

致谢:天津中医学院中心实验室及范英昌等老师的大力协助。

References:

- [1] Pozarowski P, Halicka D H, Parzykiewicz Z. NF-kappaB inhibitor sesquiterpene parthenolide induces concurrently a typical apoptosis and cell necrosis: difficulties in identification of dead cells in such cultures [J]. *Cytometry*, 2003, 54A (2): 118-141.
- [2] Song X K, Wu L J, Tu P F. Studies on bioactive constituents in bark of *Tsoongiodendron odoratum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(8): 283-285.
- [3] Witek-awada B, Koj A. Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2003, 54(4): 489-534.
- [4] Fan X. Methvalalvoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409(2): 274-286.
- [5] Martin-Ventura I L, Blanco-Colio L M, Munoz-Garcia B. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability [J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 458-520.
- [6] Yang C, Yuan C, Jia Z. Xanthanolides, germacranolides, and other constituents from *Carpesium longifolium* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(12): 1554-1560.

人参花蕾皂苷对脑缺血-再灌注损伤大鼠的抗氧化作用及其机制

张丽君¹, 吕文伟², 王 志², 金永日³, 孙连坤^{2*}

(1. 延边大学医学院附属医院 心内科, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林大学基础医学院, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学化学学院, 吉林 长春 130021)

有研究表明脑缺血-再灌注损伤的发病机制中氧自由基起着重要的作用^[1]。人参花和花蕾平时被人们作为有益健康的中药加入到茶、洗发露中使用, 而不作为药物来使用。Yahara 等^[2]在干燥的高丽参的花和花蕾混合物中分离出 20(S) 人参皂苷 Rd、Re 和 Rg₁, 但它们的药理作用还不清楚。本实验探讨本校化学教研室提取的人参花蕾皂苷 (flower-buds ginsenoside, FBG) 是否具有减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤的作用, 并通过观察脑皮质中脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 量的变化及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和 mRNA 基因的表达探讨其作用机制。

1 材料

1.1 试剂和药品: 谷胱甘肽和 GSH 购于 Sigma 公司。TBA、TCA 和 DTND 购于 Wako 公司。人参花蕾皂苷 [FBG, 含有 20(S)-人参皂苷 Rd 7.2%、20(S)-人参皂苷 Re 39.1%、20(S)-人参皂苷 Rg₁ 3.3%] 由吉林大学化学中心提供。GSH、MDA 和 SOD 检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 实验动物: 健康 Wistar 大鼠, 体重 (25±10) g, 雌雄不拘, 由吉林大学实验动物中心提供, 合格证

号 SCXK—(吉) 2003-2004。

2 方法

2.1 分组、给药及造模: 大鼠 32 只, 随机分为对照组, 模型组, FBG 低、高剂量组, 每组 8 只。FBG 组于造模前分别按 25、50 mg/kg ip 给予生理盐水溶解的 FBG, 每天 1 次, 持续 7 d。模型组和对照组大鼠 ip 等量生理盐水。模型组和 FBG 组大鼠通过改良的四血管结扎法^[3]进行 10 min 短暂脑缺血处理。大鼠用 50 mg/kg 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 椎动脉用电烙术进行永久性封闭, 颈动脉用尼龙和聚乙烯管制的扣子结扎, 尼龙和聚乙烯管制的扣子可通过细小的皮肤切口进行放松和收紧。此后用 30% O₂ 和 70% N₂ 混合的三氟溴氯乙烷进行吸入性麻醉。左、右侧颈动脉被同时收紧 10 min, 即大鼠缺血 10 min 后, 再放松, 使脑动脉血流进行 4 h 再灌注, 观察大鼠死亡率。另取 32 只大鼠, 分组、造模及给药方法同上, 脑动脉血流再灌注 1 h 后, 过量戊巴比妥钠麻醉处死大鼠, 断头取脑皮质, 冻于液氮中备用。

2.2 脑皮质中 MDA 和 GSH 水平的测定: 脑皮质组织冰浴匀浆, 分别根据试剂盒方法测定脑皮质匀浆中 GSH 和 MDA 的水平、SOD 活性及匀浆液中总蛋白水平。

收稿日期: 2005-03-15

作者简介: 张丽君 (1963—), 女, 吉林省九台市人, 主治医师, 研究方向为心血管疾病诊断及治疗。Tel: (0433) 2660224

* 通讯作者 孙连坤 Tel: (0431) 5619485

2.3 脑皮质 SOD mRNA 表达的检测:脑皮质总 RNA 提取参照 Ultraspec™-I RNA Isolation System (Biotech Laboratories, INC) 说明书进行,逆转录成 cDNA,进行 PCR 反应。SOD 引物设计为正向:GTGAAGAGCTGTCTGGGCTGT,反向:ATGTTGAGCCGGCAGTGTGC,片段大小为 255 bp; GAPDH 的引物设计为正向:GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT,反向:AAGAATGGGTGTTGCTGTTGAAGTC,片段大小为 700 bp。SOD 的 PCR 反应条件:变性 95 ℃、60 s,退火 65 ℃、60 s,延伸 72 ℃、120 s,25 个循环。GAPDH 的 PCR 反应条件:变性 94 ℃、30 s,退火 56 ℃、30 s,延伸 72 ℃、45 s,25 个循环。

2.4 统计分析:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行统计处理。

3 结果

3.1 各组大鼠存活率:模型组大鼠缺血 10 min 后再灌注 4 h,大鼠死亡率为 50% (4/8);而 FBG 组大鼠死亡率明显低于模型组,均为 12.5% (1/8)。

3.2 脑皮质中 MDA 和 GSH 水平的变化:与对照组相比,模型组大鼠脑皮质中 MDA 水平明显增加;SOD 活性和 GSH 水平明显下降。与模型组相比,FBG 组 MDA 水平明显降低,SOD 活性和 GSH 水平明显增加,结果见表 1。

3.3 脑皮质 SOD mRNA 的表达:与对照组比较,模型组大鼠脑皮质 SOD mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,FBG 组大鼠脑皮质 SOD mRNA 表达呈剂量依赖性增加 ($P < 0.05$),见图 1。以各组 SOD 电泳条带密度值(灰度 $\times$ 面积)与 GAPDH (参照物)密度值的比值表示 SOD mRNA 表达水平。对照组、模型组及 FBG (25、50 mg/kg) 组的 SOD mRNA 表达水平分别为 0.79 ± 0.13 、 0.52 ± 0.05 、 0.89 ± 0.08 、 1.09 ± 0.13 。

表 1 大鼠脑皮质中 MDA 和 GSH 水平及 SOD 活性的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Changes of MDA and GSH levels and SOD activity in cortex of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

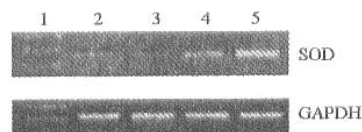
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	GSH/ (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	3.84 ± 0.95	71.44 ± 2.45	5.28 ± 0.21
模型	—	$6.06 \pm 1.47^{\Delta\Delta}$	$51.72 \pm 1.85^{\Delta}$	$3.47 \pm 0.75^{\Delta\Delta}$
FBG	25	$4.45 \pm 1.08^{\Delta}$	$69.53 \pm 1.84^{\Delta}$	$4.17 \pm 0.83^{\Delta}$
	50	$5.01 \pm 2.14^{\Delta}$	$70.48 \pm 2.18^{\Delta}$	$4.71 \pm 1.03^{\Delta}$

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group

$\Delta P < 0.05$ vs model group



1-Maker 2-对照 3-模型 4、5-FBG (25, 50 mg/kg)
1-Maker 2-control 3-model 4,5-FBG (25, 50 mg/kg)

图 1 SOD 和 GAPDH RT-PCR 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis analysis of SOD and GAPDH RT-PCR product

4 讨论

谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。细胞内 99.5% 以上是以 GSH 的形式存在。左颈动脉的持续闭塞可以引起谷胱甘肽的减少^[4]。表明 GSH 可能在缺血大脑的自由基清除中起着重要的作用。人参皂苷单体成分对神经细胞有明显的抗缺血效应,其作用机制可能与其提高神经细胞抗氧化能力、减少自由基的生成,保护细胞的结构与功能有关。人参皂苷可明显提高蒙古沙土鼠急性脑缺血脑组织中 Ach 水平和 ChAT 的活性^[5],表明人参皂苷可能通过多靶点药物治疗效果对急性脑缺血有保护作用。

本实验结果显示,脑缺血-再灌注大鼠脑皮层中 MDA 水平显著增加,而 GSH 水平却显著下降。FBG 组大鼠脑皮层 MDA 水平明显低于模型组,SOD 活性和 GSH 水平明显增加;SOD mRNA 表达呈剂量依赖性增加。表明 FBG 与人参根皂苷的药理效果非常相近。可能是通过上调 SOD 基因的表达,增加脑组织细胞 SOD 活性,抑制由脑缺血-再灌注损伤引起的脂质过氧化物的产生和 GSH 的降低,减轻由脑缺血-再灌注引起的脑组织细胞损伤。

References:

- [1] Mollace V, Iannone M, Muscoli C, et al. The protective effect of M40401, a superoxide dismutase mimetic, on post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils [J]. *BMC Pharmacol*, 2003, 3: 8-17.
- [2] Yahara S, Kaji K, Tanaka O. Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* C. A. meyer [J]. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27: 88-92.
- [3] Tomiyama Pulsinelli W A, Brierly J B, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia [J]. *Ann Neurol*, 1982, 11(5): 491-498.
- [4] Shivakumar B R, Kolluri S V R, Ravindranath V. Glutathione homeostasis in brain during reperfusion following bilateral carotid artery occlusion in the rat [J]. *J Mol Cell Biochem*, 1992, 111: 125-129.
- [5] Li T W, Kong L K, Qiong W, et al. Protective effects of ginsenosides on O₂⁻ and H₂O₂ injury in cultured rat cerebral neurons [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1998, 24(2): 130-132.