

去葡萄糖竹节参皂苷 IV a 对缺氧复氧心肌细胞损伤的保护作用

孙桂波, 徐惠波, 温富春, 张 伟, 丁 涛, 孙晓波*
(吉林省中医中药研究院新药中心, 吉林 长春 130021)

摘要: **目的** 研究去葡萄糖竹节参皂苷 IV a (DCIV a) 是否为龙牙楸木总皂苷抗心肌缺血的有效成分之一。**方法** 取体外培养的新生大鼠心肌细胞建立缺氧 6 h 复氧 3 h 心肌细胞损伤模型, 并于缺氧及复氧开始时分别加入终浓度为 2.5, 1.0 和 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCIV a。检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)漏出量, 丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性。MTT 法检测心肌细胞存活率。**结果** DCIV a(2.5, 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)显著减少缺氧及复氧后 LDH 和 CK 漏出量, 降低 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 提高心肌细胞存活率。**结论** DCIV a 为龙牙楸木总皂苷抗心肌缺血的有效成分之一, 可减轻缺氧复氧对心肌细胞的损伤, 对心肌细胞具有直接的保护作用。

关键词: 皂苷, 龙牙楸木; 去葡萄糖竹节参皂苷 IV a; 心肌; 细胞, 培养的; 细胞低氧; 超氧化物歧化酶; 乳酸脱氢酶; 肌酸激酶

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)06-0424-04

去葡萄糖竹节参皂苷 IV a (degucose-chikusetsu saponin IV a, DCIV a), 即 3-O-[β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-齐墩果酸苷, 是从龙牙楸木 [*Aralia elata* (Miq.) Seem.] 中分离得到的一种单体皂苷类物质, 龙牙楸木系五加科楸木属植物, 其性味辛苦, 有小毒, 药用部位主要是根皮、树皮及叶, 具有补气安神、活血化瘀、利尿消肿、除湿止痛之功效。其化学成分以皂苷

类为主, 总皂苷具有抗变态反应、保肝、降血脂、耐缺氧等多种药理活性^[1]。目前国内外尚无有关 DCIV a 在心血管药理活性方面研究的报道。本实验采用原代培养的大鼠心室肌细胞, 利用缺氧再给氧环境模拟心肌细胞缺血再灌注损伤, 探讨 DCIV a 对缺氧复氧心肌细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物、药品与试剂

新生 1~4 d 的 Wistar 大鼠 30 只, 雌雄不拘, 购于长春高新医学动物实验研究中心, 合格证号: 10-5112。

DCIV a 由吉林省中医中药研究院新药中心化学室提供, 纯度 98.7%, 批号 20021108。制备方法: 称取楸木总皂苷 10 g 溶于 1500 mL 水中, 再加入 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液 1500 mL, 混匀, 于 100℃ 下加热 3 h 后, 常温静置 12 h, 滤取沉淀。沉淀加 1% 氢氧化钠水溶液 1000 mL 溶解, 通过大孔吸附树脂柱, 先用去离子水洗至中性, 再用 30% 乙醇洗至无色, 弃去洗脱液, 继用 60%~80% 乙醇洗脱。收集洗脱液, 减压回收乙醇, 得白色粉末 1100 mg, 收率 11%。熔点 236~238℃, 红外 (KBr) cm^{-1} : 3390 (-OH), 2940, 1682 (-COOH), 质谱 (FAB-MS) 给出的分子量 ($M + \text{Na}$) 峰为 655, 碳核磁共振谱数据与 3-O-[β -D-吡喃葡萄糖醛酸]-齐墩果酸苷基本一致。控制各批药物质量的主要指标按该药物含量不低于 98% 为标准。DMEM/F12 (Gibco 公司); 胰蛋白酶 (Difco 公司); L-谷氨酰胺、噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司); 青霉素、链霉素 (华北制药股份有限公司); 胎牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所); 磷酸缓冲液 (PBS 液)、Hanks 液由国产分析纯试剂配制。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

来稿日期: 2005-03-11 接受日期: 2005-10-26

基金项目: 国家中医药管理局课题 (2000-J-P-23)

作者简介: 孙桂波 (1973-), 女, 现为华南师范大学生命科学学院博士后, 医学博士, 研究方向为中药药理学; 孙晓波 (1959-), 男, 医学博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药理学。

* 联系作者 E-mail: Sun-Xiaobo@163.com Tel: (0431) 6816859

1.2 心肌细胞的分离与培养

按文献^[2]方法并略加改进。新生乳大鼠无菌条件下取心室肌,放入 PBS 液中清洗 2~3 次,放入无血清的 DMEM/F12 培养液中,剪成 1~1.5 mm³ 的碎块,移入离心管中,50 × g 离心 3 min,弃上清,加入 0.08% 的胰酶置于 37℃ 水浴中,分 6~7 次消化,每次消化 10 min。第 1 次弃上清,从第 2 次起收集心肌细胞,并过 200 目筛,80 × g 离心后加入含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液制成细胞悬液,在 CO₂ 培养箱中培养 2 h,以差速分离法去除已贴壁的成纤维细胞,取上清液计数并稀释细胞密度为 5 × 10⁸ L⁻¹。接种于 24 孔板,每孔 1 mL,于 37℃ 在 CO₂ 培养箱中静置贴壁培养。每 24 h 更换 1 次培养液,72 h 后选生长状态良好的心肌细胞进行实验。

1.3 缺氧复氧及给药处理

参照文献^[3]方法进行实验处理。实验分 5 组,每组 12 孔。空白对照组:加入有糖 Hanks 液 2 mL,CO₂ 培养箱培养 6 h 后换液 1 次,再培养 3 h;模型组:以氮饱和(含 N₂ 99.9%)的无糖 Hanks 液冲洗 2 次,换氮饱和的无糖 Hanks 液 2 mL,置持续通以 95% N₂-5% CO₂ 混合气的厌氧培养箱中 37℃ 培养 6 h。再换入有糖 Hanks 液 2 mL,置持续通以 95% O₂-5% CO₂ 混合气的 CO₂ 培养箱中,37℃ 培养 3 h;给药组:缺氧开始及复氧开始时分别加入终浓度为 2.5, 1.0 和 0.1 mg·L⁻¹ 的 DCⅣa,其余过程同模型组。

1.4 培养液中 LDH 和 CK 漏出量,MDA 含量及 SOD 活性测定

分别取缺氧 6 h 及复氧 3 h 时细胞培养液,紫外

分光光度法测定 LDH 含量;N-乙酰半胱氨酸法测定 CK 含量;硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。SOD 活性表示为试剂盒对照管与样品管间亚硝酸盐量的差值(Δ)。亚硝酸盐量根据亚硝酸盐标准品的标准曲线($Y = a + bX$)计算得出, Y 代表吸光度值, X 代表亚硝酸盐浓度(μmol·L⁻¹)。本实验中 $Y = 0.05601X - 0.00065$ 。

1.5 MTT 法测定心肌细胞存活率

取实验处理后的心肌细胞,吸弃培养液,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 200 μL,37℃ 孵育 4 h,弃培养液,加入 600 μL 二甲亚砷震荡至形成的结晶完全溶解,用酶标仪比色,检测 570 nm 处的吸光度($A_{570\text{ nm}}$)值。无细胞含培养液的培养孔调零。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据用 SPSS10.0 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 DCⅣa 对培养乳大鼠心肌细胞 LDH 和 CK 漏出量的影响

由表 1 结果可见,缺氧 6 h 后模型组心肌细胞培养液中的 LDH 和 CK 漏出量显著高于空白对照组。与模型组相比,DCⅣa 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹ 能显著降低心肌细胞 LDH 和 CK 的漏出量。再给氧 3 h 后,模型组及各给药组 LDH 和 CK 的漏出量均有所增加,但 DCⅣa 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹ 组与模型组相比均明显降低。

Tab 1. Effect of deglucose-chikusetsu saponin Ⅳa (DCⅣa) on lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) efflux in culture medium of neonatal rat myocardial cells after anoxia-reoxygenation (A-R) injury

Drug/ mg·L ⁻¹	LDH/mmol·min ⁻¹ ·L ⁻¹		CK/mmol·min ⁻¹ ·L ⁻¹	
	Anoxia 6 h	Reoxygenation 3 h	Anoxia 6 h	Reoxygenation 3 h
Control	23 ± 7	24 ± 8	18.2 ± 6.3	18.7 ± 2.3
A-R(Model)	35 ± 7* *	132 ± 18* *	26.6 ± 3.7* *	28.6 ± 4.2* *
DCⅣa 2.5	26 ± 7# #	110 ± 24* *# #	20.5 ± 3.4# #	22.1 ± 3.0# #
1.0	27 ± 9# #	113 ± 19* *# #	21.7 ± 3.2# #	23.8 ± 6.6# #
0.1	33 ± 8* *	123 ± 15* *	23.4 ± 4.8	27.7 ± 6.3* *

Neonatal rat myocardial cells 5 × 10⁸ L⁻¹ were cultured on 24-well plate, 1 mL in each well, then were randomly divided into 5 groups after 72 h culture. A-R model was established by anoxia 6 h and reoxygenation 3 h. DCⅣa was added into the culture medium before anoxia and again before reoxygenation. The control group was cultured 9 h in the normoxic condition. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. * * $P < 0.01$, compared with control; # # $P < 0.01$, compared with A-R group.

Tab 2. Effect of DCIV a on malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase(SOD) activity in culture medium of neonatal rat myocardial cells after anoxia-reoxygenation(A-R) injury

Drug/ mg·L ⁻¹	MDA/nmol·L ⁻¹		SOD/ μ mol·min ⁻¹ ·L ⁻¹	
	Anoxia 6 h	Reoxygenation 3 h	Anoxia 6 h	Reoxygenation 3 h
Control	2.56 ± 0.67	2.39 ± 0.53	11.9 ± 0.6	19.4 ± 0.5
A-R(Model)	4.64 ± 0.87 ^{**}	4.76 ± 0.92 ^{**}	2.0 ± 0.4 ^{**}	15.7 ± 0.6 ^{**}
DCIV a 2.5	2.87 ± 0.28 ^{##}	2.43 ± 0.57 ^{##}	5.8 ± 1.0 ^{**##}	18.3 ± 0.5 ^{**##}
1.0	3.04 ± 0.41 ^{##}	2.52 ± 0.38 ^{##}	5.0 ± 0.7 ^{**##}	18.1 ± 1.0 ^{**##}
0.1	4.14 ± 0.55 ^{**}	4.27 ± 0.42 ^{**}	2.3 ± 0.4 ^{**}	16.3 ± 0.9 ^{**}

See legend of Tab 1 for neonatal rat myocardial cells treatments. The SOD activity was measured by xanthine oxidase method and expressed as difference of nitrite amount between control in test kit and sample. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control; ^{##} $P < 0.01$, compared with A-R group.

2.2 DCIV a 对培养乳大鼠心肌细胞 MDA 生成量和 SOD 活性的影响

由表 2 结果可见,缺氧与复氧损伤后 MDA 含量升高,SOD 活性降低,DCIV a 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹组在缺氧后即表现出明显的降低 MDA 含量和升高 SOD 活性的作用,与模型组相比具有显著性差异。复氧 3 h 时,DCIV a 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹组均可使 MDA 含量降至对照组水平,与模型组相比差异显著;DCIV a 各剂量组和模型组 SOD 活性均明显升高,但 DCIV a 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹剂量组与模型组相比有显著性差异。

2.3 DCIV a 对培养乳大鼠心肌细胞存活率的影响

表 3 结果表明,缺氧及复氧造成心肌细胞存活率降低。与模型组相比,DCIV a 2.5 和 1.0 mg·L⁻¹可显著提高细胞存活率。

Tab 3. Effect of DCIV a on viability of cultured myocardial cells injured by anoxia-reoxygenation(A-R)

Drug/mg·L ⁻¹	Cell viability($A_{570\text{ nm}}$)
Control	0.864 ± 0.017
A-R(Model)	0.666 ± 0.029 ^{**}
DCIV a 2.5	0.759 ± 0.037 ^{**##}
1.0	0.710 ± 0.013 ^{**##}
0.1	0.670 ± 0.030 ^{**}

See legend of Tab 1 for neonatal rat myocardial cells treatments. Cells viability was determined by MTT assay. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control; ^{##} $P < 0.01$, compared with A-R group.

3 讨论

培养的心肌细胞缺氧再给氧后,能量代谢紊乱,

线粒体功能异常,其代谢功能及形态结构均发生改变,细胞损伤甚至坏死,与活体内缺血再灌注损伤相似。DCIV a 可使缺氧再给氧后培养液中 LDH 和 CK 含量明显下降,提高心肌细胞的存活率,提示 DCIV a 可减轻细胞膜的损伤程度,降低细胞膜通透性,具有膜稳定作用。

心肌细胞在缺氧再给氧时由于氧自由基的生成,引起细胞膜脂质过氧化,破坏细胞膜的通透屏障,心肌细胞内的心肌酶漏出^[4]。SOD 是体内重要的抗氧化酶之一,它可清除超氧阴离子,使机体免受其损伤,其值高低间接反应了机体清除氧自由基的能力^[5]。MDA 是体内氧自由基攻击生物膜,脂质过氧化的产物,其含量能够间接反应细胞损伤程度,DCIV a 可浓度依赖性地降低缺氧及再给氧心肌细胞 MDA 的生成量,提高 SOD 活性。说明 DCIV a 可能通过增强机体清除氧自由基的能力,减轻细胞膜的脂质过氧化损伤,从而发挥对细胞膜的保护作用。

龙牙榧木总皂苷口服给药能显著改善异丙肾上腺素所致心肌缺血时心电图的变化,显著减少缺血心肌组织 CK 的释放,改善心肌缺血时脂肪酸代谢,保护缺血心肌组织 SOD 活性。DCIV a 是从龙牙榧木总皂苷中分离得到的一种单体物质,提示 DCIV a 为龙牙榧木总皂苷抗心肌缺血的有效成分之一,其对缺氧复氧心肌细胞损伤的保护作用与抗氧化自由基损伤有关。但具体的作用机制还需进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Sun GB, Li R, Zhou LL, Xu HB, Du JW, Zhang XH,

- et al.* Advances in research of chemical constituents and pharmacological effects of *Aralia elata* (Miq.) Seem [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2003, **14**(2):139–141.
- [2] Hao YR, Li JJ, Li GS, Wang J. The primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Chin Heart J* (心脏杂志), 2001, **13**(6):473–475.
- [3] Yan DM, Tian X. The protective effects of coenzyme Q₁₀ and anisodamine against myocardial hypoxia/reperfusion injury in cultured rat myocardial cells [J]. *J Chin Med Univ* (中国医科大学学报), 1999, **28**(5):373–374.
- [4] Guo LJ, Zhang ZR, Chen DH, Wang P. Detection and protection of oxygen free radical following myocardium ischemia reperfusion tested with electron spin resonance spectroscopy [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis* (心肺血管病杂志), 2000, **19**(1):58–61.
- [5] Coudray C, Pucheu S, Boucher F, Amaud J, Leiris J, Favier A. Effect of ischemia/reperfusion sequence on cytosolic iron status and its release in the coronary effluent in isolated rat hearts [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1994, **41**(1–2):69–75.

Protective effects of deglucose-chikusetsu saponin IV a on cultured myocardial cells subjected to anoxia-reoxygenation injury

SUN Gui-Bo, XU Hui-Bo, WEN Fu-Chun, ZHANG Wei, DING Tao, SUN Xiao-Bo*

(Center for New Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: **AIM** To study whether deglucose-chikusetsu saponin IV a (DCIV a) is one of the effective components of aralosides to exert its protective action against myocardial ischemia. **METHODS** An anoxia (6 h)-reoxygenation (3 h) model of cultured myocardial cells of neonatal Wistar rats was established, and DCIV a was added into the culture medium with a final concentration 2.5, 1.0, 0.1 mg·L⁻¹ before anoxia and again before reoxygenation. Lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) release, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in the culture medium were assayed. Myocardial cells survival rate was measured by MTT assay. **RESULTS** DCIV a (2.5, 1.0 mg·L⁻¹) restrained evidently the LDH and

CK release, decreased MDA content, enhanced SOD activity and increased myocardial cells survival rate. **CONCLUSION** DCIV a has direct protection for the cultured myocardial cells injured by anoxia and reoxygenation, it is one of the important ingredients of aralosides to exert its protective action against myocardial ischemia.

Key words: saponins, *Aralia elata*; deglucose-chikusetsu saponin IV a; myocardium; cells, cultured; cell hypoxia; superoxide dismutase; lactate dehydrogenase; creatine kinase

Foundation item: The project supported by State Administration of Traditional Chinese Medicine and Traditional Chinese Materia Medica of China(2000-J-P-23)

* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)