DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.05.011

三七总皂甙对大鼠脊髓损伤组织总钙和脂质过氧化的影响*

何凤慈 龙在云 周 立 刘英炳 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 打击法致大鼠脊髓损伤(SCI,50gcm)4 h 后脊髓组织 MDA、FFA 含量均显著增加($P<0.01$);XOD 活性显著升高($P<0.05$),SOD 活性显著降低($P<0.01$);$[Ca^{2+}]t$ 显著增加($P<0.001$)。表明 SCI 病理过程中伴随 Ca^{2+} 介导的自由基生成和膜脂质过氧化反应。不同剂量的(30、90、270mg/kg,iv)PNS 均可抑制 MDA 生成($P<0.01$);大剂量(270mg/kg)PNS 还可抑制 FFA 释放和 XOD 活性($P<0.05$);90mg/kg PNS 亦可使 $[Ca^{2+}]t$ 显著降低($P<0.001$)。提示 PNS 抑制细胞 Ca^{2+} 内流可能是其抗脂质过氧化反应的主要机理之一。

关键词 脊髓损伤;过氧化脂质类;钙;钙通道阻滞剂;三七总皂甙

Ca^{2+} 内流引起的脂质过氧化反应是脊髓损伤(Spinal Cord Injury,SCI)继发性损伤的主要病理机理之一[1]。SCI 后组织缺血—缺氧,Ca^{2+} 内流使磷脂酶 A_2(PLA_2)激活,花生四烯酸(AA)及其代谢产物大量释放,导致自由基生成增加,引起膜脂质过氧化反应,进一步加重缺血—缺氧,形成恶性循环,从而使神经功能严重障碍。三七总皂甙(total saponins of Panax notoginseng,PNS)为三七的主要药理活性成份,具有抗炎[2],扩张脑血管[3],和钙通道阻滞作用[4]。本实验观察 PNS 对大鼠 SCI 脊髓组织脂质过氧化反应终产物丙二醛(MDA)生成,游离脂肪酸(FFA)释放,黄嘌呤氧化酶(XOD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性与组织总钙浓度($[Ca^{2+}]t$)的影响,结合 PNS 钙拮抗作用的机理分析 Ca^{2+} 与脂质过氧化反应在 SCI 病理过程中的地位。

1 实验方法

1.1 大鼠 SCI 模型制备与给药方法

Wistar 健康大鼠,体重 239±46g,雌雄兼用,经戊巴比妥钠(40mg/kg,ip)麻醉后,按常规切除 T_{13}-L_1 椎板,暴露脊髓,参照 Allen's 打击法[5]复制 SCI 动物模型(50gcm,5cm×10g)。以单纯椎板切除作为对照组。PNS(四川省中药研究所提供)以生理盐水(NS)溶解,于伤前 10 min 静脉注射(iv)。SCI 后 4 h 取出伤段脊髓备测 MDA、FFA、XOD、SOD 和 $[Ca^{2+}]_t$。

1.2 脊髓组织 MDA 测定

取伤段脊髓按1∶50以生理盐水(含 0.1mmol/L EDTA)用内切式匀浆机(ZS83－Ⅰ型,浙西机械厂)在冰溶下制备组织匀浆。取脊髓匀浆 0.2ml,按硫代巴比妥酸(TBA)法[6]用荧光分光光度计(RF-250型,日本岛津)测定荧光强度;(激发波长 515nm,发射波长 553nm,狭缝 10nm),计算 MDA 含量,结果以 nmol/mg 蛋白表示。

1.3 FFA 测定

参考血清 FFA 铜试剂法[7]稍加修改。以脊髓匀浆 0.3ml 加入测定管中,空白管和标准管分别加入双蒸水和棕榈酸,用氯仿抽提,离心,(1800×g·10min),吸取氯仿层显色,混匀后用分光光度计(721-A 型,四川分析仪器厂)比色(440nm),计算 FFA 含量,结果以 μmol/L/g 湿重组织表示。

1.4 XOD 活性测定

分别取脊髓匀浆 0.1ml 加入测定基质液和空白基质液中,按比色法[8]测定(500nm)OD 值,经标准曲线回归方程计算 XOD 活性单位(u/mg 蛋白)。

1.5 SOD 活性测定

脊髓匀浆 2ml,用无水乙醇—氯仿抽提[9],抽提液按焦性没食子酸—NBT 比色法(540nm)[10]比色,计算抑制百分率和 SOD 比活性(u/mg 蛋白)。

1.6 $[Ca^{2+}]t$ 测定[11]

取脊髓组织置105℃烤干称重,加入1ml 2mol/L 硝酸和 0.5ml 1mol/L 高氯酸消化 48 h,置 120℃

* 国家自然基金资助课题

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

烤干，再加入 1ml 2mol/L 硝酸溶解，经 100℃ 2 h 挥发硝酸后置 Muffle 炉中 500℃ 18 h 取出，加入 2ml 0.1N 盐酸(含 0.25% $LaCl_3$)稀释，用原子吸收分光光度计(IL-95 型，美国实验仪器公司)以空气/乙炔火焰法(223nm)测定 Ca^{2+} 含量(μg/ml)，结果以 μmol/g 干重组织表示。

1.7 蛋白定量

脊髓组织匀浆蛋白含量测定按 Lowry's 法[12]进行。

2 结果

2.1 大鼠 SCI 后脊髓组织 MDA、FFA、XOD、SOD 和 $[Ca^{2+}]t$ 变化

大鼠 SCI 4 h，双侧后肢瘫痪，运动功能丧失。脊髓组织 MDA 生成、FFA 释放显著增加，与单纯椎板切除对照组比较 $P<0.01$；XOD 活性明显升高($P<0.05$)，而 SOD 活性剂显著降低($P<0.01$)，$[Ca^{2+}]t$ 显著增加($P<0.01$)(见表 1)。

表 1 大鼠脊髓损伤(50gcm，4 h)后 MDA 生成、FFA 释放、XOD 和 SOD 活性的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of MDA production, FFA release, XOD and SOD activity after 4 h SCI in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	MDA (nmol/mg protein)	FFA (μmol/g wet weight)	XOD (u/mg protein)	SOD (u/mg protein)
Laminectomy	26.1± 9.7 (12)	11.3± 3.8 (12)	4.0±1.0 (12)	2.8±0.5 (11)
SCI	39.8±14.6 (11)**	59.3±10.1 (12)**	5.4±2.1 (14)*	0.4±0.1 (9)**

Experimental aminals in brackets $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$ *vs* laminectomy.

2.2 PNS 对 SCI、MDA 生成和 FFA 释放的影响

不同剂量(30、90、270mg/kg，iv)PNS 均可抑制 SCI MDA 生成，与生理盐水对照组比较 $P<0.01$；大剂量(270mg/kg)PNS 亦可抑制 FFA 释放($P<0.05$)(见表2)。

表2 三七总皂甙对大鼠脊髓损伤(50gcm，4 h)后 MDA 生成、FFA 释放、XOD 和 SOD 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of Panax notoginseng Saponins (PNS) on MDA production, FFA release, XOD and SOD activity after 4 h SCI in rats ($\bar{x}\pm s$)

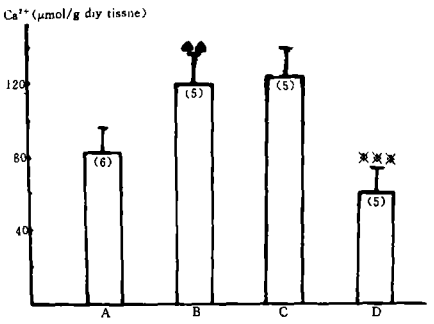
		MDA (nmol/mg protein)	FFA (μmol/g wet weight)	XOD (u/mg protein)	SOD (u/mg protein)
Normal saline		34.7±9.9 (11)	59.9±10.4 (10)	5.8±2.5 (9)	0.4±0.1 (10)
PNS	30mg/kg	22.8±9.2 (9)**	53.4±16.4 (10)	4.8±1.8 (9)	0.4±0.1 (11)
	90mg/kg	21.5±9.1 (11)**	50.6±19.5 (9)	4.8±2.1 (11)	0.4±0.2 (10)
	270mg/kg	19.3±8.4 (8)**	47.3±14.1 (8)*	4.5±1.9 (11)*	0.5±0.2 (9)

Experimental animals in brackets $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$ *vs* normal saline.

2.3 PNS 对 SCI XOD 和 SOD 活性及 $[Ca^{2+}]t$ 的影响

与生理盐水对照组比较，大剂量(270mg/kg)PNS 可显著抑制 XOD 活性($P<0.05$)；中剂量(90mg/kg)PNS 可使 SCI 脊髓组织 $[Ca^{2+}]t$ 显著降低($P<0.001$)；PNS 对 SOD 活性无明显影响($P>0.05$)(见表2，附图)。

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



附图 大鼠脊髓损伤4 h[Ca^{2+}]t 的变化和 PNS 对脊髓组织[Ca^{2+}]t 的影响

Fig Effects of Panax notoginseng Saponins (PNS) on the Changes of total calcium content after 4 h SCI in rats ($\bar{x} \pm s$)

A: laminectomy group; B: SCI group; C: normal saline group; D: PNS group.

▲▲: compared with laminectomy $P < 0.01$; * * *: compared with normal saline $P < 0.001$. experinmental aminals in bracket.

3 讨论

SCI 继发性损伤病理过程中，组织微循环障碍和缺血—缺氧，使线粒体氧化呼吸功能障碍产生病理性自由基[13]，产生膜脂质过氧化反应，膜磷脂降解，脂肪酸释放，尤其是 AA 代谢过程中大量自由基生成，加重了组织损伤。SCI 后细胞外[Ca^{2+}]降低，细胞内[Ca^{2+}]升高，并有神经元结构的破坏，被称为神经性钙反常(Nenro-Calcium paradox)[14]。钙反常现象与脂质过氧化反应具有协同作用，即 Ca^{2+} 进入细胞内触发的生化代谢变化，使自由基生成增加，脂质过氧化反应加重；而脂质过氧化反应又进一步增加 Ca^{2+} 内流，由此而产生恶性循环。本实验结果表明，大鼠 SCI 4 h，脊髓组织 MDA 生成和 FFA 释放显著增加，SOD 活性明显降低，XOD 活性和[Ca^{2+}]t 也都显著增加，提示在 SCI 病理过程中伴随由 Ca^{2+} 内流介导的自由基生成和脂质过氧化反应，加重神经损伤的生化代谢紊乱。

SCI 细胞内[Ca^{2+}]升高主要是细胞外 Ca^{2+} 内流所致[14]。SCI 组织缺血缺氧引起的能量代谢障碍，大量的内源性 ATP 降解，其主要降解产物次黄嘌呤在 XOD 的作用下生成黄嘌呤和尿酸，并伴有自由基的生成。XOD 是一种 Ca^{2+} 依赖性酶，Ca^{2+} 内流使 XOD 活性产生病理性自由基，这也是 Ca^{2+} 介导脂质过氧化反应的一个重要环节。本实验结果表明，PNS 不但可使 SCI MDA 生成和 FFA 释放抑制，而且可以抑制 XOD 活性，PNS 还可使[Ca^{2+}]t 显著降低，表明 PNS 作为一种钙通道拮抗剂， 减轻 SCI 脂质过氧化反应的机理之一是抑制了细胞外 Ca^{2+} 内流， 从而使 XOD 活性降低， 自由基产生过程受到抑制[15]。 PNS 抑制 SCI 脊髓组织[Ca^{2+}]t 升高，抗脂质过氧化的机理值得深入研究。

参考文献

1. Trump BF. Mechanisms of cellular injury and death. J Neurotrauma, 1988;5(3):215
2. 郝朝庆 杨 帆。三七总皂甙的抗炎作用。中国药理学报，1986;7(3):252
3. 李麟仙 王子灿 李盈盈，等。三七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
4. 熊志刚 陈俊秀 孙家钧。三七总皂甙对心肌动作电位及慢钙电流的影响。中国药理学报，1989;10(2):122
5. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. JAMA, 1911;45:878
6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi k. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979;95:351

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

7. 魏明竟。血清游离脂肪酸测定。见：上海市医学化验所编。临床生化检验(上册)。上海：上海科学技术出版社，1979：168～172
8. 吴晓生 李龙官。比色法测定黄嘌呤氧化酶。生物化学与生物物理进展，1986；13(5)：65
9. 陈淑英 朱汉民 谢 辉，等。人红细胞内超氧化物歧化酶比色测定法。中华老年医学杂志，1986；5(2)：117
10. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clin Chim Acta, 1979;92:337
11. Young W, De-Crescito V, Flamm ES, et al. Tissue Na, K, and Ca changes in regional cerebral ischemia: their measurement and interpretation. CNS Trauma, 1986;3(3):215
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951;193:265
13. Hall ED, Braughler JM. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration: A review. CNS Trauma, 1986;3(4):281
14. Young W. Ca paradox in neural injury: A hypothesis. CNS Trauma, 1986;3(3):235
15. 李 杏 陈俊秀 孙家钧。三七总皂甙对大鼠实验性心肌缺血再灌注损伤的保护作用。中国药理学报，1990；11(1)：26

(收稿：1992-09-18；修回：1993-08-25)

Effects of total saponins on calcium content and lipid peroxidation in injured spinal cord of rats

He Fengchi, Long Zaiyun, Zhou Li, Liu Yingbing (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Four hours after the spinal cord of rats was injured, the contents of malondialdehyde (MDA) and free fatty acid (FFA) were significantly increased, the activity of xanthine oxidase (XOD) elevated, the activity of superoxide dismutase (SOD) reduced, and the calcium content significantly increased in the tissues of the injured cord. These facts suggest that there is the generation of calcium-mediated free radicals and lipid peroxidation in the membrane. Intravenous injection of saponins of Panax notoginseng (PNS) in the dosage of 30, 90, and 270mg/kg could all inhibit the production of MDA; 270mg/kg could inhibit the release of FFA and the activity of XOD; 90mg/kg could significantly decrease the calcium content. These findings indicate that the inhibition of PNS on the calcium influx might be one of the mechanisms of anti-lipid peroxidation in spinal cord injury in rats.

Key words spinal cord injuries; lipid peroxides; calcium; calcium channel blockers; Panax notoginseng Saponins

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