

麦冬酒制前后对内皮细胞缺氧保护作用的比较研究

焦艳 李喆 刘清新 于永军

【摘要】 目的 研究中药麦冬及其酒制炮制品对人脐静脉内皮细胞(EAHY926)缺氧损伤的保护作用。**方法** 体外培养 EAHY926, 采用通入缺氧气体建立缺氧损伤模型。用麦冬提取液干预后, 采用 MTT 比色法测定细胞活力、黄嘌呤氧化酶法测定细胞内超氧化物歧化酶活性、硫代巴比妥酸显色法测定丙二醛含量、硝酸还原酶法测定一氧化氮含量。**结果** 组间比较采用单因素方差分析, 两两之间用 SNK 检验。与模型组相比, 川麦冬生品提取液组、酒制川麦冬提取液组、杭麦冬生品提取液组、酒制杭麦冬提取液组均能显著提高细胞活力($P < 0.05$), 并且均显著提高缺氧后细胞超氧化物歧化酶活性($P < 0.05$)及降低丙二醛、一氧化氮的含量($P < 0.05$); 酒制川麦冬提取液组和酒制杭麦冬提取液组效果最佳, 与空白对照组比有非常显著性差异($P < 0.01$)。**结论** 麦冬酒制后更能显著拮抗缺氧对 EAHY926 的损伤。

【关键词】 麦冬; 酒制; 内皮细胞; 缺氧保护

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.009

Comparative study of protective effect of Radix Ophiopogonis processed Protective effect of Radix Ophiopogonis on hypoxia before and after being processed by wine-a comparative study JIAO Yan, LI Zhe, LIU Qing-xin, et al. Cangzhou Medical College of Pharmacy, Cangzhou 061001, China
Corresponding author: JIAO Yan, E-mail: jykycg@163.com

【Abstract】 Objective To study the Chinese medicine Radix Ophiopogonis and the protective role of its wine-processed products on hypoxia of human umbilical vein endothelial cells (EAHY926). **Methods** In vitro culture of EAHY926 was performed, which was exposed to hypoxic gas to establish models with hypoxic injury. After intervention by Radix extract, MTT colorimetry was used to determine cell viability, the xanthine oxidase method was adopted to detect the activity of superoxide dismutases (SOD) in cells, the thibabutaric acid developing method was adopted to assay malondialdehyde (MDA), and the nitrate reductase method was used to detect the content of nitric oxide (NO). **Results** Data collected was treated with one-way ANOVA, SNK test to make pairwise comparison. Compared with the model group, Ophiopogon japonicus extract raw chemicals group, wine extract Ophiopogon group, Hang Radix Ophiopogonis extract raw chemicals group, wine Hangzhou Radix Ophiopogonis extract group could significantly improve cell viability ($P < 0.05$), with respect to SOD activity during cell hypoxia ($P < 0.05$) and decrease MDA and NO levels ($P < 0.05$); wine extract Ophiopogon group and wine Hangzhou Radix Ophiopogonis extract group showed the sharpest increase among the groups, as exhibited significant difference compared with control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Wine-processed Radix Ophiopogonis was significantly effective in antagonizing the damage on EAHY926 caused by hypoxia.

【Key words】 Radix Ophiopogonis; Wine-processed product; Endothelial cells; Hypoxia protection

基金项目:沧州市科学技术研究与发展指导计划(1213145ZD)

作者单位:061001 河北省沧州市沧州医学高等专科学校药学区

作者简介:焦艳(1983-),女,硕士,讲师。研究方向:药物分析与检验技术。E-mail:jykycg@163.com

麦冬为常用中药,《中华人民共和国药典》2010 版(一部)记载其来源为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根。主产地为四川(川麦冬)和浙江(杭麦冬)。心脑血管病的发生、发展和变化与中医血瘀证紧密相关^[1]。血瘀证是临床常见的一种中医证型,其病理改变基础与血管内皮细胞损伤密切相关^[2]。麦冬是常用滋阴中药,能活血化瘀。随着现代医学的研究,麦冬提取液对内皮细胞损伤具有保护作用,对心脑血管缺血缺氧具有保护作用。常用酒制品入药,但还未见麦冬炮制前后的作用比较。本研究从细胞层面,研究麦冬酒制后对人脐静脉内皮细胞的抗缺氧活性的变化,为麦冬的开发研究提供理论依据,对其在医药领域中的应用也将有重要的意义。

1 材料

1.1 药材

所用药材生品川麦冬、杭麦冬购于沧州同仁堂药店,经过本校药学系天然药物教研室于永军副教授鉴定为正品,其中酒制品麦冬为于永军老师按麦冬:黄酒(1:5)制备得到。

1.2 药物提取

分别取川麦冬、杭麦冬及其它们的酒制炮制品,采用水提法进行提取,加水量为药材的 3 倍,提取时间为 1.5 小时,浸膏进行低温干燥,得到的粉末(过三号筛)约 5.0 g,精密称定,置 50 ml 容量瓶中,加 70% D-Hank's 试液至刻度,冷浸 24 小时,期间振摇数次,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得样品溶液。

1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(GIBCO, USA)(每升含 10% 小牛血清、L-谷氨酰胺 0.33 mg、青霉素 100 U、链霉素 100 U、pH 7.4);胰蛋白酶(MERCK, USA);96 孔细胞培养板(Costar, Denmark);细胞培养箱(NAPCO, USA);一氧化氮(NO)测试盒(批号 20121102),丙二醛(molondialdehtde, MDA)试剂盒(批号 20121218),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 20121122),均购自南京建成生物工程研究所。四氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司。

1.4 实验细胞

人脐静脉内皮细胞(EAHY926)株(购自天津后勤学院)接种于无菌培养瓶中,加入适量高糖达尔伯克(氏)必需基本培养基(H-DMEM)培养液(含 10%

的小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml),于 5% CO_2 、37℃ 饱和湿度的培养箱中培养。每 3~5 天传代 1 次。传代时用 0.25% 胰酶消化,用培养液吹打制成细胞悬液,接种传代。

1.5 实验分组

(1)正常对照组:细胞在 37℃,5% CO_2 条件下培养;(2)缺氧模型组:细胞在通入缺氧气体 30 分钟后缺氧 2 小时;(3)川麦冬生品提取液组;(4)酒制川麦冬提取液组;(5)杭麦冬生品提取液组;(6)酒制杭麦冬提取液组。每组均设复孔 6 个。

1.6 培养方法

将生长良好的内皮细胞 EAHY926 用 0.25% 胰酶消化后,轻轻吹打,以含 10% 的小牛血清 H-DMEM 培养液制成细胞悬液,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,取 4 ml 分别接种于各培养瓶中。待细胞贴壁,呈单层融合后(约 12 小时),弃去上清液,更换为无血清 H-DMEM 培养液 4 ml,饥饿细胞。弃去原培养液,其他各组均更换为无血清 H-DMEM 培养液饥饿细胞。12 小时后各中药组分别加入中药提取液,空白组与模型组以无血清 H-DMEM 培养液补足。

1.7 观察项目

1.7.1 MTT 比色法检测细胞生长活力 将生长良好的 EAHY926 用 0.25% 胰酶消化后,轻轻吹打,以含 10% 的小牛血清 H-DMEM 培养液制成细胞悬液,调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$,以每孔 1000~10000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl 。放置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养 12 小时,使细胞贴壁呈单层融合。弃去上清液,更换为无血清 H-DMEM 饥饿细胞 12 小时。弃去上清液,除空白组,其余各组通入 $\text{N}_2:\text{CO}_2 = 95:5$ 的缺氧气体 30 分钟进行造模。恒温箱缺氧培养 2 小时后取出,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl ,4 小时后吸弃上清液,每孔加入二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)200 μl 溶解结晶物,振荡 10 分钟后在酶标仪 490 nm 处测定各孔的吸光度值(OD 值)。

1.7.2 NO、MDA 含量和 SOD 活性的测定 缺氧处理后,弃去培养基,用 PBS 洗涤 2 次。加入 300 μl 细胞裂解液于冰上裂解 30 分钟后,高速冷冻离心机离心 10 分钟,取 100 μl 细胞上清液按试剂盒说明书操作,用硫代巴比妥酸显色法、硝酸还原酶法和黄嘌呤氧化酶法分别测定细胞 MDA、NO 含量和 SOD 活性。

表 1 麦冬液各组对缺氧损伤的 MDA、NO 含量、SOD 活性及细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	OD	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD/($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$)
空白组	0.46 \pm 0.04	0.19 \pm 0.07	5.67 \pm 0.79	75.36 \pm 5.33
模型组	0.19 \pm 0.05	0.45 \pm 0.08	12.23 \pm 0.68	41.76 \pm 3.92
川麦冬生品	0.32 \pm 0.06	0.29 \pm 0.06	8.15 \pm 0.81	47.34 \pm 4.31
酒制川麦冬	0.38 \pm 0.03	0.24 \pm 0.06	6.69 \pm 0.59	49.71 \pm 3.97
杭麦冬生品	0.30 \pm 0.04	0.31 \pm 0.07	8.61 \pm 0.72	46.26 \pm 5.12
酒制杭麦冬	0.34 \pm 0.05	0.26 \pm 0.05	7.81 \pm 0.64	47.44 \pm 4.56

1.8 统计学分析

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计。各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 实验结果

2.1 对细胞活力的影响

缺氧后,使用 MTT 检测,模型组吸光度值低于空白组 ($P < 0.05$);与模型组相比,川麦冬生品提取液组、酒制川麦冬提取液组、杭麦冬生品提取液组、酒制杭麦冬提取液组吸光度值均大于模型组 ($P < 0.05$),均能显著提高细胞活力,酒制川麦冬提取液组和酒制杭麦冬提取液组效果最佳(见表 1)。

2.2 对 MDA、NO 含量、SOD 活性的影响

缺氧后,模型组 MDA 和 NO 含量较空白组均显著性升高 ($P < 0.05$),SOD 活性较空白组显著性降低 ($P < 0.05$)。各组提取液干预后,麦冬提取液各组均能显著提高 SOD 活性 ($P < 0.05$);酒制川麦冬提取液组、酒制杭麦冬提取液组能显著降低 MDA 和 NO 含量 ($P < 0.01$) (见表 1)。

3 讨论

血管内皮细胞是血管壁组织和血液间的通透性屏障,许多因素都可损伤内皮细胞,造成内皮细胞的功能障碍,由此而导致血栓形成、动脉粥样硬化、高血压等心脑血管疾病的发生。内皮细胞损伤是血管损伤的初始阶段,因此保护内皮细胞功能是预防血管性疾病发生的关键^[3]。

中药麦冬味甘,微苦、性微寒,归心、肺、胃经,具有养阴生津、润肺清心的功效。植物化学成分研究表明,麦冬中含有甾体皂苷、高异黄酮、多糖等多种化学成分,具有抗心肌缺血、抗缺氧、增加免疫活性、降低血糖、平喘和抗过敏等药理作用^[4]。随着现代

医学的研究,麦冬及其提取物的药理作用主要表现为对内皮细胞的保护作用,减少内毒素对其诱导的凋亡作用^[5],其有效部位,可对血管内皮细胞损伤进行保护^[6]。

麦冬酒制的目的主要是有利于有效成分如甾体皂苷、黄酮、糖、甾醇、微量元素和氨基酸等成分的煎出,适合不同的治疗作用。麦冬炮制方法对上述药理作用和化学成分有直接的影响^[7]。

经本实验研究表明,麦冬的水溶性提取液具有保护缺氧所致的血管内皮细胞损伤的作用,能有效增加心肌营养血流量^[8],且麦冬酒制后效果更佳,入药时可优先选用酒制麦冬。本研究为麦冬的药理活性研究提供了实验方向和实验依据,对临床治疗心脑血管疾病具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] 孙永宁. 活血化瘀治疗低血粘度缺血性血瘀证中风病的临床思考[J]. 现代中医药, 2008, 28(3): 16.
- [2] Wright JL, Levy RD, Churg A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment[J]. Thorax, 2005, 60(7): 605-609.
- [3] 何玉红. 血管内皮细胞 NO 合成与释放的信号转导[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2001, 21(1): 28-30.
- [4] 莫正纪, 江光池, 冉兰, 等. 麦冬有效成分的药理研究[J]. 华西药理学杂志, 1991, 6(1): 13-15.
- [5] 陈雪霞, 李民, 张旭, 等. 麦冬药血清抗血管内皮细胞损伤的机制研究[J]. 国医论坛, 2007, (1): 38-39.
- [6] 范俊, 张小燕, 张志杰, 等. 麦冬不同提取部位对过氧化氢所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(2): 131-133.
- [7] 邵家德. 麦冬炮制方法探讨[J]. 中药通报, 1988, 13(6): 23-24.
- [8] 周跃华, 徐德生, 冯怡. 麦冬提取物对小鼠心肌营养血流量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 22-24.

(收稿日期: 2013-10-30)

(本文编辑: 蒲晓田)