

人参果提取物对H₂O₂诱导人脐静脉内皮 ECV304 细胞损伤的保护作用

李晶^{1*}, 越皓¹, 李娜², 于珊珊¹, 戴雨霖¹, 郑飞¹, 刘淑莹^{1#} (1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学研发中心中药药理实验室, 长春 130117)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0942-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.24

摘要 目的: 研究人参果提取物对过氧化氢(H₂O₂)诱导人脐静脉内皮细胞(ECV304细胞)损伤的保护作用。方法: 体外培养的ECV304细胞随机均分为正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与人参果提取物①、②、③、④(10、20、40、80 μg/ml)组, 给予相应药物培养ECV304细胞24 h后, 用H₂O₂(0.3 mmol/L)培养ECV304细胞4 h以复制细胞氧化损伤模型; 采用MTT法检测细胞活力以筛选最适质量浓度。体外培养的ECV304细胞随机均分为正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与人参果提取物(80 μg/ml)组, 给予相应药物培养ECV304细胞24 h后同上复制细胞氧化损伤模型。采用HE染色观察细胞形态; 采用流式细胞仪测定细胞周期; 检测丙二醛(MDA)含量和乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果: 人参果提取物最适给药质量浓度为80 μg/ml。与正常对照组比较, 模型组细胞部分皱缩, 边缘模糊, 细胞有融合现象; 细胞活力减弱; G₁期细胞比例升高, S期和G₂期细胞比例降低; SOD活性减弱, MDA含量增加, LDH活性增强, 差异有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较, 人参果提取物组细胞损伤程度减轻; G₁期细胞进入S期和G₂期的细胞比例升高, G₁期细胞比例降低, S期细胞比例升高; SOD活性增强, MDA含量减少, LDH活性减弱, 差异有统计学意义(P<0.01)。结论: 人参果提取物对H₂O₂损伤的ECV304细胞具有保护作用, 其机制可能与加快细胞周期进程、抗氧化作用有关。

关键词 人参果; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化氢; 抗氧化; 细胞周期

Protective Effect of the Fruit of *Panax ginseng* on H₂O₂-induced Injury of Human Umbilical Vein Endothelial ECV304 Cells

LI Jing¹, YUE Hao¹, LI Na², YU Shan-shan¹, DAI Yu-lin¹, ZHENG Fei¹, LIU Shu-ying¹ (1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Pharmacology Laboratory of Chinese Drugs, Research and Development Center, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate protective effect of the Fruit of *Panax ginseng* (FG) on human umbilical vein endothelial cells (ECV304) injury induced by hydrogen peroxide. METHODS: *In vitro* cultured ECV304 cells were randomly divided into normal control group (conventional culture), model group (conventional culture) and FG extracts ①, ②, ③, ④ groups (10, 20, 40, 80 μg/ml). ECV304 cells were treated with corresponding drug for 24 h, and then the cells were cultured in media contained H₂O₂ (0.3 mmol/L) to generate the oxidative damage model. MTT assay was used to detect the cell viability, which screen the optimal mass concentration. The ECV304 cells were randomly divided into normal control group (conventional culture), model group (conventional culture) and FG extract group (80 μg/ml) with treatment of corresponding drug for 24 h and then the cells were cultured to generate the oxidative damage model as mentioned below. The cell morphology was observed by HE staining; the cell cycle was determined by flow cytometry instrument; the lactate dehydrogenase (LDH) activity, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were detected. RESULTS: The optimal mass concentration of FG extracts was 80 μg/ml. Compared with normal control group, cells of model group were shrinkage, the cell edge was blurred, cells were fused; cell viability decreased; percentage of G₁ phase increased, percentage of S and G₂ phase decreased; SOD activity decreased, MDA content increased, LDH activity increased. There was statistical significant difference (P<0.01). Compared with model group, cell activities of FG extracts group were enhanced, cell damage degree was reduced; cell percentage of G₁ phase cells into S and G₂ phase were increased, percentage of G₁ phase cells decreased, and percentage of S phase cells increased; SOD activity increased, MDA content decreased, LDH activity decreased. There was statistical significant difference (P<0.01). CONCLUSIONS: FG extracts play a protective role on ECV304 cells damaged by H₂O₂, and its mechanism may be related to accelerate the process of cell cycle and antioxidant effect.

KEYWORDS Fruit of *Panax ginseng*; Human umbilical vein endothelial cells; H₂O₂; Anti-oxidation; Cell cycle

人参果(Fruit of *Panax ginseng*)为五加科植物人参(*P. gin-*

* 研究实习员, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 0431-86045467。
E-mail: 244987746@qq.com

通信作者: 研究员, 博士生导师。研究方向: 中药化学与有机质谱学。电话: 0431-86045467。E-mail: syliu19@yahoo.com.cn

seng C.A.Meyer)的成熟果实, 含有人参皂苷、多糖、生物碱、挥发油、氨基酸、无机元素等, 其中主要化学成分是人参皂苷, 包括人参皂苷 Re、Rg₃、Rb₁、Rb₂、Rd 等^[1]。据文献记载, 人参果中人参皂苷的含量约为人参根的4倍^[2], 人参皂苷 Re 的含量是人参根的30倍^[3-4]。人参果对内分泌系统、免疫系统、男性生殖

系统与代谢系统有一定影响,且具有一定的抗衰老作用^[6-7]。另外,人参皂苷在心脑血管疾病及抗肿瘤方面的作用显著^[9-13]。在前期的实验中,笔者对人参的不同部位提取物,包括人参花、人参根、人参茎叶以及人参果进行了抗氧化方面的筛选,筛选出人参果具有较强的抗氧化作用。

血管内皮细胞是人体最重要的内分泌和旁分泌细胞。血管疾病(Diseases of blood vessel)主要包括动脉粥样硬化、炎性血管疾病、功能性血管疾病、血管的真性肿瘤性疾病等^[8]。本研究通过对人参果抗氧化方面的研究,初步探讨其保护血管内皮细胞氧化损伤的作用机制,针对其在血管损伤性疾病中的作用进行研究,为寻求血管疾病新的治疗药物或保健品提供思路和方向。

1 材料

1.1 仪器

EXPO32型流式细胞仪(美国Beckman公司);CO₂培养箱(美国ESCO公司);Elx800型酶标仪(美国Bio-Rad公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

人参果提取物(长春中医药大学吉林省人参科学研究院制备,经长春中医药大学吉林省人参科学研究院越皓研究员鉴定为真品,含50%总皂苷);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 细胞系

人脐静脉内皮细胞(ECV304细胞)由长春中医药大学研发中心提供。

2 方法

2.1 人参果提取物最适质量浓度的筛选

2.1.1 细胞培养与分组、给药 ECV304细胞接种于含10%胎牛血清、1%双抗的1640培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)混合液消化,72h传代1次。取对数生长期的ECV304细胞随机分成6组,即正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与人参果提取物①、②、③、④(10、20、40、80 μg/ml)组。给予相应药物培养ECV304细胞24h后,以H₂O₂(0.3 mmol/L)培养ECV304细胞4h以复制细胞氧化损伤模型。

2.1.2 MTT法测定细胞活力 MTT本身是一种黄色的染料,MTT法是一种检测细胞存活和生长增殖情况的方法。琥珀酸脱氢酶存在于活细胞线粒体中,能使外源性的MTT还原为不溶性的蓝紫色结晶物甲臜,能够沉积在细胞中,而死细胞不含琥珀酸脱氢酶,因此无这种功能。二甲亚砜(DMSO)能溶解沉积在细胞中的甲臜,溶液颜色深浅与所含的结晶量成正比,用酶标仪在490 nm波长处测定光密度(OD),可间接反映细胞活力。取消化后的细胞(密度约 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$)100 μl接种于96孔板,培养12h完全贴壁,按“2.1.1”项下方法分组、给药,每组设6个复孔,模型组细胞用常规培养液培养,人参果提取物组细胞用人参果提取物处理24h后,模型组和人参果提取物组均用H₂O₂(0.3 mmol/L,4h)处理,每孔20 μl加入MTT,4h后甩板,每孔加入150 μl的DMSO使其显色,显色后振荡孵育10 min,使结晶完全溶解,酶标仪490 nm波长处测OD,以OD表明细胞活力。

2.2 各组细胞形态学的观察

体外培养的ECV304细胞随机均分为3组,即正常对照

(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与人参果提取物(80 μg/ml)组。给予相应药物培养ECV304细胞24h后,同“2.1.1”项下方法复制细胞氧化损伤模型。HE染色,即苏木精-伊红染色,苏木精使细胞核内染色质和胞质内核糖体呈紫蓝色,伊红使细胞质和细胞外质呈红色,是形态学最常用的染色方法。将细胞用胰酶消化后,调整细胞浓度约至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,滴加于盖玻片上,培养相应时间后,取出细胞爬片,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次。甲醇固定,PBS洗涤2次,苏木素染液染色2~3 min,自来水洗涤。浸入伊红染液染色1 min,自来水洗涤。吹干或自然晾干细胞爬片后,中性树脂胶封片。

2.3 各组细胞周期的检测

分组、给药与复制模型同“2.2”项下方法。取对数生长期的各组细胞,胰酶消化后收集细胞于离心管中,以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min,弃上清液,4℃下PBS清洗5次。将约1 ml 70%乙醇(4℃)缓缓贴壁加入离心管,固定细胞。上机前,以离心半径为8 cm、1 000 r/min离心5 min,重新收集细胞,PBS洗2次。加入RNA酶和20 μl溴化碘(PI),室温避光染色20 min,用300目尼龙网过滤,经流式细胞仪检测。

2.4 各组细胞SOD、MDA、LDH水平的检测

分组、给药与复制模型同“2.2”项下方法。收集细胞培养液,以离心半径8 cm、10 000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒要求检测细胞上清液中SOD、LDH的活性与MDA的含量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 12.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人参果提取物最适质量浓度的筛选结果

与正常对照组比较,模型组细胞活力减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,人参果提取物④组细胞活力增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,人参果提取物最适给药质量浓度为80 μg/ml。各组细胞活力的检测结果见表1。

表1 各组细胞活力的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 The activities results of ECV304 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度, μg/ml	OD
正常对照组		0.56 ± 0.02
模型组		0.42 ± 0.02*
人参果提取物④组	80	0.46 ± 0.01#
人参果提取物③组	40	0.44 ± 0.02
人参果提取物②组	20	0.41 ± 0.01
人参果提取物①组	10	0.39 ± 0.02

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$

3.2 各组细胞形态学的观察结果

正常对照组细胞生长良好,细胞核细胞浆染色对比分明,细胞呈梭形,细胞核多为类圆形;模型组细胞部分皱缩,细胞核暗淡、碎裂,核仁消失,伪足消失;人参果提取物组细胞损伤程度减轻,细胞核完整性较模型组好,皱缩现象减轻,伪足略变细。各组细胞形态学的观察结果见图1。

3.3 各组细胞周期的检测结果

与正常对照组比较,模型组G₁期细胞比例升高,进入S期

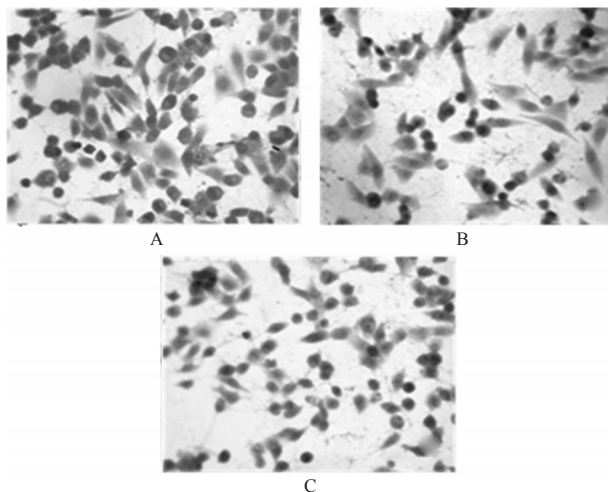


图1 各组细胞形态学的观察结果

A.正常对照组;B.模型组;C.人参果提取物组

Fig 1 The HE staining results of ECV304 cells in each group

A. normal control group; B. model group; C. FG extract group

和G₂期的细胞比例降低。与模型组比较,人参果提取物组G₁期细胞进入S期和G₂期的细胞比例升高,G₁期细胞比例降低,S期细胞比例升高。说明人参果提取物能够增加细胞DNA的合成,从而保护氧化损伤模型细胞,促进细胞增殖。各组细胞周期的检测结果见图2。

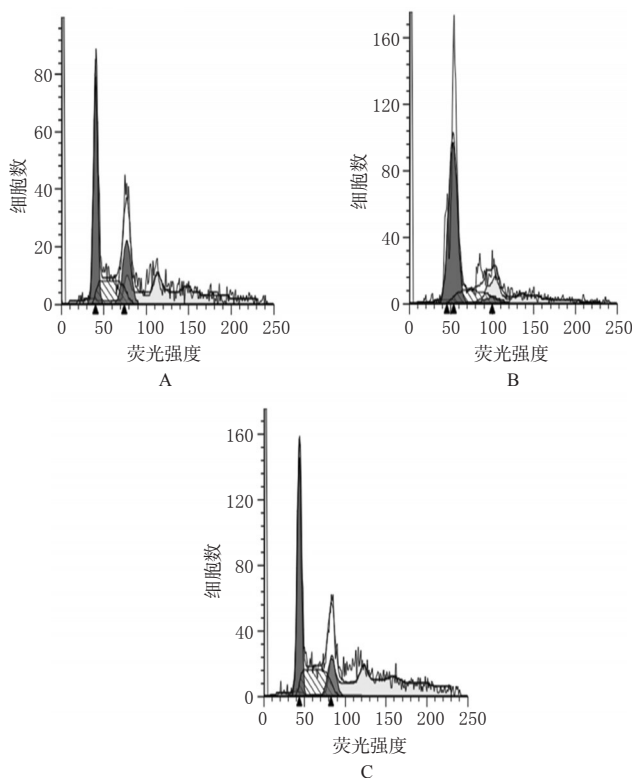


图2 各组细胞周期的检测结果

A.正常对照组;B.模型组;C.人参果提取物组

Fig 2 The cycle results of ECV304 cells in each group

A. normal control group; B. model group; C. FG extract group

3.4 各组细胞SOD、MDA、LDH水平的检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞SOD活性减弱,MDA含

量增加,LDH活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,人参果提取物组细胞SOD活性增强,MDA含量减少,LDH活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞SOD、MDA、LDH水平的检测结果见表2。

表2 各组细胞SOD、MDA、LDH水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 The level of SOD, MDA and LDH of ECV304 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, $\mu\text{g/ml}$	SOD, U/ml	MDA, ng/ml	LDH, U/L
正常对照组		38.63 ± 0.41	1.86 ± 0.37	161.29 ± 43.11
模型组		$22.73 \pm 0.88^*$	$5.43 \pm 0.97^*$	$488.14 \pm 79.05^*$
人参果提取物组	80	$26.03 \pm 0.36^{\#}$	$2.59 \pm 0.53^{\#}$	$397.31 \pm 90.25^{\#}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, $^{\#}P < 0.01$

4 讨论

血管内皮细胞是覆盖于血管内膜表面的单层扁平或多角形的细胞。血管内皮细胞受损将会引起多种血管疾病的发生,氧化损伤是引起血管内皮细胞受损的主要原因之一^[14]。生物膜中的多不饱和脂肪酸可能受到机体内过多的氧自由基的攻击,从而引发脂质过氧化作用,裂解生成脂质过氧化终产物MDA。SOD是体内氧自由基的清除剂之一,可阻碍氧自由基的产生,保护细胞的正常功能。因此,测定MDA水平和SOD活力可间接反映体内自由基的产生和毒物对细胞的损伤情况,亦可反映组织内清除自由基的能力。LDH主要存在于细胞内,属于胞浆酶,是生物体细胞内参与糖代谢过程一种重要的酶,参与机体的能量代谢,当细胞受到损伤时会释放到基质中,故测定LDH含量可以推断细胞的损伤程度^[15]。

本研究结果表明,人参果提取物能够促进氧化损伤内皮细胞的增殖,使胞浆饱满,核仁清晰、呈梭形;能够明显缓解因氧化损伤ECV304细胞G₁期细胞增多、S期细胞减少的现象,在预处理中起到修复、逆转细胞活力的作用;并且能够降低MDA、LDH的水平,明显增强SOD活性,具有一定的抗氧化作用。综上所述,人参果提取物通过抗氧化作用保护血管内皮细胞免受损伤,其作用机制可能与其促进氧化损伤内皮细胞增殖、调节细胞周期、降低MDA含量、减弱LDH活性、增强SOD活性有关。这一结果为进一步研究开发血管疾病的治疗药物及保健品奠定了基础。

参考文献

- [1] Choi SY, Cho CW, Lee Y, et al. Comparison of ginsenoside and phenolic ingredient contents in hydroponically-cultivated ginseng leaves, fruits, and roots[J]. *J Gins Res*, 2012, 36(4):425.
- [2] 王继彦,孙光芝,李向高.人参果的化学、药理研究进展[J].吉林农业大学学报,2005,27(1):71.
- [3] 孙伟娜.人参果化学成分研究[D].长春:长春中医药大学,2010.
- [4] 曲芯瑶,赵宏峰,弥宏,等. RP-HPLC 测定人参果总皂苷中人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 的含量[J].中国社区医师,2014,30(1):5.
- [5] 曹智,张燕娣,许永华,等.人参有效成分及其药理作用研究新进展[J].人参研究,2012,24(2):39.
- [6] Cho KS, Park CW, Kim CK, et al. Effects of Korean ginseng berry extract (GB0710) on penile erection: evidence from in vitro and in vivo studies[J]. *Asian J Androl*,

山西省医院静脉用药调配中心运行现状和工作模式调查比较[△]

李志宏^{1*}, 陈维红^{1#}, 李芳²(1.山西大医院, 太原 030032; 2.太原钢铁集团总医院, 太原 030003)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0945-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.25

摘要 目的:为山西省医院静脉用药调配中心(PIVAS)的发展提供参考。方法:对山西省医院的PIVAS进行现场走访和问卷调查,内容包括PIVAS的运行情况和工作模式,并对调查结果进行分析,提出相关建议。结果与结论:63.1%的PIVAS是在4年内新建的,各PIVAS占地面积相差很大,58.0%的PIVAS日工作量在1 000袋以下,只有4家PIVAS的服务覆盖了全院各科室;在工作模式方面,9家PIVAS采用传统的工作模式,即“一人一筐”模式,有3家在传统模式基础上改进为“多人一筐”的排药模式,有7家采用了按品种为单位的集中排药模式。目前山西省部分医院PIVAS仍处于发展初期,且没有充分发挥其应有的作用。建议应给予PIVAS人员、场地、收费方面的支持,并注重学习和交流,根据实际情况选择适合本院的工作模式。

关键词 PIVAS; 运行现状; 工作模式; 调查

Comparison of Operation Situation and Working Mode of PIVAS in Hospitals of Shanxi Province

LI Zhi-hong¹, CHEN Wei-hong¹, LI Fang²(1. Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China; 2. General Hospital of Taiyuan Iron&Steel (Group) Co., Ltd., Taiyuan 030003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the development of Pharmacy intravenous admixture services (PIVAS) in hospitals of Shanxi province. METHODS: An investigation was undertaken with both on-site visiting and questionnaire survey to PIVAS of hospitals of Shanxi province, including the operation situation and working mode of PIVAS, to analyze the results of investigation and make recommendations. RESULTS & CONCLUSIONS: 63.1% PIVAS have been built in last 4 years and the floor spaces of PIVAS have a large difference. The daily workload of 58.0% PIVAS is less than 1 000 bags, and only 4 PIVAS services cover the whole hospital. 9 PIVAS are adopting the traditional working mode, which means “one basket for one label”; 3 PIVAS develop “one basket for several labels” model based on the traditional model and 7 PIVAS adopt the model of centralized units by species. Some PIVAS of hospital in Shanxi province are still in initial stage and not functioning adequately. It is suggested that supporting of PIVAS should be given in aspects of staff, sites and charges, learning and communication should be emphasized and the suitable working mode should be picked up based on its actual situation.

KEYWORDS Pharmacy intravenous admixture services; Operation situation; Working mode; Investigation

2013, 15(4): 503.

- [7] Kim ST, Kim HB, Lee KH, *et al.* Steam-dried ginseng berry fermented with *Lactobacillus plantarum* controls the increase of blood glucose and body weight in type 2 obese diabetic db/db mice[J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60(21): 5 438.
- [8] 孙瑞娟, 朱毅, 汪南平, 等. 血管病变机制与血管功能调控研究的现状与趋势[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(2): 103.
- [9] Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, *et al.* In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*[J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2007, 59(5): 589.
- [10] Zhang YJ, Zhang XL, Li MH, *et al.* The ginsenoside rg1 prevents transverse aortic constriction-induced left ventric-

ular hypertrophy and cardiac dysfunction by inhibiting fibrosis and enhancing angiogenesis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 2(1): 50.

- [11] Xie JT, Wang CZ, Zhang B, *et al.* In vitro and in vivo anticancer effects of American ginseng berry: exploring representative compounds[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(9): 1 552.
- [12] Li XL, Wang CZ, Sun S, *et al.* American ginseng berry enhances chemopreventive effect of 5-FU on human colorectal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(4): 943.
- [13] Xie JT, Du GJ, McEntee E, *et al.* Effects of triterpenoid glycosides from fresh ginseng berry on SW480 human colorectal cancer cell line[J]. *Cancer Res Tr*, 2011, 43(1): 49.
- [14] 余海滨, 崔琳, 周淑娟, 等. 大黄素对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞的影响[J]. *中国药房*, 2010, 21(43): 4 043.
- [15] 贺海波, 许佳, 徐媛青, 等. 竹节参总皂苷预处理对冠脉结扎致大鼠急性心肌缺血损伤的影响[J]. *中药材*, 2012, 35(5): 744.

△基金项目:山西省软科学研究项目(No.201304107902)

*主管药师, 硕士。研究方向: 静脉用药调配中心管理。E-mail: zhihongli0325@sohu.com

#通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 医院药学。E-mail: whchen@126.com

(收稿日期: 2014-04-25 修回日期: 2014-07-03)

(编辑: 张静)