

地黄梓醇对缺氧缺糖损伤的人胚胎肾脏细胞保护作用研究

陈靖 付彦君

【摘要】 目的 研究梓醇对缺血细胞的保护作用机制。方法 通过连二亚硫酸钠消除培养基中的氧,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中,模拟缺血环境中的细胞损伤;再对对照组、模型组、梓醇低、中、高浓度组分别进行细胞存活率、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定。结果 梓醇能显著提高细胞存活率,且在 5 ~ 20 μmol/L 呈剂量依赖性,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);梓醇能显著提高细胞培养液上清液中的 TAC、SOD,降低 LDH 水平,且在 5 ~ 20 μmol/L 呈剂量依赖性,与模型组比较, $P < 0.01$,有统计意义。结论 梓醇可以通过抗氧化损伤保护缺糖缺氧细胞。

【关键词】 梓醇; 缺糖; 缺氧; 细胞保护

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.09.010

Study on protective effect of catalpol on injured HEK293 cell induced by oxygen glucose deprivation CHEN Jing, FU Yan-jun. *Experiment center for teaching, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China*

Corresponding author: FU Yan-jun, E-mail: yjfukim@163.com

【Abstract】 Objective To study the protective mechanism of catalpol on chemically injured cells. **Methods** By sodium dithionite and eliminate medium oxygen at 37℃, 5% CO₂ incubator, cell damage of simulated ischemia environment. The cell survival rate, total antioxidant capacity (total antioxidant capacity, TAC), superoxide dismutase (superoxide dismutase SOD) and lactate dehydrogenase (lactate, dehydrogenase, LDH) determination were compared among the control group, model group, low catalpol group, medium catalpol group and high catalpol group. **Results** Compared with model group, catalpol can significantly improve the survival rate of cells in a dose-dependent manner (5 ~ 20 mol/L, $P < 0.01$). Compared with the model group, catalpol can significantly improve the cell culture supernatant of TAC, SOD, reduce the LDH level with the same trend of survival rate of cells. **Conclusion** Catalpol can protect OGD cell oxidative damage.

基金项目: 辽宁中医药大学 2011 年度教育科学研究立项课题(七年制专项)

作者单位: 110847 沈阳, 辽宁中医药大学教学实验中心(陈靖), 基础医学院基础药理教研室(付彦君)

作者简介: 陈靖(1979-), 硕士, 实验师。研究方向: 药理学及中药药理学。E-mail: w2013007@126.com

通讯作者: 付彦君(1966-), 女, 博士, 副教授。研究方向: 药理学及中药药理学。E-mail: yjfukim@163.com

【Key words】 Catalpol; Hypoglycemia; Hypoxia; Cell protection

地黄 *Rehmanniae glutinosa* Libosch, 为玄参科地黄属多年生草本植物的地黄新鲜或干燥块根, 最早记载于《神农本草经》, 传统中医认为其具有“滋阴补血, 填精补髓”的功效^[1], 早在公元前 718 年的周朝时期就作为皇帝贡品和馈赠亲友的佳品。目前也是中国重要的创汇产品之一, 产品远销港澳、东南亚及日本等地区^[2], 临床上常用于治疗脑卒中、脑卒中后遗症等^[3]。梓醇是地黄的主要成分之一, 《中华人民共和国药典》(一部)2010 版以梓醇含量来检测生地黄质量^[4]。近年研究发现, 梓醇具有利尿、降血糖、抗脑缺血、保肝及保护神经元免受细胞毒性损伤, 减少脑缺血后神经凋亡等药理作用^[5-7]。脑缺血时, 大量细胞毒性成分诱导的氧自由基是导致细胞死亡的重要原因^[8]。本文选用人胚胎肾脏细胞体外培养, 通过测定对照组、模型组、和梓醇低、中、高浓度组的细胞存活率、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAC)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 以及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力, 探讨梓醇对细胞保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

10% 胎牛血清 RP-MI1640 培养液购于 Hyclone 公司; Earle's 平衡盐溶液购于苏州苏大赛尔免疫生物技术有限公司; TAC 试剂盒、SOD 试剂盒、LDH 试剂盒购自南京建成试剂公司; 地黄梓醇 (地黄提取物, 含量大于 98.5%) 和人胚胎肾脏细胞由沈阳药科大学药学院提供; 噻唑蓝 (MTT) 溶液: 100 mg MTT 固体充分溶解于 20 mL 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2), 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4℃ 避光保存。

1.2 缺氧缺糖损伤模型的建立及实验分组

实验分为对照组, 缺血缺氧损伤模型组和缺血缺氧损伤后药物干预组。取前培养 24 小时的人胚胎肾脏细胞, 吸去原培养液, 并用 Earle's 液 (pH 7.4) 洗涤, 调整细胞数目约 1.5×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板 (0.1 mL/孔)。对照组加入 20 μL 含糖 Earle's 液; 模型组加入 10 μL 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 和 10 μL 含糖 Earle's 溶液; 梓醇低、中、高浓度组分别加入 10 μL 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液和 10 μL 的不同浓度药物 (5、10、

20 μmol/L)。将培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时后观察并测定有关指标。

1.3 MTT 法测定细胞存活率

取上述 96 孔板, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL, 4 小时后镜下观察结晶情况并每孔加入 100 μL 三联液 (10% 十二烷基硫酸钠, 5% 异丁醇, 0.012 mmol/L HCl), 再培养 10 小时左右后取出, 于酶标仪 640 nm 为参考波长, 560 nm 波长测定吸光度 (A)。

1.4 细胞培养上清液中 TAC、SOD 及 LDH 的测定

吸取各组细胞培养孔内的上清液作为测试液, 按试剂盒说明书进行测定。

1.5 统计学处理

实验结果用 SPSS 20.0 软件进行处理, 每组数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较用 SNK 法, $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 有显著差异。

2 实验结果

2.1 梓醇对缺氧缺糖细胞存活率的影响

结果表明, 在经过造模处理后, 模型组细胞存活率降低, 和对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而梓醇低、中、高浓度组在给药后, 细胞存活率提高, 与模型组对比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。梓醇对细胞的保护作用在 5 ~ 20 μmol/L 时, 明显表现出剂量增大, 保护作用增强, 具体结果见表 1。

表 1 梓醇对缺氧缺糖细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度 μmol/L	A ₅₆₀	细胞存活率 (%)
对照组	—	0.121 ± 0.002	100.00 ± 1.31
模型组	—	0.015 ± 0.003 ^a	12.40 ± 1.64 ^a
梓醇低浓度组	5	0.035 ± 0.003 ^b	29.93 ± 1.34 ^b
梓醇中浓度组	10	0.052 ± 0.001 ^b	42.50 ± 0.08 ^b
梓醇高浓度组	20	0.062 ± 0.002 ^b	51.24 ± 1.42 ^b

注: 与对照组比较; ^a $P < 0.01$; 与模型组比较; ^b $P < 0.01$ 。

2.2 梓醇对缺氧缺糖细胞 TAC、SOD 及 LDH 的影响

结果表明, 在经过造模处理后, 模型组 TAC、SOD 含量降低, 和对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而梓醇低、中、高浓度组在给药后, TAC

表 2 梓醇对缺氧缺糖细胞 TAC、SOD 及 LDH 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	浓度 $\mu\text{mol/L}$	TAC(U/mL)	SOD(U/mL)	LDH(U/mL)
对照组	—	21.51 \pm 0.53	29.51 \pm 1.53	821.51 \pm 122.53
模型组	—	2.62 \pm 0.43 ^a	4.62 \pm 1.43 ^a	1442.62 \pm 221.43 ^a
梓醇低浓度组	5	6.51 \pm 0.73 ^b	10.51 \pm 0.83 ^b	1206.51 \pm 121.73 ^b
梓醇中浓度组	10	7.98 \pm 0.51 ^b	14.98 \pm 1.51 ^b	1097.98 \pm 86.51 ^b
梓醇高浓度组	20	10.21 \pm 0.92 ^b	19.21 \pm 0.92 ^b	973.21 \pm 95.92 ^b

注:与对照组比较, ^a $P<0.01$, 与模型组比较, ^b $P<0.01$ 。

提高,与模型组对比,差异有统计学意义($P<0.01$)。而模型组 LDH 含量升高,和对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。而梓醇低、中、高浓度组在给药后,LDH 含量降低,与模型组对比,差异有统计学意义($P<0.01$)。梓醇对细胞的保护作用在 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时,明显表现出剂量增大,保护作用增强,具体结果见表 2。

3 讨论

人胚胎肾脏细胞广泛应用于药物的细胞保护作用研究^[9]。在细胞缺血损伤时,主要是因为细胞缺氧缺糖,继而产生大量自由基,损伤细胞。本实验的缺氧缺糖模型是利用连二亚硫酸钠消除培养基中的氧,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时,模拟缺血环境中的细胞损伤,方法简单,结果稳定、可靠^[10]。

TAC 是酶促体系小分子量的抗氧化物质和非酶促体系的抗氧化物质的总和,是反映机体抗氧化作用的重要指标。SOD 能清除自由基,对机体的氧化与抗氧化平衡起重要作用。在组织缺血时,TAC 和 SOD 活性降低,氧自由基堆积,氧自由基可转变为羟基自由基,活性增强,损伤细胞膜结构,破坏细胞膜功能,进而加剧缺血组织损伤。LDH 广泛存在于细胞浆内,当细胞发生损伤时,LDH 进入细胞外液,活性增高。因此,TAC、SOD 水平和机体抗氧化能力呈正相关,LDH 水平和机体损伤水平呈正相关。本实验通过测定细胞存活率及细胞培养液上清液中的 TAC、SOD、LDH 等指标,证明了梓醇至少通过抗自由基损伤,抗氧化对细胞发挥保护作用,梓醇对细胞有保护作用,且保

护作用和剂量(5~20 $\mu\text{mol/L}$)呈正相关性。

参 考 文 献

- [1] 张成秋,辛青,王秀琴. 六味地黄丸对糖尿病肾阴虚证患者血清脂联素和高敏 C 反应蛋白的影响[J]. 中医杂志,2013,54(19):1660-1662.
- [2] 张中朋. 地黄国际市场前景看好—中国地黄及其制品国内外市场简介[J]. 中国现代中药,2005,7(4):43-44.
- [3] HF Z, D W, Y L, et al. Catalpol increases brain angiogenesis and up-regulates VEGF and EPO in the rat after permanent middle cerebral artery occlusion[J]. International Journal of Biological Sciences, 2010, 6(5):443-453.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:116.
- [5] 刘明,孙建宁,董世芬,等. 梓醇对永久性脑缺血损伤大鼠恢复早期运动感觉功能和能量代谢的影响[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(4):245-249.
- [6] 刘江月. 梓醇对糖尿病大鼠主动脉的保护作用与抗氧化机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(6):1023-1028.
- [7] 杨清俊,李宗泽,朱艳凌,等. 梓醇对高糖诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. 中药药理与临床,2013,29(3):43-46.
- [8] Gong C, Tao G, Yang L, et al. The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4):4915-4925.
- [9] Shi J, Mori E, Mori Y, et al. Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells[J]. The Journal of Physiology, 2004, 561(2):415-432.
- [10] 刘岩,王建,姚洪武,等. 开窍药对缺血缺氧损伤 PC12 细胞的影响及其作用机制[J]. 中药药理与临床,2010,26(4):35-38.

(收稿日期:2014-11-21)

(本文编辑:董历华)