

藏药螃蟹甲中苯乙醇苷对模型大鼠急性高原脑水肿的改善作用[△]

栾飞^{1,2*},李茂星^{1,2,3,4#},马蓉^{2,3},周保柱^{2,3},曹馨元^{2,3},赵一²,王先敏⁴(1.甘肃中医药大学药学院/甘肃省中药药理与毒理学重点实验室,兰州 730000;2.兰州军区兰州总医院/全军高原环境损伤防治重点实验室/国家中医药管理局临床中药学重点学科,兰州 730050;3.兰州大学药学院,兰州 730000;4.兰州理工大学石油化工学院,兰州 730050)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3075-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.16

摘要 目的:研究藏药螃蟹甲中苯乙醇苷(PhGCs)对模型大鼠急性高原脑水肿的改善作用。方法:60只Wistar大鼠随机分为常氧空白(等容灭菌注射用水)组、缺氧模型(等容灭菌注射用水)组、地塞米松(4 mg/kg)组与PhGCs高、中、低剂量(400、200、50 mg/kg)组。复制模型前6 d ig给药,ig给药第4 d起除常氧空白组外,其余各组大鼠均置于模拟海拔8 000 m的高原环境,连续缺氧暴露72 h以复制大鼠高原脑水肿模型。苏木精-伊红染色后光镜下观察大鼠脑组织病理改变;干湿质量法测定大鼠脑含水量;测定大鼠脑组织中丙二醛(MDA)含量与超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)活性;酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠血清中与脑组织中白细胞介素 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量。结果:与常氧空白组比较,缺氧模型组大鼠脑组织出现明显水肿,细胞和血管周围腔隙增宽,可见炎性细胞浸润;大鼠脑含水量增加;大鼠脑组织MDA含量增加,SOD、GSH活性减弱;大鼠血清与脑组织IL- 1β 、TNF- α 含量增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与缺氧模型组比较,PhGCs高、中、低剂量组大鼠脑组织炎症细胞浸润程度减轻,脑含水量减少;PhGCs高、中剂量组大鼠脑组织MDA含量减少,SOD、GSH活性增强,大鼠血清与脑组织IL- 1β 、TNF- α 含量减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:PhGCs能明显减轻由急性缺氧所致大鼠急性脑损伤状态,对模型大鼠急性高原脑水肿有一定改善作用。

关键词 螃蟹甲;苯乙醇苷;高原脑水肿;炎症;氧化应激;大鼠

Improving Effect of Phenylethanoid Glycosides from Tibetan Medicine *Phlomis younghusbandii* on Rats with Acute High-altitude Cerebral Edema

LUAN Fei^{1,2}, LI Mao-xing^{1,2,3,4}, MA Rong^{2,3}, ZHOU Bao-zhu^{2,3}, CAO Xin-yuan^{2,3}, ZHAO Yi², WANG Xian-min⁴(1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine/Gansu Province Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of TCM, Lanzhou 730000, China; 2. Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command/Key Laboratory of the Prevention and Cure for Plateau Environment Injury, PLA/Key Discipline of Chinese Materia Medica of State Administration of TCM, Lanzhou 730050, China; 3. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 4. School of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the improving effect of phenylethanoid glycosides (PhGCs) from Tibetan medicine *Phlomis younghusbandii* on rats with acute high-altitude cerebral edema. METHODS: 60 Wistar rats were randomly divided into a normoxia control group (isometric sterile water for injection), a hypoxia model group (isometric sterile water for injection), a dexamethasone group (4 mg/kg), and three groups of PhGCs at high (400 mg/kg), middle (200 mg/kg) and low (50 mg/kg) doses, with 10 rats in each group. The rats were given drugs, ig, 6 d before the establishment of models. On the 4th day of administration, ig, the rats in all groups except the normoxia blank group were placed in a simulated 8 000 m altitude plateau environment for 72 h hypoxic exposure to establish the rat models of high-altitude cerebral edema. Following HE stain, the pathological changes in rats' brain tissues were observed under the light microscope. Dry-wet proportion method was used to determine the water contents in rats' brain. The content of MDA and the activities of SOD and GSH in rats' brain tissues were detected. Enzyme-linked immunosorbent assay was adopted to determine the contents of IL- 1β and TNF- α in rats' serum and brain tissues. RESULTS: Compared to the rats in the normoxia control group, those in the hypoxia model group showed obvious brain edema, and thickened lacunas around cells and vessels and inflammatory cell infiltration, higher water contents and MDA and weaker activities of SOD and GSH in brain, and higher contents of IL- 1β and TNF- α in serum and brain tissues. There were statistically significances ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared to the rats in the hypoxia model group, those in the groups of PhGCs at high, middle

[△] 基金项目:全军后勤科研“十二五”计划重点项目(No. BWS12J012)

* 硕士研究生。研究方向:中药活性成分研究与开发。E-mail: luanfeiren@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药活性成分研发。E-mail: limaox2005@aliyun.com

and low dosages demonstrated less inflammatory cell infiltration and lower water contents in brain tissues, in which the groups of PhGCs at high and middle dosages demonstrated lower content of MDA and stronger activities of SOD and GSH in brain tissues, and lower contents of IL-1 β and TNF- α in serum and brain tissues. There were statistical significances ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: PhGCs can obviously alleviate the acute cerebral injury in rats which is caused by acute hypoxia and has improvement effect to some degree on the rats with acute high-altitude cerebral edema.

KEYWORDS *Phlomis younghusbandii*; Phenylethanoid glycoside; High-altitude cerebral edema; Inflammation; Oxidative stress; Rat

高原脑水肿(High altitude cerebral edema, HACE)是急进高原人员快速上升至高海拔地区时,在低压低氧环境下迅速出现的一种严重的、致死性疾病,虽发病率低,但其发病急、病程快、死亡率高,成为威胁急进高原人员生命最大的隐患^[1-2]。但目前仍缺乏安全有效的治疗药物,迫使人们从新的角度、新的层面探讨HACE的发病机制并开发新的预防和治疗HACE的药物。近年来研究表明,炎症反应和氧化应激在HACE的发病中发挥了重要作用^[3]。

藏药螃蟹甲,藏语称露木尔,来源于唇形科糙苏属植物螃蟹甲 *Phlomis younghusbandii* Mukerjee 的干燥块根,为藏医习用药材,广泛用于治疗感冒、咳嗽、肺炎支、疮疥肿毒、风湿性关节炎、气管炎等疾病。螃蟹甲生长于青藏高原海拔3 100~4 800 m的干燥山坡、草地。前期研究表明,螃蟹甲含有大量的苯乙醇苷(Phenylethanoid glycosides, PhGCs)类成分,其中毛蕊花糖苷是其主要成分,具有良好的抗炎镇痛活性^[4-5]。相关药理研究表明,苯乙醇苷类成分具有抗氧化、抗炎、抗缺氧、恢复毛细血管通透性以及改善记忆力等多种功效^[6]。然而,对螃蟹甲 PhGCs 成分用于预防和治疗 HACE 的相关药理作用及机制研究未见报道。本研究通过复制实验性高原脑水肿大鼠模型,观察螃蟹甲 PhGCs 对其是否具有改善作用及其潜在机制,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

DYC-9070型模拟高原低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限责任公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);BPZ-6033LC型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);3K15型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);Spectra-Max[®] i3型全自动荧光酶标仪(美国Molecular Devices公司);WD-9403F型紫外-可见分光光度计(美国惠普公司);BP210S型电子天平(德国Sartorius公司);DK-8A型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);TB-718E型生物组织自动包埋机(湖北泰雅电子技术有限公司);E200型光学显微镜(日本Nikon公司);HM340E型组织切片机(德国美康公司)。

1.2 药材

螃蟹甲购买于成都荷花池药材市场(2013年7月),经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

毛蕊花糖苷(国家食品药品检定研究院,批号:111530-201310,纯度:93.9%);地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:140208,规格:0.75 mg/片);Pierce二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(美国Thermo Scientific公司,批号:NC13227CH);白介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均购于美国RD公司;丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯。

1.4 动物

SPF级Wistar大鼠60只,♂,体质量180~220 g,购买于中

国人民解放军兰州军区兰州总医院动物实验科[实验动物使用许可证号:SYXK(军)2012-0029]。饲养期间以标准饲料喂养,大鼠自由摄食进水,室温19~24℃。

2 方法

2.1 螃蟹甲 PhGCs 的提取制备

称取螃蟹甲3.8 kg,粉碎后加8倍量水煎煮2次,每次2 h,静置滤过,母液缓慢、匀速地注入预先处理好的聚酰胺色谱柱中,紫外检测流出液成分(无PhGCs);上样完全后蒸馏水洗脱,至流出液无色后改用75%乙醇洗脱,流出液每100 ml收集1份,监测至无PhGCs类成分流出;合并乙醇洗脱物,45℃旋转蒸发浓缩,将浓缩液放置于真空干燥箱内,45℃减压干燥,得PhGCs(以毛蕊花糖苷为对照品,在330 nm波长下采用外标法测得PhGCs含量以毛蕊花糖苷计为76%)。

2.2 复制模型与分组、给药^[7]

60只Wistar大鼠随机分为6组,即常氧空白(等容灭菌注射用水)组、缺氧模型(等容灭菌注射用水)组、地塞米松(4 mg/kg)组与PhGCs高、中、低剂量(400、200、50 mg/kg)组。复制模型前6 d ig给药,每天1次,连续7 d;ig给药第4 d起除常氧空白组外,其余各组大鼠均置于模拟海拔8 000 m(舱内压力:35.9 kPa,氧分压:7.5 kPa)的高原环境,连续缺氧暴露72 h以复制大鼠高原脑水肿模型。每天上午9:00以10 m/s速度下降至4 000 m(舱内压力:62.1 kPa,氧分压:13.0 kPa),实验人员进舱,在舱里ig给药,换水食和垫料。每天给药完毕后,将舱内高度以10 m/s的速度匀速上升到预定海拔8 000 m,在此期间大鼠自由摄食及进水。地塞米松成人剂量为0.75 mg/d(成人以60 kg计),按相应系数(0.162)计算得4 mg/kg为大鼠ig剂量;PhGCs根据预实验选择相应剂量。

2.3 指标测定

2.3.1 样本取材 复制模型结束后,眼眶采血后断头处死大鼠,小心打开颅腔,缓慢分离大脑组织,去除小脑和脑干,然后沿脑中线将大脑分为左、右半球。右半球脑组织用4%多聚甲醛固定,用于苏木精-伊红(HE)染色病理切片;左半球上部分脑组织用电子分析天平称湿质量后,锡箔纸包裹,用于测定大鼠脑含水量;左半球下部分脑组织于-80℃保存,用于其他指标的测定。

2.3.2 各组大鼠脑含水量测定 大鼠脑组织含水量检测采用干湿质量法。将锡箔纸包裹的大鼠脑组织,放入55℃恒温干燥烘箱中连续烘烤72 h后至恒质量,然后称干质量,达恒质量后(两次称量干质量误差<0.002 g),再根据Elliot公式计算脑含水量:大鼠脑含水量百分比(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

2.3.3 各组大鼠脑组织病理学观察 取大鼠右半球脑组织于4%的多聚甲醛溶液固定,固定组织应充分展开,切勿挤压和冷冻。室温固定3 d后,采用石蜡切片法制作常规病理切片,HE染色后,中性树胶封片,光学显微镜下不同倍数观察脑组织病理学改变,并拍摄图片。

2.3.4 各组大鼠血清和脑组织匀浆中炎症及氧化应激相关指标水平测定 采集大鼠血样及制备的10%脑组织匀浆液,以

离心半径为 25 cm、3 500 r/min 离心 10 min,分装血清,−80 ℃ 冻存;以 ELISA 法测定大鼠血清与脑组织中 TNF-α、IL-1β 含量。通过紫外分光光度计以比色法测定脑组织中 SOD、MDA、GSH 水平。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠脑含水量测定结果

与常氧空白组比较,缺氧模型组大鼠脑组织含水量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与缺氧模型组比较,地塞米松组与 PhGCs 高、中、低剂量组大鼠脑含水量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠脑含水量测定结果见表 1。

表 1 各组大鼠脑含水量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination results of the water contents in brain of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	脑含水量百分比,%
常氧空白组		77.93 ± 1.88
缺氧模型组		79.64 ± 0.75*
PhGCs 高剂量组	400	78.77 ± 0.29 ^{##}
PhGCs 中剂量组	200	78.86 ± 0.62 [#]
PhGCs 低剂量组	50	78.88 ± 0.78 [#]
地塞米松组	4	78.06 ± 1.63 [#]

注:与常氧空白组比较,* $P < 0.05$;与缺氧模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normoxia control group, * $P < 0.05$; vs. hypoxia model group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

3.2 各组大鼠脑组织病理学观察结果

光镜下观察到常氧空白组大鼠脑组织海马结构清晰整齐,锥体细胞呈层状有序排列,未见神经元脱失和空泡样变,少突胶质细胞未见局限性增生,神经纤维未表现出水肿现象,未见明显病理性损伤。缺氧模型组大鼠脑组织海马正常结构丧失,脑毛细血管充血,锥体细胞有序排列层数减少,神经元脱失严重,出现肿胀或浓缩、核仁消失,多数细胞出现空泡样改变;少突胶质细胞出现局限性增生,部分细胞核浓染,神经纤维束可见轻度水肿;细胞和血管周围腔隙增宽,血管周围可见炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,可见小胶质细胞增生。PhGCs 高、中、低剂量组大鼠脑组织海马结构损伤,血管和细胞水肿以及细胞和血管周围腔隙增宽程度减轻,中炎性细胞浸润也不同程度的减轻,但不能完全减少脑水肿的形成。地塞米松组大鼠脑组织海马结构恢复正常,神经元结构完整清晰、排列整齐,血管源性水肿及细胞和血管周围腔隙增宽也不程度的减少。各组大鼠脑组织病理学观察结果见图 1。

3.3 各组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 含量测定结果

与常氧空白组比较,缺氧模型组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与缺氧模型组比较,地塞米松组和 PhGCs 高、中剂量组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 含量测定结果见表 2。

3.4 各组大鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH 水平测定结果

与常氧空白组比较,缺氧模型组大鼠脑组织 MDA 含量增加,SOD 和 GSH 活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与缺氧模型组比较,地塞米松组与 PhGCs 高、中剂量组

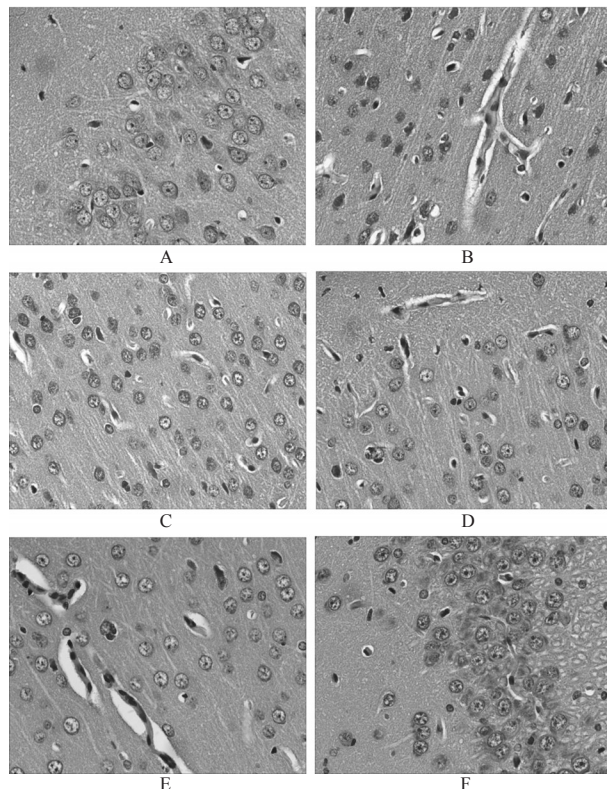


图 1 各组大鼠脑组织切片观察结果(HE, ×400)

A. 常氧空白组; B. 缺氧模型组; C. PhGCs 高剂量组; D. PhGCs 中剂量组; E. PhGCs 低剂量组; F. 地塞米松组

Fig 1 Observation results of brain tissue sections of rats in all groups(HE, ×400)

A. normoxia control group; B. hypoxia model group; C. high-dose group of PhGCs; D. middle-dose group of PhGCs; E. low-dose group of PhGCs; F. dexamethasone group

表 2 各组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination results of the contents of IL-1β and TNF-α in the serum of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	IL-1β,pg/ml	TNF-α,ng/ml
常氧空白组		831.90 ± 57.53	34.13 ± 4.13
缺氧模型组		1 015.69 ± 97.21*	45.08 ± 3.87*
PhGCs 高剂量组	400	880.33 ± 69.90 [#]	39.30 ± 3.99 [#]
PhGCs 中剂量组	200	894.99 ± 45.12 [#]	38.25 ± 2.54 [#]
PhGCs 低剂量组	50	949.57 ± 82.03	40.51 ± 6.59
地塞米松组	4	865.78 ± 80.79 [#]	33.91 ± 6.37 [#]

注:与常氧空白组比较,* $P < 0.01$;与缺氧模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normoxia control group, * $P < 0.01$; vs. hypoxia model group,[#] $P < 0.05$

大鼠脑组织 MDA 含量减少,SOD 和 GSH 活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠脑组织中 SOD、MDA、GSH 水平测定结果见表 3。

3.5 各组大鼠脑组织中 IL-1β、TNF-α 含量测定结果

与常氧空白组比较,缺氧模型组大鼠脑组织中 IL-1β、TNF-α 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与缺氧模型组比较,地塞米松组与 PhGCs 高、中剂量组大鼠脑组织中 IL-1β、TNF-α 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠脑组织中 IL-1β、TNF-α 含量测定结果见表 4。

表3 各组大鼠脑组织中SOD、MDA、GSH水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Determination results of the levels of SOD, MDA and GSH in brain tissues of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	MDA,nmol/mg	SOD,U/mg	GSH, μ .mol/g
常氧空白组		3.52±1.18	12.71±2.36	18.41±3.52
缺氧模型组		4.80±1.13*	9.77±1.92**	14.06±3.37*
PhGCs高剂量组	400	3.75±0.89 [#]	12.68±3.77 [#]	18.14±4.97 [#]
PhGCs中剂量组	200	3.69±0.82 [#]	12.26±1.83 [#]	17.93±3.76 [#]
PhGCs低剂量组	50	4.54±1.25	10.51±2.68	15.10±3.31
地塞米松组	4	3.90±0.59 [#]	12.01±2.34 [#]	17.94±4.04 [#]

注:与常氧空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与缺氧模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. normoxia control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. hypoxia model group,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

表4 各组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Determination results of the contents of IL-1 β and TNF- α in brain tissues of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	IL-1 β ,pg/ml	TNF- α ,ng/ml
常氧空白组		1 070.56±87.20	43.02±4.49
缺氧模型组		1 334.18±115.33**	49.76±2.61*
PhGCs高剂量组	400	1 135.84±128.29 [#]	44.80±3.43 [#]
PhGCs中剂量组	200	1 179.19±82.64 [#]	45.26±2.79 [#]
PhGCs低剂量组	50	1 213.66±91.22	48.52±2.75
地塞米松组	4	1 105.39±106.83 [#]	44.93±2.42 [#]

注:与常氧空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与缺氧模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. normoxia control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$;vs. hypoxia model group,[#] $P<0.05$

4 讨论

HACE的发病机制至今不清,大多数研究证明HACE为血管源性脑水肿,血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)通透性增加在其发病中起了关键作用。BBB是维持中枢神经系统内环境稳定的重要结构。近年研究发现,缺氧可以引起BBB通透性增加^[7],但缺氧引起BBB通透性增加的机制仍不清楚。周其全等^[8]研究证明炎症介质生成增加是高原暴露下BBB通透性改变的一个重要因素。但目前对HACE的发生机制尚未完全阐明,对该病的预防和治疗也缺少有效措施。

高原低压低氧下,机体在一定程度上会发生氧自由基代谢紊乱,SOD和GSH的活性均减弱,MDA的含量增加^[9]。MDA是氧自由基和生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物,其产生的量与氧自由基清除的量相平行,测定MDA可反映氧自由基的代谢情况,间接反映出细胞损伤的程度^[10]。从本实验结果可以看出,模拟高原低压低氧的条件下,缺氧模型组大鼠脑组织中SOD和GSH活性均减弱,而MDA含量增加,说明在急性高原低压低氧下,机体的氧自由基代谢会发生紊乱,抗氧化系统被破坏,导致机体细胞和组织受到损伤。而经PhGCs给药后,大鼠脑组织的SOD和GSH活性较缺氧模型组有增强的趋势,MDA含量有减少的趋势,表明PhGCs能有效改善缺氧状态下HACE大鼠的氧化应激损伤,减轻脂质过氧化反应对组织细胞的损伤作用,恢复机体的抗氧化功能。

研究表明,氧自由基可与炎症因子相互促进,如大肠埃希

菌,通过内毒素(LPS)、TNF- α 及其他细胞炎症因子激活中性粒细胞,增加耗氧量和释放活性氧,加剧SEP病程的进展^[11]。海乐等^[12]研究发现高原缺氧能激活HAPE大鼠模型中TNF- α 等炎症因子。同时,TNF- α 还可刺激IL-1 β 等其他细胞炎症介质的释放,引起细胞炎症因子释放的瀑布效应等^[13]。IL-1 β 在局部起免疫调节作用,可加速中性粒细胞到达炎症部位释放氧自由基、脂质代谢产物、溶酶体酶等氧化应激产物^[14]。基于此,笔者检测了大鼠血清和脑组织中IL-1 β 和TNF- α 的变化。从实验结果可以看出,在模拟高原海拔8 000 m、缺氧暴露72 h的条件下,缺氧模型组大鼠血清和脑组织中IL-1 β 和TNF- α 的含量均增加,其主要是由于低氧条件导致炎症反应的刺激和诱导,造成了以巨噬细胞为主的免疫活性细胞产生大量的IL-1 β 和TNF- α 并释放到血液循环中,使血清及脑组织中IL-1 β 和TNF- α 含量增加。而PhGCs各剂量组大鼠给药后,IL-1 β 和TNF- α 的含量较缺氧模型组减少,表明PhGCs的抗炎作用可以通过降低IL-1 β 和TNF- α 等炎症因子的含量来实现。同时,PhGCs各剂量组给药后,脑水肿程度较缺氧模型组明显降低,表明PhGCs对大鼠高原脑水肿有一定的抗渗作用。

目前,以地塞米松为代表的糖皮质激素类药物在抗炎治疗中广泛应用,此类药物免疫抑制作用较强,能广泛调节机体内多种炎症介质的表达,但因其会产生药物依赖、激素抵抗等不良反应,故一直不能作为临床治疗的最佳选择。对藏药螃蟹甲PhGCs作为预防药物进行实验研究,以地塞米松为阳性药,结果发现其抗炎效果虽略低于地塞米松,但可能会避免长期使用激素类药物带来的副作用^[15]。

综上所述,藏药螃蟹甲中PhGCs可通过抗氧化、抗炎等方式对高原低压低氧所致大鼠高原脑水肿发挥改善作用,有望为临床上高原脑水肿的治疗提供可能途径,但其机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Luks AM, McIntosh SE, Grissom CK, et al. Wilderness medical society consensus guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness[J]. *Wilderness Environ Med*, 2010,21(2):146.
- [2] Palmer BF. Physiology and pathophysiology with ascent to altitude[J]. *Am J Med Sci*, 2010,340(1):69.
- [3] Yu Botao, Jie Ma, Wenjing Xiao, et al. Protective effect of ginkgolide B on high altitude cerebral edema of rats [J]. *High Altitude Medicine Biology*, 2013,14(1):61.
- [4] Maoning L, Jin H, Chao Z, et al. Iridoid glycosides and phenylethanoid glycosides from phlomis younghusbandii roots[J]. *Chem Nat Compd*, 2011,47(5):848.
- [5] 张超,李茂星,尚小飞,等.藏药螃蟹甲的镇痛抗炎作用[J].*华西药学杂志*, 2011,26(2):135.
- [6] Gulinuer M, Liu M, Lu J. Effect of cistanoside compounds on oxidative stress and immunity[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001,10(3):157.
- [7] Patir H, Sarada SK, Singh S, et al. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012,53(4):659.
- [8] 周其全,王静,汪云利,等.炎症介质在高原暴露下血脑屏障通透性改变中的作用及相互关系[J].*中国应用生理学杂志*, 2007,23(3):281.
- [9] Qian J, Jiang F, Wang B, et al. Ophiopogonin D prevents H₂O₂-induced injury in primary human umbilical cells [J].

黄芪多糖对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的增殖作用研究^Δ

高晓红*, 焦海胜, 张雪琛(兰州大学第二医院, 兰州 730030)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3079-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.17

摘要 目的:研究黄芪多糖(APS)对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制作用。方法:以 0(空白对照)、25、50、100 mg/ml APS 培养细胞 6、12、24 h 后,MTT 法测定细胞活力并计算抑制率。0(空白对照)、25、50、100 mg/ml APS 培养细胞 24 h 后,Hoechst 33258 荧光染色,荧光显微镜下观察细胞核形态;流式细胞仪检测细胞周期分布与凋亡情况;Western blot 法检测细胞磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(ERK)1/2 蛋白表达;酶联免疫吸附(ELISA)法测定细胞白细胞介素 2(IL-2)、IL-6、IL-12 含量。结果:与空白对照比较,100 mg/ml APS 培养细胞 6 h,50、100 mg/ml APS 培养细胞 12 h 与 25、50、100 mg/ml APS 培养细胞 24 h 后细胞抑制率升高。50、100 mg/ml APS 培养细胞 24 h 后,G₀/G₁ 期比例升高,G₂/M、S 期比例降低;IL-2、IL-6 含量增加。25、50、100 mg/ml APS 培养细胞 24 h 后细胞凋亡率升高;细胞核出现碎块状致密浓染,并有凋亡小体出现;细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平降低,IL-12 含量增加。以上差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:APS 能抑制 SH-SY5Y 细胞增殖,阻滞细胞周期进程,诱导细胞凋亡,其机制可能与降低 ERK 蛋白磷酸化水平和升高细胞因子水平有关。

关键词 黄芪多糖;人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞;细胞周期;磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 1/2;细胞因子

Study on the Effect of Astragalus Polysaccharide on the Proliferation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

GAO Xiao-hong, JIAO Hai-sheng, ZHANG Xue-chen (Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the inhibitory effect of astragalus polysaccharide (APS) on the proliferation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **METHODS:** After the cells were cultured with 0 (blank control), 25, 50 and 100 mg/ml APS for 6, 12 and 24 h, MTT method was used to determine cell viability and calculate inhibition rate. Following cell cultured with 0 (blank control), 25, 50 and 100 mg/ml APS for 24 h, Hoechst 33258 fluorescent staining was performed, and then cell nucleus morphology was observed under the fluorescence microscope; flow cytometer was used to detect the distribution of cell cycles and apoptosis; western blot was employed to determine the expression of extracellular regulated protein kinases (ERK) 1/2 protein in cells. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted to determine the contents of interleukin 2 (IL-2), IL-6 and IL-12 in the cells. **RESULTS:** Compared to the blank control, those cultured with 100 mg/ml APS for 6 h, 50 and 100 mg/ml APS for 12 h and 25, 50 and 100 mg/ml APS for 24 h demonstrated higher inhibition rate. After the cells were cultured with 50 and 100 mg/ml APS for 24 h, those in G₀/G₁ phase increased and those in G₂/M and S phases decreased, and the contents of IL-2 and IL-6 increased. After cells were cultured with 25, 50 and 100 mg/ml APS for 24 h, the apoptosis rate was higher, densely hyperchromatic fragments in cell nuclei and apoptotic bodies appeared, the phosphorylation level of ERK1/2 protein in the cells was lower, and the content of IL-12 was higher. There was statistically significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** APS can inhibit the proliferation of SH-SY5Y cells by arresting cell cycle and inducing cell apoptosis through a mechanism which may be correlated to the decrease in the phosphorylation of ERK1/2 and increase in cytokine.

KEYWORDS Astragalus polysaccharide; Human neuroblastoma SH-SY5Y cell; Cell cycle; Extracellular regulated protein kinases 1/2; Cytokine

J Ethnopharmacol, 2010, 128(2):438.

[10] Shen ZB, Yin YQ, Tang CP, et al. Pharmacodynamic screening and simulation study of anti-hypoxia active fraction of Xiangdan injection[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(1):103.

[11] Suntres ZE, Shek PN. Treatment of LPS-induced tissue injury: role of liposomal antioxidants[J]. *Shock*, 1996, 6(1):57.

[12] 海乐, 周其全, 贺斌峰, 等. 七叶皂苷钠对大鼠实验性高原肺水肿的干预作用观察[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(12):1291.

[13] Segal B, Rhodus NL, Patel K. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitor therapy for rheumatoid arthritis[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod*, 2008, 106(6):778.

[14] 向红, 王雅莉, 邱桐. 红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(15):1352.

[15] Sun J, Zhao Y, Hu J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1 β and IL-6 production in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67078.

Δ 基金项目:甘肃省兰州市科技局重大创新项目(No.041242)
* 副主任药师。研究方向:中药药理学。E-mail:gxhong0616@163.com (收稿日期:2015-01-03 修回日期:2015-03-17) (编辑:张 静)