

龟板醇提物对大鼠骨髓间充质干细胞氧化损伤的修复 及其抗脂质过氧化作用

李熙灿¹, 谢学明^{1*}, 黄春花^{1*}, 钟远声^{1*}, 李伊为², 周健洪², 陈东风^{2*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 研究龟板 95% 乙醇提取物(醇提物)对大鼠骨髓间充质干细胞(MSC)氧化损伤修复及其抗脂质过氧化作用。方法 使用密度梯度法分离大鼠 MSC 进行培养,经 CD44 鉴定后以 H_2O_2 作用于 MSC 3 h,建立 MSC 氧化损伤模型,通过 MTT 法检测不同质量浓度龟板醇提物(0.166、0.833、1.66、3.32、4.98 mg/mL)对 MSC 损伤的修复。50 只 SD 大鼠,随机分为 5 组,受试组分别 ig 0.01、0.03、0.09 g/(kg·d) 龟板醇提物;阳性对照组 ig 维生素 E 200 mg/(kg·d);对照组 ig 等量的蒸馏水。每天 1 次,共 7 d,分别用 TBA 比色法、亚硝酸盐法测定大鼠肝中丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活力。结果 与 H_2O_2 (1:10)损伤组比较,龟板醇提物各组具有显著性差异($P<0.01$ 、 0.05);与对照组比较,龟板醇提物低、中、高剂量组 MDA 水平均明显降低($P<0.01$),同时能明显提高 SOD 活力($P<0.01$ 、 0.05)。结论 龟板醇提物对大鼠 MSC 氧化损伤具有明显修复作用,同时,具有抗脂质过氧化作用。

关键词: 龟板醇提物; H_2O_2 ; 骨髓间充质干细胞(MSC); 脂质过氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)07-1043-04

Repairing of oxidative damage to mesenchymal stem cell in rats and anti-lipidperoxidation by *Plastrum Testudinis* ethanolic extract

LI Xi-can¹, XIE Xue-ming¹, HUANG Chun-hua¹, ZHONG Yuan-sheng¹,

LI Yi-wei², ZHOU Jian-hong², CHEN Dong-feng²

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. College of Basic Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of 95% ethanolic extract of *Plastrum Testudinis* (EEPT) on repairing of the oxidative damage to mesenchymal stem cell (MSC) and its anti-lipidperoxidation. **Methods** MSCs were isolated from rats by density gradient and cultured, then identified by CD44. The model of MSCs oxidative damage was created by using hydrogen peroxide (H_2O_2) for 3 h. The effect on repairing of the oxidative damage to MSC was determined by MTT method and the extract's concentration varied at 0.166, 0.833, 1.66, 3.32, and 4.98 mg/mL. SD rats (50) were randomly divided into five groups in average. The extract groups were given by ig in three doses (0.01, 0.03, and 0.09 g/(kg·d) of EEPT; Vit E [200 mg/(kg·d)] was given by ig to the positive control group; Distilled water [200 mg/(kg·d)] was given by ig to the control group. The drug was given once a day and lasted for 7 d. Then, the level of MDA and the vitality of SOD in liver of rats was measured by TBA method and nitrous salt method. **Results** There were distinct difference between H_2O_2 damage group (1:10) and EEPT groups in promoting optic density of MSC ($P<0.01$, 0.05). Compared with the control group, the level of MDA of the extract groups was rather lower ($P<0.01$), while the activity of SOD was rather higher ($P<0.01$, 0.05). **Conclusion** EEPT can be used to repair the oxidative damage to MSC from rats remarkably and reduce the lipid peroxidation.

Key words: the 95% ethanolic extract of *Plastrum Testudinis* (EEPT); H_2O_2 ; mesenchymal stem cell (MSC); lipid peroxidation

收稿日期: 2007-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271377, 30371837, 30472272); 广东省自然科学基金项目 (31483)

作者简介: 李熙灿(1970—), 男, 湖南省桂阳县人, 硕士, 副教授, 主要从事中药提取物的研究。

Tel: (020) 39358076 E-mail: lixican@126.com

* 通讯作者 陈东风 Tel: (020) 36585448 E-mail: CDF27212@21cn.com

** 广州中医药大学中药学院 2003 级本科生

Prockop^[1]于 1997 年报道了骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 可以分化为神经细胞以来, MSC 移植可能是未来帕金森病等神经退行性病变治疗的一个方向^[2,3]。但是, 由氧化而导致的自由基损伤可能是影响干细胞移植效果的一个重要因素。因此, 研究修复 MSC 的氧化损伤具有重要意义。

龟板 *Plastrum Testudinis* 为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的腹甲, 临床常作益肾药使用, 其味甘、咸, 性寒, 归肝、肾、心经, 可以滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心。前期研究表明, 龟板对脑缺血后神经保护作用的机制与其下调脑缺血所致的一氧化氮合酶 nNOS 和 iNOS 的异常表达有关^[4], 同时, 龟板能促进神经干细胞 (NSC) 和 MSC 增殖^[5,6], 还可影响帕金森病大鼠行为和脑内多巴胺水平, 对大鼠帕金森病具有潜在的临床应用价值^[7]。研究表明^[8], 龟板的最强体外抗氧化活性部分分布在 95% 乙醇提取物 (以下简称醇提物) 中。本实验以 H_2O_2 诱导 MSC 损伤, 进一步观察龟板醇提物对大鼠 MSC 氧化损伤的修复作用, 同时, 观察了龟板醇提物对大鼠肝组织中 MDA 水平和 SOD 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂: 高效液相仪 DIONEX summit P680 (PDA—100 Photodiode Array Detector); 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 紫外-可见分光光度计 (755B, 上海精密科学仪器有限公司); 低糖 DMEM (L-DMEM)、Percoll 和胎牛血清 (FBS) 为 Gibco 公司产品, 抗体兔抗 CD34、CD44、CD45、生物素化二抗 (羊抗兔)、SABC、DAB 染色试剂盒均购自武汉博士德公司。MTT 为 Sigma 公司产品。MDA 测试盒和 SOD 测试盒均购于南京建成生物工程研究所; 维生素 E 胶囊 (广州敬修堂药业)。其他试剂均为分析纯。

1.2 龟板醇提物制备: 药材龟板购于汕头药材采购站, 产地海南, 经广州中医药大学中药学院鉴定教研室张丹雁教授鉴定为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 腹甲。将龟板敲成小块, 置电热恒温干燥箱中 (60 ± 0.2) °C 烘 12 h, 再进行粉碎, 过 20 目筛得所需细粉, 备用。40 g 龟板细粉放入索氏提取器内, 经过预处理后, 用 250 mL 95% 乙醇提取 12 h, 抽滤, 将滤液减压浓缩后, 挥干至恒重, 无溶剂残留, 得龟板醇提物 (含脂肪 71.3%、无机盐 6.7%)。用 HPLC 检测 [甲醇-乙腈-水 (30 : 30 : 40), 1.000 mL/min, 254 nm], 结果见图 1。

1.3 MTT 法检测龟板醇提物对 MSC 的损伤修复

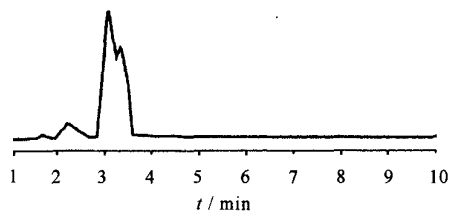


图 1 龟板醇提物的 HPLC 结果

Fig. 1 HPLC Result of *Plastrum Testudinis* ethanolic extract

作用

1.3.1 MSC 分离、培养与鉴定: 清洁级 SD 大鼠 10 只, 220~250 g, 雌性, 由广东省实验动物中心提供 (粤检证字 2005A010 号)。将大鼠骨髓用 L-DMEM 冲出, 充分混匀, 转入离心管, 300 × g 离心 10 min, 去上清, D-Hanks 液重悬, 离心去上清后, 加 4 mL D-Hanks 液混匀。Percoll 贮存液按 0.56 : 0.44 混合, 取 4 mL 放入 10 mL 离心管内, 吸骨髓液在离液面 2 cm 处贴管壁缓缓加入。900 × g 离心 30 min, 收集单核细胞层, 用 DMEM 洗涤两次。然后计数细胞, 调整密度, 按 1 × 10⁶/cm² 密度接种, 37 °C、5% 饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养, 培养液为含 10% FBS 的 L-DMEM, 3 d 后更换培养液, 弃去未贴壁细胞, 2~3 d 换液 1 次, 接近融合的 MSC 用含 0.25% 胰酶室温消化 2~3 min, 按 1 × 10⁴/cm² 传代, 传至第 3 代得到 1 × 10⁷/cm² 个细胞。将部分 MSC 接种至含盖玻片的 24 孔培养板内, 滴加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 2 h 后细胞处于贴壁未分化状态, 取出盖玻片做 Brdu、CD44 免疫组化及两者结合的免疫组化双重染色。

1.3.2 H_2O_2 损伤 MSC 模型^[9]: 传 3 代的 MSC 分为对照组、 H_2O_2 损伤组 (10%) 和龟板醇提物组。对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液; H_2O_2 损伤组在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中加 H_2O_2 损伤; 龟板醇提物组 MSC 经 H_2O_2 损伤 3 h 后, 换含不同质量浓度 (0.166、0.833、1.66、3.32、4.98 mg/mL) 龟板醇提物培养液。作用 24 h 后各组分别以 MTT 法检测。

1.3.3 MTT 法测细胞活性: 制备单细胞悬液, 计数, 调整细胞浓度为 1 × 10⁵/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL。每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 37 °C 孵育 4 h, 弃上清。每孔加入二甲亚砜 150 μL, 振摇 10 min, 于 490 nm 波长测吸光度 (A) 值。

1.4 大鼠肝组织脂质过氧化检测

1.4.1 动物分组与给药: 清洁级 SD 大鼠 50 只,

220~250 g, 雌性, 由广东省实验动物中心提供 (粤检证字 2005A010 号)。大鼠随机分为受试组、阳性对照组和对照组。受试组大鼠用量按成人 (60 kg) 30 g/d 折算成龟板醇提取物约为 0.01 g/(kg·d), 以其 1、3、9 倍设低、中、高 [0.01、0.03、0.09 g/(kg·d)] 剂量, 以丙二醇为溶剂, 10 mL/kg ig 给药; 阳性对照组: 维生素 E 胶囊 200 mg/(kg·d), 以丙二醇为溶剂, 10 mL/kg ig 给药; 对照组给予等体积的蒸馏水, 持续给药 1 周。

1.4.2 大鼠肝组织中脂质过氧化降解产物 MDA 水平、SOD 活性的测定: 用 TBA 比色法^[10]测 MDA。取 10% 组织匀浆 0.1 mL, 按测试盒操作法加入试剂, 反应终体积为 4.2 mL。反应管用旋涡混匀器混匀, 试管口用保鲜薄膜扎紧, 用针头刺一小孔, 95℃ 水浴 40 min, 取出后流水冷却, 然后 3 500 r/min 离心 10 min。取上清液, 532 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管 A 值。组织 (湿) 中 MDA 水平 = (A_{测定} - A_{测定空白}) / (A_{标准} - A_{标准空白}) × 标准品浓度 (10 nmol/mL) / 蛋白量 (mg/mL)。

用亚硝酸盐法^[11]测 SOD, 包括总 SOD 和 CuZn-SOD。取 10% 组织匀浆稀释 50 倍, 即 50 μL 10% 匀浆 + 2 450 μL 生理盐水, 配成 0.2% 组织匀浆。(1) 总 SOD 测定: 取组织匀浆 10 μL, 按测试盒操作法加入试剂, 反应体积为 1.31 mL。反应管用旋涡混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 min, 加入显色剂 2 mL 混匀, 室温放置 10 min, 于波长 550 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测 A 值。组织中总 SOD 活力 = (A_{对照} - A_{测定}) × 反应液总体积 / (50% A_{对照} × 取样量 × 组织中蛋白量)。(2) CuZn-SOD 测定: 样品按试剂盒操作进行前处理, 取组织匀浆 10 μL, 按测试盒操作法加入试剂, 反应体积为 1.31 mL。反应管用旋涡混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 min, 加入显色剂 2 mL 混匀, 室温放置 10 min, 于波长 550 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测 A 值。组织中 CuZn-SOD 活力 = (A_{对照} -

A_{测定}) × 反应液总体积 / (50% A_{对照} × 取样量 × 组织中蛋白量)。Mn-SOD 活力为总 SOD 活力减去 CuZn-SOD 活力。

1.5 统计学处理: 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计与分析, 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析。

2 结果

2.1 龟板醇提取物对 H₂O₂ 损伤 MSC 的影响: 结果见表 1。H₂O₂ 损伤组与对照组比较具有显著性差异 (P < 0.01), 说明 H₂O₂ 损伤 MSC 模型造模成功; 与 H₂O₂ 损伤组比较, 龟板醇提取物不同质量浓度组对 H₂O₂ 损伤 MSC 均具有修复作用 (P < 0.05、0.01), 龟板醇提取物随质量浓度增大修复能力增强, 呈正向关系。

表 1 龟板醇提取物对 H₂O₂ 损伤 MSC 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Table 1 Effect of EEPT on H ₂ O ₂ damage to MSC ($\bar{x} \pm s$, n = 5)		
组 别	ρ / (mg · mL ⁻¹)	A 值
对照	—	0.288 ± 0.018
H ₂ O ₂ 损伤	—	0.171 ± 0.006△△
龟板醇提取物	0.166	0.199 ± 0.017*
	0.833	0.266 ± 0.024**
	1.66	0.364 ± 0.049**
	3.32	0.546 ± 0.060**
	4.98	0.658 ± 0.057**

与对照组比较: △△P < 0.01
与 H₂O₂ 损伤组比较: *P < 0.05 **P < 0.01
△△P < 0.01 vs control group
*P < 0.05 **P < 0.01 vs H₂O₂ damage group

2.2 龟板醇提取物对大鼠肝组织中的 MDA 水平及 SOD 活力的影响: 结果见表 2。与对照组比较, 龟板醇提取物低、中、高剂量组 MDA 水平均明显降低 (P < 0.01), 同时, 能明显提高 SOD 活力, 包括总 SOD、CuZn-SOD 和 Mn-SOD (P < 0.05、0.01)。且低剂量提高 SOD 活力能力最强, 对于总 SOD、CuZn-SOD 和 Mn-SOD, 龟板醇提取物低、中、高组均没有显著性差异 (P > 0.05), 说明龟板醇提取物增加大鼠肝组织中 SOD 活力不受剂量的影响。

表 2 龟板醇提取物对大鼠肝组织中 MDA 水平及 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 2 Effect of EEPT on level of MDA and vitality of SOD in liver tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组 别	剂量 / (g · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	MDA / (nmol · mg ⁻¹)	总 SOD / (U · mg ⁻¹)	CuZn-SOD / (U · mg ⁻¹)	Mn-SOD / (U · mg ⁻¹)
对照	—	9.61 ± 0.85	997.28 ± 167.36	703.13 ± 164.13	294.14 ± 48.36
阳性对照	0.20	7.58 ± 1.30**	1 434.41 ± 136.38**	984.15 ± 82.09**	450.26 ± 71.63**
龟板醇提取物	0.01	8.45 ± 0.42**	1 489.60 ± 259.18**	1 011.95 ± 172.63**	477.65 ± 131.17**
	0.03	7.75 ± 0.90**	1 203.73 ± 265.73*	863.45 ± 167.18*	340.28 ± 111.26*
	0.09	7.93 ± 0.60**	1 307.95 ± 161.61**	914.27 ± 116.90*	393.68 ± 48.27**

与对照组比较: *P < 0.05 **P < 0.01
*P < 0.05 **P < 0.01 vs control group

3 讨论

本研究结果表明,龟板醇提物对大鼠 MSC 氧化损伤具有明显修复作用。 H_2O_2 加入 MSC 中后, MSC 细胞内抗氧化酶活性下降,过多的氧自由基不能被及时清除而堆积在细胞内,致使它们与细胞内的一些生物大分子,如蛋白质、核酸、脂质等发生反应,生成大量氧化物或过氧化物,造成 MSC 细胞损伤。同时 H_2O_2 通过其代谢产物羟自由基($\cdot OH$)使抗凋亡基因 bcl-2 表达下调,降低细胞抗氧化能力,从而导致细胞凋亡^[12]。而龟板醇提物则能修复 MSC 的这种氧化损伤,其修复能力随着质量浓度的增大而增强。为观察龟板醇提物对 MSC 氧化损伤的修复作用机制,本实验观察了龟板醇提物对在体动物肝脂质过氧化的作用。

本实验结果表明,龟板醇提物低、中、高剂量组均可降低大鼠肝组织中 MDA 的水平($P < 0.01$);同时能不同程度地提高大鼠肝组织中 SOD 活力,包括总 SOD、CuZn-SOD 和 Mn-SOD($P < 0.05$ 、 0.01)。也就是说,龟板具有抗脂质过氧化作用。

值得一提的是,中医认为,龟板具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心的功效,龟板益肾作用可能与其抗氧化性有关,本实验结果恰好证明了这一点。因此,本实验在从抗氧化的角度诠释中医益肾理论方面,作了有益的尝试。至于龟板醇提物抗氧化作用的活性成分,有待更进一步研究。

致谢:广州中医药大学中药学院鉴定教研室张

丹雁教授对实验药材给予鉴定。

References:

- [1] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276: 71.
- [2] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 316(2): 67.
- [3] Schwarz E J, Alexander G M, Prockop D J, et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(5): 2539.
- [4] Chen D F, Du S H, Li Y W, et al. Effect of *Plastrum Testudinis* on three subtypes of NOS expression in rats with focal cerebral ischemia [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13(5): 278-281.
- [5] Du S H, Chen D F, Li Y W, et al. Effect of *Plastrum Testudinis* on transdifferentiation from MSCs after implantation to neurons from rats with cerebral ischemia [J]. *Nat Med J China* (中华医学杂志), 2005, 85(3): 205-207.
- [6] Chen D F, Du S H, Li Y W, et al. Effect of *Plastrum Testudinis* on neural stem cell after focal cerebral ischemia [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 2001, 18(4): 328-332.
- [7] Li Y W, Zhou J H, Chen D F, et al. Effect of tortoiseshell on behavior and striatum levels of dopamine in rat model of Parkinson's disease [J]. *Anat Res* (解剖学研究), 2004, 26(1): 17-18.
- [8] Xie X M, Li X C, Zhong Y S, et al. Study of antioxidant activities of *Plastrum Testudinis* in vitro [J]. *China Pharm* (中国药房), 2006, 17(18): 1372-1374.
- [9] Zhou J H, Li H, Chen D F, et al. Effect of hydrogen peroxide on promoting level of mesenchymal stem cell [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2005, 26(9): 1199-1200.
- [10] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [11] 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.
- [12] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. *Science*, 1987, 235(4788): 529-531.

银杏叶提取物的心肌延迟保护作用及其机制研究

李年生¹, 钟志莲², 姜德建^{1*}

(1. 中南大学药学院 药理学系, 湖南 长沙 410078; 2. 中南大学湘雅医院 检验科, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 观察银杏叶提取物(EGb761)对大鼠离体心脏心肌的延迟保护作用及其机制。方法 离体大鼠心脏全心停灌缺血 30 min 后再灌注 30 min 产生缺血再灌注损伤,观测心率(HR)、冠脉流量(CF)、左室内压(LVP)和左室内压变化最大速率($+dp/dt_{max}$),测定心肌组织中肌酸激酶(CK)释放量、心肌组织丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)的量。结果 实验前 24 h 单次 ig 给予 EGb761 (50 或 100 mg/kg) 可显著改善心肌缺血再灌注所致的心功能(LVP 和 $+dp/dt_{max}$) 损伤,抑制心肌组织 CK 释放和 MDA 水平的增加以及 NO 水平的降低。预先给予 NO 合酶抑制剂 L-NAME (5 mg/kg) 或心肌细胞膜 ATP 敏感钾通道(sarK_{ATP}) 阻断药 HMR1883 (3 mg/kg),均可明显抑制 EGb761 对心肌缺血再灌注损伤的延迟保护作用。结论 EGb761 对缺血再灌注诱导大鼠心肌损伤具有延迟性保护作用,这一保护作用可能与增加 NO 合成和开放 sarK_{ATP} 通道有关。

关键词:银杏叶提取物(EGb761); 缺血再灌注损伤; ATP 敏感钾通道; 一氧化氮

中图分类号:R286.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1046-05

收稿日期:2007-01-08

作者简介:李年生,男,学士,主管实验师,研究方向为心血管药理。

* 通讯作者 姜德建 Tel: (0731) 2355077 Fax: (0731) 2355078 E-mail: liniansheng8@163.com