

正交试验法研究艳山姜挥发油保护脂多糖 诱导 HUVEC 损伤的活性组分

张彦燕, 令狐克刚, 陈妍, 陶玲, 张小金, 文波, 沈祥春*
(贵阳医学院天然药物优效利用重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:分析艳山姜挥发油(EOF AZ)保护脂多糖(LPS)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的主要活性组分。方法:将 EOF AZ 中含量较高的 4 个成分(α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇,莰烯)作为考察因素,每个因素选取有或无共 2 个水平,按 $L_8(2^7)$ 正交表设计分组与给药。运用四甲基偶氮唑盐(MTT)法和 NO 检测法,以细胞活力和细胞分泌 NO 为指标分析 EOF AZ 的主要药效物质基础。采用单成分分析法测定各成分不同浓度给药保护后细胞活力及培养上清液 NO 含量,观察 4 个成分对 LPS 诱导损伤的 HUVECs 的保护作用。结果:挥发油中 4 个成分均能明显提高细胞存活率,保护作用主次顺序为莰烯 > α -蒎烯 > 1,8-桉叶油醇 > β -蒎烯,4 个成分间均存在明显差异。单成分分析表明 4 个成分作用于 HUVECs 后,可提高细胞活力及培养上清液 NO 含量,且呈一定剂量相关性。结论:EOF AZ 对 LPS 诱导损伤的 HUVECs 具有保护作用,其中莰烯, α -蒎烯,1,8-桉叶油醇和 β -蒎烯为主要药效组分。

[关键词] 艳山姜挥发油; 脂多糖; 人脐静脉内皮细胞; 单成分分析法; 细胞活力

[中图分类号] R283.6;R285.5;R284.1;R282.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0009-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200009

[收稿日期] 20140627(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360650,81102664);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2011]2285 号);贵州省卫生厅科学技术基金项目(gzkwj2011-1-019);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合中药字[2012]5051 号);贵州省大学生创新创业训练项目(021203102)

[第一作者] 张彦燕, 硕士, 讲师, 从事心血管药理学研究, Tel:0851-6908628, E-mail: chinazyy201@163.com

[通讯作者] * 沈祥春, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药民族药活性及效应机制研究, Tel:0851-6908108, E-mail: shenxiangchun@126.com

用质量分数 0.1% ~ 0.3%, 本文采用泊洛沙姆 407 和 HA 的混合基质作为温度敏感型眼用即型凝胶的基质, 通过质量分析, 符合制剂要求。

[参考文献]

[1] Rozier A, Mazuel C, Grove J, et al. Gelrite: A novel, ion-activated, *in-situ* gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol[J]. Int J Pharm, 1989, 57(1):163.

[2] Pital S S, Paradkar A R, Mahadik K R, et al. Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B12. Part I: preformulation study[J]. Int J Pharm, 2004, 270(1):37.

[3] 魏刚. 体温敏感型眼用凝胶的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.

[4] Balasubramaniam J, Kant S, Pandit J K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the Gelrite gellan gum-based ocular delivery system for indomethacin[J]. Acta Pharm, 2003, 53(4):251.

[5] 王豫辉. 透明质酸及其钠盐在药物制剂中的应用[J]. 食品与药品, 2005, 7(8A):10.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:1110.

[7] 代龙. 熊胆眼用即型凝胶的制备及评价[J]. 中成药, 2009, 31(8):1203.

[8] 王志钢, 臧琛, 李慧, 等. 丹葛明目即型凝胶的定量测定及体外释放研究[J]. 中成药, 2012, 34(4):682.

[责任编辑 刘德文]

Main Ingredients of Essential Oil from Fructus Alpiniae Zerumbet in Protecting HUVECs Injury Induced by Lipopolysaccharide Using Orthogonal Test

ZHANG Yan-yan, LING-HU Ke-gang, CHEN Yan, TAO Ling,
ZHANG Xiao-jin, WEN Bo, SHEN Xiang-chun*

(Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources,
Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze main ingredients of essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet (EOFAZ) against human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** Four factors were selected from EOFAZ (α -pinene, β -pinene, 1, 8-eucalyptol, camphene) as research object, each factor was selected two levels, including contained or not contained, experiment was arranged according to $L_8(2^7)$ Orthogonal test table. MTT activities and NO detection were used as indexes and data were analyzed by SPSS software. In component analysis method, protective effects of ingredients with different concentrations were assayed by testing cell viability and NO contents in medium. **Result:** Protective extent of four factor was camphene > α -pinene > 1, 8-eucalyptol > β -pinene, there were significant differences among these ingredients. Single component analysis showed that pretreatment with ingredients at different concentrations could obviously enhance cell viabilites and NO contents, and effects had dose-dependent. **Conclusion:** EOFAZ has a protective effect on HUVECs injury induced by LPS, and camphene, α -pinene, 1, 8-eucalyptol, β -pinene are main active components.

[Key words] essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet; lipopolysaccharide; human umbilical vein endothelial cells; single component analysis; cell viability

各种损伤刺激、心血管危险因素均首先作用于血管内皮,通过启动炎症反应诱发加重心血管系统疾病。艳山姜具有抗氧化、镇痛、降血脂、抗高血压等药理作用^[1-2]。课题组前期研究发现艳山姜挥发油(essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet, EOFAZ)可通过改善一氧化氮-一氧化碳合酶(NO-NOS)信号通路及抑制核因子NF- κ B的激活,减少炎症因子(TNF- α , IL-1, IL-6等)及黏附因子(ICAM-1等)的释放,增加血管内皮舒张因子NO的分泌与释放,对脂多糖诱导损伤的血管内皮具有保护作用^[3]。

艳山姜主要化学成分为挥发油类、黄酮类、二萜类和有机酸类等化合物,其中挥发油为主要活性部位^[1-2]。挥发油中物质成分较多,Lahlou等^[4]发现艳山姜叶挥发油中主要成分为松油烯-4-醇,具有直接松弛血管的作用,且不依赖于交感神经系统。但有关艳山姜保护血管内皮炎症损伤的活性组分研究尚无报道,故本实验以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)炎症损伤为模型,观

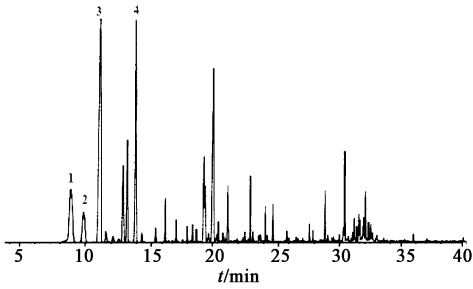
察EOFAZ中含量较高的4个成分 α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇及蒎烯的作用,以明确EOFAZ的主要活性物质组分。

1 材料

CK40-F200型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),ELX800型酶联免疫检测仪(美国GE公司),HP6890-HP5973型GC-MS联用仪(美国惠普公司)。艳山姜采集自贵州省贞丰县连环乡,经贵阳医学院药学院生药学与药用植物学教研室陈祖云教授鉴定为姜科植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith 的干燥成熟果实;内皮细胞培养液、胰蛋白酶、冻存液、人脐静脉内皮细胞(HUVECs)均购自美国 Sciencell 公司,四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolium, MTT, 美国 Sigma 公司),DMEM 培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所),二甲基亚砷(DMSO, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),脂多糖(LPS, 美国 Sigma 公司), α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇及蒎烯对照品(阿拉丁公司,批号分别为 K1206047, 18248, A1329043, 39342)。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取 按照《中国药典》2010 年版一部水蒸气蒸馏法提取挥发油,所得馏分用乙醚萃取,回收乙醚后以无水硫酸钠脱水,计算挥发油收率 1.3%。采用 GC-MS 联用技术分析挥发油成分,色谱条件和方法已另文报道^[5]。结果 α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇及蒎烯在药材全果挥发油的质量分数分别为 9.275%,5.056%,10.956%,10.120%。4 个成分分别用 DMSO 溶解,加入 DMEM 培养基配制药液(DMSO 质量分数 <0.02%),见图 1。



1. α -蒎烯;2. 蒎烯;3. β -蒎烯;4. 1,8-桉叶油醇

图 1 艳山姜挥发油 GC

2.2 细胞培养 本室传代培养 HUVECs,常规方法复苏 HUVECs,加入内皮细胞培养基后于 37 °C,5% CO₂ 的湿热培养箱中培养,视具体情况换液及传代培养,取对数生长期的细胞用于试验。

2.3 艳山姜挥发油对 HUVECs 保护作用 取对数生长期 HUVECs 计数后以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。试验分为 3 组:正常对照组采用正常细胞培养(DMEM,pH 7.2~7.3),模型组为脂多糖(LPS,15 mg·L⁻¹,共同孵育 12 h),EOFAZ 组(4 μ g·L⁻¹)。EOFAZ 干预保护 1 h,加入 LPS 复制 HUVECs 炎性损伤模型。利用 MTT 法测定细胞活力,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,震荡 10 min,运用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测定各孔吸光度(A),每组设 6 个复孔,重复 3 次,各组的 A 以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果分别为 0.294 ± 0.009 , 0.258 ± 0.016 , 0.278 ± 0.008 。结果表明与对照组相比,模型组细胞活力显著降低($P < 0.05$),预先给予 EOFAZ 干预保护后,细胞活力较模型组明显增加($P < 0.05$),说明 4 μ g·L⁻¹ EOFAZ 干预给药后,对 LPS 炎性损伤的 HUVECs 具有保护作用。

2.4 正交试验考察 将对数生长期 HUVECs 接种于 96 孔板,按 L₈(2⁷) 正交表进行分组给药,选择 α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇及蒎烯质量浓度为考

察因素,分别以各成分占 4 μ g·L⁻¹ EOFAZ 中相应含量为水平 1,以不含相应物质成分为水平 2,应用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 *t* 检验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对细胞活力影响的顺序为 $D > A > C > B$ 。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明 4 个成分间均存在明显差异,其中蒎烯和 α -蒎烯具有极显著性影响。

表 1 艳山姜挥发油保护脂多糖诱导损伤 HUVEC 的活性组分正交试验安排及直观分析

No.	A α -蒎烯 / μ g·L ⁻¹	B β -蒎烯 / μ g·L ⁻¹	C 1,8-桉叶油醇 / μ g·L ⁻¹	D 蒎烯 / μ g·L ⁻¹	A ₄₉₀
1	0.371	0.202	0.438	0.405	0.182
2	0.371	0.202	0	0	0.192
3	0.371	0	0.438	0	0.193
4	0.371	0	0	0.405	0.204
5	0	0.202	0.438	0	0.219
6	0	0.202	0	0.405	0.222
7	0	0	0.438	0.405	0.225
8	0	0	0	0	0.164
K ₁	0.193	0.204	0.204	0.208	
K ₂	0.207	0.196	0.196	0.192	
R	0.015	0.008	0.009	0.016	

表 2 活性成分筛选方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.001 78	1	42.427	<0.01
B(误差)	0.000 45	1	10.785	<0.05
C	0.000 62	1	14.833	<0.05
D	0.002 04	1	48.607	<0.01
误差	0.000 13	3		

注: $F_{0.05}(1,3) = 7.71$, $F_{0.01}(1,3) = 34.1$ 。

2.5 单成分分析法 分别以 4 μ g·L⁻¹ EOFAZ 中 α -蒎烯, β -蒎烯,1,8-桉叶油醇,蒎烯含量的 2 倍(0.742,0.404,0.876,0.810 μ g·L⁻¹)和 50 倍(18.55,10.10,21.90,20.25 μ g·L⁻¹)质量浓度给药,观察对 HUVECs 的保护作用。取对数生长期 HUVECs 接种于 96 孔板,采用 MTT 法检测细胞活力,按试剂盒说明书测定培养上清液 NO 含量,结果见表 3,4。表明与对照组相比,模型组细胞活力明显降低($P < 0.05$),4 个成分以不同质量浓度干预给药后均能明显提高 HUVECs 细胞活力($P < 0.05$); α -蒎烯(18.55 μ g·L⁻¹), β -蒎烯(10.1

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 1, 8-桉叶油醇 ($21.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 及蒎烯 ($0.81 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 均能增加培养上清液中 NO 含量 ($P < 0.05$), 蒎烯 ($20.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著增加 NO 含量 ($P < 0.01$)。

表 3 单成分分析法测定艳山姜挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{490}	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白		0.153 ± 0.016	189.471 ± 26.318
模型		$0.128 \pm 0.009^{1)}$	$115.577 \pm 30.450^{2)}$
α -蒎烯	0.742	$0.1454 \pm 0.002^{3)}$	119.045 ± 24.237
	18.55	$0.154 \pm 0.0003^{3)}$	$139.830 \pm 26.407^{4)}$
β -蒎烯	0.404	$0.150 \pm 0.009^{3)}$	117.472 ± 26.481
	10.1	$0.154 \pm 0.0114^{3)}$	$125.240 \pm 23.478^{3)}$

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 4 单成分分析法测定艳山姜挥发油中蒎烯和 1,8-桉叶油醇的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{490}	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白		0.19 ± 0.008	224.652 ± 24.307
模型		$0.149 \pm 0.009^{1)}$	$137.038 \pm 19.271^{2)}$
1,8-桉叶油醇	0.876	$0.171 \pm 0.005^{3)}$	139.284 ± 25.413
	21.9	$0.181 \pm 0.009^{3)}$	$155.010 \pm 28.423^{3)}$
蒎烯	0.81	$0.179 \pm 0.010^{3)}$	$143.777 \pm 28.451^{3)}$
	20.25	$0.183 \pm 0.005^{3)}$	$175.229 \pm 29.45^{4)}$

3 讨论

内皮功能的损伤(如炎症、氧化应激等)是导致心血管疾病发生的病理学基础,其中内皮细胞炎症性损伤几乎贯穿于心血管疾病的始终^[6-7]。LPS 为经典致炎物质,其诱导的炎症反应主要由 TLR4 跨膜受体介导,促进各种炎症因子基因表达的激活^[8]。本文采用 LPS 损伤 HUVECs 建立内皮炎症性细胞损伤模型,观察挥发油及其主要物质成分对内皮炎症性损伤的保护作用。由于中药所含物质成分复杂,本文通过对多个组分进行细胞活力考察,以相对含量较高的 4 个组分进行活性组分筛选。试验以物质基

础基本明确的组分配伍,通过正交试验筛选有效组分,符合中医药特色。结果显示蒎烯, α -蒎烯,1,8-桉叶油醇及 β -蒎烯对 LPS 诱导损伤 HUVECs 均具有保护作用,而且保护作用均存在明显差异。单成分分析法表明 4 个成分干预给药后能增加内皮舒张因子 NO 的分泌与释放,改善内皮的功能状态,且具有一定剂量相关性。本文研究发现蒎烯, α -蒎烯,1,8-桉叶油醇及 β -蒎烯为艳山姜果实挥发油中主要活性组分,4 个组分既能提高内皮细胞活力,还能改善血管内皮的功能状态,体现中医药多成分、多靶点综合治疗的特点。

[参考文献]

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:187.
- [2] 张彦燕,沈祥春. 艳山姜化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2010,26(5):179.
- [3] Tao L, Hu H S, Shen X C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings *in vitro* [J]. Phytomedicine, 2013, 20(5):387.
- [4] Lahlou S, Interaminense L F L, Duarte G P, et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, tepinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats [J]. Fund Clin Pharmacol, 2003, 17(3):323.
- [5] 沈祥春,胡涵帅,肖海涛. GC-MS 分析艳山姜根茎、茎、叶及果实等部位挥发油化学成分[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8):1399.
- [6] Stoletov K, Fang L, Choi S H, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. Circ Res, 2009, 104(8):952.
- [7] Moore K J, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Cell, 2011, 145(3):341.
- [8] Timmers L, Sluijter J P, Hoefler I E, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function following myocardial infarction [J]. Circ Res, 2007, 102(2):257.

[责任编辑 刘德文]