

# 大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 对培养心肌细胞的抗氧化损伤作用与对搏动和动作电位的抑制作用

R 965.2

江岩, 钟国赣<sup>1</sup>, 齐晖, 马兴元<sup>2</sup> (白求恩医科大学生理中心实验室, 长春 130021, 中国)

**Antioxidative action of soyasaponin monomers I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and their inhibitory effects on action potential and beating of myocardiocytes in culture**

JIANG Yan, ZHONG Guo-Gan<sup>1</sup>, QI Hui, MA Xing-Yuan<sup>2</sup> (Central Laboratory of Physiology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT** Ventricular myocardiocytes from newborn Wistar rats were cultured. Soyasaponin monomers I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 2 μg · ml<sup>-1</sup> added to the culture medium, like nimodipine 1.25 μg · ml<sup>-1</sup>, decreased the number of spontaneously beating clusters and the action potential parameters of myocardiocytes, which restored after washing out and were reversed by Ca<sup>2+</sup> 80 μg · ml<sup>-1</sup> or epinephrine 10 μg · ml<sup>-1</sup>, indicating the Ca<sup>2+</sup> channel blockade action of the saponin monomers. Adding xanthine 0.42 mmol · L<sup>-1</sup> and xanthine oxidase 5.4 nmol · L<sup>-1</sup> into culture medium led to the increase of free radical content of the myocardiocytes and the decrease of action potential parameters, which were reversed by I 2 μg · ml<sup>-1</sup>, indicating the antioxidative action of saponin monomer I.

**KEY WORDS** cultured cells; myocardium; saponins; soybeans; action potentials; calcium channel blockers; free radicals

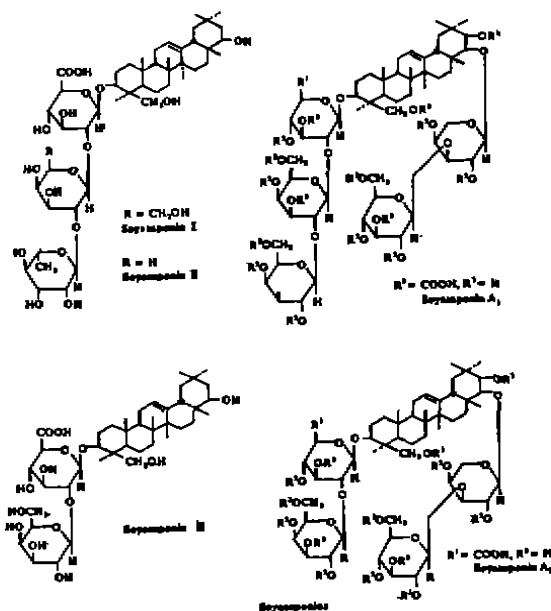
**摘要** 向新生 Wistar 大鼠心室肌细胞培养基中加大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 各 2 μg · ml<sup>-1</sup>, 呈现自发性搏动的群落数及心肌细胞动作电位各参数减小, Ca<sup>2+</sup> 80 μg · ml<sup>-1</sup> 能使之逆转. 显示有钙通道阻滞作用. 向培养基中加黄嘌呤 0.42 mmol · L<sup>-1</sup> 及黄嘌呤氧化酶 5.4

nmol · L<sup>-1</sup>, 心肌细胞动作电位各参数减小, I 2 μg · ml<sup>-1</sup> 使之逆转, 显示其抗自由基损伤作用.

**关键词** 培养的细胞; 心肌; 皂甙; 大豆; 动作电位; 钙通道阻滞剂; 自由基

大豆总皂甙能显著抑制 S180, YAC-1 肿瘤细胞 DNA 的合成<sup>(1)</sup>, 有抗自由基损伤作用<sup>(2)</sup>. 从大豆总皂甙中分得的 5 种葡萄糖醛酸单体皂甙 I, II, III, A<sub>1</sub> 及 A<sub>2</sub>, 都能抑制阿霉素所致的小鼠心脏脂质过氧化物增多, 其中以 A<sub>2</sub> 的作用为最强<sup>(3)</sup>.

我们在以心肌细胞动作电位为指标观察大豆总皂甙的抗氧化作用时, 意外地发现它有明显的钙通道阻滞作用<sup>(4)</sup>. 本实验在培养的心肌细胞上, 以自发性搏动、动作电位、自由基含量为指标, 探讨了大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 的钙通道阻滞作用与 I 的抗黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶效应.



Received 1991-10-08 Accepted 1992-08-14

<sup>1</sup>Department of Physiology,  
<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry,  
Norman Bethune University of Medical Sciences,  
Changchun 130021, China

MATERIALS AND METHODS

**药品** 本校有机化学教研室用柱层析法从豆腐水中提取大豆皂甙, 从中分离到 I, II, III, A<sub>1</sub> 及 A<sub>2</sub> 5 种单体皂甙, 薄层色谱分析与标准品一致. CaCl<sub>2</sub> CP (北京红星化工厂). 肾上腺素 1 mg · ml<sup>-1</sup> (上海天丰制药厂). 尼莫地平 (nimodipine, 天津市中央制药厂). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life Technologies Inc, USA).

**心肌细胞培养** 取出生后 24-48 h 的 Wistar 大鼠心室, 剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 用 0.1% 胰蛋白酶加机械搅拌法分离心肌细胞<sup>(6)</sup>. 将获取的细胞放入培养瓶, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 的空气中, 37℃ 培养. 用于观察钙通道阻滞作用的心肌细胞分三组, 均用常规培养基 (含 80% DMEM 和本实验室自制的 20% 小牛血清) 培养, 于电位记录时分别加入 I, A<sub>1</sub> 及 A<sub>2</sub>. 用于观察抗氧化损伤作用的心肌细胞也分三组培养; 对照组为常规培养基; X-XO 组在实验前 16 h 向常规培养基中加黄嘌呤 0.42 mmol · L<sup>-1</sup> 及黄嘌呤氧化酶 5.4 nmol · L<sup>-1</sup> (X-XO), I 组在向常规培养基中加入 X-XO 的同时加大豆皂甙单体 I 20 μg · ml<sup>-1</sup>.

**动作电位记录** 于培养 d 4-5, 用直径小于 0.5 μm 的玻璃微电极, 自搏动的心肌细胞内引导动作电位, 经微机连机分析以下电参数: 动作电位幅度 (APA), 超射 (OS), 最大舒张电位 (MDP), 阈电位 (TP), 最大除极速度 (V<sub>max</sub>), 复极 10%, 50%, 90% 水平的动作电位时程 (APD<sub>10</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub>), 与动作电位发放频率 (APF).

**自由基含量测定** 在室温 (20-22℃) 下将心肌细胞机械脱壁, 置入石英样本管中, 在液氮蒸气环境中用 ER 200D-SRC 电子自旋共振 (ESR) 仪进行测定. 测定条件为温度 85 K, 微波频率 9606 MHz, 微波功率 17 dB 4 mV, 调制频率 100 Hz, 调制幅度 3.2 G, 放大倍数 5 × 10<sup>5</sup>.

RESULTS

**大豆皂甙单体对自发性搏动的影响** 于培养 d 4-5, 计数每个培养瓶中呈现自发性搏动的群落数, 作为加药前对照. 然后, 向培养基中分别加入大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub> 及 A<sub>2</sub>. 浓度均依次倍增为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 μg · ml<sup>-1</sup> 再

次计数搏动群落数. 结果能维持搏动的心肌细胞群落数与培养基中大豆皂甙的浓度呈显著负相关 (Fig 1).

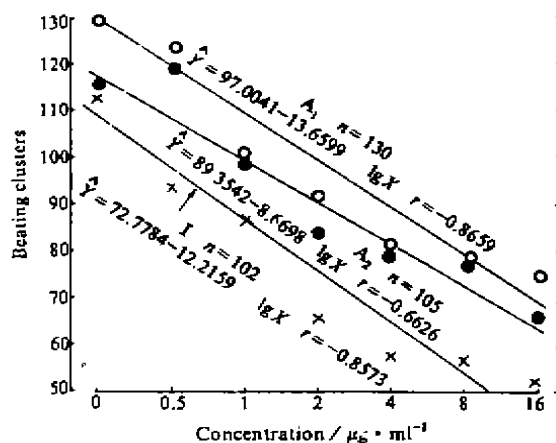


Fig 1. Effects of soyasaponin monomers I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> on beating clusters (N=before medication).

用培养基洗脱各种浓度的大豆皂甙后, 停搏的群落均能恢复原来的自发性搏动. 在大豆皂甙 2 μg · ml<sup>-1</sup> 的基础上, 再加入肾上腺素 10 μg · ml<sup>-1</sup>, 或 CaCl<sub>2</sub> 80 μg · ml<sup>-1</sup> 不仅停搏群落恢复搏动, 而且搏动群落数分别由加药前的 94 和 98 增加到 112 和 122.

**对动作电位的影响** 于培养 d 4-5, 在引导加药前的心肌细胞动作电位以后, 向培养基中加入大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub> 或 A<sub>2</sub> 2 μg · ml<sup>-1</sup>, 使心肌细胞动作电位的所有电参数全面减小, 发放频率加快. 以 I 为例, APA, OS, MDP, TP, V<sub>max</sub>, APD<sub>10</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub> 分别比加药前降低 36%, 38%, 35%, 22%, 51%, 39%, 21%, 19%, 发放频率比加药前增快 22%. 洗脱后恢复. 提高 [Ca<sup>2+</sup>]. 可使大豆皂甙所致的动作电位抑制逆转. 尼莫地平 1.25 μg · ml<sup>-1</sup> 对心肌细胞动作电位的抑制与大豆皂甙单体相似 (Tab 1). 各项参数的组间差异均经 t test 处理. 为排除发放频率对动作电位波宽的影响, 对三项波宽指标又做了协方差检验, 证实大豆皂甙能使波宽变窄 (P < 0.05 或 0.01). Fig 2 为动作电位的典型示波器照像记录.

Tab 1. Influence of soyasaponin monomers I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 2.0 μg · ml<sup>-1</sup> on action potentials of cultured myocardio-cytes. CaCl<sub>2</sub> 80 μg · ml<sup>-1</sup>; Nimodipine 1.25 μg · ml<sup>-1</sup>. n=30 cells;  $\bar{x} \pm s$ . \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs control; <sup>+</sup>P>0.05, <sup>++</sup>P<0.05, <sup>+++</sup>P<0.01 vs I; <sup>\*</sup>P>0.05, <sup>\*\*\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*\*\*</sup>P<0.01 vs A<sub>1</sub>; <sup>†</sup>P>0.05, <sup>††</sup>P<0.05, <sup>†††</sup>P<0.01 vs A<sub>2</sub>.

	APA/mV	OS/mV	MDP/mV	TP/mV	V <sub>max</sub> /V·s <sup>-1</sup>	APD <sub>10</sub> /ms	APD <sub>50</sub> /ms	APD <sub>90</sub> /ms	APF/bpm
Control	76±7	27±3	49±6	26±5	21±8	36±7	133±33	211±38	125±27
I	48±5 (****)	17±6 (****)	32±7 (****)	20±3 (****)	10±4 (****)	22±8 (****)	105±15 (****)	171±16 (****)	152±24 (****)
Wash out I	76±9 (*)	27±4 (*)	47±7 (*)	26±7 (*)	19±5 (*)	35±7 (*)	134±16 (*)	195±27 (*)	137±23 (*)
I+CaCl <sub>2</sub>	78±8 (*)	29±4 (*)	50±8 (*)	27±7 (*)	23±3 (*)	26±4 (****)	83±21 (****)	112±16 (****)	220±30 (****)
A <sub>1</sub>	53±5 (***,†††)	18±4 (***,†)	36±6 (***,††)	20±7 (***,†)	8±3 (***,†††)	30±6 (***,†††)	118±27 (***,†††)	152±15 (***,†††)	141±27 (***,†††)
Wash out A <sub>1</sub>	74±6 (*)	25±5 (*)	49±8 (*)	24±6 (*)	16±7 (*)	34±6 (*)	129±21 (*)	195±26 (*)	132±35 (*)
A <sub>1</sub> +CaCl <sub>2</sub>	76±7 (*)	27±4 (*)	49±5 (*)	24±4 (*)	20±6 (*)	23±5 (****)	110±12 (****)	145±20 (****)	173±19 (****)
A <sub>2</sub>	46±6 (***,†,†††) ****	20±2 (***,†††) ****	26±7 (***,†††) ****	16±3 (***,†††) ****	8±2 (***,††) **	25±8 (***,†) ***	102±24 (***,†) ***	141±26 (***,†) ***	151±27 (***,†) ***
Wash out A <sub>2</sub>	76±4 (*)	25±4 (*)	49±4 (*)	25±5 (*)	14±4 (*)	35±8 (*)	130±12 (*)	200±33 (*)	132±22 (*)
A <sub>2</sub> +CaCl <sub>2</sub>	76±5 (*)	28±5 (*)	49±5 (*)	27±6 (*)	17±6 (*)	29±4 (****)	91±22 (****)	129±18 (****)	182±30 (****)
Nimodipine	45±8 (***,†,†††) ****,§	13±4 (***,†††) ****,§§	33±7 (***,†) **	22±6 (***,†) **	4±4 (***,†††) ****,§§§		78±7 (***,†††) ****,§§§		207±30 (***,†††) ****,§§§

APA action potential amplitude; OS overshoot; MDP maximal diastolic potential; TP threshold potential; V<sub>max</sub> maximal depolarizing rate; APD<sub>10</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub> action potential duration at 10%, 50%, 90% repolarization levels, respectively; APF action potential frequency.

X-XO 使 APA, OS, MDP, TP, V<sub>max</sub>, APD<sub>10</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub> 分别比加药前降低 31%, 18%, 38%, 34%, 41%, 53%, 11%, 18%, 发放频率比加药前增快 13%。大豆皂甙单体 I 20 μg · ml<sup>-1</sup> 能对抗 X-XO 所致的电位改变 (Tab 2, Fig 3 为其典型的示波器照像记录。

**对自由基含量的影响** 于培养 d 5, 测绘 ESR 谱线, 各组心肌细胞的 ESR 谱线的线形及线宽相似, 而且共振条件的 g 值均为 2.0023 (Fig 4), 表明各组自由基的同一性。根据自旋数与谱线面积成正比, 按各组心肌细胞的 ESR 谱线面积与标准品沥青 (自旋数 12.9 × 10<sup>12</sup>) 之比, 算出各组心肌细胞的自旋数即自由基数。

为排除细胞重量不同所致的影响, 各组心肌细胞的自旋数均用该组心肌细胞的干重除, 得出各组每克干重心肌细胞的自由基含量: 对照组 (19.7 ± 0.33) × 10<sup>11</sup>; X-XO 组 (36.6 ± 0.48) × 10<sup>11</sup>; X-XO+I 组 (8.2 ± 0.34) × 10<sup>11</sup>。

## DISCUSSION

本实验见到大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 使培养的慢反应心肌细胞动作电位的所有电参数全面减小, 动作电位的发放频率加快。慢反应心肌细胞动作电位的 0 期除极化与 2 期平台的形成均取决于 Ca<sup>2+</sup> 内流。当钙通道阻滞时, 0 期

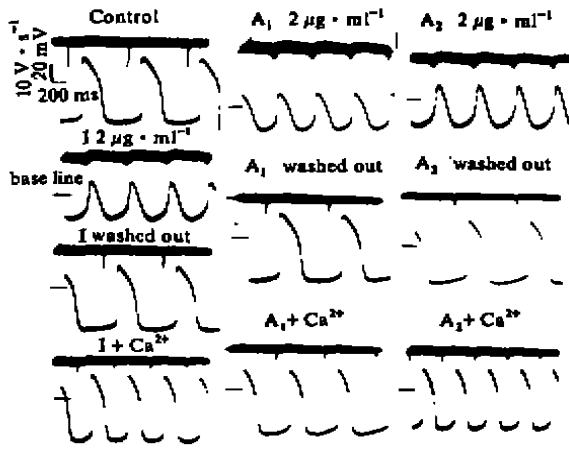


Fig 2. Recordings showing effects of I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>(2 µg · ml<sup>-1</sup>) on action potentials of cultured rat myocardocytes. Ca<sup>2+</sup> = CaCl<sub>2</sub>80 µg · ml<sup>-1</sup>; Upper tracing = dV/dt; Lower tracing = action potential.

Tab 2. Influence of soyasaponin monomer I and X-XO on action potential parameters of cultured myocardocytes. Xanthine (X) 0.42 mmol · L<sup>-1</sup>; Xanthine oxidase (XO) (5.4 nmol · L<sup>-1</sup>; I 20 µg · ml<sup>-1</sup>. n=30, x ± s; \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs control.

	Control	X-XO	I+X-XO
APA/mV	76±7	59±9	77±7*
OS/mV	27±3	22±5***	28±5*
MDP/mV	49±5	30±9***	50±5*
TP/mV	26±6	17±6***	28±7*
V <sub>max</sub> /V · s <sup>-1</sup>	16±6	10±3***	15±4*
APD <sub>10</sub> /ms	34±5	16±6***	31±9*
APD <sub>50</sub> /ms	142±18	127±23**	142±14*
APD <sub>90</sub> /ms	222±29	182±33**	215±39*
APF/bpm	127±26	147±23**	126±15*

除极的速度和幅度减小,平台期缩短,从而使心肌细胞动作电位各参数全面减小.另外, Ca<sup>2+</sup>内流的减少使[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低,因而Ca<sup>2+</sup>激活性K<sup>+</sup>通道的开放减少<sup>(7)</sup>.后者使3期复极化的K<sup>+</sup>外流减少,导致舒张期自动除极化的起点MDP向正的方向移动.结果使心肌细胞动作电位的发放频率加快.本实验3种皂甙单

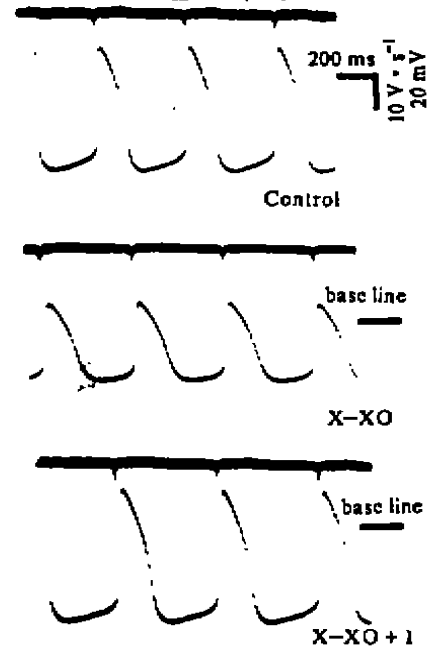


Fig 3. Recordings showing antioxidative action of I 20 µg · ml<sup>-1</sup> on action potentials of cultured rat myocardocytes. Xanthine (X) 0.42 mmol · L<sup>-1</sup>; Xanthine oxidase (XO) 5.4 nmol · L<sup>-1</sup>. Upper tracing = dV/dt; Lower tracing = action potential.

体对心肌细胞跨膜电活动的影响,表明它们有钙通道阻滞作用.

大豆皂甙单体 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>使培养的慢反应心肌细胞群落的自发性搏动呈剂量依赖性抑制,进一步支持三种皂甙单体阻滞钙通道的可能性.随着药浓度的增高,钙通道失活导致丧失兴奋性的心肌细胞数递增,因而呈现自发性搏动的群落数减少.另外,心肌细胞动作电位平台期的缩短使钙内流减少,也是搏动群落数目减少的原因之一.

钙通道阻滞剂尼莫地平的阳性药物对照,不仅进一步支持这三种大豆皂甙单体可能有钙通道阻滞作用,而且得出 I, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>2 µg · ml<sup>-1</sup>对钙通道的阻滞作用强度与尼莫地平1.25 µg · ml<sup>-1</sup>相近的定量概念.

X-XO系统可诱发超氧阴离子自由基<sup>(8)</sup>.本实验观察到大豆皂甙单体 I能逆转X-XO所致的膜损伤性心肌细胞的电位表现,并能显著降低心肌细胞的自由基含量,确证了大豆皂

甙单体 I 的抗氧化损伤作用.

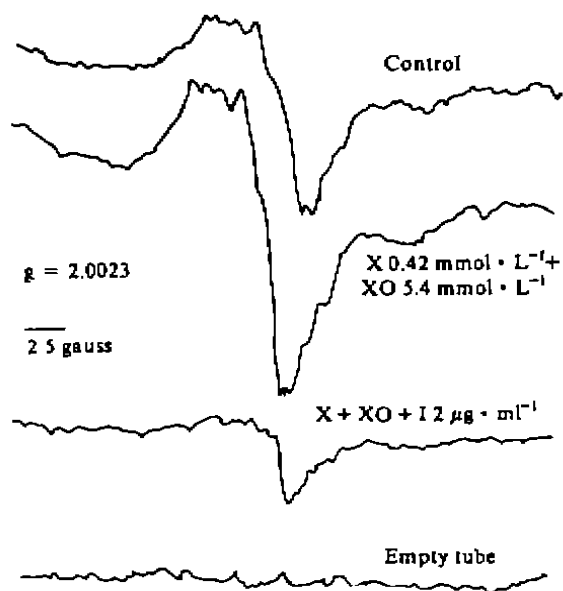


Fig 4. Electron spin resonance spectra of cultured myocardiocytes. 1st curve: Control. 2nd curve: Adding X and XO into culture medium. 3rd curve: Adding I with X-XO.  $g = g$  factor. Magnetic field 2.5 Gs.

REFERENCES

- 1 Yu LP, Cheng ZQ, Jiang MT. Influence of soyaaponins on the synthesis of DNA by carcinoma cells. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1990; 16 Suppl 1 : 86.
- 2 Gao GG, Li Zy, Chen YG, Liu YX. The effect of soyaaponin on hyperlipidemia rabbits induced by Adeps Suillus and on the endurance to anoxia in mice under normal pressure. *Bull Chin Mater Med* 1984; 9 : 184-5.
- 3 Zhan H, Shen JM, Jiang GR. Proceedings of antiooxidative action of Chinese traditional drugs. *China J Chin Mater Med* 1990; 15 : 630-3.
- 4 Tanu T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S, Kitagawa I. Histochemistry. V. Soyaaponins in soybeans (*Glycine max* Merrill, seeds). *Chem Pharm Bull* 1985; 33 : 3829-33.
- 5 Zhang WJ, Zhong GG, Zhou AH, Jiang Y, An ZY, Ma XY. Influence of soyaaponins on the spontaneous contractility and action potential. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1992; 18 : 518-20.
- 6 Schanne OF. Factors involved in the loss of spontaneous contractile and electrical activity in clusters of cultured cardiac cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1972; 50 : 523-32.
- 7 Schwarz W, Passow H.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in erythrocytes and excitable cells. *Annu Rev Physiol* 1983; 45 : 359-74.
- 8 Thompson JA. The oxygen free radical system; a fundamental mechanism in the production of myocardium necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986; 28 : 449-62.

273-276

苜蓿多糖 免疫佐剂

苜蓿多糖的免疫增强效应

赵武迷, 张玉琴, 任丽娟<sup>1</sup>, 张岚<sup>1</sup>, 杨健<sup>1</sup>

(中日友好临床医学研究所免疫学研究室, <sup>1</sup> 药物药理学研究室, 北京 100029, 中国)

R967

273-276

Immunopotentiating effects of polysaccharides isolated from *Medicago sativa* L

ZHAO Wu-Shu, ZHANG Yu-Qin, REN Li-Juan<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>

(Department of Immunology, <sup>1</sup> Department of Materia Medica and Pharmacology, China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT** *In vitro* experiments showed that 250-500  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  of the polysaccharides isolated from *Medicago sativa* L (MSP) increased mouse lymphocyte uptake of [<sup>3</sup>H]thymidine (TdR) induced by PHA-p (0.15%), Con A (5  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), LPS (20  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), and PWM (2  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) at maximum by 5.13 ± 0.81, 0.75 ± 0.08, 4.52 ± 0.36, and 0.86 ± 0.24 folds, respectively. After MSP ip for 5 d, the average count of mouse splenic lymphocytes in 125  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  group increased from 1.4 ± 0.4 ( $\times 10^7$ )/mouse to 3.6

Received 1989-12-09

Accepted 1992-10-20