

. 实验研究 .

丹参酮 II A 通过抑制 TLR4/NF- κ B 途径减轻糖氧剥夺对大鼠脑微血管内皮细胞的炎症损伤

杨 华 何强华 张爱华 李 扬 陈 兵

【摘要】目的 探讨丹参酮 II A 对大鼠脑微血管内皮细胞糖氧剥夺炎症损伤的影响及其机制。**方法** 原代培养雄性 SD 大鼠脑微血管内皮细胞,分为对照组、糖氧剥夺组和丹参酮 II A 组。对照组用 DMEM 培养,糖氧剥夺组细胞用无糖 DMEM 培养,丹参酮 II A 组用无糖 DMEM 基础上加用含 8 μ g/ml 丹参酮 II A 培养。利用 CCK8 检测细胞活力,酶联免疫吸附试验检测细胞炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平;实时 PCR 和免疫印迹法检测细胞 TLR4 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,糖氧剥夺组细胞活力明显降低($P<0.05$),IL-6 和 TNF- α 水平明显增加($P<0.05$),TLR4 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达均明显增加($P<0.05$);丹参酮 II A 明显抑制糖氧剥夺作用($P<0.05$),但未恢复到对照组水平($P<0.05$)。**结论** 丹参酮 II A 可减轻糖氧剥夺对大鼠脑微血管内皮细胞的炎症损伤,其作用机制可能与抑制 TLR4-NF- κ B 信号通路有关。

【关键词】 缺血性脑卒中;脑微血管内皮细胞;糖氧剥夺;炎症因子;丹参酮 II A;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2020)09-0610-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Tanshinone II A relieves inflammatory damage of cerebral microvascular endothelial cells induced by oxygen glucose deprivation via inhibition of TLR4/NF- κ B pathway

YANG Hua^{1,2}, HE Qiang-hua², ZHANG Ai-hua², LI Yang², CHEN Bing¹. 1. Graduate School, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524005, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Naval Hospital of Southern Theater Command, PLA, Zhanjiang 524005, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of tanshinone II A on the inflammatory damage of cerebral microvascular endothelial cells (CMECs) induced by oxygen glucose deprivation (OGD). **Methods** The primary CMECs were cultured which were isolated from SD rats brain tissues and randomly divided into control group in which the CMECs were cultured in the conventional DMEM medium, OGD group in which the CMECs were cultured in the DMEM sugar-free medium, and tanshinone II A group in which the CMECs were treated with 8 μ g/ml tanshinone II during OGD treatment. Cell activity was detected by CCK8 method. Inflammatory cytokines including IL-6 and TNF- α were detected by ELISA method. TLR4 and NF- κ B mRNA and protein expressions were detected by real-time PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with control group, the CMECs activity was significantly lower ($P<0.05$), the levels of IL-6 and TNF- α in culture medium were significantly higher ($P<0.05$), and TLR4 and NF- κ B mRNA and protein expression levels were significantly higher in OGD group ($P<0.05$). Tanshinone II A significantly inhibited the effects caused by OGD ($P<0.05$). **Conclusion** The results suggest that tanshinone II A could relieve the inflammatory damage of CMECs induced by OGD, and its mechanism may be related to the inhibition of TLR4-NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Cerebral microvascular endothelial cells; Oxygen glucose deprivation; Inflammation; Tanshinone II A; Rat

缺血性脑卒中发病率、病死率及致残率均较高,严重危害人们健康^[1]。缺血缺氧导致内皮细胞的损伤是缺血性卒中的病理改变之一^[2]。丹参酮 II A 是一种来源于丹参的脂溶性化合物单体,常用于心血管疾病的辅助治疗^[3],也能用于治疗缺血性脑卒中^[4]。炎症和免疫反应在缺血性卒中的病理生理过程

中具有重要的作用^[5]。本文利用丹参酮 II A 处理原代培养大鼠脑微血管内皮细胞,检测细胞损伤和炎症情况,以及 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号通路改变情况,旨在阐明丹参酮 II A 对缺血性脑卒中保护作用的新机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠脑微血管内皮细胞培养 取 50~60 g 体重雄性 SD 大鼠(广东省医学实验动物中心),麻醉后断头处死,收集大脑皮质,充分剪碎后,用 100 目筛网过滤,收集滤网上的血管组织,采用 0.2% 的胶原酶

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.09.011

作者单位:524005 广东湛江,广东医科大学研究生院(杨 华、陈兵);524005 广东湛江,中国人民解放军南部战区海军第一医院神经外科(杨 华、何强华、张爱华、李 扬)

通讯作者:陈 兵, E-mail: toxiao daizi@163.com

37 ℃消化 30 min, 1 000 转/min 离心 10 min 后去上清,清洗3遍后用DMEM培养液重悬接种于预先明胶包被的细胞皿中培养。待细胞融合度达85%左右,用含EDTA的胰酶消化传代,并进行纯度鉴定,取第三代细胞进行实验。

1.2 细胞干预 根据细胞干预方式分为对照组、糖氧剥夺组和丹参酮ⅡA组。对照组正常培养细胞。糖氧剥夺组细胞用无糖DMEM培养液培养12 h。丹参酮ⅡA组用在无糖DMEM培养液基础上,加用含8 μg/ml丹参酮ⅡA培养12 h。

1.3 CCK8检测细胞活力 用含10% CCK8试剂的DMEM培养液100 μl 孵育细胞1~2 h,酶标仪测定450 nm吸光度值。

1.4 酶联免疫吸附试验检测白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平 细胞培养12 h后,收集细胞上清,采用酶联免疫吸附试验检测试剂盒(武汉博士德公司)测定IL-6和TNF-α含量。

1.5 实时PCR检测TLR4和核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)mRNA表达 Trizol法提取细胞总RNA,通过逆转录试剂盒(日本Takara公司)合成cDNA,PCR使用TB Green 试剂盒(日本Takara公司)进行分析,检测数据为循环阈值(cycle threshold, Ct)。

1.6 免疫印迹法检测TLR4和NF-κB蛋白表达 RIPA裂解细胞提取总蛋白,BCA蛋白定量后煮沸变性,取30 μg蛋白进行电泳并转膜,加入一抗4 ℃孵育过夜,加入相应二抗室温孵育1 h,ECL发光并通过化学发光成像系统分析,检测数据为灰度值。

1.7 统计学分析 应用SPSS 20.0软件进行处理;定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞活力的影响 与对照组相比,糖氧剥夺组细胞活力明显降低($P<0.05$);丹参酮ⅡA组细胞活力高于糖氧剥夺组($P<0.05$),但未恢复到对照组水平($P<0.05$)。见图1。

2.2 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞炎症反应相关因子的影响 与对照组相比,糖氧剥夺组IL-6和TNF-α水平明显增高($P<0.05$);丹参酮ⅡA组IL-6和TNF-α水平明显低于糖氧剥夺组($P<0.05$),但未恢复到对照组水平($P<0.05$)。见图2。

2.3 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞TLR4和NF-κB表达的影响 与对照组相比,糖氧剥夺组细胞TLR4和NF-κB mRNA和蛋白表达水平均

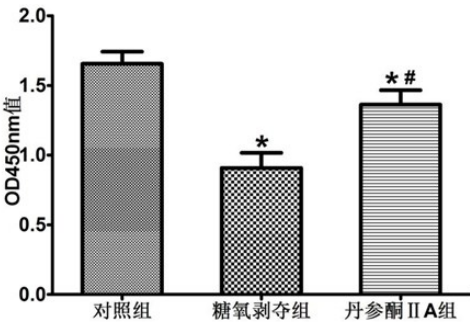


图1 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞活力的影响
与对照组相比,* $P<0.05$;与糖氧剥夺组相比,# $P<0.05$

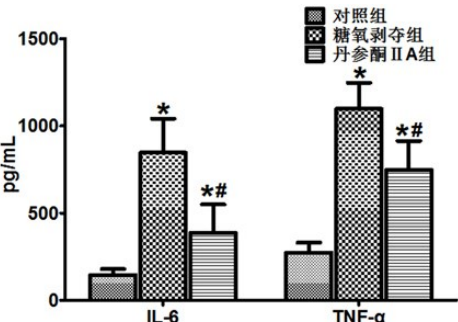


图2 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞IL-6和TNF-α表达的影响
与对照组相比,* $P<0.05$;与糖氧剥夺组相比,# $P<0.05$

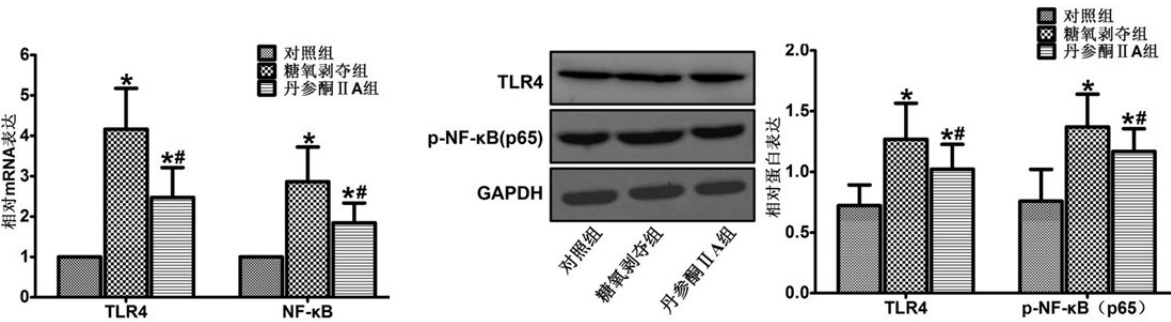


图3 丹参酮ⅡA对糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞TLR4和NF-κB mRNA和蛋白表达的影响
与对照组相比,* $P<0.05$;与糖氧剥夺组相比,# $P<0.05$

明显增加($P<0.05$);丹参酮ⅡA 组细胞 TLR4 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平均明显低于糖氧剥夺组($P<0.05$),但也未恢复到对照组水平($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

脑血管内皮细胞通过形成血脑屏障维持氧运输和营养供应,当大脑的血液供应中断或减少,氧气和葡萄糖的供应不能满足脑细胞的需要时,就会发生缺血性脑卒中和血脑屏障的破坏^[6]。糖氧剥夺能够激活各种蛋白酶,导致血脑屏障通透性改变,引发免疫炎症级联反应^[7]。缺血区内皮细胞产生大量炎症因子,促进中性粒细胞浸润和炎症反应^[8]。抗炎治疗能够延长缺血性脑卒中的治疗时间窗,为进一步康复争取宝贵时间。

丹参酮ⅡA 具有抗缺血、抗血栓等心血管保护作用^[9],还具有显著的抗炎和抗氧化作用^[10,11]。本文结果发现在糖氧剥夺条件下培养的大鼠脑微血管内皮细胞细胞活力明显降低,而且炎症因子 IL-6 和 TNF- α 释放明显增多;而丹参酮ⅡA 能够在一定程度上逆转糖氧剥夺所致的细胞损伤和炎症反应。

TLR4 作为最早被认识的模式识别受体,多种内外源性损伤因素均能被 TLR4 识别^[12]。TLR4 通过 MyD88/TRIF6 信号通路诱导 NF- κ B 活化^[13]。NF- κ B 能够转录激活 TNF- α 和 IL-6 等多种炎症因子。研究表明 TLR4/NF- κ B 炎症信号通路参与缺血性脑卒中损伤的病理生理过程^[14,15]。本文结果发现在糖氧剥夺条件下培养的大鼠脑微血管内皮细胞 TLR4/NF- κ B 表达增多;而丹参酮ⅡA 能够在一定程度上降低 TLR4/NF- κ B 表达,从而减轻炎症损伤。

总之,丹参酮ⅡA 可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 表达减轻糖氧剥夺大鼠脑微血管内皮细胞炎症损伤。

【参考文献】

[1] Del Brutto VJ, Chaturvedi S, Diener HC, *et al.* Antithrombotic therapy to prevent recurrent strokes in ischemic cerebrovascular disease: JACC scientific expert panel [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(6): 786-803.

[2] Yang H, Xi X, Zhao B, *et al.* KLF4 protects brain microvascular endothelial cells from ischemic stroke induced apoptosis by transcriptionally activating MALAT1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3): 2376-2382.

[3] Cai M, Guo Y, Wang S, *et al.* Tanshinone IIA elicits neuro-

protective effect through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-dependent antioxidant response [J]. Rejuvenation Res, 2017, 20(4): 286-297.

[4] 李德川,鲍秀琦,孙 华,等. 丹参酮ⅡA 对缺血性脑中风的神经保护作用研究进展[J]. 药学学报, 2015, 50(6): 635-639.

[5] 秦锦标,刘高飞,朱 敏. 脑卒中与外周免疫抑制[J]. 中国临床研究, 2018, 31(07): 981-983.

[6] 黄婷婷,李 妍,张月蔓,等. 双光子活体成像技术检测缺血性脑卒中超早期血脑屏障损伤[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(9): 998-1003.

[7] 王世召,张立民,张云鹤,等. 血脑屏障与免疫炎症反应[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015, 20(7): 439-442.

[8] Dong X, Gao J, Zhang CY, *et al.* Neutrophil membrane-derived nanovesicles alleviate inflammation to protect mouse brain injury from ischemic stroke [J]. ACS Nano, 2019, 13(2): 1272-1283.

[9] 段媛媛,郭振丰,李雪连. 丹参酮ⅡA 治疗心血管疾病研究机制新进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(19): 1817-1820.

[10] Wang XX, Yang JX, Pan YY, *et al.* Protective effects of tanshinone II A on endothelial progenitor cells injured by tumor necrosis factor- α [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4055-4062.

[11] Tang C, Xue HL, Bai CL, *et al.* Regulation of adhesion molecules expression in TNF- α -stimulated brain microvascular endothelial cells by tanshinone IIA: involvement of NF- κ B and ROS generation [J]. Phytother Res, 2011, 25(3): 376-380.

[12] Leitner GR, Wenzel TJ, Marshall N, *et al.* Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders [J]. Expert Opin Ther Targets, 2019, 23(10): 865-882.

[13] 谢 敏,周小炫. Toll 样受体 4 与脑出血的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015(1): 55-57.

[14] Tao X, Sun X, Yin L, *et al.* Dioscin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through the downregulation of TLR4 signaling via HMGB-1 inhibition [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 84: 103-115.

[15] Tajalli-Nezhad S, Karimian M, Beyer C, *et al.* The regulatory role of Toll-like receptors after ischemic stroke: neurosteroids as TLR modulators with the focus on TLR2/4 [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(3): 523-537.

(2019-12-08 收稿, 2020-03-12 修回)