doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.007

人参皂苷 Rb1 调节脑微血管 NOS/NO 改善脑细胞膜通透性 *

马 琪 张小玲 王春亚 郭 蕾 赵玉杰 侯彦丽 骆燕妮 王小闯△

（西安交通大学第二附属医院重症医学科 陕西 西安 710014）

摘要 目的：探究人参皂苷 Rb1 在脂多糖（LPS）诱导的人脑微血管细胞模型中对脑细胞膜通透性的影响。**方法**：采用噻唑蓝比色法（MTT）及乳酸脱氢酶（LDH）释放检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激人脑微血管内皮细胞系（HBMEC）存活率的影响；采用 EVOM 法检测 HBMEC 细胞通透性；采用 Griess 法、ELISA 法及 DAF-FM DA 荧光探针分别检测 NO、$ONOO^-$ 含量及 eNOS、iNOS 活性；Western blot 法检测 p-eNOS(ser1177)、iNOS 蛋白的表达水平。**结果**：与正常对照组比较，LPS（5 μg/mL）可明显降低 HBMEC 细胞存活率（*P<0.01*）；与 LPS 组比较，随着人参皂苷 Rb1 浓度的增加细胞存活率明显升高，且中、高剂量组（40、80 μmol/L）具有显著性差异（*P<0.05*、*P<0.01*）；LPS 导致 HBMEC 单层细胞电阻值明显降低（*P<0.01*），人参皂苷 Rb1 高剂量组（80 μmol/L）可显著抑制 LPS 所致的细胞膜通透性升高（*P<0.05*）；LPS 可明显降低 HBMEC 细胞 NO 含量（*P<0.01*）升高 $ONOO^-$ 含量（*P<0.05*），人参皂苷 Rb1 中、高剂量组（40、80 μmol/L）较 LPS 组具有显著升高 NO 含量，降低 $ONOO^-$ 含量的作用（*P<0.05*）；与正常对照组比较，LPS 组可明显降低 HBMEC 细胞磷酸化 eNOS (ser1177) 蛋白的表达水平，而显著升高 iNOS 蛋白表达水平（*P<0.01*）。人参皂苷 Rb1 高剂量组（80 μmol/L）较 LPS 组可显著升高 p-eNOS(ser1177)蛋白的表达水平，降低 iNOS 蛋白的表达水平（*P<0.05*）。**结论**：人参皂苷 Rb1 可有效降低 iNOS 活性，升高 eNOS 活性继而减少 NO 水平及 ONOO- 含量，显著降低 LPS 导致的脑细胞膜通透性升高。

关键词：人参皂苷 Rb1；人脑微血管内皮细胞；细胞膜通透性；NOS/NO

中图分类号：R-33; Q593.2; R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2019)08-1430-06

Ginsenoside Rb1 Regulates Brain Microvascular NOS/NO Improves Brain Cell Membrane Permeability *

MA Qi, ZHANG Xiao-ling, WANG Chun-ya, GUO Lei, ZHAO Yu-jie, HOU Yan-li, LUO Yan-ni, WANG Xiao-chuang△

(Department of Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiangtong University Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710014, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of ginsenoside Rb1 on brain cell membrane permeability in lipopolysaccharide (LPS) induced brain microvascular cell model. **Methods:** Methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) release assays were used to detect the survival rate of different concentrations of ginsenoside Rb1 on of human brain microvascular endothelial cell line (HBMEC) stimulated by LPS; The HBMEC cell permeability by epithelial voltmeter (EVOM) method; The content of nitric oxide (NO), peroxynitrite ($ONOO^-$) and the activity of eNOS, iNOS were detect respectively by Griess method, ELSA and fluorescence spectrophotometer DAF-FM DA. The expression of protein levels of phosphorylated endothelial nitricoxide synthase (p-eNOS Ser1177) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, LPS (5 μg/mL) could significantly reduce the survival rate of HBMEC cells (*P<0.01*), Compared with the LPS group, the cell survival rate increased significantly with the ginsenoside Rb1 concentration increased, and the medium and high dose groups (40, 80 μmol/L) had significant difference (*P<0.05, P<0.01*); LPS caused the transendothelial electrical resistance of HBMEC cells was significantly decreased (*P<0.01*), and ginsenoside Rb1 high dose group (80 μmol/L) could significantly decrease the cell membrane permeability induced by LPS (*P<0.05*). LPS could significantly reduce the content of NO (*P<0.01*) and increase the content of $ONOO^-$ (*P<0.05*) in HBMEC cells, the ginsenoside Rb1 medium and high dose group (40, 80 μmol/L) had significantly increased NO content and decreased $ONOO^-$ content compared with LPS group (*P<0.05*). Compared with the control group, LPS group significantly decreased the expression of phosphorylated eNOS (ser1177) protein in HBMEC cells, and significantly increased the level of iNOS protein expression (*P<0.01*). Ginsenoside Rb1 high dose group (80 μmol/L) can significantly increase the expression level of p-eNOS (ser1177) protein and reduce the expression level of iNOS protein compared with LPS group (*P<0.05*). **Conclusion:** Ginsenoside Rb1 could effectively reduce the activity of iNOS, and increase the activity of eNOS, reduced the content of NO and $ONOO^-$. It significantly

* 基金项目：西安交通大学第二附属医院科研基金项目（YJ(QN)201709）；国家自然科学基金项目（81670049）

作者简介：马琪（1983-），硕士，主要研究方向：脑保护，电话：18706888323，E-mail: mamaqi521@163.com

△ 通讯作者：王小闯，E-mail: 1585431074@qq.com

（收稿日期：2018-07-30 接受日期：2018-08-23）

improved the permeability of the brain cell membrane caused by LPS.

Key words: Ginsenoside Rb1; Human brain microvascular endothelial cells; Permeability of cell membranes; NOS/NO

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R285.5 **Document code: A**

Article ID: 1673-6273(2019)08-1430-06

前言

脓毒症脑病(septic encephalopathy,SE) 又称脓毒症相关性脑病(sepsis associatedencephalopathy,SAE) 是指缺乏中枢神经系统感染的临床或实验室证据,由感染引起系统性反应导致的弥漫性脑功能障碍[1,2]。SAE 是重症监护病房最常见的脑病之一,脑血管功能障碍是导致脓毒症脑病的关键诱因[3,4]。脓毒症时机体产生大量细胞因子,而内毒素和细胞因子可刺激脑微血管产生过量 NO，过多 NO 可降低细胞色素 C 与氧亲和力,从而抑制线粒体呼吸链功能,NO 与过氧化物结合形成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$),而后者可影响糖酵解酶和呼吸酶的功能,干扰脑细胞能量代谢[5-7]。近期的研究发现过量的 NO 及过氧亚硝基阴离子是导致血脑屏障损伤的关键因素,可以导致血微血管内皮细胞通透性增加,降低紧密联系蛋白表达,并激活基质金属蛋白酶(MMPs)家族,进一步促进紧密连接蛋白降解的发生。而 NO 是维持血管功能的重要调节因子,适量的 NO 在维持血管舒张等功能中具有重要作用。内皮细胞中内皮依赖性一氧化碳合酶(eNOS)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是生成 NO 的关键调节蛋白,而诱导型一氧化氮合酶主要由外界刺激或炎症因子等刺激激活,且其激活 NO 的能力是 eNOS 的 1000 倍[8-12]。因此调节脑血管内皮细胞适量 NO 是保持细胞正常功能,维持血脑屏障完整性的关键。人参皂苷 Rb1 是人参的有效成分之一,是人参二醇型的代表性成分。已有研究表明人参皂苷 Rb1 对中枢神经系统疾病有保护作用,可以降低大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及脑组织和血清 IL-1β 含量,联合亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有显著保护作用[13-15]。但其在 LPS 诱导的脑微血管内皮细胞损伤中的保护作用未见报道,其对血脑屏障的保护作用也有待研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑微血管内皮细胞系（HBMEC）购自中国科学院细胞库;脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司;人参皂苷 Rb1 购于中国药品生物制品鉴定所;0.25%胰蛋白酶购自凯基生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;四氮唑蓝(MTT)细胞增殖检测试剂盒,乳酸脱氢酶（LDH）检测试剂盒,NO 检测试剂盒及 NOS 活性检测试剂盒均购自碧云天生物技术公司;eNOS,磷酸化 eNOS (Ser1177, Thr495)及 GAPDH 一抗购自于 Cell Signaling Technology 公司;ECL 化学发光试剂盒,Transwell 小室购自于美国 Millipore 公司。

1.2 仪器

倒置成像显微镜(OLYMPUS IX53);二氧化碳培养箱（上海力申 Heal Force HF90）；台式冷冻离心机（基因有限公司 GENSPEED 1730R）；荧光酶标仪（Infinite M200 Pro, 瑞士 Tecan 公司）；细胞电阻仪（Millicell® ERS-2，美国 Merck-Millipore 公司）；电泳槽（Mini-PROTEAN® Tetra System，美国 BIO-RAD 公司；转印系统（Trans-Blot® Turbo System,美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 HBMEC 细胞培养及实验分组 HBMEC 细胞采用含 1%青链霉素,10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃ 5%CO_2 培养箱中常规培养,正常传代培养后,显微镜下观察细胞长到 80%开始进行实验。实验分为 5 组:空白对照组(仅加入培养基),LPS 组(5 μg/mL),人参皂苷 Rb1(20、40、80 μmol/L)+LPS 组（即 20、40、80 μmol/L 的人参皂苷 Rb1 处理 12 h 后再加入 LPS 5 μg/mL),模型均处理 12 h。

1.3.2 MTT 及 LDH 检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞存活率的影响 取对数期生长的 HBMEC 细胞以 5× 10^4 cells/mL 密度接种于 96 孔板中,24 h 贴壁后,弃去原培养基,正常对照组仅加入培养基,空白对照孔(只加培养基,无细胞)各组分别加入不同浓度的人参皂苷 Rb1,培养 12 h,后加入 LPS 组,每组设 6 个重复孔。继续培养 12 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL,放置孵箱内培养 4 h 后弃上清,加人二甲基亚砜(DMSO)200 μL,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪 490 nm 波长处测定每孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。每组实验重复 3 次。细胞存活率(%)=(人参皂苷 Rb1 各浓度组 A 值 - 空白对照组 A 值)/ (正常对照组 A 值 - 空白对照组 A 值)× 100%。

各组药品刺激完毕后,尽量吸除上清,加入 150 μL 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的 LDH 释放试剂,适当摇晃混匀,然后继续孵育 1 h。随后将细胞培养板采用多孔板离心机 400 g,离心 5 min。分别取各孔上清液 120 μL,加入新的 96 孔板进行于 490 nm 波长测定吸光度值。

1.3.3 EVOM 法检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激单层 HBMEC 细胞通透性的影响 Millicell® ERS-2 电阻仪的两片电极垂直置于上下室,浸没于培养液液面以下,测出每个小室的基础电阻值,此为空白电阻。将 HBMEC 细胞按 1× 10^5cells/mL 密度接种在 Transwell 的小室多聚碳酸酯膜上,加入 RIPM1640 完全培养基 300 μL,置入 24 孔板,底层小室每孔加入培养液 1 mL,置于恒温孵箱中培养 24 h 形成细胞单层。在上室中分别加入低、中、高剂量组人参皂苷 Rb1 孵育 12 h 后,分别加入 1 μg/mL LPS 作用 12 h,对照组加入同样体积的 PBS。用同样的方法测量各小室的电阻值,将测得电阻值减去空白电阻值后除以小室的底面积,即为单层细胞电阻值(单位:Ω/cm^2)其反映细胞相对通透性。

1.3.4 Griess 法及 ELISA 法检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 NO 和 $ONOO^-$ 的影响 取对数期生长的 HBMEC 细胞以 5× 10^5 cells/mL 密度接种于 6 孔板中,各组分别加入不同浓度的人参皂苷 Rb1 预处理 12 h,再加入 5 μg/mL LPS 处理 12 h, 正常对照组仅加入培养基,空白对照孔(只加培

养基,无细胞)。按照试剂盒说明书中顺序将各组待检测样品,将混合后的样品加入各 10 μL 的 LDH 及 LDH buffer,37℃孵育 30 min,后加入 Griess Reagent Ⅰ和 Griess Reagent Ⅱ试剂各 50 μL,混匀后室温孵育 10 min,于 540 nm 处检测吸光度。

将 $ONOO^-$ 试剂盒在室温平衡 20 min 后,取出板条,设置标准品孔和样本孔,用 PBS 对细胞进行两次洗涤,在 37℃下孵育 1 h,用 0.005 mol/L DHR 123 检测 $ONOO^-$。细胞用 PBS 洗涤两次,用分光光度计测量荧光强度, DHR 123 的激发波长和发射波长分别为 480 nm 和 530 nm。荧光强度的变化表示为对照组中获得的值的百分比(取为 100%)。

1.3.5 **不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 eNOS 和 iNOS 活性的影响** 取对数期生长的 HBMEC 细胞以 5×10^4 cells/mL 密度接种于 96 孔板中,各组分别加入不同浓度的人参皂苷 Rb1 预处理 12 h,再加入 5 μg/mL LPS 处理 12 h。吸弃各组培养基,加入 100 μL NOS 缓冲液,再加入 100 μL 检测反应液(每个反应包括:NOS 缓冲液 50 μL, 超纯水 39.8 μL,精氨酸 5 μL,0.1 mol/L NADPH 5 μL,DAF-FM DA 探针 0.2 μL),轻轻混匀,37℃孵育 40 min。于激发波长 495 nm, 发射波长 515 nm 检测荧光强度值,为总 NOS 活性。其中 iNOS 活性属于 Ca^{2+} 不依赖型, 采用无钙培养基并加入 1 mmol/L EGTA 进行除去多余 Ca^{2+}, 检测方法同 NOS 活性检测方法,eNOS 活性=NOS 活性－iNOS 活性。

1.3.6 **Western Blot 检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 p-eNOS(ser1177)和及 iNOS 蛋白表达** 按 5×10^5 cells/mL 密度接种于 6 孔板中,将处于对数生长期的细胞换用无血清的 DMEM 培养基同步化处理 6 h,分别加入高中低不同浓度组人参皂苷 Rb1,培养 12 h 后,再加入 5 μg/mL LPS 处理 12 h,取出培养板弃去上清。将培养板至于冰上,用预冷的 PBS 轻洗 3 次,按每孔加入 150 μL 蛋白酶抑制剂混合物,于冰上充分裂解 30 min,反复吹打使细胞充分裂解,4℃、12000 × g 离心 20 min,取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量。按 25 μg 总蛋白进行免疫印迹实验,采用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,采用半干转将胶中电泳产物转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加 eNOS、p-eNOS(ser1177)、iNOS、GAPDH 一抗(1:1000),4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,分别加入相应的二抗(1:3000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光试剂显色,采用 BIO-RAD ChemiDocTM XRS+ 凝胶成像仪采集图像, 采用 Quantity One® (Analysis Software Version4.6.2, Bio-Rad inc, USA)进行灰度值分析。

1.4 **数据统计**

所有数据统计均采用 SPSS 15. 0 软件处理, 数据以已 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One Way ANOVA,LSD)评价多组间差异性,各组间的显著性以 *P<0.05* 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 **不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞存活率的影响**

结果显示, 与正常对照组比较,LPS 组明显降低 HBMEC 细胞存活率(*P<0.01*),与 LPS 组比较,随着人参皂苷 Rb1 浓度的增加,细胞存活率显著增加,且人参皂苷 Rb1 中、高剂量组存活率分别为 72.9%和 93.5%, 较 LPS 组具有显著性差异 (*P<0.05*、*P<0.01*)。LDH 结果显示,与正常对照组比较,LPS 组 LDH 释放量显著增加(*P<0.01*),与 LPS 组比较,随着人参皂苷 Rb1 浓度的增加,LDH 释放含量明显降低,且人参皂苷 Rb1 高剂量组 LDH 释放含量为 270.2 U/L,较 LPS 组具有显著性差异(*P<0.05*)。结果说明人参皂苷 Rb1 能浓度依赖性的保护 LPS 诱导的 HBMEC 的损伤。结果见表 1。

表 1 人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 1 Effect of ginsenoside Rb1 on the survival rate of LPS-stimulated HBMEC cells($\bar{x}\pm s$,n=3)

Groups		Dose	HBMEC Surival rate (%)	LDH content (U/L)
Control group		—	100.0± 5.1	180.7± 15.3
LPS group		5 μg/mL	48.9± 4.1**	379.1± 24.6**
Ginsenoside Rb1	Low group	20 μmol/L	57.3± 3.9	352.3± 19.5
	Middle group	40 μmol/L	72.9± 4.8#	310.8± 18.7
	High group	80 μmol/L	93.5± 6.2##	270.2± 15.2#

注:与正常对照组比较,**P<0.01**;与 LPS 组比较,#P<0.05;##P<0.01。**

Note: compared with the control group ***P<0.01*; compared with the model group #*P<0.05*, ##*P<0.01*.

2.2 **不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激单层 HBMEC 细胞通透性的影响**

结果显示,LPS 组较正常对照组单层细胞电阻明显降低,细胞通透性增加(*P<0.01*),人参皂苷 Rb1 组较 LPS 组单层细胞电阻明显上升,细胞通透性降低,且人参皂苷 Rb1 高剂量组较 LPS 组具有显著型差异(*P<0.05*)。结果说明人参皂苷 Rb1 能够明显改善 LPS 导致的 HBMEC 细胞通透性增高。结果见表 2。

2.3 **不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 NO 及 $ONOO^-$ 含量的影响**

结果显示, 与正常对照组比较,LPS 组 NO 含量显著降低(*P<0.01*),$ONOO^-$ 含量显著升高(*P<0.05*),人参皂苷 Rb1 组较 LPS 组剂量依赖性的升高 NO,降低 $ONOO^-$ 含量,且人参皂苷 Rb1 中、高剂量组较 LPS 组具有显著性升高 NO 及降低 $ONOO^-$ 含量的作用(*P<0.05*)。结果说明人参皂苷 Rb1 能剂量依赖性的改善 LPS 导致的 HBMEC 细胞 NO 含量升高及降低 $ONOO^-$ 含量。结果见表 3。

表 2 人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激单层 HBMEC 细胞通透性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2 Effects of ginsenoside Rb1 on permeability of LPS stimulated monolayer HBMEC cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Groups		Dose	HBMEC monolayer cell resistance (Ω /cm²)
Control group		-	25.37± 1.51
LPS group		5 μg/mL	9.16± 1.25**
Ginsenoside Rb1	Low group	20 μmol/L	11.39± 1.36
	Middle group	40 μmol/L	12.54± 1.87
	High group	80 μmol/L	21.72± 1.74#

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与 LPS 组比较，#$P<0.05$。

Note: compared with the control group **$P<0.01$; compared with the LPS group #$P<0.05$.

表 3 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 NO 和 $ONOO^-$ 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3 Effects of different concentrations of ginsenoside Rb1 on NO and $ONOO^-$ contents stimulated by LPS in HBMEC cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Groups		Dose	NO contents (μmol/L)	$ONOO^-$ contents (relative fluorescence intensity)
Control group		-	85.33± 8.37	1.04± 0.09
LPS group		5 μg/mL	51.68± 6.44**	3.52± 0.45*
Ginsenoside Rb1	Low group	20 μmol/L	60.16± 7.38	2.85± 0.31
	Middle group	40 μmol/L	73.11± 1.26#	1.83± 0.28#
	High group	80 μmol/L	80.49± 1.63#	1.31± 0.19#

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与 LPS 组比较，#$P<0.05$。

Note: compared with the control group **$P<0.01$; compared with the LPS group #$P<0.05$.

2.4 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 eNOS 和 iNOS 活性的影响

机体中 eNOS 和 iNOS 是参与调控 NO 和 $ONOO^-$ 的关键蛋白酶，其活性高低直接反应其催化能力。结果显示，与正常对照组比较，LPS 组可显著增加 iNOS 活性，降低 eNOS 活性（$P<0.05$），人参皂苷 Rb1 组较 LPS 组具有剂量依赖性的升高 eNOS 活性，并降低 iNOS 活性。人参皂苷 Rb1 中、高剂量较 LPS 组显著升高 eNOS 活性（$P<0.05$），人参皂苷 Rb1 高剂量组较 LPS 组显著降低 iNOS 活性（$P<0.05$）。结果说明人参皂苷 Rb1 能明显降低 LPS 导致的 HBMEC 细胞 iNOS 活性的增加且升高 eNOS 活性。结果见表 4。

表 4 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 eNOS 和 iNOS 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4 Effects of different concentrations of ginsenoside Rb1 on eNOS and iNOS activity stimulated by LPS in HBMEC cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Groups		Dose	eNOS activity (relative fluorescence intensity)	iNOS activity (relative fluorescence intensity)
Control group		-	1.03± 0.11	1.02± 0.09
LPS group		5 μg/mL	0.56± 0.08*	1.61± 0.15*
Ginsenoside Rb1	Low group	20 μmol/L	0.63± 0.10	1.56± 0.11
	Middle group	40 μmol/L	0.77± 0.09#	1.43± 0.12#
	High group	80 μmol/L	0.91± 0.08#	1.25± 0.09#

注：与正常对照组比较，*$P<0.05$；与 LPS 组比较，#$P<0.05$。

Note: compared with the control group *$P<0.05$; compared with the LPS group #$P<0.05$.

2.5 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 LPS 刺激 HBMEC 细胞 p-eNOS (ser1177)及 iNOS 蛋白的影响

结果表明，与正常对照组比较，LPS 处理组可明显降低 HBMEC 细胞 p-eNOS(ser1177)蛋白的表达水平，而显著升高 iNOS 蛋白表达水平（$P<0.01$）。人参皂苷 Rb1 组较 LPS 组具有剂量依赖性的升高 p-eNOS(ser1177)蛋白表达水平，降低 iNOS 蛋白的表达水平。人参皂苷 Rb1 高剂量组（80 μmol/L）较 LPS 组可显著升高 p-eNOS(ser1177)蛋白的表达水平，降低 iNOS 蛋白的表达水平（$P<0.05$）。具体结果见图 1，表 5。

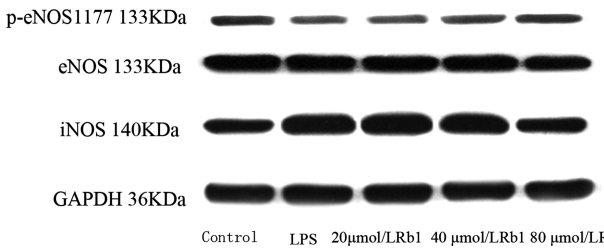

图 1 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 p-eNOS(ser1177)、iNOS 蛋白表达的影响

Fig.1 Expression of p-eNOS (ser1177) and iNOS protein on different concentrations of ginsenoside Rb1

表 5 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 p-eNOS(ser1177)、iNOS 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 5 Expression of p-eNOS (ser1177) and iNOS protein on different concentrations of ginsenoside Rb1($\bar{x}\pm s$,n=3)

Groups		Dose	p-eNOS(ser1177)/eNOS relative expression	iNOS relative expression
Control group		-	1.04± 0.07	1.00± 0.08
LPS group		5 μg/mL	0.43± 0.03**	2.41± 0.12**
Ginsenoside Rb1	Low group	20 μmol/L	0.49± 0.05	2.21± 0.10
	Middle group	40 μmol/L	0.55± 0.04	2.03± 0.13
	High group	80 μmol/L	0.83± 0.06#	1.43± 0.11#

注:与正常对照组比较,**$P<0.01$;与 LPS 组比较,#$P<0.05$。

Note: compared with the control group **$P<0.01$; compared with the LPS group #$P<0.05$.

3 讨论

脓毒症性脑病是重症监护病房中患者发病率增高及死亡率增加的重要原因之一,早期研究认为脑部细菌感染是导致该疾病发生的主要原因,而近期的研究发现即使脓毒症患者的中枢神经系统和血液中无细菌入侵,仍可发生脑功能障碍,而导致及发生的原因是感染引起机体产生全身炎症反应继而作用于大脑,导致脑部炎性反应、微循环、血脑屏障异常等诸多因素的合并影响,继而引起脓毒症性脑病的发生[16-18]。其中,血脑屏障功能障碍是导致脓毒症性脑病发生发展的重要因素之一。

血脑屏障由脑微血管内皮细胞及其间形成的紧密连接、血管基膜和星形胶质细胞的足突构成。因此内皮细胞在脓毒症脑病中发挥重要作用。脑血管内皮细胞间的紧密连接可以选择性阻止血液中大多数化合物进入脑组织。而当脓毒症发生时内毒素和炎性细胞因子使内皮细胞选择素,血管细胞黏附分子和细胞间黏附分子 1 的表达增加,在炎性介质的作用下内皮细胞激活,导致使血管张力改变,并导致微循环和凝血功能障碍,这将引起缺血性或出血性损伤,血管内皮的紧密连接损伤导致血脑通透性增加,促进大量炎症物质进行,继而加重血管损伤,形成恶性循环,加重脓毒症脑病的发生,而脓毒症引起血管内皮屏障通透性增加的最主要病因是 G^- 菌释放的内毒素 (LPS)[19-24]。脂多糖(LPS)诱导的脑微血管细胞模型是研究内毒素导致的细胞损伤及脑血管内皮细胞屏障通透性的经典模型,LPS 可以导致脑血管内皮细胞损伤,升高细胞 LDH 水平,同时导致内皮细胞屏障功能损伤,通透性升高,促进细胞间紧密连接蛋白表达的降低,并升高基质金属蛋白酶 -2/9(MMP-2/9)。而 MMP-2/9 参与紧密连接蛋白的降解, 从而促进细胞间紧密连接蛋白降解,导致通透性升高,影响血脑屏障功能。本研究发现人参皂苷 Rb1 可以明显降低 LPS 导致的脑微血管细胞活力降低,减少模型细胞 LDH 水平,并降低模型细胞通透性,说明人参皂苷 Rb1 具有一定的血脑屏障保护作用。

NO 是机体内源性调控因子,在维持血管功能中具有重要作用,NO 是内源性血管舒张因子,并可通过抗凝血、抗氧化、抗炎以及抑制平滑肌细胞增生等具有很强的抗动脉粥样硬化的作用,但是过量的 NO 可以在机体中氧化为 $ONOO^-$,导致氧化应激反应发生,促进炎症因子释放,继而导致细胞凋亡发生等。研究表明过量的 $ONOO^-$ 可以导致脑微血管通透性增加, 激活 MMP 家族,促进紧密连接蛋白降解的发生,导致血脑屏障功能障碍的发生。而 eNOS,iNOS 是机体调控 NO 的关键位点,eNOS/NO 在机体中具有重要作用,eNOS 的活化, 可以促进适量 NO 的产生,而适量 NO 可以抑制血小板聚集、抑制单核细胞粘附于内皮细胞、抑制平滑肌细胞增殖等作用,改善血管功能,可以改善脓毒症导致的血管张力改变,恢复微循环和抑制凝血功能障碍等,主要发挥 NO 的正性调控作用,而 iNOS 在炎症因子及内毒素等刺激下,激活导致 NO 大量产生,iNOS 促进 NO 升高的能力是 eNOS 的 1000 倍,病理状态下,机体的炎症因子等激活 iNOS 导致过量 NO,NO 在机体氧化应激反应下转变为 $ONOO^-$,而 $ONOO^-$ 是 NO 发挥其负性调控作用的主要原因[25-28]。$ONOO^-$ 是较 NO 及 O_2^- 氧化作用更强,作用更广的氧化剂。它生成后,可在生成的局部、在胞浆及弥散到邻近的细胞起反应。$ONOO^-$ 可使酶氧化失活,如:使酪氨酸、色氨酸、鸟氨酸等硝基化或羟化,或作用于巯基使其氧化损伤,导致 SOD、酪氨酸羟化酶、磷酸甘油醛脱氢酶、线粒体呼吸链酶被抑制;其次,其可导致脂质过氧化,导致细胞膜的功能障碍和结构损伤与核酸作用引起 DNA 裂解,作用于线粒体使能量生成障碍等,在脑血管细胞中,可诱导脑血管平滑肌凋亡发生,同时刺激肌细胞 cGMP 产生,激活钾离子通道激活。近期的研究发现通过减少 $ONOO^-$, 可以抑制由于微囊蛋白 -1 (caveolin-1) 导致的 MMP 激活,从而减少其对细胞紧密连接蛋白的降解,发挥保护血脑屏障的作用; 此外也有研究表明 $ONOO^-$ 可直接导致 MMP-9 的激活,继而影响血脑屏障功能[29-33]。

本研究发现人参皂苷 Rb1 可以明显降低 LPS 诱导的脑微血管细胞 NO 及 $ONOO^-$ 水平, 同时激活 eNOS 并抑制 iNOS,发挥其保护作用。NO 的来源是通过一氧化碳合酶(NOS)而血管中主要为 eNOS 及 iNOS,eNOS 促进少量 NO 发挥正性调控作用,改善血管功能,发挥保护作用,其作用机制主要可通过 PI3K/Akt 途径,通过磷酸化 Akt,继而磷酸化 eNOS 的 1177 位点, 促进 eNOS 活化, 提高其活性, 此外 PKC 途径同样参与 eNOS 的活化,PKC 途径可激活 eNOS 非活性位点,抑制 eNOS 的活化,因此本研究发现人参皂苷 Rb1 可激活 eNOS,但其作用机制尚待进一步研究,有研究表明人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI3K/Akt 途径改善大鼠急性心肌缺血损伤的发生, 此外其可以通过 Akt 途径促进大脑海马神经元的增殖,但其在脑微血管细胞中的作用还有待进一步验证。iNOS 通过炎症因子等激活,而 eNOS 的激活,少量的 NO 发挥其正性调控机制,可以在机体中发生保护作用,减少炎症反应,抑制细胞凋亡发生等,一

定程度上抑制 iNOS 的激活，而人参皂苷 Rb1 可以抑制 iNOS 的活性，其作用机制是直接抑制其表达，还是通过激活 eNOS 发挥的间接保护作用。还有待研究。本研究对于诠释人参皂苷 Rb1 在脓毒症脑病种的保护作用提供了新的方向。此外 eNOS 的激活作用的机制较为复杂，人参皂苷 Rb1 如何激活 eNOS 发挥其保护作用，及其抑制 iNOS 的作用是否与激活 eNOS 相关还有待进一步探讨。

参 考 文 献(References)

[1] 谢志超, 廖雪莲, 康焰. 脓毒症相关性脑病的诊疗与研究新进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(6): 609-613

[2] Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis associated encephalopathy [J]. Adv Med, 2014 (2014): 762320

[3] Zhang LN, Ai YH, Gong H, et al. Expression and role of neuroglobin in rats with sepsis-associated encephalopathy[J]. Crit Care Med, 2014, 42(1): e12-21

[4] Sharshar T, Mazeraud A, Verdonk F, et al. Brain perfusion in sepsis or to resolve the macro part of micro [J]. Crit Care Med, 2014, 42(2): 485-486

[5] Salzman AL. Endotoxic nitrosopenia[J]. Intensive Care Med, 1988, 24 (12): 1239-1241

[6] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium-Gatekeeper of vessel health[J]. Atherosclerosis, 2016, 248: 97-109

[7] Chi Q, Wang T, Huang K. Effect of insulin nitration by peroxynitrite on its biological activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 330(3): 791-796

[8] Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, et al. The endothelium in sepsis [J]. Shock, 2016, 45(3): 259-270

[9] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets[J]. Pharmacol Ther, 2013, 140(3): 239-257

[10] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 315-424

[11] Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction[J]. Current Hypertension Reports, 2003, 5(6): 473-480

[12] 张艺森, 徐晓涵, 孙炳伟. 脓毒症时血管内皮细胞与血管平滑肌细胞相互作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(2): 180-182

[13] 郭海雷, 卢才教, 刘政军, 等. 脓毒症大鼠早期血管内皮和心肌损害及其相关性研究[J]. 中国现代医生, 2018, 56(10): 37-41

[14] 刘俊伟, 任冶龙, 刘旭玲, 等. 人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及脑组织和血清 IL-1β 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1696-1699

[15] 何海娟, 杨燕青, 俞玉龙, 等. 人参皂苷 Rb1 对脑缺血 / 再灌注损伤大鼠脑血流量的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (5): 461-463

[16] Wilson JX, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy: Evolving concepts[J]. Can J Neurol Sci, 2003, 30(2): 98-105

[17] Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy [J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3): 283-287

[18] Davies DC. Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours[J]. J Anat, 2002, 200(6): 639-646

[19] Wang JY, Yang JM, Tao PL, et al. Synergistic apoptosis induced by bacterial endotoxin lipopolysaccharide and high glucose in rat microglia[J]. Neurosci Lett, 2001, 304(3): 177-180

[20] Sharshar T, Gray F, Lorindela Grandmaison G, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock [J]. Lancet, 2003, 362(9398): 1799-1805

[21] Erbas O, Taskiran D. Sepsis-induced changes in behavioral stereotypy in rats; involvement of tumor necrosis factor-alpha, oxidative stress, and dopamine turnover[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 262-268

[22] Ji MH, Qiu LL, Tang H, et al. Sepsis-induced selective parvalbumin interneuron phenotype loss and cognitive impairments may be mediated by NADPH oxidase 2 cativation in mice [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 182

[23] Wafa K, Lehmann C, Wagner L, et al. Desmopressin improves intestinal functional capillary density and decreases leukocyte activation in experimental endotoxemia[J]. Microvasc Res, 2015, 97: 98-104

[24] Amaral FA, Fagundes CT, Miranda AS, et al. Endogenous Acetylcholine Controls the Severity of Polymicrobial Sepsisassociated Inflammatory Response in Mice[J]. Curr Neurovasc Res, 2016, 13(1): 4-9

[25] Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls [J]. Cell, 1994, 78(6): 915-918

[26] Xiao H, Li Y, Qi J, et al. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats[J]. J Nephrol, 2009, 22(6): 800-808

[27] El Assar M, Angulo J, Vallejo S, et al. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dyscular dysfunction [J]. Front Physiol, 2012, 132(3): 1-13

[28] Wang X, Liu K, Li B, et al. Macrophages Aggravate Hypoxia-Induced Cardiac Microvascular Endothelial Cell Injury via Peroxynitrite: Protection by Tongxinluo [J]. Cell Commun Adhes, 2015, 22(2-6): 39-47

[29] Maiti AK, Saha NC, More SS, et al. Neuroprotective Efficacy of Mitochondrial Antioxidant MitoQ in Suppressing Peroxynitrite-Mediated Mitochondrial Dysfunction Inflicted by Lead Toxicity in the Rat Brain[J]. Neurotox Res, 2017, 31(3): 358-372

[30] Khan M, Dhammu TS, Matsuda, et al. FTargeting the nNOS/ peroxynitrite/calpain system to confer neuroprotection and aid functional recovery in a mouse model of TBI [J]. Brain Res, 1630: 159-170

[31] Zhou C, Ramaswamy SS, Johnson DE, et al. Novel Roles for Peroxynitrite in Angiotensin II and CaMKII Signaling [J]. Sci Rep, 2016, 15: 23416

[32] Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant [J]. J Biol Chem, 2013, 288(37): 26464-26472

[33] Chen HS, Chen X, Li WT, et al. Targeting RNS/caveolin-1/MMP signaling cascades to protect against cerebral ischemia-reperfusion injuries: potential application for drug discovery [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5): 669-682