

人参皂苷对内皮细胞 ECV304 代谢 NO 的影响

王伯初^{*}, 祝连彩(重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要:目的 探讨人参皂苷预防和治疗心血管疾病的机理。方法 应用血清药理学方法研究了人参皂苷对常规培养正常内皮细胞和氧化损伤内皮细胞代谢一氧化氮(NO)的影响。结果 人参皂苷可上调正常内皮细胞和氧化损伤内皮细胞 NO 的代谢, 分别上调了 3.98 倍和 6.04 倍, 差异显著 ($P < 0.01$)。结论 人参皂苷可能通过升高内皮细胞 NO 的代谢, 而对心血管疾病具有良好的防效和疗效。

关键词:人参皂苷; 血清药理学; 一氧化氮(NO); 心血管疾病

The Effect of Ginsenosides on the NO Production in ECV304

WANG Bo-chu^{*}, ZHU Lian-cai(*Key Lab for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE to study the mechanism of Ginsenosides preventive and remedial effect on cardio-vascular diseases. **METHOD** The effect of Ginsenosides on the nitric oxide(NO) Production in normal ECV304 and oxidation injury ECV304 was studied with Serum Pharmacology. **RESULTS** Ginsenosides could up-regulate the NO production in normal ECV304 and oxidation injury ECV304 significantly($P < 0.01$) by 3.98 times and 6.02 times respectively. **CONCLUSION** Ginsenosides have the preventive and remedial effect on cardio-vascular diseases by increasing NO production in vascular endothelial cells.

^{*} Corresponding author, E-mail address: wangbc2000@126.com wangbc@cqu.edu.cn, Tel: 0086-23-66626399

人参为五加科植物人参(*panax ginseng*C. A. Meg)的根茎,是中国特产的珍贵中药。人参含有多种化学成分,如人参皂苷、人参多糖、多肽、人参炔醇、麦芽酚、腺嘌呤核苷以及某些氨基酸和微量元素等。现代药理学的研究证实人参皂苷是人参的主要药效物质。具有改善心血管功能,抗肿瘤、抗衰老、抗辐射等多种生物活性。我们应用中药血清药理学研究方法研究了人参皂苷对常规培养内皮细胞和氧化损伤内皮细胞代谢一氧化氮 NO 的影响,试图探讨人参皂苷预防和治疗心血管疾病的机理。

1 材料与方法

1.1 受试药物

人参皂苷,北京泰克美公司惠赠,纯度为 98%。

1.2 实验动物和细胞系

日本大耳白兔,第三军医大学动物中心;人脐带静脉 ECV304 细胞株,购自中国科学院上海细胞生物学研究所,常规培养传代。

1.3 主要试剂及仪器设备

新生牛血清(TBD 生物技术发展中心),干粉型 DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司),NO 检测试剂盒(江苏碧云天生物技术公司);3599 型 96 孔培养板(美国 Corning Incorporated 公司),CO₂ 培养箱(美国 Shell Lab 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),酶标仪(Bio-Rad 公司)。

1.4 血清的制备

实验需制备两组血清,即空白血清和人参皂苷血清。选成年日本大耳白兔,雌性,每组各两只。空白血清组日本大耳白兔每日灌胃生理盐水 30mL/只,人参皂苷血清组灌胃人参皂苷 100mg/kg/d/只。以上各组均每日灌胃一次,连续 3d,于第 3 天给药后 2.0h(灌胃前 12h 禁食不禁水),腹主动脉无菌取血,25℃ 放置 5h 左右至完全凝血后,于 2500r/min 离心 20min,分离血清,0.22μm 滤膜过滤除菌两次后分装,56℃ 水浴 30min 灭活, -20℃ 冷冻保藏备用。

1.5 实验分组

正常传代培养的内皮细胞 ECV304 消化后,制备成细胞浓度为 2 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,接种至 96 孔培养板培养 24h 吸除原培养液后,按以下分组进行实验正常对照组:加入无血清培养液培养 4h,然后加入含兔空白血清 20% 的培养液培养 24h,检测 NO。氧化损伤组:加入含联胺 10ng/mL 的培养液培养 4h,然后加入含兔空白血清 20% 的培养液培养 24h,检测 NO。正常细胞 + 人参皂苷组:加入无血清培养液培养 4h,然后加入含人参皂苷血清 20% 的培养液培养 24h,检测 NO。氧化损伤 + 人参皂苷组:加入含联胺 10ng/mL 的培养液培养 4h,然后加入含人参皂苷血清 20% 的培养液培养 24h,检测 NO。

1.6 一氧化氮的检测

亚硝酸/硝酸根离子(NO₂ - /NO₃ -)为 NO 的稳定代谢产物,测定培养液中 NO₂ - /NO₃ - 的含量可间接反映细胞的

NO 代谢量^[1]。收集各组培养液,测定采用 Griess 法^[2]按照 NO 试剂盒说明书(碧云天试剂公司生产)操作。在酶标仪上 540 nm 处读出光密度值,从亚硝酸钠标准曲线上换算 NO 值。

2 实验结果

实验按 1.6 检测各组 NO 的代谢量,结果见表 1。

Tab 1 The production of NO in ECV304(μM)

序号	正常对照组	氧化损伤组	正常细胞 + 人参皂苷组	氧化损伤 + 人参皂苷组
1	3.73	3.30	13.89	11.95
2	2.22	2.00	11.08	11.30
3	3.08	3.08	13.46	12.59
4	4.16	2.00	14.11	13.03
5	3.52	0.70	16.49	13.89
6	4.38	1.57	14.98	13.68
$\bar{x} \pm s$	3.52 ± 0.78	2.11 ± 0.96	14.00 ± 1.79 ¹⁾	12.74 ± 1.00 ²⁾

Note: ¹⁾ Significantly different compared with the control group, t-test, *P* < 0.01; ²⁾ Significantly different compared with the oxidation injury group, t-test, *P* < 0.01

由 Table1 可见,氧化损伤组与正常对照组相比内皮细胞 NO 的代谢降低了 40.05%;氧化损伤 + 人参皂苷组与氧化损伤组相比内皮细胞 NO 的代谢升高了 6.03 倍,差异显著;正常细胞 + 人参皂苷组与正常对照组相比内皮细胞 NO 的代谢升高了 3.98 倍,差异显著。

3 讨论

现代药理学的研究证实人参皂苷是人参的主要药效物质。到目前为止从人参中分离出了 30 余种人参皂苷,可分为 3 组,即齐墩果酸组,原人参二醇组,原人参三醇组。人参皂苷具有阻滞钙离子通道、扩张血管、抑制血小板聚集、清除超氧阴离子自由基等^[3]多种药理活性。一氧化氮(NO)是血管内皮产生的最重要的血管活性物质,即内皮衍生性舒张因子(EDRF)。NO 具有舒张血管^[4]、抑制血管平滑肌增殖、抗血小板聚集和抗血栓形成作用^[5,6],具有抗心血管疾病活性。Table1 的血清药理学研究结果表明脂质过氧化损伤使内皮细胞 NO 的代谢明显降低,而人参皂苷血清可显著上调过氧化损伤内皮细胞和正常内皮细胞的 NO 代谢量,分别上调了 6.04 倍和 3.98 倍。这表明人参和人参皂苷可能通过 L-Arg 途径,激活一氧化氮合酶,升高内皮细胞 NO 的代谢,进而扩张血管、抑制血小板聚集、清除超氧阴离子,对心血管疾病具有良好的防效和疗效。

参考文献

[1] 苏定冯. 心血管药理学[M]. 北京: 科学出版社. 2001: 115.
[2] Schmidt HHHW, Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. Methods in nitric oxide research[J]. New York: John Wiley, 1996, 491.
[3] 赵萍, 孙成文, 钟果赣. 齐墩果酸型人参皂甙 R 对心肌细胞单钙通道活动与自由基含量的影响[J]. 白求恩医科大学学报,

1994,20(6):540.

- [4] El-Mas M, Mohy El-Din M, El-gowilly S M, *et. al.* Relative roles of endothelial relaxing factors in cyclosporine-induced impairment of cholinergic and β -adrenergic renal vasodilations[J]. European Journal of Pharmacology, 2004,487: 49.
- [5] Kristyn S B, Jennifer L W. N. Nitric oxide-generating polymers reduce platelet adhesion and smooth muscle cell proliferation[J].

Biomaterials, 2000,21:2273.

- [6] Venturini CM, Del PJ, Kaplan JE, *et. al.* Thrombin-induced platelet adhesion to endothelium is modified by endothelial derived relaxing factor(EDRF) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989,159:349.

收稿日期:2004-06-15