

人参皂苷 R_d 及其 C₁₂手性异构体对缺氧/再复氧后 蛋白酪氨酸磷酸化的抑制作用

曾 颢², 关永源¹, 刘德育², 贺 华¹, 王 炜², 丘钦英¹, 王雪融¹, 周家国¹
(中山大学 1. 基础医学院药理学教研室, 2. 药学院化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 目的 探讨人参皂苷 R_d C₁₂手性碳构型改变与其药理活性的关系。方法 建立牛主动脉内皮细胞(BAEC)缺氧/再复氧(H/R)损伤模型; MTT法研究 R_d 及 R_d C₁₂手性异构体(12-epi-R_d)对 H/R 损伤 BAEC 的保护作用; Western 印迹法检测蛋白酪氨酸磷酸化(TPP)水平, 研究二者对 H/R 损伤 BAEC 的 TPP 水平的影响。结果 0.5~64 μmol·L⁻¹ 的 R_d 及 12-epi-R_d 能浓度依赖性的保护 H/R 损伤的 BAEC, 二者所能达到的最大存活率分别为(72.7±1.5)% 和(70.0±1.5)%, EC₅₀分别为(1.06±0.19)和(1.88±0.55) μmol·L⁻¹ (P<0.05)。R_d 及 12-epi-R_d 均可抑制 H/R 引起的 TPP 水平的提高, 浓度为 1, 4, 16 μmol·L⁻¹ 时, R_d 的抑制率分别可达(24.3±6.8)%, (52.6±8.7)% 及(73.4±11.4)%; 而 12-epi-R_d 的抑制率分别可达(12.8±4.4)%, (24.1±10.3)% 及(42.5±13.0)%, 二者在三个浓度点的抑制率均有显著性差异(P<0.05)。结论 人参皂苷 R_d C₁₂手性碳构型的改变对其保护 H/R 损伤 BAEC 的作用及抑制 H/R 诱导的 TPP 水平增强的作用有一定的影响。R_d C₁₂手性碳构型改变明显降低其抑制 TPP 增强的作用可能是其保护作用下降的重要原因之一。

关键词: 人参皂苷, 人参; 手性异构体; 内皮, 血管; 缺氧; 磷酸化

收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2003-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271503); 2000年广东省自然科学基金团队项目(2001); 国家科技部攀登计划资助项目(国科基字[1999]045号); 及中华医学基金会(CMB: 00-370)

作者简介: 曾 颢(1969-), 女, 四川省德阳人, 药理学博士, 讲师, 主要从事天然药物化学与药理学研究; 关永源(1946-), 男, 教授, 广东省新会人, 主要从事心血管药理学研究。

* 联系作者 E-mail: yyguan@gzsums.edu.cn Tel: (020)87331857

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)04-0274-05

人参皂苷(ginsenosides, GS)是人参中的主要活性成分, 其结构复杂, 分子中有多个手性碳, 理论上应有多种对映异构体。目前对人参皂苷立体异构与其药理活性关系方面的研究还非常少, 为数不多的研究也主要集中在对 C₂₀位手性异构体的研究, 尚无人涉及人参皂苷骨架中第 12 位手性碳构型改变与其药理活性关系的研究。人参皂苷 R_d (ginsenoside R_d, 12β-OH)是人参皂苷中的主要活性成分之一, 具有广泛的药理活性。此前作者已制备了 R_d 的 C₁₂手性异构体(epimer of ginsenoside R_d, 12-epi-R_d, 12α-OH), 并比较研究了二者对去氧肾上腺素收缩大鼠主动脉环作用的影响, 发现二者的作用没有显著性差异^[1]。那么, C₁₂手性碳构型改变对人参皂苷 R_d 的其他药理活性有无影响呢?

通常认为自由基^[2,3]及细胞内 Ca²⁺ 超载^[4,5]是缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R, *in vitro*)和缺氧/再复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R, *in vitro*)损伤中最为重要的机制。近年来研究表明^[6-9], 蛋白质酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)的激活可能在 I/R 及 H/R 损伤中扮演着重要的角色, PTK 阻断剂, 如三羟异黄酮(genistein)可在多种组织和器官抑制 I/R 或 H/R 造成的损伤, 如 Zhang 等^[8,9]报道, H/R 后人脐静脉内皮细胞的酪氨酸磷酸化蛋白(tyrosine-phosphorylated proteins, TPP)水平显著提高, 导致细胞缝隙连接介导的细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)严重受损, 自由基清除剂二甲亚砜(DMSO)及超氧化物歧化酶对这种损伤没有抑制作用, 而 PTK 阻断剂三羟异黄酮可完全抑制这种 GJIC 损伤。据报道, 人参皂苷 R_d 可有效抑制 H/R 后人脐静脉内皮细胞的 TPP 水平的提高, 从而抑制 H/R 导致的 GJIC 损伤^[8,9]; 还可有效保护

因 I/R 引起的肾损伤及近球细胞损伤^[10]。

基于以上所述,本研究建立了牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells, BAEC)的 H/R 损伤模型;用 MTT 法研究比较了 R_d 及 12-epi-R_d 对 H/R 损伤 BAEC 的保护作用;采用 Western 印迹杂交检测 TPP 水平,研究比较了 R_d 及 12-epi-R_d 对 H/R 诱导的 TPP 水平增强的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

新生健康乳牛(♂),由广州市奶牛研究所提供。

人参皂苷 R_d:本实验室自提,纯度 > 98%; 12-epi-R_d:本实验室合成,纯度 > 98%, R_d 与 12-epi-R_d 均以 3% Tween 80 水溶液配制,临用前用细胞培养液稀释到所需浓度, Tween 80 的终浓度小于 0.05%; DMEM/F-12、新生牛血清购自 Gibco 公司。Western 印迹杂交化学发光检测试剂盒等购自 Boehringer Mannheim 公司。Triton X-100, EGTA, HEPES, MTT, 胰蛋白酶(trypsin), 苯甲基磺酰氟, 抑肽酶, 亮肽酶, β-巯基乙醇, 叠氮钠, 抗小鼠磷酸酪氨酸单克隆抗体(monoclonal anti-phosphotyrosine clone PY-20, purified mouse immunoglobulin)购自 Sigma 公司(USA)。硝酸纤维素膜购自 Poraplot 公司(Germany)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 牛主动脉内皮细胞的分离、培养与鉴定

方法同文献[11]。实验用第 3~5 代细胞。

1.3 培养牛主动脉内皮细胞缺氧/再复氧损伤模型的建立

参考文献[8]方法。当细胞长至 70%~80% 融合时,加药培养 24 h 后,将细胞置于一减压干燥器中,用真空泵抽气,真空度达 0.09 kPa 后继续抽气 10 min,停止抽气后立即灌入 99.99% 高纯度氮气,待干燥器内压力恢复常压后,将其置于 37℃ 恒温箱内缺氧培养 14~16 h。复氧时,打开干燥器,将细胞迅速用 PBS 洗 2 遍,换上新鲜的 DMEM/F₁₂ 培养基,置于含 5% CO₂、37℃ 的 CO₂ 培养箱内复氧培养 0~6 h。

1.4 MTT 法测定细胞活力^[12]

将细胞按每孔 10³~10⁴ 个细胞接种于 96 孔板上,培养 2~3 d 后,加药孵育细胞 24 h,换新鲜培养液,缺氧 14~16 h,复氧 2 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 g·L⁻¹)20 μL, 5% CO₂、37℃ 继续孵育 4 h,终止培

养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶解结晶体,待结晶体完全溶解后,在酶标仪上(λ₅₇₀)测定吸光度(A_{570 nm})值。存活率 = 处理组 A 值/正常对照组 A 值 × 100%。

1.5 内皮细胞酪氨酸磷酸化水平的检测

细胞长至 70%~80% 融合时,加药孵育细胞 24 h,换新鲜培养液,缺氧 14~16 h,复氧后 2 h 检测其 TPP 水平。按文献[13]提取细胞总蛋白、进行 SDS-PAGE 电泳及电转。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 PBST(含 0.5% Tween 20 的 PBS)封闭硝酸纤维素膜 2 h 后,将膜置于含 0.5% 脱脂奶粉的 PBST 中,加入抗小鼠磷酸酪氨酸单克隆抗体(1:2000),室温孵育 1 h。PBST 洗涤 1 h,每 10 min 换 1 次液。加入辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG(1:1000)室温轻摇孵育 1 h, PBST 洗涤 1 h,每 10 min 换液 1 次。将硝酸纤维素膜浸入 10 mL 1 × LumiGLO(含 0.5 mL 20 × 底物 A, 0.5 mL 20 × 底物 B, 9.0 mL 水),室温下轻摇 2~5 min,定影后拍照并进行计算机图象分析,获取积分吸光度值(即面积和平均吸光度的乘积),以正常细胞的积分吸光度值为对照,计算其他各组细胞积分吸光度值的增加率(%),即增加率(%) = (H/R 的积分吸光度值 - 正常细胞的积分吸光度值)/正常细胞的积分吸光度值 × 100%。药物对 TPP 的抑制率按下列公式计算:抑制率(%) = (H/R 的积分吸光度值增加率 - 加药后 H/R 的积分吸光度值增加率)/H/R 的积分吸光度值增加率 × 100%。

1.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。E_{max} 及 EC₅₀ 用 Scott 比值法计算。组间差异用组间 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 复氧不同时间对细胞酪氨酸磷酸化水平的影响

BAEC 的蛋白裂解产物,用抗磷酸酪氨酸的单克隆抗体作 Western 印迹杂交,在 80 ku 附近检测到一条蛋白质主带,结果表明:正常的 BAEC 维持着一定的 TPP 水平(图 1);仅缺氧不会导致 BAEC 的 TPP 水平提高;复氧后,BAEC 的 TPP 水平逐渐升高,在复氧后 2 h 达到最高,比正常细胞的 TPP 水平增加了(223 ± 82)%, 6 h 后又慢慢回落至接近正常水平(表 1)。实验表明,BAEC 缺氧后再复氧 2 h(图 1),其 TPP 水平最高,故选择复氧后 2 h 检测其细胞活

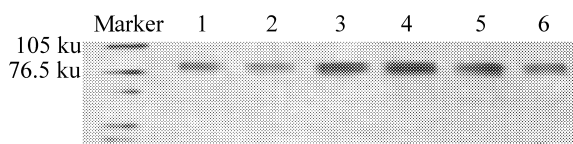


Fig 1. Increase of tyrosine-phosphorylation induced by hypoxia/reoxygenation(H/R) in bovine aortic endothelial cells. Lane 1: normoxia; lanes 2-6: 0, 1, 2, 4 and 6 h reoxygenation after hypoxia for 14-16 h, respectively.

Tab 1. Time-course of tyrosine-phosphorylation induced by hypoxia/reoxygenation in bovine aortic endothelial cells

Reoxygenation time/h	Increment rate/%
0	2 ± 15
1	154 ± 56 * *
2	223 ± 82 * *
4	189 ± 76 * *
6	22 ± 18

Increment rate (%) = (integrated absorbance of H/R - integrated absorbance of normoxia) / integrated absorbance of normoxia × 100%. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * * $P < 0.01$, compared with normoxia.

力及 TPP 水平。

2.2 人参皂苷 R_d 及 12-epi-R_d 对缺氧/再复氧损伤的牛主动脉内皮细胞的保护作用

MTT 法观察 R_d 及 12-epi-R_d 对 H/R 的 BAEC 的保护作用(表 2)。以正常组细胞的存活率为 100% 计算, H/R 组 BAEC 的存活率仅为 (50.6 ± 2.8)%, 预孵 R_d 及 12-epi-R_d 24 h 再进行 H/R 的 BAEC, 各浓度点的存活率均显著高于 H/R 组的存活率。在相同浓度下, 预孵 R_d 的存活率显著高于预孵 12-epi-R_d 的存活率 ($P < 0.05$); 预孵 R_d 的最大存活率可达 (72.7 ± 1.5)%, 高于预孵 12-epi-R_d 的最大存活率 (70.0 ± 1.5)% ($P < 0.05$); R_d 保护 H/R 损伤 BAEC 的 EC₅₀ 为 (1.06 ± 0.19) μmol · L⁻¹, 明显低于 12-epi-R_d 的 EC₅₀ (1.88 ± 0.55) μmol · L⁻¹ ($P < 0.05$)。

2.3 人参皂苷 R_d 及 12-epi-R_d 对缺氧/再复氧后牛主动脉内皮细胞酪氨酸磷酸化水平的影响

图 2 及表 3 结果可见, R_d 及 12-epi-R_d (1 ~ 16 μmol · L⁻¹) 均可显著抑制 H/R 引起的 TPP 水平的提高; R_d 在 3 个浓度点 (1, 4, 16 μmol · L⁻¹) 的抑制率均明显高于 12-epi-R_d 的抑制率 ($P < 0.05$)。

Tab 2. Protective effects of ginsenosides R_d and 12-epi-R_d on hypoxia/reoxygenation-induced injury in cultured bovine aortic endothelial cells

Group	Concentration / μmol · L ⁻¹	A _{570 nm}
Normoxia		0.698 ± 0.009 * *
H/R		0.355 ± 0.010
R _d	0.5	0.403 ± 0.003 * *
	1	0.428 ± 0.002 * *
	2	0.455 ± 0.004 * *
	4	0.477 ± 0.006 * *
	8	0.490 ± 0.006 * *
	16	0.501 ± 0.007 * *
12-epi-R _d	0.5	0.384 ± 0.006 *
	1	0.400 ± 0.007 * *
	2	0.428 ± 0.002 * *
	4	0.448 ± 0.004 * *
	8	0.464 ± 0.004 * *
	16	0.476 ± 0.006 * *
	32	0.482 ± 0.004 * *
	64	0.485 ± 0.004 * *

Normoxia: normal cell without H/R treatment; H/R: 2 h reoxygenation after 14-16 h hypoxia. Treatment with R_d and 12-epi-R_d was conducted when cells grew confluent, and lasted for 24 h before H/R. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, compared with H/R by independent-samples *t* test.

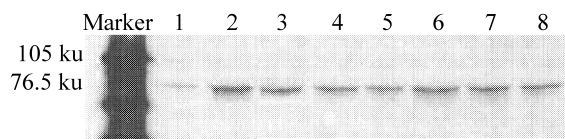


Fig 2. Inhibitory effects of ginsenosides R_d (1-16 μmol · L⁻¹) and 12-epi-R_d (1-16 μmol · L⁻¹) on tyrosine-phosphorylation enhanced by hypoxia/reoxygenation in bovine aortic endothelial cells. Lane 1: normoxia; lane 2: H/R; lanes 3-5: treatment with 1, 4, 16 μmol · L⁻¹ R_d for 24 h before H/R; lanes 6-8: treatment with 1, 4, 16 μmol · L⁻¹ 12-epi-R_d for 24 h before H/R.

Tab 3. Effects of ginsenosides R_d and 12-epi-R_d on hypoxia/reoxygenation-induced tyrosine-phosphorylation in bovine aortic endothelial cells

Group	Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Increment rate/% (Inhibitory rate/%)
H/R		243 ± 20
R _d	1	185 ± 30* (24.3 ± 6.8)
	4	117 ± 38** (52.6 ± 8.7)
	16	66 ± 27** (73.4 ± 11.4)
12-epi-R _d	1	211 ± 10* (12.8 ± 4.4)
	4	186 ± 35* (24.1 ± 10.3)
	16	137 ± 19** (42.5 ± 13.0)

Treatment with R_d and 12-epi-R_d was conducted when cells grew confluent, and lasted for 24 h before H/R. Increment rate is defined as the same in Tab 1. Inhibitory rate(%) = (increment rate of H/R - increment rate of H/R treated with R_d or 12-epi-R_d) / increment rate of H/R × 100%, shown in parentheses. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with H/R by independent-samples t test.

3 讨论

本研究表明, R_d 及 12-epi-R_d 能浓度依赖性的保护 H/R 的 BAEC, 二者所能达到的最大存活率 E_{max} 及 EC_{50} 均存在显著性差异 ($P < 0.05$), 提示人参皂苷 R_d C₁₂ 手性碳构型的改变对其保护 H/R 内皮细胞的作用有一定的影响。

近年来研究表明^[6~9], PTK 的激活可能在 I/R 及 H/R 损伤中扮演着重要的角色。PTK 阻断剂可在多种组织和器官抑制 I/R 或 H/R 造成的损伤, 如观察到人参皂苷 R_d 可有效抑制 H/R 后人脐静脉内皮细胞的 TPP 水平的提高, 从而抑制 H/R 导致的 GJIC 损伤^[8,9]。我们的实验结果与此一致, R_d 确实可抑制 H/R 后 BAEC 中 TPP 水平的增强, 12-epi-R_d 也有类似的作用, 但效果明显低于 R_d, 提示 R_d 及 12-epi-R_d 对 BAEC H/R 后 TPP 水平增强的抑制作用可能是其保护 H/R 内皮细胞的重要机制之一, 二者对 TPP 抑制程度的不同可能正是二者对 H/R BAEC 的保护作用存在差异的重要原因之一。但二者对 H/R 后 BAEC 的保护作用是否存在其他机制, 如是否存在对自由基及钙通道的作用, 还有待于进一步的研究。

此前作者曾比较研究了 R_d 及 12-epi-R_d 对去氧肾上腺素收缩大鼠主动脉环作用的影响^[1], 发现二

者的作用没有显著性差异, 提示 C₁₂ 手性碳构型改变对 R_d 的不同药理活性的影响是不同的。推测 C₁₂ 手性碳构型改变对其药理活性有无影响, 关键在于它所影响的这部分结构在其药理活性中所起的作用如何? 作用大, 影响可能就大; 作用小, 影响可能就小。但 R_d C₁₂ 手性碳构型改变如何影响其分子结构, 乃至影响其药理活性, 还需要进行更为深入的研究。

4 参考文献:

- [1] Zeng S, Guan YY, Liu DY, He H, Wang W, Qiu QY, *et al.* Synthesis of 12-epi-ginsenoside R_d and its effects on contractions of rat aortic rings[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2003, **19**(3):282 - 286.
- [2] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **282**(2):C227 - C241.
- [3] Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, Okinaga K. Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion[J]. *J Surg Res*, 1994, **57**(6):693 - 697.
- [4] Hu Q, Ziegelstein RC. Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells[J]. *Circulation*, 2000, **102**(20):2541 - 2547.
- [5] Ikeda K, Nagashima T, Wu S, Yamaguchi M, Tamaki N. The role of calcium ion in anoxia/reoxygenation damage of cultured brain capillary endothelial cells[J]. *Acta Neurochir Suppl*(Wien), 1997, **70**:4 - 7.
- [6] Hayashi A, Weinberger AW, Kim HC, de Juan E Jr. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, ameliorates retinal degeneration after ischemia - reperfusion injury in rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, **38**(6):1193 - 1202.
- [7] Hagar H, Ueda N, Shah SV. Tyrosine phosphorylation in DNA damage and cell death in hypoxic injury to LLC-PK1 cells[J]. *Kidney Int*, 1997, **51**(6):1747 - 1753.
- [8] Zhang YW, Morita I, Shao G, Yao XS, Murota S. Screening of anti-hypoxia/reoxygenation agents by an *in vitro* model. Part 1. Natural inhibitors for protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Planta Med*, 2000, **66**(2):114 - 118.
- [9] Zhang YW, Morita I, Zhang L, Shao G, Yao XS, Murota S. Screening of anti-hypoxia/reoxygenation agents by an *in vitro* method. Part 2. Inhibition of tyrosine kinase activation prevented hypoxia/reoxygenation-induced injury in endothelial gap junctional intercellular communication [J]. *Planta*

- Med*, 2000, **66**(2):119 – 123.
- [10] Yokozawa T, Liu ZW, Dong E. A study of ginsenoside-R_d in a renal ischemia – reperfusion model [J]. *Nephron*, 1998, **78**(2):201 – 206.
- [11] Wei WL, Guan YY, He H, Sun JJ. ATP-induced Ca²⁺ entry in bovine aortic endothelial cells and its relation with Cl⁻ channels and PKC[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2000, **16**(2):190 – 195.
- [12] Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death[J]. *Methods Cell Biol*, 1998, **57**:251 – 264.
- [13] Yang XR, Guan YY, Qiu QY, He H, Li JL. Effects of tyrosine kinase inhibitor on α_{1B}-AR-induced Ca²⁺ influx involved in hTrp3 protein[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2002, **18**(2):178 – 182.

Inhibitory effects of ginsenoside-R_d and its C₁₂ isomer on tyrosine-phosphorylation induced by hypoxia/reoxygenated injury

ZENG Sa², GUAN Yong-Yuan¹, LIU De-Yu², HE Hua¹, WANG Wei²,
QIU Qin-Ying¹, WANG Xue-Rong¹, ZHOU Jia-Guo

(1. Department of Pharmacology, 2. Department of Chemistry, Zhongshan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **AIM** To investigate the relationship between the construction of chiral C₁₂ of ginsenoside and its pharmacological effects. **METHODS** A hypoxia-reoxygenated (H/R) model of cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) *in vitro* was established. The protective effects of ginsenosides R_d and 12-epi-R_d on H/R BAEC were studied by MTT. The effects of R_d and 12-epi-R_d on tyrosine phosphorylated protein (TPP) improved by H/R in BAEC were studied by Western blot. **RESULTS** Both R_d and 12-epi-R_d (0.5 – 64 μmol · L⁻¹) remarkably increased the survival rates of H/R BAEC (50.6 ± 2.8)% in a concentration-dependent manner. The maximal survival rate of R_d (72.7 ± 1.5)% was higher than that of 12-epi-R_d (70.0% ± 1.5)% (*P* < 0.05); the EC₅₀ (1.06 ± 0.19) μmol · L⁻¹ of R_d to protect H/R BAEC was lower than the EC₅₀ (1.88 ± 0.55) μmol · L⁻¹ of 12-epi-R_d (*P* < 0.05). Both R_d and 12-epi-R_d had inhibitory effects on TPP in H/R BAEC after 2 h of reoxygenation. When the concentration of R_d and 12-epi-R_d were 1, 4, 16 μmol · L⁻¹, respectively, the inhibitory rates of

R_d were (24.3 ± 6.8)%, (52.6 ± 8.7)% and (73.4 ± 11.4)%, while the inhibitory rates of 12-epi-R_d were (12.8 ± 4.4)%, (24.1 ± 10.3)% and (42.5 ± 13.0)%, respectively. Their inhibitory rates all had significant differences on each concentration (*P* < 0.05). **CONCLUSION** The changing of the construction of chiral C₁₂ of R_d did alter its protective effects on H/R BAEC and its inhibitory effects on TPP in H/R BAEC. The reduced inhibitory effects induced by the changing of the construction of chiral C₁₂ may be one of the most important reasons for its reduced protective effects on H/R BAEC.

Key words: ginsenosides, ginseng; isomer; endothelium, vascular; hypoxia; phosphorylation

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30271503); and by Team-Work Program from Natural Science Foundation of Guangdong Province (2001); and by Science Foundation of the Ministry of Science and Technology([1999]045); and by China Medical Board (CMB: 00-370)

(本文编辑 乔虹)