

风轮菜总黄酮不同极性部位的 抗氧化作用研究

邢娜¹ 张海晶¹ 舒尊鹏¹ 许旭东² 朱寅荻² 孙桂波² 王秋红¹ 孙晓波²

(1 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室,黑龙江中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室,哈尔滨,150040; 2 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京,100193)

摘要 目的:探讨风轮菜总黄酮的不同极性部位对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用。方法:建立缺氧/复氧 H9c2 心肌细胞损伤模型,对风轮菜总黄酮 10% 甲醇部位(2[#])、20% 甲醇部位(3[#])、30% 甲醇部位(5[#]) 进行药物浓度筛选,采用 MTT 法测定细胞存活率。收集培养细胞及其上清液测定乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及过氧化氢酶(CAT)的活性和丙二醛(MDA)的含量。结果:与正常对照组比,模型组 H9c2 心肌细胞经过缺氧 4h 复氧 24h 造模后,细胞活力显著降低。与模型组比较,2[#]、3[#]、5[#] 给药组显著增加 H9c2 心肌细胞活力。与正常对照组比较,模型组的 SOD、GSH-Px 及 CAT 的活性均显著降低,而 LDH 活性、MDA 含量均升高,2[#]、3[#]、5[#] 给药组可呈浓度依赖性显著增加 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性,降低 LDH 活性及 MDA 含量。结论:2[#]、3[#]、5[#] 对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞损伤具有保护作用,其与增强细胞清除氧自由基能力、降低脂质过氧化物的产生有关。

关键词 风轮菜总黄酮;H9c2 心肌细胞;缺氧/复氧;抗氧化作用

Antioxidant Effect of Different Isolated polar Fractions in Total Flavones of *Clinopodium chinense*

Xing Na¹, Zhang Haijing¹, Shu Zunpeng¹, Xu Xudong², Zhu Yundi², Sun Guibo², Wang QiuHong¹, Sun Xiaobo²

(1 Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract Objective: To explore the protective effect of different polar fractions in total flavones of *Clinopodium chinense* on H9c2 myocardial cell damage induced by hypoxia/ reoxygenation(H/R). **Methods:** The hypoxia/ reoxygenation injury cardiomyocyte model was established and screened out parts with 10% (2[#]), 20% (3[#]), 30% (5[#]) of carbinol. Cell viability was determined by MTT method. We collected culture cell and its supernatant for detecting LDH, SOD, GSH-Px, CAT activity and MDA content. **Results:** In H/R group, after hypoxia 4 h and reoxygenation 24 h, the myocardial cell viability decreased significantly compared to control group. Compared with H/R group, 2[#]、3[#]、5[#] different isolated fragments in total flavones of *Clinopodium chinense* could increase cell viability. Compared to control group, SOD, GSH-Px, CAT were dropped remarkably, and LDH and MDA increased remarkably in H/R group. Compared to H/R group, 2[#]、3[#]、5[#] medication groups decreased LDH and MDA significantly, and increased SOD, GSH-Px, CAT significantly in a dose-dependent manner. **Conclusion:** 2[#]、3[#]、5[#] can reduce myocardial damage induced by hypoxia/ reoxygenation, the mechanism is related with the enhancement ability of myocardial cells to clear oxygen free radicals, and decrease the generation of lipid peroxide.

Key Words Total Flavones of *Clinopodium chinense*; H9c2 myocardial cell; Hypoxia/ Reoxygenation; Antioxidant

中图分类号:R961 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.009

目前,缺血性心脏病的发病率处于原发性心脏病的首位,其中心肌缺血再灌注损伤(Myocardial Ischemia Reperfusion Injury, MIRI)约占 50%。随着溶栓、介入手术、冠脉搭桥、心脏移植等心血管疾病治疗技术的广泛应用, MIRI 更成为临床亟待解决的关

键问题^[1]。

缺血及再灌注后引起的自由基损伤是 MIRI 重要的病理机制之一。由于过量的氧自由基能氧化细胞膜上的脂质成分、糖类、蛋白质及 DNA,造成脂质过氧化,引起细胞膜功能障碍和损伤、并产生可扩散

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81374010);国家自然科学基金项目(编号:81173511)

作者简介:邢娜(1990—),女,在读硕士研究生,从事心血管药理学、中药药效物质基础及其作用机制研究, E-mail: nanaxing90@163.com

通信作者:王秋红(1969—),女,博士,教授,从事中药及天然药物药效物质基础、中药性味理论研究, Tel: (0451) 87266856, E-mail: qh-wang668@sina.com; 孙晓波(1958—),男,研究员,研究方向:心血管药理学, Tel: (010) 57833013, E-mail: sun_xiaobo163@163.com

性醛毒效应,同时使抗氧化酶活性降低导致心肌细胞膜完整性破坏、通透性增加及离子转运功能障碍,引起钙超载、炎症因子释放,使心肌细胞严重受损,大量细胞凋亡、坏死,进而导致心力衰竭而危及生命^[2]。

黄酮类化合物是中药中用于治疗和预防心血管疾病的重要有效成分。目前流行病学研究证明饮食中大量摄入黄酮类化合物亦能够降低急性心梗的风险并且降低心血管疾病的死亡率。突出显示出黄酮类化合物在预防和治疗心血管疾病中具有潜在应用价值和巨大的药用开发前景^[3-7]。

风轮菜为唇形科风轮菜属(*Clinopodium*)植物,源于2010版中国药典一部收载的常用中药。为唇形科植物风轮菜 *Clinopodium chinensis* (Benth.) O. Kuntze 的干燥地上部分,具有清热解毒、凉血止血、活血之功效。风轮菜中含黄酮类、皂苷类、有机酸类、芳香族类、三萜类、甾体等类型化合物,其中黄酮类和皂苷类化合物为该植物的主要活性成分。现代关于风轮菜的药理研究主要集中于皂苷类成分止血作用的研究,对其黄酮类成分药理作用的研究较少。风轮菜黄酮类成分含量较高,是重要的活性部位。研究表明风轮菜总黄酮具有显著的抗氧化、抗心肌缺血、耐缺氧、抗炎、保护血管内皮细胞等作用^[8];尽管风轮菜总黄酮对心血管系统具有显著的活性,但对其不同黄酮类成分的心血管活性方面的基础研究薄弱,物质基础尚未阐明。

为进一步确认风轮菜总黄酮中抗 MIRI 损伤的有效部位,进而得到有效成分,我们利用缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation H/R)损伤心肌细胞模型,研究了风轮菜总黄酮不同极性部位对缺氧复氧损伤模型的保护作用,探讨其初步的作用机制。为风轮菜总黄酮保护心肌的药效物质基础研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备 TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FA2104 电子分析天平(上海天平厂);ZHJH-C1109C 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);M1000 微孔扫描酶标仪(Bio-Tek 公司);二氧化碳培养箱(Thermo Scientific 公司);Type III 型手套厌氧箱(美国 COY Laboratory)。

1.2 主要材料 DMEM 高糖培养基、DMEM 无糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司),胰蛋白酶、四氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司),乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成

生物工程研究所),二甲基亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(ZLI-9061),实验用水为 Millipore 超纯水。

1.3 实验细胞株 H9c2 大鼠心肌细胞株购自上海生命科学研究院细胞库。

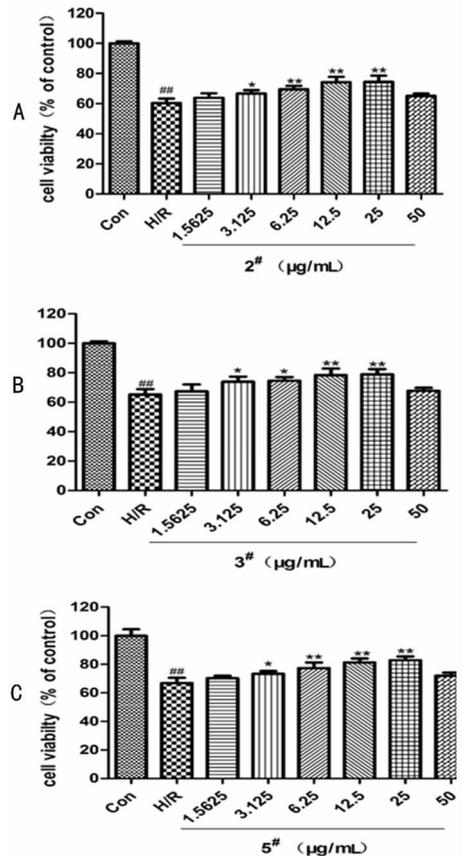


图1 2[#]、3[#]、5[#](图A、B、C)对缺氧/复氧诱导H9c2心肌细胞损伤的保护作用

注:与空白对照组比较,### $P < 0.01$,与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2 实验方法

2.1 风轮菜总黄酮片段的制备 风轮菜总黄酮由中国医学科学院药用植物研究所化学室分离提纯而得,按其极性大小进行分离,以氯仿、甲醇100:0-0:100的比例,甲醇5%递增的方式进行梯度洗脱,得到分离洗脱样品。减压浓缩,50℃真空干燥获得固体样品,分别标记为风轮菜总黄酮不同极性部位1~19,即1[#]~19[#]。以DMSO溶解至100µg/mL的药物母液,DMEM高糖培养基倍半稀释至所需浓度。

2.2 H9C2心肌细胞的培养及药效的筛选 根据预实验结果现选用2[#]、3[#]、5[#]三个有效部位进行药效筛选实验。H9c2心肌细胞用含10%胎牛血清DMEM高糖培养基于5%CO₂培养箱中37℃培养。实验时取对数生长期细胞,以 1×10^5 /孔密度接种于96

表1 2[#]、3[#]、5[#]对缺氧/复氧所致心肌细胞损伤抗氧化能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mg protein)	CAT (U · mL ⁻¹)	GSH-Px (U/mg protein)	MDA (nmol · mL ⁻¹)	LDH (U · mL ⁻¹)
Control	225.23 ± 27.26	26.07 ± 3.97	94.40 ± 10.59	29.70 ± 4.25	465.80 ± 38.58
Model	137.14 ± 15.73 ^{△△}	14.53 ± 2.80 ^{△△}	61.61 ± 9.22 ^{△△}	70.99 ± 5.52 ^{△△}	899.44 ± 71.76 ^{△△}
2 [#] -6.25	170.14 ± 19.85*	19.70 ± 2.99*	67.42 ± 8.54*	62.05 ± 2.91*	771.66 ± 53.19**
2 [#] -12.5	193.60 ± 9.33**	22.71 ± 2.49**	71.33 ± 6.86*	47.59 ± 1.66**	673.65 ± 39.18**
2 [#] -25	199.98 ± 15.04**	25.23 ± 3.07**	81.15 ± 6.02**	35.52 ± 2.25**	588.12 ± 39.81**
3 [#] -6.25	165.68 ± 14.73**	21.38 ± 1.14**	69.38 ± 8.92*	54.80 ± 4.82**	752.57 ± 41.72**
3 [#] -12.5	194.49 ± 19.41**	22.56 ± 2.30**	77.99 ± 8.14**	42.01 ± 2.68**	628.37 ± 39.06**
3 [#] -25	208.26 ± 27.83**	24.83 ± 3.06**	79.51 ± 10.92**	35.10 ± 4.44**	558.10 ± 34.75**
5 [#] -6.25	160.26 ± 13.79*	21.78 ± 5.53*	69.32 ± 5.65*	51.43 ± 3.32**	743.03 ± 42.60**
5 [#] -12.5	173.47 ± 18.13**	22.71 ± 2.92**	81.09 ± 8.57**	41.88 ± 5.64**	632.14 ± 36.75**
5 [#] -25	194.21 ± 21.41**	23.99 ± 4.21**	87.06 ± 6.67**	33.08 ± 1.31**	566.13 ± 23.94**

注:与空白对照组比较,△△ $P < 0.01$,与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

孔培养板培养 24 h 后,随机分为 3 组,正常对照组(C 组),缺氧/复氧模型组(H/R 组),缺氧/复氧模型+2[#]、3[#]、5[#](1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL)给药组,每组设置 6 个复孔。预给药孵育 12 h 后,在倒置显微镜下观察细胞形态,吸弃含药培养液,加 100 μL DMEM 无糖培养基,厌氧箱中培养 4 h,再吸弃培养液,加入 100 μL DMEM 高糖培养液放置于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 24 h。弃去培养液,每孔加入含 1.0 mg/mL MTT 的无血清培养液 100 μL 继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,微孔振荡器上振荡 5 min,酶标仪 570 nm 波长测定各孔吸光度值(OD)。实验重复 3 次。

细胞存活率(%) = (各实验组吸光度值/正常对照组吸光度值) × 100%

2.3 生化指标的测定 测定 H9c2 心肌细胞的氧化平衡体系酶。采用 2,4-二硝基苯腈显色法检测 LDH 活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,二硫代二硝基苯甲酸法测定 GSH-Px 含量,钼酸铵法测定 CAT 活力。实验重复 3 次,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

3 结果

3.1 2[#]、3[#]、5[#]对缺氧/复氧诱导 H9c2 心肌细胞活力的影响 与正常组比较,各模型组 H9c2 心肌细胞活力均显著降低,具有统计学差异;2[#]、3[#]、5[#]对 H9c2 心肌细胞活力的下降均有抑制作用。在改善细胞活力方面,片段 2[#]、3[#]、5[#](图 1A、B、C)3.125 ~ 25 μg/mL 的给药剂量可使细胞活力较模型组相比显著增高,且各片段均呈剂量依赖性,其他给药剂量

可不同程度的降低此抑制作用,但无统计学意义。结果如图 1。

3.2 2[#]、3[#]、5[#]对缺氧/复氧所致 H9c2 心肌细胞损伤抗氧化能力的影响 根据 3.1 的实验结果,对 2[#]、3[#]、5[#]的低、中、高(6.25、12.5、25 μg/mL)三个给药剂量进行抗氧化作用研究。结果见表 1,与正常对照组比较,模型组心肌细胞的 SOD、GSH-Px、CAT 活性显著降低,而 LDH、MDA 含量则显著增加。与模型组相比,2[#]、3[#]、5[#]均可增加 SOD、GSH-Px、CAT 活性,降低 LDH、MDA 含量,并呈剂量依赖性。

4 讨论

根据课题组前期研究风轮菜总黄酮对阿霉素心脏毒性保护作用及机制研究,实验表明,风轮菜总黄酮在体内和体外水平可以减轻阿霉素诱导心肌细胞凋亡。风轮菜总黄酮通过抑制线粒体依赖的 p53 介导的细胞凋亡信号减轻阿霉素诱导的心肌氧化应激损伤。此外,风轮菜总黄酮也激活 PI3K/Akt 信号通路,从而促进细胞的存活。

ROS 的过量生成和随后的氧化应激反应在阿霉素诱导的心肌功能障碍中发挥重要的作用^[9]。阿霉素对心肌细胞的毒性作用主要是由于其固有的化学结构所引起的,其诱导产生的自由基可导致细胞凋亡^[10]。以往的研究也证明了阿霉素能增加心脏组织和心肌细胞氧自由基的生成,抑制抗氧化酶的表达,降低内源性抗氧化能力,进而造成心肌细胞的氧化应激损伤^[11-13],风轮菜总黄酮可以通过调节活性氧代谢酶的活性进而有效降低阿霉素诱导的心肌细胞氧化应激损伤。

机体的氧化应激是指机体在遭受有害刺激时,氧自由基生成过量,氧化系统和抗氧化系统失衡,导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集,从而对细

胞产生多种毒性作用的病理状态。MDA 是脂质过氧化反应的终产物,其水平的高低可反映机体脂质过氧化程度。因此,测定 MDA 的含量可间接反映出细胞受氧化损伤程度,是反映氧化应激较好的指标^[14]。自由基激发的脂质过氧化物可以导致质膜损伤,LDH 漏出率能较准确地证明包膜的完整性。本研究利用缺氧/复氧模型诱导 H9c2 心肌细胞的损伤时,发现 MDA 含量显著增高,表明 H9c2 心肌细胞在缺氧/复氧环境中产生了大量的脂质过氧化物,并改变了细胞膜的通透性,使膜内 LDH 可透过细胞膜释放到培养液中,导致培养液中 LDH 水平显著升高。SOD、GSH-Px、CAT 是生物体内清除活性氧自由基的重要酶类,它们的催化活性可以间接反映机体清除氧自由基的能力,是维持机体氧化平衡的重要物质^[15]。在本研究中,模型组 SOD 活性、CAT 活性、GSH-Px 含量显著降低,表明在 H/R 可导致 H9c2 心肌细胞肌细胞抗氧化防御机制受损。风轮菜总黄酮的不同极性部位 2[#]、3[#]、5[#] 给药组可有效提高心肌细胞存活率,并可呈浓度依赖性显著有效提高 SOD、GSH-Px、CAT 的活性,减少 MDA 的生成量,同时降低受损心肌 LDH 的释放量。

综上所述,风轮菜总黄酮的不同极性部位 2[#]、3[#]、5[#] 能提高清除氧自由基能力及降低脂质过氧化物的产生说明风轮菜总黄酮片段通过抗氧化作用发挥对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞损伤具有保护作用。

参考文献

- [1] Narasimman Gurusamy a, Gautam Malik a, et al. Nikolai V. Redox activation of Ref-1 potentiates cell survival following myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, 43: 397-407.
- [2] Perrelli MG, Tullio F, Angotti C, et al. Gatastatin reduces myocardial ischemia/ reperfusion injury: involvement of PI3K/Akt, PKCs, mitochondrial K(ATP) channels and ROS signaling[J]. *Pfugers Arch*, 2013, 465(7): 1031-1040.
- [3] Morito N, Yoh K, Hirayama A, et al. Nrf2 deficiency improves autoimmune nephritis caused by the fas mutation lpr[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(5): 1703-13.
- [4] Mink, P. J., Scrafford, C. G., Barraj, L. M., et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women[J]. *Am. J. Clin. Nutr*, 2007, 85: 895-909.
- [5] 杨乐, 邹晓静, 高翔. 丹参酮 II A 磺酸钠对 Ang II 诱导的心肌细胞氧化应激的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(4): 270-274.
- [6] 张红兵, 韩梅, 温进坤. 欧亚旋覆花总黄酮类提取物抑制内皮损伤诱导的血管氧化应激反应[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(5): 615-619.
- [7] 徐佳物, 董晓蕾, 郁郁. 淫羊藿总黄酮对高脂血症大鼠氧化应激水平的相关研究[J]. *河北中医*, 2012, 34(1): 111-114.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 171-172.
- [9] J. Ghosh, J. Das, P. Manna, et al. The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4857-4866.
- [10] G. Takemura, H. Fujiwara. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330-352.
- [11] L. Szweda, T. Oberley, D. St. Clair, et al. Oxidative Damage Precedes Nitrate Damage in Adriamycin-Induced Cardiac Mitochondrial Injury[J]. *Toxicologic Pathology*, 2004, 32(5): 536-547.
- [12] Elisabetta Aldieri, Loredana Bergandi, Chiara Riganti, et al. Doxorubicin Induces an Increase of Nitric Oxide Synthesis in Rat Cardiac Cells That Is Inhibited by Iron Supplementation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 185(2): 85-90.
- [13] X. Han, J. Pan, D. Ren, et al. Lou. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(9): 3140-3146.
- [14] Sehrlir O, Tozan A, Omurtag GZ, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 71(1): 301.
- [15] 吕风亚, 李义召, 徐龙宪, 等. 硒对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后 MDA、GSH-Px 及细胞凋亡的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2003, 10(4): 198.

(2015-06-29 收稿 责任编辑: 洪志强)