

制提供理论和实验基础;为进一步开展方剂研究提供策略;为临床治疗多发性骨髓瘤及其他恶性肿瘤开辟新的道路,具有重要的理论意义和应用前景。

References:

- [1] Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(1): 111-126.
- [2] Liu J, Hu W X, He L F, et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2004, 578(3): 245-250.
- [3] Chu K T, Ng T B. First report of a glutamine-rich antifungal peptide with immunomodulatory and antiproliferative activities from family Amaryllidaceae [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(1): 167-173.
- [4] Then M, Szentmihályi K, Sarkozi A, et al. Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 889(1-2): 69-74.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [6] Xu L Z. The standardization precept of research about AgNOR [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 1996, 23(5): 377.
- [7] Webster K R. Therapeutic potential of targeting the cell cycle [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(10): 940-943.
- [8] Paulovich A G, Toczyski D P, Hartwell L H. When checkpoints fail [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 315-321.
- [9] Agami R, Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G₁ cell cycle arrest in response to DNA damage [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 55-66.
- [10] Lee S Y. Effect of *N*-phthalyl-L-glutamyl-sarcosine and lycorine on the respiration and glycolysis of the Ehrlich ascites tumour cells of mouse [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1965, 12(8): 542-545.
- [11] Hohmann J, Forgo P, Molnar J, et al. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(5): 454-457.
- [12] Song L R, Hong X, Ding X L, et al. *Dictionary of Modern Chinese Traditional Medicine* (现代中药学大辞典) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [13] Crocker J. Nucleolar organiser regions [J]. *Curr Top Pathol*, 1990, 82: 91-149.

泽泻有效部位对肾草酸钙结石模型大鼠肾组织骨桥蛋白表达的影响

米其武¹, 曹正国², 刘继红¹, 吴继洲³, 尹春萍³, 周四维¹, 叶章群¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430030; 2. 安徽省立医院 泌尿外科, 安徽 合肥 230001; 3. 华中科技大学同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究泽泻有效部位对大鼠肾草酸钙结石形成和肾组织骨桥蛋白(OPN)表达的影响,探讨泽泻抑制尿结石形成的机制。方法 采用现代植化和生物活性导向分离的方法分离、提取泽泻的有效部位。将30只大鼠随机分成3组:对照组、模型组、泽泻组。以乙二醇和1 α -羟基维生素D₃制备大鼠肾草酸钙结石模型。检测各组大鼠血及尿生化、肾Ca²⁺水平、24h尿草酸分泌量和肾组织病理学改变,并采用免疫印迹(Western blotting)和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别观察各组大鼠肾组织OPN蛋白及其mRNA的表达水平。结果 ig泽泻有效部位(主要以四环三萜类化合物为主)大鼠的血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、肾Ca²⁺水平、24h尿Ca²⁺分泌量、肾组织草酸钙晶体的分布、OPN蛋白及其mRNA的表达水平均显著低于模型组($P < 0.01$)。结论 泽泻有效部位能抑制大鼠肾组织OPN的表达,减少肾组织草酸钙结晶的沉积,从而能有效抑制大鼠肾草酸钙结石的形成。

关键词:泽泻;尿石;骨桥蛋白;草酸钙

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1827-05

Effects of active fraction of *Alisma orientale* on osteopontin expression in renal tissue of urolithiasis model rat with calcium oxalate stone

MI Qi-wu¹, CAO Zheng-guo², LIU Ji-hong¹, WU Ji-zhou³, YIN Chun-ping³,
ZHOU Si-wei¹, YE Zhang-qun¹

(1. Department of Urology, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Urology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 3. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

收稿日期:2005-04-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970891)

作者简介:米其武(1963—),男,辽宁朝阳人,副主任医师,在读博士研究生,主要从事泌尿外科尿石症和膀胱肿瘤的研究。

Tel: (0769) 2223412-3701 E-mail: mqw175@163.com

Abstract: Objective To study the effects of active fractions of *Alisma orientale* on urinary calcium oxalate stone formation and osteopontin (OPN) expression in urolithiasis model rats and to explore the mechanism of *A. orientale* on the prevention of the formation from urinary calculi. **Methods** The active fractions of *A. orientale* were separated and extracted with isolation techniques guided by modern phytochemistry and bioactivity. Adult male Wistar rats (30) were randomized into three groups, they were control, model, and *A. orientale* groups. The model rats with renal calcium oxalate stone formation were induced by ig ethylene glycol and 1 α -hydroxyvitamin D₃ for four weeks. The calcium oxalate deposit in the kidney was observed by microscopy. The SCr and BUN levels, renal tissue calcium content, 24 h urinary oxalic acid excretion, and physiological change in renal tissue were also detected. Western blotting and RT-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used to observe the protein and mRNA expression of OPN in rat renal tissue of every groups. **Results** SCr and BUN level, renal tissue calcium content, 24 h urinary calcium excretion, crystal deposition, and the OPN expression in the rats by ig active fractions which were identified as tetracyclic triterpenoids, were significantly lower than those in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The active fractions of *A. orientale* can inhibit the OPN expression and deposit of calcium oxalate in renal tissue so as to block the formation of renal calcium oxalate stone in rats potently.

Key words: *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; urinary calculi; osteopontin (OPN); calcium oxalate

泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 是治疗泌尿系结石的常用传统中药,以往的研究已证实泽泻的有效部位醋酸乙酯浸膏能显著抑制大鼠肾草酸钙结石的形成^[1],但目前国内外尚未见泽泻抑制肾草酸钙结石形成的活性部位及其作用机制的研究报道。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种富含天冬氨酸的磷酸化糖蛋白,体外实验表明能显著抑制草酸钙晶体的成核、聚集和与肾小管上皮细胞的黏附,认为可能是草酸钙结石的抑制因子^[2]。本课题组在前期工作的基础上采用现代植化和生物活性导向分离的方法进一步从泽泻中分离得到了一种化合物,体外研究已证明其对草酸钙结晶有抑制作用^[3]。本实验分别用免疫印迹(Western blotting)和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)初步观察了泽泻的活性部位对肾草酸钙结石模型大鼠肾结石形成和肾 OPN 及其 mRNA 表达的影响,为泽泻在抑制肾草酸钙结石形成的作用机制方面的深入探讨提供了实验依据。

1 材料

泽泻有效部位的提取:泽泻粗粉(产于福建,由华中科技大学同济医学院药学院吴继洲教授鉴定)10.5 kg,用50%甲醇回流提取,回收甲醇得浸膏约2 kg,加适量水溶解后,用醋酸乙酯萃取并回收醋酸乙酯得到醋酸乙酯浸膏212 g,留45 g配样,其余的用硅藻土柱色谱分离,以醋酸乙酯洗脱,回收溶剂得到醋酸乙酯洗脱液,经硅胶柱色谱分离,用石油醚洗脱并反复柱色谱分离后得到提取物2.1 g。将该提取物与25.0 mL无水乙醇和25.0 mL聚山梨酯-80充分混匀后,用蒸馏水定容至500 mL备用(其主要

成分为四环三萜类,相当于含生药20.0 g/mL)。

2 方法

2.1 动物模型制备和分组处理:Wistar健康雄性大鼠30只,体重180~220 g,随机分为3组,每组10只。A组(对照组);B组(肾草酸钙结石模型组);参照文献报道方法^[4]复制大鼠肾结石模型。以1%乙二醇+1 α -羟维生素D₃为诱石剂,隔天ig给予,每只0.5 μ g;C组(泽泻组);在给予与B组相同诱石剂的同时,每天ig泽泻提取物5.0 mL/kg(相当于生药100.0 g/kg,预实验证明此剂量为最佳剂量)。各组大鼠均给药4周。

2.2 一般观察指标及检测方法:实验结束前1 d称体重,比较实验前后大鼠体重的变化,用代谢笼收集并测定24 h尿量、尿液pH值、24 h尿草酸的分泌量(过氧化氢-盐酸苯肼法)。戊巴比妥ip麻醉后,严格无菌操作下行下腔静脉穿刺取血,离心取上层血清,用Olympus Au1000自动分析仪测血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)水平;同时切取肾组织,一部分置液氮罐保存备用,另一部分以10%中性福尔马林固定,作常规HE石蜡切片和Pizzalato's染色,光镜下观察肾组织草酸钙结晶形态分布及肾组织的病理改变。Hitachi 180-80型原子吸收光谱仪进行肾组织Ca²⁺、尿总Ca²⁺测定。

2.3 Western blotting检测肾组织OPN蛋白的表达:匀浆器处理肾组织,用预冷的PBS洗2遍,加入5倍体积的组织蛋白裂解液,置冰上30 min,离心(12 000 $\times g$)2 min,取上清液,测蛋白浓度。取10 μ L加入等体积2 $\times$ 上样缓冲液,煮沸10 min,离心后取上清液。制备10%非连续SDS-PAGE凝胶,

每孔加变性后的总蛋白 100 μg , 在 100 V 下电泳, 至溴酚蓝达到凝胶底部, 恒流 320 mA, 2 h 后将蛋白电转移到 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 1 : 1 000 稀释兔抗人 OPN 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入 1 : 1 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 最后在暗室中进行化学发光法显影。设立不加一抗的阴性对照组, Western blotting 蛋白条带测定吸光度 A 值。

2.4 RT-PCR 检测肾组织 OPN mRNA 的表达: 肾组织总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒 (美国 Gibco 公司) 的说明书进行。紫外分光光度计测定提取的总 RNA A_{260}/A_{280} 值, 并经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定。根据 Primer 5.0 引物设计软件设计的 OPN 引物序列, 正义引物: 5'-CATCAGAGCCAC-GAGTTTCA-3', 反义引物: 5'-TCAGGGCC-CAAAACACTATC-3', 扩增产物为 273 bp; RT-PCR 二步法按 TaKaRa RNA PCR 试剂盒 (大连宝生物工程 (大连) 有限公司) 的说明书进行。取逆转录产物 10 μL 进行 PCR, 50 μL PCR 体系的反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min; 35 个循环。同时进行内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 的 PCR, 正义引物: 5'-CCCAGAGCAAGA-GAGGCTC-3', 反义引物: 5'-AGCACAGCCTG-

GATAGCAAC-3', 扩增产物长度为 400 bp。取 PCR 产物 5 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 75 V 下电泳, UVP 凝胶成像系统照相扫描, 测定灰度值, 计算出每个标本 OPN 与 β -actin 的比值来判断各组中 OPN mRNA 表达的相对水平。

2.5 统计学分析: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 总体比较采用方差分析, 组间比较采用 q 检验, 用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。

3 结果

3.1 一般情况: 泽泻大鼠的 24 h 尿量为 (25.41 $\pm$ 8.17) mL, 明显高于对照组的 (16.26 $\pm$ 3.18) mL 和模型组的 (13.07 $\pm$ 4.34) mL, 差异显著 ($P < 0.01$)。泽泻活性部位对大鼠尿 pH 值无明显影响 (pH 值均在 6.40 左右)。模型组大鼠死亡 1 只, 大鼠的食量、体重增量均小于其他组, 但差异不显著 ($P < 0.05$)。

3.2 血清 BUN、SCr、24 h 尿 Ca^{2+} 、24 h 尿草酸分泌量和肾组织 Ca^{2+} 水平: 结果见表 1。对照组血清 BUN、SCr、24 h 尿草酸、24 h 尿 Ca^{2+} 、肾组织 Ca^{2+} 水平均明显低于其他两组, 差异显著; 泽泻组血清 BUN、SCr、24 h 尿 Ca^{2+} 、肾组织 Ca^{2+} 水平均明显低于模型组, 差异显著; 24 h 尿草酸分泌量, 模型组与泽泻组间差异不显著。

表 1 3 组大鼠血清 BUN、SCr、24 h 尿草酸、24 h 尿 Ca^{2+} 和肾组织 Ca^{2+} 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum BUN, SCr, 24 h urinary oxalic acid, and Ca^{2+} level in 24 h urine and in renal tissue of rats in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	血清 BUN/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SCr/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿草酸/[($\mu\text{mol} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$)]	尿 Ca^{2+} /[($\mu\text{mol} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$)]	肾组织 Ca^{2+} /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	10	6.26 $\pm$ 1.10	34.23 $\pm$ 11.09	24.22 $\pm$ 6.49	3.14 $\pm$ 0.90	1.54 $\pm$ 0.71
模型	9	20.07 $\pm$ 3.15***	226.31 $\pm$ 32.14***	82.89 $\pm$ 10.22***	97.35 $\pm$ 10.84***	138.39 $\pm$ 11.92***
泽泻	10	19.34 $\pm$ 4.27***	183.54 $\pm$ 36.81*** $\Delta\Delta$	83.67 $\pm$ 13.43***	50.67 $\pm$ 8.92*** $\Delta\Delta\Delta$	73.46 $\pm$ 10.09*** $\Delta\Delta\Delta$

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs model group

3.3 肾组织病理学检查: Pizzilato's 染色后, 草酸钙晶体在光镜下呈黑褐色。模型组大鼠肾组织草酸钙结晶布满全肾, 主要分布在肾乳头和肾皮质, 部分结晶成堆且互相连接成片, 高倍镜下晶体主要存在于肾近曲小管和远曲小管, 小管上皮细胞明显肿胀、变性、坏死, 管腔显著扩张; 结石经分析表明是草酸钙结晶。泽泻组大鼠肾组织草酸钙晶体明显少于模型组, 仅有少数晶体分布在肾皮质和髓质且晶体大多散在不成堆, 管腔内也仅见散在的草酸钙结晶, 扩张程度也明显比模型组轻。

3.4 OPN 蛋白的表达: 3 组大鼠肾组织 OPN 蛋白的 Western blotting 蛋白条带的 A 值见表 2。对照组肾组织 OPN 蛋白条带的 A 值均明显低于模型组

表 2 3 组大鼠肾组织 OPN 蛋白及 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Protein and mRNA expression of OPN in renal tissue of rats in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	OPN 蛋白表达 (A 值)	OPN mRNA 表达
对照	10	40 451 $\pm$ 8 210	0.27 $\pm$ 0.08
模型	9	70 601 $\pm$ 9 613***	0.79 $\pm$ 0.06***
泽泻	10	54 546 $\pm$ 9 421*** $\Delta\Delta$	0.49 $\pm$ 0.07*** $\Delta\Delta\Delta$

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

$\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs model group

和泽泻组, 差异显著; 泽泻组 OPN 的 A 值也明显低于模型组, 差异显著。

3.5 OPN mRNA 的表达:3 组大鼠肾组织 OPN mRNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 1,OPN mRNA 的相对表达水平见表 2。对照组肾组织 OPN mRNA 的表达水平明显低于模型组和泽泻组,差异显著;泽泻组 OPN mRNA 的表达水平也明显低于模型组,差异显著。

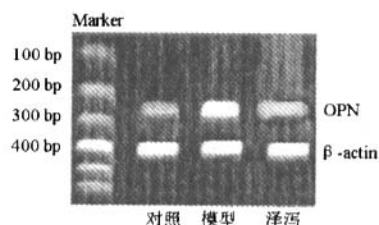


图 1 3 组大鼠肾组织 OPN mRNA 的 RT-PCR 电泳图
Fig. 1 Electrophoregram of RT-PCR of OPN mRNA in renal tissue of rats in three groups

4 讨论

尿石症是威胁人类健康的常见疾病之一,草酸钙结石占尿结石的 80% 左右,尿结石被摘除或排出后的复发率很高。随着体外冲击波碎石和腔内泌尿外科等发展,尿石症的治疗已取得较大的进步,但目前尚缺乏治疗及预防尿结石复发的有效药物。泽泻具有利水渗湿功效,可与多种中草药配伍组成治疗尿路结石的传统方剂。泽泻用于防治尿石症有悠久的历史和良好的效果,虽已积累了丰富的临床经验,然而对其作用机制,特别是对其活性成分深入的基础研究报道甚少。自 Yamaguchi 等^[5]报道泽泻的水提液体外能抑制草酸钙结晶的生长(晶体生长抑制指数达到 80% 以上);能显著抑制实验性肾结石大鼠肾草酸钙结石形成以来,许多学者对泽泻的活性部位及其防治草酸钙尿石症的作用机制进行了研究。本实验采用现代植化和生物活性导向分离的方法将泽泻的有效部位醋酸乙酯浸膏进一步分离得到几种化合物,通过前期的动物和体外实验逐渐筛选出泽泻的活性部位,并探讨了其对结石模型大鼠肾结石形成和 OPN 表达的影响。

本实验采用 1% 乙二醇和 1 α -羟基维生素 D₃ 诱导大鼠肾草酸钙结石形成。实验结果表明泽泻的活性部位明显降低肾结石大鼠的血清 BUN、SCr、肾 Ca²⁺水平和 24 h 尿 Ca²⁺分泌量,减轻肾小管损伤的程度;而其对大鼠尿草酸的排泄并没有影响。同时服用泽泻的大鼠 24 h 尿量明显多于对照组和模型组,表明泽泻较强的利尿作用也有助于大鼠肾结石的排出。

正常人尿抑制草酸钙结晶的能力主要依赖于尿

液中的某些蛋白质大分子,它们的浓度及其内在的抑制能力可显著影响草酸钙晶体的生长和聚集。OPN 是一种磷酸化糖蛋白,从正常人尿液中提纯的 OPN 在多种浓度下均对草酸钙结晶的生长和聚集有明显的抑制作用^[6],表明 OPN 可能是正常机体一种重要的抑制结石形成的内源性大分子物质。免疫组化和原位杂交证实 OPN 主要是由正常肾脏远曲小管和集合管合成分泌^[7]。Yasui 等^[8]的研究发现,正常人肾脏表达 OPN 较弱,而结石模型组大鼠 OPN 的表达明显高于对照组,而结石患者的肾脏和结石原基质中 OPN 表达明显增强。本实验也证实结石模型组大鼠 OPN 的表达明显高于对照组,而 OPN 的过高表达是由大鼠服用乙二醇和 1 α -羟基维生素 D₃ 后产生的高草酸尿、高钙尿和草酸钙晶体在肾脏的沉积共同调控所致^[9]。OPN 的这种分泌情况,是机体的一种防御机制,肾脏表达 OPN 的强度在一定程度上反映了尿抑制晶体结晶的能力,即通过合成更多的 OPN 来抑制结石形成。大鼠服用泽泻活性部位后,OPN 的表达显著降低。

泽泻主要含挥发油、天门冬素、植物甾醇苷、脂肪酸、树脂、蛋白质、淀粉、三萜类化合物、倍半萜类化合物、尿苷、大黄素、泽泻醇 C-醋酸酯和环氧泽泻烯等。本课题组将泽泻的活性部位进行初步的核磁共振谱分析,发现其主要成分是四环三萜类化合物,它可能通过减少结石大鼠肾组织 OPN 的表达来抑制大鼠肾结石的形成,这为阐明泽泻防治草酸钙尿石症的物质基础及其作用机制和进一步开发生产治疗尿石症的新药提供了理论依据,有助于科学评价泽泻药材及制剂的质量、改进剂型和提高其防治尿石症的疗效。

References:

- [1] Cao Z G, Liu J H, Wu J Z, et al. Effect of different extracts of *Alisma orientalis* on urinary calcium oxalate stone formation in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 45-48.
- [2] Ye Z Q, Deng Y L, Dong C. *Urolithiasis* (泌尿系结石) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [3] Cao Z G, Wu W, Liu J H, et al. Inhibition of the three constituents from *Alisma orientalis* on the formation of urinary calcium oxalate calculus in vitro [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2005, 14(2): 166-168.
- [4] Cao Z G, Liu J H, Duan Y F, et al. Comparison of several experimental renal calcium oxalate calculus models in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech: Health Sci* (华中科技大学学报:医学版), 2002, 31(5): 556-559.
- [5] Yamaguchi S, Liu J H, Utsunomiya M, et al. The effect of takusha and kagosou on calcium oxalate renal stones in rats [J]. *Hinyokika Kyo*, 1995, 41(6): 427-431.
- [6] Min W, Shiraga H, Chalko C, et al. Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(1): 183-189.

- [7] Jiang XJ, Feng T, Chang L S, *et al.* Expression of osteopontin mRNA in normal and stone-forming rat kidney [J]. *Urol Res*, 1998, 26(6): 389-394.
- [8] Yasui T, Fujita K, Hayashi Y, *et al.* Quantification of osteopontin in the urine healthy and stone-forming men [J]. *Urol Res*, 1999, 27(4): 225-230.
- [9] Yasui T, Fujita K, Sato M, *et al.* The effect of takusha, a kampo medicine, on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model [J]. *Urol Res*, 1999, 27(3): 194-199.

油茶皂苷对缺氧-复氧诱导的内皮细胞损伤及中性粒细胞黏附的影响

黄起壬¹, 何明¹, 戴育成², 罗永明³

(1. 江西医学院 药理教研室, 江西 南昌 330006; 2. 江西医学院第二附属医院血液研究所, 江西 南昌 330006; 3. 江西中医学院 药学系, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 研究油茶皂苷(SQS)对缺氧-复氧诱导的内皮细胞损伤及中性粒细胞黏附的作用及可能的机制。方法 建立人脐静脉内皮细胞(HUVEC)缺氧-复氧损伤模型,取培养细胞上清液测定LDH活性,分别测定HUVEC存活率、中性粒细胞黏附率、线粒体丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。同法检测中性粒细胞黏附。结果 缺氧-复氧可导致HUVEC损伤及中性粒细胞黏附的增加,表现为LDH活性、MDA水平及中性粒细胞黏附率显著升高,而SOD和GSH-Px活性显著下降;SQS呈浓度依赖性对抗上述改变。结论 SQS对缺氧-复氧诱导的HUVEC损伤有保护作用,其机制可能与其抗脂质过氧化和抑制白细胞黏附有关。

关键词:油茶皂苷; 内皮细胞; 中性粒细胞; 黏附; 缺氧-复氧

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1831-04

Effects of sasanquasaponin on injury of endothelial cells induced by hypoxia-reoxygenation and neutrophil adhesion

HUANG Qi-ren¹, HE Ming¹, DAI Yu-cheng², LUO Yong-ming³

(1. Department of Pharmacology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China; 3. Department of Pharmaceutical Science, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sasanquasaponin (SQS) on injury of endothelial cells induced by hypoxia-reoxygenation and neutrophil adhesion, and its possible mechanisms. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were exposed to normoxia or hypoxia-reoxygenation in the absence or presence of SQS (10.0, 1.0, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$). Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in cultured HUVEC supernatants. HUVEC survival rate, neutrophil adhesion rate, malondialdehyde (MDA) level superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were measured. Neutrophil adhesion was assayed in additional HUVEC treated as above. **Results** The results showed that hypoxia-reoxygenation resulted in HUVEC injury and enhancement of neutrophil adhesion, with the increase in LDH activity, MDA level, and adhesion rate as well, conversely, with the decrease in activity of SOD and GSH-Px; SQS antagonized these changes in a concentration-dependent manner. **Conclusion** SQS may protect HUVEC against hypoxia-reoxygenation injury and its mechanism appears to be related to anti-lipoperoxidation and anti-adhesion of white blood cell.

Key words: sasanquasaponin; endothelial cells; neutrophils; adhesion; hypoxia-reoxygenation

缺血-再灌注损伤是许多心脑血管疾病共同的病理过程。已有充分证据表明:中性粒细胞的参与是缺血-再灌注损伤的关键因素,而血管内皮则是缺

血-再灌注损伤的关键部位^[1]。研究表明,细胞在缺血或缺氧的情况下,将出现能量代谢障碍,引起细胞内钙超载和氧自由基的产生,并产生细胞因子,激活

收稿日期:2005-03-21

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(0140030)

作者简介:黄起壬(1967—),男,江西省南康市人,副教授,博士,研究方向为心血管药理学和分子药理学。

Tel: (0791) 6360590 Fax: (0791) 6361693 E-mail: huangqr67@163.com