

小续命汤含药血清对氧糖剥夺模型大鼠星形胶质细胞的保护作用研究[△]

向 军^{1,2*}, 徐莉莉^{1,2}, 杨 峰¹, 朱 雯¹, 蔡定芳^{1,2#} (1. 复旦大学附属中山医院中西医结合科, 上海 200032; 2. 复旦大学中西医结合研究院内科研究所, 上海 200032)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0034-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.07

摘要 目的:探讨小续命汤含药血清对氧糖剥夺(OGD)模型大鼠星形胶质细胞的保护作用及其机制。方法:将体外培养的大鼠星形胶质细胞随机分为对照组、模型组和小续命汤含药血清低、中、高浓度组,其中对照组细胞不作任何处理,模型组和小续命汤含药血清低、中、高浓度组细胞经OGD 2.5 h后分别在0(即模型组不加药)、2.5%、5%、10%的小续命汤含药血清中复氧0、3、6、12 h,采用比色法检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)含量。取OGD后复氧12 h时的对照组、模型组和小续命汤含药血清高浓度组大鼠细胞,采用荧光探针法检测其活性氧(ROS)水平,采用免疫荧光双染法检测其锰超氧化物歧化酶(MnSOD)水平。结果:对照组细胞中LDH含量始终保持在较低水平;模型组细胞分别在OGD后复氧0~12 h时,其LDH含量从(110.99±17.06) U/L逐渐上升至(436.64±55.29) U/L,均显著高于对照组($P<0.05$);与OGD后复氧相同时间点的模型组比较,小续命汤含药血清低、中、高浓度组细胞中LDH含量均不同程度地降低,并表现出时间和剂量依赖趋势,其中小续命汤含药血清各浓度组细胞在OGD后复氧6、12 h时其LDH含量均较模型组显著降低($P<0.05$)。OGD后复氧12 h时,模型组细胞中ROS水平显著高于对照组,MnSOD水平显著低于对照组($P<0.05$);小续命汤含药血清高浓度组细胞中ROS水平显著低于模型组,MnSOD水平显著高于模型组($P<0.05$)。结论:小续命汤含药血清可能通过上调MnSOD的水平,清除过量的ROS,从而减轻OGD导致的大鼠星形胶质细胞损伤,发挥其保护作用。

关键词 小续命汤;含药血清;星形胶质细胞;氧糖剥夺;保护作用;机制

Study on Protective Effects of Drug-contained Serum of Xiaoxuming Decoction on Astrocyte of Oxygen and Glucose Deprivation Model Rats

XIANG Jun^{1, 2}, XU Lili^{1, 2}, YANG Feng¹, ZHU Wen¹, CAI Dingfang^{1, 2} (1. Dept. of Integrative Medicine, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Internal Medicine, Institutes of Integrative Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the protective effects of drug-contained serum of Xiaoxuming decoction (XXM) on astrocyte of oxygen and glucose deprivation model rats, and to explore its mechanisms. **METHODS:** The astrocytes of rats were randomly divided into control group, model group and XXM low-dose, middle-dose, high-dose groups. The cells in the control group were not treated; after 2.5 h of OGD, model group and XXM low-dose, middle-dose, high-dose groups were reoxygenated for 0, 3, 6, 12 h in 0 (i.e. the model group was not added with drugs), 2.5%, 5%, 10% of XXM, respectively. The content of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by colorimetry. The reactive oxygen species (ROS) level was detected by fluorescence probe method, and the expression of Manganese superoxide dismutase (MnSOD) was determined by immunofluorescence double staining method in control group, model group and XXM high-dose group after 12 h of reoxygenation following OGD. **RESULTS:** The content of LDH in the control group was always kept at a low level; LDH content in the model group gradually increased from (110.99±17.06) U/L to (436.64±55.29) U/L after 0-12 h of reoxygenation following OGD, which was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). Compared with model group at the same time point after reoxygenation following OGD, the contents of LDH in the cells of XXM low-dose, medium-dose and high-dose groups were decreased to different extents, and showed a time-and dose-dependent trend. The contents of LDH in XXM groups at 6 and 12 h after reoxygenation following OGD were significantly lower than that of the model group ($P<0.05$). At 12 h after reoxygenation following OGD, the levels of ROS in

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673823, No.81973619);上海市科学技术委员会科研计划项目(No.19ZR1409900)

* 主治医师,博士。研究方向:中医药防治缺血性卒中。电话:021-64041990-3444。E-mail:xiang.jun@zs-hospital.sh.cn

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中西医结合神经病学。电话:021-64041990-3444。E-mail:cai.dingfang@zs-hospital.sh.cn

model group were significantly higher than control group, while the level of MnSOD was significantly lower than control group ($P<0.05$). The level of ROS in XXM high-dose group was significantly lower than model group, while the level of MnSOD was significantly higher than model group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** XXM can protect astrocyte by up-regulating levels of MnSOD, scavenging excessive oxygen free radicals,

to relieve the OGD induced astrocytic injury, with protective effect.

KEYWORDS Xiaoxuming decoction; Drug-contained serum; Astrocyte; Oxygen and glucose deprivation; Protective effect; Mechanism

祛风通络法及其代表方小续命汤在治疗缺血性中风的临床应用中具有悠久的历史,其疗效受到历代医家的广泛认可^[1-3]。在此基础上,大量基于现代药理学的研究开始探讨小续命汤对脑缺血后神经元的保护作用 and 机制^[4-9],为其临床应用提供了更多的证据支持。

近年来,有学者提出,脑保护研究思路应当突破神经元的局限,更多地关注星形胶质细胞、脑血管内皮细胞、周细胞等神经元支持成分^[10]。星形胶质细胞是大脑内数量最多的细胞,对神经元起到支持、保护和营养的作用,并参与神经系统发育、突触传递、维持神经系统内环境稳定以及能量代谢等多种生理功能,在脑缺血损伤的发生、发展以及修复过程中扮演着重要角色^[11-12]。为了在相对理想的环境下观察小续命汤对缺血缺氧星形胶质细胞的影响,笔者拟借助血清药理学方法^[13],将体外培养的大鼠星形胶质细胞通过氧糖剥夺(Oxygen-glucose deprivation, OGD)法模拟脑缺血损伤模型,采用小续命汤含药血清干预模型大鼠星形胶质细胞,观察其对模型大鼠星形胶质细胞中乳酸脱氢酶(LDH)含量及活性氧(ROS)和锰超氧化物歧化酶(MnSOD)表达的影响,研究其对大鼠星形胶质细胞的保护作用及可能的分子机制。

1 材料

1.1 仪器

EBA280型台式离心机(德国Hettich公司);HH-6型恒温水浴锅(上海析达仪器有限公司);Aquelix 5型纯水机(美国Milipore公司);EVL-3S型超净工作台(珠海市再鑫仪器有限公司);BB15型CO₂培养箱(德国Heraeus公司);BX21型荧光倒置相差显微镜(日本Olympus公司);ELx800型全自动酶标仪(美国BioTek公司)。

1.2 药品与试剂

参照《千金要方》,小续命汤由麻黄3g、桂枝3g、芍药3g、川芎3g、黄芩3g、杏仁3g、附子3g、甘草3g、人参3g、防己3g、防风4.5g、生姜15g组方而成^[14]。上述中药材均通过复旦大学附属中山医院药剂科采购,并由上海虹桥药业有限公司中药饮片厂鉴定,均符合2015年版《中国药典》(一部)^[15]质量标准。

杜氏磷酸缓冲液(D-PBS,批号:C14190500BT)、DMEM/F12完全培养基(批号:C11330500BT)、0.25%胰蛋白酶(批号:25200-072)、胎牛血清(批号:10099-141)均购自美国Gibco公司;DNA酶(批号:D8071-25)购自上海所爱生物科技有限公司;聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100,批号:AR-0341)、聚山梨酯20(Tween-20,批号:T8220-100)均购自国鼎环科(北京)技术有限公司;

LDH检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A020-1-2);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)兔多克隆抗体(丹麦DAKO公司,批号:3064);MnSOD鼠多克隆抗体(美国Abcam公司,批号:74231)、荧光染料Cy3标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号:A0516)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG二抗(批号:A0568)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液(批号:C1005)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)ROS检测试剂盒(批号:S0033)均购自北京碧云天生物科技公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为去离子水。

1.3 动物

SPF级新生SD大鼠10只(24h内新生,雌雄兼用)、SPF级SD大鼠25只(7~8周龄,雄性,体质量200~220g)均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物生产许可证号:SCXY(沪)2017-0005]。所有动物均饲养于复旦大学附属中山医院实验研究中心动物房[动物使用许可证号:SYXY(沪)2016-0006],室温20~25℃,相对湿度50%~60%,通风良好。大鼠自由进食饮水,适应性饲养1周后进行实验。动物实验严格按照《复旦大学附属中山医院实验动物管理规范》进行操作。

2 方法

2.1 小续命汤提取物制备

参照《千金要方》小续命汤组方^[15],将麻黄、桂枝、芍药、川芎、黄芩、杏仁、附子、甘草、人参、防己、防风、生姜以1:1:1:1:1:1:1:1:1:1.5:5的质量比混合,加水浸泡1h后,以10倍体积水(mL/g)煎煮1h,滤取上清液后,再加入10倍体积水(mL/g)煎煮1h,共重复煎煮3次。合并3次所得药汁并浓缩至1g/mL,冷却后加入无水乙醇使其达到总体积的75%,再以磁力搅拌过夜,然后以3000r/min离心20min后取上清液。收集药渣,用1倍体积75%乙醇(mL/g)浸泡1h,过滤后收集上清液,与离心所得的上清液合并,于80℃恒温蒸发1h除去乙醇,得到质量浓度为1g/mL(以生药量计算)的小续命汤提取物,经高压灭菌后于-20℃保存备用。

2.2 含药血清、星形胶质细胞的制备及给药处理

2.2.1 小续命汤含药血清制备 将25只雄性SD大鼠适应性饲养1周后,参考前期小续命汤对脑缺血保护作用的量效研究结果^[4],采用2.5mL小续命汤提取液(相当于生药量2.5g)对大鼠灌胃给药,早晚各1次,连续5d。末次给药后1h时,每只大鼠腹腔注射水合氯醛(350mg/kg)麻醉,经腹主动脉取血5mL。血样在37℃下静置1h后,以3000r/min离心10min,取上层血清置于离心管中,于56℃水浴灭活30min,再经0.22μm滤膜过

滤除菌,于-20℃保存,备用。

2.2.2 分离培养星形胶质细胞 取新生SD大鼠10只,于无菌条件下断头取脑,将脑组织放入4℃预冷的D-PBS培养皿内并置于冰盒上,漂洗3次后转入2 mL 4℃预冷的D-PBS液中。去除大鼠的脑膜及大血管,分离其大脑皮质并剪成1 mm³大小的碎块,加入0.25%胰蛋白酶,于37℃条件下消化30 min,随后加入DMEM/F12完全培养基内终止消化;在4℃、1 000 r/min条件下离心10 min,弃上清液,加入适量DNA酶消化至肉眼不见胶丝状物,以乙二胺四乙酸(EDTA)终止消化;以4℃、1 000 r/min再次离心10 min,弃上清液,收集沉淀,加入适量DMEM/F12完全培养基,吹打成单细胞悬液,调整细胞密度至1.5×10⁶个/mL,接种于75 cm²的培养瓶中。采用差速贴壁法1 h去除成纤维细胞后,将细胞悬液转移至新的75 cm²培养瓶继续培养,每3天换液1次。培养7 d后,将培养瓶放入水平摇床(260 r/min, 37℃)2 h,换液弃除小胶质细胞,放入培养箱中平衡1 h,重新置于水平摇床(260 r/min, 37℃)2 h,换液弃除少突胶质细胞;剩下的即为星形胶质细胞,再用DMEM/F12完全培养基清洗2次,加入0.25%胰蛋白酶与0.02% EDTA混合液(1:1)消化、传代。每3天换液1次,取用稳定生长的第3代细胞用于试验。

2.2.3 分组与给药处理 将“2.2.2”项下培养的大鼠星形胶质细胞接种至6孔板,随机分为对照组、模型组和小续命汤低、中、高浓度组。模型组和小续命汤各含药血清组采用OGD法(参考文献[16])模拟体内脑缺血损伤以建立体外细胞损伤模型:将大鼠星形胶质细胞转移至含5% CO₂、95% N₂的特制缺氧箱内,并给予低糖(0.5 mmol/L)DMEM/F12培养基,于37℃培养2.5 h,随后将其移出缺氧培养箱,转入含有0(即模型组不加药)和低、中、高浓度的小续命汤含药血清(2.5%、5%、10%,以含药血清在培养基中的体积分数计算)的DMEM/F12完全培养基内继续培养(即复氧)一定时间。对照组细胞不作任何处理。小续命汤含药血清的给药浓度设置参考文献[17]。

2.3 大鼠星形胶质细胞中LDH含量的检测

采用比色法进行检测。分别于OGD 2.5 h后复氧0、3、6、12 h时取对照组、模型组和小续命汤低、中、高浓度组的大鼠星形胶质细胞上清液置于96孔板,根据LDH检测试剂盒说明书将空白孔、标准孔、测定孔、对照孔分别加入相应工作液,在37℃下避光孵育,再采用全自动酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD)值。根据公式计算LDH含量:LDH含量(U/L)=[(测定孔OD值-对照孔OD值)/(标准孔OD值-空白孔OD值)]×标准品浓度(0.2 mmol/L)×1 000。细胞上清液中LDH含量越高,则表明OGD导致的细胞损伤程度越高。试验重复8次。

2.4 大鼠星形胶质细胞中ROS水平的检测

采用荧光探针法进行检测。于OGD 2.5 h后复氧

12 h时收集对照组、模型组和小续命汤高浓度组的大鼠星形胶质细胞接种至6孔板,悬浮于DCFH-DA稀释液(1:1 000)中,在37℃的细胞培养箱内孵育20 min;以PBS洗涤3次,去除未进入细胞内的DCFH-DA后,于荧光显微镜下观察并拍照。阴性对照采用PBS替代DCFH-DA,其余同法操作。采用Image Pro Plus 6.0软件计算细胞的平均光密度用来表示细胞中ROS水平,该值越高,则ROS水平越高。试验重复3次。

2.5 大鼠星形胶质细胞中MnSOD水平的检测

采用免疫荧光双染法检测。于OGD 2.5 h后复氧12 h时收集对照组、模型组和小续命汤高浓度组的大鼠星形胶质细胞接种至6孔板,PBS洗涤3次,经40 g/L的多聚甲醛固定10 min;清洗后,用3%正常羊血清封闭1 h;加入GFAP一抗(1:100)和MnSOD一抗(1:100),于4℃下过夜孵育;PBS洗涤后,加入Cy3标记的二抗(1:500)和FITC标记的二抗(1:500),室温避光孵育2 h;PBS洗涤后,加入DAPI染液(1:100),室温避光孵育30 min;PBS充分洗涤后于荧光显微镜下观察并拍照。阴性对照采用PBS替代一抗,其余同法操作。采用Image Pro Plus 6.0软件计算细胞的平均光密度用来表示细胞中MnSOD水平,该值越高,则MnSOD水平越高。试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS13.0统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小续命汤含药血清对OGD后复氧不同时间的大鼠星形胶质细胞中LDH含量的影响

OGD后复氧不同时间的对照组细胞中LDH含量始终保持在较低水平;模型组细胞分别在OGD后复氧0~12 h时,其LDH含量从(110.99 ± 17.06) U/L逐渐上升至(436.64 ± 55.29) U/L,均显著高于对照组($P < 0.05$),表明细胞损伤程度逐渐加重;与OGD后复氧相同时间点的模型组比较,小续命汤含药血清低、中、高浓度组细胞中LDH含量均不同程度地降低,并表现出时间和剂量依赖趋势,其中小续命汤含药血清各浓度组细胞在OGD后复氧6、12 h时其LDH含量均较模型组显著降低($P < 0.05$),详见表1。根据上述结果,本研究选取小续命汤含药血清的高浓度组和复氧12 h进行后续研究。

3.2 小续命汤含药血清对OGD损伤模型大鼠星形胶质细胞中ROS水平的影响

对照组大鼠细胞中平均光密度为10.79 ± 5.37;模型组细胞中平均光密度为44.94 ± 10.29,显著高于对照组($P < 0.05$);小续命汤含药血清高浓度组细胞中平均光密度为19.23 ± 5.27,显著低于模型组($P < 0.05$),详见图1。

表1 OGD后复氧不同时间的各组细胞中LDH含量比较($\bar{x} \pm s, n=8, U/L$)

Tab 1 Comparison of LDH content in astrocyte in each group after different time of reoxygenation following OGD($\bar{x} \pm s, n=8, U/L$)

组别	复氧0h	复氧3h	复氧6h	复氧12h
对照组	29.42 ± 3.78	32.01 ± 7.14	37.87 ± 7.74	36.43 ± 10.5
模型组	110.99 ± 17.06*	161.51 ± 30.25*	344.65 ± 34.94*	436.64 ± 55.29*
小续命汤含药血清低浓度组	90.22 ± 15.23	122.61 ± 29.22	190.67 ± 21.79*	253.55 ± 32.23*
小续命汤含药血清中浓度组	78.90 ± 19.43	89.06 ± 17.53	141.1 ± 18.89*	218.56 ± 30.32*
小续命汤含药血清高浓度组	65.96 ± 17.90	86.05 ± 18.42	121.23 ± 26.47*	177.26 ± 27.30*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

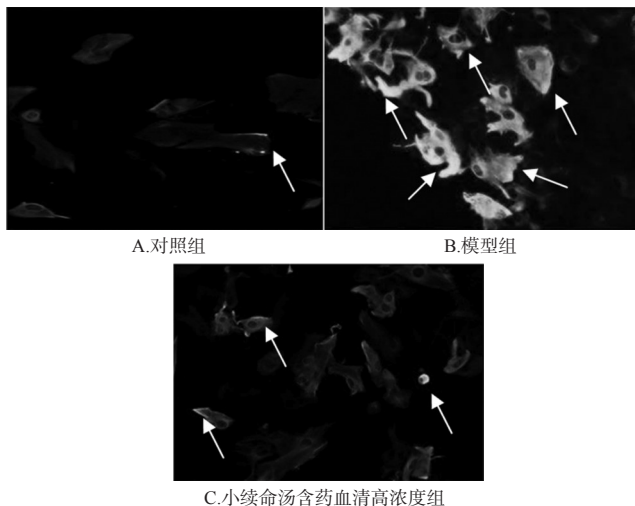
Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

3.3 小续命汤含药血清对OGD损伤模型大鼠星形胶质细胞中MnSOD水平的影响

对照组细胞中平均光密度为 46.28 ± 11.57 ; 模型组中平均光密度为 4.63 ± 1.72 , 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 小续命汤含药血清高浓度组细胞中平均光密度为 32.79 ± 15.7 , 显著高于模型组 ($P < 0.05$), 详见图2。

4 讨论

小续命汤治疗缺血性卒中的历史可追溯至我国南北朝时期陈延之的《小品方》, 曰“甘草、麻黄、防己、人



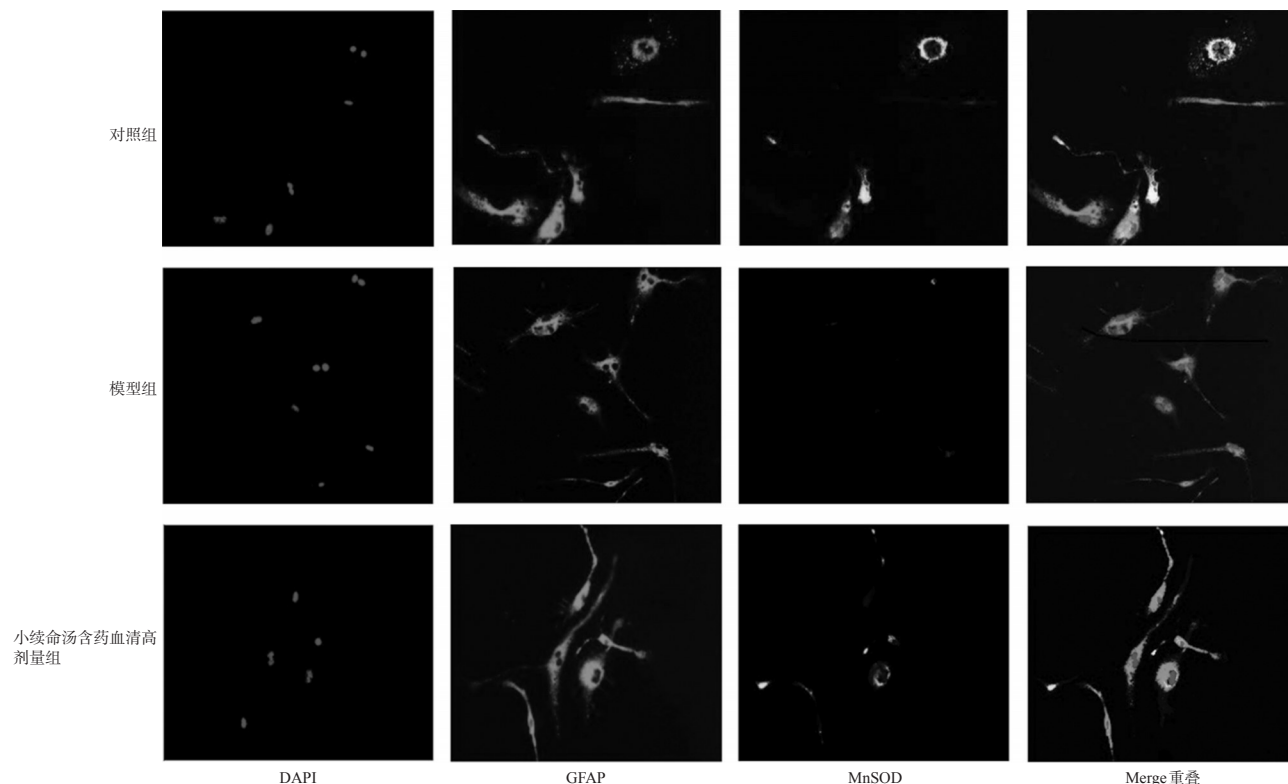
注:箭头处表示DCFH-DA荧光标记的ROS

Note: the arrow indicates the ROS labeled with DCFH-DA

图1 各组细胞中ROS的荧光显微图($\times 400$)

Fig 1 Fluorescence micrograph of ROS in astrocyte of each group ($\times 400$)

参、桂枝、黄芩、川芎、芍药各一两, 防风一两半, 生姜五两, 附子大者一枚”, 因治疗卒中效果显著, 被当时众医奉为“诸汤之最要”^[18]。后被我国唐代孙思邈收录于《备



注:第1列为蓝色荧光标记的DAPI,表示细胞核;第2列为红色荧光标记的GFAP,表示星形胶质细胞;第3列为绿色荧光标记的MnSOD;第4列为前3列的重叠图,呈黄色荧光,表示MnSOD在星形胶质细胞内的表达定位

Note: the first column is DAPI labeled with blue fluorescence, indicating the nucleus; the second column is GFAP labeled with red fluorescence, indicating astrocytes; the third column is MnSOD labeled with green fluorescence; the fourth column is the overlapping diagram of the first three columns, showing yellow fluorescence, indicating the expression and localization of MnSOD in astrocytes

图2 各组细胞中MnSOD的免疫荧光显微图($\times 400$)

Fig 2 Immunofluorescence micrograph of MnSOD in astrocyte of each group ($\times 400$)

急千金要方》,谓“小续命汤,治卒中欲死,身体缓急,口目不正,舌强不能语,奄奄惚惚,精神闷乱,诸风服之皆验,不令人虚方”^[15]。我国清代汪昂在《医方集解》中称其是“六经中风通剂”^[19]。

有研究表明,小续命汤治疗缺血性卒中具有确切的临床疗效^[9],吸引了学者的注意。经动物实验证实,小续命汤可减少脑梗死体积、改善神经功能,其作用机制可能不局限于对神经元的保护,还可能与其可保护对神经元具有支持作用的细胞和结构成分(如胶质细胞、血管内皮细胞、血脑屏障等)有关^[4-5]。因此,笔者采用小续命汤制备含药血清,将体外培养的大鼠星形胶质细胞通过OGD法模拟脑缺血损伤模型,采用小续命汤含药血清干预损伤模型细胞,观察其对细胞中LDH含量以及ROS、MnSOD水平的影响,以探索其对大鼠星形胶质细胞的保护作用及可能的分子机制。

LDH是存在于细胞质内的一种酶,当细胞膜受到损伤时,LDH会释放到细胞外,由于其释放稳定,已经成为评定细胞死亡和损伤的重要指标^[20]。本研究发现,OGD 2.5 h后复氧0~12 h时,模型组大鼠星形胶质细胞中LDH含量从(110.99±17.06) U/L逐渐上升至(436.64±55.29) U/L,显著高于对照组($P<0.05$),表明大鼠星形胶质细胞的损伤程度逐渐加重;加入低、中、高浓度小续命汤含药血清后,在细胞OGD后复氧6、12 h时可显著抑制这一趋势。

氧化应激反应是脑缺血再灌注损伤的重要机制之一。脑血流中断后大量生成的ROS超出了机体的自我清除能力,过量的ROS不仅能介导脂质、蛋白质、核酸的过氧化,破坏各种细胞结构、增加血脑屏障的通透性,还能通过刺激多种细胞因子的释放,介导炎症和免疫反应,从而加重脑组织的损伤^[21]。更严重的是,ROS介导的脂质过氧化反应产物可导致体内氧化-抗氧化机制失衡,形成损伤后再损伤的恶性循环^[22]。因此,抗氧化成为治疗脑缺血损伤的重要手段之一^[23-24]。MnSOD是机体内ROS的天然清除剂,可防止缺血缺氧后生成的过量ROS对脑组织结构和功能的破坏,故已成为脑缺血保护研究的重要靶点^[25-26]。本研究采用10%小续命汤含药血清对OGD 2.5 h后复氧的星形胶质细胞干预12 h,结果显示,与模型组比较,小续命汤含药血清能显著抑制OGD导致的细胞中ROS水平的升高和MnSOD水平的降低,表明其可能通过调节内源性氧自由基清除剂MnSOD的表达进而降低ROS水平。

综上,本研究结果表明,小续命汤含药血清可显著减轻OGD导致的大鼠星形胶质细胞损伤,其机制可能与其上调MnSOD水平,进而清除过量的ROS有关。本研究初步探讨了小续命汤含药血清对大鼠星形胶质细胞的保护作用及机制,为祛风通络方药治疗缺血性卒中的研究提供了新的视角;同时也发现,以小续命汤为代

表的祛风通络方药治疗缺血性卒中的靶点并不局限于神经元,其对神经元支持细胞如星形胶质细胞的影响在脑缺血保护作用也扮演着重要角色。

参考文献

- [1] 陈党红,颜芳,徐国峰.重新解读小续命汤的地位[J].中华中医药杂志,2011,26(9):2154-2157.
- [2] 朱心红,陈素云,高天明.小续命汤与脑卒中:小续命汤之文献研究[J].第一军医大学学报,2002,22(6):564-565.
- [3] 张怀璧,周叶.“外风”学说指导下的小续命汤治疗中风病临床实践[J].上海中医药杂志,2019,53(12):5-8.
- [4] LAN R, XIANG J, ZHANG Y, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neurovascular unit protection of Xiao-Xu-Ming decoction against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. DOI: 10.1155/2013/459467.
- [5] LAN R, XIANG J, WANG GH, et al. Xiao-Xu-Ming decoction protects against blood-brain barrier disruption and neurological injury induced by cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. DOI: 10.1155/2013/629782.
- [6] LAN R, ZHANG Y, XIANG J, et al. Xiao-Xu-Ming decoction preserves mitochondrial integrity and reduces apoptosis after focal cerebral ischemia and reperfusion via the mitochondrial p53 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):307-316.
- [7] 路畅,杜肖,贺晓丽,等.小续命汤有效成分组对局灶性脑缺血/再灌注大鼠恢复早期的神经保护作用研究[J].中国药理学通报,2016,32(7):938-944.
- [8] 叶晓红,林乐乐,傅海群,等.小续命汤药理及临床应用研究进展[J].上海中医药杂志,2020,54(1):97-100.
- [9] 蔡定芳,杨云柯,顾喜喜,等.中医辨证结合西医分期治疗急性脑梗死临床研究[J].中国中西医结合杂志,2007,27(9):789-792.
- [10] TASKER RC, DUNCAN ED. Focal cerebral ischemia and neurovascular protection: a bench-to bedside update[J]. Curr Opin Pediatr, 2015, 27(6):694-699.
- [11] LIDDELOW SA, BARRES BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential[J]. Immunity, 2017, 46(6):957-967.
- [12] SUN LL, ZHANG YX, LIU E, et al. The roles of astrocyte in the brain pathologies following ischemic stroke[J]. Brain Injury, 2019, 33(6):712-716.
- [13] 李若飞,于春萍,兰丁璇,等.中药血清药理学实验方法与相关问题探讨[J/OJ].全科口腔医学电子杂志,2019,6(31):125、136.
- [14] 孙思邈.备急千金要方:卷八[M].北京:华夏出版社,1995:139-140.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:7、58、148、150、154、229、230、279、316、330、435、518.

桂枝茯苓丸对痰湿型多囊卵巢综合征模型大鼠的改善作用及机制研究^Δ

余璟玮^{1,2*}, 钟晓莹³, 曾 蕾³, 郑泳霞^{1#}(1.广州市番禺区何贤纪念医院中医妇科, 广州 511400; 2.广州中医药大学科技产业园, 广州 510445; 3.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0039-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.08

摘要 目的:研究桂枝茯苓丸对痰湿型多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠的改善作用及可能机制。方法:将50只动情周期规律的雌性SD大鼠随机分为空白对照组($n=10$)和造模组($n=40$)。造模组大鼠采用灌胃来曲唑[1 mg/(kg·d), 连续21 d]的方法建立痰湿型PCOS模型。将造模成功的40只大鼠再随机分为模型组、二甲双胍组[阳性对照, 0.135 g/(kg·d)]和桂枝茯苓丸低、高剂量组[4.49、17.96 g/(kg·d)], 每组10只。各药物组大鼠均灌胃给药, 每天1次, 连续给药30 d; 空白对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。末次给药结束后, 采用口服葡萄糖耐量实验检测大鼠灌胃葡萄糖溶液0、30、60、120 min后的血糖水平; 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中促卵泡生成激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、睾酮(T)水平; 称定大鼠体质量和子宫、双侧卵巢、性腺旁脂肪的质量; 采用苏木精-伊红染色法观察大鼠卵巢组织的形态学变化; 分别采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法和Western blotting法检测大鼠卵巢组织中芳香化酶(CYP19a1)和子宫组织中葡萄糖转运蛋白4(Glut4)的mRNA及蛋白表达水平。结果:与空白对照组比较, 模型组大鼠灌胃葡萄糖溶液30、60、120 min后的血糖水平以及血清中LH、 E_2 、T水平均显著升高($P<0.05$); 体质量和子宫、双侧卵巢、性腺旁脂肪的质量均显著增加($P<0.05$); 卵泡膜细胞体积明显增大、呈圆球形; 卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠上述指标水平均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠卵泡膜细胞层厚度和卵泡膜细胞体积也有一定改善。结论:桂枝茯苓丸能够上调卵巢组织中CYP19a1基因及子宫组织中Glut4基因的表达, 从而改善痰湿型PCOS模型大鼠糖代谢异常、减轻胰岛素抵抗、下调血清雌激素水平、减轻卵巢多囊样改变程度, 最终起到治疗PCOS的作用。

关键词 桂枝茯苓丸; 痰湿型多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 芳香化酶; 葡萄糖转运蛋白4

- [16] ZAREI-KHEIRABADI M, MIRSADEGHI S, VACCARO AR, et al. Protocol for purification and culture of astrocytes: useful not only in 2 days postnatal but also in adult rat brain[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(3):1783-1794.
- [17] 王宁生, 杨奎, 雷燕, 等. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5):264-266.
- [18] 陈延之. 小品方[M]. 高文铸, 辑校. 北京: 中国中医药出版社, 1995:60.
- [19] 汪昂. 医方集解[M]. 方向明, 注释. 北京: 中国中医药出版社, 2018:301.
- [20] DRENT M, COBBEN NA, HENDERSON RF, et al. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation[J]. Eur Respir J, 1996, 9(8):1736-1742.
- [21] YANG JP, QI JC, XIU BX, et al. Reactive oxygen species play a biphasic role in brain ischemia[J]. J Invest Surg, 2019, 32(2):97-102.
- [22] HUANG HF, GUO F, CAO YZ, et al. Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (MnSOD) mimics: antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(10):811-818.
- [23] XIANG J, ZHANG JS, CAI XF, et al. Bilobalide protects astrocytes from oxygen and glucose deprivation-induced oxidative injury by upregulating manganese superoxide dismutase[J]. Phytother Res, 2019, 33(9):2329-2336.
- [24] XIANG J, ZHU W, YANG F, et al. Melatonin-induced ApoE expression in mouse astrocytes protects endothelial cells from OGD-R induced injuries[J]. Transl Psychiatry, 2020. DOI:10.1038/s41398-020-00864-9.
- [25] KIM GW, KONDO T, NOSHIITA N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals[J]. Stroke, 2002, 33(3):809-815.
- [26] LIU P, ZHAO H, WANG R, et al. MicroRNA-424 protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in mice by suppressing oxidative stress[J]. Stroke, 2015, 46(2):513-519.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81804135)

* 副主任中医师, 博士研究生。研究方向:中西医结合防治妇科疾病。E-mail: yjwfon@163.com

通信作者: 主任中医师, 博士。研究方向: 生殖健康与生殖障碍的中医药研究。E-mail: 9L701@163.com

(收稿日期:2020-09-02 修回日期:2020-12-10)

(编辑:罗 瑞)