

瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤H9c2心肌细胞的保护作用及其机制研究^Δ

楚冬海^{1*}, 张振秋^{2#} (1. 辽宁科技学院生物医药与化学工程学院, 辽宁 本溪 117004; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1072-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.12

摘要 目的:研究瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤H9c2心肌细胞的保护作用及其机制。方法:以采用连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)为化学缺氧剂,建立大鼠H9c2心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,筛选不同浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.625~10 mmol/L)和不同缺氧时间(10~60 min)、复氧时间(2~8 h)的造模条件,以及瓜蒌皮提取物给药浓度(12.5~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。将细胞分为正常组、模型组、瓜蒌皮提取物不同剂量组(即TPE低、中、高剂量组,25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和阳性对照组(槲皮素,25 $\mu\text{mol}/\text{L}$),加入相应药物进行预处理24 h后,再建立缺氧/复氧损伤模型。采用MTT法检测各组细胞存活率;采用酶联免疫吸附法检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;采用流式细胞术观察细胞凋亡情况;采用Western blotting法检测细胞中Bax、Bcl-2的蛋白表达水平。结果:心肌细胞缺氧/复氧损伤造模条件为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 造模浓度2.5 mmol/L,缺氧时间30 min,复氧时间4 h;12.5~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瓜蒌皮提取物对细胞均无毒性。分组处理后结果显示,与空白组比较,模型组细胞存活率显著降低、凋亡率显著升高,细胞中CK-MB、LDH、MDA水平均显著升高,SOD水平显著降低,Bax的蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值均显著升高,Bcl-2的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,瓜蒌皮提取物各剂量组细胞上述变化均被逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤心肌细胞具有一定的保护作用;其机制可能与抑制细胞中脂质过氧化物的增加,提高细胞清除活性氧自由基的能力、上调Bcl-2/下调Bax蛋白表达等,从而抑制细胞凋亡有关。

关键词 瓜蒌皮;连二亚硫酸钠;缺氧/复氧损伤;心肌细胞;机制

Study on Protective Effects of Pericarpium Trichosanthis Extract on H9c2 Myocardial Cells Injured by Hypoxia/Reoxygenation and Its Mechanism

CHU Donghai¹, ZHANG Zhenqiu² (1. School of Biomedical and Chemical Engineering, Liaoning Institute of Science and Technology, Liaoning Benxi 117004, China; 2. Pharmacy College, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of Pericarpium Trichosanthis extract (TPE) on H9c2 myocardial cells injured by hypoxia/reoxygenation (H/R). METHODS: H/R injury model of H9c2 myocardial cells was established by using sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) as chemical hypoxia agent. The modeling conditions of different concentrations of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.625-10 mmol/L) and different time of hypoxia (10-60 min) and reoxygenation (2-8 h), as well as the concentration of TPE (12.5-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were screened. The cultured H9c2 myocardial cells were randomly divided into normal group, model group, TPE different dose groups (TPE low-dose, medium-dose and high-dose groups, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and positive control group (quercetin, 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$). They were pre-treated with relevant medicine for 24 h, and then H/R injury model was established. Cell viability was measured by MTT assay. The levels of LDH, CK-MB, SOD and MDA in cells were tested by ELISA. Apoptosis of H9c2 myocardial cells were observed by flow cytometry. Western blotting was used to detect the protein expression of Bax and Bcl-2 in cells. RESULTS: The condition of H/R injury modeling included modeling concentration of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 2.5 mmol/L, hypoxia time 30 min, reoxygenation time 4 h. 12.5-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPE showed no toxicity to H9c2 myocardial cells. After treatment, compared with blank group, survival rate and apoptotic rate of H9c2 myocardial cells in model group were increased significantly; the levels of CK-MB, LDH and MDA were increased significantly, while SOD level was decreased significantly; protein expression of Bax and Bax/Bcl-2 ratio were increased significantly, while that of Bcl-2 was decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group,

^Δ 基金项目:辽宁省科学技术计划项目(No.20180551223);辽宁省教育厅科学技术研究项目(No.L2017kyfwdf-05);辽宁省大学生创新创业训练项目(No.201811430070)

* 讲师,博士研究生。研究方向:天然药物化学。电话:024-45861231。E-mail:chubotany@sina.cn

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药质量标准规范化。电话:0411-85890199。E-mail:zhangzhenqiu@sina.com

above changes of H9c2 myocardial cells were reversed in all dose groups of TPE ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: TPE can protect H9c2 myocardial cells against H/R injury. Its mechanism may be associated with inhibiting the increase of lipid peroxide, improving the ability of scavenging reactive oxygen free radicals, up-regulating the protein expression of Bcl-2 or down-regulating protein expression of Bax, so as to

inhibit the cell apoptosis.

KEYWORDS Pericarpium Trichosanthis; Sodium hydrosulfite; Hypoxia/reoxygenation injury; Myocardial cells; Mechanism

冠心病是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病^[1];其症状之一是心绞痛,即主要由心肌缺血、缺氧引起的发作性胸痛或胸部不适^[1-2]。《中国心血管病报告2017》指出,冠心病占我国城乡居民死亡因素的第3位,预计到2030年,其有可能成为人类死亡的首位原因,严重危害人类的健康^[3]。因此,临床上亟需有效的冠心病防治药物。

瓜蒌皮为葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)或双边栝楼(*Trichosanthes rosthornii* Harms)的干燥成熟果皮,具有清热化痰、利气宽胸的功效,可用于治疗痰热咳嗽、胸闷胁痛^[4]。现代药理学研究表明,瓜蒌皮具有抗心脑血管疾病、抗肿瘤、抗菌、抗氧化及抗溃疡等作用^[5-6]。本研究以连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)作为化学缺氧剂建立大鼠H9c2心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,探讨瓜蒌皮提取物对心肌细胞的保护作用及其可能的机制,为瓜蒌皮的药效物质基础研究及开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

HERAcell 150i型 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MR18.22型超速低温离心机(法国 Jouan 公司);CP225D型微量电子天平(德国 Sartorius 公司);Infinite M200型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);FACSVerse型流式细胞仪(美国 BD 公司);JY200C型电泳仪(北京君意电泳设备有限公司);Tanon-5200型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 药材、药品及试剂

瓜蒌皮药材收集于河北省安国市,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)的干燥成熟果皮;槲皮素对照品[中国药品生物制品检定所,批号:00081-200907,纯度(高效液相色谱法): $\geq 98\%$]; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (美国百灵威科技有限公司,纯度:85%);乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(上海联硕科技有限公司,批号均为201804);兔抗大鼠Bax抗体、兔抗大鼠Bcl-2抗体、GAPDH抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号均为BC18AA0047);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(二抗)、牛血清白蛋白(BSA)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为B0802、P2300);MTT、Annexin V-FITC/PI试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白

酶(美国 Gibco 公司);1%青霉素-链霉素双抗、磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)(美国 Hyclone 公司);细胞裂解液、动物全蛋白提取试剂盒、动物全蛋白提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];PVDF膜(美国 Merck Millipore 公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL化学发光试剂盒等(上海碧云天生物技术有限公司);水为超纯水。

1.3 细胞

大鼠子一代H9c2心肌细胞,购于上海子实生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药材提取及溶液配制

2.1.1 瓜蒌皮提取物的制备与溶液配制 称取干燥瓜蒌皮粉末100 g,加水1 000 mL浸泡30 min,煎煮2 h,8层纱布过滤^[7-8];滤渣同法重复提取2次,过滤,合并滤液,减压浓缩至100 mL,再经真空冷冻干燥,即得瓜蒌皮提取物(得率为19.5%),于4℃保存、备用。精密称取瓜蒌皮提取物20.0 mg,以DMEM高糖培养基(以下简称“培养基”)溶解制成2.0 mg/mL的贮备液,经0.22 μm滤器滤过除菌,于4℃保存。后续试验时以培养基将其稀释至相应浓度。

2.1.2 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液的配制 精密称取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 30.72 mg,以PBS溶解制成10 mmol/L的贮备液,现用现配。后续试验时以PBS将其稀释至相应浓度,避光使用。

2.1.3 槲皮素溶液的配制 精密称取槲皮素对照品3.0 mg,加入DMSO 5 μL溶解,再加入培养基稀释制成2.5 mmol/L的贮备液,经0.22 μm滤器滤过除菌,于4℃保存。后续试验时以培养基将其稀释至相应浓度。

2.1.4 MTT溶液的配制 取MTT 0.5 g,加入PBS溶解制成5 mg/mL的贮备液,经0.22 μm滤器滤过除菌,于4℃避光保存。后续试验时以培养基将其稀释至相应浓度。

2.2 细胞培养

取H9c2心肌细胞,用含10%FBS、1%双抗的DMEM高糖培养基(以下简称“完全培养液”)于37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养(以下培养条件相同),适时换液。当细胞覆盖率达到80%以上时,即可进行传代。传代至第5代时,取对数生长期细胞进行试验。在每次试验前,吸弃原培养液,换用含0.5%FBS、1%双抗的培养基“饥饿”细胞12 h,进行同步化处理^[9]。

2.3 造模浓度及给药浓度的筛选

2.3.1 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 造模浓度及缺氧、复氧时间筛选 取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板,每孔100 μL,培养24 h。吸弃培养液,用PBS洗涤细胞1~2次。将细胞分为正常组和模型组,正常组加入培养液,

模型组分别加入不同浓度的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液(终浓度为0.625、1.25、2.5、5、10 mmol/L),每孔100 μL ,分别培养10、20、30、40、60 min使细胞缺氧。吸弃含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的培养液,换新鲜完全培养液后于细胞培养箱内分别培养4、8 h使细胞复氧^[10-11]。培养结束后,加入5 mg/mL MTT溶液20 μL ,继续培养4 h;吸弃培养液,加入DMSO 150 μL ,涡旋振荡10 min使结晶充分溶解;用酶标仪在570 nm波长处测定吸光度(A)。另设空白组,除不加入细胞、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 外,其余操作相同。每组设6个复孔。根据下公式计算细胞存活率:细胞存活率=($A_{\text{模型组}} - A_{\text{空白组}}$)/($A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}$) $\times 100\%$ 。试验重复3次。

2.3.2 瓜蒌皮提取物给药浓度筛选 按“2.3.1”项下方法接种并培养细胞,分为正常组、阳性对照组和瓜蒌皮提取物组,分别加入培养液、槲皮素溶液(终浓度为25 $\mu\text{mol/L}$)和瓜蒌皮提取物溶液(终质量浓度为12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$),培养24 h。每组设6个复孔。按“2.3.1”项下“每孔细胞加入5 mg/mL MTT溶液20 μL ……”开始操作,以MTT法检测并计算细胞存活率:细胞存活率=($A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}$)/($A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}$) $\times 100\%$ 。试验重复3次。

2.4 细胞分组、给药预处理及造模

取对数生长期细胞,以PBS洗涤1~2次,随机分为正常组,模型组,瓜蒌皮提取物不同剂量组(即TPE低、中、高剂量组)和阳性对照组。正常组和模型组均加入完全培养液,TPE各剂量组分别加入瓜蒌皮提取物溶液(终质量浓度为25、50、100 $\mu\text{g/mL}$),阳性对照组加入槲皮素溶液(终浓度为25 $\mu\text{mol/L}$),培养24 h进行预处理。预处理结束后,吸弃培养液,除正常组外,其余各组均加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液(终浓度为2.5 mmol/L)培养30 min使细胞缺氧;吸弃含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 培养液,换新鲜的完全培养液后培养4 h,使细胞复氧。

2.5 各组细胞活力考察

取对数生长期的心肌细胞,以 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板,每孔100 μL ,按“2.4”项下方法进行分组、给药预处理及造模。每组设6个复孔。复氧后,参照“2.3.2”项下MTT法检测并计算细胞存活率,用来考察细胞活力。试验重复3次。

2.6 各组细胞凋亡情况检测

采用流式细胞术检测细胞凋亡情况^[12]。取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL的密度接种于6孔板,每孔1.5 mL。按“2.4”项下方法进行分组、给药预处理及造模。每组设6个复孔。复氧后,以0.25%胰蛋白酶(不含0.02% EDTA)消化处理细胞,PBS洗涤2次,以 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬并调整细胞密度至 1×10^6 个/mL。取细胞悬液100 μL 至流式上样管,加入Annexin V-FITC 5 μL ,轻轻摇匀,室温下避光孵育5 min;再加入碘化丙啶5 μL ,室温下避光孵育5 min;加PBS至500 μL ,摇匀,在1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。试验重复3次。

2.7 各组细胞中LDH、CK-MB、SOD、MDA水平检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测^[13]。取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL的密度接种于24孔板,每孔0.5 mL。按“2.4”项下方法进行分组、给药预处理及造模。每组设6个复孔。复氧后,按照相应试剂盒说明书,分别检测细胞上清液中LDH、CK-MB、SOD、MDA水平。试验重复3次。

2.8 各组细胞中Bax、Bcl-2的蛋白表达水平检测

采用Western blotting法检测^[14]。取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL的密度接种于6孔板,每孔1.5 mL。按“2.4”项下方法分组、给药预处理及造模。每组设6个复孔。复氧后,采用动物全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白并用BCA法进行蛋白定量。取蛋白24 μg ,经SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜上,用5% BSA封闭30 min后,分别加入Bax抗体、Bcl-2抗体、内参GAPDH抗体(1:5 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 静置12 h;TBST洗涤2次,加入二抗(1:10 000),室温摇床孵育2 h;采用ECL试剂盒曝光显色,以凝胶成像系统采集图像,以Image J 1.46r软件分析目的蛋白条带的相对灰度值,用来表示其表达水平。试验重复3次。

2.9 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态性及方差齐性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 5.0软件绘制柱形图;多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 造模浓度的筛选结果

结果显示,细胞活力随 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 浓度升高和缺氧时间增加而降低;复氧时间超过4 h后,细胞活力降低,存活率显著下降。综合考虑后,确定细胞缺氧/复氧损伤造模条件为: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 造模浓度为2.5 mmol/L,缺氧时间为30 min,复氧时间为4 h。不同浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 及不同缺氧、复氧时间条件下细胞存活率见图1。

3.2 瓜蒌皮提取物给药浓度的筛选结果

结果显示,12.5~400 $\mu\text{g/mL}$ 的瓜蒌皮提取物处理24 h,细胞存活率均大于85%,无明显毒性作用;其中,50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的瓜蒌皮提取物对细胞的增殖具有一定促进作用[细胞存活率分别为(104.8 \pm 1.1)%、(105.3 \pm 1.7)%],因此后续试验选择25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为低、中、高剂量。不同质量浓度瓜蒌皮提取物作用24 h时细胞存活率见图2。

3.3 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞活力的影响

分组处理后结果显示,与正常组比较,模型组细胞存活率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TPE各剂量和阳性对照组细胞存活率均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞存活率检测结果见图3。

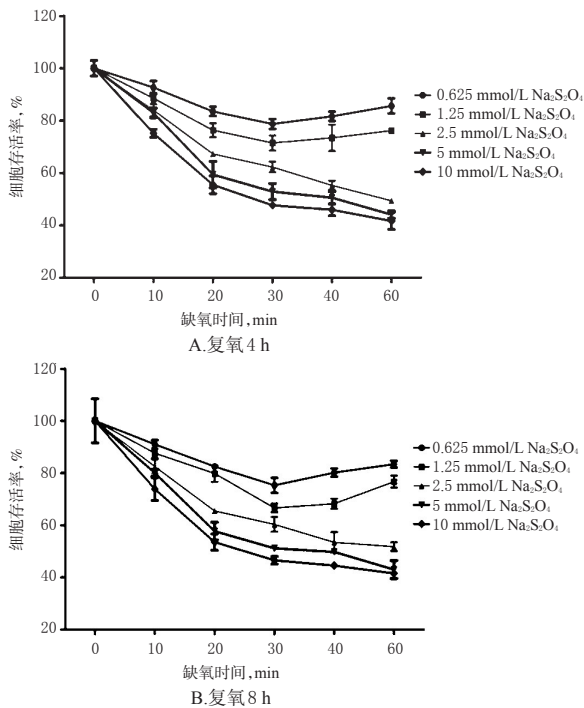


图1 不同浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 及不同缺氧、复氧时间条件下细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 1 Survival rate of treated with different concentrations of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ under different hypoxia/reoxygenation time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

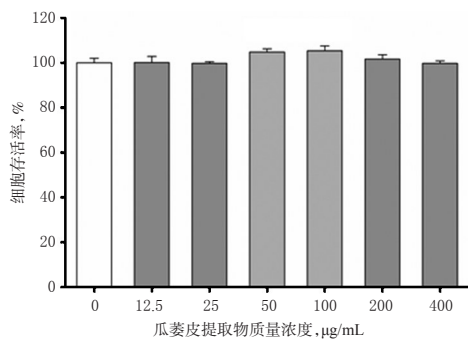


图2 不同质量浓度瓜蒌皮提取物作用24 h时细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=3$)

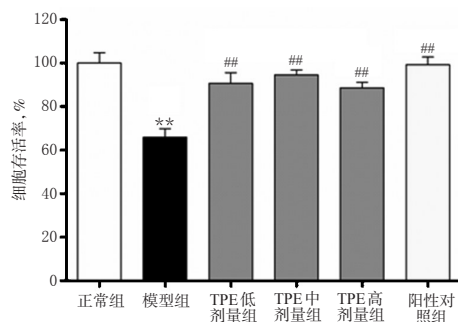
Fig 2 Survival rate of cells after treated with different concentrations of TPE for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞凋亡的影响

分组处理后结果显示,与正常组比较,模型组细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TPE各剂量和阳性对照组细胞凋亡率均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞的流式细胞图见图4,凋亡率检测结果见图5。

3.5 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞中LDH、CK-MB水平的影响

分组处理后结果显示,与正常组比较,模型组细胞中LDH、CK-MB水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TPE各剂量和阳性对照组细胞中LDH、CK-MB水平均显著降低,差异均有统计学意义



注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$

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

图3 各组细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 3 Survival rate of myocardial cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

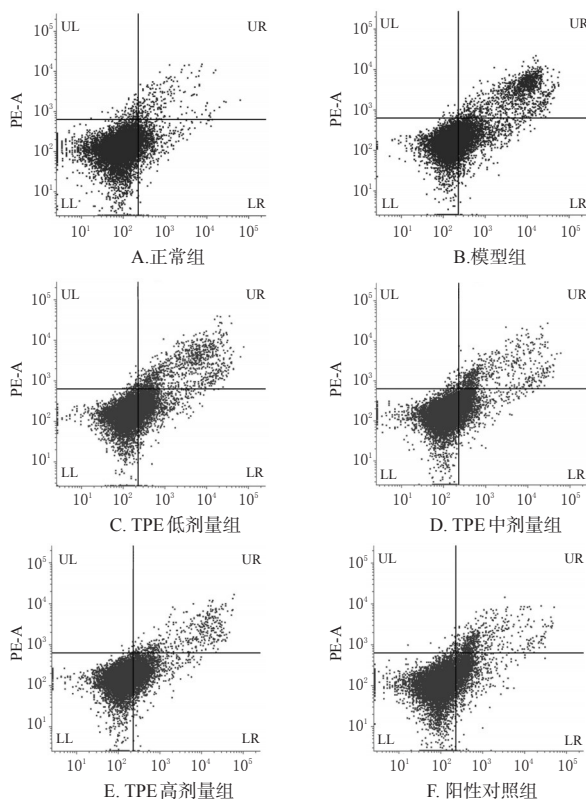
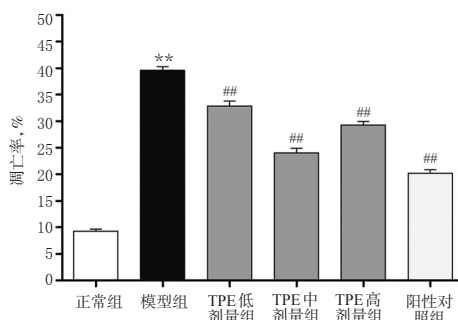


图4 各组细胞的流式细胞图

Fig 4 Flow cytogram of cells in each group



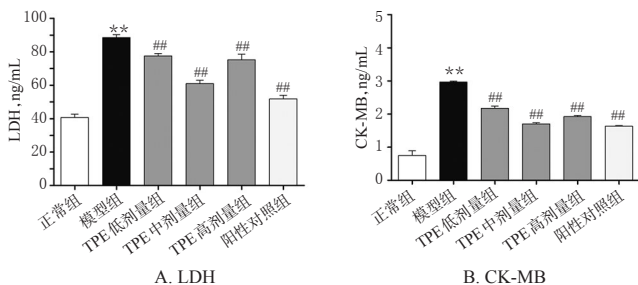
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$

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

图5 各组细胞凋亡率检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 5 Apoptosis rate of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

义($P<0.01$)。各组细胞中LDH、CK-MB水平检测结果见图6。



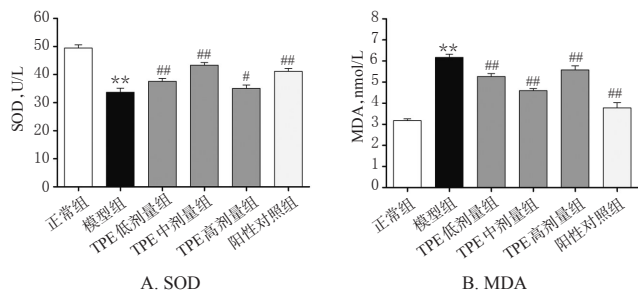
注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$
 Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, ## $P<0.01$

图6 各组细胞中LDH、CK-MB水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 6 LDH and CK-MB levels of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞中SOD、MDA水平的影响

分组处理后结果显示,与正常组比较,模型组细胞中SOD水平显著降低、MDA水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,TPE各剂量和阳性对照组细胞中SOD水平均显著升高,MDA水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞中SOD、MDA水平检测结果见图7。



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$
 Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图7 各组细胞中SOD、MDA水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 7 SOD and MDA levels of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

分组处理后结果显示,与正常组比较,模型组细胞的Bcl-2的蛋白表达水平显著降低,Bax的蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,TPE各剂量和阳性对照组细胞中Bcl-2的蛋白表达水平均显著升高,Bax的蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组细胞中Bcl-2、Bax的蛋白电泳图见图8,蛋白表达水平检测结果见图9。

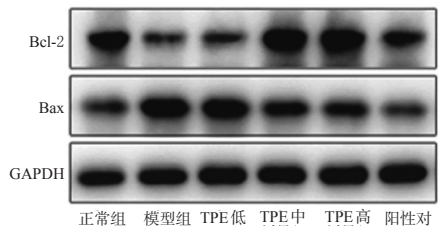
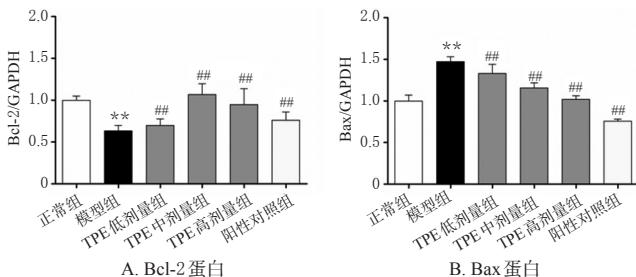


图8 各组细胞中Bcl-2、Bax蛋白电泳图

Fig 8 Electropherogram of Bcl-2 and Bax in cells of each group



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$
 Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, ## $P<0.01$

图9 各组细胞中Bcl-2、Bax的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 9 Protein expression levels of Bcl-2 and Bax in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

心肌缺血、缺氧可导致心肌代谢功能异常和结构破坏,从而引发胸痛或胸部不适,属中医“胸痹”“真心痛”的范畴^[1]。临床上主要采用药物治疗法、经皮冠状动脉介入治疗及冠状动脉旁路移植术等进行治疗,但在心肌血流恢复的同时,由于氧自由基大量产生,导致心肌凋亡通路激活,可能会加重心肌细胞结构及功能的损伤,即心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)^[2,15]。诱发MI/RI的原因较复杂,涉及氧化应激、细胞凋亡、钙超载和能量代谢等^[16],故目前尚未发现安全有效的治疗方法。因此,寻找有效的药物来预防和治疗心肌缺血性疾病有着重要的意义。

瓜蒌皮富含黄酮、多糖、氨基酸及蛋白质等多种化学成分,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及提升免疫力等作用,能够多靶点地整体协同发挥作用,在治疗冠心病方面具有一定优势^[17-18]。研究证实,黄酮类化合物槲皮素能够预防冠心病、高血压、糖尿病及多种肿瘤的发生,并且具有抗菌、抗病毒活性^[19]。因此,本研究选用槲皮素作为阳性对照药物。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的耗氧能力与其浓度呈正相关,其耗氧反应过程为: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ ^[20]。研究报道,以2 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液处理可使细胞保持无氧状态达1 h,且未造成细胞膜损伤,可用于制造细胞的缺氧液相环境;缺氧结束后更换培养液,则可恢复细胞正常供氧,实现复氧^[21]。因此,本研究采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 为化学耗氧剂诱导心肌细胞缺氧再复氧。经造模浓度及作用时间的筛选试验后发现,随着 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 浓度增大及缺氧时间的延长,细胞活力逐渐降低; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 浓度及缺氧时间一定时,细胞存活率随复氧时间的延长而下降;当缺氧时间为20~40 min、复氧时间为8 h时,细胞存活率下降趋势更加明显。经过多次重复试验并结合 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 实际应用情况^[22],本研究选择2.5 mmol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 进行缺氧30 min、复氧4 h处理,以建立H9c2心肌细胞缺氧/复氧损伤模型。

筛选瓜蒌皮提取物预处理浓度的结果显示,12.5~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 瓜蒌皮提取物预处理24 h对心肌细胞均无明显毒性作用。经25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瓜蒌皮提取物预处理后,细胞的存活率均大于85%。

CK-MB和LDH是两种重要的心肌酶,其水平高低即释放量的多少可反映细胞的受损情况^[17]。本研究结果显示,缺氧/复氧处理后细胞中CK-MB、LDH水平均显著上升;而经瓜蒌皮提取物预处理可使其水平显著降低,表明该提取物能减轻细胞缺氧/复氧损伤。

细胞缺氧后,细胞能量代谢紊乱,使细胞膜的通透性发生改变;复氧时,活性氧自由基大量生成并堆积,造成细胞膜脂质过氧化、细胞膜通透性升高,导致细胞损伤^[18]。MDA是氧自由基攻击生物膜不饱和脂肪酸的过氧化产物,其含量可间接反映细胞受氧自由基损害的程度;SOD作为广泛存在于生物体的内源性抗氧化酶,具有抗氧化、抗炎及抗衰老作用,其活性水平可反映机体清除氧自由基的能力,并间接反映机体保护氧化应激损伤细胞的能力^[17]。本研究结果显示,缺氧/复氧造模后细胞中MDA水平显著升高,SOD水平显著降低;而经瓜蒌皮提取物预处理可使MDA水平显著下降,SOD水平显著上升。这表明瓜蒌皮提取物能提高细胞清除活性氧自由基的能力,降低细胞膜脂质过氧化程度,从而减轻细胞缺氧/复氧损伤。

细胞凋亡是心肌细胞缺氧/复氧损伤的重要指标之一,其受到多种蛋白分子的调节,包括促凋亡蛋白(如Bax、Bad等)和抗凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-xl等)。Bcl-2可通过减少细胞内活性氧自由基产生、降低细胞氧化应激损伤、减少钙超载等抑制细胞凋亡;Bax则具有相反的功能^[23]。有学者提出,Bax/Bcl-2是调控细胞凋亡的“开关”,二者比值的升高/降低标志着细胞凋亡过程的激活/抑制^[23]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组细胞中Bax的蛋白表达水平及Bax/Bcl-2比值均显著升高,Bcl-2的蛋白表达水平均显著降低,细胞存活率显著降

低、凋亡率显著升高;而上述变化可被瓜蒌皮提取物逆转。这表明瓜蒌皮提取物减轻细胞缺氧/复氧损伤的作用可能与其抑制细胞凋亡相关。

在上述指标的测定结果中,笔者发现中剂量瓜蒌皮提取物(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对缺氧/复氧损伤细胞的保护作用最强,其对各项指标的改善作用较之于高剂量(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)更明显。考虑到本研究采用的瓜蒌皮提取物属于混合物,没有经过分离纯化,其含有的化学成分类型比较复杂,中剂量提取物中含有的特征化学成分可能针对缺氧/复氧损伤模型细胞发挥了最大的药物保护作用,而高剂量提取物可能由于某些化学成分含量过高而引发负反馈作用,导致其保护效果下降。因此,在后续研究中拟进一步分离纯化并确证瓜蒌皮提取物中的具体成分,以确定其药效物质基础。

综上所述,瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤细胞具有一定的保护作用。该作用可能通过抑制细胞中脂质过氧化物的增加、提高其清除活性氧自由基的能力、上调Bcl-2/下调Bax蛋白表达等机制,从而抑制心肌细胞凋亡。瓜蒌皮中的具体功效物质基础是下一步的研究重点。

参考文献

- [1] 高润霖,陈在嘉.冠心病[M].北京:人民卫生出版社,2002:1-2.
- [2] 张幼怡,吴立玲.心血管病理生理学[M].北京:北京大学医学出版社,2009:1-3.
- [3] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:114.
- [5] 王姗姗.瓜蒌皮的药理作用及其临床应用[J].山西医药杂志,2009,38(1):67-68.
- [6] 杨丽,杨玲.瓜蒌皮对冠心病的药理作用及其机制研究[J].临床医药文献电子杂志,2016,3(37):7495-7496.
- [7] 陈昌喆,段磊,王贤,等.瓜蒌皮提取液对大鼠缺血心肌的保护作用[J].中国老年学杂志,2014,34(23):6723-6725.
- [8] 单红燕,高兆慧,伏瑶,等.瓜蒌皮不同提取物干预急性心肌缺血的药效学研究[J].山东中医杂志,2017,36(5):414-418.
- [9] 操全霞,丁岳东. α -硫辛酸对H9c2心肌细胞低氧及低氧/复氧损伤的保护作用及其机制探讨[J].安徽医科大学学报,2015,50(7):1024-1028.
- [10] 许蜀闽,王培勇,马红英.连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J].第三军医大学学报,2005,27(4):359-360.
- [11] ZHANG XQ, EYZAGUIRRE C. Effects of hypoxia induced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ on intracellular calcium and resting potential of mouse glomus cells[J]. *Brain Res*, 1999, 818(1):118-126.
- [12] WANG J, JI SY, LIU SZ, et al. Cardioprotective effect of breviscapine: inhibition of apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the PI3K/Akt/eNOS pathway following simula-

辣椒药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析^Δ

冯 华^{1*},王祥培²,王世俊¹,郑凤雅¹,张 强¹(1.遵义市食品药品检验所中药室,贵州遵义 563002;2.贵阳中医学院药学院,贵阳 550002)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1078-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.13

摘要 目的:建立辣椒药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析。方法:采用HPLC法。色谱柱为Agilent C₁₈,流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为235 nm,柱温为30 ℃,进样量为15 μL。以辣椒素峰为参照,绘制15批药材样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行相似度评价,确定共有峰,并采用SPSS 19.0软件进行聚类分析和主成分分析。结果:15批药材样品的HPLC图谱相似度均在0.95以上;有12个共有峰,并指认了辣椒素峰;聚类分析结果显示,15批药材样品可聚为3类,S1、S3~S5、S7、S9~S13聚为一类,S2、S14、S15聚为一类,S6、S8聚为一类。经主成分分析,4个主成分因子的累积方差贡献率为94.093%,以S5药材样品的主成分因子综合得分最高、整体质量最好。结论:所建HPLC指纹图谱及聚类分析和主成分分析结果可为辣椒药材的质量控制提供参考。

关键词 辣椒;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析;主成分分析

Establishment of HPLC Fingerprint, Cluster Analysis and Principal Component Analysis of *Capsicum annuum*

FENG Hua¹, WANG Xiangpei², WANG Shijun¹, ZHENG Huangya¹, ZHANG Qiang¹ (1. TCM Section, Zunyi Institute for Food & Drug Control, Guizhou Zunyi 563002, China; 2. School of Pharmacy, Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Capsicum annuum*, and to conduct cluster analysis and principal component analysis. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 235 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 15 μL. Using capsaicin peak as reference, HPLC fingerprints of 15 batches of *C. annuum* from different production areas were determined. The similarity evaluation of

- ted ischemia/reperfusion injury[J]. *Pharmazie*, 2015, 70 (9):593-597.
- [13] 芦丽莉,王冬梅.瓜蒌皮提取液对实验性高血脂血症大鼠血清NO, SOD, MDA的影响[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2008, 9(5):423-425.
- [14] LIAO P, SUN G, ZHANG C, et al. Bauhinia championii flavone attenuates hypoxia-reoxygenation induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by improving mitochondrial dysfunction[J]. *Molecules*, 2016, 21(11):1469-1480.
- [15] 李立美,智光.心血管病理生理学[M].5版.北京:人民军医出版社,2013:122-144.
- [16] 郑显杰,庞力智,寇俊萍,等.中药抗心肌缺血再灌注损伤的信号通路研究进展[J]. *药学进展*, 2015, 39(6):425-436.
- [17] 高兆慧.瓜蒌皮干预大鼠急性心肌缺血药效学研究[D]. 济南:山东中医药大学,2015.
- [18] 孙娟.瓜蒌皮干预急性心肌梗死的药效与机制研究[D]. 济南:山东中医药大学,2013.
- [19] 汤蕾.槲皮素抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[D].南昌:南昌大学,2013.
- [20] 李小兰,方方,朱伟飞.不同状态下连二亚硫酸钠的稳定性研究[J]. *纺织科技进展*, 2014, 40(2):71-73.
- [21] YU MF, GORENNE I, SU X, et al. Sodium hydrosulfite contractions of smooth muscle are calcium and myosin phosphorylation independent[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275 (5 Pt 1):L976-L982.
- [22] 石瑞丽,胡金凤,孔令雷,等.瓜子皂苷己对连二亚硫酸钠致氧糖剥夺/复供诱导PC12细胞凋亡的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(3):333-336.
- [23] DEL PG, VENDITTI A, DEL PM, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Blood*, 2003, 101(6):2125-2131.

^Δ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2018]5744号);遵义市创新人才团队培养项目(No.遵市科合[2016]7号)

* 副主任药师,硕士。研究方向:药品检验、新药研究。电话:0851-28928059。E-mail:fenghua781014@163.com

(收稿日期:2018-11-04 修回日期:2019-03-11)

(编辑:段思怡)