

注射用黄芩苷镁盐冻干粉配伍稳定性及其保肝作用研究

白红红¹, 金 鹏², 李 景¹, 李 卫¹, 刘喜纲¹, 刘翠哲^{1*}
(1. 承德医学院, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000; 2. 晨光生物科技集团邯郸有限公司, 河北 邯郸 056000)

摘要: **目的** 研究注射用黄芩苷镁盐配伍稳定性及其对四氯化碳 (CCl₄) 诱导大鼠肝损伤的保护作用, 同时探讨黄芩苷镁分子结构中的黄芩苷和镁离子是否存在协同作用。**方法** 考察室温下黄芩苷镁盐在生理盐水、5% 葡萄糖和 10% 葡萄糖注射液中外观、pH 值和含量变化。雄性 wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、黄芩苷镁盐组、异甘草酸镁组、黄芩苷组和硫酸镁组, 尾静脉注射给药, 空白组及模型组注射等体积生理盐水, 连续给药 7 d。末次给药后 2 h, 空白组腹腔注射橄榄油, 其他组注射 50% CCl₄ 溶液。24 h 后腹主动脉取血检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 活性, 计算肝指数, 测定丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平, 染色并观察组织变化。**结果** 黄芩苷镁盐与各溶媒在 8 h 内颜色无变化, 无沉淀产生, pH 值和黄芩苷镁盐含量保持稳定; 黄芩苷镁组 ALT、AST 及 MDA 水平均显著低于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组 ($P<0.05$, $P<0.01$); GSH 水平显著高于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 黄芩苷镁盐在配伍试剂中理化性质和含量可以保持稳定, 对 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤有明显保护作用, 其结构中黄芩苷和镁离子在抗肝损伤方面存在协同作用。

关键词: 注射用黄芩苷镁盐冻干粉; 配伍稳定性; 保肝作用

中图分类号: R944 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)06-1636-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.048

黄芩苷 (结构式见图 1) 属黄酮类化合物, 是黄芩的主要成分之一。黄芩苷作为提取物被收录于 2015 年版《中国药典》, 是黄芩通过水提酸沉制备得到, 纯度不低于 85%, 但得到的黄芩苷几乎不溶于水, 口服生物利用度低, 大鼠口服给药后仅为 (2.2±0.2)%, 严重限制了其临床应用^[1-2]。

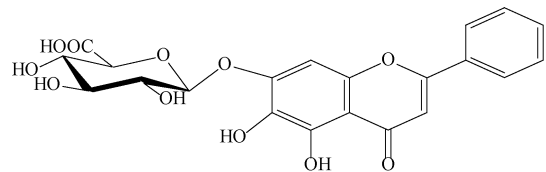


图 1 黄芩苷结构式

为提高黄芩苷的溶解度, 国内外研究人员采用纳米晶药物输送系统^[3-4]、靶向脂质体等技术^[5], 但程度有限。课题组前期研究证明, 黄芩苷在黄芩中的原本存在形式是镁盐形式 (结构式见图 2), 并通过提取得到了黄芩苷镁, 其溶解度比黄芩苷提高了 2 225 倍^[6], 并已获国家发明专利和美国专利授权^[7]。

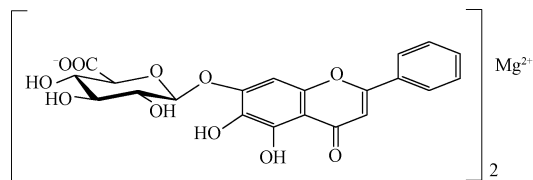


图 2 黄芩苷镁盐结构式

深入研究发现, 黄芩苷对病毒性肝炎、酒精肝、化学性肝损伤、肝纤维化、肝衰竭、肝癌等具有一定的作用^[8], 在临床上已有黄芩苷片、黄芩苷胶囊等制剂, 主要用于治疗急性慢性肝炎。无论是单体给药还是复方给药, 黄芩苷在体内均呈二房室模型, 半衰期相对较短 (约 15 min), 消除半衰期相对较长 (约 200 min), 这种药代动力学特征适合静脉给药系统^[9]。黄芩苷镁盐作为黄芩苷的原本存在形式, 前期研究表明其药代动力学特征与黄芩苷相同^[10], 而且水溶性好, 毒性低, 适合做成注射剂, 具有很大的成药性和临床应用前景。

本实验制备了黄芩苷镁盐冻干粉, 并测定其含量。考虑到临床静脉给药的特点, 拟进行配伍稳定性试验, 考察

收稿日期: 2019-09-23

基金项目: 河北省中医管理局科研计划项目 (2016188); 河北省医学科学研究重点课题计划项目 (20160311); 河北省高校重点学科建设项目 (冀教高 [2013] 4)

作者简介: 白红红 (1993—), 女 (回族), 硕士生, 从事中药制剂现代化研究。Tel: 15612484669, E-mail: 497655325@qq.com

* 通信作者: 刘翠哲, 研究员, 博士生导师, 从事中药制剂现代化研究。Tel: (0314) 2291142, E-mail: liucuizhexy@163.com

网络出版日期: 2020-03-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200306.2224.002.html>

它在生理盐水、5% 葡萄糖溶液、10% 葡萄糖溶液中的稳定性。

近期研究表明,黄芩苷对 CCl_4 所致肝细胞的氧化损伤有保护作用,其机制与其诱导 HO-1 表达及抑制促炎介质有关^[11-12]。同时也有研究表明,镁离子能够降低肝损伤小鼠肝指数、血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性、MDA 水平,对抗和清除自由基,提高氧化酶活性,抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌^[13]。黄芩苷镁盐含有镁离子,但黄芩苷在发挥对肝脏损伤的保护作用同时,镁离子对肝损伤的保护是否存在协同作用尚不明确,需作进一步研究。

1 材料

1.1 仪器 N-1100 旋转蒸发器 (日本理化公司); LGJ-22D 冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂有限公司); 1260HPLC 色谱仪 (美国安捷伦科技公司); HH-6 数显恒温水浴锅 (金坛市天竟实验仪器厂); PH 计 (瑞士梅特勒-托利多公司), SPESTRO star Nano 全波长酶标仪 (德国 BMG LABTECH 公司); HP-8453 分光光度计 (美国惠普公司); 全自动脱水机 (北京弘泰嘉业科技发展有限公司); Histocore Arcadia C 石蜡包埋机、RM2235 cwEU 切片机 (上海莱卡显微系统有限公司); Nikon DS-Fi1 电子显微镜 (日本尼康株式会社); Velocity 14R 高速低温离心机 (英国 Dynamica 公司); SCIEN-48 高通量组织研磨机 (宁波新芝生物科技有限公司); AG-A254 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); JA-2003 电子天平 (上海精科天平有限公司); KQ-300 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GHX-9080B 型隔水式恒温培养箱 (上海福玛实验设备有限公司)。

1.2 试剂 黄芩苷原料药 (承德颈复康药业集团雾灵药业有限责任公司); 黄芩苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110715-201318, 纯度 $\geq 93.3\%$)。氢氧化镁 (天津市风船化学试剂科技有限公司); 生理盐水、5% 葡萄糖、10% 葡萄糖注射液 (石家庄四药有限公司); 异甘草酸镁注射液 (连云港正大天晴药业股份有限公司); 硫酸镁、四氯化碳 (天津欧博凯化工有限公司); 橄榄油 (山东鲁花集团有限公司)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); ALT、AST、MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); GSH 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。娃哈哈纯净水 (高碑店娃哈哈启力饮料有限公司); 氨基甲酸乙酯 (国药集团化学试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 wistar 大鼠 36 只, 雄性, 体质量 240~260 g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0006, 在屏障动物房适应性饲养一周, 控制室内温度 20~22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 光照时间 8:00 至 20:00, 给予充足的饲料和饮用水。本实验所涉及的动物相关操作严格遵守有关准则, 并经承德医学院实验动物福利伦理委员会的批准。

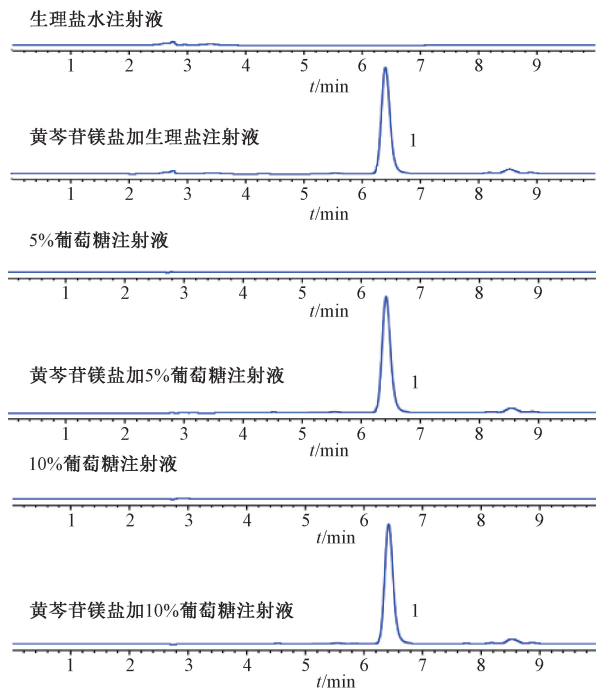
2 方法

2.1 注射用黄芩苷镁盐冻干粉的制备 在 500 mL 圆底烧瓶中先后加入黄芩苷原料药 5 g、氢氧化镁 0.138 g、蒸馏水 200 mL, 将圆底烧瓶置于旋转蒸发器上, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 低速旋转 1 h, 反应完全后为棕黄色溶液, 抽滤, 除去不溶性杂质, 活性炭吸附除去热源, 过 0.45 μm 滤膜, 固体物冷冻干燥 40 h, 得黄芩苷镁盐冻干粉。

2.2 HPLC 分析

2.2.1 色谱条件 参考 2015 年版《中国药典》相关规定, 黄芩苷镁盐分析方法为 phenomenex C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸 (60:40); 检测波长 278 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

2.2.2 专属性试验 分别取供试品溶液和生理盐水注射液, 黄芩苷镁盐加生理盐水注射液, 5%、10% 葡萄糖注射液, 在“2.2.1”项色谱条件下分析, 结果见图 3。由此可知, 3 种溶剂对测定无影响。



1. 黄芩苷镁盐

图 3 黄芩苷镁盐 HPLC 色谱图

2.2.3 线性关系考察 精密称取一定量黄芩苷对照品, 配制成 500 $\mu\text{g/mL}$ 贮备液, 稀释成 22.08、22.16、70.656、85.56、176.64、353.28 $\mu\text{g/mL}$, 在“2.1.1”项色谱条件下进样, 将质量浓度 X 与峰面积 Y 进行回归, 得方程 $Y=35.51X+132.27$ ($r=0.9991$), 在 22.08~353.28 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.4 方法学考察 在“2.1.1”项色谱条件下分别考察精密密度、重复性、加样回收率, 测得精密密度 RSD 为 0.90% ($n=6$); 重复性 RSD 为 1.38% ($n=6$); 平均加样回收率为 100.24%, RSD 为 1.06% ($n=6$), 均符合要求。

2.3 注射用黄芩苷镁盐在不同溶剂中的稳定性 精确称取黄芩苷镁盐 140.0、213.0、427.0 mg 各 3 份, 分别溶于

250 mL 生理盐水注射液、5% 葡萄糖注射液、10% 葡萄糖注射液并充分搅拌，25 ℃ 水浴中于 0、0.5、1、2、4、6、8 h 观察外观变化，测定溶液 pH 值及黄芩苷镁盐含量，结果见图 4。由此可知，在 0~8 h 内各组 pH 值略有下降，稳

定在 6.6~7.2 之间；各组约有 5% 的黄芩苷镁盐被破坏，稳定性较好，无气泡沉淀产生，颜色无变化，溶液澄清透明，达到了注射液的一般质量要求。

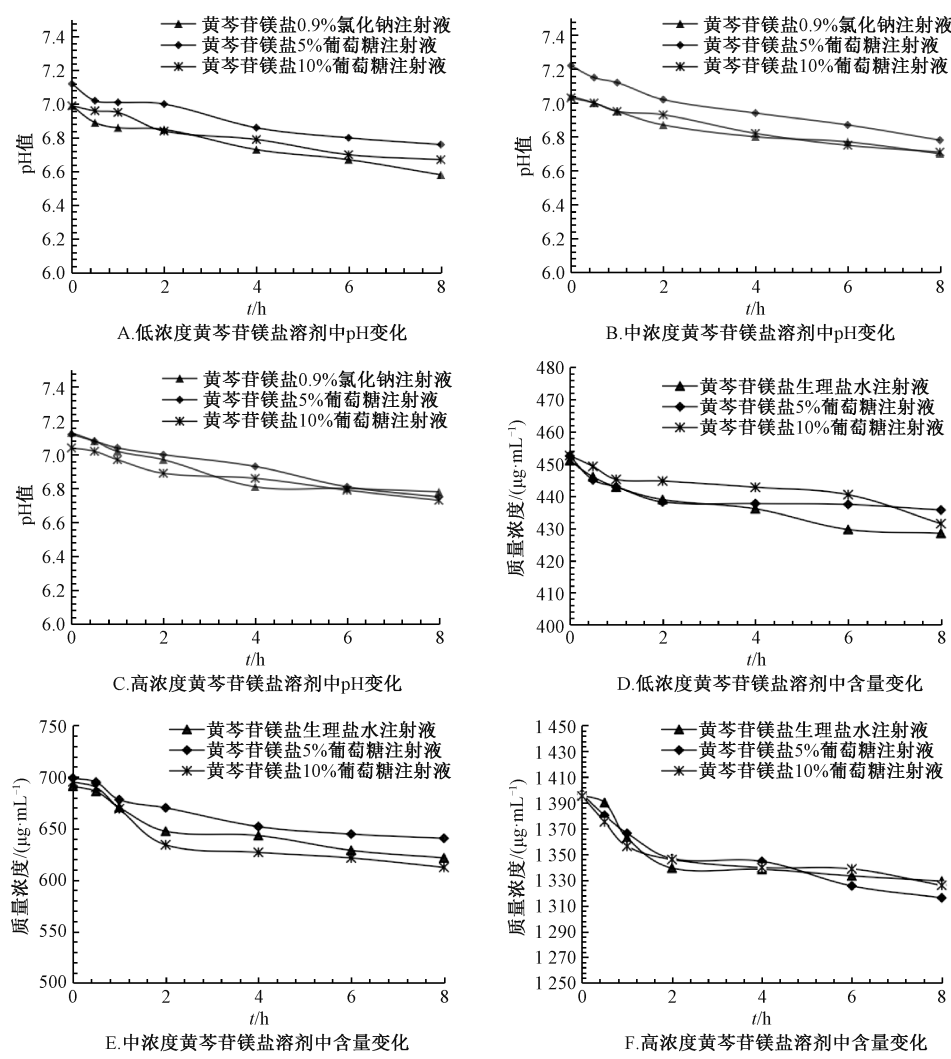


图 4 不同浓度黄芩苷镁盐在各溶剂中的 pH、含量变化

2.4 药效学实验

2.4.1 分组及给药 大鼠适应性饲养 1 周后，随机分为空白组、模型组、黄芩苷镁盐组、异甘草酸镁组、黄芩苷组、硫酸镁组，每组 6 只，根据前期预试验选择给药量为 50 mg/kg。黄芩苷和硫酸镁组（以镁离子计）给药剂量以黄芩苷镁盐组为标准，分别等量换算为 48.8、1.3 mg/kg。异甘草酸镁注射液临床上治疗急性肝损伤指导用药量为 0.2 g/d，按式（1）换算大鼠给药剂量为 18 mg/kg（ K_m 为表面积和体质量的比值，人为 37，大鼠为 6）。设计给药方式为每天 2 次，每次按给药剂量一半尾静脉注射给药，空白组和模型组给予等体积生理盐水，连续给药 1 周，记录大鼠摄食量和饮水量。末次给药 2 h 后，空白组大鼠腹腔注射橄榄油（等量），其他各组大鼠腹腔注射 50% CCl₄（橄榄油稀释）1 ml/kg，禁食，自由饮水。

人临床剂量=大鼠剂量×(大鼠 K_m /人 K_m) (1)

2.4.2 取材 造模 24 h 后，大鼠腹腔注射 20% 氨基甲酸乙酯 10 mg/kg 麻醉，腹主动脉取血 5 mL，冰浴静置 1 h，离心（4 ℃、3 000 r/min）10 min，取上清测定 ALT 和 AST 水平。取出肝脏，用预冷的生理盐水冲洗 2 次，擦拭干净后称重，计算肝指数，结果见表 1。取肝左叶，用 10% 甲醛溶液固定，苏木素-伊红（HE）染色，于光镜下观察肝组织病理变化，结果见图 5。剩余肝组织加入 9 倍量生理盐水制得 10% 肝组织匀浆，离心（4 ℃、3 000 r/min）10 min，取上清液测定 MDA、GSH 水平。

2.4.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件处理，计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

由表 1 可知，与空白组比较，模型组 ALT、AST 活性和肝指数增高（ $P < 0.01$ ），表明模型复制成功。与模型组

比较, 给药组大鼠血清 ALT、AST 活性和肝指数均有不同程度的降低 ($P<0.01$, $P<0.05$); 黄芩苷镁组血清中 ALT、AST 活性低于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肝指数低于黄芩苷组 ($P<0.05$)。

表 1 用药组对肝损伤大鼠血清 ALT、AST 活性和肝指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ALT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	AST/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	肝指数/($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
空白组	—	31.28±3.25	120.53±23.77	2.95±0.12
模型组	—	1 997.28±213.53 ^{##}	5 508.32±601.80 ^{##}	4.81±0.30 ^{##}
黄芩苷镁盐组	50	398.05±41.48 ^{**}	1 660.65±315.67 ^{**}	4.13±0.14 ^{**}
异甘草酸镁组	18	522.15±92.62 ^{**}	1 425.67±81.37 ^{**}	4.30±0.20 ^{**}
黄芩苷组	48.8	761.40±97.92 ^{**△△}	4 056.80±535.21 ^{**△}	4.46±0.22 ^{*△}
硫酸镁组	1.3	957.18±162.66 ^{**△△}	3 680.36±519.03 ^{**△△}	4.11±0.35 ^{**}

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组比较,## $P<0.01$;与黄芩苷镁盐组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

由表 2 可知, 与空白组比较, 模型组肝脏中的 MDA 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给药组 MDA 水平均有不同程度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 黄芩苷镁组中 MDA 水平低于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组 ($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组 GSH 水平降低 ($P<0.01$), 黄芩苷镁盐组 GSH 水平高于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 用药组对肝损伤大鼠肝组织 MDA、GSH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量	MDA/	GSH/
		($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	($\text{mg}\cdot\text{gprot}^{-1}$)
空白组	—	1.22±0.06	19.04±0.87
模型组	—	2.37±0.36 ^{##}	13.41±1.22 ^{##}
黄芩苷镁盐组	50	1.60±0.12 ^{**}	17.64±1.34 ^{**}
异甘草酸镁组	18	1.74±0.18 ^{**}	16.68±1.27 ^{**}
黄芩苷组	48.8	2.04±0.27 ^{**△}	15.73±0.70 ^{**△}
硫酸镁组	1.3	2.06±0.43 ^{*△}	15.40±0.84 ^{*△△}

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组比较,## $P<0.01$;与黄芩苷镁盐组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图 5 显示, 空白组大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞结构完整, 无炎细胞浸润。模型组肝索排列紊乱, 细胞间隙变大, 肝细胞结构明显破坏, 呈脂肪性泡沫病变。黄芩苷镁组肝细胞病变不明显, 肝细胞轻度肿胀, 部分肝细胞脂肪变性, 汇管区有少量炎细胞浸润。异甘草酸镁组依然可见气球样病变, 肝脏保护效果不及黄芩苷镁组。黄芩苷组和硫酸镁组也可降低肝细胞肿胀和组织病变程度, 但病变程度均大于黄芩苷镁盐组。

4 讨论

注射剂的配伍液稳定性问题主要体现在室温条件下溶液颜色变化、产生气泡及产生不溶性微粒、pH 值的变化, 一定温度和时间内溶液澄明、颜色无改变、无气泡及肉眼可见的沉淀产生, pH 值稳定, 提示药物可配伍。除了从溶液外观、pH 值等理化性质方面考察配伍稳定性外, 还测定了药物在溶剂中的含量变化, 结果显示不同浓度黄芩苷镁盐在生理盐水、5% 葡萄糖、10% 葡萄糖注射液中医理化性质和含量保持稳定。在配伍稳定性的基础上将黄芩苷镁盐溶解于生理盐水注射液中, 配制成一定浓度的注射液开展保

肝作用研究。

肝脏是人的重要器官, 目前数以百万计的人因酒精、化学品和感染而使肝脏遭受损害, 其中化学物质诸如对乙酰氨基酚、 CCl_4 、亚硝酸胺和多环芳烃等对肝脏的损害很大。 CCl_4 所致的肝损伤是肝损伤模型的首选, 它可引起与肝硬化或肝炎相同的肝脏改变、单个核细胞浸润和肝细胞脂肪性泡沫变性。 CCl_4 诱导的肝毒性被认为涉及 2 个阶段, 最初阶段是由细胞色素 P450 代谢 CCl_4 , 导致自由基的形成和脂质过氧化^[14]; 第二阶段由于自由基引起 Kupffer 细胞激活, 并伴随炎症介质的产生^[15]。由于肝损伤, 肝细胞膜的渗透性改变, 膜的渗透性改变导致细胞中的酶释放到体循环。其中 ALT 在肝实质细胞浆合成, 其血清中活性增高提示肝细胞膜破坏和肝细胞通透性增加。AST 在肝实质细胞线粒体合成, 其血清中活性增高提示肝细胞线粒体损伤。本研究中, 大鼠腹腔注射 CCl_4 24 h 后, 模型组血清中 ALT 和 AST 水平明显增高, 而黄芩苷镁盐可以减缓这种趋势。

MDA 是脂质过氧化物的最终产物, 它在血清及组织中的水平高低反映了组织过氧化时的损伤程度^[16]。因此, 肝组织内 MDA 水平的变化可反映肝损害的程度及治疗后肝功能恢复的情况。GSH 是抵抗自由基的第一道防线, 是组织氧化损伤易感性的重要决定因素, 关于 CCl_4 肝毒性机制研究表明, GSH 在 CCl_4 活性毒性代谢产物的解毒中起着关键作用, 肝坏死始于 GSH 储存的耗尽^[17]。本实验发现黄芩苷镁盐能显著降低肝组织中 MDA 水平, 减缓大鼠 GSH 水平的降低, 与阳性对照药异甘草酸镁效果相当, 明显优于等浓度的黄芩苷组和硫酸镁组。

黄芩苷具有多酚羟基结构, 能够清除和抑制自由基, 保护线粒体膜的完整性, 此外还能够促进血红素对氧酶-1 (HO-1) 和过氧化物酶体增值物激活受体 γ (PPAR γ) 的表达, 下调 TGF β_1 信号通路抑制肝星状细胞活化^[18], 同时能够抑制炎症介质因子表达。 CCl_4 可通过抑制细胞膜上和线粒体膜上钙离子泵的活性使钙离子大量内流, 激活肝细胞膜上的磷酸化酶从而引起膜的脂质过氧化^[19]。镁是体内重要的常量元素, 是钙的天然拮抗剂, 它能影响钙的膜渗透性及其结合、分布和交换, 通过减轻细胞内钙超载达到肝保护作用。临床报道, 肝损伤往往伴随低镁血症, 适当补充镁离子改善低镁血症对肝细胞有保护作用。

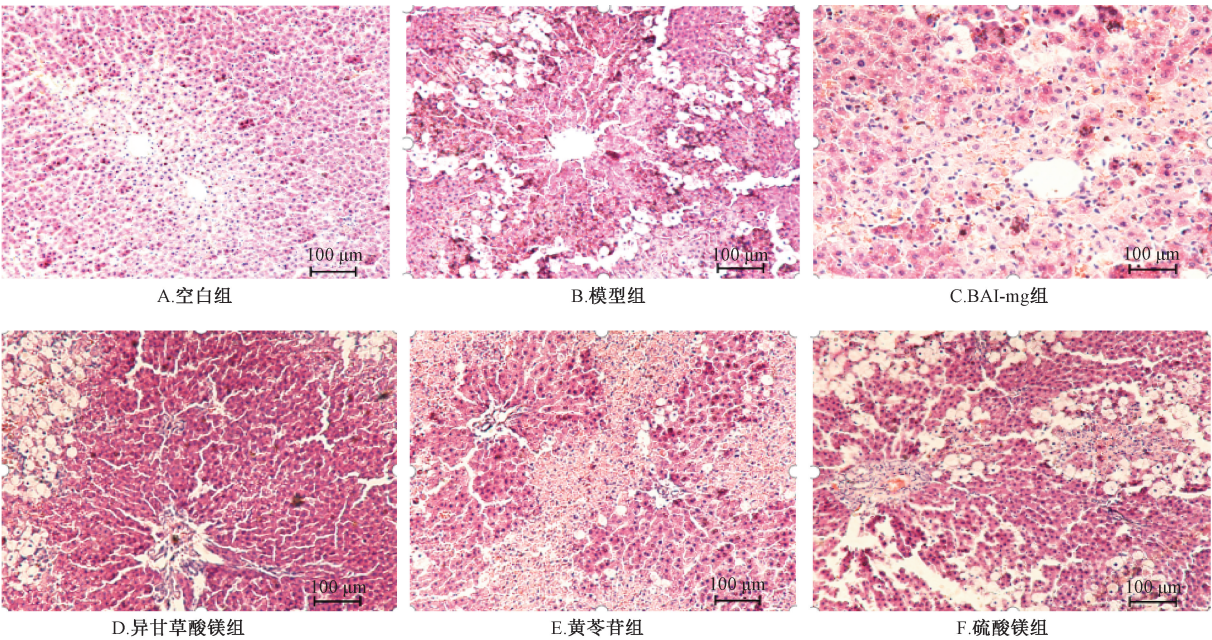


图 5 各组肝损伤大鼠肝病理切片 (HE, ×100)

实验结果显示,黄芩苷镁盐对 CCl₄ 诱导的肝损伤有保护作用,并优于等浓度的黄芩苷和硫酸镁,其结构中的黄芩苷和镁离子存在协同作用而共同达到保肝效果。其中,黄芩苷主要通过阻断自由基的脂质过氧化,保护细胞内线粒体复制、增生及粗面内质网的变化,恢复肝细胞生物氧化功能,促进相关蛋白质合成,为肝脏再生和修复提供相应的能量。同时,镁离子可以有效抑制肝细胞内钙超载,减轻肝细胞膜的脂质过氧化。

黄芩苷镁盐作为黄芩苷的原本存在形式,本身水溶性较好,在以上 3 种溶剂中的理化性质和含量保持稳定,具有很大的成药性和临床应用前景。因此,黄芩苷镁盐作为治疗人类氧化应激和炎症性肝病的一种可能的治疗手段值得研究,在临床上的应用潜力也有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 王春民,刘刚,费艳,等.大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究[J].中草药,2010,4(1):58-60.

[2] Xing J, Chen X Y, Zhong D F. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats[J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 140-146.

[3] Hao J F, Wang F G, Wang X D, et al. Development and optimization of baicalin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method using central composite design[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(2): 497-505.

[4] Jin S Y, Han J, Jin S X, et al. Characterization and evaluation in vivo of baicalin-nanocrystals prepared by an ultrasonic-homogenization-fluid bed drying method[J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(1): 71-80.

[5] Chen Y Y, Minh L V, Liu J W, et al. Baicalin loaded in folate-PEG modified liposomes for enhanced stability and tumor targeting[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016,

140(1): 74-82.

[6] 许海舰,刘一鑫,王志轩,等.黄芩苷镁盐的稳定性研究[J].中国药房,2017,28(22):3076-3079.

[7] 刘翠哲,王志轩,苗策禹,等.一种黄芩苷镁化合物及其制备方法与它的用途[P].中国专利:CN105732753A,2016-07-06.

[8] 张强,张燕堂,李素梅.黄芩苷保肝护肝作用的研究进展[J].海峡药学,2014,26(1):8-10.

[9] 柴玉爽,雷帆,邢东明,等.黄芩苷对模式识别受体TLR2/4-NOD2的作用及其成药性意义[J].中国中药杂志,2013,38(16):2639-2644.

[10] 许海舰,刘一鑫,刘喜纲,等.黄芩苷镁盐和黄芩苷的肠吸收动力学和药代动力学比较[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(4):78-83.

[11] Park S, Lee C, Kim Y, et al. Protective effect of baicalin against carbon Tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106(1): 136-143.

[12] Peng X D, Dai L L, Huang C Q, et al. Correlation between anti-fibrotic effect of baicalin and serum cytokines in rat hepatic fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(37): 4720-4725.

[13] 吴卉,唐微,孙设宗,等.镁离子、维生素E对CCl₄诱导的肝损伤TNF-α和caspase-3含量的影响[J].山西医科大学学报,2013,44(5):329-332.

[14] Koch R R, Glende EA Jr, Recknagel R O. Hepatotoxicity of bromotrichloromethane-bond dissociation energy and lipoperoxidation[J]. *Biochem Pharmacol*, 1974, 23(20): 2907-2915.

[15] Edwards M J, Keller B J, Kauffman F C, et al. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 119(2): 275-279.

[16] 孙设宗,唐微,张红梅,等.镁离子、山药多糖对四氯

化碳肝损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(12): 2780-2786.

[17] Williams A T, Burk R F. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury[J]. *Semin Liver Dis*, 1990, 10(4): 279-284.

[18] Qiao H X, Han H C, Hong D C, *et al.* Protective effect of baicalin on carbon tetrachloride induced liver injury by activating PPAR γ and inhibiting TGF β 1[J]. *J Pharm Biol*, 2011, 49(1): 38-45.

[19] 宁健康, 吕锦芳, 姜锦鹏, 等. 黄芩苷对小鼠四氯化碳肝损伤保护作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(2): 120-122.

柚皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞保护作用的代谢组学研究

张悦¹, 徐占玲¹, 孙慧峰¹, 雷霞², 刘国良², 姚远², 张宁^{1,2*}, 刘斌^{2*}
(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: **目的** 基于气质联用代谢组学方法研究柚皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用机制。**方法** 以 $\text{A}\beta_{25-35}$ 干预 PC12 细胞, 建立损伤模型。采用 MTT 法检测细胞增殖率, 同时利用 GC-MS 技术检测空白组、模型组和给药组细胞内源性代谢物的差异, 并分析其内在生物学意义。**结果** 柚皮苷能够增加 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的增殖率。各组细胞内源性代谢物均发生了变化, 包括甘氨酸、谷氨酸、 α -酮戊二酸和胆固醇等 27 种代谢物 ($\text{VIP}>1$, $P<0.05$), 柚皮苷对其有调节作用。**结论** 柚皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞损伤有保护作用, 可能是通过平衡氨基酸、能量、碳水化合物等物质的代谢来发挥。

关键词: 柚皮苷; PC12 细胞; 气质联用; 代谢组学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)06-1641-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.049

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种与衰老密切相关的神经系统退行性疾病^[1], 以认知缺陷和神经元丧失为特征, 迄今缺少有效的治疗药物。所以, 研发有效防治 AD 的药物是非常必要的。

AD 发病机制十分复杂, β 淀粉样蛋白 (amyloid- β , $\text{A}\beta$) 被认为是诱发 AD 发生发展的关键因素^[2]。近年来, 黄酮类等天然多酚类物质的抗氧化特性在对神经退行性疾病方面潜在、有益的作用成为科学研究的重点^[3]。柚皮苷全称为柚皮素-7-O-新橙皮糖苷, 是一种天然的二氢黄酮类化合物, 以往对柚皮苷的研究大都集中在治疗骨质疏松^[4]、预防动脉粥样硬化^[5]等方面。现在, 研究人员将注意力转向柚皮苷的神经损伤保护等方面。Okuyama 等^[6]将富含橙皮苷和柚皮苷果汁的干燥粉末给予脑缺血小鼠, 发现口服后可以显著抑制脑缺血诱导的海马神经细胞死亡,

具有改善小胶质细胞活化的能力。Singh 等^[7]灌胃给予脑出血小鼠不同剂量的柚皮苷, 再对探讨动物进行一系列行为测试, 用强迫游泳试验和水迷宫试验评估卒中后抑郁和记忆障碍, 研究表明, 柚皮苷可改善脑出血诱导的神经认知缺陷, 还能通过下调海马中乙酰胆碱酯酶活性和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 信号传导途径来消除顺铂引起的认知缺陷和胆碱能功能障碍^[8]。由此可见, 柚皮苷可能会成为治疗神经退行性疾病的佼佼者, 但作用机制尚不清楚。

代谢组学以代谢产物或代谢网络为基础探究常见复杂疾病的发病机制或宿主环境发病机制的相互影响, 在临床前和临床研究上都有广泛的应用^[9]。代谢体是基因-环境相互作用的最终产物之一, 它能识别并鉴别 AD 的病理生理特征^[10]。气相色谱-质谱 (GC-MS) 具有高分辨率、高灵敏度、有可供参考的标准图谱库、可对代谢产物定性等特

收稿日期: 2019-09-29
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673621); 黑龙江省属高校科技成果研发培育项目 (TSTAU-C2018020); 黑龙江省应用技术研究与开发项目 (GA17C009); 黑龙江中医药大学基金项目 (2017SEC02, 2018RCD19, 2018jkey05, 2018pt04)
作者简介: 张悦 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药效物质基础及体内代谢。Tel: 15145578506, E-mail: 15145578506@163.com
*** 通信作者:** 张宁 (1974—), 男, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及体内代谢。Tel: (0454) 6050350, E-mail: zhangning0454@163.com
刘斌 (1970—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治老年性疾病。Tel: (0454) 8782701, E-mail: liubin169@163.com