

白藜芦醇对脑小胶质细胞缺氧损伤的保护机制研究

武汉大学人民医院 邱光钰 李文强*, 武汉 430060

摘要 目的: 研究白藜芦醇对脑小胶质细胞缺氧性损伤的保护作用。方法: 使用不同浓度(0 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$)的白藜芦醇干预脑小胶质细胞缺氧模型, 通过细胞生长曲线及克隆形成实验, 检测白藜芦醇对缺氧脑小胶质细胞存活率的影响。结果: 白藜芦醇作用 2 d 后, 各浓度组脑小胶质细胞存活率与缺氧组比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。白藜芦醇作用 4 d 后, 随着药物浓度的增加, 缺氧脑小胶质细胞存活率分别为(34.17 $\pm$ 8.25)%、(55.20 $\pm$ 7.55)%、(78.13 $\pm$ 6.85)%、(90.07 $\pm$ 7.84)%, 组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。作用 6 d 后, 缺氧脑小胶质细胞存活率分别为(39.01 $\pm$ 5.54)%、(60.08 $\pm$ 7.13)%、(80.37 $\pm$ 5.31)%、(92.03 $\pm$ 7.62)%, 组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。脑小胶质细胞克隆存活率随白藜芦醇浓度增加而增高。随药物浓度增加, 白藜芦醇干预 7 d 后, 克隆存活率分别为(26.47 $\pm$ 5.66)%、(47.92 $\pm$ 5.07)%、(66.09 $\pm$ 2.93)%、(80.07 $\pm$ 1.49)%, 组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。结论: 白藜芦醇可以提高在缺氧条件下脑小胶质细胞的存活率。

关键词 急性缺氧性脑病; 白藜芦醇; 脑小胶质细胞

中图分类号 R742 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20170622

Protective mechanism of Resveratrol on hypoxia injury of brain microglia QIU Guang-yu, LI Wen-qiang*. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract Objective: To study the protective effect of resveratrol on hypoxic injury of brain microglia. Methods: The hypoxia model of microglia was treated with resveratrol at different concentrations (0, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{mol/L}$). The cell growth curve experiment and clone formation experiment were used to check up the effect of resveratrol on the survival of brain microglia hypoxia model. Results: As compared with the hypoxia group, the low dose group, middle dose group and high dose group showed no significant difference in the survival rate of MG cells after treatment with resveratrol for 2 days ($P > 0.05$). With the increase of drug concentration, the survival rates of hypoxia model were (34.17 $\pm$ 8.25)%, (55.20 $\pm$ 7.55)%, (78.13 $\pm$ 6.85)% and (90.07 $\pm$ 7.84)% respectively after 4 days, with the difference between the two groups being statistically significant ($P < 0.001$). After treatment for 6 days, the survival rates of hypoxia model were (39.01 $\pm$ 5.54)%, (60.08 $\pm$ 7.13)%, (80.37 $\pm$ 5.31)% and (92.03 $\pm$ 7.62)% respectively, with the difference between the two groups being statistically significant ($P < 0.001$). The results of cell clone formation showed that the survival rate of microglia clones increased with the increase of resveratrol concentration. The survival rates of clones were (26.47 $\pm$ 5.66)%, (47.92 $\pm$ 5.07)%, (66.09 $\pm$ 2.93)% and (80.07 $\pm$ 1.49)% respectively after treatment for 7 days, with the difference between the two groups being statistically significant ($P < 0.001$). Conclusions: Resveratrol could improve the survival of brain microglia under hypoxia.

Key words Acute hypoxic encephalopathy; Resveratrol; Brain microglia

目前已经有相关权威研究证实白藜芦醇(resveratrol, Res)在大鼠腔隙性脑梗死急性期有减少脑梗死面积, 改善神经细胞功能缺损作用^[1]。也有实验证实 Res 能明显减轻脑细胞水肿严重程度, 且对缺血损伤脑细胞具有保护作用^[2]。本研究拟探讨 Res 对缺氧脑小胶质细胞(microglia, MG 细胞)的保护作用, 为其在缺血缺氧性脑病的临床治疗提供实验室依据。

材料与方法

模型制备及分组

MG 细胞的培养: BV-2 小鼠源性小胶质细胞(购自北京协和医学院细胞中心)置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中(含支原体抗生素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱饱和湿度下培养, 每 2~3 天换液 1 次, 每 2 天传代一次。细节操作如下: 倒弃原始培养基, PBS 缓冲液漂洗 2 次, 加入 1 mL 胰酶充分

* 通信作者: 李文强, E-mail: 13971583624@139.com

浸润细胞,显微镜下观察,待细胞逐渐变圆时倒弃胰酶液,加入 1~2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化。遂即用细胞计数仪进行细胞计数,按 1:4 接种于新的细胞培养瓶,继续于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,取第 3~7 代细胞用于后续实验。

MG 细胞缺氧模型制备:参考 Goldberg 等^[3]的实验方法制备细胞缺氧模型。取对数生长期的正常条件下培养的 MG 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化 5 min,加含胎牛血清的 DMEM 培养基 1 mL 终止消化,低速离心机 1 500/min 离心 5 min,离心完取出离心管,用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞浓度约 5×10^7 个/mL,接种在 24 孔板内,每孔 1 mL,将 24 孔板放进厌氧培养盒内,向盒内通入含有 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,气流量为 1.5 L/min,通气时间为 20 min,然后放置在 37℃ 细胞培养箱内培养 4 h,即为 MG 细胞缺氧模型。

白藜芦醇配制:白藜芦醇 (R5010-500MG) 购自美国 sigma 公司,Res 相对分子量为 228.24 g/mol,称取 Res 粉末 100 mg,约为 0.438 mmol,在超净工作台内将称取的 Res 粉末溶于 4.38 mL 二甲基亚砜中,用移液器充分吹匀,待 Res 粉末完全溶解,用 5 mL 一次性注射器抽取注溶液经射滤器 (0.22 μm 微孔滤膜) 过滤除菌,然后分装成 2 mL 棕色 EP 管内, -20℃ 保存备用。

实验分组:本实验分为 5 个组:①对照组:用正常含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基;在 37℃、50 mL/L CO₂ 的孵箱饱和湿度下培养;②模型组:分为缺氧组,Res 低剂量组、中剂量组、高剂量组,在制备缺氧 MG 细胞模型时用的无糖 DMEM 培养基含 Res 的最终浓度为 0、12.5、25、50 μmol/L,缺氧培养 4 h 后改用含有对应浓度 Res 的正常培养基培养。

方法

细胞生长曲线实验:取正常条件下培养的 MG 细胞和各组的缺氧 MG 细胞模型,对应分组使用的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基分别含有对应浓度的 Res,取 96 孔板,按每孔 2 000 个细胞/200 μL 种板,每个分组设置 3 个复孔,取第 2 d、第 4 d 和第

6 d 三个时间点进行检测,用酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度 (A) 值,所有结果重复验证 3 次,然后计算白藜芦醇干预第 2 d、第 4 d 和第 6 d 的细胞存活率,计算公式为细胞存活率 (%) = 模型组 A570 值/对照组 A570 值 × 100%。

克隆形成实验:将正常 MG 细胞与缺氧细胞模型用 0.25% 胰蛋白酶常规消化,1 500/min 离心 5 min,对应分组使用的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基分别含有对应浓度的 Res,同一 Res 浓度设置 3 个复孔,对照组每孔加 4 mL 无 Res 的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,模型组分别用含有对应浓度的 Res 的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,使每个孔内总液体量为 5 mL,置于 37℃、50 mL/L CO₂ 的孵育箱饱和湿度下孵育 7 d。用酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度 (A) 值,计算克隆存活率,计算公式:克隆存活率 (%) = 模型组 A570 值/对照组 A570 值 × 100%。

统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计学软件,以上实验均重复 3 次。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多个样本间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

白藜芦醇对缺氧 MG 细胞存活率的影响 不同浓度 Res 作用于模型组 MG 细胞 2、4、6、7 d 后,计算 MG 细胞存活率 (%)。第 2 d 模型组中 Res 低剂量组、中剂量组、高剂量组 MG 细胞存活率与缺氧组比较,差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。第 4 天、第 6 天及第 7 天 Res MG 细胞存活率缺氧组 < 低剂量组 < 中剂量组 < 高剂量组 (均 $P < 0.05$) ,见表 1。

讨 论

心肺复苏的最终成败取决于脑功能的恢复。而代谢障碍、电解质酸碱平衡紊乱和自由基异常增加等在脑缺血缺氧与缺血-再灌注损伤中交互作用^[4]。缺血缺氧性脑病 (hypoxic ischemic encephalopathy, HIE) 是由于脑组织供血供氧障碍等导致脑神经细

表 1 模型组不同时间点缺氧 MG 细胞存活率

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	2d	4d	6d	7d
缺氧组	84.0 ± 7.2	34.2 ± 8.3	39.0 ± 5.5	26.5 ± 5.7
低剂量组	85.1 ± 6.4	55.2 ± 7.6 *	60.1 ± 7.1 *	47.9 ± 5.1 *
中剂量组	85.1 ± 8.6	78.1 ± 6.9 #	80.4 ± 5.3 #	66.1 ± 2.9 #
高剂量组	84.1 ± 7.4	90.1 ± 7.8 [△]	92.30 ± 7.6 [△]	80.07 ± 1.5 [△]

注:与缺氧组比较,* $P < 0.05$;与低剂量组比较,# $P < 0.05$;与中剂量组比较,[△] $P < 0.05$

胞正常功能受损或死亡,并由此引发的一系列神经精神症状的一种临床综合征^[5]。近年来急性缺血缺氧性脑病的研究结果多认为其发生是多环节、多损伤因素多方面作用的结果,最终导致神经细胞的炎症、坏死和凋亡,继发性导致对应神经系统功能性障碍^[6]。一直以来对急性缺血缺氧性脑病神经保护进行着广泛深入的研究,但具体发病机制尚未完全明确,相关研究认为脑细胞能量衰竭是引起急性缺血缺氧性脑病的主导环节^[7],同时受损的细胞发生炎症反应,释放出一些毒性酶加重细胞损伤^[8]。

脑 MG 细胞被称为中枢神经系统的巨噬细胞,具有清除变性物质和死亡细胞的作用^[9]。有研究证实 MG 在脑缺血缺氧数分钟就有 MG 反应,被称为中枢神经系统病理事件的传感器^[10,11],现在普遍认为 MG 在中枢生理和病理过程中起重要作用,是中枢神经系统具有代表性的免疫细胞。这也是本实验选取用缺氧 MG 模拟脑组织缺血缺氧的原因。

Res 具有抗血小板聚集、抗炎、清除自由基、抗氧化、生长抑制活性、及抗肿瘤增殖活性等多种生物学活性^[12]。目前已经有研究证实在大鼠腔隙性脑梗死急性期有减少脑梗死面积,改善神经功能缺损作用^[13],也有实验证实能明显减轻脑水肿程度,且具有缺血脑保护作用^[14]。本实验 MG 缺氧模型生长曲线和克隆形成实验结果显示:随着药物浓度的增加,白藜芦醇相对于对照组表现出对脑小胶质细胞缺氧模型明显保护作用。含 Res 的模型组随着 Res 浓度的提高,存活的 MG 缺氧模型细胞数也逐渐增多。细胞生长曲线结果显示随着 Res 浓度的提高,MG 细胞存活率亦随之升高,各组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。克隆形成实验数据显示不同浓度 Res 干预 7d 后,MG 细胞随着 Res 浓度升高,存活率亦逐渐升高,各组间相比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。证实了不同浓度的白藜芦醇对 MG 缺氧损伤具有保护作用,提高了 MG 缺氧模型的存活率,并且呈剂量-效应依赖关系。

本实验初步研究了白藜芦醇对 MG 缺氧模型的保护作用,为更深一步研究白藜芦醇对 HIE 保护机制以及白藜芦醇用于预防、治疗 HIE 提供了实验理论基础,但是白藜芦醇对 HIE 的具体保护机制还需

进行深层次的体外实验和临床研究。

参考文献

- 1 Abdel-Aleem GA, Khaleel EF, Mostafa DG, et al. Neuroprotective effect of resveratrol against brain ischemia reperfusion injury in rats entails reduction of DJ-1 protein expression and activation of PI3K/Akt/GSK3 β survival pathway[J]. Arch Physiol Biochem, 2016, 122(4):200-213.
- 2 Bernier M, Wahl D, Ali A, et al. Resveratrol supplementation confers neuroprotection in cortical brain tissue of nonhuman primates fed a high-fat/sucrose diet[J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(5):899-916.
- 3 Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury[J]. J Neurosci, 1993, 13(8):3510-3524.
- 4 姜银松, 李新宇. 乌司他丁在心肺复苏脑损伤中的保护效应[J]. 内科急危重症杂志, 2014, 20(3):205-207.
- 5 林春光, 沈岳飞. 急性缺血缺氧性脑病神经保护的治疗进展[J]. 医学综述, 2012, 18(1):96-98.
- 6 Lemiale V, Huet O, Vigué B, et al. Changes in cerebral blood flow and oxygen extraction during post-resuscitation syndrome[J]. Resuscitation, 2008, 76(1):17-24.
- 7 Mottahedin A, Svedin P, Nair S, et al. Systemic activation of Toll-like receptor 2 suppresses mitochondrial respiration and exacerbates hypoxic-ischemic injury in the developing brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(4):1192-1198.
- 8 Ziemka-Nalecz M, Jaworska J, Zalewska T. Insights into the neuroinflammatory responses after neonatal hypoxia-ischemia[J]. J Neuro-pathol Exp Neurol, 2017, 76(8):644-654.
- 9 Dauch JR, Yanik BM, Hsieh W, et al. Neuron-astrocyte signaling network in spinal cord dorsal horn mediates painful neuropathy of type 2 diabetes[J]. Glia, 2012, 60(9):1301-1315.
- 10 Han Q, Lin Q, Huang P, et al. Microglia-derived IL-1 β contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1):52.
- 11 Echeverry S, Rodriguez MJ, Torres YP. Transient receptor potential channels in microglia: roles in physiology and disease[J]. Neurotox Res, 2016, 30(3):467-478.
- 12 Fang L, Gao H, Zhang W, et al. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3):3219-3226.
- 13 Cheng W, Shen CB, Wang L, et al. Effect of resveratrol pretreatment on proliferation of cortical neural stem cells after oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(1):113-118.
- 14 Girbovan C, Plamondon H. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. Brain Res, 2015, 22(5):203-214.

(2017-03-21 收稿 2017-09-21 修回)