

# 生脉注射液对人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤保护的主要活性部位研究

蒋胜兰, 朱丹妮, 余伯阳\*  
(中国药科大学, 南京 211198)

**[摘要]** 目的:探索生脉注射液对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)缺氧复氧损伤保护的物质基础。方法:使用半制备型HPLC将生脉注射液分成3个极性部位,采用HUVEC缺氧复氧损伤模型分别检测各极性部位对缺氧复氧损伤的保护活性。结果:50~80 min洗脱部位对HUVEC缺氧复氧损伤模型保护活性最强,最大保护率达52.76%,经HPLC-MS鉴定,此部位主要含人参皂苷类物质。结论:生脉注射液中主要含人参皂苷的中等极性部位是HUVEC缺氧复氧损伤保护的主要活性部位。

**[关键词]** 生脉注射液;缺氧复氧损伤;活性部位

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0088-03

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1258.047.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-04 12:58

## Main Active Section on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Hypoxia/reoxygenation Injury Model in Shengmai Injection

JIANG Sheng-lan, ZHU Dan-ni, YU Bo-yang\*  
(Chinese Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the material basis of Shengmai injection by hypoxia/reoxygenation (H/R) injury. **Method:** Shengmai injection was separated into three fractions according to semi-preparative HPLC retention time to investigate their protective effects on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) H/R injury model, respectively. **Result:** 50-80 min elute was proved to be the main active section of Shengmai injection on HUVEC H/R injury model with the highest protection rate of 52.76%, HPLC-MS analysis indicated that ginsenosides were the main active component in this fraction. **Conclusion:** The medium-polar fraction containing ginsenosides showed most remarkable protective effects on HUVEC H/R injury in Shengmai injection.

**[Key words]** Shengmai injection; hypoxia/reoxygenation injury; active part

生脉注射液由人参、麦冬、五味子3味中药按一定比例配伍,用现代科学技术提取精制而成,广泛用于冠心病、心力衰竭、休克、病毒性心肌炎、急性心肌梗死、肺心病等的治疗<sup>[1-2]</sup>,临床疗效确切。在上述疾病中,生脉注射液主要作用于心肌缺血再灌注环节,当前研究认为缺血再灌注时引起的氧自由基

生成过多、线粒体能量合成障碍、细胞内钙超载、白细胞被激活,最终导致心肌细胞凋亡和死亡是心肌缺血再灌注损伤的主要机制<sup>[3]</sup>。研究表明,生脉注射液可以提高心肌对缺氧的耐受性<sup>[4]</sup>,但生脉注射液治疗这些疾病的物质基础鲜见报道。本文采用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)缺氧复氧损伤模型,探讨生脉注射液对HUVEC缺氧复氧损伤保护的主要活性部位,为探明生脉注射液的药效物质及作用途径研究提供实验依据。

### 1 材料

**1.1 仪器** Waters 600型高效液相色谱仪, Waters996型PDA检测器(美国Waters公司), Agilent 1100型高效液相色谱仪-离子阱质谱检测仪

**[收稿日期]** 20120215(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(3097396);“十一五”国家科技支撑计划项目(2008BAI51B03)

**[第一作者]** 蒋胜兰, 硕士, Tel: 15895958793, E-mail: jiangshenglan288@163.com

**[通讯作者]** \*余伯阳,教授,博士生导师,从事中药复方现代化研究, E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

(LC/MSD,美国 Agilent 公司),Mettler AE240 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),Buchi Rotavapor R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),Hedera ODS-2 柱(10 mm × 250 mm, 10 nm, 5.0 μm),Alltima C<sub>18</sub> 柱(250 mm,美国 Alltech 公司),细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司),酶标仪(Sunrise,奥地利 TECAN 公司)。

**1.2 药物与试剂** 生脉注射液(江苏苏中药业提供,批号 10070203),RPMI 1640 干粉培养基(GIBICO),新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司),甲醇(色谱纯,上海凌峰化学试剂有限公司),噻唑蓝(MTT,AMRESCO),低亚硫酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 T20090306)。

**1.3 细胞** 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),购于南京凯基生物科技有限公司,经Ⅷ因子鉴定为 HUVEC。

## 2 方法

样品制备 HPLC 洗脱程序:A(水)-B(乙腈):0~30 min, 8%~18% B;30~80 min, 18%~50% B;80~115 min, 50%~100% B;115~120 min, 100%~8% B<sup>[5]</sup>。样品 1:生脉注射液;样品 2:进样 100 μL 生脉注射液,收集 120 min 全洗脱部分;样品 3:2 次进样间用甲醇冲洗 30 min,收集洗脱液;样品 4:收集 0~50 min 样品洗脱液,样品 5:收集 50~80 min 样品洗脱液;样品 6:收集 80~120 min 样品洗脱液。各部分样品减压回收溶剂,冷冻干燥,备用。

**2.1 洗脱部分质量百分比测定** 取生脉注射液(样品 1)与同等量生脉注射液经 HPLC 分离,收集所得的样品 2 及样品 3,称质量,计算质量百分比。

**2.2 各洗脱部位对 HUVEC 细胞缺氧复氧模型的保护作用** 实验设置:对照组,模型组,加药组。样品 1~6 的 1:200,1:400,1:800 3 个稀释浓度,每组 3 个平行孔。培养瓶中 HUVEC 处于对数生长期时,用 0.15% 的胰酶消化,收集细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  /mL,接至 96 孔板,每孔 100 μL。继续培养 24 h,弃去培养基,每孔加入 100 μL 低亚硫酸钠( $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )缺氧 1 h,吸除低亚硫酸钠,正常通氧复氧 1 h,复氧时各加药组分别同时加入各样品 100 μL,空白组以 PBS 替代。每孔加入 100 μL MTT ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),孵育 4 h 后吸除 MTT,加入 DMSO 150 μL,振摇 10 min。于 570~640 nm 测定吸光度,依据结果计算样品对 HUVEC 缺氧复氧损伤模型的保护率。

**2.3 HPLC-MS 鉴别生脉注射液主要活性部位的主**

要成分 将样品 5(50~80 min 洗脱段)进行 HPLC-MS 分析。流动相 A(0.02% HAc 水)-B(0.02% HAc 乙腈)洗脱程序:0~10 min, 20% B;10~40 min, 20%~40% B;40~50 min, 40% B;50~60 min, 50% B;60~65 min, 50% B。检测波长 200 nm。质谱条件:采用氮气作为去溶剂气(流速  $9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,去溶剂温度  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ,毛细管电压 3.5 kV),扫描相对分子质量范围 200~1 400,正、负离子模式分别扫描。

## 3 结果

**3.1 洗脱部分质量百分比测定** HPLC 全洗脱部分(样品 2)质量为等量生脉注射液的 83.30%,样品 3 质量(甲醇冲洗部分)为 2.55%,由此认为在本文使用的洗脱条件下,全洗脱部分可基本代表生脉注射液。生脉注射液在 203 nm 波长下的高效液相指纹图谱见图 1。

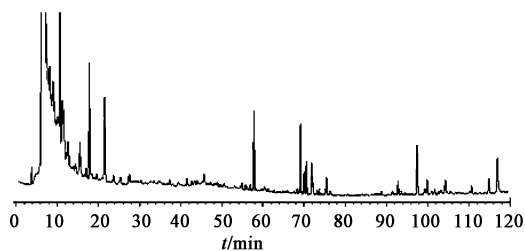


图 1 生脉注射液高效液相色谱

**3.2 各样品对 HUVEC 细胞缺氧复氧模型的保护** 结果显示,样品 2 的保护活性强于样品 1,样品 3 无保护活性,表明全洗脱部分从药效上可代表生脉注射液 HUVEC。样品 5(50~80 min 洗脱部位)3 个浓度均显示较强活性,浓度为 1:400 时,保护活性高达 74.19%,为样品 2(全洗脱部分)的 95.18%,由此说明该部位是生脉注射液对 HUVEC 细胞缺氧复氧模型保护作用的主要活性部位。各样品对 HUVEC 细胞缺氧复氧模型的保护率见表 1,在浓度 1:200 与 1:400 时,各样品相对于生脉注射液的活性百分率见图 2。

表 1 各样品对 HUVEC 缺氧复氧模型的保护率 %

样品号	浓度		
	1:200	1:400	1:800
1	54.33	28.35	7.08
2	74.80	77.95	16.89
3	0	0	0
4	33.86	9.45	0
5	52.76	74.19	13.18
6	9.45	7.08	0

**3.3 生脉注射液活性部位主要成分鉴别** 采用 HPLC-MS 鉴定样品 5 主要色谱峰,通过碎片信息与

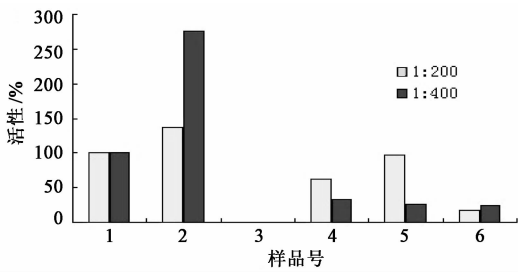


图 2 各样品 HUVEC 缺氧复氧损伤保护活性率

文献对照, 结合前期研究结果<sup>[5]</sup>, 鉴别出 10 个人参皂苷, 质谱主要碎片信息如表 2, 鉴别结果见图 3。

表 2 样品 5 质谱主要碎片信息

t/min	分子离子峰	特征碎片	化合物
25.1	[M-1] <sup>-</sup> 799	441, 423, 405	人参皂苷 Rf
25.4	[M-1] <sup>-</sup> 945	475, 441, 423, 405	人参皂苷 Re
36.3	[M-1] <sup>-</sup> 799 [M+Na] <sup>+</sup> 823	475, 441, 423, 405	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>
37.6	[M-1] <sup>-</sup> 1107	443, 425, 407	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>
38.2	[M-1] <sup>-</sup> 955	475, 795, 439	人参皂苷 Ro
38.9	[M+Na] <sup>+</sup> 1113	443, 425, 407	人参皂苷 Rb <sub>2</sub> /Rb <sub>3</sub> /Rc
40.1	[M-1] <sup>-</sup> 1077 [M+Na] <sup>+</sup> 1113	443, 425, 407	人参皂苷 Rb <sub>2</sub> /Rb <sub>3</sub> /Rc
41.6	[M-1] <sup>-</sup> 637	441, 423, 405	人参皂苷 Rh <sub>1</sub>
43.0	[M-1] <sup>-</sup> 945 [M+Na] <sup>+</sup> 969	459, 443, 425, 407	人参皂苷 Rd

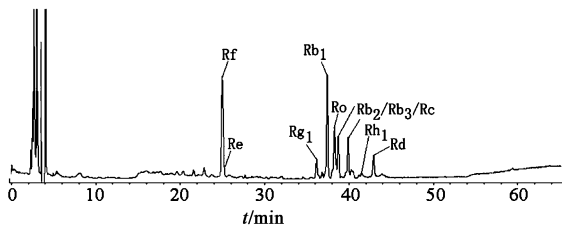


图 3 样品 5 HPLC 主要成分

#### 4 讨论

心肌缺血再灌注带来缺氧复氧损伤, 主要损伤心肌细胞及血管内皮细胞。本研究从血管内皮细胞的缺氧复氧损伤模型入手, 以高效液相指纹图谱为指导, 探寻生脉注射液对血管内皮细胞的缺氧复氧损伤保护作用的物质基础。各洗脱部位质量百分比测定实验表明, 在本研究条件下, 等量的样品 2 (全洗脱成分) 为生脉注射液质量的 83.30%, 可基本代表生脉注射液。依据指纹图谱主要峰群, 将生脉注射液分成 3 个极性部位分别进行药效研究。结果

表明, 生脉注射液 50 ~ 80 min 洗脱部位 (样品 5) 对 HUVEC 缺氧复氧损伤模型保护活性贡献最大, HPLC-MS 分析表明, 该部位主要含有 10 种人参皂苷。研究表明, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 能抑制缺氧复氧状态下内皮细胞的凋亡<sup>[6]</sup>, 对缺氧复氧损伤的肾小管细胞, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可通过升高 SOD 活性, 加速氧自由基清除和减少氧自由基生成发挥保护作用<sup>[7]</sup>。人参皂苷 Rd 能抑制钙内流<sup>[8]</sup>, 从而减少细胞内钙超载, 保护心肌细胞。有离体大鼠缺氧复氧模型心脏灌流实验证明, 人参总皂苷能升高左心室舒张压, 降低灌流液中 CK 和 LDH 的活性<sup>[9]</sup>, 具有明显的缺氧复氧损伤保护活性。

#### [参考文献]

- [1] 张瀚心. 生脉注射液药效学研究进展 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(3): 342.
- [2] 任红兵. 生脉注射液临床应用研究进展 [J]. 中医药信息, 2004, 21(6): 19.
- [3] Moens A L, Claeys M J, Timmermans J P. Myocardial ischemia reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process [J]. Int J Cardiol, 2005, 127(6): 179.
- [4] 党波, 商惠萍, 江丽. 生脉注射液对冠心病患者内皮功能的影响 [J]. 陕西中医, 2005, 26(7): 639.
- [5] Yan-Hui Wang, Cong Qiu. Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula Sheng-Mai San and rat plasma after oral administration by HPLC-DAD-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54: 1110.
- [6] 李江津, 刘正湘. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对缺氧复氧诱导内皮细胞凋亡的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21(12): 728.
- [7] 宋瑞, 盘强文, 林海英, 等. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与 Rg<sub>1</sub> 对肾小管细胞缺氧复氧损伤模型的影响 [J]. 中国药房, 2007, 18(10): 736.
- [8] Guan Yong-Yuan, Zhou Jia-Guo, Zhang Zheng. Ginsenoside-Rd from *Panax notoginseng* blocks Ca<sup>2+</sup> influx through receptor-and store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle cells [J]. Eur J Pharm, 2006, 548(1-3): 129.
- [9] Tae-Hoon Kim, Sun-Mee Lee. The effects of ginseng total saponin, panaxadiol and panaxatriol on ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6): 1516.

[责任编辑 邹晓翠]