

基于去甲肾上腺素诱发原代培养心肌细胞
损伤保护作用的太子参药效部位研究

肖婷婷¹, 彭佼¹, 陶玲², 沈祥春^{1*}

(1. 贵阳医学院药理研究室, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院药剂学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**研究太子参对去甲肾上腺素(NE)诱发原代培养心肌细胞损伤保护作用的活性部位。**方法:**采用系统溶剂分离制备提取太子参石油醚,乙酸乙酯,正丁醇及水层部位。取 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠制备原代培养心肌细胞,以 1×10^5 /mL 的细胞密度接种于 96 孔培养板,以相当于生药 0.1~0.25 g·mL⁻¹ 的太子参不同提取部位作用于原代培养心肌细胞 30 min 后,以 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NE 作用于心肌细胞 24 h 复制细胞损伤模型,MTT 法分析不同提取部位太子参的保护作用。**结果:**正丁醇和水层提取部位对 NE 诱导原代培养心肌细胞损伤吸光度(A_{570})降低具有显著的提高作用;进一步分析提示 0.1 g·mL⁻¹ 和 0.25 g·mL⁻¹ 太子参 25% 乙醇洗脱正丁醇部位和多糖物质群对 NE 诱导心肌细胞 A_{570} 的降低保护作用显著(与模型组比较,差异显著, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**初步的活性筛选发现太子参的正丁醇部位和水层部位对 NE 诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,进一步的活性追踪确定正丁醇部位经 25% 乙醇洗脱物质群及水层中的粗多糖为太子参防治 NE 诱导的心肌细胞损伤的主要活性物质群。

[关键词] 太子参; 原代培养心肌细胞; 去甲肾上腺素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0125-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111226.1611.004 **[网络出版时间]** 2011-12-26 16:11

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111226.1611.004.html>

Protection of Effective Fractions from *Pseudostellariae Radix* on Primary Cultured Cardiac Myocytes Injury Induced by Norepinephrine *in vitro*

XIAO Ting-ting¹, PENG Jiao¹, TAO Ling², SHEN Xiang-chun^{1*}

(1. Research Division of Pharmacology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Department of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protection of active fractions from *Pseudostellariae Radix* on primary cultured cardiac myocytes injury induced by norepinephrine (NE). **Method:** four fractions from *Pseudostellariae Radix*: petroleum ether extract, acetic ether extract, N-butanol extract, and water extract, were obtained by systematic solvent extraction. The primary cultured cardiac myocytes were prepared from the 1-3 d SD neonatal rat, and then 200 μL cell suspension was cultured in 96 well plates by 1×10^5 /mL. Preincubated with different fractions extracted from 0.1, 0.25 g crude *Pseudostellariae Radix* /mL 30min, and then the cardiac myocytes injury was reproduced by $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NE for 24 h. The degree of cardiac myocytes injury was detected by MTT assay. **Result:** The N-butanol and water fractions extracted from *Pseudostellariae Radix* could significantly protect primary cultured cardiac myocytes against NE-induced injury by increasing the A_{570} ($P < 0.05$ compared

[收稿日期] 20110904(002)

[基金项目] 贵州省国际科技合作项目黔科合外 G 字[2009]700115 号; 贵州省科技攻关项目(黔科合 SY[2011]3010 号); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室开发课题(P09003)

[第一作者] 肖婷婷, 香港浸会大学博士在读, 从事中药活性及毒性物质基础研究

[通讯作者] * 沈祥春, 教授, 博士后, 硕士研究生导师, 从事心血管系统药物药理及中药民族药活性研究, Tel:0851-6908108, E-mail: shenxiangchun@126.com

with NE group). Further studies suggested that *N*-butanol fraction eluted by 25% ethanol and polysaccharides fraction extracted from water fraction at 0.1, 0.25 g crude *Pseudostellariae Radix* /mL could significantly inhibit the decrease of A_{570} induced by NE ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Primary screening of bioactive fractions indicated that the *N*-butanol and water fractions extracted from *Pseudostellariae Radix* protect primary cultured cardiac myocytes against NE-induced injury. Further studies showed that *N*-butanol extract eluted by 25% ethanol and polysaccharides from *Pseudostellariae Radix* are the major bioactive fractions which inhibit NE-induced primary cultured cardiac myocyte injury.

[Key words] *Pseudostellariae Radix*; primary cultured cardiac myocytes; norepinephrine

太子参为石竹科植物孩儿参的干燥块根。中医临床主要用于治气虚肺燥,补脾土,消水肿,临床应用往往能收到益气不升提、生津不助湿、扶正不恋邪、补虚不峻猛之效,为药食两用的重要药物^[1]。本实验室的前期研究结果证实,太子参水煎液对急性心肌梗死后诱发慢性心衰具有显著的改善作用^[2-3]。大量的研究证实,心血管系统疾病与高交感活性密切相关,尤其是心力衰竭病变过程中,高交感活性诱发心肌细胞凋亡与肥大成为目前心力衰竭研究的热点。因此,本研究采用系统溶剂提取制备太子参活性部位,建立去甲肾上腺素(NE)诱发原代培养心肌细胞模型,初步探讨太子参可能的效应活性部位。

1 材料

1.1 药物的制备 药材太子参购自贵阳市三桥药材批发市场,经贵阳医学院药学院龙庆德老师鉴定,为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根。取一定量的太子参,择去杂质,称重,按药材与溶媒(水)质量与体积比为 1:10 煎煮 3 次,每次 1 h,合并提取液,抽滤,减压浓缩至适量。分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇反复萃取数次,合并萃取液,减压回收溶剂,得太子参石油醚(得率 0.34%)、乙酸乙酯(得率 0.59%)、正丁醇(得率 0.98%)和水层(得率 24.11%),共 4 个部位,备用。取太子参正丁醇部位浸膏 5 g,用适量热水分散(少量甲醇助溶, $V_{\text{甲醇}} < 3$ mL),冷却,上预处理好的 D-101 型大孔树脂柱(内径 1.5 cm,长 5~10 cm)上,先用蒸馏水洗至无浑浊,再分别用 25% 乙醇,50% 乙醇,75% 乙醇各 2 000 mL,分段洗脱,收集洗脱液,合并同段洗脱液,减压回收溶剂,得太子参 25% 乙醇(得率 73.47%)、50% 乙醇(得率 10.20%)、75% 乙醇(得率 5.10%),3 个部位,备用。取太子参水层部位浸膏 20 g,加入适量的热水使溶解,放置冷却,按照体积比 1:3 加入 Sevag 试剂(氯仿-正丁醇 5:1)沉淀蛋

白,反复多次,分离水层,合并水层液,减压浓缩至适量,加入 95% 的乙醇使含醇量达 80%,4 ℃ 静置过夜,抽滤,收集沉淀并将沉淀先后用 95% 乙醇,无水乙醇,丙酮依次洗涤,60 ℃ 烘干得太子参粗多糖(得率 38.4%),备用^[4]。

1.2 动物 SD 大鼠 1~3 d 乳鼠,雌雄不拘,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2002-0001。

1.3 试剂 DMEM 高糖、低糖培养基, Gibco 公司;胰蛋白酶,华美公司;新生胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;重酒石酸去甲肾上腺素,河南新宜医药集团精细化工有限公司;噻唑蓝(MTT),华美公司;二甲基亚砷(DMSO,分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.4 仪器 HH-601 超级恒温水浴箱(江苏金坛市环宇科学仪器厂),TDL-4ZB 台式低速自动平衡离心机(湖南星科科学仪器有限公司),BS223S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),RE-52A 旋转蒸发器(河南巩义市英峪予华仪器公司),DG 5031 型酶联免疫检测仪(华东电子集团医疗装备有限公司)。

2 方法

2.1 心肌细胞分离培养^[5] 取出生 1~3 d 内的 SD 大鼠乳鼠 10 只,置于 75% 的乙醇中浸泡消毒,固定四肢,剪开胸部组织,迅速取出心脏,去除大血管和心房,放入盛有预冷的 PBS 中洗去残余的血细胞,清洗 3 遍后,在三角瓶壁上将心室剪碎成约 1 mm³左右的小组织块,加入 10 mL 左右的 0.1% 的胰蛋白酶,于 37 ℃ 水浴消化 4~6 次,每次约 10 min。自然沉淀后,收集除第 1 次以外的细胞悬液于离心管中,加入含小牛血清的培养液,终止胰酶消化,先用 *D*-Hank's 液吹打洗涤细胞 2 次,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,然后用含有 10% 小牛血清的 DMEM (pH 7.2) 将细胞充分吹打稀释,制成细胞悬液。按上述方法将自然沉淀的组

织块反复消化,直至完全消化为止。按差速贴壁分离法纯化心肌细胞。将上述悬液接种于 50 mL 培养瓶中,置 5% CO₂ 培养箱 36.8~37.2 °C 培养 2~3 h,先贴壁的是成纤维细胞。然后将未贴壁心肌细胞吸出,台盼蓝染色后用细胞培养板计数,调整细胞数,以 1×10^5 密度接种于 96 孔细胞培养板上,200 μ L/孔,培养液中加入 0.1 mmol·L⁻¹ 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷抑制非心肌细胞生长,可使心肌细胞纯度达到 90% 以上,置 5% CO₂ 培养箱 37 °C 继续培养,待细胞铺满孔底,形成融合状态和自主节律跳动后用于以下研究。

2.2 检测前处理 移去培养液,并用无血清的低糖 DMEM 洗 2 次,再换含体积分数为 0.4% 小牛血清的低糖 DMEM (维持液) 作用 48 h 以抑制细胞于 G₀/G₁ 期,48 h 更换维持液^[6]。

2.3 药物安全浓度筛选 以终浓度相当于太子参生药量 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g·mL⁻¹ 的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水层部位与原代培养心肌细胞作用 24 h, 每个浓度重复 6 个复孔。24 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹) 20 μ L, 37 °C 继续培养 4 h。终止培养后吸弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡混匀, 然后在酶联免疫检测仪, 570 nm 波长处测定各孔吸光度 (A), 结果以 A 表示, 各组吸光度与空白对照组相比得 MTT 还原率^[7]。

$$\text{MTT 还原率} = \frac{\text{实验组 } A}{\text{对照组 } A} \times 100\%$$

2.4 模型复制 选择 NE 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} mol·L⁻¹ 进行试验, 选用细胞存活率约为 60% 的浓度为试验复制模型浓度。选择 3, 6, 12, 24, 36 h 作为分析损伤的时间点, 选用细胞存活率在 60% 左右的时间点为试验复制模型时间。NE 对心肌细胞的损伤随着浓度的增大而增强, 当浓度在 1 μ mol·L⁻¹ 时, 细胞存活率在 61.15%, 同时 NE 对心肌细胞的损伤随着时间的延长而增强, 用 1 μ mol·L⁻¹ NE 对心肌细胞持续作用达 24 h, 细胞存活率在 61.32%, 因此, 本实验研究选用 1×10^{-6} mol·L⁻¹ NE 作用心肌细胞 24 h 复制细胞损伤模型。

2.5 药效部位研究 以终浓度相当于太子参生药量 0.1, 0.25 g·mL⁻¹ 的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水层部位、25% 乙醇洗脱正丁醇部位、50% 乙醇洗脱正丁醇部位、75% 乙醇洗脱正丁醇部位及多糖部位, 各部位与原代培养心肌细胞共培养 30 min 后, 加入终浓度为 1×10^{-6} mol·L⁻¹ NE 继续作用 24 h, 每个

实验重复 6 个复孔。随后加入 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹) 20 μ L, 37 °C 继续培养 4 h, 进行 MTT 分析, 具体方法见 2.3。

2.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行单因素方差分析, 并作多重比较。P < 0.05 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 药物安全浓度筛选 石油醚部位提取物以生药量计 (下同) 0.1~4.0 g·mL⁻¹ 与原代培养心肌细胞作用 24 h 后, 实验结果提示石油醚部位质量浓度在 4.0 g·mL⁻¹ 时心肌细胞 MTT 还原率显著下降, 质量浓度在 0.1~2.0 g·mL⁻¹ 心肌细胞 MTT 还原率无明显变化, 提示该浓度范围对细胞未见明显毒性。乙酸乙酯部位质量浓度在 4.0 g·mL⁻¹ 时心肌细胞 MTT 还原率显著下降, 浓度在 0.1~2.0 g·mL⁻¹ 心肌细胞 MTT 还原率无明显变化, 提示该浓度范围对细胞未见明显毒性作用。正丁醇部位质量浓度 > 2.0 g·mL⁻¹ 时心肌细胞 MTT 还原率明显下降, 浓度在 0.1~1.0 g·mL⁻¹ 心肌细胞 MTT 还原率无明显变化, 表明该浓度范围对细胞未见明显毒性作用。水层部位质量浓度为 1.0 g·mL⁻¹ 时心肌细胞 MTT 还原率明显下降, 质量浓度在 0.1~0.5 g·mL⁻¹ 心肌细胞 MTT 还原率未见明显变化, 表明该浓度范围未见明显细胞毒性。

3.2 不同部位对 NE 诱导的心肌细胞损伤的保护作用 不同部位的提取物 0.1~0.25 g·mL⁻¹ 与原代培养心肌细胞作用 30 min 后, 根据 2.3 复制 NE 诱导心肌细胞损伤模型, 结果提示不同浓度的正丁醇部位和水层部位预处理心肌细胞后可明显降低 NE 对原代培养心肌细胞的损伤, 具有统计学意义, 石油醚部位和乙酸乙酯部位未见显著保护作用 (表 1)。

3.3 正丁醇部位和水层部位有效物质群对 NE 诱导的心肌细胞损伤的保护作用 经活性追踪发现 0.1, 0.25 g·mL⁻¹ 的正丁醇部位经 25% 乙醇洗脱物质群及粗多糖预处理心肌细胞后可明显减弱 NE 对心肌细胞的损伤, 具有统计学意义。而正丁醇部位经 50% 和 75% 乙醇洗脱物质群均未见明显改善 NE 诱导的心肌细胞损伤作用 (表 2)。

4 讨论

太子参为常用中药, 味甘, 微苦, 性微寒, 为民间公认的补益药, 具有益气生津, 补脾润肺的功效。临床报道其与其他药物配伍可治疗肝炎、恶性肿瘤、晚期癌症、病毒性脑炎、糖尿病、冠心病、动脉粥样硬

表 1 太子参不同部位提取物对 NE $1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导心肌细胞损伤 A_{570} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	生药质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	A_{570}	MTT 还 原率/%
正常对照	—	0.36 ± 0.04	100.00
NE 模型	—	$0.23 \pm 0.04^{2)}$	63.41
石油醚部位	0.1	0.25 ± 0.04	79.52
	0.25	0.24 ± 0.02	76.39
乙酸乙酯部位	0.1	0.25 ± 0.04	80.82
	0.25	0.25 ± 0.04	82.28
正丁醇部位	0.1	$0.27 \pm 0.03^{3)}$	86.93
	0.25	$0.28 \pm 0.05^{3)}$	91.73
水层	0.1	$0.28 \pm 0.05^{3)}$	89.63
	0.25	$0.27 \pm 0.02^{3)}$	88.01

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 NE 模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 太子参不同浓度乙醇洗脱正丁醇部位及粗多糖对 NE 诱导心肌细胞损伤 A_{570} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	生药质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	A_{570}	MTT 还原率 /%
正常对照	—	0.43 ± 0.02	100.00
NE 模型	—	$0.27 \pm 0.05^{2)}$	63.84
25% 乙醇洗脱	0.1	$0.36 \pm 0.03^{4)}$	82.70
	0.25	$0.35 \pm 0.04^{4)}$	81.84
50% 乙醇洗脱	0.1	0.31 ± 0.05	71.53
	0.25	0.31 ± 0.04	72.22
75% 乙醇洗脱	0.1	0.29 ± 0.02	66.59
	0.25	0.30 ± 0.06	69.78
多糖	0.1	$0.33 \pm 0.03^{3)}$	77.37
	0.25	$0.33 \pm 0.04^{3)}$	77.88

化、血栓闭塞性脉管炎、继发性再生障碍性贫血、白细胞减少症等^[8-9]。关于太子参对心肌梗死方面的药理作用尚未见报道,本课题组前期研究发现太子参水提物对心肌缺血具有明显的保护作用,但其发挥药理作用的物质基础尚不清楚,因此明确太子参的活性物质群对太子参的开发应用具有十分重要的现实意义。

本实验采用系统溶剂法按极性大小将太子参的水提物划分为石油醚、乙酸乙酯、正丁醇以及水层部位,通过 MTT 法,以 NE 诱导的心肌细胞损伤模型进行活性筛选,发现正丁醇和水层部位能明显提高心肌细胞的存活率。

太子参的化学成分较为复杂,据相关文献报道,太子参主要含有苷类、环肽类、糖类、磷脂类、脂肪酸类、挥发油类、及甾醇类等成分。黄文哲等人对太子参进行提取研究表明太子参的正丁醇部位主要含有苷类成分^[10],而水层的极性较大,主要含糖类等成

分^[11-12]。近年来,大孔吸附树脂广泛应用于皂苷、黄酮、生物碱类成分的纯化和富集^[13-14]。本试验采用了大孔吸附树脂对太子参正丁醇部位进行进一步的纯化,水层部位采用 Sevag 法进行多糖制备^[15]。进一步的活性追踪发现正丁醇 25% 乙醇洗脱部分和粗多糖可降低 NE 诱导的心肌细胞损伤作用,为深入研究太子参在心血管方面新的药理作用奠定了物质基础。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2005 :46.

[2] 沈祥春,陶玲,彭佼,等.太子参对心肌梗死后慢性心衰大鼠心肌组织 NOS 表达的影响[J].中国病理生理杂志,2009,25(4):806.

[3] 沈祥春,彭佼,李淑芳,等.太子参正丁醇提取部位对大鼠急性心肌梗死诱发心肺损伤的保护作用[J].中华中医药杂志,2010,25(5):666.

[4] 韩丽,欧阳臻,李晓昕,等.茅苍术多糖的提取工艺研究[J].中成药,2007,29(12):1777.

[5] Shen X C, Qian Z Y, Wang Y J, et al. Crocetin attenuates norepinephrine-induced cytotoxicity in primary cultured rat cardiac myocytes by antioxidant *in vitro* [J]. JANPR,2009,11(5):417.

[6] 徐立,陶玲,喻斌,等.太子参多糖对 LPS 诱导原代培养心肌细胞损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2008,24(6):46.

[7] 张日东,白瑞苗,魏敬.盐酸小檗碱对大鼠肾小管上皮细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):165.

[8] 吴朝峰,林彦铨.药用植物太子参的研究进展[J].福建农林大学学报:自然科学版,2004,(4):426.

[9] 王文凯,贾静,丁仁伟,等.太子参近年研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):264.

[10] 黄文哲,柳燕,秦民坚,等.太子参提取物对小鼠免疫功能的影响[J].现代中药研究与实践,2005,19(6):35.

[11] 张陆军,丁怡,陈芸芸,等.太子参多糖制备工艺研究[J].中国中药杂志,2004,29(12):1201.

[12] 王西龙,王允,毕研平,等.太子参多糖提取工艺优选[J].现代医药卫生,2006,22(7):964.

[13] 何伟,李伟.大孔树脂在中药成分分离中的应用[J].南京中医药大学学报,2005,21(2):134.

[14] 周剑,丁玉峰.大孔吸附树脂分离中草药有效成分的应用[J].中国医院药学杂志,2006,26(1):69.

[15] 贺锋嘎,哈森其木格.芥菜多糖的研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(2):321.

[责任编辑 聂淑琴]