 柴丽娟, 胡利民*

(天津中医药大学中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室——省部共建国家重点实验室,
天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193)

[摘要] **目的:**观察丹红注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠和缺氧损伤神经元细胞的保护作用。**方法:**①成年雄性 Wistar 大鼠随机分为模型组、假手术组、丹红注射液(0.9, 1.8, 3.6 mL·kg⁻¹)组和阳性对照(依达拉奉, 6 mg·kg⁻¹)组, 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 缺血 60 min 后再灌注 72 h, 分别于造模前 30 min、再灌注即刻、缺血后 24, 48, 72 h 经 ip 给药。72 h, 进行神经功能评分; 末次给药 1 h 后, 取左侧缺血半脑, 匀浆, ELISA 法测定 S100B 蛋白和神经特异烯醇化酶(NSE)含量。②体外培养 Neuro-2A 细胞, 分为正常对照组、氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)损伤模型组、丹红注射液组, 细胞加平衡盐溶液 D-Hanks 于 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 三气培养箱缺氧孵育 2 h 建立 OGD 损伤模型, 丹红注射液(1.25, 2.5, 5 mL·L⁻¹)干预处理, 检测细胞的增殖活力、乳酸脱氢酶(LDH)漏出量、活性氧(ROS)水平。**结果:**①与假手术组比, 模型组大鼠神经功能评分明显升高($P < 0.01$), 脑组织匀浆 NSE 和 S100B 的含量明显升高($P < 0.01$), 与模型组比, 丹红注射液各剂量组均能不同程度改善 MCAO 大鼠的行为障碍($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 明显降低脑组织匀浆中 NSE 含量($P < 0.05$), 中、低剂量组明显降低 S100 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。②与正常对照组比, 模型组细胞活力明显下降, LDH 漏出量升高, ROS 水平显著升高($P < 0.01$), 与 OGD 组比, 丹红注射液各组均能增加 OGD 损伤 Neuro-2A 细胞活力, 降低细胞内 ROS 水平($P < 0.01$), 2.5, 5 mL·L⁻¹浓度丹红注射液显著降低细胞 LDH 漏出量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**丹红注射液对脑缺血缺氧损伤具有一定的保护作用。

[关键词] 丹红注射液; 脑缺血缺氧; 乳酸脱氢酶; 活性氧; S100B 蛋白; 神经特异烯醇化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0221-04

[doi] 10.11653/syjf2013170221

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130625.0952.004.html>

[网络出版时间] 2013-06-25 9:52

Protected Effects of Danhong Injection on Cerebral Hypoxic-ischemic Injury

LI Mei-jiao, GUO Hong, LIU Qing-qing, JING Hao-ran, WANG Shao-xia, CHAI Li-juan, HU Li-min*
(Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin University of TCM,
Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and hypoxic injury in Neuro-2A cell. **Method:** ①Adult male Wistar rats were randomly divided into 6 groups as following: model group, sham group, Danhong injection low, middle and high dose (0.9, 1.8, 3.6 mL·kg⁻¹) groups, and the positive control (edaravone, 6 mg·kg⁻¹) group. The model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury was reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) performed with thread inserted for 60 minutes and then reperfusion 72 h, Danhong injection was administered intraperitoneally to the animals 30 min before operation and immediately at the onset of reperfusion, and then once a day for three days.

[收稿日期] 20130313(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101201-004);天津市科技创新体系及条件平台建设(10SYSYJC28900);中药有效成分群辨识技术研究(2008BAI51B01)

[第一作者] 李美娇, 硕士, 从事中药药理研究, Tel:18920011537, E-mail:meijiaojiao851020@163.com

[通讯作者] *胡利民, 博士, 研究员, 从事脑血管病中药药理研究, Tel:022-59596166, E-mail:huliminh@126.com

Scoring method of ischemia for 72 h was used to evaluate the abnormal behaviour by nerve injury. The content of S100B protein and nerve specific enolase (NSE) in brain tissue were determined by enzyme linked immunoassay (ELISA). ②Neuro-2A cells injury were reproduced by oxygen and glucose deprivation (OGD). Incubating with Danhong injection ($1.25, 2.5, 5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$), the neuroprotective effect indexes were investigated as the cell proliferation activity, LDH release, and ROS detection. **Result:** ①Compared with sham group, the contents of S100B and NSE were significantly increased in brain tissue ($P < 0.01$). Compared with model operation group, Danhong injection $0.9, 1.8, 3.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip could improve the nerve defect symptoms of model rats at 72 h to some extent ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$), and decreased the content of NSE significantly ($P < 0.05$). Danhong injection $0.9, 1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip could markedly decrease the content of S100B protein ($P < 0.05, P < 0.01$). ②Compared with control group, the viability of Neuro-2A cell injury induced by OGD decreased significantly, the release of LDH and the level of ROS significantly increase ($P < 0.01$), $1.25, 2.5, 5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Danhong injection could improve hypoxic injury Neuro-2A cell proliferative activity, inhibit the level of ROS increase in cells ($P < 0.01$) and $2.5, 5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Danhong injection could reduce the LDH release of Neuro-2A cell ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Danhong injection protect against cerebral the hypoxic-ischemic injury.

[**Key words**] Danhong injection; cerebral hypoxic-ischemic injury; LDH; ROS; S100B; NSE

丹红注射液是由中药丹参和红花提取制成的复方制剂,具有活血化瘀,通脉舒络的功效,临床上用于瘀血闭阻所致的胸痹及中风、冠心病、心绞痛、心肌梗死等症^[1-2]。近年来,丹红注射液对脑缺血保护作用进行了大量实验和临床研究,主要从抗氧化、抗炎性、抗凋亡等方面研究其作用机制^[3-7]。本文采用大鼠脑缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型和小鼠神经元细胞株 Neuro-2A 氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)模型,进一步探讨丹红注射液对脑缺血缺氧损伤的保护作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 $250 \sim 280 \text{ g}$ (北京维通利华实验动物技术有限公司)。

1.2 细胞株 小鼠脑神经瘤细胞 Neuro-2A(北京协和细胞资源中心)。

1.3 药品 丹红注射液(批号 110247,规格 10 mL ,菏泽步长制药有限公司),依达拉奉注射液(批号 80-120508,南京先声东元制药有限公司)。

1.4 试剂 MEM(批号 NYA0800,美国 Hyclone 公司),胎牛血清(批号 415012,美国 Hyclone 公司),细胞活力检测试剂盒(CCK-8,批号 DQ863,日本同仁化学研究所),LDH 试剂盒(批号 120471,中生北控生物科技有限公司),活性氧检测试剂盒(批号 S0033,上海碧云天生物技术研究所),BCA 蛋白定量试剂盒(批号 NO. 110401,北京原平皓生物技术有限公司),线栓(批号 2432-1.5,北京沙东生物技术有限公司),S100B 蛋白、神经特异烯醇化酶(NSE)

ELISA 试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司)。

1.5 仪器 FORMA3111 CO_2 恒温培养箱(德国, Thermo 公司), FlexStation3 多功能酶标仪(美国, MD 公司), 低温高速离心机(美国, Beckman), MODEL3131 三气培养箱(美国, Thermo 公司), TBA-120FR 全自动生化分析仪(日本, 东芝)。

2 方法

2.1 大鼠 MCAO 模型制备与分组 大鼠术前禁食 12 h , 自由饮水, 10% 水合氯醛($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔麻醉, 仰卧位固定, 电热板上体温维持(37.0 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 。颈部皮肤消毒、备皮, 做正中皮肤切口, 钝性分离肌肉, 暴露左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA), 结扎 CCA 近心端, 用直径 0.26 mm , 头端(0.34 ± 0.02) mm , 长度 40 mm 的线栓由 CCA 近心端经颈内动脉进线至大脑中动脉起始部位, 插入约(18.0 ± 0.5) mm , 感觉有轻微阻力时将线栓固定。60 min 后拔出线栓, 用手术线扎紧 CCA 远心端, 缝合皮下组织和皮肤, 实现缺血再灌注模型。术后自由饮水和进食。假手术组分离血管不插线栓。

实验动物随机分为假手术组、模型组、依达拉奉阳性对照($6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、丹红注射液高剂量($3.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、丹红注射液中剂量($1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、丹红注射液低剂量($0.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。分别于造模前 30 min 、再灌注即刻、缺血 $24, 48, 72 \text{ h}$ 经腹腔注射给药。假手术组和模型组注射等量生理盐水。

2.2 大鼠神经功能评分 手术后 72 h , 参考 Zea-

Longa^[8]法进行神经功能评分:0分,无神经功能缺损症状;1分,轻微神经功能缺损,不能完全伸展右侧前爪;2分,中度神经功能缺损,向右侧转圈;3分,重度神经功能缺损,向右侧倾倒;4分,不能自发行走,意识水平下降。

2.3 脑组织匀浆 NSE 和 S100B 含量检测 大鼠末次给药 1 h 后用 10% 水合氯醛麻醉,取左脑,用生理盐水制成 10% 脑组织匀浆。按照 S100B, NSE ELISA 试剂盒试剂说明书方法在酶标仪上测定 NSE 和 S100B 含量,并按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定蛋白质含量。

2.4 Neuro-2A 细胞培养与处理 Neuro-2A 细胞培养于含有 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,0.1 g·L⁻¹链霉素,2 mmol·L⁻¹L-谷氨酰胺的 MEM 培养基中。将处于对数生长期的 Neuro-2A 细胞消化并吹打成单细胞悬液,以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,培养 48 h,细胞用 MEM 同步化 24 h。细胞分组处理如下:①正常对照组:加无血清的 MEM,CO₂ 培养箱中正常培养 2 h。②OGD 组:加平衡盐溶液 D-Hanks 于 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 三气培养箱缺氧孵育 2 h。③丹红注射液治疗组:加用平衡盐溶液 D-Hanks 稀释的丹红注射液,浓度分别为 1.25,2.5,5 mL·L⁻¹,于 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 三气培养箱缺氧孵育 2 h。实验分为 5 组,每组 12 复孔,重复 3 次。

2.5 细胞活力、LDH 漏出量的检测 96 孔板中的细胞分组处理,培养结束后,收取上清液,全自动生

化分析仪测定上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。用 D-Hanks 将细胞洗涤两遍,每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的 MEM,37 °C 孵育 30 min,酶标仪 450 nm 波长检测各孔吸光度(A)。

2.6 ROS 水平的检测 96 孔板中的细胞分组处理,培养结束后,弃去上清液,用 D-Hanks 清洗 3 次,将各组细胞用 1:1 000 DCFH-DA 避光 37 °C 孵育 15 min,D-Hanks 缓冲液再清洗 3 次,荧光酶标仪激发波长 488 nm,发射波长 505 nm,测定荧光强度值。

2.7 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件包进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对 MCAO 大鼠神经功能评分的影响 与假手术组比,模型组大鼠表现出明显的运动功能障碍,提鼠尾可见其右前肢不能完全伸展,行走时偏向右侧,神经功能评分明显升高($P < 0.01$);与模型组比,丹红注射液低、中、高剂量组及依达拉奉组均能不同程度改善 MCAO 损伤大鼠的行为障碍($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$),见表 1。

3.2 对大鼠 MCAO 损伤脑组织匀浆 NSE 和 S100B 含量的影响 与假手术组比,模型组脑组织匀浆中 NSE 和 S100B 的含量明显升高($P < 0.01$)。与模型组比,依达拉奉与丹红注射液各剂量组均能明显降低脑组织匀浆中 NSE 含量($P < 0.05$),中、低剂量丹红注射液明显降低 S100 含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 丹红注射液对 MCAO 损伤大鼠神经功能评分及脑组织匀浆 NSE, S100B 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	剂量/mL·kg ⁻¹	神经功能评分/分	NSE/pg·mg ⁻¹	S100B/pg·mg ⁻¹
假手术	-	0 ± 0 ²⁾	45.39 ± 5.34 ²⁾	53.12 ± 26.43 ²⁾
模型	-	2.88 ± 0.64	66.82 ± 17.88	142.16 ± 44.54
依达拉奉 ³⁾	6	2.00 ± 0.53 ²⁾	48.74 ± 10.29 ¹⁾	92.11 ± 36.86 ¹⁾
丹红注射液	0.9	2.13 ± 0.64 ¹⁾	53.89 ± 11.52 ¹⁾	99.87 ± 32.37 ¹⁾
	1.8	1.88 ± 0.64 ²⁾	47.53 ± 7.19 ¹⁾	89.26 ± 14.97 ²⁾
	3.6	2.25 ± 0.46 ¹⁾	46.27 ± 10.86 ¹⁾	129.33 ± 46.30

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;³⁾依达拉奉的剂量为 mg·kg⁻¹。

3.3 对缺氧损伤 Neuro-2A 细胞活力、LDH 漏出量、ROS 水平的影响 共进行 3 次独立实验,所得数据基本一致,以下是其中 1 次数据统计结果。与正常对照组比,OGD 组细胞活力明显下降,LDH 漏出量升高,ROS 水平显著升高($P < 0.01$)。与 OGD 组比较,丹红注射液各组均能显著增加细胞活力,降低细胞内 ROS 水平($P < 0.01$),2.5,5 mL·L⁻¹丹红注射液能够降低 LDH 漏出量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

丹红注射液作为一种新型中药配方注射液,对脑缺血缺氧损伤具有一定的保护作用,有研究表明,其主要是通过减少氧自由基的生成^[3-4]、抑制炎症反应和脂质过氧化反应^[5],调控相关凋亡基因^[6]等实现的。

本实验采用大鼠脑缺血再灌注损伤模型,观察丹红注射液对脑缺血损伤的影响。NSE 是神经元

表 2 丹红注射液对缺氧损伤 Neuro-2A 细胞活力、LDH 漏出量、ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	剂量/mL·L ⁻¹	细胞活力/A	LDH/U·L ⁻¹	ROS/荧光强度
正常对照	-	0.94 ± 0.041 ²⁾	66.38 ± 6.30 ²⁾	36.01 ± 1.42 ²⁾
OGD	-	0.15 ± 0.004	253.75 ± 29.13	46.90 ± 4.07
丹红注射液	1.25	0.21 ± 0.007 ²⁾	230.13 ± 20.89	39.11 ± 3.29 ²⁾
	2.5	0.33 ± 0.018 ²⁾	195.88 ± 11.53 ¹⁾	38.62 ± 2.45 ²⁾
	5	0.48 ± 0.054 ²⁾	138.88 ± 17.59 ²⁾	35.09 ± 2.32 ²⁾

注:与 OGD 比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

的特异性蛋白,在糖酵解的过程中,催化 α -磷酸甘油形成磷酸烯醇式丙酮酸,维持细胞正常代谢。当神经元受损时,NSE 水平增高,这可能因为损伤后细胞能量代谢发生障碍,诱导了 NSE 基因表达,NSE 的增加加速了神经元细胞内糖酵解,增加 ATP 的释放量,维持细胞的正常功能^[7]。S100B 是脑胶质细胞的特异性蛋白,能够促进神经元发育、轴突生长,对胶质细胞神经元细胞有营养维持作用^[8]。当细胞受损后,S100B 蛋白会高度表达,促进炎症细胞因子表达,过量 S100B 能通过一氧化氮依赖途径诱导神经元细胞死亡^[9]。本实验显示,丹红注射液可以明显改善模型大鼠神经缺损症状,降低大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织匀浆中 NSE 和 S100B 水平,说明丹红注射液可能是通过下调 NSE 和 S100B 水平,而达到对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

Neuro-2A 细胞可分化为神经元细胞,有神经细胞正常突触之间的联系,能够进行突触传递、基因表达,并且容易培养,是研究脑损伤体外模型很好的载体^[10]。因此,本研究选用 OGD 损伤 Neuro-2A 细胞探讨丹红注射液对脑缺氧损伤的保护作用。氧化应激反应是脑缺氧损伤一个重要环节,缺氧的过程中,由于代谢紊乱,产生大量的 ROS,与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,引起 Ca²⁺ 超载,对细胞膜、DNA、蛋白质等造成很大损伤,使神经元丧失功能^[11]。本实验结果显示,丹红注射液可明显增强 OGD 损伤 Neuro-2A 的细胞活力,降低细胞 LDH 漏出量和细胞内 ROS 的水平,说明该药可以抑制脂质过氧化反应,减轻细胞膜的损伤程度,降低细胞膜通透性,对 Neuro-2A 细胞有保护作用。

综上所述,丹红注射液对脑缺血缺氧损伤具有一定的保护作用,其保护作用可能是通过清除 ROS,抑制脂质过氧化反应,保护细胞膜的完整性和稳定性,降低脑组织中 NSE 和 S100B 蛋白的水平实现的。

[参考文献]

[1] 王小平,刘峰,杨东华,等. HPLC 测定丹红注射液中

迷迭香酸在大鼠血浆中的浓度[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):112.

[2] 杜婧,杨薇,易丹辉,等. 基于 HIS“真实世界”的丹红注射液治疗冠心病患者合并用药分析[J]. 中国中药杂志,2011,36(20):2821.

[3] 金波,刘安东,李刚,等. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注后损伤的保护作用及机制研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2009,17(1):3.

[4] 韩永鹏,安芸. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 药物评价研究,2010,33(5):388.

[5] 胡霞敏,周密妹,胡先敏,等. 丹参酮 II_A 预防性给药对脑缺血/再灌注损伤炎症反应的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(4):436.

[6] 王彦平,杨金升,范磊,等. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注后凋亡诱导因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(6):715.

[7] 知晓文,苏显明,封卫毅,等. 丹红注射液对大鼠离体肠系膜动脉血管环作用及机制[J]. 2012,37(17):2607.

[8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84.

[9] 侯琳,濮海平,邵伯芹. 银杏叶提取物对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤 NSE S-100B mRNA 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2003,19(1):100.

[10] Barger S W, Van Eldik L J. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells [J]. Bio Chem,1992,267:9689.

[11] Scotto C, Deloulme J C, Rousseau D, et al. Calcium and S-100B regulation of p-53 dependent cell growth arrest and apoptosis[J]. Mol Cell Biol,1998,18:4271.

[12] Dickey C A, De Mesquita D D, Morgan D, et al. Induction of memory associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro-2A cells[J]. Neurosci Lett, 2004,366(1):10.

[13] 杨军宣,张海燕,赵成城,等. 栀子环烯醚萜苷治疗脑缺血损伤的作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):277.

[责任编辑 聂淑琴]