

环维黄杨星 D 对大鼠肾小管上皮细胞增殖的影响*

★ 于民权 许立** (南京中医药大学药理教研室 南京 210029)

摘要:目的:研究环维黄杨星 D 对大鼠肾小管上皮细胞的毒性影响。方法:体外培养大鼠肾小管上皮细胞,利用噻唑蓝法(MTT)评价环维黄杨星 D(CVB-D)对大鼠肾小管上皮细胞增长抑制的 IC_{50} ,观察不同浓度药物对细胞形态和细胞培养液乳酸脱氢酶(LDH)活力的影响。结果:CVB-D 作用大鼠肾小管上皮细胞 48 小时后,可明显地抑制细胞增值,其 IC_{50} 是 111.47 $\mu\text{mol/L}$,并且能够导致细胞发生皱缩和空泡化,48 小时后细胞上清液中 LDH 漏出率明显增加。结论:CVB-D 在体外对于大鼠肾小管上皮细胞的增殖具有明显的抑制作用。

关键词:CVB-D;大鼠肾小管上皮细胞;细胞毒

中图分类号:R 965.1 **文献标识码:**B

环维黄杨星 D(Cyclovirobuxine D, CVB-D)系从黄杨科植物小叶黄杨(*Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. Var. *Sinica* Rehd. et Wils)及其同属植物中提取的一种生物碱,商品名为黄杨宁,亦称环常绿黄杨碱 D、黄杨碱等,化学结构属孕甾烷的衍生物,分子式为: $C_{26}H_{46}N_2O$,分子量是:402.364。为我国研制成功的治疗心脑血管疾病的新药。其具有行气活血和通络止痛功能,主要用于治疗气滞血瘀所致的胸痹心痛、脉

结代、冠心病、心律失常者。它对心血管系统具有强心、抗心绞痛、抗心律失常等作用。文献对环维黄杨星 D 的药理及药效报道较多,而对于其毒理学研究报道较少。本文试从体外实验证明 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞具有一定的细胞毒性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

100.24(%) , RSD 2.07%。

2.8 样品测定 精密称取鲜地黄、生地黄、熟地黄粉末(过 20 目筛)各约 0.25 g 置具塞三角瓶中,分别加入甲醇 25 ml,加热回流提取 1.5 小时,滤过,精密量取续滤液 10 ml,浓缩至近干,残渣用流动相溶解,转移至 10 ml 量瓶中,并用流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 滤膜滤过,按上述色谱条件测定含量。结果见表 1。

表 1 不同炮制品地黄中梓醇的含量测定结果

供试品	含量(%)			RSD (%)
	1	2	3	
鲜地黄	0.71	0.69	0.72	1.80
生地黄	0.41	0.43	0.41	2.77
熟地黄	0.20	0.21	0.20	2.74

3 讨论

地黄的有效成分梓醇极性较强,易溶于热水、甲醇、乙醇中。直接用甲醇提取,避免了水提提取物中多糖、蛋白质等对色谱柱的损害。同时由于梓醇的保留时间短,因此将样品中的甲醇挥干,用流动相定容,这样会避免甲醇在 210 nm 的强吸收,减少溶

剂峰对测定峰的干扰。进样量为 10 μl ,峰形难以回到基线,仪器对峰面积积分时使得峰面积变大,导致定量结果不准,将进样量减小至 5 μl ,色谱峰达到基线分离,积分值合理,最终进样量选择在 5 μl 。

对照品梓醇溶液在酸性条件下易分解,因此对照品溶液应现配现用。

参考文献

- [1] 2005 版中国药典(一部):北京:化学工业出版社,82.
- [2] 汪程远,张浩,孟莉,等. HPLC 测定地黄及其制剂中梓醇的含量[J]. 华西药学杂志,2003,18(2):134-135.
- [3] 夏伦祝. HPLC 测定生地黄浓缩颗粒中梓醇的含量[J]. 安徽中医学院学报,1999,18(4):51-52.
- [4] 郭春燕,白雪梅,张万明,等. 高效液相色谱法测定生地黄和桃红四物汤中梓醇的含量[J]. 中西医结合学报,2004,2(2):135-137.
- [5] 顾清,唐迎雪,张建. RP-HPLC 法测定四生口服液液中梓醇的含量[J]. 中国药师,2006,9(3):244-245.
- [6] 刘芳,余少玲. 地黄不同炮制品中梓醇含量的比较[J]. 中国药房,2003,14(6):378-379.

(收稿日期:2008-07-01)

* 基金项目:国家自然科学基金项目(N0. 30672648)

** 通讯作者:许立(1964-),男,教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药理学,E-mail:xuli64@163.com

(1)实验动物。SD 大鼠,雄性,一月龄,由上海斯莱克试验动物中心提供,许可证:SCXK(沪)2003-00030。(2)主要试剂和仪器。噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,购自南京建成科技有限公司;CVB-D 由南京小营制药有限公司提供,纯度为 96.4%;酶标仪(瑞士 TECAN 公司);752 型 Spectrum 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠肾小管上皮细胞原代培养 取健康 SD 大鼠(实验前 12 小时禁食,自由进水)断颈处死后,无菌取肾去掉包膜,分离、剪碎肾皮质过筛网,获得肾小管节段,2 g/L 胰蛋白酶消化,短时离心,获得单个肾小管上皮细胞,加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,充分吹打混匀,接种于细胞瓶中,置于培养箱(37℃,5% CO₂)中培养^[1]。72 小时后首次换液,约 6、7 天后细胞生长基本融合成单层,待细胞完全铺满瓶底后作传代培养。

1.2.2 细胞形态学观察 细胞培养于 15 cm² 培养瓶中,加入不同浓度的大黄素,培养 48 小时后,倒置显微镜下观察,同时记录细胞生长的形态学变化。

1.2.3 细胞抑制率检测 将对数生长期大鼠肾小管上皮细胞调制成密度约 5 × 10⁵ 个/ml 的细胞悬液,以 80 μl/孔加入 96 孔板,37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 小时,待细胞贴壁后,加入不同浓度 CVB-D 和溶剂对照 20 μl/孔继续培养。终浓度为 20 ~ 160 μmol/L,继续培养 48 小时后,每孔加入 2.5 mg/ml 上清液 20 μl,振荡 3 ~ 5 分钟,继续培养 4 小时,轻轻吸弃 MTT,加入 DMSO 150 μl,振荡 10 分钟,用酶标仪测定吸光度(D 值),波长为 490 nm。评价方法:每个浓度平行测定 6 个重复孔,求 D₄₉₀ 值的均值,计算存活率, $P_{存活} = D_{试验组} / D_{对照组} \times 100\%$, $P_{抑制} = 100\% - P_{存活}$ 。用 Origin 5.0 软件进行曲线拟合,求 IC₅₀ 值。

1.2.4 LDH 漏出检测 取对数生长期大鼠肾小管上皮细胞,将细胞密度调至 4 × 10⁵ 个/ml 以 100 μl/孔接种于 96 孔板,细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养 24 小时,待细胞贴壁后加入不同浓度药物处理细胞 48 小时后,取培养液上清,按照 LDH 试剂盒说明操作在分光光度计上测定吸光度,以 LDH 漏出率表示细胞毒性大小,LDH 漏出率(%) = (给药 LDH 活力 - 对照 LDH 活力) / 对照 LDH 活力 × 100% (LDH 活力单位:U/gprot),每个给药浓度重复 6 次。

1.3 统计学方法

利用 SPSS16.0 软件对数据进行单因素多水平方差分析,各组间比较采用方差分析,经方差齐性检验,方差齐。

2 结果

2.1 大鼠肾小管上皮细胞的鉴定

12 小时左右可观察到细胞开始出现贴壁,随后从细胞周边有上皮样细胞生长并逐渐铺满瓶底。细胞体积较大,呈现多边的鹅卵石样,且各个细胞之间紧密衔接,可见融合成片及复层生长,镜下透明度及遮光度强。通过抗细胞角蛋白抗体实验,反应为阳性。

2.2 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞形态的影响

对照组细胞生长状态旺盛,伸展性良好,透明性及遮光性强。而给药组均发生了不同程度的皱缩现象,细胞出现空泡化,死细胞明显增高,具有明显的量效关系。

2.3 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞增值抑制的影响

利用 MTT 法检测 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞增值抑制的影响,与对照组 D₄₉₀ 0.39 ± 0.08 相比, CVB-D 浓度在 80 μmol/L D₄₉₀ 0.27 ± 0.09 有显著性差异(P < 0.05), 120 和 160 μmol/L D₄₉₀ 0.19 ± 0.04、0.14 ± 0.03 差异有极显著的统计学意义(P < 0.01)。可见, CVB-D 能明显抑制大鼠肾小管上皮细胞的增值。其 IC₅₀ 值为 111.47 μmol/L。

2.4 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞 LDH 漏出率的影响

见表 1。

表 1 CVB-D 作用 48 小时后,对大鼠肾小管上皮细胞 LDH 漏出率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	D 值 ₄₄₀	LDH 活力 / U · gprot ⁻¹	LDH 漏出率 (%)
溶剂对照组	0.10 ± 0.02	402.92 ± 63.22	-
20 μmol/ml	0.13 ± 0.02	527.49 ± 77.77 ^①	31.85
40 μmol/ml	0.17 ± 0.02	720.25 ± 79.8 ^②	83.42
80 μmol/ml	0.29 ± 0.03	1202.51 ± 121.11 ^②	202.98
160 μmol/ml	0.35 ± 0.03	1456.51 ± 115.14 ^②	267.40

注:与对照组比较,①P < 0.05, ②P < 0.01。

3 结论

早期的文献资料报道,家兔灌胃给药 CVB-D 60 天后,其中 1.2 和 0.3 mg/kg 组可致部分家兔肝脏点状、局灶性坏死灶^[2]。最近有文献报道,大鼠连续腹腔注射 CVB-D 3 个月,可致部分动物 BUN 明显升高,8.4 mg/kg 剂量组可引起肾脏远曲小管上皮细胞变性,提示一定剂量的 CVB-D 连续注射给药可致肾脏损伤^[3]。本文通过体外实验,利用 MTT 法及测定培养液上清 LDH 漏出率,观察 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞的细胞毒作用。随着作用于大鼠肾小管上皮细胞 CVB-D 浓度的增加,细胞损伤的数量和程度呈上升趋势,MTT 法试验是一种检测细胞存活和生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶物甲瓚颗粒,以颗粒溶解后呈现的颜色的深浅反映细胞的活性。LDH 漏出率反映了细胞的非特异性损伤,细胞损伤后,细胞培养液中的 LDH 会增加,利用分光光度计可以测定培养液中 LDH 的量。通过本试验证明 CVB-D 对大鼠肾小管上皮细胞确实具有一定的细胞毒作用。

参考文献

- [1] Sikka PK, McMartin KE. Normal rat kidney proximal tubule cells in primary and multiple subcultures [J]. Bio-Anim, 1996, 32: 285 - 291.
- [2] 刘锡玖, 姚明辉, 方泰惠, 等. 环维黄杨星 D 的一些心血管作用 [J]. 中国药理学报, 1982, 3(2): 101 - 104.
- [3] 许立, 梁涛, 徐立, 等. 环维黄杨星 D 对大鼠肾脏毒性的初步观察 [J]. 中药新药与临床药理, 2007 18(2): 91 - 92.

(收稿日期: 2008-07-01)