



# 荜草对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞氧化损伤 保护作用的谱效关系研究

郑林<sup>1,2</sup>, 李靖<sup>1,2</sup>, 陈慧<sup>1,2</sup>, 王永林<sup>1,2</sup>, 王爱民<sup>1,2</sup>, 黄勇<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:研究荜草中花穗、带叶嫩枝和粗茎对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤的保护作用,探讨其抗心肌缺血的药效物质基础。方法:建立荜草中花穗、带叶嫩枝和粗茎的 UPLC 指纹图谱,对色谱峰进行归属确认,同时观测荜草中花穗、带叶嫩枝和粗茎不同配比组合物对心肌细胞氧化损伤的保护作用(应用 MTT 法作为浓度筛选和细胞存活率判定指标,并检测丙二醛含量),将各组合物活性信息与其相应的 UPLC 指纹图谱化学信息进行相关性分析研究,推测药效物质基础。结果:荜草中带叶嫩枝和花穗对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤具有明显的保护作用,谱效相关性研究发现,3~5, 11~14, 18~19, 21~25 号色谱峰与抗氧化活性呈正相关。结论:通过谱效研究,推测了荜草抗氧化损伤的活性成分,为荜草药材深层次研究开发奠定一定的实验基础。

**[关键词]** 荜草;谱效关系;H9c2 心肌细胞;氧化损伤

荜草为蓼科植物荜草 *Polygonum orientale* L. 的干燥全草,具有祛风利湿,活血,消积,止痛功能,民间常用于胸痛,胸闷,气短,中风偏瘫等疾病的治疗,在贵州省广泛分布。据《中华本草》、《中药大辞典》等记载<sup>[1-2]</sup>,荜草的茎叶、果实、根和花均可作为不同部位入药,且功能主治有所差异。本课题前期研究发现<sup>[3]</sup>,荜草全株、带叶嫩枝、花穗均能不同程度改善心肌缺血,增加心脏冠脉流量,其中带叶嫩枝和花穗的综合作用较优,为心血管疾病治疗的药用部位,但荜草对心肌缺血保护作用的药效物质基础尚不清楚。为了有效利用荜草的药用价值,本研究采取中药谱效学研究思路<sup>[4]</sup>,以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型,对荜草中花穗、带叶嫩枝和粗茎的不同配比组合物进行指纹图谱和药理活性研究,实验数据经统计学处理,以挖掘荜草各药用部位化学成分与活性的相关性,探讨其抗心肌缺血的药效物质基础,为荜草资源深层次利用和现代中药新药开发奠定科学依据。

## 1 材料

WATERS 超高效液相色谱(UPLC)ACQUITY 系

**[稿件编号]** 20111029006

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30860366);贵州省科技计划重大专项项目(黔科合重大专项字[2007]6010号);贵州省社会发展攻关计划(黔科合 SY 字[2009]3092)

**[通信作者]** \* 黄勇, Tel: (0851) 6908899, E-mail: mailofhy@126.com

统,包括二元超高压溶剂系统、二极管阵列检测器、Empower2 色谱工作站;AE240 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司)。

荜草药材产于贵州清镇市长岭岗,由贵阳医学院药学院药用植物与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为蓼科植物荜草 *P. orientale* 的干燥全草;没食子酸、原儿茶酸、异荜草素、荜草素、花旗松素、牡荆素、异牡荆素、木犀草苷、山柰素-3-O-(2"-O- $\alpha$ -L-鼠李糖基)- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、槲皮苷、山柰素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷、*N*-*P*-香豆酰酰胺、槲皮素对照品均由贵州省药物制剂重点实验室从荜草药材中提取分离制备所得,纯度均大于 98%;甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸为优级纯,其余试剂均为分析纯。

H9c2 心肌细胞株(中国科学院上海生科院细胞资源中心);过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(Biochrom 公司);丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试样品制备

分别取荜草花穗、带叶嫩枝和粗茎适量,加入 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎煮液浓缩后加入乙醇,使含醇量达 65%,放置过夜,抽滤,滤液减压回收乙醇至无醇味,加入 1/2 倍量的正丁醇萃取



4次,合并正丁醇液,减压回收正丁醇,加水配制为  $2\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  药液,即得荳草花穗、带叶嫩枝、粗茎提取物。按  $L_9(3^4)$  正交试验设计,水平分别为 0, 10, 30 mL, 调配由荳草花穗、带叶嫩枝和粗茎提取物所组成的 9 组配伍组分,混合均匀后统一定容到 100 mL 即可。

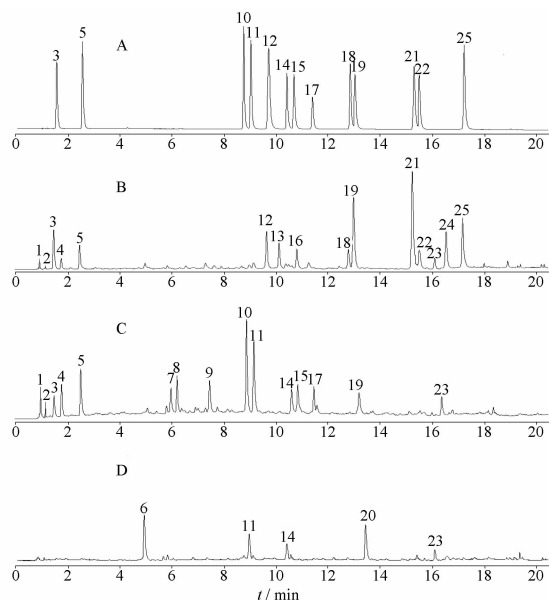
## 2.2 荳草各部位和配伍组分 UPLC 指纹图谱

### 2.2.1 色谱条件

WATERS ACQUITY UPLC BET  $C_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱, 0 ~ 15 min, A (5% ~ 20%), 15 ~ 20 min, A (20% ~ 40%), 20 ~ 22 min, A (40% ~ 100%), 22 ~ 25 min, A (保持 5%); 流速 0.3 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ; 检测波长 300 nm; 柱温 45  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样前样品以甲醇稀释至 0.2 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ , 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2.2 指纹图谱分析及色谱峰归属

对荳草各部位和配伍组分进行 UPLC 指纹图谱分析, 并对指纹图谱主要特征峰进行定位, 共有 25 个特征峰, 通过对照品与样品 UPLC-PAD 指纹图谱中色谱峰的保留时间及紫外光谱图比对, 确认了 13 个色谱峰, 见图 1。



A. 对照品; B. 荳草花穗; C. 荳草带叶嫩枝; D. 荳草粗茎; 3. 没食子酸; 5. 原儿茶酸; 10. 异荳草素; 11. 荳草素; 12. 花旗松素; 14. 牡荆素; 15. 异牡荆素; 17. 木犀草苷; 18. 山柰素-3-O-(2'-O- $\alpha$ -L-鼠李糖基)- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷; 19. 槲皮苷; 21. 山柰素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷; 22. N-P-香豆酰酰胺; 25. 槲皮素。

图 1 荳草 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of *Polygonum orientale*

## 2.3 荳草各部位和配伍组分对心肌细胞氧化损伤的保护作用<sup>[5]</sup>

### 2.3.1 细胞培养

H9c2 心肌细胞用含 10% 胎牛血清, 100 U  $\cdot$  mL $^{-1}$  青霉素, 100 U  $\cdot$  mL $^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养液, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。所有实验用细胞均在细胞呈对数生长期。

### 2.3.2 样品浓度筛选

以荳草全样的提取物筛查安全浓度, 实验考察了荳草提取物的 5 个质量浓度 (2, 20, 200, 400, 800 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 对 H9c2 心肌细胞活力的潜在影响, 选取对数生长期 H9c2 细胞加入含有不同浓度荳草提取物的新鲜培养基, 培养 24 h 后测定 MTT 存活率, 与正常对照组相比, 400, 800 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  的荳草提取物质量浓度组细胞活力明显降低, 表明高于 400 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  的给药质量浓度会导致 H9c2 细胞产生细胞毒性作用, 因此选择 200 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  作为本次研究的样品浓度。

### 2.3.3 实验分组

取对数生长期 H9c2 心肌细胞以每孔 100  $\mu\text{L}$ ,  $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中培养 24 h, 实验分为 ① 对照组: 每孔加入 DMEM 培养液 100  $\mu\text{L}$ ; ② 模型组: 每孔加入 1 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 100  $\mu\text{L}$ ; ③ 给药组: 在荳草各配伍组分中加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液使每孔  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 1 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ , 作用 H9c2 细胞 4 h 后用 MTT 法检测。每个实验组均设 6 个复孔。

### 2.3.4 MTT 法检测细胞存活率

取各组细胞, 每孔加入 2.5 g  $\cdot$  L $^{-1}$  MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 最终作用质量浓度为 0.25 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ , 继续在培养箱中培养 4 h, 小心吸去培养液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解结晶, 用酶标仪于 490 nm 测定吸光度 A, 存活率 =  $(A_{\text{模型组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{模型组}} \times 100\%$ 。

### 2.3.5 MDA 测定

细胞培养后提取上清液, 用试剂盒检测细胞培养液中脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 的含量。

### 2.3.6 指标测定结果

见表 1。

## 2.4 荳草各部位活性方差分析

以 SPSS11.5 统计学软件中 General Linear Model  $\rightarrow$  Univariate 功能对数据进行分析处理<sup>[6]</sup>, Between-Subjects Effects “主效应间检验”统计学检验结果, 荳草花穗和带叶嫩枝组分对 MTT 指标 (细胞损伤修复) 有极显著性影响 ( $P < 0.01$ ); 荳草带叶嫩枝组分对 MDA 指标 (脂质过氧化抑制) 有极显著性影响 ( $P < 0.05$ )。



表1  $L_9(3^4)$  正交设计配伍组分活性测试结果

Table 1 Activity test results of compatibility component with  $L_9(3^4)$  orthogonal design

组别	MTT/%	MDA/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	49.12 ± 8.68	4.92 ± 0.61
2	61.48 ± 6.87	4.07 ± 0.54
3	70.34 ± 6.74	3.85 ± 0.70
4	63.57 ± 7.65	4.76 ± 0.72
5	70.19 ± 7.43	4.10 ± 0.69
6	68.49 ± 6.13	4.50 ± 0.55
7	71.47 ± 5.48	4.39 ± 0.72
8	83.82 ± 7.67	4.34 ± 0.63
9	86.56 ± 5.46	3.84 ± 0.61

## 2.5 荳蔻化学成分谱效相关性分析

利用 SPSS 11.5 软件的双变量 (Bivariate) 相关分析方法<sup>[7]</sup>, 分析来源于各不同配伍组样品的 25 个特征色谱峰与生物活性指标的相关性。3, 5, 12, 13, 18, 19, 21, 22, 24, 25 号色谱峰与 MTT 指标相关显著, 4, 11, 14, 23 号色谱峰与 MDA 指标相关显著, 且均呈现正相关关系, 见表 2。上述研究结果提示配伍组样品中 3 ~ 5, 11 ~ 14, 18, 19, 21 ~ 25 号色谱峰相关物质与抑制细胞损伤和对抗脂质过氧化相关。

## 3 讨论

**3.1 中药成分复杂**, 其特点是“多成分、多靶点、多渠道”, 往往不是一个有效成分, 而是有效成分之间的相互协同、相加甚至拮抗的共同效应发挥疗效, 因此中药应作为一个整体进行研究。近年来, 学者们提出的中药谱效学以及组分配伍的研究思路为中药成分复杂体系的药效物质基础研究提供了借鉴, 这不仅对中药复方, 而且对于具有独特疗效的单味中药药效物质基础的研究同样具有积极意义。

**3.2 正交试验方差分析**表明荳蔻花穗和带叶嫩枝对 H9c2 心肌细胞氧化损伤具有明显的保护作用; 这一结论与课题组在前期工作中从整体动物水平确定荳蔻抗心肌缺血的有效部位是其花穗和带叶嫩枝相吻合<sup>[3]</sup>。本文对荳蔻化学成分谱效相关性分析表明, 荳蔻产生活性的主要成分可能为没食子酸、原儿茶酸、荳蔻素、花旗松素、牡荆素、山柰素-3-O-(2"-O- $\alpha$ -L-鼠李糖基)- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、槲皮苷、山柰素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷、N-P-香豆酰酪胺、槲皮素, 主要为酚酸类和黄酮类化合物, 研究结果提示荳蔻对心肌缺血保护作用可能与上述物质基础相关, 印证了中药活性物质“多成分、多途径、多靶点”综合作

表2 各色谱峰与活性指标的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between characteristic peaks and activity indexes

No.	活性指标	
	MTT	MDT
1	0.648	-0.639
2	0.657	-0.649
3	0.930 <sup>2</sup>	-0.472
4	0.642	-0.669 <sup>1</sup>
5	0.773 <sup>1</sup>	-0.656
6	0.119	-0.499
7	0.488	-0.651
8	0.488	-0.651
9	0.488	-0.651
10	0.488	-0.651
11	0.496	-0.794 <sup>1</sup>
12	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
13	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
14	0.489	-0.806 <sup>2</sup>
15	0.488	-0.651
16	0.591	-0.155
17	0.488	-0.651
18	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
19	0.929 <sup>2</sup>	-0.45
20	0.119	-0.499
21	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
22	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
23	0.647	-0.721 <sup>1</sup>
24	0.791 <sup>1</sup>	-0.155
25	0.791 <sup>1</sup>	-0.155

注: 相关系数显著性<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

用特征, 这对于阐明荳蔻的药效物质基础及其作用机制, 建立荳蔻及其提取物的多指标质量控制标准具有积极意义。

### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第2册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1999: 681.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1617.
- [3] 黄勇, 郑林, 王爱民, 等. 荳蔻不同药用部位抗心肌缺血作用及化学成分比较研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2520.
- [4] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2410.
- [5] 景春杰, 陈晓辉, 毕开顺, 等. 丹酚酸 B 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及可能靶点蛋白寻找[J]. 药物生物技术, 2010, 17(2): 105.



[6] 黄勇,齐晓岚,官志忠,等. 灯盏细辛组分对脑神经细胞损伤保护作用谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1038.

[7] 沈岚,张梁,冯怡,等. 芍药甘草复方效应组分谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2658.

## Study on fingerprint-pharmacology correlation of protective effect of *Polygonum orientale* on myocardial cell oxidative injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ZHENG Lin<sup>1,2</sup>, LI Jing<sup>1,2</sup>, CHEN Hui<sup>1,2</sup>, WANG Yong-lin<sup>1,2</sup>, WANG Ai-min<sup>1,2</sup>, HUANG Yong<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of flowers, branch with leaves and main stem of *Polygonum orientale* on H9c2 myocardial cells oxidative injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and discuss its efficacious substance foundation of anti-myocardial ischemia. **Method:** UPLC fingerprint was established for flowers, branch with leaves and main stem of *P. orientale*, and the chromatographic peak was identified. Meanwhile, the protective effect of composites of flowers, branch with leaves and main stem of *P. orientale* in different proportions on myocardial cells oxidative injury was observed (with MTT method as indicators of concentration screening and cell livability) and MDA were detected. The correlation analysis was made between activity information of composites and chemical information of UPLC fingerprint to infer efficacious substance foundation. **Result:** Branch with leaves and flowers from *Polygonum orientale* showed a protective effect on H9c2 myocardial cells oxidative injury. According to the study on spectrum-activity relationship, peak 3-5, 11-14, 18-19, 21-25 showed a positive correlation with their antioxidant activities. **Conclusion:** This study determined activity of *Polygonum orientale* on anti-oxidative injury, laying an experimental foundation for in-depth study and development of *P. orientale* herbs.

[Key words] *Polygonum orientale*; fingerprint-pharmacology correlation; H9c2 myocardial cells; oxidative injury

doi:10.4268/cjcm20121716

[责任编辑 孔晶晶]