

改善大鼠的神经功能缺损, 缩小脑梗死面积 ($P < 0.05, 0.01$), GCs 具有神经保护作用。

3.2 对抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响: 结果见表 2。大鼠手术 24 h 后, 脑组织 SOD 活性明显下降, MDA 含量显著升高, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.01$)。GCs 显著升高脑组织 SOD, GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05, 0.01$)。

表 2 GCs 对脑缺血大鼠脑组织 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of GCs on activities of SOD and GSH-Px, and content of MDA in brain tissue of cerebral ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	SOD /(U · mg ⁻¹)	GSH-Px /(U · mg ⁻¹)	MDA /(mmol · mg ⁻¹)
假手术	-	7.84 ± 0.31**	2.02 ± 0.49	0.39 ± 0.04**
模型	-	6.72 ± 0.74	1.73 ± 0.51	0.62 ± 0.10
GCs	125	8.08 ± 0.43**	2.69 ± 0.94*	0.38 ± 0.09**
	250	7.88 ± 0.45**	3.05 ± 0.72**	0.29 ± 0.12**
银杏叶片	50	6.99 ± 0.69	3.08 ± 0.35**	0.47 ± 0.04**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

脑卒中患者以局部脑缺血为多见, 而人类缺血性脑卒中的好发部位多在大脑中动脉及其分枝, 故选择阻断大脑中动脉形成局灶性脑缺血的模型与人类脑卒中最为相似。本实验采用插线法阻断大脑中动脉造成脑缺血损伤模型, 研究 GCs 对脑缺血损伤的影响。结果观察到大鼠手术后 12, 24 h 所有动物均出现了神经症状, 脑组织出现明显的梗死灶, 缺血 24 h 时尤为明显, 说明模型制备成功。

氧自由基在脑缺血损伤中起着重要作用。正常机体氧自由基产生与清除处于动态平衡, 脑缺血时,

防御系统受损, 氧自由基生成增加, 攻击生物膜, 发生脂质过氧化, 多价不饱和脂肪酸被破坏, 生成毒性中间产物 (如脂氢过氧化物) 及终末产物丙二醛等。丙二醛可交联蛋白质和磷脂上的氨基, 降低膜流动性, 致细胞变形, 功能受损, GCs 经证实有抗氧化作用, 包括抗脂质过氧化、清除超氧阴离子、抑制并清除羟自由基的作用^[1]。本实验测定了大鼠脑缺血状态下 SOD、GSH-Px 活性的变化, 结果在脑缺血 24 h 时, 脑组织 SOD 的活性明显降低, GSH-Px 变化不大, MDA 含量显著升高。而 GCs 能显著改善大鼠的神经症状, 缩小脑梗死范围, 提高 SOD、GSH-Px 活性, 并降低 MDA 含量。表明 GCs 具有神经保护作用, 可能是通过升高脑组织抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化反应来保护脑组织免受缺血的损伤。GCs 的这种抗氧化作用可能与其结构中含有酚羟基有关, 具体机制有待进一步研究。

References

- [1] Wang X W, Jiang X Y, Wu L Y, et al. Scavenging effects of glycosides of cistanche on free radicals and its protection against OH · induced DNA damage in vitro [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(1): 29-31.
- [2] Mao X M, Wang X W, Li L L, et al. The protective effect of glycosides of cistanche on myocardial ischemia in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 118-119.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [4] Wu H P, Zhu X G. The protective effect of total glucosides of paeony on cerebral infarction in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(2): 223-225.
- [5] Xia Y M, Zhu L Z. The determination of glutathione peroxidase in blood and tissue-DTNB direct method [J]. *J Hygiene Res* (卫生研究), 1987, 16(4): 29-32.
- [6] Chen S Z, Jin Y Y. Comparison of three methods in coloration of lipid peroxidation using TBA [J]. *J Clin Lab Sci* (临床检验杂志), 1984, 2(4): 8-10.
- [7] Macart M, Gerbaut L. An improvement of the coomassive blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid [J]. *Clin Chem Acta*, 1982, 112(1): 93-101.

丹酚酸 B 及欧芹素乙对溶血磷脂酰胆碱刺激牛主动脉平滑肌细胞增殖的影响

王杰松¹, 芮耀诚², 倪震宇³, 刘昌叶¹, 常 华^{1*}

(1. 解放军第 306 医院, 北京 100101; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433;

3. 成都军区联勤部药品仪器检验所, 四川 成都 610003)

摘要: 目的 研究溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 对牛主动脉平滑肌细胞 (BASMC) 增殖的影响及丹酚酸 B 和欧芹素乙的抑制作用。方法 体外培养 BASMC, 用 MTT 法测定细胞增殖。结果 LPC 在 $2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{ g/L}$ 剂

* 收稿日期: 2003-09-26

作者简介: 王杰松(1966—), 男, 安徽怀宁人, 博士, 副主任药师, 主要从事心脑血管药理学研究。 Tel: (010) 66356171

量依赖性地促进 BASMC 增殖; 丹酚酸 B ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 和欧芹素乙 ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 浓度依赖性地抑制 LPC 的作用。结论 LPC 可促进 BASMC 增殖, 丹酚酸 B 和欧芹素乙可抑制 LPC 的作用。

关键词: 溶血磷脂酰胆碱; 平滑肌细胞; 丹酚酸 B; 欧芹素乙

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0662-03

Effect of salvianolic acid B and imperatorin on proliferation of bovine arterial smooth muscular cells stimulated by lysophosphatidylcholine

WANG Jie-song¹, RU I Yao-cheng², NI Zhen-yu³, LIU Chang-ye¹, CHANG Hua¹

(1.No. 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China; 2 School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3 Institute for Drug and instrument Control, Chengdu Military Area, Chengdu 610003, China)

Key words: lysophosphatidylcholine (LPC); smooth muscular cells; salvianolic acid B; imperatorin

血管平滑肌细胞 (VSMC) 是血管中膜的单一细胞, VSMC 增殖不仅是动脉粥样硬化 (AS) 发生发展的基本组成成分, 而且是病变部位最早出现的成分。溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 是氧化修饰低密度脂蛋白 (LDL) 的重要组成成分, 能引起多种病理生理反应。LPC 可由血管内皮细胞、平滑肌细胞或其他血液细胞成分产生。LPC 作用主要表现在心血管系统, 如对心肌细胞电生理的影响^[1], 损伤心肌细胞改变心肌收缩性能^[2]。缺血心肌局部 LPC 堆积, 能引起类似缺血的电生理效应^[3]。

欧芹素乙为中药前胡和白芷根部的有效成分, 具有抗炎作用^[4]。欧芹素乙体外对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 α (IL-1 α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 诱导的牛脑微血管平滑肌细胞增殖具有拮抗作用^[5-7]。丹酚酸 B 是丹参的水溶性有效成分之一。体外实验显示丹酚酸 B 具有强的抗氧化作用, 并且对心脑血管循环系统有一定的保护作用, 可防止血栓形成, 血管痉挛等^[8]。本实验主要研究 LPC 对牛主动脉平滑肌细胞 (BASMC) 增殖的影响, 并观察丹酚酸 B 和欧芹素乙的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: Eagle's MEM 培养基、胰蛋白酶 (1:250) 均为 Gibco 产品; L- α 溶血磷脂酰胆碱: Sigma 公司产品; 新生小牛血清 (NBS): 上海华美生物技术公司产品; 噻唑蓝 (MTT): Sigma 公司产品; 丹酚酸 B 和欧芹素乙: 纯度 > 99.5%, 第二军医大学药学院天然药物化学教研室提供。

1.2 BASMC 的分离培养^[9]: 新生小牛放血处死, 使用无菌器械取其胸主动脉。在超净台上无菌条件下小心剥除主动脉外膜上的结缔组织, 在没有侧枝血管一侧剪取方形的主动脉块, 放入 D-Hanks 缓冲液中漂洗 2~3 次, 剔除内膜和外膜, 将只含平滑肌的中膜剪成 1 mm \times 1 mm 左右的小块, 贴附于细胞

培养瓶底面, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 孵箱中贴壁 30 min, 加入含 20% NBS 的 MEM 培养基, 每 3 d 换液 1 次。待细胞从边缘爬出, 小心剔除组织块, 继续培养至细胞铺满瓶底, 此时进行传代培养。用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 待细胞间隙增大, 弃去胰蛋白酶溶液, 加含 10% NBS 的 MEM 培养基, 吹打使分散均匀, 每 1 瓶传 3 瓶。实验中使用 2~6 代细胞。

1.3 LPC 对 BASMC 增殖的影响: BASMC 以每孔 1×10^4 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 孵育 24 h, 吸弃培养液, 加入含不同浓度 LPC ($2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{ g/L}$) 的培养液, 继续孵育 44 h, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL , 4 h 后小心吸弃培养液, 每孔加入 100 μL DM SO, 振荡 10 min, 使紫色结晶充分溶解, 在 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。

1.4 丹酚酸 B 和欧芹素乙对 LPC 诱导 BASMC 增殖的抑制作用: BASMC 以每孔 1×10^4 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 孵育 24 h 后, 吸弃培养液, 加入用培养液稀释的 $2.5 \times 10^{-7} \text{ g/L}$ LPC, 再分别加入丹酚酸 B ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 和欧芹素乙 ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), 继续孵育 48 h, 在终点前 4 h 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL , 下面操作同 1.3 项, 测吸光度 (A) 值。

1.5 统计学处理: 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 LPC 促进 BASMC 增殖: LPC ($2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{ g/L}$) 剂量依赖性地促进 BASMC 增殖, 在 $2.5 \times 10^{-8} \text{ g/L}$ 时促进作用达到极显著水平 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 丹酚酸 B 和欧芹素乙对 LPC 刺激 BASMC 增殖的抑制作用: 丹酚酸 B 和欧芹素乙均能剂量依赖性地抑制 LPC ($2.5 \times 10^{-7} \text{ g/L}$) 促进 BASMC 增殖作用, 丹酚酸 B 在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 时作用达到

表 1 LPC 对 BASMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 1 Effect of LPC on BASMC proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	终浓度/($g \cdot L^{-1}$)	A ₄₉₀
空白	-	0.28 ± 0.01
LPC	2.5×10^{-9}	0.30 ± 0.04
	2.5×10^{-8}	0.38 ± 0.02**
	2.5×10^{-7}	0.44 ± 0.02**
	2.5×10^{-6}	0.45 ± 0.04**

与空白组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs blank group

显著水平 ($P < 0.05$), $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 时作用即达到极显著水平 ($P < 0.01$)。欧芹素乙在 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时作用显著 ($P < 0.05$), 在 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时作用非常显著 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 丹酚酸 B 和欧芹素乙对 LPC 刺激 BASMC 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 2 Inhibitory effect of salvianolic acid B and imperatorin on proliferation of BASMC stimulated by LPC ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	终浓度		组别	终浓度	
	/($\text{mol} \cdot L^{-1}$)			/($\text{mol} \cdot L^{-1}$)	
空白	-	0.29 ± 0.02	欧芹素乙	1×10^{-7}	0.45 ± 0.03
LPC	-	0.47 ± 0.06		1×10^{-6}	0.41 ± 0.04
丹酚酸 B	1×10^{-9}	0.44 ± 0.02		1×10^{-5}	0.39 ± 0.01*
	1×10^{-8}	0.38 ± 0.02*		1×10^{-4}	0.38 ± 0.01*
	1×10^{-7}	0.36 ± 0.01**		1×10^{-3}	0.34 ± 0.01**
	1×10^{-6}	0.36 ± 0.01**			

与空白组比较: $P < 0.01$;与 LPC 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $P < 0.01$ vs blank group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LPC group

3 讨论

增殖的 VSMC 是 AS 早期斑块中的主要成分。损伤部位继续发展为 AS 斑块还是被抑制取决于有丝分裂原诱导的平滑肌细胞增殖^[10]。血清中存在不同类型的平滑肌细胞有丝分裂原, 如某些血管活性激素如儿茶酚胺, 多肽类有丝分裂原如生长因子、L-1、内皮素 (ET) 等。本实验结果表明, LPC 在 ng 水平即能显著促进平滑肌细胞增殖, 说明 LPC 是一种作用较强的 BASMC 有丝分裂原, 其可能通过刺激血管平滑肌细胞增殖, 在 AS 发生发展过程中起

重要的作用。由此可见, 抑制 LPC 促增殖活性的药物对 AS 预防治疗具有重要价值。本实验选用了两种不同类型的心血管系统保护药物——丹酚酸 B 和欧芹素乙进行研究, 丹酚酸 B 在体内外均具有较强的抗氧化作用, 欧芹素乙具有较强的抗炎作用。本实验结果表明两种药物均能剂量依赖性地抑制 LPC 的促增殖作用。由于丹酚酸 B 和欧芹素乙属于作用机制完全不同的两种类型的药物, 提示 LPC 的促增殖作用可能是多途径的, 但 LPC 及药物的具体作用机制需进一步研究。

References

- [1] Fu J F, Xu Y Q. Observation on varapamil against the electrophysiological effects of LPC on cardiac muscle under normal and "ischemia" conditions [J]. *Acta Univ Med Second Shanghai* (上海第二医科大学学报), 1992, 17(3): 173-177.
- [2] Yan X D, Guo Z G. Endocardial endothelium modulates lysophosphatidylcholine induced positive inotropism [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 1997, 22(3): 189-191.
- [3] Sato T, Arita M, Kiyosue T. Differential mechanism of block of alamitoyl lysophosphatidylcholine and of palmityl-caraitine on inward rectifier K^+ channels of guinea pig ventricular myocytes. [J]. *Cardiovasc Drug Ther*, 1993, 7 (Suppl) (3): 575-580.
- [4] Froehlich H H, Muller-Limmroth W. The sedative effect of the kneipp hay sack and balneological preparations of hay [J]. *Munch Med Wochenschr*, 1976, 118(1): 317-320.
- [5] Ji Y, Zeng G Q, Sun D X, et al. Drug antagonism of TNF induced proliferation of bovine cerebrovascular smooth muscle cells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29 (2): 86-89.
- [6] Ji Y, Zeng G Q, Sun D X, et al. Interleukine-1 alpha induced proliferation of bovine cerebrovascular smooth muscle cells and antagonism of drugs [J]. *Acad J Second Mil Med Uni* (第二军医大学学报), 1994, 15(1): 1-3.
- [7] Ji Y, Zeng G Q, Rui Y C, et al. Interleukine-1 beta induced proliferation of bovine cerebrovascular smooth muscle cells and antagonism of drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1994, 10(4): 271-273.
- [8] Terkeltaub R, Banka C L, Solan J, et al. Oxidized LDL induces monocyte cell expression of interlenkin-8 a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994, 14(1): 47-53.
- [9] Mark F F, Lawrence N, Sampson M D, et al. Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models [J]. *J Surg Res*, 1997, 67(2): 169-178.
- [10] Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis, a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.

多种密度、浓度计 总有一款适合您

我厂专业生产多种型号的溶液密度计、电导率仪和溶液浓度计, 可广泛地适用于工业、医药生产过程中, 包括酒精、中药提取液在内的多种溶液的密度或浓度的自动在线检测。还有供室内使用的台式密度计(特别推荐)。

上海浦东新区三海智能仪表厂

厂址: 上海张江高科技园区 电话: (021)58377810 网址: www.sanghai.com 3721 网络实名: 密度计、溶液浓度计