

·综述·

DOI: 10.11656/j.issn.1673-9043.2015.01.16

丹酚酸 B 对脑损伤神经细胞的保护作用*

马萌萌, 郭虹, 张晗, 王乔悦, 胡利民

(天津中医药大学中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室, 天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193)

摘要:近年来,有研究表明丹酚酸 B 对脑损伤神经细胞可以起到一定保护作用,其机制包括促进干细胞增殖分化、促进神经营养因子释放、维持细胞内钙离子稳态及线粒体膜电位、抗炎作用、减少应激产物生成、调控凋亡相关基因的表达、对相关神经递质的调控以及对 PI3K/Akt/GSK-3 β 、AK2/STAT3 通路的调节等。随着对丹酚酸 B 的进一步研究,有希望用于脑缺血、神经病变等疾病的治疗。

关键词:丹酚酸 B; 脑损伤; 神经保护

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2015)01-0055-04

丹酚酸 B(Sal B)是丹参水溶性成分丹参多酚酸中含量最高的物质^[1-2],由三分子丹参素与一分子咖啡酸缩合而成^[3],丹酚酸 B 水溶液不稳定^[4],在高于 70℃时,丹酚酸 B 样品水溶液容易分解^[5],其中一部分可以转化为丹酚酸 A^[6]。近年来有研究表明丹酚酸 B 对脑损伤神经细胞具有保护作用,其机制主要包括促进干细胞增殖与分化、促进神经营养因子释放、维持细胞内钙离子稳态、稳定线粒体膜电位、抗炎作用、减少应激产物生成、调控凋亡相关基因的表达以及对相关神经递质、相关通路的调控,以下从这几方面进行综述。

1 促进神经干细胞增殖、分化

Zhang、Zhong 等^[7-8]用 BrdU 免疫组织化学法证实,丹酚酸 B 可以促进骨髓来源的神经干细胞(BM-NSCs)增殖,并且有浓度依赖性。丹酚酸 B 浓度为 5、20、40 mg/mL 组 BrdU 阳性细胞率分别为(42.51 \pm 76.84)%、(56.46 \pm 79.08)%、(60.58 \pm 79.83)%、对照组为(38.90 \pm 75.04)%、给药组与对照组相比均有显著性差异;丹酚酸 B 还可以促进 BM-NSCs 分化为神经元、少突胶质前体细胞,以及少量星形胶质细胞。郭国庆等^[9]研究表明,丹酚酸 B 促进神经干

细胞增殖这一作用是通过促进 Akt 磷酸化实现的,PI3K/Akt 抑制剂(LY294002)可以抑制这一作用^[10],若这种促进分化的作用在体内也可以实现,那么机体就可以获取充足的种子细胞来修复受损的神经细胞的结构和功能。

2 促进神经营养因子的释放

神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)可以对受损的神经组织发挥营养、支持、保护、再生等作用^[11]。其中 BDNF 是脑中含量最多的神经营养因子,其可以促进骨髓间充质细胞分化成为神经元样细胞^[12]。有研究表明丹酚酸 B 可以促进 BM-NSC 产生 BDNF^[8],增加缺血半暗带 NGF、BDNF 的表达,从而起到对脑缺血再灌注损伤后神经细胞的保护作用^[13]。故有希望用于治疗脑缺血、神经病变等疾病。

3 维持细胞内钙离子稳态以及稳定线粒体膜电位

Ca²⁺通常作为第 2 信使在细胞的一些生理活动中发挥重要的作用,但是细胞内 Ca²⁺超载却是细胞损伤的共同通路,在脑缺血性损伤时会引起细胞内的 Ca²⁺超载,造成神经元损伤^[14-15],线粒体膜电位下降则是细胞凋亡早期的一个标志。汪云等^[16]研究了丹酚酸 B 对大鼠皮质神经元缺糖缺氧损伤的影响,结果显示,与模型组相比,给药组细胞活力、线粒体膜电位显著增高,细胞内钙离子浓度降低。表明丹酚酸 B 对缺糖缺氧损伤的大鼠皮质神经元有保护作用,这一作用是通过维持细胞内钙离子稳态以及稳定线粒体膜电位而实现的。

也有研究表明,1 mmol/L 的丹酚酸 B 镁盐可以通过抑制 Na(+)/K(+)-ATP 酶引起 SH-SY5Y 细胞

* 基金项目:重大新药创新(2012ZX09101202);高等学校博士学科点专项科研基金(20121210120005);教育部科学技术重点研究项目(212006);“十二五”期间天津市高等学校“创新团队培养计划”—中医脑病临床与基础(TD12-5035)。

作者简介:马萌萌(1990-),女,硕士研究生,主要从事中药药理学和中药毒理研究。

通讯作者:胡利民,E-mail:huliminth@126.com。

中钙离子浓度增加,但这一作用并不会对细胞造成损伤^[17]。

4 减少乳酸脱氢酶的渗漏率

在正常情况下细胞内乳酸脱氢酶(LDH)的渗漏率很低,但细胞受到损伤后由于细胞膜的通透性发生了改变,细胞释放到培养液中的LDH会显著增多。汪云等^[16]研究了丹酚酸B对大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的影响。结果显示,与模型组相比,给药组神经元LDH漏出率显著降低。丹酚酸B对H₂O₂介导的细胞损伤有保护作用,与对照组相比,丹酚酸B 5、20、40 g/L组细胞存活率均显著增高,LDH渗漏率明显降低^[8];Wang等^[18]用谷氨酸建立了PC12细胞损伤模型,给予丹酚酸B后,LDH渗漏率与模型组相比明显降低。

5 抗炎作用

脑缺血后会发生一系列炎症反应,在脑缺血再灌注继发的脑损伤中起着重要作用,丹酚酸B可以通过抗炎作用发挥对神经细胞的保护作用^[19-21]。活化的小胶质细胞能产生大量炎性介质,造成神经细胞毒性^[22]。Wang等^[23]用脂多糖(LPS)刺激小胶质细胞,研究表明,丹酚酸B可以抑制小胶质细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA的表达,减少小胶质细胞一氧化氮(NO)产生;抑制小胶质细胞白介素-1 β (IL-1 β)mRNA表达,减少IL-1 β 的释放;抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)mRNA的表达,减少TNF- α 的生成,且与模型组相比均有显著性差异,因此推测丹酚酸B可以通过阻断小胶质细胞活化从而抑制神经细胞炎症反应,发挥其对神经细胞的保护作用。在大鼠脑缺血再灌注损伤实验中,丹酚酸B 300 mg/丹参酮II A 30 mg组与丹参酮II A组、模型组相比,大鼠皮质区神经细胞坏死较模型组减轻,大鼠脑内损伤区周围脑组织炎症因子ICAM-1和MMP-9均显著降低,提示丹酚酸B有神经保护作用,其作用与减少炎症因子生成有关^[24]。

Chen、张义琴等^[25-26]制作了外伤性脑损伤模型,结果表明,丹酚酸B(25 mg/kg)可以抑制嗜中性粒细胞介导的炎症反应以及小胶质细胞的活化,这一作用是通过抑制TNF- α 及IL-1 β 的生成,促进炎症抑制因子IL-10及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的生成来实现的。

6 减少ROS的生成、促进自由基清除、减轻脂质过氧化反应

ROS为需氧细胞在代谢过程中产生一系列活

性氧簇ROS可以通过细胞氧化应激反应诱导细胞凋亡甚至导致其坏死。丹酚酸B可以显著抑制由LPS、1-甲基-4-苯基吡啶刺激引起的小胶质细胞ROS生成的增多^[27]。Wang等^[13]用谷氨酸建立了PC12细胞损伤模型,丹酚酸B抑制了谷氨酸诱导的ROS的释放,从而抑制PC12的凋亡。Wang等^[28]建立了原代大鼠大脑皮质神经元缺氧缺糖损伤模型,与模型组相比,丹酚酸B可以显著降低ROS的含量,提高细胞活力。

Zhang等^[29]研究表明,丹酚酸B在大鼠体内代谢会生成4种甲基化产物,经DPPH法验证,这些甲基化产物也具有清除自由基减少细胞损伤的作用。

赵旭等^[30]用大鼠线栓法制备了大脑中动脉局灶性缺血再灌注模型,实验结果表明,丹酚酸B(96 mg/kg)可以显著改善大鼠的神经功能,提高大鼠血清总超氧化物歧化酶(SOD)活力、降低丙二醇(MDA)含量,对神经元细胞起到保护作用。

7 对细胞凋亡相关蛋白的调控

Bcl-2家族为一类原癌基因,是细胞凋亡的重要调节因子,Bax、Bcl-2、Bid、Bcl-xl等最具代表性且研究较多。caspase-3被称为“死亡蛋白酶”,一旦被激活,即发生下游的级联反应,使凋亡不可避免,是细胞凋亡的关键蛋白酶。Zeng等^[27]用1-甲基-4-苯基吡啶建立细胞损伤模型后,用噻唑蓝法(MTT)验证丹酚酸B可以增强损伤后的神经母细胞瘤SH-SY5活力,减少细胞凋亡;丹酚酸B还可以下调Bax的表达,提高细胞的存活率;同时丹酚酸B还可以显著减少活化caspase-3蛋白的表达,通过以上途径丹酚酸B对1-甲基-4-苯基吡啶损伤后的SH-SY5细胞起到了保护作用。Wang等^[18]用谷氨酸建立了PC12细胞损伤模型,结果表明丹酚酸B可以显著降低谷氨酸诱导活化的caspase-3蛋白的表达,抑制PC12的凋亡。

8 对谷氨酸、 γ -氨基丁酸神经递质的调控

谷氨酸、 γ -氨基丁酸均为氨基酸类神经递质,正常情况下可以调节认知、运动功能并维持脑的兴奋-抑制平衡。但在脑缺血时,脑内谷氨酸、 γ -氨基丁酸浓度改变会使神经细胞损伤进一步加重,是神经元损伤的关键^[31]。石少明等^[32]研究表明,丹酚酸B可以降低脑缺血后纹状体谷氨酸、 γ -氨基丁酸水平,保持兴奋-抑制的平衡,可以抑制脑缺血造成的神经元坏死,改善脑缺血损伤。

9 对 PI3K/Akt/GSK-3 β 、AK2/STAT3 通路的调节

PI3K/Akt/GSK3 β 信号转导通路为一种抗凋亡、促存活的转导途径。Xiao 等^[33]分别用 N-甲基-D-天冬氨酸、红藻氨酸建立了大鼠原代海马神经元损伤模型, 研究表明丹酚酸 B 镁可抑制磷酸化 Akt 及 GSK-3 β 减少, 降低细胞死亡率, PI3K 抑制剂 LY294002 及 Akt 抑制剂曲西立滨(抗肿瘤药)可以抑制这一作用, 表明丹酚酸 B 镁对细胞的保护作用是通过 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路的调节实现的。

SMND-309 为新发现的丹酚酸 B 的衍生物, 其同样对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经细胞具有保护作用, 其可以改善神经功能、提高神经元的活力、促进血管再生。这一作用是通过促进脑内 EPO/EPOR 的表达, 导致 JAK2/STAT3 通路激活, 进而引起 VEGF 增加而引起的^[34]。

综上所述, 丹酚酸 B 可以通过促进干细胞增殖与分化、促进神经营养因子释放、维持细胞内钙离子稳态、稳定线粒体膜电位、减少乳酸脱氢酶的渗漏率、抗炎作用、减少应激产物生成、调控凋亡相关基因的表达、对相关神经递质的调控及对 PI3K/Akt/GSK-3 β 、AK2/STAT3 通路的调节作用这几方面起到对神经细胞的保护作用。脑缺血导致神经细胞病变引发的疾病很多, 其损伤机制包括氨基酸兴奋性中毒、NO 及氧自由基生成、钙超载、炎症损伤等^[35], 因此丹酚酸 B 在临床上有很广泛的应用前景。但有研究表明在大鼠体内, 丹酚酸 B 的肠壁透过率低^[36-37], 进入体循环后与血浆蛋白有很高的结合率^[38], 因此如何提高其生物利用度, 使其临床上广泛用于脑损伤神经保护作用, 有很大的理论、实际研究价值。

参考文献:

[1] 薛静, 叶正良, 李德坤, 等. HPLC 同时测定丹参多酚酸中丹酚酸 D、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 70-73.

[2] 王凤美, 陈军辉, 李磊, 等. 高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 476-478.

[3] 杜冠华, 张均田. 丹参现代研究概况与进展(续一)[J]. 医药导报, 2004, 23(6): 355-360.

[4] Zhou LN, Zhang X, Xu WZ, et al. Studies on the stability of salvianolic acid B as potential drug material[J]. Phytochemical Analysis, 2011, 22(4): 378-384.

[5] 朱静, 陈慧清, 白鹏, 等. 丹酚酸 B 水溶液分解反应的动力学研究[J]. 中成药, 2009, 31(4): 541-544.

[6] Kan S, Chen ZZ, Shao L, et al. Transformation of Salvianolic Acid B to Salvianolic Acid A in Aqueous Solution and the

In Vitro Liver Protective Effect of the Main Products [J]. Journal of food science, 2014, 79(4): C499-C504.

[7] Zhang N, Kang TG, Xia Y, et al. Effects of salvianolic acid B on survival, self-renewal and neuronal differentiation of bone marrow derived neural stem cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 697: 32-39.

[8] Zhong J, Tang MK, Zhang Y, et al. Effect of salvianolic acid B on neural cells damage and neurogenesis after brain ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta pharmaceutica Sinica, 2007, 42(7): 716-721.

[9] 郭国庆, 李斌, 王圆圆, 等. 丹酚酸 B 促进胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖、突起生长和分化[J]. 中国科学, 2009, 39(8): 793-802.

[10] Zhuang PW, Zhang YJ, Cui GZ, et al. Direct Stimulation of Adult Neural Stem/Progenitor Cells In Vitro and Neurogenesis In Vivo by Salvianolic Acid B [J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): 1-9.

[11] Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor in Neuropsychiatric disorders[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64: 238-258.

[12] 黄文, 张成, 陈松林, 等. 脑源性神经营养因子体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 军医大学学报, 2004, 24(8): 854-858.

[13] 刘鹏, 王瑾, 苗常青, 等. 神经营养因子在大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤中的变化及丹参乙酸镁的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(4): 285-289.

[14] Kristian P, Doyle RS, Mary PS. Mechanisms of ischemic brain damage [J]. Neuropharmacology, 2008, 55(3): 310-318.

[15] 刘青青, 郭虹, 王少峡, 等. 脑缺血损伤机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(6): 1228-1230.

[16] 汪芸, 蒋玉凤, 黄启福, 等. 丹酚酸 B 对大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(3): 180-183.

[17] Chen Y, Jinn T, Chung T, et al. Magnesium lithospermate B extracted from Salvia miltiorrhiza elevates intracellular Ca²⁺ level in SH-SY5Y cells [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(8): 923-929.

[18] Wang X, Zhu G. Study on protective effect of salvianolic acid B on glutamate-induced excitotoxicity in pheochromocytoma PC12 cells [J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(3): 353-357.

[19] Alfredo C, Massimo M, Salvatore C, et al. Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation [J]. Brain Research Reviews, 2007, 54(1): 205-218.

[20] Feng Y, You ZL, Yan S, et al. Antidepressant-like effects of Salvianolic acid B in the mouse forced swim and tail suspension

- sion tests[J]. Life Sciences, 2012, 90(25-26): 1010-1014.
- [21] 仲爱芹, 徐士欣, 张军平, 等. 丹酚酸 B 干预大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应的实验研究[C]. 第十一届全国博士生学术年会(生物医药专题)论文集, 2013.
- [22] 卢国彦, 杨红云, 王少峡, 等. 心脑舒通及其单体成分对内毒素激活的小胶质细胞的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(1): 19-21.
- [23] Wang SX, Hu LM, Gao XM. Anti-inflammatory Activity of Salvianolic Acid B in Microglia Contributes to its Neuroprotective Effect [J]. Neurochemical Research, 2010,35(7): 1029 - 1037.
- [24] 赵军伟. 丹参酮 II A 及丹参酮 II A/丹酚酸 B 不同配比对大鼠脑缺血再灌注后 ICAM-1 及 MMP-9 的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [25] Chen T, Liu WB, Chao XD, et al. Salvianolic acid B attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in mice [J]. Brain Research Bulletin, 2011, 84 (2): 163-168.
- [26] 张义琴, 周波, 张国锋. 丹酚酸 B 对小鼠创伤性脑损伤的保护作用 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2014, 13 (1): 27-30.
- [27] Zeng G, Tang T, Wu HJ, et al. Salvianolic Acid B Protects SH-SY5Y Neuroblastoma Cells from 1-Methyl-4-phenylpyridinium-Induced Apoptosis [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2010,33(8):1337-1342.
- [28] Wang Y, Jiang YF, Huang QF, et al. Neuroprotective effects of salvianolic acid B against oxygen-glucose deprivation/reperfusion damage in primary rat cortical neurons[J]. Chinese Medical Journal (English Edition), 2010, 123 (24): 3612-3619.
- [29] Zhang Y, Akao T, Nakamura N, et al. Magnesium lithospermate B is excreted rapidly into rat bile mostly as methylated metabolites, which are potent antioxidants [J]. Drug metabolism and disposition, 2004, 32(7): 752-757.
- [30] 赵旭, 范英昌, 杜云. 丹酚酸 B 对局灶性脑缺血/再灌注大鼠血清超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量的影响[J]. 天津中医药, 2008, 25(1): 63-65.
- [31] 蔡青, 张伯礼, 黄淑芸, 等. 丹参酮 B 钠盐对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠海马神经递质含量的影响[J]. 天津中医药, 2010, 27(6): 486-489.
- [32] 石少明, 李泽慧, 田书林. 丹酚酸 B 对脑缺血再灌注损伤大鼠纹状体氨基酸类神经递质的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(8): 535-538.
- [33] Xiao GD, Hu WD, Chen XS. Magnesium Lithospermate B Protects Neurons from N-Methyl-d-Aspartic Acid Injury and Attenuates Kainic Acid-Induced Neurodegeneration in FVB Mice [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2013, 51 (2): 550-557.
- [34] Zhu HB, Zou LB, Tian JW, et al. SMND-309, a novel derivative of salvianolic acid B, protects rat brains ischemia and reperfusion injury by targeting the JAK2/STAT3 pathway[J]. European journal of pharmacology, 2013, 714 (1): 23-31.
- [35] 闫晨, 马德邻, 朱金墙. 脑缺血再灌注神经元损伤机制研究进展[J]. 天津中医药, 2012, 29(5): 510-512.
- [36] Zhou LM, Chow SM, Zuo Z. Effect of sodium caprate on the oral absorptions of danshensu and salvianolic acid B [J]. International journal of pharmaceutics, 2009, 379 (1): 109-118.
- [37] 王萍, 王洋, 李进, 等. 配伍对化痰通脉方中丹参在大鼠体内的药动学影响 [J]. 天津中医药, 2011, 28(3): 244-247.
- [38] Jing CJ, Chen XH, Liu X, et al. Determination of the binding rate of rat plasma protein with salvianolic acid B [J]. Acta pharmaceutica Sinica, 2010, 45(3): 343-346.

(收稿日期: 2014-08-28)

Protective effect of Salvianolic acid B on nerve cells after cerebral injury

MA Meng-meng, GUO Hong, ZHANG Han, WANG Qiao-yue, HU Li-min

(Tianjin Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin Laboratory of modern Chinese medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: In recent years, studies have shown that Salvianolic acid B play a protective role on damaged nerve cells. The mechanism includes promoting the stem cells proliferation and differentiation, maintaining intracellular calcium homeostasis and mitochondrial membrane potential, inhibiting inflammatory reaction, reducing free radicals, regulating expression of apoptosis-related genes and related neurotransmitter as well as regulating PI3K/Akt/GSK-3 β , AK2/STAT3 pathway and so on. With its further research, there is hope for the treatment of cerebral ischemia, neuropathy and other diseases.

Key words: Salvianolic acid B; brain damage; neuroprotective