

太子参抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的活性部位筛选及作用机制研究[△]

杨馨^{1*}, 张金娟², 宛蕾², 邓连力¹, 廖尚高^{1,3,4}, 何迅^{3,5#} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025; 3. 国家苗药工程技术中心及教育部民族药与中药开发应用工程研究中心, 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学天然药物优效利用重点实验室, 贵阳 550004; 5. 贵州医科大学医药卫生管理学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R965.1; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1958-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.20

摘要 目的: 筛选太子参抗心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤的活性部位, 并探讨其作用机制。方法: 太子参药材水提物经D101大孔吸附树脂柱以水-乙醇梯度洗脱, 得水洗脱部位(Fr.A)、30%乙醇洗脱部位(Fr.B)、50%乙醇洗脱部位(Fr.C)、95%乙醇洗脱部位(Fr.D)。采用化学缺氧法以连二亚硫酸钠复制大鼠H9c2心肌细胞H/R损伤模型, 采用MTS法检测经太子参各部位低、中、高剂量(Fr.A、Fr.B、Fr.C低、中、高剂量均分别为750、1 500、3 000 mg/L, Fr.D低、中、高剂量分别为5、10、20 mg/L)预处理后的细胞存活率, 筛选活性最强部位。分别采用微板法、硫代巴比妥酸比色法、WST-1法测定经太子参活性最强部位低、中、高剂量预处理后细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性以及细胞内丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率, 采用蛋白质印迹法检测细胞胱天蛋白酶3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平。结果: 经4个部位预处理后, Fr.A高剂量组, Fr.B高剂量组, Fr.C各剂量组的细胞存活率均较模型组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且以Fr.C的活性最强。经Fr.C预处理后, 各剂量组细胞培养液中LDH活性、中、高剂量组细胞内MDA含量、细胞凋亡率及Caspase-3和Bax蛋白的表达量均较模型组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 高剂量组细胞内SOD活性以及中、高剂量组细胞Bcl-2蛋白的表达量均较模型组显著升高($P < 0.05$)。结论: 太子参Fr.A、Fr.B、Fr.C部位均具有抗心肌细胞H/R损伤的作用, 其中以Fr.C的活性最强; Fr.C抗心肌细胞H/R损伤作用可能与其改善细胞的氧化应激状态, 提高细胞清除氧自由基的能力, 降低细胞脂质过氧化程度, 抑制细胞凋亡, 上调Bcl-2蛋白表达以及下调Caspase-3、Bax蛋白表达有关。

关键词 太子参; 活性部位; 大鼠H9c2心肌细胞; 缺氧/复氧损伤; 氧化应激; 细胞凋亡; 胱天蛋白酶3; B细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2相关X蛋白

Study on the Screening of Active Fractions of *Pseudostellaria heterophylla* Against Myocardial Hypoxia/reoxygenation Injury and Its Mechanism

YANG Xin¹, ZHANG Jinjuan², WAN Lei², DENG Lianli¹, LIAO Shanggao^{1,3,4}, HE Xun^{3,5} [1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. National Engineering Research Center of Miao's Medicines & Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guiyang 550004, China; 4. Key Lab of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 5. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen the active fractions of *Pseudostellaria heterophylla* against myocardial hypoxia/reoxygenation (H/R) injury, and to investigate its mechanism. METHODS: The water extract of *P. heterophylla* was eluted with D101 macroporous adsorption resin column by water-ethanol gradient elution to obtain water elution fraction (Fr.A), 30% ethanol eluting fraction (Fr.B), 50% ethanol eluting fraction (Fr.C) and 95% ethanol eluting fraction (Fr.D). H/R injury model of rat H9c2

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81360635、81660570)

* 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础及作用机制。E-mail: 695304748@qq.com

通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 中药药效物质基础及作用机制。电话: 0851-88308118。E-mail: 18985123337@189.cn

myocardial cells was induced by chemical anoxia method with sodium hydrosulfurosum. MTS assay was used to detect survival rate of cells after pretreated with low-dose, medium-dose and high-dose of each fraction (low-dose, medium-dose and high-dose of Fr.A, Fr.B, Fr.C were 750, 1 500, 3 000 mg/L; low-dose, medium-dose and high-dose of Fr.D were 5, 10, 20

mg/L), and the strongest active fraction of *P. heterophylla* was screened. After pretreated with the strongest active fraction, the activity of LDH in cell culture medium, the content of MDA and the activity of SOD in the cells were determined by microplate method, TBA method and WST-1 method, respectively. The apoptotic rate of the cells was detected by flow cytometry. The expressions of Caspase-3, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. RESULTS: After the pretreatment of 4 fractions, the survival rate of cells in Fr.A high-dose group, Fr.B high-dose group and all Fr.C groups were increased significantly, compared with model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of Fr.C was the strongest. After pretreated with different doses of Fr.C, the activity of LDH in the culture medium of all groups, the content of MAD, apoptotic rate, the protein expression of Caspase-3 and Bax in medium-dose and high-dose groups were all decreased significantly, compared with model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the activity of SOD in high-dose group, the protein expression of Bcl-2 in medium-dose and high-dose groups were increased significantly, compared with model group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The Fr.A, Fr.B and Fr.C of *P. heterophylla* have anti-H/R injury effects on cardiomyocytes, and the activity of Fr.C is the strongest. Anti-H/R injury of Fr.C may be related to its ability to improve oxidant stress state and scavenge oxygen free radicals, decrease the degree of lipid peroxidation, inhibit cell apoptosis, up-regulate the protein expression of Bcl-2 and down-regulate the protein expression of Caspase-3 and Bax.

KEYWORDS *Pseudostellaria heterophylla*; Active fraction; Rat H9c2 cardiomyocytes; Hypoxia/reoxygenation injury; Oxidant stress; Cell apoptosis; Caspase-3; Bcl-2; Bax

太子参是石竹科假繁缕属植物孩儿参[*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.]的干燥块根,可用于治疗脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肺燥干咳等症,同时也是民间用于治疗心悸的重要药材^[1]。现代药理学研究表明,太子参具有明确的抗应激、抗疲劳、降血糖、降血脂、增强免疫功能、抗心肌缺氧及改善急性心肌梗死后的慢性心力衰竭等作用^[2-4]。本研究采用中药传统煎煮法对太子参药材进行提取,水提物经D101大孔吸附树脂柱以水-乙醇梯度洗脱,得到太子参不同极性部位;考察不同部位对连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)诱导的心肌细胞缺氧/复氧(Hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤模型的影响,筛选出活性最强的部位,并对其抗心肌细胞H/R损伤的作用机制进行初步探讨,旨在为太子参的临床应用奠定现代药理学研究基础。

1 材料

1.1 仪器

2001HY-6003型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Elx 800UV型酶标仪(美国Bio-Tek公司);Universal Hood II型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司);BS223S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Allegra 64R型台式高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);MiniSpin型离心机(德国Eppendorf公司);NovoCyte 3008型流式细胞仪(美国ACEA Biosciences公司);TS-1000型转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);WD-905D型水平摇床(北京市六一仪器厂);K30型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

太子参药材购于贵州省凯里市黄平县太子参栽培种植基地(批号:TZS-20140520),经贵州医科大学药学院龙庆德副教授鉴定为石竹科假繁缕属植物孩儿参[*P. heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.]的根。

D101大孔吸附树脂(0.30~1.25 mm,天津市海光化工有限公司);DMEM高糖培养基、DMEM无糖培养基、胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为8117182、1868979、1859509);胎牛血清(德国SeraPro公司,批号:P1701);维生素E(纯度:≥98%)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、RIPA细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为1012B036、20170227、20171018、20171011);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(北京雷根生物技术有限公司,批号:0424A17);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20170319、20170312、20170105);CellTiter 96® AQueous单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)(美国Promega公司,批号:0000227663);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:20171017);B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体(美国BioWorld公司,批号:CC893300);Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Proteintech公司,批号:00054598);胱天蛋白酶3(Caspase-3)抗体(美国Cell Signaling公司,批号:18);兔β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:AG07197903);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(中杉金桥生物技术有限公司,批号:133599);免疫印迹化学发光试剂(ECL)(上海七海复泰生物科技有限公司,批号:20170906);乙醇、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 细胞

大鼠H9c2心肌细胞株由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法

2.1 样品的制备

称取太子参药材 30 kg,用水煎煮提取 2 次,第 1 次用 10 倍量水浸泡过夜后加热煎煮提取 2 h,第 2 次用 8 倍量水加热煎煮提取 2 h,合并两次提取液,滤过,滤液加热浓缩,得水提取浸膏(得率为 47.50%)。将上述浸膏用水溶解(终质量浓度为 1.0 g/mL,以生药量计),经 D101 大孔吸附树脂柱,依次以水、30%乙醇、50%乙醇、95%乙醇洗脱,收集各部分洗脱液,加热浓缩至稠膏,得太子参水洗脱部位(Fr.A)、30%乙醇洗脱部位(Fr.B)、50%乙醇洗脱部位(Fr.C)和 95%乙醇洗脱部位(Fr.D)等 4 个部位,分别于 70 °C 下减压浓缩、冷冻干燥,即得各部位样品(得率分别为 37.38%、3.62%、0.35%、0.02%)。精确称取上述各部位样品适量,用 DMSO 溶解,得质量浓度均为 500 mg/mL 的样品溶液,置于 -80 °C 冰箱中保存,备用。

2.2 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤模型的建立

将 H9c2 心肌细胞接种于完全培养基(DMEM 高糖培养基+10%胎牛血清)中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 24 h,常规传代。待细胞生长至对数生长期,用 0.25%胰蛋白酶消化,以转速 1 000 r/min 离心 3 min,收集细胞,用完全培养基重悬并调整细胞密度至 4×10⁴ mL⁻¹,按 100 μL/孔接种于 96 孔细胞培养板、2 mL/孔接种于 6 孔细胞培养板或 5 mL/瓶接种于细胞培养瓶中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 48 h。吸弃上清液,用 DMEM 无糖培养基清洗 2 次,采用化学缺氧法^[5]在培养板/瓶中加入以 DMEM 无糖培养基配制的终浓度为 20 mmol/L 的 Na₂S₂O₄ 溶液,继续置于培养箱中,刺激细胞 15 min 使发生缺氧损伤;然后吸弃缺氧液,换用完全培养基,置于培养箱中继续培养 15 min,进行复氧。

2.3 太子参抗 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤的活性部位筛选

取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,以 4×10⁴ mL⁻¹ 的密度按 100 μL/孔接种于 96 孔细胞培养板中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 24 h 后,将心肌细胞随机分为正常对照组、模型组、维生素 E 组以及太子参 Fr.A、Fr.B、Fr.C、Fr.D 低、中、高剂量组(参照前期预试验结果,Fr.A、Fr.B、Fr.C 的低、中、高剂量分别为 750、1 500、3 000 mg/L,Fr.D 的低、中、高剂量分别为 5、10、20 mg/L,均以各部位样品质量计,下同),每组设 6 个复孔,吸弃各孔上清液,正常对照组及模型组加入完全培养基 100 μL,各给药组加入含相应剂量药物的完全培养基 100 μL,按上述条件继续培养 24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制 H/R 损伤模型。复氧后,每孔加入 MTS 20 μL,于培养箱中孵育 3 h 后,使用酶标仪检测各孔在 490 nm 波长处的光密度(OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率=样品组平均 OD 值/正常对照组平均 OD 值×100%^[6]。以上试验重复 3 次,比较太子参不同部位对 H/R 损伤模型细胞存活率的影响,筛选出活性最强部位。

2.4 太子参活性最强部位对 H/R 损伤模型细胞培养液中 LDH 活性及细胞内 MDA 含量、SOD 活性的影响

取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,以 4×10⁴ mL⁻¹ 的密

度按 2 mL/孔接种于 6 孔细胞培养板中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 24 h 后,将心肌细胞随机分为正常对照组、模型组、维生素 E 组和太子参活性最强部位低、中、高剂量组,每组设 3 个复孔。正常对照组及模型组加入完全培养基 2 mL,各给药组加入含相应剂量药物的完全培养基 2 mL,按上述条件继续培养 24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制 H/R 损伤模型。复氧后,各孔吸取上清液采用微板法检测细胞培养液中 LDH 活性;各孔吸弃上清液后,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.4)清洗 2 次,加入 RIPA 细胞裂解液 100 μL,收集裂解后的细胞,采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法检测细胞内 MDA 含量,采用 WST-1 法检测细胞内 SOD 活性。各指标均使用酶标仪检测,并严格按照试剂盒说明书操作。以上试验重复 3 次。

2.5 太子参活性最强部位对 H/R 损伤模型细胞凋亡率的影响

采用流式细胞术检测太子参活性最强部位对 H/R 损伤模型细胞凋亡率的影响。取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,以 4×10⁴ mL⁻¹ 的密度按 2 mL/孔接种于 6 孔细胞培养板中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 24 h 后,将心肌细胞随机分为正常对照组、模型组和太子参活性最强部位低、中、高剂量组,每组设 3 个复孔。正常对照组及模型组加入完全培养基 2 mL,各给药组加入含相应剂量药物的完全培养基 2 mL,按上述条件继续培养 24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制 H/R 损伤模型。复氧后,用 PBS 清洗 2 次,消化、离心收集细胞,按细胞凋亡检测试剂盒说明书进行 Annexin V-FITC/PI 染色,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。以上试验重复 3 次。

2.6 太子参活性最强部位对 H/R 损伤模型细胞凋亡调节蛋白表达的影响

采用蛋白质印迹法(Western blot)检测太子参活性最强部位对 H/R 损伤模型细胞凋亡调节蛋白(Caspase-3、Bcl-2、Bax)表达的影响。取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,以 4×10⁴ mL⁻¹ 的密度按 5 mL/瓶接种于细胞培养瓶中,置于 37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养 24 h 后,按照“2.5”项下方法分组。正常对照组及模型组加入完全培养基 2 mL,各给药组加入含相应剂量药物的完全培养基 2 mL,按上述条件继续培养 24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制 H/R 损伤模型。复氧后,用预冷的 PBS 清洗 2 次,加入含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液 100 μL,冰浴 30 min,将细胞刮下,收集裂解后的细胞液,于 4 °C 下以转速 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白浓度^[7]。经蛋白上样缓冲液稀释后,用 100 °C 沸水将蛋白变性后置于 -80 °C 保存,备用。每组取蛋白 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,以 5%胎牛血清蛋白室温封闭 2 h,加入相应一抗[Caspase-3(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Bax

(1:5 000)、 β -actin(1:5 000)],在室温下振摇2 h后,于4 ℃孵育过夜,用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(TBST)洗膜3次,每次5 min,加入二抗[HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5 000)],室温孵育1 h,用TBST洗膜3次,每次10 min,以ECL显色后,置于凝胶成像分析仪上成像并用Image Lab 3.0软件分析。以相应蛋白与内参 β -actin的灰度值比值表示该蛋白的相对表达量。以上试验重复3次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或Dunnett's *t*检验,两组间比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 太子参抗H9c2心肌细胞H/R损伤的活性部位筛选结果

与正常对照组比较,模型组细胞存活率显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,维生素E组,Fr.A高剂量组,Fr.B高剂量组,Fr.C各剂量组的细胞存活率均显著升高,且Fr.C的抗细胞损伤作用呈剂量依赖性,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而Fr.A低、中剂量组,Fr.B低、中剂量组,Fr.D各剂量组的细胞存活率与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这提示Fr.C是太子参抗H9c2心肌细胞H/R损伤的活性最强部位,详见表1。

表1 太子参不同部位对H9c2心肌细胞H/R损伤后细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Effects of different fractions of *P. heterophylla* on survival rate of H9c2 cardiomyocytes after inducing H/R injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Fr.A	Fr.B	Fr.C	Fr.D
正常对照组	100.00 ± 3.06	100.00 ± 1.93	100.00 ± 1.41	100.00 ± 2.52
模型组	61.97 ± 2.27*	60.69 ± 2.18*	60.66 ± 2.63*	61.08 ± 2.06*
维生素E组	75.09 ± 2.76 ^{##}	73.13 ± 2.74 ^{##}	73.18 ± 2.46 ^{##}	74.90 ± 2.61 ^{##}
不同部位低剂量组	58.32 ± 3.75	59.91 ± 3.80	64.07 ± 2.39 [#]	60.88 ± 2.77
不同部位中剂量组	62.22 ± 3.03	62.18 ± 3.65	70.06 ± 4.50 ^{##Δ}	59.86 ± 4.53
不同部位高剂量组	65.22 ± 1.96 ^{ΔΔ}	65.46 ± 1.76 ^{##ΔΔ}	78.65 ± 3.21 ^{##ΔΔ□}	61.73 ± 2.24

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与同部位低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与同部位中剂量组比较,[□] $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; vs. low-dose group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. medium-dose group, [□] $P < 0.01$

3.2 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后LDH、MDA、SOD水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞培养液中LDH活性和细胞内MDA含量均显著升高,而细胞内SOD活性显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),提示细胞明显受损。与模型组比较,维生素E组和Fr.C各剂量组细胞培养液中LDH活性均显著降低,且呈一定的剂量依赖性,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Fr.C中、

高剂量组细胞内MDA含量均显著降低,Fr.C高剂量组细胞内SOD活性显著上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这提示Fr.C能减轻H/R损伤后H9c2心肌细胞的受损程度,对其具有一定的保护作用,详见表2。

表2 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后LDH、MDA、SOD水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of Fr.C on LDH, MDA and SOD levels of H9c2 cardiomyocytes after inducing H/R injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LDH,U/L	MDA,nmol/mg prot	SOD,U/mg prot
正常对照组	110.0 ± 14.5	0.84 ± 0.29	70.98 ± 0.16
模型组	246.4 ± 15.5*	1.82 ± 0.23*	62.77 ± 0.49*
维生素E组	164.4 ± 13.0 ^{##}	1.08 ± 0.40 [#]	66.33 ± 0.47 [#]
Fr.C低剂量组	195.4 ± 16.9 [#]	1.42 ± 0.43	63.55 ± 2.59
Fr.C中剂量组	156.9 ± 11.5 ^{##Δ}	1.02 ± 0.35 [#]	65.27 ± 1.64
Fr.C高剂量组	139.7 ± 21.5 ^{##Δ}	0.95 ± 0.42 [#]	66.86 ± 0.74 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; vs. low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后细胞凋亡的影响

与正常对照组比较,模型组的细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,Fr.C中、高剂量组的细胞凋亡率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而Fr.C低剂量组的细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图1、表3。

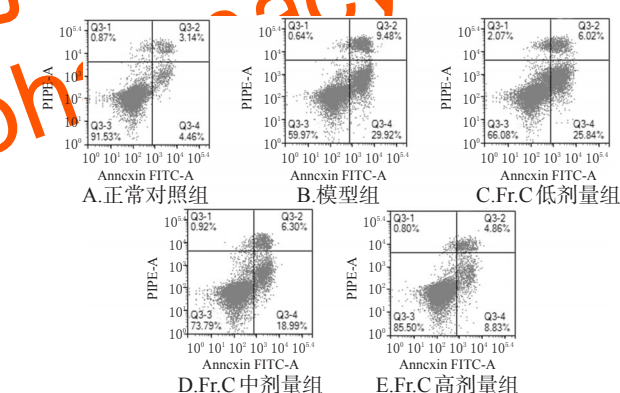


图1 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后细胞凋亡的影响

Fig 1 Effects of Fr.C on the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes after inducing H/R injury

3.4 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞H/R损伤后Caspase-3、Bax蛋白表达量均显著升高,Bcl-2蛋白表达量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,Fr.C中、高剂量组细胞Caspase-3、Bax蛋白表达量均显著降低,Bcl-2蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而Fr.C低剂量组细胞Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达量虽有变化,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这表明Fr.C中、高剂量能下调

Caspase-3、Bax 蛋白表达,并上调 Bcl-2 蛋白表达,详见图2、表3。

表3 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后细胞凋亡率以及Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of Fr.C on the apoptotic rate and the relative expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax of H9c2 cardiomyocytes after inducing H/R injury($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率, %	蛋白相对表达量		
		Caspase-3	Bcl-2	Bax
正常对照组	8.61 ± 0.51	0.52 ± 0.02	1.24 ± 0.09	0.43 ± 0.04
模型组	32.30 ± 3.25**	1.02 ± 0.09*	0.47 ± 0.04**	0.92 ± 0.04**
Fr.C低剂量组	27.45 ± 1.16	0.94 ± 0.08	0.56 ± 0.05	0.80 ± 0.04
Fr.C中剂量组	23.54 ± 0.88#	0.72 ± 0.02#	0.83 ± 0.06#	0.65 ± 0.06#
Fr.C高剂量组	16.80 ± 1.57###	0.58 ± 0.10#	1.03 ± 0.07#	0.56 ± 0.05#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$

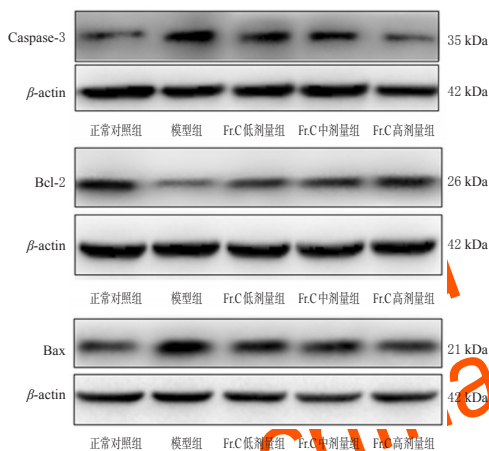


图2 Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤后Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophoretic diagrams of the effects of Fr.C on protein expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in H9c2 cardiomyocytes after inducing H/R injury

4 讨论

缺血性心脏病(Ischemic heart disease, IHD)是一类严重的心血管系统疾病,是目前导致患者死亡和心功能衰竭的主要原因^[8]。针对IHD所采取的主要治疗方法再灌注疗法(如药物治疗、冠状动脉搭桥术、经皮冠状动脉介入术等)可能会加重患者心肌细胞结构及功能的损坏程度,从而导致心肌缺血/再灌注损伤(Myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)^[9]。由于MIRI存在着复杂的致病因素,故目前尚无疗效可靠的防治药物^[10]。因此,开发更加安全、有效的抗MIRI药物对防治心肌缺血性疾病具有重要的临床价值。

心肌缺血性损伤主要是供给心肌的氧减少,氧自由

基清除系统功能减弱,生成系统活性却增强;而心肌再灌注损伤主要是当恢复氧气供应时,氧自由基急剧生成并大量堆积,从而造成心肌细胞结构损伤和功能代谢障碍,故MIRI的病因可主要归结为心肌细胞的H/R损伤^[11-12]。为此,本研究采用化学缺氧法以终浓度为20 mmol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液诱导心肌细胞损伤,复制H/R(即缺血/再灌注)损伤模型,从分子水平上初步探讨了太子参不同极性部位对H/R损伤心肌细胞的保护作用及可能机制。

已有研究表明,维生素E是一种高效的自由基清除剂和脂质过氧化作用阻断剂,能够有效地保护心血管系统,降低心血管疾病的发病率^[13],对MIRI具有一定的疗效^[14],并具有明显的抗细胞凋亡能力^[15],故本研究以维生素E作为阳性对照药物。同时,本研究参照前期预试验安全浓度范围设定了太子参不同部位的低、中、高剂量。本研究结果表明,太子参4个部位分别作用于H/R损伤模型24 h后,Fr.A、Fr.B、Fr.C均可不同程度地提高心肌细胞的存活率,其中Fr.C的作用最为显著。这提示Fr.A、Fr.B、Fr.C对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导H/R损伤的H9c2心肌细胞均具有一定的保护作用,且Fr.C的保护作用最强,可能与该部位富含苷类成分有关^[3]。随后,本研究以活性最强的Fr.C为对象,初步探讨了太子参抗H9c2心肌细胞H/R损伤的作用机制。

目前,MIRI的机制研究包括氧自由基、炎症反应、钙超载、能量代谢障碍、血管内皮细胞及细胞凋亡等。细胞内自由基的大量产生以及氧自由基清除能力的下降是引发MIRI的主要原因,因此在治疗MIRI时,应提高机体抗氧化酶的活性,增加清除氧自由基的能力,以减轻氧自由基对心肌细胞的损伤^[16-17]。LDH是一种糖酵解酶,在正常生理条件下,很少从细胞质中释放;而当细胞受到损伤时,LDH便会从细胞质中释放出来,其渗出量的多少可间接反映细胞膜的损伤程度^[18]。MDA是细胞内脂质的过氧化产物,其能与蛋白质、氨基酸或者其他生物大分子相互作用,最终改变磷脂结构,使生物膜受到严重损害,其含量可间接反映细胞脂质过氧化的程度^[19]。通常情况下,内源性抗氧化酶(SOD等)是防止氧化应激产生损伤的第一道防线,这类酶通过清除过量的氧自由基使机体处于平衡状态,其活性的高低可反映机体清除氧自由基的能力,并间接反映机体对氧化损伤细胞的保护程度^[20]。本研究结果显示,在太子参Fr.C预作用于心肌细胞H/R损伤模型24 h后,其低、中、高剂量组细胞培养液中LDH活性以及中、高剂量组细胞内MDA含量均显著降低,高剂量组细胞内SOD活性显著上升,提示Fr.C能有效抑制H/R损伤细胞释放LDH,并降低细胞内MDA含量、提高细胞内SOD活性。这表明Fr.C能提高细胞清除氧自由基的能力,减轻细胞膜等受自由基攻击后的损伤,降低H/R损伤致心肌细胞脂质过氧化的程度,从而有效保护心肌细胞,这种保护作用可能与该部位能够有效抑制心肌细胞受损过程中的脂质

过氧化有关^[19]。

细胞凋亡发生在许多疾病的生理与病理过程中,随着心血管病学研究的不断深入,研究者发现MIRI致心肌细胞死亡有两种机制,即坏死和凋亡,而后者是引发心血管系统疾病的重要原因^[21]。心肌再灌注虽然恢复了血流,但同时也可能加速受损心肌细胞的凋亡过程,故细胞凋亡在MIRI的病理过程中发挥着重要作用^[22]。细胞凋亡的发生受细胞内凋亡调节蛋白的调控,其分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类,细胞凋亡的发生是这两者平衡失调的结果。Bcl-2家族成员的构成比例是细胞凋亡调控的关键因素,Bcl-2有抗凋亡作用,而Bax有促凋亡作用,Bcl-2/Bax是启动细胞凋亡的“凋亡开关”,Bcl-2可与过表达的Bax形成异二聚体,抑制细胞凋亡,在抗细胞凋亡中发挥关键作用^[23]。细胞凋亡的启动者及启动者是Caspase,其中Caspase-3不仅是Caspase家族的关键凋亡蛋白酶,同时也是细胞凋亡的核心标志物之一^[24]。在外界刺激或Caspase-3等因子活化时,Bax从细胞质转入线粒体或细胞核内,导致促凋亡因子与抗凋亡因子失衡,从而诱导细胞凋亡^[25]。本研究结果显示,太子参Fr.C预作用于心肌细胞H/R损伤模型24 h后,其中、高剂量组细胞凋亡率较模型组显著下降,且Caspase-3、Bax蛋白表达量显著下降,Bcl-2蛋白表达量显著上升,提示其可有效抑制细胞凋亡,防止心肌细胞数目减少,维持或改善心功能。这表明Fr.C对H9c2心肌细胞H/R损伤的保护可能与其抗凋亡作用有关。

综上所述,太子参Fr.A、Fr.B、Fr.C均具有一定的抗心肌细胞H/R损伤的作用,其中以Fr.C的活性最强。上述作用可能与其可改善细胞的氧化应激状态,提高细胞清除氧自由基的能力,降低心肌细胞受损过程中的脂质过氧化程度,抑制细胞凋亡,上调Bcl-2蛋白表达及下调Caspase-3、Bax蛋白表达有关。本研究可为了解太子参在心肌细胞H/R损伤过程中的保护作用及其机制提供参考。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:1428-1429.

[2] 汪剑飞. 太子参药理研究新进展[J]. 实用药物与临床,2013,16(4):333-334.

[3] WANG Z, LIAO SG, HE Y, et al. Protective effects of fractions from *Pseudostellaria heterophylla* against cobalt chloride-induced hypoxic injury in H9c2 cell[J]. *J Ethnopharmacol*,2013,147(2):540-545.

[4] 沈祥春,陶玲,彭佼,等. 太子参对心肌梗死后慢性心力衰竭大鼠心肌组织NOS表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(4):806-809.

[5] REN C, BAO YR, MENG XS, et al. Comparison of the protective effects of ferulic acid and its drug-containing plasma on primary cultured neonatal rat cardiomyocytes with hypoxia/reoxygenation injury[J]. *Pharmacognosy Mag*,2013,9(35):202-209.

[6] 刘飞,付微,乔陆明,等. 快速建立心肌细胞缺氧/复氧损伤模型的方法[J]. 牡丹江医学院学报,2017,38(2):1-5.

[7] 韩富亮,袁春龙,郭安鹊,等. 二喹啉甲酸法(BCA)分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点[J]. 食品与发酵工业,2014,40(11):202-207.

[8] LUO D, YAO YY, LI YF, et al. Myocardial infarction quantification with late gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in rats using a 7-T scanner[J]. *Cardiovasc Pathol*,2012,21(2):112-119.

[9] 徐盟. 心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展[J]. 实用药物与临床,2014,17(8):1052-1056.

[10] WANG J, LI J. Activated protein C: a potential cardioprotective factor against ischemic injury during ischemia/reperfusion[J]. *Am J Transl Res*,2009,1(4):381-392.

[11] KUMAR D, JUGDUTT BI. Apoptosis and oxidants in the heart[J]. *J Lab Clin Med*,2003,142(5):288-297.

[12] 朱艳媚,陈志. 藏药八味沉香散对Na₂S₂O₄所致乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):251-253.

[13] 王璇,高玉霞,常红,等. 维生素C、E对血管内皮细胞氧化损伤保护作用[J]. 中国公共卫生,2009,25(2):193-195.

[14] 郭健,刘文,李延平,等. 氧自由基与心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国心血管杂志,2008,13(5):384-387.

[15] 仓宝成,宫璀璨,王莉,等. 维生素E在体内外具有抗氧化作用[J]. 基础医学与临床,2016,36(1):80-84.

[16] 罗小东. 氧自由基和心肌缺血再灌注损伤[J]. 陕西医学杂志,1995,24(5):295-297.

[17] 张萍,林敬明,李志梁,等. 复方丹参注射液对兔急性心肌梗塞细胞凋亡的影响[J]. 中药材,2001,24(7):502-504.

[18] 蒋有琴,刘剑,张冬颖. 京尼平对缺氧/复氧心肌细胞氧化应激损伤的影响[J]. 中国药理学杂志,2016,51(1):28-34.

[19] 张金艳,李澎,李贻奎,等. 丹皮酚、芍药苷及二者配伍对体外培养心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(4):510-514.

[20] 刘俊法,郝亚逢,李杨. 九龙藤总黄酮对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(3):325-329.

[21] 孙宇,陈建光. 细胞凋亡与心肌缺血再灌注损伤研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2009,10(1):34-45.

[22] OERLEMANS MI, KOUDESTAAL S, CHAMULEAU SA, et al. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection[J]. *Int J Cardiol*,2013,165(3):410-422.

[23] RENGARAJAN T, NANDAKUMAR N, RAJENDRAN P, et al. D-pinitol promotes apoptosis in MCF-7 cells via induction of p53 and Bax and inhibition of Bcl-2 and NF-kappaB[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2014,15(4):1757-1762.

[24] LIAO YH, XIA N, ZHOU SF, et al. Interleukin-17A con-

HPLC法同时测定蒙药复方协日嘎-4中5种有效成分的含量^Δ

白凤*,董玉#,李斌鑫,赵海龙(内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010059)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1964-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.21

摘要 目的:建立同时测定蒙药复方协日嘎-4中高良姜素、高良姜素-3-甲醚、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Elite C₁₈,流动相为0.5%磷酸-乙腈(梯度洗脱),流速为0.6 mL/min,检测波长为235 nm(高良姜素、高良姜素-3-甲醚)、420 nm(双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素),柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:高良姜素、高良姜素-3-甲醚、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素检测进样量线性范围分别为0.047 2~0.472 0 μg($r=0.999 9$)、0.104 0~1.040 0 μg($r=0.999 9$)、0.030 4~0.304 0 μg($r=0.999 9$)、0.039 2~0.392 0 μg($r=0.999 8$)、0.232 0~2.320 0 μg($r=0.999 7$);定量限分别为11.41、12.73、4.92、5.29、5.39 ng,检测限分别为3.41、3.72、1.46、1.59、1.62 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率分别为97.24%~102.93%(RSD=2.01%, $n=6$)、95.10%~101.50%(RSD=2.34%, $n=6$)、95.23%~97.61%(RSD=0.97%, $n=6$)、97.10%~100.65%(RSD=1.24%, $n=6$)、98.69%~101.15%(RSD=0.99%, $n=6$)。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于蒙药复方协日嘎-4中高良姜素、高良姜素-3-甲醚、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量的同时测定。

关键词 蒙药;复方协日嘎-4;高良姜素;高良姜素-3-甲醚;双去甲氧基姜黄素;去甲氧基姜黄素;姜黄素;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 5 Effective Components in Mongolian Medicine Xieriga-4 by HPLC

BAI Feng, DONG Yu, LI Binxin, ZHAO Hailong (College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of galangin, galangin-3-methyl ether, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin in mongolian medicine Xieriga-4. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Elite C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.5% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelengths were set at 235 nm (galangin, galangin-3-methyl ether) and 420 nm (bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin). The column temperature was set at 25 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of galangin, galangin-3-methyl ether, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin were 0.047 2-0.472 0 μg($r=0.999 9$), 0.104 0-1.040 0 μg($r=0.999 9$), 0.030 4-0.304 0 μg($r=0.999 9$), 0.039 2-0.392 0 μg($r=0.999 8$), 0.232 0-2.320 0 μg($r=0.999 7$), respectively. The limits of quantitation were 11.41, 12.73, 4.92, 5.29, 5.39 ng; the limits of detection were 3.41, 3.72, 1.46, 1.59, 1.62 ng, respectively, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3%. The recovery rates were 97.24%-102.93%(RSD=2.01%, $n=6$), 95.10%-101.50%(RSD=2.34%, $n=6$), 95.23%-97.61%(RSD=0.97%, $n=6$), 97.10%-100.65%(RSD=1.24%, $n=6$), 98.69%-101.15%(RSD=0.99%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for simultaneous determination of galangin, galangin-3-methyl ether, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin in mongolian medicine Xieriga-4.

KEYWORDS Mongolian medicine; Xieriga-4; Galangin; Galangin-3-methyl ether; Bisdemethoxycurcumin; Demethoxycurcumin; Curcumin; HPLC; Content determination

蒙药复方协日嘎-4是蒙医临床治疗泌尿系统感染的常用处方^[1],该处方收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》^[2]中,由姜黄、黄柏、栀子、蒺藜等4

味药材按配伍原则以5:3:4:5(质量比)组成,具有利尿、清泄湿热等功效,主要用于小便闭止、尿频、尿急、尿中带血、膀胱刺痛等症^[1]。从该复方中分离得到的姜黄

tributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regu-

^Δ 基金项目:内蒙古自治区科技计划项目

* 药师,硕士研究生。研究方向:中蒙药(复方)有效物质基础研究及药物创新。E-mail:2463924338@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中蒙药(复方)有效物质基础研究及药物创新。电话:0471-6653084。E-mail:dongyu010@126.com

lating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(4):420-429.

[25] 孟剑峰. 地黄多糖对H₂O₂诱导乳鼠心肌细胞损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(1):90-95.

(收稿日期:2018-01-13 修回日期:2018-05-13)

(编辑:张元媛)