DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.010
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)05-0399-03

论著

三七皂甙对氧化损伤大鼠脑能量代谢及线粒体呼吸功能的影响

王碧江,陈剑鸿,刘松青 (第三军医大学西南医院药局,重庆 400038)

提 要:目的 探讨三七皂甙对氧化损伤型类阿尔茨海默病大鼠脑组织能量代谢的影响。方法 采用二羟延胡索酸(DHF)和$FeCl_3$-ADP左侧脑室注射法制作大鼠氧化损伤型类AD大鼠模型;用高效液相法测定脑组织中含高能磷酸键的ATP、磷酸肌酸等的含量,用氧电极法测量线粒体呼吸链呼吸功能,观察分析各指标在同样插管但注射生理盐水的手术对照组以及模型组、给药组(给三七皂甙)之间的差异。结果 给药组ATP、磷酸肌酸显著高于模型组,但仍低于对照组,给药组ADP、AMP显著低于模型组。给药组线粒体3、4态呼吸以及P/O显著高于模型组。结论 三七皂甙可以有效地改善氧化损伤型类AD大鼠脑能量代谢及线粒体功能,提示其可用于AD的治疗。

关键词:三七皂甙;氧化损伤;脑;线粒体;能量代谢
中图法分类号:R282.71;R322.81;R329.25 文献标识码:A

Effects of saponins of *Panax Notoginseng* on energy metabolism and mitochondrial respiratory function of brain in oxidative damaged rats

WANG Bi-jiang, CHEN Jian-hong, LIU Song-qing (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of saponins of *Panax notoginseng* (PNS) on the brain energy metabolism and mitochondrial respiratory function of oxidative damaged rat model mimic to Alzheimer disease (AD). Methods Oxidative damaged rat model mimic AD (AD group) was established by injection of dihydroxy fumaric acid (DHF) and FeCl3-ADP into the left lateral ventricle of rats. The contents of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and phosphate creatine (Pcr) in brain were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The mitochondrial functions (R3, R4, P/O, and OPR) were observed by Clark oxygen electrode method. The difference in the above parameters in rats in the control group (injection of saline), model group, and administration group (injection of PNS) was observed. Results The levels of ATP, Pcr, and R3, R4, P/O, and OPR of rats in AD group were significantly lower than those in the control group (0.9% NaCl instead of DHF-FeCl3-ADP), but those in PNS group were higher than those in the AD group. Conclusion PNS can improve brain energy metabolism and mitochondrial function of oxidative damaged rats, suggesting that PNS could be used for the treatment of AD.

Key words: saponin of *Panax notoginseng*; oxidative damage; brain; mitochondrial; energy metabolism

脑组织中抗氧化酶活性相对较低,易遭受自由基等氧化剂的损伤。脑线粒体含量丰富,除与活跃的高级中枢神经活动相适应产生足量的能量物质外,也是内环境紊乱时氧自由基产生的主要场所。同时,氧化剂对线粒体可造成广泛的影响[1],脑组织在受到氧化剂损伤时,其必然影响到线粒体功能、细胞能量代谢以及乙酰胆碱合成,构成阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)的发病学基础[2]。文献[3~7]报道,三七皂甙(saponins of panax notoginseng, PNS)可以减轻脂质过氧化损伤、清除自由基、保护抗氧化酶和ATP酶,因此三七皂甙可能对AD病具有一定的效果,但是三七皂甙对AD是否有治疗作用少见文献报道。本实验观察了三七皂甙对氧化型类AD大鼠脑能量代谢及线粒体呼吸功能的影响,为进一步开发三七皂甙对AD的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物及氧化损伤型类AD大鼠模型

Wistar雄性大鼠25只(实验中因动物个体差异及实验技术造成样本丢失7例),体质量(200±10)g,由第三军医大学实验动物中心提供。参照文献[8,9]的方法,大鼠用戊巴比妥钠

作者简介:王碧江(1964-),女,河北省唐山市人,主管药师,主要从事中药药理学方面的研究。电话:(023)68754000-73120

收稿日期:2003-03-01;修回日期:2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

麻醉后，固定头部，剪去皮肤，暴露头骨，于左侧脑室部位埋置内径约 0.8 mm 的外套管（含内芯）。给药时，拔除内芯，以恒速推进泵经外套管向脑室内注射。从手术日起，模型组和药物治疗组各注射二羟延胡索酸（DHF）（2.4 mmol/L）-$FeCl_3$（43 nmol/L）-ADP（1.56 μmol/L）5 μl/次，每隔 2 d 注射 1 次，共 3 次。

1.2 实验分组

大鼠分为对照组（Normal Control，NC）、模型组（AD）、给药组（PNS），每组 6 只。各组操作如前所述，其中对照组以等量生理盐水代替 DHF-FeCl3-ADP。各组在造模前 1 周给药，腹腔注射 80 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ PNS，但对照组及模型组以等量生理盐水代替 PNS，连续 3 周，然后取材测定指标。

1.3 脑线粒体的分离

大鼠断头迅速取出全脑，加入含有 225 mmol/L 甘露醇、75 mmol/L 蔗糖、1 mmol/L EDTA、25 mmol/L Tris、0.25% 牛血清白蛋白的分离介质 10 ml（pH 7.4），冰上匀浆，800× *g* 离心 10 min，取上清液 12 000× *g* 离心 15 min，取沉淀，重复 2 次。取少许沉淀加入 200 μl 分离介质，悬浮线粒体，以 Lowrry 法测定蛋白质浓度。

1.4 线粒体呼吸控制率的测定

呼吸Ⅲ态、Ⅳ态、呼吸控制率（RCR）、磷氧比及氧化磷酸化效率（OPR）的测定采用 Clark 氧电极法[10]。取 1 mg 蛋白的线粒体悬液加入 2.5 ml 反应体系中孵育 1 min，加入由 5 nmol/L 丙酮酸和 5 mmol/L 苹果酸钠组成的底物 20 μl，2 min 后再加入 45 mmol/L 的 ADP 10 μl，测得的氧消耗率为呼吸Ⅲ态（R3），待 ADP 完全耗尽（磷酸化）后测得的氧消耗率为呼吸Ⅳ态（R4）。RCR= R3/R4；P/O= ADP 含量/呼吸Ⅲ态总耗氧量；OPR= P/O× R3。

1.5 ATP、ADP、AMP、磷酸肌酸（phosphate creatine，PCr）含量测定

采用高效液相法[11]断头取脑，液氮冷冻，敲除颅骨取出全脑。在液氮浸泡下将组织杵成粉，取（200±20）mg，加入预冷 0.42 mol/L 高氯酸 2.0 ml，用玻璃匀浆器匀浆，4 ℃以 6 000 r/min 离心 5 min。取上清液 1 ml，加入 1% 甲基橙 10 μl，用 1 mol/L 氢氧化钾滴定至黄色，置冰浴 10 min，再次离心，上清用 0.45 μm 滤膜过滤，上机测定。流动相为 220 mmol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4 缓冲液，pH 6.5（内含甲醇和四丁基氢氧化胺）。色谱条件：λ= 210 nm，流速 1.3 ml，柱温 20～25 ℃，进样量为 10 μl。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，结果用 SPSS11.0 进行统计学分析，其中均数间差别显著性检验用 FLSD 法。

2 结果

2.1 脑组织 ATP 等含量的变化

表 1 所示，模型组（AD 组）ATP 与 PCr 均较对照组显著降低（$P<0.05$），ADP 显著性升高（$P<0.05$）。用药组（PNS）ATP 与 PCr 均较模型组显著增高（$P<0.05$），AMP 较模型组显著降低（$P<0.05$），ADP 与模型组没有显著性差异（$P>0.05$）。

2.2 脑线粒体呼吸功能的变化

表 2 所示，模型组 R3、R4、P/O、OPR 均较对照组显著降低（$P<0.05$）。在给药组，R3、R4、P/O、OPR 均较模型组显著回升（$P<0.05$），RCR 在各组之间没有显著性差异。

表 1 三七皂甙对氧化损伤型大鼠脑组织中 ATP、Pcr 等含量的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Effects of saponins of *Panax notoginseng* on the levels of ATP and Pcr in the brain of oxidative damaged AD rats（μmol/g·d）（$\bar{x} \pm s$）

Group	ATP	ADP	AMP	PCr
Control	3.014±0.294 *	0.634±0.074 *	0.283±0.024 *	3.945±0.606 *
AD	1.479±0.134	1.271±0.083	0.627±0.085	2.170±0.250
PNS	2.419±0.275 *	1.198±0.053	0.348±0.038 *	4.189±0.584 *

ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diophosphate; AMP: Adenosine monophosphate; PCr: Phosphate creatine. *: $P<0.05$ *vs* AD group

表 2 三七皂甙对氧化损伤型大鼠脑线粒体呼吸功能的影响

Tab 2 Effects of saponins of *Panax notoginseng* on mitochondrial respiratory function of oxidative damaged AD rats（R3, R4 and OPR: nmol O_2/min·mg·pro）

Group	R3	R4	RCR	P/O	OPR
Control	57.15±6.90 *	23.92±4.26 *	2.43±0.35	1.80±0.20 *	102.38±9.93 *
AD	34.31±4.40	16.17±3.76	2.17±0.31	1.30±0.09	44.67±8.09
PNS	50.25±4.47 *	23.82±2.61 *	2.12±0.12	1.77±0.13 *	88.78±10.36 *

R3: The third respiratory state 3; R4: The forth respiratory state; RCR: Respiratory control rate; P/O: Phosphor/oxygen; OPR: Oxygenated phosphate rate *: $P<0.05$, *vs* AD group

3 讨论

脑组织富含不饱和脂肪酸，由于单位分子脂肪酸完全氧化较葡萄糖耗氧量大，其抗氧化酶活性相对较低，因此易遭受自由基的氧化损伤。线粒体是细胞中合成能量的工厂，在脑组织中，线粒体含量丰富，与活跃的高级中枢神经活动相适应，为其提供丰富的能源物质。但也是氧自由基产生的主要部位。当细胞内环境被破坏时，线粒体呼吸功能及能量代谢便会受到较大的影响。本实验采用二羟延胡索酸（DHF）和 FeCl3-ADP 左侧脑室注射造成大鼠氧化损伤模型，结果指出，在模型组，脑组织中 ATP 及 Pcr 含量显著降低，表明脑组织在氧化损伤后能量的合成代谢受到严重影响。模型组 ADP、AMP 含量显著增加，可能与模型制作过程中给予外源性 ADP 有关。另外，模型组 R3、R4、P/O 及 OPR 均显著降低，线粒体呼吸Ⅲ态（R3）为加入底物及 ADP 时快速耗氧期的耗氧速率，呼吸Ⅳ态（R4）为Ⅲ态状态下 ADP 耗尽后的耗氧速率，R3、R4 之比值为呼吸控制率 RCR。R4 依赖于内膜通透性。P/O 和 OPR 均能表示线粒体呼吸链释放能量偶联 ADP 合成 ATP 的效率，表明氧化损伤时，线粒体内膜通透性及内膜上复合物受损，造成电子传递过程中电子漏失及电子传递障碍，线粒体呼吸功能严重受损。氧化剂可损伤线粒体结构和功能，影响多种代谢酶的活性，可以造成葡萄糖的氧化分解障碍，乙酰胆碱合成不足[1,2]，影响胆碱

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能神经元功能，引起 AD 患者学习记忆呈渐进性减退；另一方面，大量自由基还可损伤线粒体 DNA 及线粒体 DNA 聚合酶[12]，影响呼吸链中各酶及酶复合物的活性，干扰能量代谢[13]。

因此，氧化损伤与 AD 病的发生发展密切相关。三七为五加科人参属植物三七的干燥根，具有抗氧化、增强细胞色素氧化酶活性等多种功效[14]。同时许多实验证明三七的主要活性成分——三七皂甙具有抗氧化作用。在本实验中，给药组 ATP 及 Pcr 显著回升，表明三七皂甙能有效地改善细胞能量代谢。给药组 R3、R4、P/O 及 OPR 均显著回升，说明三七皂甙可恢复 R3、R4 进而改善 AD 模型鼠氧化磷酸化偶联作用，改善 AD 大鼠的呼吸功能，改善能量代谢。文献[3~7]报道，三七皂甙可以减轻脂质过氧化损伤、清除自由基、保护抗氧化酶和 ATP 酶，因此三七皂甙对氧化损伤型类 AD 大鼠的改善线粒体功能、改善能量代谢的作用可能与这些因素有关。

但是三七皂甙是跨过血脑屏障作用于脑实质细胞(如神经元细胞和/或胶质细胞)直接发挥抗氧化作用，还是先作用于脑血管改善脑循环进而间接发挥作用，尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Van R H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging [J]. Exp Gerontol, 2001, 36(7): 957—968.
[2] Meier R W, Iwangoff P, Bertoni F C. What is primary and what secondary for amyloid deposition in Alzheimer's disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 719: 230—237.
[3] 葛林虎，吴哲凡，陈汉章. 三七对失血性休克晚期家兔治疗作用的探讨[J]. 中国现代医学杂志，2002, 12(2): 1—3.
[4] 刘 雯，吴青锋，李 华. 三七皂甙对无糖培养引起 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用[J]. 上海中医药杂志，2002, 36(2): 46—48.
[5] 罗 伟，田 明，张 新. 三七总甙对高血压病患者氧自由基及红细胞流变性的影响[J]. 安徽中医临床杂志，2000, 12(5): 369—371.
[6] 陈江斌，许家璃，江 洪. 三七总皂苷对冠心病患者过氧化脂质及纤维蛋白溶酶原激活物的影响[J]. 中国新药杂志，2000, 9(11): 781—782.
[7] 李淑慧，李晓辉，楚 延. 三七总皂苷抗炎作用机制的实验研究[J]. 中草药，2000, 31(9): 676—678.
[8] 邱 宏，金国琴，张学礼，等. 调心方对氧化损伤型类 AD 大鼠能量代谢的影响[J]. 中药药理与临床，2002, 28(1): 18—21.
[9] Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, *et al*. beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model[J]. Neurosci Lett, 1994, 170(1): 63—66.
[10] 李露斯，郑彩梅. 大鼠脑线粒体呼吸功能测定的方法探讨[J]. 第三军医大学学报，1994, 16(6): 451—453.
[11] 叶冀明，朱明春，孙继英，等. HPLC 同步测定磷酸肌酸、腺苷酸等的探讨[J]. 昆明医学院学报，1995, 16(3): 13—16.
[12] Graziewicz M A, Day B J, Copeland W C. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(13): 2817—2824.
[13] Tanaka S, Takehashi M, Matoh N, *et al*. Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid[J]. J Neurochem, 2002, 82(2): 305—315.
[14] 舒 彬，周吉祥，吴宗耀. 红花、三七制剂治疗肌肉拉伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报，1997, 19(5): 427—430.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2004)05-0401-01

个案与短篇

静脉用药后单眼内源性眼内炎 2 例

Two cases of monocular endogenous endophthalmitis after intravenous administration

高朋芬，阴正勤，陈少军，王 一 （第三军医大学西南医院全军眼科中心，重庆 400038）

例 1，女，38 岁，入院前 4 d 因“感冒”发烧，于当地诊所输液治疗，具体用药不详。次日感左眼胀痛，视物不见，当地医院诊为“左眼葡萄膜炎”，给予“强的松”口服 2 d 后转我院。入院查体：视力 左眼 眼前手动，光定位准，双眼压 16 mmHg。右眼未见异常。左眼结膜轻微充血，角膜 KP(+)，房水 Tyndall(+)，玻璃体白色混浊(+++)，眼底看不清。全身各项辅助检查基本正常。入院诊断考虑：左眼全葡萄膜炎 左眼眼内炎？静脉给予大剂量地塞米松抗炎治疗，病情反复。入院 7 d 后患者受凉感冒，玻璃体混浊加重，考虑急性视网膜坏死综合征，在激素抗炎基础上加用抗病毒治疗，但病情无好转。入院第 19 天，病情加重，出现少量前房积脓，考虑左眼眼内炎，立即行左眼玻璃体切割术以及玻璃体细菌、真菌涂片和培养检查。术中见玻璃体白色絮状混浊，视网膜表面大量脓苔附着，黄斑周围机化膜覆盖，黄斑区灰白，皱褶，超过半个象限锯齿缘离断。术后诊断左眼眼内炎，性质待定。术后加强抗炎、抗细菌治疗。玻璃体细菌、真菌涂片和培养检查均为阴性。术后第 12 天，左眼视力眼前数指，光定位准，玻璃体腔透明，网膜平复，出院。

例 2，女，26 岁，因右眼红痛，视力骤降 1 个月入院。入院前 7 d 于外院诊断为“右眼视网膜脱离”，未处理。发病 40 d 前顺产 1 子，因会阴撕裂，延迟不愈，静脉用抗生素超过 10 d。入院查

（下转 404 页）

作者简介：高朋芬(1972—)，女，山东省烟台市人，主治医师，主要从事视觉发育可塑性机制方面的研究，电话：(023)68754403
通信作者：阴正勤，E-mail：zqyin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期：2003-12-18；修回日期：2004-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net