

三七总皂苷对拟缺血脑微血管内皮细胞 RIG-I 表达的影响

张 赛¹ 杜庆红¹ 李卫红¹ 马家宝¹ 姜昭妍¹ 胡艳红¹ 郭晓谨² 万亮琴¹ 李芳赫¹

(1 北京中医药大学,北京,100029; 2 北京市通州区中西医结合医院,北京,101100)

摘要 目的:研究三七总皂苷对拟缺血损伤的脑微血管内皮细胞维甲酸诱导基因-I(Retinoic Acid-inducible Gene-I, RIG-I)的影响。方法:采用原代培养大鼠脑微血管内皮细胞(Brain Microvascular Endothelial Cell, BMEC),氧糖剥夺法制备拟缺血损伤模型,首先用不同浓度梯度的三七总皂苷进行干预,筛选出三七总皂苷的最佳用药浓度,然后分别采用荧光定量 PCR 和免疫蛋白印迹法检测各组细胞中 RIG-I mRNA 及蛋白的表达水平。结果:三七总皂苷在 22 μg/mL 浓度时能够显著提高拟缺血损伤脑微血管内皮细胞的活性,同时能够从基因和蛋白水平下调 RIG-I 的表达。结论:三七总皂苷对拟缺血损伤脑微血管内皮细胞具有保护作用,提示三七总皂苷在缺血性脑损伤中使 RIG-I 的表达下调可能是其发挥抗炎作用的内在分子机制之一。

关键词 三七总皂苷;脑微血管内皮细胞;维甲酸诱导基因-I

The effect of Panax notoginseng saponins on the expression of RIG-I in mimic ischemic cerebral microvascular endothelial cells

Zhang Sai¹, Du Qinghong¹, Li Weihong¹, Ma Jiabao¹, Jiang Zhaoyan¹, Hu Yanhong¹,
Guo Xiaojin², Wan Liangqin¹, Li Fanghe¹

(1 Beijing university of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Tongzhou combine traditional Chinese and western medicine hospital, Beijing 101100, China)

Abstract Objective: To study the effect of Panax notoginseng saponins (PNS) on the expression of RIG-I in mimic ischemic cerebral microvascular endothelial cells (BMECs). **Methods:** Rat BMECs were cultured in oxygen-glucose-deprived (OGD) conditions to mimic cerebral ischemia in vitro. Firstly, the optimal concentration of PNS was determined by various concentration gradients of PNS being administrated on OGD-induced BMECs. Then, the expression levels of RIG-I mRNA and protein in each group cells were detected by Q-PCR and Western blot method. **Results:** PNS can significantly improve the cells activity at 22 μg/mL concentration, and decrease the expression of RIG-I in gene and protein levels in the OGD-induced BMECs. **Conclusion:** PNS has a protective effect on mimic ischemic BMECs, the mechanism may be related to the down-regulation of RIG-I expression, which may be one of the mechanisms of anti-inflammatory effects of PNS in cerebral ischemic injury.

Key Words Panax notoginseng saponins; Cerebral microvascular endothelial cells; Retinoic acid-inducible gene-I

中图分类号: R245.3; R255.2; R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.035

近年实验和临床研究发现,三七总皂苷(Panax Notoginseng Saponins, PNS)能够有效减轻缺血性脑损伤,尤其是对缺血后炎症反应具有显著作用^[1]。维甲酸诱导基因-I作为一种模式识别受体,可识别非自身的病毒 RNA,在病毒感染后机体天然免疫反应中发挥重要作用。但新近发现 RIG-I 样受体信号通路也涉及非病毒感染性的炎症反应,发现其与肿瘤、风湿性关节炎、缺血性损伤等的发生也有密切联系。因此,该实验是通过观察氧糖剥夺模型(Oxy-

gen-glucose Deprivation, OGD)后三七总皂苷对大鼠脑微血管内皮细胞中 RIG-I mRNA 及蛋白表达水平的调节,进一步深入揭示三七总皂苷在缺血性脑损伤中发挥抗炎作用的分子机制。

1 实验材料与方法

1.1 主要材料与仪器 三七总皂苷(中国食品药品检验研究所),胎牛血清(Hyclone 南美胎牛血清),D-MEM/F-12 培养基干粉(美国 Gibco 公司),内皮细胞生长添加剂(ECGS)(中科迈晨(北京)科技有

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81273885);北京中医药大学研究生自主课题项目(编号:2015-JYB-XS043);北京市自然科学基金项目(编号:7144223)

作者简介:张赛(1989.05—),女,在读硕士研究生,主要从事中药复方治疗脑病的配伍机制研究

通信作者:李卫红(1973.05—),女,医学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事中医药治疗脑病的基础研究, E-mail: liweihong_403@163.com

限公司),明胶(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),胶原酶 II 型(美国 Sigma 公司),CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),兔抗大鼠单克隆 RIG-I 抗体(美国 CST 公司),山羊抗兔二抗(中杉金桥),SHKE4000-8CE 恒温孵育箱(Thermo Scientific 公司),荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司),PCR 自动系列化分析仪(美国 BIO-RAD 公司),Tanon-4500 数码凝胶图像处理系统(北京原平皓生物技术有限公司)。

1.2 取材及造模 采用本课题组已建立的大鼠脑微血管内皮细胞培养技术^[2],使用的第 3 代内皮细胞,其纯度达到 98%^[3]。应用本课题组已建立的氧糖剥夺模型^[4]进行造模。

1.3 用药浓度的确定与分组 将传至 3 代的细胞随机分为 9 组:正常组、模型组以及 7 个给药组(PNS 分别按照 5.5、11、22、44、88、176、352 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度给药),正常组不作处理,其余 8 组按上述方法进行造模,OGD 结束后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性,通过比较各组间 OD 值差异,筛选出 PNS 的最佳给药浓度。

将培养至 3 代的细胞随机分为 3 组,即正常组、模型组和三七总皂苷组。正常组不作处理,其余 2 组均进行造模,其中,三七总皂苷组按上步实验筛选出的最佳浓度在造模前以及造模过程中均给药。

1.4 PCR 法检测 RIG-I mRNA 的表达 造模结束后,用 Trizol 抽提总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 法检测 RIG-I mRNA 的表达水平。PCR 所用引物序列如下:RIG-I:上游 5'-GAAATACAACGACGCCCTCA-3',下游 5'-AAATGCTGCTTCTCGGACAT-3'; β -actin:上游 5'-CGCG AGAAGATGACCCAGAT-3',下游 5'-GCACTGTGTTGGCGTACAGG-3'。

1.5 Western Blotting 法检测 RIG-I 蛋白的表达 氧糖剥夺模型后,用 RIPA 细胞裂解液提取蛋白,用 Western Blotting 法检测各组细胞 RIG-I 蛋白的表达水平。利用凝胶成像仪拍照记录后分析图像的灰度值。

1.6 统计学处理 应用统计学软件 SPSS 20.0 进行数据分析,实验结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm ss$)表示,本实验数据处理应用 t 检验和单因素方差进行分析,其中 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 不同浓度三七总皂苷对拟缺血 BMEC 活性的影响 如图 1 结果所示,模型组较正常组 OD 值显著降低($P < 0.01$),说明 OGD 会使内皮细胞损伤严

重,活性显著减弱。三七总皂苷在低浓度阶段时,大鼠 BMECs 活性随药物浓度增加而逐渐增强,在 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高峰,较模型组 OD 值显著升高($P < 0.01$)。之后随浓度继续增加,内皮细胞活性反而下降,OD 值仅在 88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时与模型组比差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此选用 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为下一步实验的用药浓度。

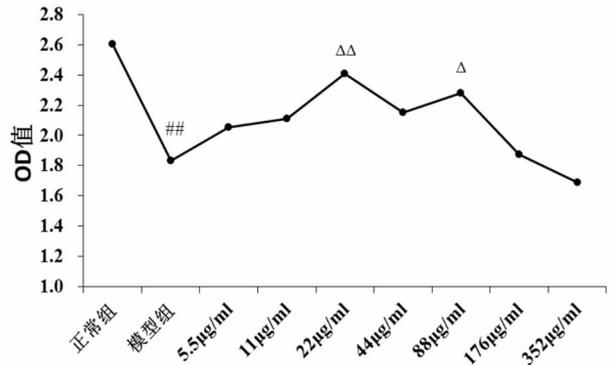


图 1 不同浓度三七总皂苷对拟缺血 BMEC 活性的影响
注:与正常组比:## $P < 0.01$;与模型组比: $\Delta P < 0.05$; $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2 三七总皂苷对拟缺血大鼠 BMEC 中 RIG-I mRNA 表达的影响 如图 2 结果所示,模型组 RIG-I mRNA 水平较正常组显著升高($P < 0.01$),提示 OGD 可诱导大鼠脑微血管内皮细胞 RIG-I mRNA 高表达;三七总皂苷组 RIG-I 基因表达较模型组显著降低($P < 0.01$),提示三七总皂苷对 RIG-I mRNA 有显著下调作用。

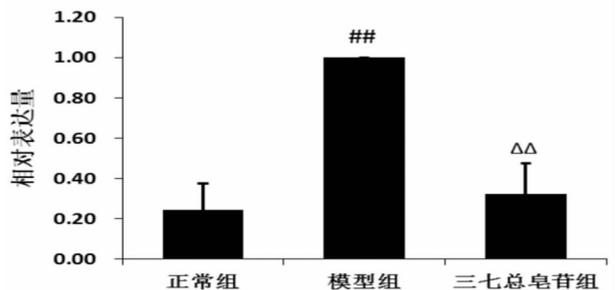


图 2 三七总皂苷对拟缺血大鼠 BMEC 中 RIG-I mRNA 表达的影响

注:与正常组比:## $P < 0.01$;与模型组比: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3 三七总皂苷对拟缺血大鼠 BMEC 中 RIG-I 蛋白的影响 如图 3 结果所示,正常组内皮细胞中 RIG-I 蛋白的表达量较少,氧糖剥夺后,条带明显增粗,提示 OGD 可诱导 RIG-I 表达明显增加,三七总皂苷能明显下调 RIG-I 的蛋白表达。定量分析后发现,三七总皂苷组较模型组条带灰度值明显降低,表明组间差异有统计学意义($P < 0.05$),与 PCR 结果

基本一致。

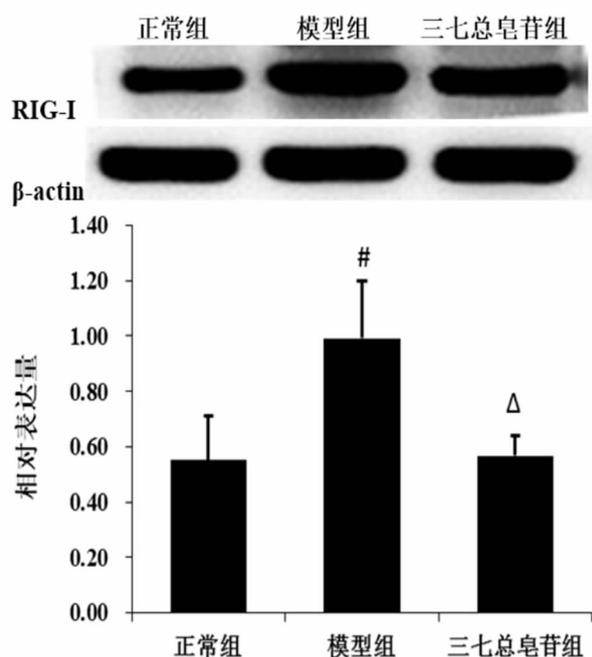


图3 三七总皂苷对拟缺血大鼠 BMEC 中 RIG-I 蛋白的影响注:与正常组比:[#] $P < 0.05$;与模型组比:^Δ $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血性脑血管病是脑卒中中最常见的临床类型,以发病率高、致残率高及致死率高著称。在脑动脉栓塞或血栓形成后,由于脑组织的缺氧血症以及继发的级联反应引起了组织的能量耗竭启动了脑组织损伤^[5]。随着缺血性脑损伤的发生,炎症反应细胞(小胶质细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、白细胞等)被激活,当炎症反应细胞活化后合成并释放炎症反应递质,这些炎症反应递质反过来又可进一步激活炎症反应细胞,形成恶性循环,进而加重脑损伤^[6]。因此,阻断缺血后炎症反应级联反应成为改善缺血再灌注脑损伤的研究热点。

依据 1989 年 Charles Janeway 提出的天然免疫模式识别理论,包括 RIG-I 样受体、Toll 样受体、NOD 样受体、Hin-200 家族蛋白和一些 DNA 感应分子在内的受体同属于病原识别受体,能够特异性地识别病毒表达的病原相关分子模式感知外源病原体,通过诱导下游的信号通路,激发人体的天然免疫反应,构成机体的第一道免疫防御防线^[7]。RIG-I 基因最早由我国上海瑞金医院血液病研究所发现^[8],是 RLR 家族成员之一。RIG-I 在被发现后广泛的应用于抗病毒研究中。但近年来,随着研究的深入,发现 RIG-I 样受体信号通路也涉及非病毒感染性的炎症反应。

Liu F 等^[9]在研究中分别采用了急性炎症反应模型(LPS 刺激巨噬细胞)和慢性炎症反应模型(HUVEC 细胞传代的复制性衰老模型)发现在这两种不同的炎症反应模型中 RIG-I 均被上调并且发挥生物学功能。在对衰老相关的慢性炎症反应模型研究中首次提出了 IRF1-RIG-I-NF- κ B/AP-1 轴线在缓慢进行的细胞周期中会引起慢性炎症反应,在衰老细胞中干涉 RIG-I 能够显著性降低转录因子 NF- κ B 和 AP-1 的生物学活性以及细胞上清中 IL-6 的分泌水平。Poeck 等^[10]后来发现,RIG-I 的炎症作用是其作用于炎症激活的传感器,如 MAVS、TRAF,导致 caspase-1 激活和产生成熟 IL-1 β 。这些研究确认了 RIG-I 在非感染性疾病炎症反应中的作用和地位,即 RIG-I 的活化可通过信号转导诱导炎症反应因子的表达。Frank J. Brand 等^[11]在大脑中动脉栓塞模型大鼠中,通过 Western blotting 和免疫组化可以观察到其海马中 RLR 信号通路中 RIG-I 和 INF- α 蛋白表达升高;体外实验显示,在星形胶质细胞 OGD 后 RIG-I 和 IFN- α 表达也升高,这些研究结果具有一致性。此外,他们还发现在星形胶质细胞 OGD 后 NF- κ B 的表达亦升高,且其变化趋势与 RIG-I 呈线性相关。这些研究表明 RIG-I 参与了脑缺血后炎症反应损伤,在大鼠脑缺血后 RIG-I 能够通过活化 NF- κ B,诱导炎症反应因子的产生,起到加重脑缺血损伤的病理作用。本课题通过氧糖剥夺法制备了大鼠拟缺血 BMECs 损伤模型,结果显示,OGD 后 RIG-I mRNA 和蛋白水平均出现明显上调,提示内皮细胞 RIG-I 的高表达也参与了缺血后炎症反应,降低内皮细胞 RIG-I 的表达可能是阻断缺血后炎症反应级联反应的潜在靶点。

PNS 是中药三七的主要有效成分,具有降低心肌耗氧量、扩张血管、延长凝血时间、抑制血小板聚集、抗氧化、清除自由基、抗炎、降血脂等药理作用,临床上广泛应用于缺血性脑中风的治理。唐婧姝等研究显示,三七总皂苷能降低脑缺血再灌注后炎症细胞因子的含量,发挥其改善脑缺血再灌注损伤的功效。本实验,通过 OGD 初步得出三七总皂苷浓度与大鼠拟缺血损伤 BMECs 活性的量效关系,分析发现药效与该药的药物浓度之间呈非线性关系:在 PNS 药物浓度较低时,脑内皮细胞活性随药物浓度的增加逐渐增强,在 22 μ g/mL 时达到最高峰,然后药物的保护作用随着浓度的增加却反而下降,提示三七总皂苷在一定剂量范围内具有内皮保护作用,浓度过高可能具有一定的细胞毒作用。综合实时荧

光定量 PCR 和 western blotting 的结果来看,大鼠 BMECs 氧糖剥夺造模后, RIG-I 的表达明显升高,三七总皂苷在 mRNA 和蛋白水平均使 RIG-I 的高表达显著下调。综上可知,细胞内 RIG-I 激活可活化 NF- κ B,引起 TNF- α 等相关炎性反应因子的表达,从而启动或进一步加重炎性损伤。本实验结果提示,三七总皂苷抑制大鼠氧糖剥夺模型后 BMECs 中 RIG-I 的高表达,可能是其在缺血性脑损伤中发挥抗炎作用的内在机制之一。

参考文献

[1] 段寅慧, 吴敏. 三七总皂苷药理研究及临床应用进展[J]. 中医药信息, 2014, 31(2): 108-110.
 [2] 李卫红, 李澎涛, 华茜, 等. 不同内皮细胞条件培养液对皮层神经元线粒体功能的影响及通络救脑注射液的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(2): 131-134.
 [3] 青雪梅, 李澎涛, 胡京红, 等. 不同脑微血管内皮细胞条件培养液抗缺血及再灌神经元损伤的比较[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(2): 183-188.
 [4] 胡利民, 范祥, 张艳军, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞共培养血脑屏障体外模型的建立[J]. 天津中医药, 2005, 22

(2): 149-151.
 [5] 李卫红, 王东坡, 李兴广, 等. 通络救脑注射液及其有效成分对拟缺血损伤人脑微血管内皮细胞的保护作用[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(6): 42-46.
 [6] 王萍, 张密霞, 庄朋伟, 等. 脑缺血再灌注损伤的炎性反应机制研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(5): 317-320.
 [7] 丁云磊, 孙英杰, 王晓旭, 等. RIG-I 样受体信号通路及其调控研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2014, (5): 72-79.
 [8] Liu TX, Zhang JW, Tao J, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells[J]. Blood, 2000, 96(4): 1496-1504.
 [9] Liu F, Wu S, Ren H, et al. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3): 254-262.
 [10] Su ZZ, Sarkar D, Emdad L, et al. Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I) expression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2): 502-510.
 [11] Brand FJ, de Rivero Vaccari JC, Mejias NH, et al. RIG-I contributes to the innate immune response after cerebral ischemia[J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12: 52.

(2015-12-25 收稿 责任编辑: 王明)

第八届中医儿科国际学术交流大会定于 11 月在中国南京召开

经世界中联批准, 第八届中医儿科国际学术交流大会定于 2016 年 11 月 19-21 在中国南京召开。

一、大会主题

中医儿科学术流派的传承与创新

二、会议征文内容

1. 江(江育仁)氏、董(董廷瑶)氏、徐(徐小圃)氏等现代中医儿科学术流派的学科建树与学术特点。

2. 纪念江育仁教授诞辰 100 周年, 学术生涯与学科贡献回顾。

3. 中医儿科名老中医学学术思想与临证经验。

4. 中医儿科学术创新的理论与实践。

5. 现代中医儿科的临床与实验研究。

6. 中青年学者的临床经验体会交流。

三、征文要求

1. 尚未在学术会议及公开刊物上发表的论文。

2. 保证论文内容的真实性和客观性, 文责自

负。

3. 投稿论文中、英文摘要各一份, 摘要 200~400 字, 回顾、总结性论文用叙述式, 研究性论文分目的、方法、结果、结论四个部分。

4. 编排要求: 标题宋体 2 号, 加粗, 居中; 作者姓名楷体 5 号, 居中, “,” 分隔; “()” 内写单位、城市、邮政编码, 宋体 5 号, 居中; 摘要、关键词宋体 5 号; 英文字体 Time New Roman, 标题小 2 号, 作者、单位、摘要、关键词小 4 号; 正文一级标题黑体 5 号, 以下全部宋体 5 号, 序号采用 1、1.1、1.1.1 方式。可附参考文献。文后附作者简介(包括姓名、职称、主要研究方向、联系方式等)。Word 文档文稿。字数 1500~3500 字。

四、投稿方式

来稿请发电子邮箱: szlek@126.com。本次征稿不接受纸质版。

五、征稿截止日期: 2016 年 9 月 30 日。