三七总皂苷及其主要成分对血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用

闫彦芳[1], 张 壮[1], 孙塑伦[1], 王硕仁[2], 何丽云[1], 范吉平[1], 朱陵群[1]
(1. 北京中医药大学东直门医院中医脑病研究室, 北京 100700;
2 北京中医药大学东直门医院中医内科学实验室, 北京 100700)

摘要: 研究三七总皂苷活血化瘀作用的血管内皮保护机制, 并确定其血管内皮保护作用的主要效应成分。方法: 血管内皮细胞培养, MTT 比色法测定药物毒性、台盼蓝染色、MTT 比色法、LDH 漏出率评价药效。结果: 与模型组比较, 三七总皂苷及其主要成分三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 组的 LDH 漏出率、细胞死亡率显著下降($P < 0.001$), 细胞存活率显著提高($P < 0.001$)。结论: 三七总皂苷的活血化瘀作用机制与其对血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用有关, 三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 是其血管内皮保护作用的主要效应成分。

关键词: 血管内皮细胞; 缺氧损伤; 脑保护; 三七皂苷
中图分类号: R285.5 **文献标识码**: B **文章编号**: 1005-9903(2002)01-0034-04

Protective Effects of Tatal Saponin of *Panax Notoginseng* and Notoginsenosides on the Hypoxia induced damage of Cultured Vascular Endothelial Cells *in Vitro*

YAN Yanfang, ZHANG Zhuang, SUN Sulun, WANG Shuoren, HE Liyun, FAN Jiping, ZHU Lingqun
(1. *Department of Neurology*, 2. *The Laboratory of Chinese Internal Medicine*,
The Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of TCM, *Beijing* 100700, *China*)

Abstract: The model of hypoxia induced damage in cultured vascular endotheliocyte cells was set up in *vitro*, toxicity was tested by MTT assay, effect was evaluated by classic pharmacodynamic criteria Trypan blue stain, lactate dehydrogenase (LDH) release, and MTT assay. The results showed the mortality rate and LDH release were significantly decreased to compare with the damaged group, ($P < 0.001$), and the cell survival rate was significantly increased ($P < 0.001$) in the protective groups of total saponins of *Panax notoginseng* and notoginsenoside Rb_1, Rg_1 and Re.

Key words: Vascular endothelial cell; Hypoxia; Brain protection; Notoginsenoside

三七为活血化瘀代表中药, 近年来, 经实验与临床研究证实对中风病具有较好疗效, 本文从血管内皮保护角度探讨其治疗中风病的脑保护作用机制, 观察三七总皂苷及其主要成分对血管内皮细胞缺氧损伤的影响, 初步确定其血管内皮保护作用的主要

收稿日期: 2001-08-24
基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(1999, 25 批)

效应成分。

1 材料

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 购自武汉大学典型培养物保藏中心, 实验采用第 133 代。

1.2 药物三七总皂苷为本实验室提取, 含量以人参皂苷 Rb_1 计为 83.2%; 其余化学对照品均购自中国药品生物制品检定所, 人参皂苷 Rg_1 批号 0703-200015, 人参皂苷 Rb_1 批号 0704-9701, 人参皂苷 Re 批号 0754-9810。

1.3 试剂 DMEM 培养基: 美国 Gibco 公司产品, 新生小牛血清: 美国 HyClone 公司产品; 胰酶 L-谷氨酰胺 MTT 试剂: 美国 Sigma 公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO) 天津市天河化学试剂厂分析纯产品; 其他试剂均为国产分析纯, 水为自制三蒸水。

1.4 仪器 德国 Heraeus cell 型二氧化碳培养箱; 北京半导体设备仪器厂 JJT1300 型超工作台; 美国 REVCO Legaci -86℃低温冰箱; OLYMPUS MIT-2 倒置相差显微镜; 日本岛津 AEG-45SM 十万分之一精密电子分析天平; GDV 公司 DV 990BV4 型酶标仪; 英国 Mettler-Toledo 320 型精密 pH 计; 北京医用离心机厂 LD50-2A 型离心机; 上海医用分析仪器厂 75-2 型振荡混合仪。

2 方法

2.1 细胞复苏、细胞传代[1] 后, 调细胞浓度至 1×10^5/ml 接种于 96 孔培养板, 每孔 100μl, 即细胞数为 1×10^4/孔, 置 37℃培养箱培养 24h。

2.2 给药方法 取出培养板, 吸弃培养基, 进行给药实验, 给药孔处理如下: 以含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基溶解三七总皂苷等药物, MTT 实验药物终浓度三七总皂苷从 100mg/L 起步, 其他药物均从 100μM 为最高浓度 1024 起步, 以 1024→1 倍半稀释法配制成 11 个终浓度的含药血清 DMEM 培养基, 分别加入加药实验孔, 每孔 100μl; 正常空白对照孔, 仅给予含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基 100μl, 37℃培养 18h, 取出进行 MTT 比色测定。

2.3 细胞缺氧损伤造模法 根据文献[2] 采用氧清除剂连二亚硫酸钠造成缺氧, 种板培养 24h 后, 各孔弃去培养基, 用无糖 Earls 液洗细胞 2 次, 正常对照孔加入 DMEM 培养基; 模型孔加入含连二亚硫酸钠终浓度为 1.0mM 的无糖 Earls 液, 造成细胞缺氧损伤模型。给药组加入含连二亚硫酸钠终浓度为 1.0mM 的无糖 Earls 液, 药物以无糖 earle 液溶解, 高、中、低 3 个终浓度分别加入加药实验孔, 37℃孵育 6h, 取出培养板, 吸弃各实验孔液体, 用无糖 Earls 液洗细胞 2 次, 各实验孔均换含药的无血清 DMEM 培养基, 继续培养 12h。

2.4 检测方法

2.4.1 MTT 比色法测定 MTT 试剂以 0.01M PBS (pH7.4) 配制成 5mg/ml 的工作液, 现用现配, 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌。吸弃各孔液体, 加入无血清 DMEM 培养基 100μl, 再加入 5mg/ml MTT 工作液 20μl, 混匀, 37℃孵育 4h, 翻板法弃去孔内培养液, 每孔加入 100μl DMSO, 振荡 10min, 使充分溶解, 在酶标仪 492nm 波长处测量各孔 OD 值, 以不加细胞孔调零, 酶标仪自动打印结果。以正常对照组 OD 值均数为 100%, 计算细胞存活率(%)= 各孔 OD 值/正常组 OD 值均数×100。

2.4.2 台盼蓝染色计数法测定细胞死亡率 台盼蓝以 0.01M PBSD (pH7.4) 配制成 4% 母液, 4℃保存, 使用时用 0.01M PBS(pH7.4) 稀释成 0.4% 工作液, 1×10^5/ml 细胞接种于 24 孔培养板, 每孔体积 1ml, 缺血/再灌注造模实验后, 取出培养板, 各孔上清液吸入对应编号试管中, 细胞层用 0.35% 胰酶消化, 用新生小牛血清 2 滴终止反应, 每孔加 0.01M PBS(pH7.4) 1ml, 收集细胞悬液于对应上清液试管中, 800rpm 离心 5min, 吸弃上清液, 留 0.3~0.5ml, 轻轻吸吹为细胞悬液, 取细胞悬液 9 滴移入尖底试管中, 加一滴 0.4% 台盼蓝溶液混匀, 在 3min 内, 用血球计数板计数蓝染的死细胞数和拒染的活细胞共 200 个, 细胞死亡率(%)= 死细胞数/(活细胞数+死细胞数)×100。

2.4.3 LDH 漏出率的测定 收集 24 孔培养板上清液于 EP 管中, 培养板加入无血清 DMEM 培养基 1ml, 分别置-86℃低温冰箱冷存, 待测 LDH。测定前取出, 上清液和孔内细胞置室温融化, 吹打使细胞破裂, 混匀, 3000rpm 离心 5min, 按照 LDH-L 试剂盒说明书操作, 用分光光度计 340nm 处测定每分钟平均吸光度变化值, 公式计算测得上清液和相应胞浆中的 LDH 活性, LDH 漏出率(%)= 上清液 LDH 活性/(上清液 LDH 活性+胞浆 LDH 活性)×100。

2.5 数据处理 采用 SPSS 8.0 for Windows 中 ONE ANOVA 程序进行统计学分析, 以方差分析法进行组间均数比较。

3 结果

3.1 三七总皂苷及其主要成分三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 对正常培养的 ECV304 血管内皮细胞均未出现明

显的毒性损伤效应。根据各药物对正常培养的 ECV304 血管内皮细胞生长的 MTT 实验结果, 确定抗血管内皮细胞缺氧损伤的药效学实验所用各药终浓度。详见表 1、表 2。

表 1　三七总皂苷对 ECV304 血管内皮细胞存活率的影响($n=8$)

终浓度(mg/L)	0	0.098	0.195	0.39	0.781	1.562	3.125	6.25	12.5	25	50	10
$\bar{x}$(%)	100.0	106.6	109.9	109.9	119.3	115.3	117.1	107.9	112.3	96.1	108.8	110.5
s(%)	19.2	31.0	27.0	30.8	23.7	29.2	32.0	25.5	30.3	26.8	29.0	32.7

表 2　三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 对 ECV304 血管内皮细胞存活率的影响($n=8$)

	终浓度(μM)	0	0.098	1.195	0.391	0.781	1.563	3.125	6.25	12.5	25	5
三七皂苷 Rb_1	$\bar{x}$(%)	100.0	113.2	111.3	124.6	109.8	126.4	113.3	112.3	93.3	94.1	94.7
	s(%)	16.5	24.7	18.6	20.1	13.1	25.1	13.7	19.4	10.7	15.0	12.4
三七皂苷 Rg_1	$\bar{x}$(%)	100.0	88.3	89.0	91.6	93.0	95.0	95.6	98.3	98.5	100.1	99.3
	s(%)	2.2	2.4	3.4	2.9	2.2	2.1	2.6	1.8	1.5	1.5	2.0
三七皂苷 Re	$\bar{x}$(%)	100.0	81.0	78.7	85.1	82.2	89.0	81.1	91.5	105.2	97.7	98.6
	s(%)	9.6	6.9	10.7	5.7	4.5	8.3	5.7	9.2	8.1	7.7	9.7

3.2　台盼蓝染色计数细胞死亡率结果　详见表 3。

表 3　三七总皂苷及其主要成分对 ECV304 细胞缺血/再灌注细胞死亡率(%)的影响

组别	剂量	n	$\bar{x}\pm s$(%)
正常对照		8	6.8±2.1
缺氧模型		8	89.4±4.8$^{\#}$
三七总皂苷	3.125mg/L	4	48.4±5.3$^{\#*}$
三七总皂苷	1.563mg/L	4	36.1±5.0$^{\#*}$
三七总皂苷	0.781mg/L	4	35.1±6.1$^{\#*}$
人参皂苷 Rb_1	3.125μM	4	40.4±5.1$^{\#*}$
人参皂苷 Rb_1	1.563μM	4	37.1±6.3$^{\#*}$
人参皂苷 Rb_1	0.781μM	4	36.0±4.9$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	3.125μM	4	42.1±6.9$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	1.563μM	4	39.1±4.6$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	0.781μM	4	34.5±5.4$^{\#*}$
人参皂苷 Re	3.125μM	4	43.8±7.6$^{\#*}$
人参皂苷 Re	1.563μM	4	33.5±6.9$^{\#*}$
人参皂苷 Re	0.781μM	4	33.1±4.5$^{\#*}$

注: 与正常对照组比较$^{\#}$ $P<0.001$; 与模型组比较* $P<0.001$(以下同)。各治疗组间比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.3　MTT 比色法细胞存活率结果　详见表 4。

表 4　三七总苷及其主要成分对 ECV304 细胞缺血/再灌注细胞存活率(%)的影响

组别	剂量	n	$\bar{x}\pm s$(%)
正常对照组		40	100± 2.1
缺氧模型组		42	24.8±17.7$^{\#}$
三七总皂苷	3.125mg/L	8	56.2±14.8$^{\#*}$
三七总皂苷	1.563mg/L	8	60.10± 9.0$^{\#*}$
三七总皂苷	0.781mg/L	8	69.7±15.9$^{\#*}$
人参皂苷 Rb_1	3.125μM	8	85.4±24.4**
人参皂苷 Rb_1	1.563μM	8	81.1±12.1**
人参皂苷 Rb_1	0.781μM	8	73.4±18.5$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	3.125μM	8	51.0± 6.7$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	1.563μM	8	58.9±18.7$^{\#*}$
人参皂苷 Rg_1	0.781μM	8	63.1±22.8$^{\#*}$
人参皂苷 Re	3.125μM	8	66.0± 8.9$^{\#*}$
人参皂苷 Re	1.563μM	8	85.8±17.1**
人参皂苷 Re	0.781μM	8	87.0±16.6**

注: 与其他各治疗组间比较* $P<0.001$。

3.4　LDH 漏出率测定结果　详见表 5。

4　讨论

脑水肿是中风病急性期死亡的主要原因, 血管源性脑水肿的发生和发展与损伤区微血管通透性和血脑屏障的完整性密切相关。作为血脑屏障的重要构成部分, 微血管(包括毛细血管和小静脉)的内皮

表 5　三七总皂苷及其主要成分对 ECV304 细胞缺血/再灌注 LDH 漏出率(%)的影响

组别 $\bar{x}\pm s$(%)		剂量	n
正常对照		10	12.2 ± 3.2
缺氧模型		10	69.4 ± 7.4#
三七总皂苷	3.125mg/L	4	36.2 ±10.7#*
三七总皂苷	1.563mg/L	4	31.8 ± 8.9###*
三七总皂苷	0.781mg/L	4	26.4 ± 8.9###*
人参皂苷 Rb_1	3.125μM	4	26.6 ± 6.6#*
人参皂苷 Rb_1	1.563μM	4	29.5 ±11.4#*
人参皂苷 Rb_1	0.781μM	4	27.5 ± 5.3#*
人参皂苷 Rg_1	3.125μM	4	32.5 ± 7.3#*
人参皂苷 Rg_1	1.563μM	4	29.9 ± 7.7#*
人参皂苷 Rg_1	0.781μM	4	27.4 ± 7.4#*
人参皂苷 Re	3.125μM	4	32.6 ±10.3#*
人参皂苷 Re	1.563μM	4	28.1 ± 7.4#*
人参皂苷 Re	0.781μM	4	29.1 ±10.7#*

注: 与正常对组比较## $P<0.01$, 各治疗组间比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

细胞在缺血和缺血/再灌注状态下的损伤程度和内皮细胞间紧密连接的完整性对血脑屏障的完整性影响巨大。缺血期即发生脑水肿, 而再灌注后脑水肿进一步加重, 表明脑组织缺血/再灌注损伤在脑水肿的形成和发展过程中作用更明显[3]。各类中药的抗脑水肿作用的文献较多, 但中药对培养的血管内皮细胞缺血/再灌注损伤的影响尚未见报道, 进行此方面相关研究对揭示中药抗脑水肿的作用机理可能具有一定帮助。

尽管已有较成熟的鼠脑微血管内皮细胞的分离、培养方法, 但大量制取并用于稳定性要求高、工作量巨大的药效学实验, 其稳定性尚较差。ECV304 血管内皮细胞为人脐静脉血管内皮细胞株, 大量文献报道表明人脐静脉血管内皮细胞可用于研究多种因素对多种血管损伤的病理机制及药物的血管内皮保护作用, 能够说明与多种血管的血管内皮细胞损伤有关的病理和药理问题[4~10]。已有文献报道脐静脉血管内皮细胞具有血脑屏障微血管内皮细胞的紧密连接等特性[11], 故在严格控制的体外培养条件下, 选用人脐静脉血管内皮细胞株 ECV304 细胞进行缺氧损伤实验能够在一定程度上反映中风病急性期脑组织缺氧时血脑屏障微血管内皮细胞的损伤情况, 可以用于观察中药对血脑屏障微血管内皮细胞缺氧损伤的初步药效研究。

文献报道三七总皂苷[12]、Rb_1、Rg_1[13] 具有显著的抗脑水肿作用, 本文结果表明活血化瘀代表中药三七总皂苷及其主要化学成分三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 均具有显著的抗血管内皮缺氧损伤作用。此结果提示三七的脑保护作用机制可能部分与其对缺氧所致血管内皮细胞损伤的保护作用有关, 三七皂苷 Rb_1、Rg_1、Re 是其血管内皮保护作用的主要效应成分。

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000. 73-82.

[2] 韩丽莎, 马玉亭, 韩哲. 参麦注射液对缺血再灌注兔的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(7): 663-664.

[3] Mayer SA, Lignelli A, Fink ME, et al. Perilesional Blood flow and edema formation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1791-1798.

[4] 严晓红, 欧阳静萍, 涂淑珍, 等. 当归对氧化低密度脂蛋白所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20(3): 181-183.

[5] 孙慧勤, 陈意生, 史景泉, 等. NDGA 对血管内皮细胞增殖抑制的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 245-248.

[6] 范礼佩, 黄先恩, 刘兰平, 等. 环孢素 A 对人脐静脉内皮细胞的损伤作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1996, 5(1): 15-17.

[7] 高建川, 安静, 杨宗城, 等. 烧伤血清对血管内皮细胞损伤及抗凝特性的影响[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1994, 10(6): 452-455.

[8] 朱平, 刘俊彬, 阎荣, 等. 紧综合征出血热病毒改变人血管内皮细胞骨架[J]. 第四军医大学学报, 1994, 15(5): 332-335.

[9] 郭军, 李澄, 顾晓琴, 等. 平阳霉素对体外培养的脐静脉内皮细胞损伤的研究[J]. 南京铁道医学院学报, 1998, 17(4): 245-247.

[10] 张志琳, 包仕尧, 吴鸿飞, 等. 血管内皮细胞缺氧性损伤及药物干预作用的实验观察[J]. 江苏医药, 1998, 24(11): 805-807.

[11] 王嵘. 星形胶质细胞诱导维持血脑屏障特性[J]. 国外医学•脑血管疾病分册, 1998, 6(3): 141-144.

[12] 李麟仙, 王子灿, 黄志宏, 等. 三七皂苷对急性脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1991, 7(1): 56-59.

[13] 张英鸽, 刘天培. 人参皂苷 Rb_1 和 Rg_1 对大鼠可逆性局灶性脑缺血的影响[J]. 中国药理学报, 1996, 17(1): 44-48.