

- [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

中性粒细胞,激活的粒细胞可以变形、变僵,沉积在毛细血管及小血管,从而改变血管的通透性进而损伤血管内膜的完整性和功能;激活的中性粒细胞还能黏附到血管和心内膜内皮细胞并迁移到皮下,分泌各种活性物质进一步损害内皮细胞和心肌细胞。在缺血-再灌注损伤过程中,中性白细胞与血管内皮细胞的黏附是关键的一步。

油茶皂苷(sasanquasaponin, SQS)是从油茶籽中提取的一种有效单体成分,化学结构上属于三萜烯类,具有与人参皂苷、三七皂苷等相似的化学结构。相对分子质量为1 204.035 2。前期研究发现, SQS对心肌缺血-再灌注损伤具有保护作用,其机制与抗钙、抗氧自由基及诱导内源性心肌保护物质的生成有关^[2~5]。近期在小鼠缺血-再灌注损伤实验中,发现 SQS能降低缺血-再灌注损伤所致心律失常的发生率,其机制是通过调控心肌细胞内氯离子的平衡来实现的^[6]。但其对缺氧-复氧诱导内皮细胞损伤的作用及对中性粒细胞黏附的影响,尚未见报道。因此,本研究拟建立人脐静脉内皮细胞(HUVEC)缺氧-复氧损伤模型,研究 SQS对 HUVEC损伤的作用及对中性粒细胞黏附的影响并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品与主要试剂: SQS粉剂,从茶籽饼中按 Ueda 的方法^[7]分离提取并纯化,质量分数可达 97.8%。IMDM 培养基(Gibco);胎牛血清(杭州四季青);胰蛋白酶(Sigma 进口分装);Ⅱ型胶原酶、HEPES、EDTA、鼠抗人 vWF、MTT、多聚赖氨酸均为 Sigma 公司产品, hVEGF 为 Biosource 公司产品,兔抗鼠 IgG1-FITC (Santa Cruz), 乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 主要仪器: SW—CJ—TA 水平流超净工作台(吴江市净化设备总厂), NAPCO 二氧化碳培养箱(美国), DIAPHOT—TMD 型倒置显微镜(Nikon 公司), BX51 型荧光显微镜(Olympus 公司), Sartorius BS110 型电子天平(德国), Beckman 低温低速离心机(Beckman 公司)。

2 方法

2.1 HUVEC 原代和传代培养: 参照 Jaffe 等方法^[8]略加改进。取分娩 4 h 内健康新生儿脐带, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 1 g/L 胶原酶Ⅱ灌注消化, 离心收集。用含 200 mL/L 胎牛血清(FBS)、100

U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素、20 μg/L VEGF、50 mg/L 肝素的 Iscove 改良培养基(IMDM), 调整细胞数为 2×10^6 /mL, 接种于用 1 g/L 多聚赖氨酸包被的培养瓶中。待细胞 80% 以上融合时, vWF 免疫荧光化学鉴定。取第 3 代细胞用于实验。

2.2 HUVEC 缺氧-复氧损伤模型的建立: 参照 Koyama 等方法^[9]。首先配制模拟缺氧溶液(mmol/L: NaH_2PO_4 0.9、 NaHCO_3 6.0、 CaCl_2 1.0、 MgSO_4 1.2、HEPES 20.0、NaCl 98.5、KCl 10.0、乳酸钠 40.0, pH 6.8, 37℃)和模拟复氧溶液(mmol/L: NaCl 129.5、KCl 5.0、 NaH_2PO_4 0.9、 NaHCO_3 20.0、 CaCl_2 1.0、 MgSO_4 1.2、HEPES 20.0、葡萄糖 5.5, pH 7.4, 37℃)。取第 3 代 HUVEC, 当细胞长至 80% 融合时用预先经 95% N_2 和 5% CO_2 混合气体饱和 1 h 的模拟缺氧溶液置换正常培养液即缺氧; 用预先经 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体饱和 1 h 的模拟复氧溶液置换缺氧液即为复氧。

2.3 实验分组: 实验共分 5 组, 每组设复孔, 重复 3 次。分别为对照组: 弃去原培养液, 换用复氧溶液置于培养箱(95% O_2 、5% CO_2 , 37℃) 3 h, 再换上复氧溶液孵育 2 h。缺氧-复氧损伤组(模型组): 弃去原培养液, 换预先经 95% N_2 和 5% CO_2 混合气体饱和过的模拟缺氧溶液, 然后置于 95% N_2 和 5% CO_2 混合气体持续通气的缺氧密闭容器中(37℃) 3 h, 再换上预先经 95% O_2 和 CO_2 混合气体饱和过的模拟复氧溶液, 于 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体中复氧孵育 2 h。SQS 组: 在缺氧-复氧前 3 h 和整个缺氧-复氧期间分别加入终浓度为 10.0、1.0、0.1 μmol/L SQS, 其余处理同模型组。

2.4 细胞培养上清液中 LDH 活性测定: 实验处理结束后各组分别收集细胞培养液, 500×g 离心, 取 200 μL 上清液, 严格按 LDH 试剂盒说明书操作检测其活性。

2.5 MTT 法检测 HUVEC 存活率: 将第 3 代 HUVEC 接种于 96 孔培养板中, 接种密度为每孔 2.0×10^5 个细胞, 每孔液体 200 μL。细胞长至 80% 融合时按 2.3 项下方法进行处理。处理后, 弃原培养液, 用 PBS 洗涤各孔 3 次, 加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL, 孵育 4 h, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值。设不加细胞只加孵育液的空白对照调零, 记录结果。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%

2.6 人外周血中性粒细胞的分离: 健康人静脉血

20 mL, 肝素抗凝, 用 Percoll 分离液分离中性粒细胞 (1.080 g/mL), PBS 洗涤两遍后重悬于 50 mL/L FBS 的 IMDM 培养基中, 调整细胞数为 2.5×10^6 /mL。Giemsa 染色中性粒细胞纯度 90% 以上, 台盼蓝染色细胞活力大于 95%。

2.7 中性粒细胞与 HUVEC 黏附率的测定: HUVEC 处理结束后, 吸弃各孔液体, PBS 洗孔 3 次, 加入中性粒细胞悬液 200 μ L (5.0×10^5 个), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。吸除未黏附的中性粒细胞, PBS 洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 0.25% Rose Bengal (PBS 配制), 室温孵育 5 min。吸除染料, PBS 洗 3 次, 加入 PBS-乙醇 (1:1), 每孔 200 μ L, 室温孵育 30 min, 酶标仪 570 nm 波长测定各孔 A 值。中性粒细胞所摄取的 Rose Bengal 染料在 PBS-乙醇作用后可释放出来, 因此, 每孔 A 值与所黏附的中性粒细胞数量成正比, 计算各组的细胞黏附率。

黏附率 = (HUVEC 黏附中性粒细胞 A 值 - HUVEC A 值) / 加入总中性粒细胞 A 值 $\times 100\%$

2.8 HUVEC 线粒体蛋白的制备: 经 2.3 项下方法处理后的 HUVEC 用 PBS 洗 2 次, 用细胞刮收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心 (1 500 $\times g$, 5 min), 收集细胞沉淀于 1.5 mL Eppendorff 管中。加入 1.0 mL Pipes-Triton buffer (10 mmol/L Pipes, 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L PMSF, 10 μ g/mL Leupeptin, 0.1% Triton, pH 7.9), 吹打混匀细胞, 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。4 $^{\circ}$ C 10 000 $\times g$ 离心 20 min, 弃上清液, 即得粗线粒体沉淀, 超速离心 (15 000 $\times g$, 30 min) 一次, 得到较纯的线粒体沉淀。用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 储于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

2.9 HUVEC 线粒体 MDA 水平、SOD 和 GSH-Px 活性测定: 取 200 μ L 线粒体悬液严格按试剂盒上说明分别进行各指标测定。

2.10 统计分析: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 SPSS 11.5 进行方差齐性检验, 单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较用 LSD 法。

3 结果

3.1 SQS 对缺氧-复氧诱导 HUVEC 损伤的影响: HUVEC 缺氧-复氧损伤 5 h 后, 培养液中 LDH 活性显著升高, 与对照组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 但 HUVEC 存活率无明显下降。不同浓度的 SQS (10.0、1.0、0.1 μ mol/L) 预先孵育 HUVEC 3 h 后, 再缺氧-复氧损伤 5 h, 可见 SQS 呈浓度依赖性地降低 LDH 活性, 其中 10.0 μ mol/L SQS 作用最明显; 但对 HUVEC 存活率无明显影响。结果见表 1。

表 1 SQS 对缺氧-复氧诱导 HUVEC 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of SQS on HUVEC injury induced by hypoxia-reoxygenation ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度 / (μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)	存活率 / %	LDH / (U $\cdot$ L $^{-1}$)
对照	—	89.0 $\pm$ 6.8	31.5 $\pm$ 1.4
模型	—	78.3 $\pm$ 8.3	46.8 $\pm$ 3.2**
SQS	10.0	84.5 $\pm$ 11.5	35.7 $\pm$ 2.2 $\Delta\Delta$
	1.0	82.7 $\pm$ 10.6	38.6 $\pm$ 1.5 Δ
	0.1	83.6 $\pm$ 9.8	42.1 $\pm$ 2.0

与对照组比较: ** $P < 0.01$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

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

3.2 SQS 对缺氧-复氧诱导中性粒细胞与 HUVEC 黏附的影响: 由表 2 可看出, 模型组中性粒细胞与 HUVEC 的黏附率明显高于对照组, 差异非常显著 ($P < 0.01$); SQS 高、中、低浓度组与模型组比较, 中性粒细胞黏附率分别下降了 39.6%、32.5% 和 22.2%, 差异显著 ($P < 0.01, 0.05$), 且呈一定的浓度依赖关系。

表 2 SQS 对缺氧-复氧诱导中性粒细胞与 HUVEC 黏附的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of SQS on neutrophil adhesion to HUVEC induced by hypoxia-reoxygenation ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度 / (μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)	黏附率 / %
对照	—	28.32 $\pm$ 4.67
模型	—	58.49 $\pm$ 13.86**
SQS	10.0	35.32 $\pm$ 8.47 $\Delta\Delta$
	1.0	39.49 $\pm$ 11.45 Δ
	0.1	45.52 $\pm$ 10.89

与对照组比较: ** $P < 0.01$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

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

3.3 SQS 对缺氧-复氧损伤 HUVEC 线粒体 MDA 水平、SOD 和 GSH-Px 模型活性的影响: 模型组 MDA 水平显著增加, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。模型组 SOD、GSH-Px 活性与对照组比较, 分别降低了 53.3% 和 48.6%, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。SQS 呈浓度依赖性地抑制缺氧-复氧所致的 MDA 升高, 并显著提高 SOD 和 GSH-Px 活性。结果见表 3。

4 讨论

白细胞与内皮细胞 (EC) 黏附是多种急、慢性心脑血管疾病发生、发展的重要环节。大量研究表明, 局部缺血时, 除缺血-再灌注所致组织直接损伤外, 缺血区还可产生多种细胞因子 (如 IL-1、TNF- α)

表3 SQS对缺氧-复氧损伤 HUVEC 线粒体 MDA 水平、SOD 和 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 3 Effect of SQS on MDA level, SOD and GSH-Px activities of HUVEC injured by hypoxia-reoxygenation ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	SOD/ ($\text{IU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px/ ($\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	12.26 $\pm$ 2.64	20.12 $\pm$ 4.35	54.34 $\pm$ 9.74
模型	—	22.32 $\pm$ 4.38**	9.40 $\pm$ 2.54**	27.92 $\pm$ 6.54**
SQS	10.0	15.54 $\pm$ 3.09 Δ	17.61 $\pm$ 4.45 Δ	44.63 $\pm$ 8.01 Δ
	1.0	17.05 $\pm$ 3.28 Δ	14.67 $\pm$ 3.89 Δ	36.72 $\pm$ 7.27 Δ
	0.1	20.25 $\pm$ 4.21	12.68 $\pm$ 3.37	32.59 $\pm$ 6.82

与对照组比较: ** $P<0.01$ 与模型组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs model group

等)及大量的活性氧(ROS),进一步刺激血管EC,导致EC损伤,并诱导EC大量表达细胞黏附分子(CAMs),如ICAM-1、VCAM-1、E-选择素等。白细胞在一系列分子级联反应的作用下,沿血管内皮滚动,识别并结合位点,形成病源性细胞,进一步加剧炎症反应的发生和发展,最终导致多器官功能不全(MODS)甚至多器官衰竭(MOF)^[10]。

本实验以HUVEC的缺氧-复氧应激损伤模型来模拟组织器官的缺血-再灌注损伤,从细胞水平来观察SQS对HUVEC缺氧-复氧应激损伤的保护作用及中性粒细胞黏附的影响,并初步探讨SQS的可能作用机制。本研究发现:体外培养的HUVEC在受到缺氧-复氧应激时,LDH活性显著增加,但存活率无明显影响,这说明在缺氧-复氧时,HUVEC可出现不同程度的损伤,但还不足以产生明显的凋亡或死亡的结果,HUVEC此时还处于应激状态。SQS呈浓度依赖性地对抗缺氧-复氧应激所致的HUVEC损伤,降低LDH活性,对HUVEC的损伤有显著的保护作用,但它对HUVEC的增殖无明显影响。

在中性粒细胞与HUVEC黏附的实验中,发现缺氧-复氧应激可促进中性粒细胞与HUVEC的黏附,黏附率较对照组明显升高,该变化与HUVEC的损伤程度呈平行关系,这说明中性粒细胞与EC的黏附可加重EC的损伤,其机制为中性粒细胞与EC黏附可激活黄嘌呤脱氢酶(XD)转化为黄嘌呤氧化酶(XO),在XO的作用下,产生大量毒性的活性氧系列(ROS),使EC膜脂质过氧化,产生大量的MDA,导致EC的损伤^[11]。而SQS可显著抑制

缺氧-复氧应激所致的白细胞黏附增加,并呈一定的浓度依赖关系,这可能是SQS对EC产生保护作用的机制。SQS抑制白细胞黏附的机制可能与细胞间黏附分子(ICAM-1)转录下调有关^[12]。

此外,本实验还发现缺氧-复氧应激可引起HUVEC线粒体MDA大量堆积,SOD和GSH-Px活性明显降低,以致ROS在线粒体的积聚造成EC损伤;SQS可显著降低缺氧-复氧所致的线粒体MDA生成,提高或恢复EC线粒体SOD和GSH-Px活力,增强或恢复其清除氧自由基的能力,并呈现一定的剂量依赖性。这可能是SQS对EC产生保护作用的又一重要机制,这一结果与前期在大鼠心肌损伤实验中观察的结果相吻合^[4]。

综上所述,SQS对缺氧-复氧诱导的HUVEC损伤具有保护作用,其机制可能与其抗脂质过氧化作用和抑制白细胞黏附作用有关,但确切作用机制有待于进一步研究。

References:

- [1] Gimbrone M J. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis [J]. *Am J Cardio*, 1995, 175: 67B-70B.
- [2] Huang Q R, He M, Li P, et al. Effect of sasanquasaponin on Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} content and ATPase activity in myocardium mitochondrion of ischemic rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 1999, 4(3): 195-197.
- [3] Huang Q R, Cao S Y, He M, et al. Protective effect and Pharmacological ischemic preconditioning of sasanquasaponin mediated by NO on intact rat heart [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 44-47.
- [4] Huang Q R, He M, Li P, et al. Anti-oxygen free radicals and anti-lipoxidation of sasanquasaponin (SQS) to myocardial ischemic rat [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(9): 1034-1036.
- [5] Huang Q R, Cao S Y, He M, et al. Protective effects as ischemic preconditioning of sasanquasaponin mediated by KATP channel in the intact rat hearts [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2003, 8(2): 170-172.
- [6] Lai Z F, He M, Huang Q R, et al. Effects of sasanquasaponin on ischemia and reperfusion injury in mouse hearts [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94: 313-324.
- [7] Ueda Y. Method of extraction and isolation of sasanquanonin from the seeds saponin of *Thea sinensis* L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1954, 2: 175-177.
- [8] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C R, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745-2756.
- [9] Koyama T, Temma K, Akera T. Reperfusion-induced contracture develops with a decreasing $[\text{Ca}^{2+}]$ in single heart cells [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(30): H1115-H1122.
- [10] Lush C W, Cepinskas G, Kvietys P R. LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF-kappaB mobilization [J]. *Am J Physiol*, 2000, 278: H853-H861.
- [11] Li J M, Mullen A M, Yun S, et al. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47 (phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α [J]. *Circ Res*, 2002, 90: 143-150.
- [12] Huang Q R, Dai Y C. Effects of sasanquasaponin-c on anoxia-reoxygenation injury to human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(11): 2048-2050.