

三七总皂甙对培养的猪主动脉内皮细胞释放一氧化氮的影响

尹小川 刘建康 周序琰 胡黎平 李朝红 邓满平

(中山大学组织学与胚胎学教研室, 广州 510089)

The Effect of Total *Panax Notoginseng* Saponin on Releasing Nitric Oxide from Cultured Porcine Aorta Endothelial Cells

YIN Xiao-Chuan, LIU Jian-Kang, ZHOU Xu-Long, HU Li-Ping, LI Chao-Hong and DENG Yi-Ping
(Department of Histology and Embryology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China)

Aim Total *Panax Notoginseng* saponin (tPNS) is a traditional herb medicine of Chinese. In this study, we have investigated the release of nitric oxide (NO) from cultured porcine aorta endothelial cells (PAEC) affected by the tPNS for understanding the pharmacological mechanism of tPNS.

Methods PAEC were cultured with M199 and compared the morphological appearance of tPNS group with the control under the phase contrast microscope after PAEC exposed to conditional medium (CM) for 24 hours. NO amounts in CM were determined by the methods of Termin and Green.

Results PAEC in tPNS groups were grew normally. The cells of control group were constricted and separated from each other, there were a lot of small vesicles in the cytoplasm. The amounts of NO in CM of tPNS groups were ranged from 350 ± 59 to 410 ± 90 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and compared with the control, the $P < 0.001$. This enhance was ceased by pluing EDTA in CM. The time course expressed that the amount of NO was raised quickly by pluing tPNS and was maintaining a high level. This effect could stop by adding the EDTA in CM too.

Conclusions The results of enhancing the release of NO from PAEC and maintaining the growth of

PAEC by tPNS were suggested that the tPNS can play a significant role in some diseases such as atherosclerosis.

KEY WORDS Total *Panax Notoginseng* saponin; Porcine aorta endothelial cells; Nitric oxide; Calcinm channel; Atherosclerosis

摘要 本文观察了中药田七的主要药用成分三七总皂甙对培养的猪主动脉内皮细胞分泌一氧化氮以及形态学的影响。结果表明加有三七总皂甙条件培养液的猪主动脉内皮细胞生长良好,仍融合成片。而对照组的猪主动脉内皮细胞出现明显收缩,胞浆中有大量小空泡。猪主动脉内皮细胞在三七总皂甙的条件培养液中培养 24 小时后,条件培养液中一氧化氮含量由对照组的 $55 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $390 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.001$)。从培养的猪主动脉内皮细胞在加入三七总皂甙条件培养液后不同时间检测其条件培养液中的一氧化氮含量也表明三七总皂甙能在短时间内刺激内皮细胞分泌一氧化氮。结果提示三七总皂甙能明显增加培养中的猪主动脉内皮细胞分泌一氧化氮,对培养的内皮细胞的生长有维持和保护作用。

关键词 三七总皂甙; 猪主动脉内皮细胞; 一氧化氮; 动脉粥样硬化

三七总皂甙 (total *Panax Notoginseng* saponin, tPNS) 是我国中药田七的主要药用成分,临床有针剂广泛应用。实验表明 tPNS 具有增加冠状动脉血流量^[1,2]、降低心肌耗氧量^[3]和对抗脂质过氧化的作用。它还能促进猪主动脉内皮细胞 (porcine aorta endothelial cells, PAEC) 释放前列环素 E_2 ^[4] 和组织型血纤溶酶原激活剂^[5,6], 抑制血小板聚集^[7]; 还对平滑肌细胞具有阻断钙离子内流和减弱其收缩性的作用^[8]。以上说明 tPNS 在一定范围内具有对抗动脉粥样硬化形成的作用。本文试图从 tPNS

对 PAEC 释放一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响来探讨 tPNS 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

M199、DMEM、EDTA、N-奈基乙二胺均为 Sigma 产品。tPNS 购自昆明制药厂。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。动物购自华南农业大学茅山种猪场,为长白与大白良杂交良种小公猪。CO₂ 培养箱为美国 Precision Scientific Co 产品,酶联免疫检测仪为华东电子管厂产品,型号为 DG3022。

1.2 猪主动脉内皮细胞的培养

1.2.1 PAEC 的取材 购回的小公猪按外科常规消毒,作胸腹联合纵行切口,在无菌条件下分离并取出主动脉,置于含抗菌素的 D-Hanks' 液中,尽快冲洗去掉血管内外的血细胞并剔除血管外膜。用 1.25 g/L 胰蛋白酶消化血管内膜,20 min 后用含 20%(V/V)胎牛血清的 M199 终止消化,然后用手术刀轻刮内膜面并收集 PAEC。

1.2.2 PAEC 的原代培养 将收集的 PAEC 调整细胞密度为 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^4$ /L 后,常规用含 20%(V/V)胎牛血清的 M199 培养液,置 5% CO₂、37℃ 的培养箱内培养。

1.2.3 PAEC 的传代培养 生长融合成层的二代 PAEC,用 D-Hanks' 液轻洗 2~3 次,然后每瓶中加入 625 mg/L 胰蛋白酶和 0.1 g/L EDTA 混合液,室温消化 30 s~1 min,移去消化液,加入适量新鲜培养液,用弯吸管将细胞吹打下来,使其成细胞悬液,调细胞密度为 5×10^3 /L,加入 12 孔培养板内,每孔加入 0.5 ml 的细胞悬液,继续培养。当 PAEC 刚呈融合状态时,细胞数为 1.0×10^5 /孔,即开始进行下一步实验。

1.3 实验组的设计与条件培养液的收集

1.3.1 tPNS 与 PAEC 分泌 NO 的量效关系 实验分为三组:①正常对照组,条件培养液(conditional medium, CM)为无血清无酚红的 M199;②M199+tPNS 实验组,其中依 tPNS 最终浓度不同分为 0.125、0.25、0.5、1、2 g/L 五组;③M199+tPNS+EDTA 实验组,其中 tPNS 和 EDTA 的最终浓度分别为 2 g/L 和 0.2 g/L。每组为 6 孔。每孔加入的 CM 为 0.5 ml。在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后收集各组份的 CM,待测 NO 含量。

1.3.2 tPNS 与 PAEC 分泌 NO 的时效关系 实验分为三组:①正常对照组;②M199+tPNS 实验组;③

M199+tPNS+EDTA 实验组。后两组加入 CM 后,其中 tPNS 终浓度为 0.25 g/L,EDTA 为 2.0 g/L,每孔加入的 CM 为 0.5 ml。在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 0.5、1、2、4、6 h 后分别收集条件培养液,待测 NO 含量。

1.4 猪主动脉内皮细胞的形态学观察

各实验组的 PAEC 的形态特征用倒置相差显微镜观察比较。

1.5 一氧化氮浓度的测定

一氧化氮浓度的测定采用 Termin^[9]和 Green^[10]的方法,以上收集的各组份 CM,以 3 倍体积的待测样品和 1 倍体积的 Gress 试剂(10 g/L 的对氨基苯磺酸,1 g/L 的 N-奈基乙二胺,25 ml/L 的磷酸)混合后,在 550 nm 波长处测样品吸收值,样品的 NO 浓度从已知浓度的亚硝酸钠标准曲线上换算得出。NO 浓度单位以 $\mu\text{mol/L}$ 来表示。

1.6 统计学分析

所得数据用两样本均数比较的 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 猪主动脉内皮细胞的形态观察

在倒置相差显微镜下观察到猪主动脉内皮细胞呈典型的鹅卵石状形态。猪主动脉内皮细胞在 CM 中培养 24 h 后,tPNS 实验组的 PAEC 仍然呈融合状态,细胞皱缩不明显,细胞质中小空泡数量较少。而正常对照组 PAEC 的边缘出现皱缩,细胞间隙增大,细胞质中有大小不等的颗粒状空泡;tPNS+EDTA 组 PAEC 形态与对照组形态相似。

2.2 三七总皂甙对猪主动脉内皮细胞分泌一氧化氮的影响

猪主动脉内皮细胞在加入 tPNS 的 CM 中培养 24 h 后,分别检测各组 CM 中的 NO 含量,结果见 Figure 1。可见加有 tPNS 的各组份 CM 中的 NO 含量与对照组相比明显增高,从直方图上可以看出 PAEC 对 tPNS 较为敏感,当 tPNS 浓度为 250 mg/L 时,PAEC 分泌 NO 的含量便急剧上升,然后随着 tPNS 浓度的增加,CM 中 NO 的含量稍有上升并维持在一个平台上。与对照组相比,差异有极显著性统计学

意义($P < 0.001$)。在加有 EDTA 离子螯合剂的 tPNS 组份 CM 中 NO 含量则与对照组相似($P > 0.05$)。

2.3 三七总皂甙影响猪主动脉内皮细胞分泌一氧化氮的时效关系

培养中的 PAEC 加入 tPNS(250 mg/L)后 0.5 h, CM 中的 NO 含量即明显上升, 1 h 达到最高, 2 h 以后轻微下降但仍维持在较高的水平。加入 tPNS(250 mg/L)+EDTA(2 g/L)后各时间点均未有 NO 含量的升高; 与对照组基本相同(Figure 2)

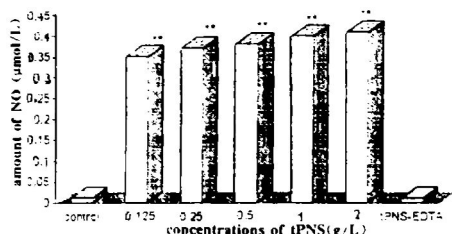


Figure 1. The effect on releasing nitric oxide (NO) by porcine aorta endothelial cells (PAEC) exposed to total *panax notoginseng* saponins (tPNS).

The vascular endothelial cells were seeded at 12 holes culture clusters about $(1.0 \times 10^5)/\text{hole}$. The test was divided into three groups: ① control, ② groups of tPNS (the concentration of tPNS was ranged from 0.125 g/L to 2 g/L), ③ group of tPNS (0.25 g/L) with EDTA (0.2 g/L). The amounts of NO released by PAEC after exposing to conditional medium for 24 h were determined by the methods of Termin and Green. The P values of NO in tPNS groups were little than 0.001 compared with control, and the P value of tPNS with EDTA was big than 0.05. ** $P < 0.001$, * $P > 0.05$, compared with control group.

3 讨论

三七总皂甙是中草药五加科植物田三七的药用成份, 主要含有人参二醇型皂甙 Rb1、人参三醇型皂甙 Rg1 和生物碱等成份。已知 tPNS 能引起血管的舒张, 降低血压。在兔主动脉实验中提示 tPNS 可通过抑制肾上腺素受体阻断 Ca^{2+} 进入细胞内而使血管扩张^[8], 它能使兔血

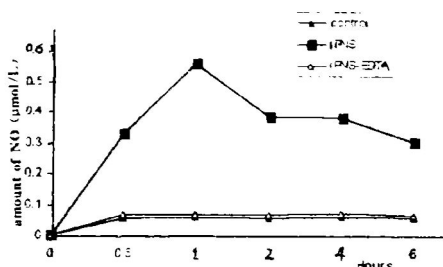


Figure 2. The concentrations of nitric oxide were released by porcine aorta endothelial cells (PAEC) which exposed to total *panax notoginseng* saponins (tPNS) (0.25 g/L) or tPNS (0.25 g/L) with EDTA (2 g/L) at the indicated times.

Vascular endothelial cells were seeded at 12 holes culutre clusters about $1.0 \times 10^5/\text{hole}$. The amount of NO in conditional medium was raised quickly when exposed to tPNS (■---■) and was ceased when plued EDTA (△---△). The control was expressed by (▲---▲).

浆中的组织型纤溶酶原激活物增加^[6], 也能促使体外培养的 PAEC 分泌组织型纤溶酶原激活物^[5]。本实验结果表明一定量的 tPNS 加入到培养的 PAEC 中, 能显著地促使 PAEC 分泌 NO。内皮细胞释放的 NO 是引起血管舒张的一种生理性介质。实验表明 NO 也参与一些疾病发生的病理过程, 如炎症、动脉粥样硬化等。内皮细胞内存在有 NO 合成酶^[11], 在某些活性物质如乙酰胆碱等刺激下, 细胞膜上的钙离子通道开放, 细胞内钙离子浓度升高, 在钙调素存在的情况下, 激活细胞内的 NO 合成酶, 合成 NO 并释放到胞外而产生生物学效应。有资料显示, NO 合成酶激活所需的细胞内钙离子浓度在 100~500 nmol/L 范围内, 钙离子浓度低于 100 nmol/L 时, NO 合成酶的活性小。启动 NO 合成的“开关”可定位于质膜上的钙离子泵^[12]。tPNS 是一种离子泵激动剂, 在离体培养的血管内皮细胞实验中, tPNS 及其单体均能增加细胞内的钙离子浓度^[13], 这种使胞内钙离子浓度增加的作用极快且有明显的 ATP 依赖性, 虽作用机制不很清楚, 但从其作用的速度和

ATP 的依赖性来看有可能与离子通道的开放有关。tPNS 使内皮细胞分泌 NO 增加,可能的机理是:tPNS 作用于内皮细胞,使其膜上的钙离子通道开放,胞外的钙离子内流,升高的钙离子在钙调素的协调下,激活细胞内的 NO 合成酶,合成并分泌 NO。在含有 tPNS 的 CM 中加入一定量的离子螯合剂 EDTA 后,使细胞内外的钙离子被螯合,阻断了胞内钙离子量的增加,从而阻断 NO 合成酶的激活,因而,NO 含量不增加。实验中还观察到,当 tPNS 的浓度增加到一定量时,短时间内 CM 中 NO 的量即明显升高,tPNS 的浓度进一步增加,CM 中 NO 的量却没有随 tPNS 的增加而上升,其上升到一定的高度后即维持在一定水平,亦表明 tPNS 的作用可能与离子通道的开放有关。已有资料表明,tPNS 对细胞膜的稳定性有保护作用^[14],高浓度的 tPNS 亦不引起血管内皮细胞膜的破坏^[13]。在我们的实验中,PAEC 在加有 tPNS 的 CM 中培养 24 h 后,其细胞形态基本保持完整,仍呈融合状态,也表明 tPNS 对内皮细胞有保护和维持生长的作用。tPNS 能明显增加培养中的 PAEC 分泌 NO,对培养的内皮细胞有稳定和保护作用,表明 tPNS 对如动脉粥样硬化、休克等疾病有一定的预防和治疗作用。

参考文献

- 1 苏雅,李勤华,张宝恒.三七绒根提取物(76017)对心血管的作用.药学报,1979,14(6):321~325.
- 2 张子昭,王懋德,陈植和,等.三七提取物对心脏的药理作用.药学报,1980,15(6):385.
- 3 莫云强.三七总甙注射液抗血栓及抗凝血作用.医学信息(云南省医学情报研究所),1986,5:9~10.
- 4 石琳,等.三七总甙升高颈动脉 PGI₂ 及降低血小板 TXA₂ 的作用.中国药理学报,1990,11(1):29.
- 5 刘青,邓满平.内皮联合培养:细胞间相互作用对组织型纤溶酶原激活剂的影响.中山医科大学学报,1992,13(4):18.
- 6 YIN Xiao-chuan, HUAN Xi, DENG Yi-ping. The effect of panax notoginseng saponins (PNS) on the plasma tissue-type plasminogen activator (t-PA) and endothelial morphology. 9th International Symposium on Atherosclerosis. Rosemont Illinois, USA, 1992,107.
- 7 赵丹,赵雪俭,林群,等.人参二醇组皂甙对失血性休克犬血清 5-HT 的影响及血小板的保护作用.中国病理生理杂志,1992,8(1):50~54.
- 8 关永源,贺华,陈俊秀.三七总皂甙对兔主动脉条收缩反应的影响.中国药理学报,1985,6(4):276~279.
- 9 Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solution. Life Science, 1992, 51: 1621~1629.
- 10 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 1979, 95: 351~358.
- 11 Fuchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium dependent relaxing and contracting factors. FASEB J, 1989, 3: 2007~18.
- 12 Richard G, Knowles, Salvador Moncada. Nitric oxide as a signal in blood vessels. Trends Biochem Sci, 1992, 17(10):399~402.
- 13 DENG Yi-ping, LO Wing-joe, KWAN Chiu-yin, et al. The effect of total panax notoginseng saponins (tPNS) and its components Rb1 and Rg1 on the intercellular free calcium ion of aortic endothelial cells (aEC) under laser scanning confocal microscope (LSCM) observations. Sin-franch Symposium, Shanghai, September 9-11, 1995; 126.
- 14 李麟仙,王子灿,李盈盈,等.三七根总皂甙对家兔急性脑缺血的保护作用.中华神经精神科杂志,1987,20(2):109~112.

(1995-12-06 收到, 1996-02-22 修回)