

藏党参皂苷对睾丸间质细胞的影响及作用机制

郑娟,赵莹,王丽蕃,胡华刚,徐斯凡*

(中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院,北京 100081)

[摘要] 目的:本研究以藏党参的正品长花党参 *Codonopsis thalictrifolia* Wall. 为研究对象,对藏党参皂苷对睾丸间质细胞功能的影响进行了初步研究。方法:利用不同质量浓度的藏党参皂苷对大鼠睾丸间质细胞进行体外培养,并测定细胞分泌睾酮的含量,cAMP 的含量以及 MTT 吸光度。结果:藏党参皂苷质量浓度为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以显著升高体外培养的大鼠睾丸间质细胞分泌睾酮的含量 ($P < 0.05$),提高 cAMP 的含量 ($P < 0.01$),并降低 MTT 吸光度 ($P < 0.01$)。结论:藏党参皂苷可使单个睾丸间质细胞的分泌能力增强,可能由 PKA 通路介导。

[关键词] 藏党参;皂苷;睾丸间质细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0145-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1432.015 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1432.015.html>

Effect and Mechanism of *Codonopsis thalictrifolia* Saponin on Leydig Cells

ZHENG Juan, ZHAO Ying, WANG Li-fan, HU Hua-gang, XU Si-fan*

(Chinese Minority Traditional Medical School, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

[Abstract] **Objective:** To study effects of *Codonopsis thalictrifolia* on leydig cells. **Method:** Leydig cells

[收稿日期] 20110420(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973956)

[第一作者] 郑娟,硕士,从事民族药物的基础研究工作,Tel:15210506552,E-mail:zy212007@hotmail.com。

[通讯作者] *徐斯凡,学士,教授,博士生导师,从事民族药物的基础研究工作,Tel:010-68930971,E-mail:sifanxu@126.com

用,从而具有抗菌耐药性的特点,这也是中药抗菌药物开发的一大优势。体内抗菌实验结果表明线叶菊对小鼠全身感染动物模型具有保护作用。特别对头孢克肟无作用的耐药金黄色葡萄球菌导致的感染动物依然具有保护作用。

为进一步探讨线叶菊的抗菌机制,通过电镜对与线叶菊作用前、后的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的形态学进行观察,发现与线叶菊作用后细菌的细胞壁遭到了严重的破坏,而细胞壁对于细菌而言是非常重要的结构,它对细菌起到了很好的保护作用,细胞壁的破损将直接导致细菌的死亡。同时细菌的细胞质也表现出不同程度的破坏。为进一步研究线叶菊的抗菌机制提供了方向和基础。

[参考文献]

[1] 内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药

[M]. 呼和浩特:内蒙古自治区人民出版社,1972:146.

[2] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 北京:科学出版社,1995:681.

[3] Xie X F, Cai X Q, Zhu S Y, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1312.

[4] 吕邵娃,刘玉婕,匡海学,等. 线叶菊抗感染有效部位抗炎镇痛作用研究[J]. 中医药学报,2011,2(39),15.

[5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1658.

[6] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(5):350.

[7] 吴景时,姚志国,秦泗军,等. 中草药线叶菊药理初步研究[J]. 药学通报,1979,14(2):87.

[责任编辑 聂淑琴]

were collected and cultured *in vitro* with different concentration of saponin to test quantity of testosterone and cAMP and MTT absorbance. **Result:** When saponin concentration was $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, quantity of testosterone was significantly increased ($P < 0.05$), content of cAMP was significantly increased ($P < 0.01$), and MTT absorbance was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion:** The saponin of *C. thalictrifolia* can strengthen the capability of single leydig cell to secrete testosterone, which is perhaps induced by the pathway of PKA.

[**Key words**] *Codonopsis thalictrifolia*; saponin; leydig cells

近年来的研究发现,不育症的发生率呈上升趋势,生殖健康已成为了科学研究的热点。藏党参作为藏族地区一味常用药,为桔梗科党参属植物,具有消炎散肿、滋补壮阳、健脾胃、补气的功效,在治疗不育症方面发挥着一定作用。本研究主要针对藏党参有效成分皂苷,对其影响大鼠睾丸间质细胞的功能以及相关作用机制进行探究。

1 材料

1.1 藏党参总皂苷 藏党参 *Codonopsis thalictrifolia* Wall.,产地为青海省岷县,生长于青藏高原与西秦岭相汇处,海拔 2 000 ~ 3 000 m。购于兰州金开来商贸有限公司。藏党参总皂苷由本实验室从藏党参药材中提取纯化获得,得率为 2.99%。

1.2 试剂与仪器 小牛血清(Hyclone);环磷酸腺苷(cAMP)ELISA 检测试剂盒(Adlitteram,批号 091120);MTT(Sigma);睾酮对照品 100 mg(天津一方科技有限公司)。BenchePark Plus 型酶标仪(美国 Bio-rad 公司),C150 型二氧化碳培养箱(德国 Binder 公司),BDS200 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器厂),5804R 型低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 动物 雄性 Wistar 大鼠, (260 ± 20)g,合格证号 SCXK(京)2006-0008,购于北京大学医学部实验动物中心。保持温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 35% ~ 50%,自由饮水,适应性饲养 1 周后用于实验。

2 方法

2.1 大鼠睾丸间质细胞的体外培养 颈椎脱臼处死动物后尽快取出睾丸,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 DMEM/F12 培养液中,快速、仔细地剪开被膜,清洗 2 ~ 3 次。加入 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胶原酶 II 缓冲液(2.5 mL/次),36 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化 15 min,适当摇晃。将上清液吸出,先后通过 100 目、200 目尼龙过滤网过滤。收集滤液,于 4 $^{\circ}\text{C}$,900 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,离心 10 min,弃去上清液,再加入 DMEM/F12 培养液(2.5 mL/次),摇匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$,900 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,离心 10 min,弃去上清液。

调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,1 mL/孔接种到 24 孔板,在 35 $^{\circ}\text{C}$,100% 相对饱和湿度,5% CO_2 培养箱中培养。根据不同培养时间将间质细胞分 8 组,每组设 6 个复孔。根据不同加药浓度将细胞分 7 组,每组设 6 个复孔。将藏党参总皂苷溶解于 DMEM/F12 培养液中,向不同浓度组别的细胞培养液中加入相应的藏党参总皂苷溶液和 DMEM/F12 培养液,使其体积一致。

2.2 细胞活率测定 取一滴细胞悬液滴于载玻片上,加一滴 0.4% 的台盼蓝溶液,混匀,静置 3 min,显微镜下观察,活细胞为无色透明,死细胞为蓝色,计算细胞活率。

2.3 高效液相测定睾酮含量 流动相乙腈-水(40:100),色谱柱 C18 柱(6 mm \times 250 mm, 5 μm),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,波长 240 nm,进样量 10 μL 。精密称取睾酮对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中。分别取 0.1,0.5,1,4,8 mL 置于 25 mL 量瓶,再用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为睾酮对照品溶液。分别吸取各睾酮对照品溶液 10 μL 进样分析,以峰面积(Y)为纵坐标,以进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线。

2.4 环磷酸腺苷(cAMP)含量的测定 采用固相夹心法酶联免疫吸附试验。

2.5 细胞活力测定 采用四甲基偶氮唑盐(MTI)微量酶反应比色法检测细胞增殖。取出药物作用后的 96 孔板,吸弃培养液。每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 ,孵育 4 h。吸弃液体,加 150 μL /孔 DMSO,混匀,室温静置 10 min,酶标检测仪检测在 570 nm 处各孔的 A 值。

2.6 数据统计分析 用统计软件 SPSS 11.0 进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验检查组间差异。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率 睾丸间质 leydig 细胞培养 0,1,2,4,8,16,32 h 后,通过显微镜观察细胞活率情况对比。通过台盼蓝排斥实验证实离体大鼠睾丸间质细

胞功能良好,可作为本实验的动物模型。由台盼蓝排斥实验可看出细胞活率较高,但随着培养时间的延长,细胞活率有所下降。孵育 0,1,2,4,8,16,32 h,细胞活率分别为 $(98.1 \pm 0.4)\%$, $(97.4 \pm 1.6)\%$, $(96.7 \pm 1.1)\%$, $(94.1 \pm 1.0)\%$, $(90.6 \pm 0.7)\%$, $(80.3 \pm 0.9)\%$, $(77.5 \pm 1.3)\%$ 。

3.2 大鼠睾丸间质细胞分泌的睾酮含量

3.2.1 不同藏党参总皂苷浓度对睾丸间质细胞睾酮分泌量,cAMP 含量的影响 本实验室曾测定过本方法所培养的睾丸间质细胞睾酮分泌量,随着培养时间的延长睾酮分泌量增加,培养至 4 h 后增长峰趋于平缓,因此把未加药之前培养睾丸间质细胞的培养时间定为 4 h^[3]。藏党参总皂苷不同给药浓度组和空白对照组睾酮分泌量和 cAMP 含量测定统计分析结果见表 1。

表 1 藏党参总皂苷不同给药浓度与睾酮分泌量、cAMP 含量的关系 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	睾酮 /ng/1 × 10 ⁶ cells	cAMP /nmol·L ⁻¹
空白对照	0	0.198 ± 0.078	6.60 ± 0.39
藏党参总皂苷	0.1	0.218 ± 0.022	11.01 ± 1.45
	0.2	0.317 ± 0.019	13.94 ± 1.52 ¹⁾
	0.3	0.330 ± 0.076 ¹⁾	22.81 ± 1.24 ²⁾
	0.4	0.387 ± 0.010 ¹⁾	24.39 ± 0.81 ²⁾
	0.5	0.289 ± 0.016	18.75 ± 0.59 ¹⁾
	0.6	0.224 ± 0.030	11.43 ± 0.66

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

由表 1 显示,给药组分泌的睾酮分泌量和 cAMP 含量均比空白组高。当浓度较低睾酮分泌量和 cAMP 含量增加较少,初期随着给药浓度增加睾酮分泌量随之增大,0.3 g·L⁻¹ 组和 0.4 g·L⁻¹ 组与空白对照组比均有显著性增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 给药浓度达到 0.4 g·L⁻¹ 时细胞睾酮分泌量和 cAMP 含量最大,此后随着给药浓度的增大细胞睾酮分泌量和 cAMP 含量呈逐渐下降的趋势。

3.2.2 不同藏党参总皂苷培养时间对睾丸间质细胞睾酮分泌量的影响 各组藏党参总皂苷给药浓度均为 0.4 g·L⁻¹, 其对睾丸间质细胞不同培养时间睾酮分泌量测定结果统计分析结果如表 2。

实验中选择的给药浓度为 0.4 g·L⁻¹, 结果显示,给药组分泌的睾酮含量均比空白组分泌的睾酮含量高,1,2,8,16,32 h 组均与空白对照组有显著差异

($P < 0.05$)。当培养时间较短时睾酮的分泌量增加较少,初期随着培养时间的增加睾酮分泌量随之加大,培养时间达 4 h 时细胞睾酮分泌量最大,与空白对照组有极显著的差异 ($P < 0.01$), 此后随着培养时间的增大细胞睾酮的分泌量呈逐渐下降的趋势。

表 2 藏党参总皂苷给药浓度均为 0.4 g·L⁻¹ 不同培养时间对细胞睾酮分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	培养时间 /h	睾酮/ng/1 × 10 ⁶ cells
空白对照	-	0	0.198 ± 0.078
藏党参总皂苷	0.4	1	0.328 ± 0.029 ¹⁾
		2	0.425 ± 0.022 ¹⁾
		4	0.542 ± 0.040 ²⁾
		8	0.469 ± 0.019 ¹⁾
		16	0.455 ± 0.023 ¹⁾
		32	0.397 ± 0.009 ¹⁾
		64	0.263 ± 0.092

3.3 MTT 吸光度 配置不同浓度的藏党参总皂苷溶液,分别用溶液加入培养的睾丸间质细胞,再加入 20 μL 的 MTT 溶液,培养 4 h 后吸弃液体,加入 150 μL 的 DMSO 溶液,混匀测定 MTT 的 A。见表 3。

表 3 不同藏党参总皂苷给药浓度对睾丸间质细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A
空白对照	0	1.89 ± 0.22
藏党参总皂苷	0.1	1.88 ± 0.27
		1.79 ± 0.17
		1.70 ± 0.15 ¹⁾
		1.50 ± 0.11 ²⁾
		1.49 ± 0.23 ²⁾
		1.45 ± 0.29 ²⁾
		1.45 ± 0.29 ²⁾

由表 3 得知,随着给药浓度的增加,MTT 吸光度值呈逐渐下降趋势。当藏党参总皂苷为 0.3 g·L⁻¹ 时,MTT 吸光度值与空白组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 给药质量浓度为 0.4,0.5,0.6 g·L⁻¹ 时与空白组相比有极其显著的差异 ($P < 0.01$)。0.1,0.2 g·L⁻¹ 与空白对照组差异不显著。

4 讨论

本实验主要利用藏党参总皂苷对大鼠睾丸间质细胞进行体外培养,研究藏党参皂苷对睾丸间质细胞增殖和功能的影响。分别检测间质细胞在体外培养 0,1,2,4,8,16,32 h 后的台盼蓝镜下情况及 4 h 细胞培养板内的生长情况,可知在孵育时间内细胞状态良好,细胞活率高达 98%。

睾酮是最重要的雄性激素,主要由睾丸间质细胞分泌。细胞群分泌睾酮的总量取决于有分泌能力的细胞数量和单个细胞的分泌能力 2 个方面。目前有文献报道利用高效液相色谱法(HPLC)检测睾酮含量的报道^[4]。与 γ -放免仪器相比,HPLC 法测定睾酮的含量,无放射物污染,方法快速、简便、准确、重复性好,结果稳定。选用睾酮对照品作为对照,检测出峰的条件。利用高效液相色谱仪测定不同藏党参给药质量浓度和培养时间的睾酮的分泌量。

在不同藏党参总皂苷给药浓度对睾酮分泌量的研究中,细胞培养时间为 4 h,给药组睾酮分泌量明显高于空白对照组,0.3,0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与空白对照组相比有显著差异($P < 0.05$),此后随着给药浓度的增大,睾酮的分泌量呈逐渐下降的趋势。在不同藏党参总皂苷培养时间对睾酮分泌量的研究中,给药质量浓度为 0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,给药组分泌的睾酮含量均比空白组分泌的睾酮量高,1,2,8,16,32 h 组均与空白对照组有显著差异($P < 0.05$),培养时间达 4 h 时与空白对照组有极显著的差异($P < 0.01$),此后随着培养时间的增大细胞睾酮的分泌量呈逐渐下降的趋势。

cAMP 含量的多少与睾酮的分泌有内在的联系^[5]。在不同藏党参总皂苷给药浓度对 cAMP 的含量的研究中,细胞培养时间为 4 h,给药组 cAMP 含量均比空白对照组高。初期随着给药浓度增加 cAMP 含量随之增大,0.3,0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组与空白对照组比均有极显著性差异($P < 0.01$),此后随着给药浓度的增大,cAMP 含量呈逐渐下降的趋势。藏党参总皂苷对睾丸间质细胞睾酮的分泌与其 cAMP 含量变化趋势基本一致,由此推测,藏党参总皂苷是通过 cAMP 影响睾丸间质细胞睾酮的分泌。

张健等^[6]研究人参二醇皂苷对人乳腺癌细胞增殖的实验研究,试验结果显示细胞生长明显受到抑制,且生长抑制率呈时间依赖性和剂量依赖;杜键^[7]等人研究西洋参叶二醇组皂苷对血管平滑肌细胞增殖的影响,实验结果测得西洋参叶二醇组皂苷能抑制血管平滑肌细胞增殖,且抑制作用呈一定的剂量依赖性。根据测得不同藏党参总皂苷给药浓度和培

养时间与 MTT 吸光度之间的关系得出,当藏党参总皂苷质量浓度为 0.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,MTT 吸光度值与空白组相比有显著差异($P < 0.05$),藏党参总皂苷质量浓度 0.4,0.5,0.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组与空白对照组相比有极显著差异($P < 0.01$)。同时还发现随着培养时间的增加,给药组 MTT 的吸光度值也随之增加,但与相对应的空白组略低。培养 1,2,4,8 h 组均与空白对照组比较有极显著的差异($P < 0.01$),16 h 组与相应空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

细胞群分泌睾酮的总量取决于有分泌能力的细胞数量和单个细胞的分泌能力 2 个方面。由 MTT 比色法测定细胞增殖实验及睾酮分泌量实验看出,本实验中细胞数量虽然下降,但是睾酮的分泌量仍然增加,表明单个睾丸间质细胞的分泌能力有所增强,从而导致睾酮分泌量的增多,同时 cAMP 含量增多也表明了体外培养睾丸间质细胞的睾酮分泌与 PKA 通路有关。研究说明藏党参总皂苷可使单个睾丸间质细胞的分泌能力增强,可能由 PKA 通路介导。

[参考文献]

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991.
- [2] 罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004.
- [3] 王丽蓉. 藏党参中主要活性成分的测定及其多糖对睾丸间质细胞影响的研究[D]. 北京:中央民族大学,2009:1.
- [4] 姚莉蓓,冉兰,刘梅妍. HPLC 测定甲睾酮喷雾剂中的甲睾酮[J]. 华西药学杂志,2008,23(2):235.
- [5] 杨国平,吴益民,王洪军,等. IL-1 对冷应激大鼠睾丸间质细胞睾酮浓度的调节[J]. 解放军预防医学杂志,2007,25(5):336.
- [6] 张健,张舵舵,张妍,等. 人参二醇皂苷抑制人乳腺癌细胞增殖的实验研究[J]. 中国老年杂志,2008,12(8):2448.
- [7] 杜键,张治国,李洋,等. 西洋参叶二醇组皂苷对血管平滑肌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国老年杂志,2007,11(27):2085.

[责任编辑 聂淑琴]