

miR-155低表达内皮祖细胞对缺血性脑卒中小鼠血管再生的影响

王 艳, 郑杰怡, 杜东辉, 张惠婷, 马晓塘, 潘群文* (广东医科大学附属医院神经病学研究所, 广东湛江 524001)

摘 要: 目的 探讨miR-155低表达内皮祖细胞(EPCs)对缺血性脑卒中小鼠血管再生的影响。方法 以线栓法建立C57BL/6小鼠右侧大脑中动脉梗塞(MCAO)模型, 提取分离小鼠循环血液及骨髓中EPCs, 用流式细胞仪检测循环EPCs水平, qRT-PCR检测循环EPCs中miR-155的表达; 体外培养EPCs, 以慢病毒感染法沉默EPCs中的miR-155, 以MTT法检测EPCs活性; 通过尾静脉注射向脑卒中小鼠体内输注EPCs, 检测脑微血管密度(CD31+)及用多普勒血流灌注仪检测脑血流灌注。结果 与正常小鼠相比, 缺血性脑卒中小鼠循环EPCs水平显著下降($P<0.01$), 同时EPCs中miR-155表达水平显著升高($P<0.01$); 敲减EPCs中的miR-155, 可显著增加EPCs的增殖活性($P<0.01$); 输注miR-155低表达EPCs后, 脑缺血区微血管密度显著增加($P<0.01$), 并增加了缺血区脑血流灌注($P<0.01$)。结论 缺血性脑卒中病理条件下, EPCs中miR-155表达水平异常。输注miR-155低表达EPCs可以通过增加缺血区血管生成及脑血流灌注改善缺血性脑卒中小鼠缺血损伤。

关键词: 内皮祖细胞; miR-155; 血管生成; 脑缺血损伤修复

中图分类号: R 743

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0576-06

Effect of endothelial progenitor cells with low miR-155 expression on the angiogenesis of ischemic stroke rats

WANG Yan, ZHENG Jie-yi, DU Dong-hui, ZHANG Hui-ting, MA Xiao-tang, PAN Qun-wen* (Institute of Neurology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of endothelial progenitor cells (EPCs) with low miR-155 expression on the angiogenesis of ischemic stroke rats. **Methods** C57BL/6 mouse were subjected to sham-surgery (control) or permanent cerebral artery occlusion (MCAO). The circulating EPCs were extracted from the plasma of mice. The level of circulating EPCs was analyzed with flow cytometry, and the expression of miR-155 in EPCs was measured with qRT-PCR. EPCs were cultured in EGM-2 culture medium in vitro, and miR-155 in EPCs was silenced with lentivirus infection. MTT assay was used to measure the proliferation activity of EPCs. The EPCs were transferred into mice via tail intravenous injection. On day 3, cerebral microvascular density and cerebral blood flow were determined. **Results** Compared with normal mice, ischemic stroke rats had the level of circulating EPCs significantly decreased ($P<0.01$) and the miR-155 expression in EPCs significantly increased ($P<0.01$); EPCs infusion increased the cerebral microvascular density (cMVD) ($P<0.01$) and cerebral blood flow (CBF) in infarct area of the ischemic stroke mice. Moreover, silencing miR-155 enhanced the therapeutic efficacy of EPCs ($P<0.01$). **Conclusion** Under the pathological condition of ischemic stroke, miR-155 in circulating EPCs are abnormally expressed. The infusion of miR-155 low expressed EPCs can improve ischemia damage by increasing cMVD and CBF in infarct area of the ischemic stroke rats.

Key words: endothelial progenitor cells; miR-155; angiogenesis; cerebral ischemia damage repair

内皮祖细胞(EPCs)是具有可分化为成熟内皮细

胞能力的一种主要来源于骨髓(BM)的祖细胞亚群, 对新生血管的生成具有重要作用^[1-2]。EPCs有益于血管的再生及保护, 维持血管系统稳定性^[3]。近年有多组报道研究了EPCs在创伤愈合、心肌缺血、卒中等动物模型中的治疗效果^[4-5]。然而在病理条件下, 循环EPCs水平及功能受损^[6], 制约了EPCs体内的治疗效果。

miR-155参与了缺血性脑卒中(ischemic stroke,

基金项目: 国家自然科学基金(No.81701175), 广东医科大学基金项目(No. M2015012)

收稿日期: 2017-09-29; **修订日期:** 2017-11-27

作者简介: 王 艳(1986-), 女, 本科, 研究实习员。

***通信作者:** 潘群文(1985-), 男, 博士生, 助理研究员,

E-mail: pqwforeve@163.com。

IS)重要致病因素(动脉粥样硬化、高血脂等)的病理过程^[7-8], IS大鼠脑缺血24 h后脑组织miR-155表达水平升高^[9], 并反向调控人脑微血管内皮细胞多种生理功能^[10], 这些表明miR155与IS密切相关。同时研究报道miR-155在缺血性脑卒中小鼠BM-EPCs中异常表达, 其缺失促进BM-EPCs增殖、迁移及血管形成^[11]。然而目前关于循环EPCs中miR-155表达与缺血损伤相关性的研究尚未见文献报道。

本研究主要检测IS发生后, 小鼠循环EPCs水平及EPCs中miR-155表达的变化。同时通过向IS小鼠输注miR-155敲减的EPCs, 观察输注后对IS血管生成及血流灌注的影响, 探索病理条件下, 通过增强EPCs功能, 提高缺血损伤修复的方法, 从而为实现IS临床靶向治疗奠定理论基础, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

1.1.1 实验动物 成年健康雄性清洁级C57BL6小鼠12只, 体质量为20~25 g, 购于广东省医学实验动物中心。

1.1.2 试剂和仪器 MTT [3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐](美国sigma, 5 g/L); DMEM高糖培养基(美国hyclone); 血清(美国Gibco); EBM-2培养基(美国Lonza); 纤连蛋白(美国sigma); CD31一抗(BD bioscience); 淋巴细胞分离液(澳洲gemini); 青链霉素(美国hyclone); 慢病毒, miR-155检测试剂盒(上海吉玛); 血管形成检测试剂盒(德国millipore); 荧光定量PCR仪(德国roche); 酶标仪(美国BioTek); 流式细胞仪(美国thermo); 细胞培养箱(美国thermo)。

1.2 方法

1.2.1 MCAO模型的建立^[12] MCAO组小鼠6只, 剪开颈部中央皮肤, 暴露出颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉, 在颈外动脉上远心端用0-5手术线结扎, 近心端用0-2手术线结扎, 中间用0手术线打活结。在活结的上方剪一小口, 然后插入表面涂胶的0.21 mm×30 mm线栓, 遇到阻力时停, 插入线栓大概1 cm, 缝合皮肤。假手术组小鼠6只, 仅分离血管, 不插入线栓。

1.2.2 EPCs的分离培养 制作小鼠MCAO模型3 d后, 分别从MCAO小鼠及假手术组小鼠中取血1 mL, 采用淋巴细胞分离液通过密度梯度离心分离获得血液中总单核细胞。单核细胞(1×10^7 个)培养于含2

mL EGM-2内皮细胞培养基的6孔板中, 培养4 d后, 换新鲜培养基, 去除未贴壁的细胞, 获得EPCs。每2 d换液1次, 继续培养7 d。待细胞长满后, 传代用于EPCs鉴定及下一步实验。

1.2.3 循环EPCs水平及其miR-155表达的检测 收集IS小鼠及对照小鼠血液1 mL, 淋巴细胞分离液梯度离心分离单个核细胞。进一步采用偶联磁珠分选其中EPCs。具体方法为取分离所得单核细胞悬液, 采用抗鼠CD34生物素抗体(Miltenyi Biotec)于4 ℃条件下孵育单核细胞2 h后, 加入抗生物素偶联磁珠于4 ℃条件下孵育15 min, 再补加150 μ L PBS混匀, 将含悬液的EP管上磁力架, 4 ℃条件下孵育过夜。收集吸附于管壁的沉淀, 100 μ L PBS重悬后, 采用流式细胞仪计数。QRT-PCR法用于检测EPCs中miR-155表达, trizol法提取磁珠分选所得EPCs总RNA, microRNA检测试剂盒检测两种来源EPCs中miR-155表达水平, U6作为内参基因。

1.2.4 慢病毒感染法建立稳定敲减miR-155的EPCs细胞株 将对照慢病毒(LV-scramble)和转载有沉默miR-155的siRNA (LV-si155)的慢病毒感染EPCs, 24 h后换新鲜培养基, 72 h观察绿色荧光细胞数, 采用终质量浓度为1 mg/L嘌呤霉素筛选阳性细胞, 最终获得稳定敲减miR-155的EPCs(EPCs^{SimiR-155})以及LV-scramble稳定感染的EPCs(EPCs^{NC})作为对照, 用于后续小鼠体内移植实验。

1.2.5 EPCs增殖能力检测 按1.2.2中所述方法收集两组的EPCs, 分别接种于96孔板, 每孔100 μ L EBM-2细胞完全培养液(含细胞 2×10^3 个), 每种细胞6个重复, 共培养3 d, 每天MTT测定细胞存活率。MTT测定时, 每孔中加入15 μ L MTT溶液, 37 ℃孵育20 min后酶标仪490 nm测定吸光值。实验重复3次。

1.2.6 免疫组化检测脑微血管密度 MCAO术构建IS小鼠模型, 通过尾静脉向小鼠体内输注100 μ L含 2×10^6 个EPCs^{NC}或EPCs^{SimiR-155}的PBS悬液, 只输注PBS的小鼠为对照组。输注7 d后, 处死小鼠, 取脑采用4%多聚甲醛固定过夜后, 继续采用4%多聚甲醛加30%蔗糖固定3 d。冰冻切片将固定好的脑组织切成20 μ m切片标本。脑切片标本CD31一抗4 ℃孵育过夜, Cy3荧光二抗常温避光孵育30 min, 免疫荧光检测血管形成情况。

1.2.7 脑血流灌注检测 IS小鼠输注EPCs或PBS后3 d, 采用多普勒血流检测仪检测小鼠脑血流情况。小鼠采用10%水合氯醛麻醉后, 立体定位仪固定小

鼠。剪开小鼠头顶皮肤，暴露整个颅骨。多普勒血流监测系统扫描颅骨(2.0 cm×1.4 cm)1 min。采用Pimsoft软件测定缺血侧平均血流灌注量。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism5软件进行统计学处理，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用t检验、单因素方差分析及q检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血浆中EPCs水平及miR-155表达的检测

MCAO术后3 d，与假手术组比较，IS组小鼠循环血浆中CD34+ EPCs水平显著降低($P<0.01$ ，图1，表1)，同时QRT-PCR检测发现IS组小鼠EPCs中miR-155表达水平较假手术组显著升高($P<0.01$ ，表1)。说明EPCs水平与缺血性脑卒中负相关，而EPCs中miR-155表达水平与IS呈正相关。

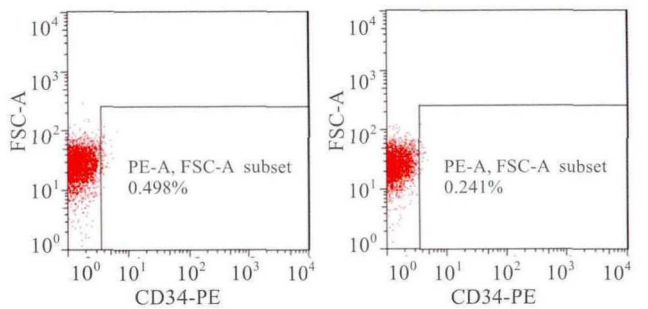


图1 流式细胞仪检测小鼠循环EPCs水平

表1 小鼠循环EPCs水平及EPCs中miR-155表达的检测 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	EPCs水平/(个/ μ L)	MiR-155表达
假手术组	6	0.51 ± 0.042	1.07 ± 0.11
IS组	6	0.24 ± 0.021^a	3.25 ± 0.47^a

与假手术组比较：^a $P<0.01$ 。

2.2 慢病毒干扰对EPCs中miR-155表达及EPCs增殖活性的影响

分离获得正常小鼠循环EPCs，采用LV-SimiR-

155干扰EPCs中miR-155表达并筛选稳定克隆后，QRT-PCR检测发现EPCs中miR-155表达水平显著降低($P<0.01$ ，表2)，表明成功获得miR-155低表达EPCs。MTT检测EPCs增殖能力结果显示，miR-155低表达组EPCs增殖能力显著高于对照组EPCs($P<0.01$ ，表2)。

表2 慢病毒干扰对EPCs中miR-155表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-155表达水平	增殖能力(OD值)
EPCs ^{NC}	6	1.057 ± 0.035	0.62 ± 0.053
EPCs ^{SimiR-155}	6	0.317 ± 0.022^a	1.01 ± 0.076^a

与EPCs^{NC}组比较：^a $P<0.01$ 。

2.3 输注EPCs对IS小鼠缺血区脑微血管形成的作用

免疫荧光结果显示，向IS小鼠体内输注EPCs显著增加了IS小鼠缺血区脑微血管密度($P<0.01$)，同时EPCs^{SimiR-155}组较EPCs^{NC}组具有更好地促进脑微血管密度形成的效果($P<0.01$)。详见图2、表3。

表3 输注EPCs对缺血区脑微血管形成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脑微血管数(条/ mm^2)
PBS	6	74.5 ± 13.8
EPCs ^{NC}	6	225.8 ± 28.4
EPCs ^{SimiR-155}	6	302.2 ± 34.1

各组两两比较： $P<0.01$ 。

2.4 输注EPCs对IS小鼠缺血区脑血流灌注的影响

激光散斑多普勒检测发现，向IS小鼠体内输注EPCs显著增加了IS小鼠缺血区脑血流灌注($P<0.01$)，同时EPCs^{SimiR-155}组较EPCs^{NC}组具有更好地增加缺血区脑血流灌注的效果($P<0.01$)。详见图3、表4。

3 讨论

本研究结果显示，MCAO模型小鼠脑缺血3 d后，循环血浆中EPCs水平显著下降，并伴随miR-155在EPCs中高表达。提取分离正常小鼠循环EPCs，体

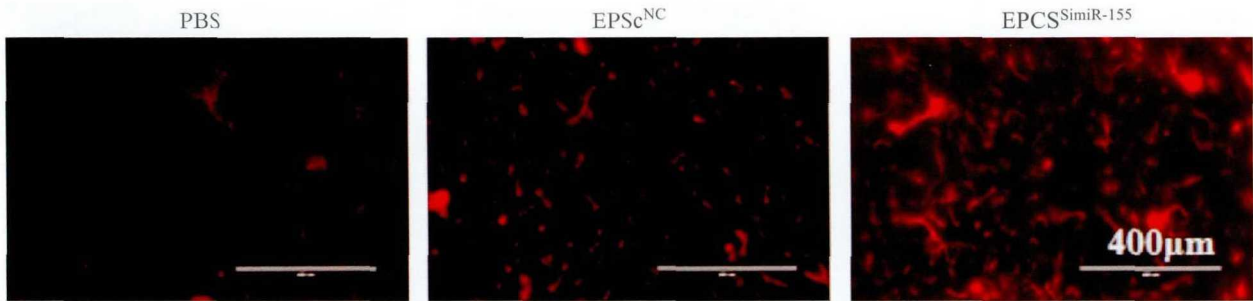


图2 尾静脉输注EPCs对IS小鼠缺血区脑微血管形成的影响

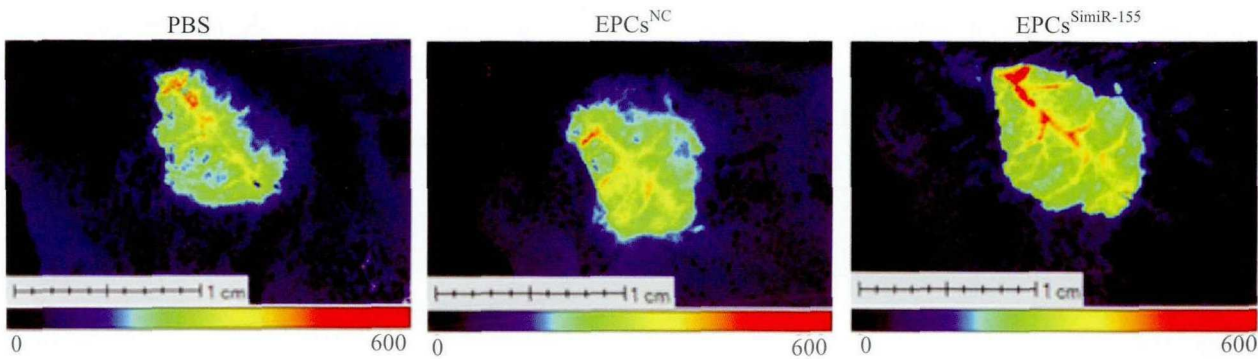


图3 尾静脉输注EPCs对IS小鼠缺血区脑灌注的影响

表4 输注EPCs对缺血区脑血流灌注的影响力 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	缺血区血流灌注(PU)
PBS	6	106.21±15.24
EPCs ^{NC}	6	177.34±20.74
EPCs ^{SimiR-155}	6	255.34±21.72

各组两两比较: $P<0.01$ 。

外培养, 敲减EPCs中miR-155表达能显著增强EPCs的增殖能力。将EPCs及miR-155敲减的EPCs输注到IS小鼠体内, 可以显著增加IS小鼠缺血区脑微血管形成及脑血流灌注, 同时发现输注miR-155敲减EPCs效果更好。我们的结果提示循环EPCs数量下降及EPCs中miR-155表达升高与缺血性脑卒中密切相关, 提高IS小鼠循环EPCs水平及功能, 能够促进缺血性脑卒中缺血损失修复。

IS发生后, 缺血脑组织供能下降、组织细胞内离子稳态失衡、氧自由基及细胞因子介导的细胞毒性、炎症以及血脑屏障功能破坏等是IS主要的病理进程^[13]。现阶段对IS的治疗主要为血管再通术, 包括动静脉溶栓及介入治疗^[13-15]。然而由于IS发病机理及病理进程复杂, 对于卒中发生后的治疗措施非常有限。越来越多的研究证实EPCs能够改善IS发生后的缺血损伤^[15-16]。缺血性脑卒中发生后, 脑组织因缺血缺氧受损。EPCs能够从骨髓中动员到外周循环并迁移到损伤血管及缺血脑组织处, 然后通过分化成熟血管内皮细胞或释放不同的种类的细胞生长因子参与损伤组织处内皮重构及血管再生^[17-18]。然而病理条件下循环EPCs水平减少及功能受损, 研究表明在糖尿病小鼠血浆中EPCs水平显著性减少^[19]。在本研究中我们发现小鼠缺血性脑卒中手术3 d后循环EPCs数量显著降低, 与上述文献报道相符。因此, 我们认为, 增加循环EPCs水平是血管损伤性疾病治疗的一个有效途径。同时, 研究证实在糖尿病伴外周动脉病患者体内, EPCs克隆形成及粘附能力受

损^[20]。另有研究报道在人肾素与血管紧张素转基因小鼠中EPCs迁移及血管形成能力显著性下降^[21]。因此为了增强EPCs在血管损伤疾病中的治疗效果, 研究者将趋化因子受体CXCR4、血管紧张素转化酶2(ACE2)、血管内皮生长因子(VEGF)等基因转染入EPCs中增强EPCs的功能^[6, 22-23], 从而提高EPCs的治疗效果。

miR-155是一种多功能小RNA分子, 能够通过调节靶基因表达参与多种细胞功能调节。有研究发现miR-155参与调节血管内皮细胞增殖、迁移及凋亡等多种生物学功能^[10], 低表达miR-155的血管内皮细胞表现出更好的增殖、迁移及血管生成能力。同时研究发现, 在IS患者体内miR-155异常表达^[24]。这些研究表明miR-155参与调节内皮细胞功能, 并与IS密切相关。在本研究中, 我们发现缺血性脑卒中小鼠循环EPCs中miR-155表达显著升高, 体外细胞功能研究发现, 敲减EPCs中miR-155水平, 可以显著提高EPCs的增殖活性。我们的研究表明, EPCs中miR-155水平与缺血性脑卒中正相关, 其低表达能够有效提高EPCs的功能。深入的研究中, 我们将EPCs及低表达miR-155的EPCs输注到IS小鼠体内, 进一步证实输注EPCs能改善IS小鼠缺血区脑微血管密度, 而miR-155能够提高EPCs体内对IS的治疗效果。新生血管生成在组织损伤修复进程中发挥重要作用。EPCs具有分化成血管内皮细胞的潜能, 代表了一种重要的机体内源性的组织损伤修复机制。EPCs能够结合并分化成成熟血管内皮细胞, 或分泌促血管生长因子促进血管内皮细胞增殖^[25]。本研究中, 我们发现低表达miR-155的EPCs能够有效促进EPCs对IS小鼠缺血病灶的血管生成作用。更为重要的是, 在IS发生后, 新生血管能够为脑缺血区恢复血流供应^[26]。而恢复脑梗死灶, 尤其是梗死半暗带区血流供给可以促进神经功能的恢复。因此新生血管

生成引导的缺血区血流供给是IS治疗的一个重要途径^[27]。本研究证实了敲减miR-155能够提高EPCs对IS小鼠缺血区脑血流供给的改善作用,提示低表达miR-155的EPCs可能通过促进缺血区血管生成而进一步改善缺血灶脑血流灌注,从而对IS发挥治疗效果。然而对于低表达miR-155的EPCs对缺血区血管生成促进作用的潜在机制还有待进一步的研究。

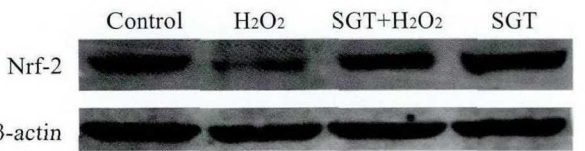
参考文献:

- [1] Balaji S, King A, Crombleholme T M, et al. The role of endothelial progenitor cells in postnatal vasculogenesis: implications for therapeutic neovascularization and wound healing[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013, 2(6): 283-295.
- [2] Real C, Caiado F, Dias S. Endothelial progenitors in vascular repair and angiogenesis: how many are needed and what to do[J]? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2008, 8(3): 185-193.
- [3] Rouhl R P, van Oostenbrugge R J, Damoiseaux J, et al. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts[J]. *Stroke*, 2008, 39(7): 2158-2165.
- [4] Atesok K, Li R, Stewart D J, et al. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(8): 1007-1014.
- [5] Rozen N, Bick T, Bajayo A, et al. Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects[J]. *Bone*, 2009, 45(5): 918-924.
- [6] Chen J, Chen J, Chen S, et al. Transfusion of CXCR4-primed endothelial progenitor cells reduces cerebral ischemic damage and promotes repair in db/db diabetic mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50105.
- [7] Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4190-4202.
- [8] Magenta A, Greco S, Gaetano C, et al. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 17319-17346.
- [9] Huang H, He J, Teng X, et al. Combined intrathymic and intravenous injection of mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft associated with decrease in miR-155 expression[J]. *J Surg Res*, 2013, 185(2): 896-903.
- [10] Liu Y, Pan Q, Zhao Y, et al. MicroRNA-155 regulates ROS production, NO generation, apoptosis and multiple functions of human brain microvessel endothelial cells under physiological and pathological conditions[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(12): 2870-2881.
- [11] 潘群文, 刘雅静, 何彩霞, 等. MiR155对缺血性脑卒中小鼠内皮祖细胞功能的调节作用[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(4): 385-388.
- [12] 马晓璐, 潘群文, 刘雅静, 等. miR-126对缺血性脑卒中小鼠内皮祖细胞血管形成能力的影响[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(4): 376-380.
- [13] Levine S R, Brott T, Broderick J. Effect of intravenous recombinant tissue plasminogen activator on ischemic stroke lesion size measured by computed tomography[J]. *Stroke*, 2000, 31(12): 2912-2919.
- [14] Hefzy H, Mitsias P. Efficacy of intra-arterial fibrinolysis for acute ischemic stroke: incongruent recanalization and good outcome rates[J]. *Stroke*, 2010, 41(11): e593.
- [15] Castano C, Dorado L, Guerrero C, et al. Mechanical thrombectomy with the Solitaire AB device in large artery occlusions of the anterior circulation: a pilot study[J]. *Stroke*, 2010, 41(8): 1836-1840.
- [16] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(3): 330-338.
- [17] Shyu W C, Lin S Z, Chiang M F, et al. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(13): 3444-3453.
- [18] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2004, 95(4): 343-353.
- [19] Fan Y, Shen F, Frenzel T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(4): 488-497.
- [20] Chen J, Chen S, Chen Y, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cellular membrane microparticles in db/db diabetic mouse: possible implications in cerebral ischemic damage[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(1): E62-71.
- [21] Dincer U D. Fetal exposure to a diabetic intrauterine environment resulted in a failure of cord blood endothelial progenitor cell adaptation against chronic hypoxia[J]. *Stem Cells Cloning*, 2015, 8: 1-14.
- [22] Chen J, Xiao X, Chen S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy[J]. *Hypertension*, 2013, 61(3): 681-689.
- [23] Yu J X, Huang X F, Lv W M, et al. (下转第584页)

表5 SGT对PC12细胞的Nrf-2核转运的相对灰度值的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	相对灰度值
对照组	1.084±0.056
H ₂ O ₂ 损伤模型组	0.667±0.041 ^a
SGT+H ₂ O ₂ 高剂量组	1.184±0.067 ^{bc}
SGT高剂量组	2.251±0.116 ^{acd}

与对照组比较: ^aP<0.01, ^bP<0.05; 与H₂O₂损伤模型组比较: ^cP<0.01; 与SGT+H₂O₂高剂量组比较: ^dP<0.01。



Control为对照组; H₂O₂为H₂O₂损伤模型组; SGT+H₂O₂为SGT+H₂O₂高剂量组; SGT为SGT高剂量组。

图1 SGT对PC12细胞Nrf-2核转运的影响

以反映清除氧自由基的能力^[10]。SGT作为一剂古方,已有明确的药理活性,本实验利用其抗氧化性,提高了细胞内酶的活性,能有效地清除自由基。本文采用H₂O₂诱导PC12细胞损伤,建立氧化应激损伤细胞模型,通过CCK8法、LDH、MDA和SOD等抗氧化酶的检测以及蛋白免疫印迹法,发现SGT能够提高经H₂O₂诱导损伤后PC12细胞的活性,增强上清液中LDH、MDA含量及胞内MDA的量,降低细胞上清液及细胞内的SOD活性。此结果表明SGT可明显增强各酶类的活力,从而起到抗氧化的作用。

在过去的研究中,通过启动Nrf-2通路治疗阿尔茨海默症和帕金森症等疾病已取得了显著成果^[11]。Nrf-2基因被认为是抗氧化防御系统的主控环节,可减少自由基的产生从而发挥抗氧化作用。正常状态下,Nrf-2活性主要由细胞质接头蛋白Keap1负性调节,在氧化应激状态下,Keap1构型发生改变,Nrf-2

与Keap1分离,Nrf-2向核中转运和活化,从而启动下游多种蛋白的表达和二相解毒酶的合成,如SOD、MDA等,减轻氧化应激引起的损伤。H₂O₂在诱导PC12细胞氧化应激模型中,SGT各剂量组核内Nrf2蛋白表达明显升高,表明SGT能有效促进Nrf-2的核转位,进一步说明SGT可能通过调节Nrf-2蛋白的表达,产生抗氧化应激损伤的作用。

参考文献:

[1] 薛小燕,郭小华,李敏,等.神经退行性疾病发病机制研究进展[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3149-3152.

[2] 黄进,杨国宇,李宏基,等.抗氧化剂作用机制研究进展[J].自然杂志,2004,26(2):74-78.

[3] 郑继生,钱景莉.芍药甘草汤及其临床运用[J].河南中医,2012,32(8):966-968.

[4] 汪萌,闫永红,邹慧琴,等.芍药甘草汤功能与药效组分对应性研究[J].国际药学研究杂志,2015,42(1):101-106.

[5] 关炜,王洋,李韶妮,等.芍药甘草汤对支气管哮喘作用机理的研究[J].中国中医急症,2011,20(10):1625-1626.

[6] 张保国,刘庆芳.芍药甘草汤方剂学实验研究[J].中成药,2012,34(7):1354-1358.

[7] 蒋娜,许岩.芍药甘草汤临床应用综述[J].中国中医药现代远程教育,2012,10(3):156-157.

[8] 黎巍威,王学美.PC12细胞作为氧化应激细胞模型的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2011,31(11):1575-1580.

[9] 张颖,柯尊记,杨坚,等.芍药甘草汤及其活性成分的脑保护作用机制研究概述[J].现代生物医学进展,2014,14(34):6773-6777.

[10] Wang S J, Zhao S J, Wang Y S, et al. Effects of estrogen intervention on the biomechanical characteristics of serum SOD, MDA, and middle cerebral artery in aged female rats [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2015, 42(3): 295-299.

[11] 赵春阳,王晓良,彭英.Nrf2在神经退行性疾病中的作用及激活剂的研究进展[J].药学学报,2015,50(4):375-384.

(上接第580页)

Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization[J]. J Vasc Surg, 2009, 50(3): 608-616.

[24] Hunsberger J G, Fessler E B, Wang Z, et al. Post-insult valproic acid-regulated microRNAs: potential targets for cerebral ischemia[J]. Am J Transl Res, 2012, 4(3): 316-332.

[25] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic

neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3422-3427.

[26] Seto S W, Chang D, Jenkins A, et al. Angiogenesis in ischemic stroke and angiogenic effects of Chinese herbal medicine[J]. J Clin Med, 2016, 5(6): 56.

[27] Arenillas J F, Sobrino T, Castillo J, et al. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2007, 9(3): 205-212.