

表 5 EAEPP 对脾内抗体形成细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 (mg/kg)	A_{413nm}
NS	—	0.39 ± 0.06
EAEPP	8	0.34 ± 0.05
	16	0.33 ± 0.05

3 讨论

近代研究表明,许多扶正药物对机体免疫功能有双向调节作用。中药之所以产生双向调节作用,与其所含有两种或多种功效、作用相反的化学成分是分不开的^[6]。墨旱莲对小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响在免疫抑制状态下呈提高作用,而在免疫增强状态下呈抑制作用,具有双向调节作用^[7]。我们首次发现墨旱莲乙酸乙酯总提物(为皂苷类成分)具免疫抑制活性,能显著抑制小鼠免疫器官脾的发育,并显著抑制巨噬细胞的吞噬功能,明显抑制 T 细胞介导的迟发性变成反应,降低血清溶血素水平,表明其显著抑制机体的非特异免疫、细胞免疫及体液免疫功能。

提示墨旱莲中含有功效相反的化学成分,其对免疫功能的双向调节作用是其各成分综合作用的结果。同时 EAEPP 可显著提高小鼠胸腺指数,促进胸腺的发育,揭示对不同的免疫器官有不同的作用,也为免疫双向调节作用的原因之一。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 2000 年版. 一部
- [2] 胡慧娟, 杭秉茜, 刘 勇. 旱莲草对免疫系统的影响[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(1): 55-57.
- [3] 张 梅, 邱晓辉, 刘 梅. 旱莲草中黄酮类成分的免疫调节作用[J]. 中草药, 1997, 28(10): 615.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [5] 薛 彬. 免疫毒理学实验技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [6] 张宏方. 从中医理论的异同看中药药理研究之思路[J]. 医学与哲学, 1996, 17(2): 86-88.
- [7] 熊晓玲, 李 文. 部分扶正固本中药对小鼠脾细胞 IL-2 产生的双向调节作用[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1991, 3(4): 37-38.

葛根素对乳鼠心肌细胞缺氧-复氧时脂质过氧化损伤的保护作用

朱智彤, 姚 智, 李会强, 娄建石*, 卢 奕*

(天津医科大学 免疫教研室, 天津 300203)

摘 要: 目的 观察葛根素(puerarin, Pue)对缺氧-复氧损伤造成的大鼠乳鼠心肌细胞脂质过氧化反应的作用。方法 分别测定各个时点对照组、模型组及各给药组(1, 0.1, 0.01 g/L Pue)培养上清中 SOD 活性和 MDA 含量, 细胞 MTT 代谢率的变化。结果 缺氧及复氧都可造成 SOD 活性下降, MDA 含量升高及 MTT 代谢率下降, 复氧后 2 h 最为显著($P < 0.01$)。3 种剂量 Pue 均能对抗这 3 个指标的异常变化, 但浓度越小, 作用越弱。结论 Pue 能减轻缺氧时产生的自由基损害, 减少 SOD 的消耗, 并可能促进其合成, 亦可保护心肌细胞的线粒体功能, 这些作用呈剂量依赖趋势。

关键词: 缺氧-复氧; 心肌细胞; 葛根素; 过氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)04-0343-04

Protective effect of puerarin on cardiomyocytes of neonatal mice injured by lipid peroxidation during hypoxia-reoxygenation

ZHU Zhi-tong, YAO Zhi, LI Hui-qiang, LOU Jian-shi, LU Yi

(Department of Immunology, Tianjin University of Medical Science, Tianjin 300203, China)

Key words: hypoxia-reoxygenation; cardiomyocyte; puerarin; superoxide dismutase; melondialdehyde

缺氧及其后更为严重的复氧损伤是各种缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury)的共性。文献报道脂质过氧化反应与缺氧-复氧损伤(hypox-

ia-reoxygenation injury)的发生、发展密切相关。而对葛根素是否通过增强心肌细胞的抗氧化能力来发挥其保护作用知之甚少。本研究采用给培养的心肌

* 收稿日期: 2000-10-23

作者简介: 朱智彤(1971-), 女, 天津人, 讲师, 在读博士, 研究方向: 免疫药理。Tel: (022) 23313909 E-mail: zhuzt-hello@yahoo.com

* 本校药理教研室

细胞换用缺氧及有氧培养基而造成缺氧-复氧损伤来探究葛根素(puerarin, 简称 Pue) 抗缺氧和(或) 复氧造成的心肌细胞损伤的作用途径及量效关系。

1 材料与方法

1.1 材料: 胰蛋白酶(Sigma); 95% N₂-5% CO₂, 95% O₂-5% CO₂ 高纯混合气(天津市华北氧气厂); 葛根素(化学名: 4, 7-二羟基-8-β-D-葡萄糖基异黄酮, 相对分子量: 416. 4, 广东燕塘生物化学药业有限公司, 批号: 9903121, 50 mg/mL); 噻唑蓝(MTT) (Sigma); 过氧化物歧化酶(SOD) 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 丙二醛(MDA) 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物: 出生后 1~4 d 的 Wistar 大鼠, 雌雄不拘, 购自军事医学科学院四所。

1.3 心肌细胞的培养: 参照文献^[1]略有改进。肝素(100 U/只) 抗凝后无菌取心室, 剪成 0. 5~1 mm³ 碎块。用终浓度含 0. 1% 胰蛋白酶、0. 02% EDTA 及 0. 1% 柠檬酸钠的消化液消化。用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基将心肌细胞沉淀混匀, 过 200 目钢丝网, 制成细胞悬液, 并用分次静置法纯化后, 配成 5×10⁵/mL 的浓度, 分装于铺鼠尾胶的培养瓶内, 每瓶 2 mL。放入培养箱中培养, 24 h 后换液, 48 h 后换为无血清 RPMI 1640 培养基。选生长状态佳者于 72 h 后进行实验。

1.4 实验方法: 参照文献^[2]略有改进。(1) 对照组: 实验开始时换用有糖 RPMI 1640 培养基 1. 8 mL+ PBS 0. 2 mL, 普通培养箱培养 2 h, 换上述液体, 继续培养。(2) 模型组: 换 N₂ 饱和(*P* O₂< 1. 1 kPa) 的无糖 RPMI 1640 培养基 1. 8 mL+ PBS 0. 2 mL, 置持续通以 95% N₂-5% CO₂ 混合气(4 mL/min) 的密闭孵育器中, 37℃, 2 h。再换 O₂ 饱和(*P* O₂> 93. 1 kPa) 的有糖 RPMI 1640 培养基 1. 8 mL+ PBS 0. 2 mL, 置持续通以 95% O₂-5% CO₂ 混合气(4 mL/min) 的密闭孵育器中, 37℃, 1 h。结束后, 放入普通培养箱培养。(3) 给药组: 实验开始, 及复氧开始时, 分别加入终浓度为 1, 0. 1, 0. 01 g/L Pue, 其余过程

同(2)。分别在缺氧结束后、复氧结束后 1, 6, 12, 24 h 取上清液测 SOD 活性及 MDA 含量, 细胞用于 MTT 代谢率的测定(实验重复 6 次)。

1.5 检测方法

1.5.1 SOD 活性用亚硝酸盐法测定, 具体步骤遵照试剂说明书。

1.5.2 MDA 用 TBA 法测定, 具体步骤遵照试剂说明书。

1.5.3 MTT 代谢率: 每瓶加 1 mL MTT(0. 5 mg/mL) 孵育 4 h, 37℃, 离心后弃上清。加入盐酸异丙醇, 酶标仪比色, 检测吸光度(*A*) 值。参考波长 630 nm, 实验波长 570 nm。

MTT 代谢率(%)= 实验组 *A* 值/对照组 *A* 值×100%

1.6 统计方法: 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较用 *t* 检验。多组间比较用双因素方差分析, 其中均数间两两比较用 Student-Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 SOD 活性的变化: SOD 活性从缺氧后受抑(*P*< 0. 01)。1 g/L Pue 则表现出强的升高 SOD 活性的作用, 甚至可使 SOD 活性显著高于对照组(*P*< 0. 01), 并一直保持在高水平。0. 1 g/L Pue 能使 SOD 活性恢复并保持在对照组水平(*P*> 0. 05)。0. 01 g/L Pue 在复氧后 2 h 才表现出这种作用, 但弱于前二个剂量, 见表 1。

2.2 MDA 含量的变化: 缺氧与复氧损伤后 MDA 值升高, 并在复氧后 6 h 达高峰。1 g/L Pue 在缺氧后即表现出显著降低 MDA 的作用, 甚至可使复氧后 24 h 的 MDA 含量降至对照组水平(*P*> 0. 05)。0. 1 g/L Pue 在缺氧后起效, 且均未达对照组水平(*P*< 0. 01)。而 0. 01 g/L Pue 在复氧后 6 h 才表现出这种作用, 且较前两组作用差(*P*< 0. 05), 见表 2。

2.3 MTT 代谢率的变化: 缺氧及复氧造成心肌细胞 MTT 代谢率降低, 并于复氧后 2 h 时最低(*P*< 0. 05)。各剂量的 Pue 都能显著地提高 MTT 代谢率。1 及 0. 1 g/L Pue 的作用在缺氧时即表现出这种作用(与模型组相比, *P*< 0. 01), 见表 3。

表 1 缺氧-复氧损伤后各组 SOD 活性的变化($\bar{x} \pm s, n= 6$)

组 别	剂 量 (g/L)	SOD(NU/mL)				
		缺氧后即刻	复氧后 2 h	复氧后 6 h	复氧后 12 h	复氧后 24 h
对照组	-	29. 3±4. 9	31. 8±5. 5	31. 0±6. 3	31. 1±4. 9	29. 2±5. 9
模型组	-	16. 0±4. 0	12. 2±3. 9	20. 5±3. 7	33. 8±5. 0	32. 2±2. 2
Pue	0. 01	19. 1±3. 6	20. 6±4. 9 **	21. 9±5. 1	31. 7±6. 3	26. 6±4. 5
	0. 1	28. 0±3. 2* *	30. 3±4. 5* *	35. 1±6. 5* *	37. 7±5. 7	30. 3±4. 9
	1. 0	37. 3±3. 0 **	47. 1±5. 6 **	43. 8±5. 4 **	41. 1±5. 4	38. 0±3. 6 *

与对照组相比: *P*< 0. 05 *P*< 0. 01; 与模型组相比: * *P*< 0. 05 ** *P*< 0. 01

表 2 缺氧-复氧损伤后各组 MDA 含量的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g/L)	MDA (nmol/mL)				
		缺氧后即刻	复氧后 2 h	复氧后 6 h	复氧后 12 h	复氧后 24 h
对照组	—	1.01 ± 0.45	1.21 ± 0.50	1.48 ± 0.57	1.67 ± 0.66	1.94 ± 0.66
模型组	—	3.13 ± 0.65	5.14 ± 0.79	8.01 ± 0.51	5.97 ± 0.80	5.65 ± 0.91
Pue	0.01	2.99 ± 0.55	4.83 ± 0.41	6.90 ± 0.89 *	5.12 ± 0.52 *	4.90 ± 0.49 **
	0.1	2.47 ± 0.42	3.67 ± 0.37 **	5.97 ± 0.76 **	4.00 ± 0.43 **	3.43 ± 0.45 *
	1.0	1.84 ± 0.40 **	2.77 ± 0.58 **	3.80 ± 0.63 **	2.94 ± 0.52 **	2.27 ± 0.59*

与对照组相比: $P < 0.01$; 与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 3 缺氧-复氧损伤后各组 MTT 代谢率的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g/L)	MTT 代谢率(%)				
		缺氧后即刻	复氧后 2 h	复氧后 6 h	复氧后 12 h	复氧后 24 h
对照组	—	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
模型组	—	50.3 ± 6.3	43.3 ± 4.7	49.7 ± 5.5	53.5 ± 3.7	59.1 ± 3.1
Pue	0.01	56.7 ± 8.0	52.6 ± 7.9	58.7 ± 5.7 *	61.7 ± 5.2 *	66.5 ± 6.2 *
	0.1	64.6 ± 5.2 **	62.3 ± 2.8 **	67.7 ± 8.0 **	74.3 ± 10.7 **	76.0 ± 7.4 **
	1.0	78.2 ± 8.1 **	76.6 ± 11.6 **	80.5 ± 7.5 **	85.3 ± 6.7 **	87.0 ± 5.4 **

与对照组相比: $P < 0.01$; 与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

对照组培养上清中即含有少量的 MDA, 说明正常生理过程即可内源性产生氧化产物。缺氧后首先引起能量代谢受抑, 激活蛋白水解酶, 使 ATP 分解为黄嘌呤、次黄嘌呤。由于 O_2^+ 在细胞膜中的溶解度远大于在水中的溶解度, 故即使在外界缺氧的情况下, 细胞中仍有少量的氧可参与自由基反应。因而在黄嘌呤及次黄嘌呤被进一步氧化成尿酸的同时, 也有少量 O_2^+ 产生, 但正如本实验及其它研究^[3,4]所证实的, 此时的自由基损伤是渐进性的。复氧后, MDA 产生激增, 并在其后 6 h 达峰值, 12 h 出现恢复趋势, 而稳定在一较低的水平。这说明复氧早期随着 O_2^+ 的涌入, 自由基大量产生, 脂质过氧化反应最为剧烈。

能分解 O_2^+ 的 SOD 是体内重要的抗氧化酶之一。SOD 升高能防止氧中毒或缺血-再灌注后的组织损伤, 如减少局部缺血造成的毛细血管渗透性增加、使受抑的心肌收缩力提前恢复等^[4~6]。SOD 活性在缺氧时即受到抑制, 这与文献报道相同^[2,4]。自由基的大量产生造成内源性抗氧化系统的大量消耗^[2,4,7], 故而在复氧早期 SOD 活性亦受显著抑制。SOD 活性在复氧后 6 h 回升, 12 h 即恢复至对照组水平。说明缺氧及复氧损伤早期 SOD 活性受抑, 致心肌细胞对 O_2^+ 的代谢能力下降, 可能是造成细胞脂质过氧化损伤的主要原因之一。而在复氧后期, 随着 SOD 活性的恢复及合成代偿性增加, 细胞抗氧化能力增强, 自由基产生减少, 则脂质氧化反应亦减轻。但 MDA 含量与 SOD 活力恢复的不同步, 说明了还可能新的自由基产生而延长了损伤的时间和

程度。

MTT 代谢率反映了细胞线粒体代谢能力的变化, 并在一定程度上可反映细胞生存力的变化^[8]。复氧后 2 h 细胞线粒体功能损伤最重, 但随着时间的延长, 具明显细胞毒性因子的产生较以前减少, 细胞结构和功能的损害亦减轻。而残余细胞功能的恢复, 甚至代偿性增加, 都可造成 MTT 代谢能力在复氧后期有一定程度的增强。

Pue 具有显著增加 SOD 活性的作用, 故而各个剂量都能对抗 O_2^+ 造成的脂质过氧化损伤, 并呈剂量依赖趋势。

总之, 自由基损伤在缺氧时即已开始, 复氧早期最为显著, 此时 SOD 活性及心肌细胞的 MTT 代谢能力亦明显受抑; 复氧后期, 自由基渐被清除, SOD 活性也恢复至对照组水平, MTT 代谢能力有一定程度的提高; Pue 能对抗自由基产生, 减少 SOD 的消耗, 大剂量还可促进其合成, 并可保护心肌细胞的线粒体功能, 这些作用呈剂量依赖趋势。

参考文献:

- [1] 徐叔云, 卞如瀛, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [2] Kirshenbaum L A, Singal P K. Changes in antioxidant enzyme in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation[J]. Lab Invest, 1992, 67(6): 796-803.
- [3] Vanden Hoek T L, Becker L B, Shao Z, et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia-induced preconditioning in cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18092-18098.
- [4] 郭来敬, 张志仁, 陈东辉, 等. 电子顺磁共振检测心肌缺血再灌注产生的氧自由基及其保护的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2000, 19(1): 58-61.
- [5] 徐惠芳, 王莉, 江伟, 等. 己酮可可碱对自由基致心肌损伤的保护作用及其机制[J]. 中华麻醉学杂志, 1998, 12(8): 730-733.

- [6] Wang P, Zweier J L. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 29223-29230.
- [7] Spark J I, Chetter I C, Gallavin L, *et al.* Reduced total an-

tioxidant capacity predicts ischemia-reperfusion injury after femorodistal bypass[J]. Br J Surg, 1998, 85(2): 221-225.

- [8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.

银杏内酯 A 对胆碱能神经功能 损伤引起的 SD 大鼠学习记忆的促进作用

高向东^{1,2}, 陈 鹏², 刘俊彦¹, 谭仁祥^{1*}

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093; 2. 中国药科大学生物制药学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究银杏内酯 A 对 Meynert 基底核 (NBM) 损伤引起的 SD 大鼠学习记忆的改善作用。方法 通过 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 单侧损伤 SD 大鼠 NBM 以破坏胆碱能神经功能, 采用 Y 型迷宫法检测动物空间辨别学习记忆能力, 利用放射化学法检测皮层胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活力, 观察银杏内酯 A 对胆碱能损伤记忆功能的恢复, 脑内 ChAT 的变化。结果 银杏内酯 A 对胆碱能损伤记忆功能具有恢复作用, 且能防止 ChAT 活力降低。结论 银杏内酯 A 能改善 NBM 损伤引起的大鼠学习记忆能力。

关键词: 银杏内酯 A; Meynert 基底核; 胆碱乙酰转移酶

中图分类号: R 282.71; R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)04-0346-03

Improving effects of ginkgolide A on nucleus basalis of Meynert lesion-induced learning and memory deficits in SD rats

GAO Xiang-dong^{1,2}, CHEN Peng², LIU Jun-yan¹, TAN Ren-xiang¹

(1. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210093, China;

2. College of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 210009, China)

Key words: ginkgolide A; nucleus basalis of Meynert; choline acetyltransferase

银杏内酯是银杏有效成分之一, 已从银杏的种皮及银杏叶中分离出 5 种银杏内酯 (A、B、C、M、J)。近年来, 国内外对银杏内酯的药理作用进行了大量的研究, 其药理作用广泛^[1], 对脑缺氧、局部缺血等有较好的改善效果, 银杏提取物用于治疗脑功能障碍和多种类型的痴呆, 使病人的反应加快, 记忆改善, 症状好转。这些研究多数是以银杏内酯和银杏提取物为研究对象。为了进一步研究该作用的活性成分, 本研究通过 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 单侧损伤 SD 大鼠 Meynert 基底核 (NBM) 以破坏胆碱能神经功能, 观察银杏内酯 A 对胆碱能损伤记忆功能的恢复, 脑内乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 的变化, 探讨了银杏内酯对中枢神经系统保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 试药: 银杏内酯 A, 由刘俊彦博士分离获得,

经核磁共振等光谱法分析与文献^[2]数据一致, 其纯度为 93%。

1.2 动物: 雄性 SD 大鼠, 体重 250~300 g, 购于南京医科大学实验动物中心。

1.3 试剂: *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA), Sigma 公司; 水合氯醛, 上海试剂一厂; 牙科磷酸锌水泥, 上海齿科材料厂; 青霉素钠, 哈尔滨制药总厂; 硫酸链霉素钠, 山东鲁抗; [³H] 乙酰辅酶 A, Am-pharmacia 公司; 乙酰辅酶 A, Sigma 公司; 毒扁豆碱, Fluka 公司; 氯化胆碱, 上海试剂三厂; 四苯硼钠, 上海试剂一厂; 2, 5-二苯基噻唑 (闪烁纯), 上海试剂一厂; 1, 4-双-(5-苯基噻唑基-2) 苯 (闪烁纯), 上海试剂一厂; 其余试剂皆为国产分析纯。

1.4 仪器: 江湾 型立体定向仪, 上海医用仪器厂; 307-6 台式牙钻车, 上海齿科器械厂; MG-3 迷宫刺激器, 张家港市教学实验器械厂; LS5000TD 液体闪

* 收稿日期: 2001-09-11

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK99096); 教育部高等学校骨干教师资助计划项目资助

作者简介: 高向东(1963-), 女, 现任中国药科大学生物制药学院教授, 博士, 主要从事衰老的分子生物学和生物新药的研究。

Tel: 025-3271298 E-mail: xiangdong-gao@hotmail.com