

不同配比人参总皂苷、丹皮总苷、丹皮酚含药血清对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的改善作用研究[△]

张留记^{1,2*}, 王建霞², 李开言¹, 屠万倩¹(1.河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2.河南中医药大学药学院, 郑州 450008)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1209-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.12

摘要 目的:研究不同配比的人参总皂苷(TGG)、丹皮总苷(TGM)、丹皮酚含药血清对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的改善作用,筛选最优配比并探讨其作用机制。方法:将大鼠随机分为空白组(蒸馏水)、TGG组(TGG, 2.025 g/kg)、TGM组(TGM, 4.05 g/kg)、丹皮酚组(丹皮酚, 1.08 g/kg),每组12只,每天灌胃相应药物2次,连续7 d,末次给药后1 h,腹主动脉取血,制备含药血清。以HUVEC细胞存活率为评价指标,人参总皂苷、丹皮总苷、丹皮酚含药血清不同配比为考察因素设计L₉(3⁴)正交试验,优选3种含药血清的最优配比;将HUVEC细胞分为空白组、模型组、TGG组、TGM组、丹皮酚组、最优配比组,除空白组细胞加入相应培养基外,其余各组均采用1.2 mmol/L H₂O₂诱导HUVEC损伤,然后TGG组(含药血清体积分数为0.000 5%)、TGM组(含药血清体积分数为0.000 5%)、丹皮酚组(含药血清体积分数为1%)、最优配比组再加入相应药物含药血清进行干预。采用微板法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)、内皮素1(ET-1)的水平。结果:含药血清最优配比为TGG 0.000 5%、TGM 0.000 5%、丹皮酚1%。与空白组比较,模型组细胞LDH、ET-1水平更高(P<0.01),NO水平更低(P<0.05);与模型组比较,TGG、TGM、最优配比组细胞NO水平更高(P<0.01),LDH、ET-1水平更低(P<0.05或P<0.01);与TGG组、TGM组、丹皮酚组比较,最优配比组细胞LDH水平更低(P<0.05或P<0.01),NO水平更高(P<0.05或P<0.01)。结论:TGG、TGM、丹皮酚联合应用对H₂O₂诱导的HUVEC损伤具有良好的改善作用,其作用机制与降低LDH、ET-1水平和升高NO水平有关。

关键词 人参总皂苷;丹皮总苷;丹皮酚;联合应用;含药血清;配比;人脐静脉内皮细胞

Study on Improvement Effects of Different Proportions of Total Ginsenoside of Ginseng, Total Glucosides of Moutan Cortex and Paeonol Containing Serum on HUVEC Injury Induced by H₂O₂

ZHANG Liuji^{1,2}, WANG Jianxia², LI Kaiyan¹, TU Wanqian¹(1.Henan Provincial Academy of TCM, Zhengzhou 450004, China; 2.College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effects of different proportions of total glucosides of ginseng (TGG), total

- [8] 史会齐,白雁,谢彩侠,等.近红外光谱法快速测定六味地黄丸中水分含量[J].实验室研究与探索,2011,30(5):38-41.
- [9] 宋丽丽,徐晓杰,范丙义,等.近红外光谱法测定六味地黄丸中丹皮酚[J].中草药,2005,36(8):58-61.
- [10] 陈斌,李军会,臧鹏,等.近红外光谱法快速检测六味地黄丸中的定量指标[J].时珍国医国药,2010,21(5):1064-1066.
- [11] 裴玲,茅向军.六味地黄胶囊的质量标准研究[J].中国民族民间医药,2016,25(16):29-32.
- [12] 徐灿辉,何维为,何云飞. HPLC法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚[J].药物评价研究,2014,37(3):257-259.
- [13] 刘毅,金传山,许甜甜.高效液相色谱法测定山茱萸中熊果酸与齐墩果酸的含量[J].安徽中医学院学报,2013,32(3):85-87.
- [14] 金德庄,张聪.不同产地山茱萸中熊果酸与齐墩果酸含量研究[J].中国药业,2010,19(14):34-35.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:104.
- [16] 丁银花,毕宇安,曹燕飞,等. AOTF近红外光谱技术快速测定茯苓中的水分[J].药学与临床研究,2014,22(3):209-211.
- [17] 任绪华,苏婷,姜文月,等.声光可调-近红外漫反射光谱法快速评价黄芪药材质量[J].中国药房,2018,29(2):168-171.
- [18] 黄丽苹,时桂芹,陈利平,等.芍药苷提取方法及药理作用研究进展[J].农产品加工,2018(1):71-75.

△基金项目:河南省科技创新人才计划项目(No.144200510019);河南省中医药科学研究专项课题(No.2016ZY1003)

*研究员,博士。研究方向:中药质量评价及中药新药开发。电话:0371-66331598。E-mail:zlj666671@163.com

(收稿日期:2018-11-23 修回日期:2019-02-28)

(编辑:林 静)

glucosides of moutan cortex (TGM) and paeonol containing serum on the injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injury induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), screen the optimal proportion and investigate its mechanism. METHODS: The rats were randomly divided into blank group (distilled water), TGG group (TGG, 2.025 g/kg), TGM group (TGM, 4.05 g/kg) and paeonol group (paeonol, 1.08 g/kg), with 12 rats in each group. They were given relevant medicine twice a day for consecutive 7 days. 1 h after last medication, the blood samples were collected via abdominal aorta to prepare drug containing serum. Using survival rate of HUVEC as evaluation indexes, different proportions of TGG, TGM and paeonol containing serum as factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was designed to optimize the optimal proportion of 3 kinds of drug containing serum. HUVEC were divided into blank group, model group, TGG group, TGM group, paeonol group and optimal proportion group. Except that blank group were treated with relevant medium, other group were treated with 1.2 mmol/L H_2O_2 to induce HUVEC injury, and then TGG group (volume fraction of drug containing serum was 0.000 5%), TGM group (volume fraction of drug containing serum was 0.000 5%), paeonol group (volume fraction of drug containing serum was 1%) and optimal proportion group were intervened with drug containing serum. The levels of LDH, NO and ET-1 in cells were detected by microplate method and ELISA. RESULTS: The optimal proportion of drug containing serum were TGG 0.000 5%, TGM 0.000 5% and paeonol 1%. Compared with blank group, the levels of LDH and ET-1 were higher in model group ($P<0.01$), while NO level was lower ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of NO were higher in TGG group, TGM group and optimal proportion group ($P<0.01$), while the levels of LDH and ET-1 were lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with TGG group, TGM group and paeonol group, the level of LDH was lower in optimal proportion group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the level of NO was higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: TGG and TGM combined with paeonol can significantly improve HUVEC injury induced by H_2O_2 , and the mechanism of which may be associated with the decrease of LDH and ET-1 and the increase of NO.

KEYWORDS Total glucosides of ginseng; Total glucosides of moutan cortex; Paeonol; Combined use; Drug containing serum; Proportion; Human umbilical vein endothelial cell

心肌缺血(Myocardial ischemia)是指心脏的血液灌注减少,导致心脏的供氧减少,心肌能量代谢异常,不能维持心脏正常工作的一种病理状态。心肌缺血是多种心脏疾病的初始阶段,其发病率和病死率随着我国人口老龄化进程的加剧而呈逐年上升的趋势,严重影响人类的身体健康和生活质量^[1]。

人参为五加科植物人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.)的干燥根和根茎。人参皂苷类成分是人参的主要有效成分,具有抗心肌缺血的作用,其机制可能通过减少心肌耗氧,减慢心率,增强心肌收缩力等,保护心肌组织^[2]。牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的干燥根皮。丹皮总苷和丹皮酚是牡丹皮中的主要有效物质,芍药苷又是丹皮总苷中含量最高的化合物^[3]。相关研究发现,丹皮总苷和丹皮酚具有抗缺血再灌注性损伤的作用^[4-8]。人参大补元气、复脉固脱,牡丹皮活血化瘀、清热凉血,二者配伍,标本兼治、通补结合,具有益气通络、活血化瘀的作用^[9]。本课题组前期研究也发现,人参、牡丹皮功效部位提取物配伍使用具有抗脑水肿、缩小脑梗死面积、抗血栓和改善血流变等活性,其作用强度优于人参总皂苷(TGG)、丹皮总苷(TGM)和丹皮酚单独使用^[10]。因此,笔者推测人参、牡丹皮功效部位提取物可能具有抗心血管疾病的作用。

血管内皮细胞是介于血流和血管壁组织之间的一层单核细胞,内皮受损后,血液中增加的脂质会通过受损的内皮进入到血管壁,沉积于血管内皮下,使血管内

皮增厚、变硬,血管的弹性变差,在外界因素的刺激下容易出现血管痉挛,影响血液供应,导致心肌缺血缺氧的发生,引发心血管疾病^[11-13]。本文通过 H_2O_2 诱导建立人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤模型,灌胃给药大鼠制备TGG、TGM、丹皮酚的含药血清,研究不同配比人参总皂苷、丹皮总苷、丹皮酚含药血清对 H_2O_2 诱导的HUVEC损伤的改善作用,筛选最优配比并探究其抗心肌缺血的可能作用机制。

1 材料

1.1 仪器

ELX800 多功能酶标仪(美国 Bio-tek 公司); HF160W CO_2 培养箱(上海力申科学仪器有限公司); CKX53 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 2K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 药品与试剂

人参(批号:160711)、牡丹皮(批号:160402)均购自河南千方药业有限公司,经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定为真品;MTT(美国 Amresco 公司,批号:6041053);二甲基亚砜(DMSO,天津市风船化学试剂有限公司,批号:20170515); H_2O_2 (派尼化学试剂厂,批号:20160508);DMEM/F12 培养基(博士德生物工程有限公司,批号:08H17B04、13I06A74);磷酸盐缓冲液(PBS,批号:20171107、13D17B21)、胰蛋白酶消化液(胰蛋白酶 0.25%,批号:T5016)均购自北京索莱宝科技有限公司;澳洲新生胎牛血清(江苏恩莫阿赛生物技术有限公司,

批号:S171204F);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:20180619)、一氧化氮(NO)试剂盒(批号:20180530)均购自南京建成生物工程研究所;内皮素1(ET-1)试剂盒(武汉云克隆科技股份公司,批号:L190904198)。

1.3 细胞

HUVEC系购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司。

1.4 动物

60只SPF级SD大鼠,♂,体质量约200g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2014-0007。

2 方法与结果

2.1 TGG、TGM、丹皮酚的制备

2.1.1 TGG的制备 将1840g人参药材粉碎后,加5倍量70%的乙醇,浸泡1h,提取2次,每次1h,过滤,滤液回收至无醇味后浓缩;再加1倍量的蒸馏水在室温下静置过夜,过滤,滤液4000r/min离心30min,上清液过大孔吸附树脂,依次用蒸馏水、5%乙醇、70%乙醇、80%乙醇洗脱,回收70%乙醇洗脱液乙醇,浓缩成浸膏备用^[14],即得TGG57.11g。1gTGG相当于原药材31g,其中人参皂苷Rg₁含量为0.148%、人参皂苷Re含量为0.119%、人参皂苷Rb₁含量为0.262%。

2.1.2 TGM的制备 将700g牡丹皮药材粉碎后,加70%乙醇提取2次,滤液回收至无醇味后浓缩;加1倍量的蒸馏水在室温下静置过夜,过滤,滤液4000r/min离心30min,上清液过大孔吸附树脂,依次用蒸馏水、5%乙醇、40%乙醇、80%乙醇洗脱,回收40%乙醇洗脱液乙醇,浓缩成浸膏备用^[14],即得TGM22.85g。1gTGM相当于原药材30.63g,芍药苷的含量为9.1%。

2.1.3 丹皮酚的制备 将700g牡丹皮药材粉碎后,加7L的蒸馏水,采用水蒸气蒸馏法^[15],待蒸出液澄清停止加热,将蒸出液置于冰箱中冷藏48h,过滤,所得结晶于40℃下减压干燥,即得丹皮酚8.58g。1g丹皮酚相当于原药材81.6g,丹皮酚含量为1.23%。

2.2 溶液的制备

2.2.1 TGG溶液 称取“2.1.1”项下TGG浸膏806mg,蒸馏水加热溶解,制备成质量浓度为31mg/mL的溶液。

2.2.2 TGM溶液 称取“2.1.2”项下TGM浸膏1716mg,蒸馏水加热溶解,制备成质量浓度为66mg/mL的溶液。

2.2.3 丹皮酚溶液 称取“2.1.3”项下丹皮酚粉末57.2mg,加入26mL5%的羧甲基纤维素钠助悬,制备成质量浓度为2.2mg/mL的溶液。

2.3 大鼠含药血清的制备

将大鼠随机分为空白组(蒸馏水)、TGG组(TGG,2.025g/kg,按生药量计,下同)、TGM组(TGM,4.05g/kg)、丹皮酚组(丹皮酚,1.08g/kg)各12只。各组大鼠

每天早晚灌胃1次,连续给药7d。末次给药1h后,腹主动脉取血^[16],分离血清,56℃水浴灭活30min,0.2μm微孔滤膜过滤,分装封口后于-80℃保存。

2.4 统计学方法

采用统计软件SPSS 19.0进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,方差齐时采用LSD法进行组间比较,反之,采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.5 H₂O₂造模浓度的筛选

采用MTT法^[17]筛选H₂O₂的造模浓度,取处于对数生长期的HUVEC,按 2.5×10^5 mL⁻¹接种于96孔板,每组设6个复孔,5%CO₂,37℃培养24h,分别加入0(空白)、1.1、1.2、1.4、1.8 mmol/L H₂O₂于含10%胎牛血清的DMEM培养基,培养24h后分别加入20μL 5g/L MTT,培养4h后,弃上清液,加入150μL DMSO室温避光振荡10min,于酶标仪570nm处测定吸光度(OD)值并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = 试验组OD值/空白组OD值 × 100%。结果,H₂O₂浓度在1.1~1.8 mmol/L时,随着H₂O₂浓度的增加,细胞存活率不断减小,说明H₂O₂对细胞有损伤作用。综合考虑,选用存活率为60%左右的1.2 mmol/L作为损伤模型的H₂O₂浓度。

2.6 TGG、TGM、丹皮酚给药浓度的筛选

HUVEC以 2.5×10^5 mL⁻¹接种于96孔板培养24h后,将其分为空白组(15%空白血清)、模型组(15%空白血清+1.2 mmol/L H₂O₂)、TGG不同给药浓度组[体积分数为0.000 1%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%的TGG血清(空白血清补足至15%,下同)+1.2 mmol/L H₂O₂]、TGM不同给药浓度组(体积分数为0.000 1%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%的TGM血清+1.2 mmol/L H₂O₂)、丹皮酚不同给药浓度组(体积分数为0.000 1%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%的丹皮酚血清+1.2 mmol/L H₂O₂)每组3个复孔,培养24h后,MTT法检测OD值并计算细胞存活率。结果,与空白组比较,模型组细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,TGG各组存活率均显著升高($P < 0.05$),且含药血清为0.000 1%时,细胞存活率最高;TGM 0.000 1%、0.01%、0.1%、1%组存活率显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且含药血清为0.000 1%时,细胞存活率最高;丹皮酚0.000 1%、0.1%、1%组存活率显著升高($P < 0.05$),且含药血清为1%时,细胞存活率最高。因此,TGG、TGM、丹皮酚最优给药浓度分别为0.000 1%、0.000 1%、1%。TGG、TGM、丹皮酚不同给药浓度下细胞存活率测定结果见表1。

2.7 正交试验筛选含药血清最优配比

2.7.1 正交试验 根据“2.6”项下TGG(A)、TGM(B)、丹皮酚(C)的含药血清体积分数范围,以细胞存活率为评价指标,设计L₉(3⁴)正交试验,筛选含药血清最优配

表1 TGG、TGM、丹皮酚不同给药浓度下细胞存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Results of survival rate of HUVEC after treated with different concentrations of TGG, TGM and paeonol ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	含药血清体积分数, %						
	0	0.000 1	0.001	0.01	0.1	1	10
空白组	100.00 ± 4.420						
模型组	76.633 ± 0.422						
TGG组		97.800 ± 1.271**	87.540 ± 3.169**	95.153 ± 4.671**	92.500 ± 3.902**	91.820 ± 6.306*	94.020 ± 2.804**
TGM组		89.150 ± 0.331**	76.123 ± 4.658	83.060 ± 2.312**	82.317 ± 1.561**	79.467 ± 1.921*	73.423 ± 3.373
丹皮酚组		85.610 ± 5.690*	76.680 ± 3.994	76.920 ± 4.512	82.093 ± 1.755**	89.163 ± 0.720**	78.720 ± 2.895

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

比。因素与水平见表2, 正交试验设计与结果见表3, 方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(TGG), %	B(TGM), %	C(丹皮酚), %
1	0.000 05	0.000 05	0.5
2	0.000 1	0.000 1	1
3	0.000 5	0.000 5	2

表3 正交试验设计与结果($n=3$)

Tab 3 Design and results of orthogonal tests($n=3$)

序号	A, %	B, %	C, %	细胞存活率, %
1	1	1	1	75.5
2	1	2	2	84.0
3	1	3	3	82.5
4	2	1	2	83.0
5	2	2	3	78.0
6	2	3	1	78.0
7	3	1	3	87.0
8	3	2	1	80.0
9	3	3	2	95.0
K_1	242.0	245.5	233.5	
K_2	239.0	242.0	262.0	
K_3	262.0	255.5	247.5	
R	23.0	13.5	28.5	

表4 方差分析

Tab 4 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
A	104.222	2	52.111	43.628	0.022
B	32.722	2	16.361	13.698	0.068
C	135.389	2	67.694	56.674	0.017
误差	2.389	9	1.194		

2.7.2 结果分析 根据表3和表4结果, 以细胞存活率为评价指标, 各因素对细胞存活率的影响效果依次为 $C > A > B$, A、C因素对细胞存活率有显著影响($P < 0.05$), 选用各因素的最优水平 $A_3B_3C_2$ 作为含药血清最优配比(TGG 0.000 5%, TGM 0.000 5%, 丹皮酚1%)。

2.8 验证试验

按“2.7.2”项下最优含药血清配比进行3次验证试验。结果, 3次试验的细胞存活率分别为95%、92%、90%, 表明最优含药血清配比条件合理, 重现性好。

2.9 最优含药血清配比作用下细胞LDH、NO、ET-1水平的测定

细胞以 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于96孔板培养24 h后, 分为空白组(15%空白血清)、模型组(15%空白血清+1.2 mmol/L H_2O_2)、TGG组(0.000 5%)、TGM组(0.000 5%)、丹皮酚组(1%)、最佳配比组, 每组平行5份, 分别加入对应含药血清, 孵育24 h后, 收集细胞培养上清液, 按相关试剂盒要求检测细胞上清液中LDH、NO和ET-1的水平。各组细胞LDH、NO、ET-1水平的测定结果见表5。

表5 各组细胞LDH、NO、ET-1水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 5 The levels of LDH, NO and ET-1 of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LDH, U/L	NO, $\mu\text{mol/L}$	ET-1, ng/L
空白组	2 679.318 7 ± 84.980 4	10.196 1 ± 0.784 3	13.559 9 ± 1.122 4
模型组	3 495.863 7 ± 94.398 9 ^Δ	6.666 6 ± 0.392 2 ^Δ	22.816 4 ± 1.091 3 ^Δ
TGG组	3 209.761 6 ± 54.939 5*	11.372 5 ± 0.784 3**	19.276 3 ± 1.793 6*
TGM组	3 250.121 7 ± 86.994 1*	9.803 9 ± 0.392 2**	20.149 8 ± 1.805 8*
丹皮酚组	3 356.691 0 ± 72.953 8	8.235 3 ± 0.679 2	20.831 8 ± 2.633 7
最优配比组	2 914.841 8 ± 36.600 8***	12.156 9 ± 0.392 2***	17.391 2 ± 1.713 9**

注:与空白组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与TGG组、TGM组、丹皮酚组比较, *** $P < 0.01$

Note: vs. control group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. TGG group, TGM group, paeonol group, *** $P < 0.01$

由表5可知, 与空白组比较, 模型组细胞LDH、ET-1水平显著升高($P < 0.01$), NO水平更低($P < 0.05$);与模型组比较, TGG组、TGM组、最优配比组细胞NO水平更高($P < 0.01$), LDH、ET-1水平更低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与TGG组、TGM组、丹皮酚组比较, 最优配比组细胞LDH水平更低, NO水平更高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), ET-1水平也有降低的趋势, 但未达到统计学的意义。

3 讨论

LDH是机体能量代谢中的一种重要酶, 其活性的改变直接影响机体的能量代谢。LDH作为细胞质中的酶, 当细胞受损时才可能大量溢出, LDH增加可反映细胞膜的损伤, 其外漏的程度也可间接反映心肌再灌注受损程度^[18]。NO和ET是内皮细胞释放的两种主要血管活性

物质。NO具有刺激血管平滑肌舒张,抑制血小板聚集以及抑制内皮细胞增殖等作用;ET-1是收缩血管物质,其通过刺激血管平滑肌细胞增殖,参与并促进高血压病的发生和发展,除了直接收缩血管外,还能促进其他收缩血管物质产生,如血管加压素、儿茶酚胺、肾上腺皮质激素等^[19]。

血清药理学是近年来提出的一种针对中药复方研究的药理学方法,中药提取物灌胃大鼠后经过吸收、分布、代谢、排谢等体内过程,再取大鼠含药血清进行药理学实验,比较接近药物体内环境中产生药理作用的真实过程,排除了中药粗制剂杂质的影响,在理论上更具科学性和真实性^[20]。本研究采用H₂O₂诱导建立HUVEC损伤模型,用TGG、TGM、丹皮酚含药血清单独作用于HUVEC损伤细胞,细胞存活率明显升高,得出TGG、TGM、丹皮酚具有促进细胞增殖的作用。试验初期,笔者设计的按生药比例混合同时灌胃TGG、TGM、丹皮酚,制备混合含药血清,但结果并没有3者单独制备含药血清更好,故有必要检测TGG、TGM、丹皮酚不同配比对HUVEC细胞增殖的影响,从而获得最优含药血清配比;经正交试验得出最优含药血清配比为TGG 0.000 5%、TGM 0.000 5%、丹皮酚1%;最优配比提高了HUVEC细胞存活率,可能与降低LDH、ET-1水平及提高NO的释放量有关。

综上所述,TGG、TGM、丹皮酚联合应用对H₂O₂诱导的HUVEC损伤具有良好的改善作用,由于药物经过大鼠的体内代谢,获得的含药血清中可能发生了化学成分及含量的改变,故需要后期采用薄层色谱法、液质联用等技术,对TGG、TGM、丹皮酚含药血清的最优配比进行定性定量分析,以期开发抗心肌缺血药物提供试验基础。

参考文献

[1] 魏志成,童东,杨娟,等.基于网络药理学的沙棘总黄酮治疗心肌缺血的作用机制研究[J].中国中药杂志,2017,42(7):1238-1244.

[2] 刘玉莲.人参皂苷Rb组单体和Rd对心肌缺血干预作用的机制[D].长春:吉林大学,2009.

[3] 曹春泉.牡丹皮的化学成分研究进展[J].广州化工,2013,41(12):44-45.

[4] 张金艳,赵乐,李贻奎,等.丹皮酚心血管活性的研究进展[J].中药新药与临床药理,2016,27(1):148-150.

[5] 翟昌林,黎莉,张运.丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护中HMGB1表达的影响[J].中华中医药学刊,2012,30(10):2284-2286.

[6] 陆建洪,翟昌林,陈捷.丹皮酚对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡及其Bcl-1和Bax表达的影响[J].中国中医药科技,2013,20(2):151-152.

[7] 李颖,尹茂山,官娟,等.丹皮总苷对小鼠急性心肌缺血的保护作用[J].泰山医学院学报,2013,34(10):768-770.

[8] 李薇,杜军保,金红芳,等.硫化氢供体对动脉粥样硬化大鼠内皮素1生成的影响[J].中华儿科杂志,2015,53(6):448-452.

[9] 李海剑,张婷婷.益气活血风静胶囊对大鼠及家兔血液流变学的影响[J].中国药事,2018,32(4):522-528.

[10] 张军霞,张婷婷,陈炜,等.益气活血风静胶囊对大鼠血栓形成的影响[J].医药论坛杂志,2016,37(8):9-10.

[11] 张一颖,张丽丽,申鹏飞,等.血管内皮及其分泌因子在血压调节中作用机制[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(3):60-64.

[12] 李宏力,李玉文,刘天龙,等.Z-没药甾酮对急性血瘀模型大鼠凝血和血管内皮功能的改善作用及其机制研究[J].中国药房,2016,27(19):2615-2617.

[13] WANG Y, CHE J, ZHAO H, et al. Paeoniflorin attenuates oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis and adhesion molecule expression by autophagy enhancement in human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018. DOI:10.1002/jcb.28204.

[14] 杨明杰.人参-牡丹皮抗脑缺血功效成分组的制备工艺及含量测定研究[D].郑州:河南中医学院,2015.

[15] 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,2015:705-706.

[16] 梁瑞峰,李开言,王晓丽,等.降压宝蓝片含药血清对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(3):112-115.

[17] WANG T, SUN P, CHEN L, et al. Cinnamtannin D-1 protects pancreatic β -cells from palmitic acid-induced apoptosis by attenuating oxidative stress[J]. *J Agric Food Chem*, 2014,62(2):5038-5045.

[18] 沈炳玲,颜利求,秦毅,等.锌对家兔心肌缺血再灌注损伤后心肌酶影响[J].天津医科大学学报,2004,10(2):185-194.

[19] 胡小勤,曾学文.高血压病血淤证患者血清对人脐静脉内皮细胞分泌NO、ET的影响及丹参酮II_A的干预作用[J].时珍国医国药,2008,19(12):2842-2843.

[20] 张景红,樊秦.伤肌宁胶囊含药血清对阿霉素所致心肌细胞损伤的保护作用研究[J].中国药房,2010,21(23):2117-2119.

(收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-12-24)

(编辑:唐晓莲)