

ring makes the two compounds of 2-Cl-DM-MDBT and 2-Cl-BAMDBT show different behavior on the inhibition of NADH-Q reductase. The stronger inhibitory effect of 2-Cl-DMMDBT than 2-Cl-BAMDBT is probably due to the longer hydrophobic side chain of 2-

Cl-DMMDBT, because the reactive sites of ubiquinone are all in the membrane of the mitochondria.

Key words respiratory chain, inhibitor, dioxobenzothiazole

酸枣仁总皂甙对缺氧-再给氧心肌细胞的保护作用

万华印 丁力¹⁾ 孔祥平 陈兴坚²⁾

(广州空军 458 医院肝病研究所, 广州 510602)

摘要 按 Laarse's 方法建立培养心肌细胞缺氧-再给氧(A-R)模型, 缺氧缺氧 60 min, 再给氧 30 min. 结果发现, 缺氧组心肌细胞 MDA 含量增加, SOD 活性降低, 细胞膜脂质流动性下降, 再给氧组上述改变加剧. 酸枣仁总皂甙(ZS)能剂量依赖性地显著降低心肌细胞 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 增加细胞膜脂质流动性. 证明 ZS 有明显抗心肌细胞缺氧-再给氧损伤作用.

关键词 酸枣仁总皂甙, 培养心肌细胞, 缺氧-再给氧, 丙二醛, 超氧化物歧化酶, 膜脂质流动性

心肌缺血(缺氧)-再灌注(给氧)损伤(ischemia/anoxia-reperfusion/reoxygenation, I-RI/A-RI)的研究是目前基础医学和临床医学中的一个重要课题, 酸枣仁总皂甙(total saponins of *semen Ziziphi spinosae*, ZS)曾被证实有抗大鼠心肌缺血^[1], 保护缺氧心肌细胞^[2]等作用, 但未见有关 ZS 抗脂质过氧化损伤的报道, 本实验以心肌细胞丙二醛含量, 超氧化物歧化酶活性及细胞膜脂质流动性为线索, 在细胞水平研究了 ZS 抗心肌 A-RI 作用.

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

ZS 由西安医科大学化学教研室提供; RPMI-1640 培养基, Hepes, 硫代巴比妥酸(TBA), 四乙氧基丙烷(TEP), 联大茴香胺(diamisidine), 荧光探针 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯(DPH)及十二烷基磺酸钠(SDS)均为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶为上海生化试剂采

购站进口分装产品(Difco 1:250); 超氧化物歧化酶(SOD)为上海生物化学研究所东风生化技术公司产品; 小牛血清为军事医学科学院产品; Vit E 为北京第二制药厂产品; 核黄素为河北制药厂产品; 余均为国产分析纯.

1.2 主要仪器

电热恒温培养箱, 岛津 RF-5000 型荧光分光光度计.

1.3 原代心肌细胞培养

参照文献[3], Wistar 大鼠乳鼠由第一军医大学动物中心提供, 细胞浓度为 10^9 个/L, 每个 10 ml 培养瓶接种细胞悬液 1 ml.

1.4 培养心肌细胞缺氧-再给氧损伤模型

参照 Laarse 等^[4]建立的方法, 缺氧 60 min, 再给氧 30 min.

¹⁾ 广州军区总医院超声诊断科, 广州 510010.

²⁾ 第一军医大学药理教研室, 广州 510515.

收稿日期: 1995-01-04, 修回日期: 1995-03-22

1.5 细胞MDA及SOD的测定

参考翁玉椿等^[5]荧光微量法测定细胞MDA; SOD的测定采用光化学扩增法^[6]; 蛋白质定量采用Lowry's法。

1.6 细胞膜脂质流动性的测定

参考文献[7]用DPH测定, DPH使用前先用四氢呋喃配成 2×10^{-3} mmol/L的母液, 低温避光保存, 用时以0.01 mmol/L PBS稀释为 2×10^{-6} mmol/L的应用液, 并猛烈振摇, 最后以各向异性(anisotropy) γ 表示膜流动性的大小, γ 值越大, 膜流动性越小。

2 结 果

2.1 ZS对缺氧-再给氧细胞MDA含量的影响

缺氧组细胞MDA含量增加, 与对照组比较 $P < 0.01$; 缺氧-再给氧组MDA含量进一步增加, 与对照组及缺氧组比较均为 $P < 0.01$; 加入ZS 15、5 mg/L各组MDA含量下降, 与缺氧-再给氧组比较相差显著($P < 0.01$); 加入ZS 1.5 mg/L组MDA含量与缺氧-再给氧组比较 $P > 0.05$; SOD 4 mg/L组与缺氧-再给氧组比较亦相差显著($P < 0.01$); 见表1。

表1 ZS对缺氧-再给氧心肌细胞MDA含量的影响

	剂量/mg · L ⁻¹	MDA/mmol · g ⁻¹
对照组	—	0.47 ± 0.02
缺氧组	—	0.75 ± 0.05 ¹⁾
缺氧-再给氧组	—	1.21 ± 0.06 ^{1) 2)}
缺氧-再给氧+ZS组	15	0.82 ± 0.06 ³⁾
	5	1.01 ± 0.07 ³⁾
	1.5	1.20 ± 0.08 ⁴⁾
缺氧-再给氧+SOD组	4	0.80 ± 0.07 ⁴⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与缺氧组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与缺氧-再给氧组比较, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P > 0.05$ 。($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.2 ZS对心肌细胞SOD活性的影响

缺氧组细胞SOD活性下降, 与对照组比较 $P < 0.01$; 缺氧-再给氧组SOD活性进一步下降, 与对照组及缺氧组比较均为 $P < 0.01$; 加入

ZS 15、5 mg/L组SOD活性增大, 与缺氧-再给氧组比较相差显著($P < 0.01$); 加入Vit E 15 mg/L组与缺氧-再给氧组比较亦相差显著($P < 0.01$); 加入ZS 1.5 mg/L组SOD活性与缺氧-再给氧组比较 $P > 0.05$, 见表2。

表2 ZS对心肌细胞SOD活性的影响

	剂量/mg · L ⁻¹	SOD/U · mg ⁻¹
对照组	—	185 ± 5
缺氧组	—	162 ± 6 ¹⁾
缺氧-再给氧组	—	131 ± 8 ^{1) 2)}
缺氧-再给氧+ZS组	15	191 ± 6 ³⁾
	5	161 ± 8 ³⁾
	1.5	139 ± 4 ⁴⁾
缺氧-再给氧+Vit E组	15	195 ± 9 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与缺氧组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与缺氧-再给氧组比较, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P > 0.05$ 。($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.3 ZS对心肌细胞膜脂质流动性的影响

缺氧心肌细胞膜 γ 值增大, 与对照组比较 $P < 0.01$; 缺氧-再给氧组心肌细胞膜 γ 值进一步增大, 与对照组比较 $P < 0.01$; 与缺氧组比较 $P < 0.05$; 加入ZS 15、5 mg/L组心肌细胞膜 γ 值降低, 与缺氧-再给氧组比较相差显著($P < 0.01$); SOD 4 mg/L组与缺氧-再给氧组比较亦相差显著($P < 0.01$); 加入ZS 1.5 mg/L组心肌细胞膜 γ 值与缺氧-再给氧组比较 $P > 0.05$, 见表3。

表3 ZS对心肌细胞膜脂质流动性的影响

	剂量/mg · L ⁻¹	γ
对照组	—	0.124 ± 0.005
缺氧组	—	0.145 ± 0.003 ¹⁾
缺氧-再给氧组	—	0.150 ± 0.006 ^{1) 2)}
缺氧-再给氧+ZS组	15	0.129 ± 0.003 ³⁾
	5	0.138 ± 0.004 ³⁾
	1.5	0.145 ± 0.004 ⁴⁾
缺氧-再给氧+SOD组	4	0.128 ± 0.003 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与缺氧组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与缺氧-再给氧组比较, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P > 0.05$ 。($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3 讨 论

本实验利用体外培养的大鼠乳鼠心肌细胞,通过中断供给细胞赖以生存的糖和氧,一定时间后再恢复供糖供氧,模拟在体心肌缺血/再灌注损伤^[4],在细胞水平探讨了 ZS 抗心肌细胞 A-RI 作用. 心肌 A-RI 由多个环节引起,氧自由基损伤和钙超载是比较公认的两个因素,本实验选用 MDA 作为反映心肌细胞脂质过氧化水平指标;SOD 活性大小表示细胞清除氧自由基能力;细胞膜脂质流动性大小反映生物膜在 A-R 时的受损程度. 结果发现缺氧组及缺氧-再给氧组 MDA 含量升高, SOD 活性下降,与对照组比较相差非常显著;缺氧-再给氧组与缺氧组比较也相差显著;证明心肌细胞 A-R 时 MDA 含量升高, SOD 活性下降,且以再灌时更为明显. ZS 能剂量依赖性降低心肌细胞 MDA 含量,从而有效地减轻细胞内脂质过氧化反应. 机体在抗脂质过氧化反应损害时,由酶和抗氧化剂组成了两个保护系统, SOD 就是其中的一个特异地清除 O_2^- 的酶^[8],并且在抗 A-RI 中的作用已得到证实, ZS 能剂量依赖性提高 SOD 活性,从而增强细胞清除 O_2^- 的能力. 缺氧组及缺氧-再给氧组细胞膜流动性下降,与对照组比较相差非常显著,提示 A-R 时细胞膜受损,与 Yamaguchi 等^[9]报道一致. 加入 ZS (5 mg/L 和 15 mg/L) 后细胞膜流动性较 A-R 组明显升高,证明 ZS 能有效地防止 A-RI 致心肌细胞膜脂质流动性的降低,维持细胞膜功能,保护细胞.

总之, ZS 对培养心肌细胞 A-RI 有良好的保护作用,能提高细胞膜脂质流动性,可能与其降低心肌细胞 MDA 含量,提高 SOD 活性有关,但更详细的机理有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 刘菊芳,古维新,杨素琴. 第一军医大学学报, 1985; 5 (1): 31
- 2 Chen X J, Yu C L, Liu J F. Acta Pharmacol Sin, 1990; 11 (2): 153

- 3 李连达,徐萃华,张金妹等. 中华心血管病杂志, 1980; 8 (2): 141
- 4 Laarse A V D, Hollaar N, Valk L J M. Cardiovas Res, 1979; 13: 345
- 5 翁玉椿,王春平,卢泳才等. 细胞生物学杂志, 1985; 7 (3): 142
- 6 刘智峰,方允中. 军事医学科学院院刊, 1986; 10 (4): 313
- 7 林克椿,聂松青. 生理科学进展, 1985; 16 (1): 83
- 8 McCord J M. J Biol Chem, 1969; 244: 6049
- 9 Yamaguchi T. Biochim Biophys Acta, 1983; 736 (2): 150

Protective Effects of Total Saponins of Semen *Ziziphi saponase* on Cultured Myocardial Cells Exposed to Anoxia-Reoxygenation. Wan Huayin, Ding Li, Kong Xiangping, Chen Xingjian (Research Institute for Liver Disease, the 458th Air Force Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China).

Abstract The anoxia-reoxygenation model of cultured neonatal rats myocardial cells were developed, according to Laarse's method: anoxia and glucose deficiency for 60 min followed by reoxygenation and re-exposure to glucose for 30 min. The results showed that the intracellular malondialdehyde (MDA) content in the anoxia group was significantly increased, superoxides dismutase (SOD) activity was obviously reduced and membrane fluidity was decreased, all the changes were much more severe in the reoxygenation group. Total saponins of semen *Ziziphi spinosae* (ZS) could markedly and dose-dependently decrease MDA content, elevate SOD activity and increase membrane fluidity. It proved the effects of ZS against lipid peroxidation induced by anoxia-reoxygenation.

Key words total saponins of semen *Ziziphi saponase*, anoxia-reoxygenation, cultured myocardial cells, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), membrane fluidity