

基于 HUVEC 细胞膜色谱的莱菔子中 抗血管性疾病活性成分筛选及验证*

李华妮^{1,2}, 刘长河^{1,2**}, 菅单单³, 陈胜虎³, 葛文静^{1,2}, 张雪侠^{1,2}

(1. 河南省中西医结合医院 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 河南省中药制剂工程技术研究中心, 郑州 450004;
3. 河南大学药学院, 开封 475004)

摘要 目的: 构建人脐静脉细胞膜色谱(HUVEC/CMC)模型,并将其应用于莱菔子中抗血管性疾病活性成分的快速筛选。**方法:** 采用 HUVEC/CMC 模型二维在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统对莱菔子活性成分进行分离、筛选和鉴定,并将筛选的活性成分进一步作用于氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的 HUVEC,验证其保护作用。**结果:** 利用所建立的方法从莱菔子中共筛选出 2 个保留组分,通过与对照品比对,鉴定出 1 个成分为芥子酸。与模型组比较,芥子酸低、中、高预处理组细胞存活率显著增加,细胞中 ICAM-1 和 VCAM-1 的含量下降,并呈剂量依赖性;Bcl-2 蛋白表达水平下降、Bax 蛋白表达升高,具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 构建的 HUVEC/CMC 在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统可用于快速筛选复杂中药体系中活性成分,为细胞膜色谱的应用和莱菔子的开发提供了参考。

关键词: 莱菔子;细胞膜色谱;芥子酸;人脐静脉内皮细胞

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)06-0929-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.06.02

Screening and validation of anti-vascular disease active components from *Semen raphani* based on HUVEC cell membrane chromatography*

LI Hua-ni^{1,2}, LIU Chang-he^{1,2**}, JIAN Dan-dan³,
CHEN Sheng-hu³, GE Wen-jing^{1,2}, ZHANG Xue-xia^{1,2}

(1. Henan Integrative Medicine Hospital/Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Zhengzhou 450004, China;
2. Henan Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Preparation, Zhengzhou 450004, China; 3. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract Objective: To establish a method for determination of potential anti-vascular disease active components of *Semen raphani* based on cell membrane chromatographic (CMC) model of human umbilical vein cell (HUVEC). **Methods:** The HUVEC cell membrane chromatography coupled with HPLC-ESI IT TOF MS system were used to screen the active components of *Semen raphani*. The selected active components were further applied to ox-LDL induced HUVEC to verify their protective effects. **Results:** Two retained components were selected from *Semen raphani* by this method. One component was identified as erucinic acid by comparing with the reference material. Compared with the model group, the cell survival rates of the erucinic acid pretreatment groups

* 河南省自然科学基金(232300421318);河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2262);河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1148);河南省基本科研业务费(2304574)

** 通信作者 Tel:13939016319;E-mail:liuchhn371@163.com
第一作者 Tel:(0371)66336558;E-mail:mgmlhn@163.com

increased significantly. The amount of ICAM-1 and VCAM-1 decreased in a dose-dependent manner. Bcl-2 protein levels decreased and Bax protein levels increased, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** The method can rapidly obtain active ingredients from complex traditional Chinese medicines. It provides a reference for the application of cell membrane chromatography and the development of *Semen raphani*.

Keywords: *Semen raphani*; cell membrane chromatography; erucic acid; human umbilical vein cell

莱菔子为十字花科植物萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 的干燥成熟种子, 主要含有硫苷类、生物碱类、黄酮类和脂肪酸类等成分^[1-4], 具有降血压、降血糖、抗炎、抗肿瘤和消食等药理作用^[5-9]。有文献报道, 从莱菔子中分离出的芥子碱硫酸盐或芥子碱氯化盐具有降压、抑制动脉粥样硬化等药理作用, 但是其作用靶点尚不明确^[10-11]。因此, 亟需建立基于特定生物靶点的方法筛选天然药物复杂体系中的活性化合物。

细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 是将细胞膜固定在硅胶载体表面制备色谱固定相的一种生物亲和色谱方法^[12]。活性成分与某些受体之间存在相互作用, 可以通过它们在 CMC 中的保留行为来进行研究。人脐静脉内皮细胞是心脑血管疾病的重要靶标细胞, 其细胞膜膜含有丰富的 β_1 肾上腺素受体 (β_1 -AR) 受体, 具有多种生理功能, 与人脐静脉内皮细胞亲和的成分可能成为抗心脑血管疾病的药物^[13]。本研究拟利用 HUVEC 细胞建立 HUVEC/CMC 模型, 通过十通阀将 CMC 模型与液相色谱-质谱联用仪构成 HUVEC/CMC 在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统, 用于筛选莱菔子中抗心脑血管疾病的潜在活性成分; 采用 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤模型, 对筛选结果进行体内药效验证。

1 仪器与试剂

1.1 药物及试剂

莱菔子 (郑州当地药店购买, 经河南省中医药研究院刘杰研究员鉴定为莱菔子 *Raphanus sativus* L.)、芥子酸 (纯度 $\geq 98\%$, 批号 PS020720, 成都普思生物科技有限公司)、盐酸普萘洛尔片 (江苏亚邦爱普森药业有限公司, $10 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 批号 200102)、胎牛血清 (LONSA SCIENCE SRL, 批号 TC03634)、DMEM 培养基 (北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 批号 8123503)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 T1320)、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 和血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 试剂盒 (ELK Biotechnology, 批号 52377652、52400211),

促凋亡基因 (Bax) 兔多克隆抗体和抑制凋亡基因 (Bcl-2) 兔多克隆抗体 (ELK Biotechnology, 批号 52401171、52401176)、GAPDH 兔多克隆抗体 (杭州贤至生物科技有限公司, 批号 AB-P-R001)、BCA 定量试剂盒 (雷根生物科技有限公司, 批号 PT0001)、ECL 化学发光底物试剂盒 (北京兰杰柯科技有限公司, 批号 BL520A), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 大孔球形硅胶 (型号 ZEX-II, $5 \mu\text{m}$, 青岛美高集团有限公司)。

1.2 仪器

HPLC-ESI IT TOF MS 液相色谱-质谱联用仪 (Shimadzu 公司)、JY92 II 细胞粉碎仪 (宁波新芝公司)、2K15 型冷冻离心机 (Sigma 公司)、ELX800 型多功能酶标仪 (BioTek 公司)、HF160W 型 CO_2 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司)。

1.3 细胞株

HUVEC 株, 购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 供试品储备液 称取莱菔子药材 1000 g , 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h , 回流提取 3 次, 每次 1 h , 合并 3 次提取液, 浓缩至浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。取适量的大孔树脂 DM101, 95% 乙醇浸泡 24 h 后湿法装柱, 采用蒸馏水冲洗至无醇味, 加入 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液, 用蒸馏水冲洗至洗脱液无色后, 加入 90% 乙醇洗脱, 当流出的洗脱液无色时停止洗脱, 收集 90% 乙醇洗脱液, 回收乙醇, 浓缩液减压干燥, 即得莱菔子提取物 (1000 g 莱菔子提取得到约 20 g 提取物干粉, 出膏率为 2%)。精密称取莱菔子提取物样品适量, 用甲醇制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品储备液, 备用。

2.1.2 对照品溶液 精密称定芥子酸、盐酸普萘洛尔对照品适量, 用甲醇制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品储备液, 待分析时采用甲醇稀释至适宜的浓度。

2.1.3 缓冲液 Tris-HCl 低渗液: 称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 1.21 g , 氯化钾 0.74 g , 七水硫酸镁 0.50 g , 溶于超纯水 1000 mL 中, 然后用盐酸调节 pH

为7.4,置于4℃储存,备用。

2.2 HUVEC 培养与细胞膜固定相制备

HUVEC 于37℃、5%二氧化碳及饱和湿度条件下,培养于DMEM培养基中(含有10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 U·mL⁻¹链霉素)。试验用HUVEC均取自对数生长期的细胞。当细胞生长至约80%时,用0.25%胰蛋白酶消化液消化,然后用少量DMEM培养基吹打细胞,制成单细胞悬液,计数,使总细胞数不低于1×10⁷个。将收集的细胞悬液于4℃、1 000 g离心10 min,倾出上清液,所得沉淀物即为HUVEC。用生理盐水将其离心洗涤2次,加入Tris-HCl低渗液,超声(250 W,20 kHz)30 min破碎细胞后匀浆。混悬液于4℃、1 000 g离心10 min,细胞膜悬浮在上清液,收集上清液,于4℃、12 000 g离心20 min,弃上清液,所得沉淀即为细胞膜,加入预冷的生理盐水5 mL重悬沉淀,得细胞膜悬液。将细胞膜悬液5 mL在真空条件下缓慢加入到25 mL具支试管中(内含50 mg已活化的大孔球形硅胶)中,涡旋5 min,然后将反应混合物转移至10 mL离心管中,于4℃条件下磁力搅拌0.5 h后,4℃静置过夜。次日,采取湿法装柱得到HUVEC/CMC柱。

2.3 HUVEC/CMC 细胞膜色谱在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统条件

第一维色谱条件:HUVEC/CMC柱,流动相为超纯水,流速为0.2 mL·min⁻¹,柱温37℃,盐酸普萘洛尔检测波长为290 nm,芥子酸检测波长为320 nm。

二维色谱:Inertsil ODS(150 mm×3.5 mm,4.6 μm)色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.1%乙酸水(B),梯度洗脱(0~15 min,5%A→10%A,15~17 min;10%A→12.5%A,17~27 min,12.5%A→14%A;27~55 min,14%A→25%A;55~65 min,25%A→55%A),流速0.2 mL·min⁻¹,柱温37℃。

质谱:电喷雾离子源;雾化气(1.5 L·min⁻¹)和干燥气(109 kPa)均为高纯度氮气,纯度>99.999%;接口电压和检测器电压分别为4.5 kV和1.57 kV;加热模块温度和CDL管温度均为200℃;CID碰撞气体为高纯度氩气,纯度>99.999%,能量设为50%;离子累积时间设置为30.0 ms;正、负离子扫描模式,扫描范围m/z 100~1 000。

一维 CMC 色谱系统与二维 HPLC-ESI IT TOF MS 系统通过十通阀及富集柱连接,以实现一维 CMC 系统的保留成分经过富集柱在线富集后切换到二维

系统进行进一步分离及鉴定。

2.4 细胞样品的制备与采集

取对数生长期的 HUVEC,胰蛋白酶消化后,以6×10⁵·mL⁻¹的密度接种于6孔细胞培养板中,贴壁生长后给予10 μg·mL⁻¹莱菔子提取物,给药前取空白细胞,给药后继续培养24 h,吸弃上清液,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗2次,在4℃条件下向6孔板内加入细胞裂解液,裂解30 min后进行超声(200 W,20 kHz)破碎,裂解液13 000 r·min⁻¹离心10 min,然后取细胞裂解上清液100 μL,加入乙腈400 μL后震荡3 min,13 000 r·min⁻¹离心10 min,上清液采用氮气吹干,残渣加甲醇复溶后过0.22 μm滤膜进行LC-MS/MS分析。

2.5 HUVEC 培养与分组

取对数生长期的 HUVEC,胰蛋白酶消化后,以1×10⁵·mL⁻¹的密度接种于96孔细胞培养板中,每孔接种100 μL,贴壁生长后,实验分为空白组,模型组(160 μmol·L⁻¹氧化低密度脂蛋白),活性成分低、中、高剂量组(2、10、50 μmol·L⁻¹芥子酸分别加160 μmol·L⁻¹氧化低密度脂蛋白),空白组加入等量的空白培养基。

2.6 HUVEC 存活率检测

将各组细胞以1×10⁵·mL⁻¹的密度接种于96孔细胞培养板中并置于细胞培养箱培养24 h,待细胞生长至融合度约80%时,按“2.5”项下方法处理细胞,培养箱中培养24 h,每孔加入3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液20 μL,孵育4 h后吸弃上清,随后加入DMSO 20 μL并室温震荡10 min,570 nm波长下测定各孔吸收度(A)。

2.7 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 的含量测定

将各组细胞以1×10⁵·mL⁻¹的密度接种于6孔细胞培养板中并置于细胞培养箱培养24 h,待细胞生长至融合度约80%时,按“2.5”项下方法处理细胞24 h,收集上清液,ELISA法检测上清液中ICAM-1和VCAM-1的含量,实验操作均按照说明书进行。

2.8 Western blotting 检测 HUVEC 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

取对数生长期的 HUVEC,以1×10⁵·mL⁻¹的密度接种于6孔细胞培养板中,37℃、5%CO₂条件下培养24 h,吸弃上清液,用PBS缓冲液清洗2次,按“2.5”项下分组及药物继续培养24 h,收集细胞,在4℃条件下向6孔板内加入细胞裂解液,裂解20 min后

收集上清液并采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。细胞裂解液经 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 然后低温将蛋白转至 $0.45 \mu\text{m}$ PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入抗体 Bcl-2 (1:1 000)、Bax (1:5 000)、GAPDH (1:1 000), 4°C 过夜后采用含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠和 0.5% 吐温-20 的洗液洗膜 3 次, 每次 6 min, 加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜, 然后加入增强型化学发光液 (ECL) 进行暗室成像。

2.9 数据处理与统计

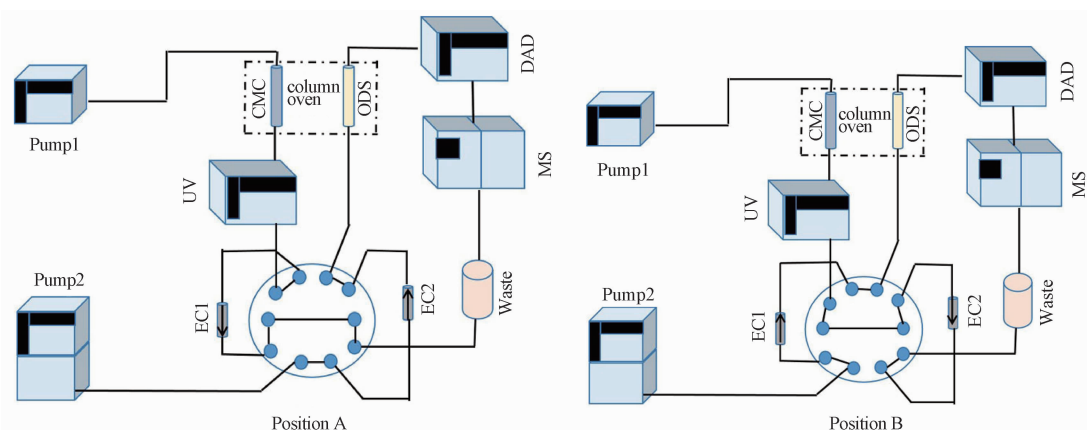
实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, Graph Prism 10.0 软件作图, 两组之间比较采用 t 检验, 多

组间比较采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2.10 方法学考察

2.10.1 HUVEC/CMC 系统适用性

利用十通阀将 HUVEC 细胞膜色谱柱与 HPLC-ESI IT TOF MS 系统构建二维在线 HUVEC/CMC-HPLC-ESI IT TOF MS 系统, 示意图如图 1。采用选择性作用于 β_1 -AR 受体的药物盐酸普萘洛尔考察该系统的适用性。盐酸普萘洛尔在 HUVEC 细胞膜色谱柱上有很好的保留, 说明所建立的 HUVEC/CMC-HPLC-ESI IT TOF MS 系统可以对与 β_1 -AR 受体相互作用的组分进行较好的识别。



CMC. HUVEC/CMC 柱 (HUVEC/CMC column) ODS. ODS 色谱柱 (ODS column) EC1 和 EC2. ODS 富集柱 (enrichment column) Pump1 和 Pump2 分别为一维液相色谱泵和二维液相色谱泵 (pump of the first and second dimension) UV. 紫外检测器 (ultraviolet detector) DAD. 二极管阵列检测器 (diode-array detector) MS. 质谱仪 (mass spectrometer)

图 1 HUVEC/CMC-online-HPLC-ESI IT TOF MS 示意图

Fig. 1 Brief scheme of HUVEC/CMC-online-HPLC-ESI IT TOF MS method

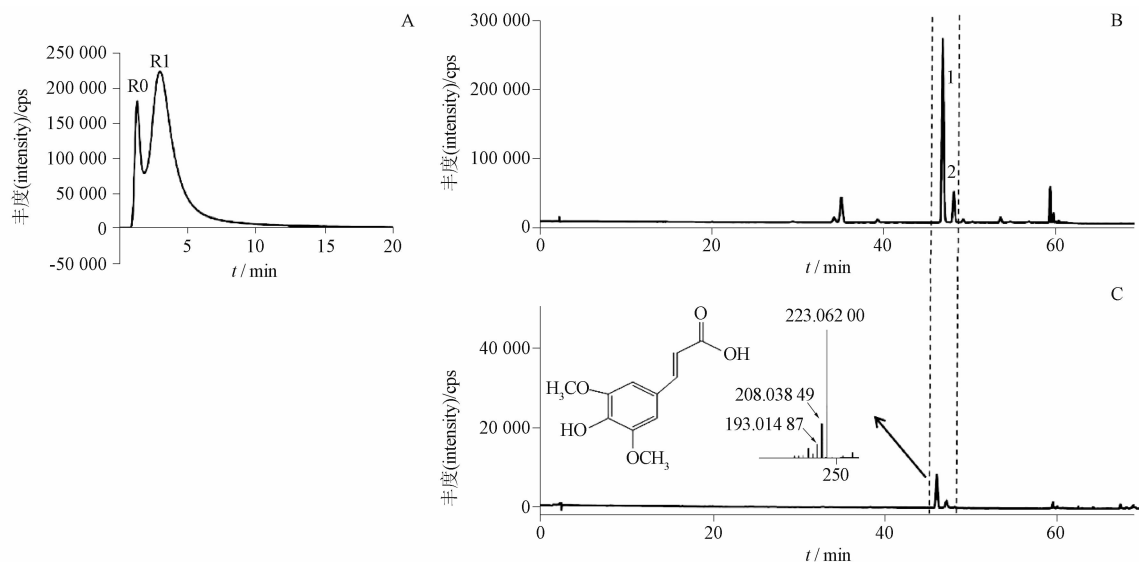
对于同一根 HUVEC/CMC 柱, 连续进样 5 次 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸普萘洛尔 $10 \mu\text{L}$, 以盐酸普萘洛尔的保留时间为指标, 考察柱内重现性^[14]。结果 5 次进样的保留时间的 RSD 为 2.6%。按照“2.2”项下方法制备 3 根 HUVEC/CMC 柱, 在相同的色谱条件下, 进样 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸普萘洛尔 $10 \mu\text{L}$, 以盐酸普萘洛尔的保留时间为指标, 考察柱间重现性, 结果 3 根 HUVEC/CMC 柱的保留时间的 RSD 为 3.7%。对同一根 HUVEC/CMC 柱, 连续分析盐酸普萘洛尔样品, 在 72 h 内, 盐酸普萘洛尔在 CMC 柱上均有较好的保留。

综上所述, 本研究所建立的 HUVEC/CMC 柱模型可特异性识别作用于 β_1 -AR 受体的盐酸

普萘洛尔, 且 HUVEC/CMC 柱的柱内及柱间重现性良好, 且细胞膜柱的活性时间也能满足实验需求。

2.10.2 莱菔子中活性组分筛选

利用验证过的 HUVEC/CMC-online-HPLC-ESI IT TOF MS 系统对莱菔子提取物进行筛选, 如图 2-A 为莱菔子提取物在 HUVEC/CMC 柱上的色谱图, 包含非保留组分 R0 和保留组分 R1 (保留时间约为 3 min); 图 2-B 是莱菔子提取物在 HPLC-ESI IT TOF MS 色谱图; 图 2-C 为保留组分 R1 经富集柱富集、十通阀切换进入 HPLC-ESI IT TOF MS 系统后的色谱图, 筛选出了 2 种保留成分, 经质谱分析和对照品比对, 指出保留组分 1 为芥子酸。



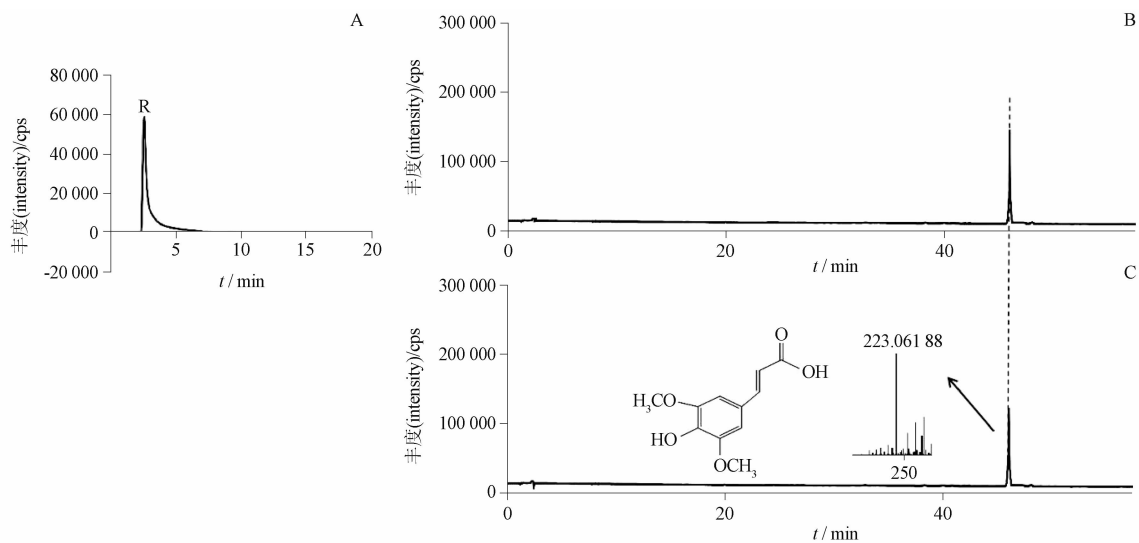
A. HUVEC/CMC 柱 (HUVEC/CMC column) B. HPLC - ESI IT TOF MS (HPLC - ESI IT TOF MS) C. 保留组分 (R1) 在 HPLC - ESI IT TOF MS 系统 (retained fraction by HPLC - ESI IT TOF MS)

图 2 莱菔子提取物在 HUVEC/CMC - HPLC - ESI IT TOF MS 系统上分析的二维色谱图

Fig. 2 Chromatograms of *Semen raphani* extract analyzed by HUVEC/CMC coupled with HPLC - ESI IT TOF MS system

为了验证上述保留组分筛选的准确性,采用相同条件的 HUVEC/CMC - online - HPLC - ESI IT TOF MS 系统对芥子酸对照品溶液进行分析,结果见图 3,

芥子酸对照品与莱菔子提取物的保留组分具有相同的保留行为和质谱信息,因此,确定莱菔子中潜在的活性成分为芥子酸。



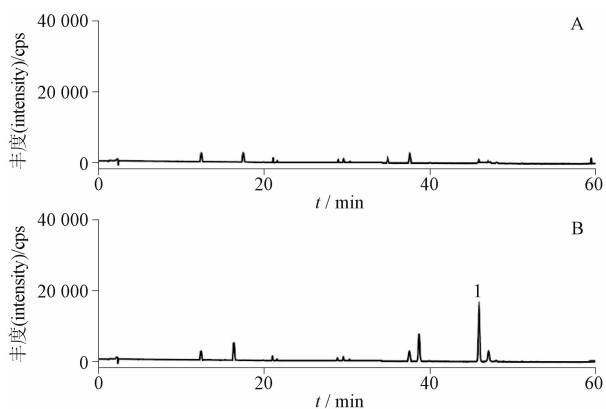
A. HUVEC/CMC 柱 (HUVEC/CMC column) B. HPLC - ESI IT TOF MS C. 保留组分 (R) 在 HPLC - ESI IT TOF MS (retained fraction by HPLC - ESI - IT - TOF - MS)

图 3 芥子酸在 HUVEC/CMC - HPLC - ESI IT TOF MS 系统上分析的二维色谱图

Fig. 3 Chromatograms of erucic acid analyzed by HUVEC/CMC coupled with HPLC - ESI IT TOF MS system

2.10.3 细胞内成分的 LC - MS/MS 分析 空白细胞色谱图及含药细胞色谱图见图 4,含药细胞内可检测到芥子酸。

2.10.4 HUVEC 存活率检测 与空白组比较,模型组 HUVEC 存活率显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,芥子酸低、中、高剂量组能显著提高 HUVEC

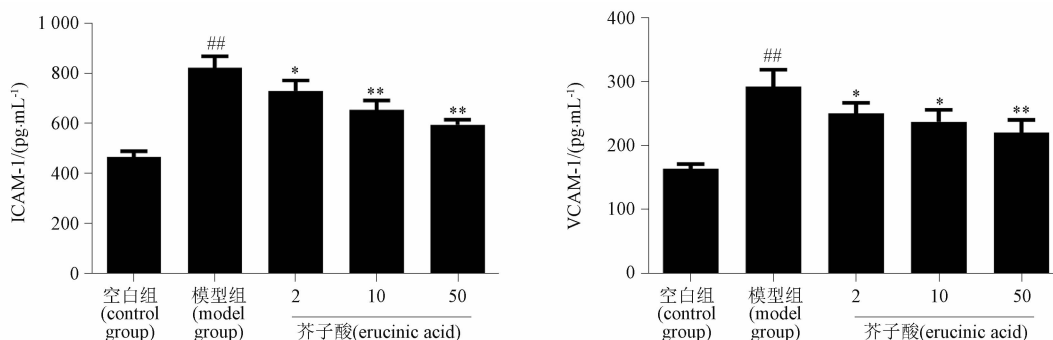


1. 芥子酸(erucinic acid)
A. 空白 HUVEC 裂解液 (blank HUVEC lysate) B. 芥子酸处理的 HUVEC 裂解液 (erucinic acid treated HUVEC lysate)

图 4 HUVEC 胞内成分的色谱图
Fig. 4 LC-MS/MS diagrams of intracellular components of HUVEC

存活率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

2.10.5 芥子酸对 ox-LDL 损伤 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 含量的影响 实验选取 HUVEC 细胞,考察芥子酸对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的



与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (compared with blank group, ^{##} $P < 0.01$; compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$)

图 5 芥子酸对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 含量的影响
Fig. 5 Effects of erucinic acid on ICAM-1 and VCAM-1 in the supernatant of HUVEC injured by ox-LDL

2.10.6 芥子酸对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组 HUVEC 内 Bcl-2 蛋白表达水平显著下降、Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,低、中、高剂量组细胞内 Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组细胞内 Bcl-2 蛋白显著升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见图 6。

表 1 芥子酸对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 存活率影响
Tab.1 Effect of erucinic acid on viability in HUVEC damaged by ox-LDL

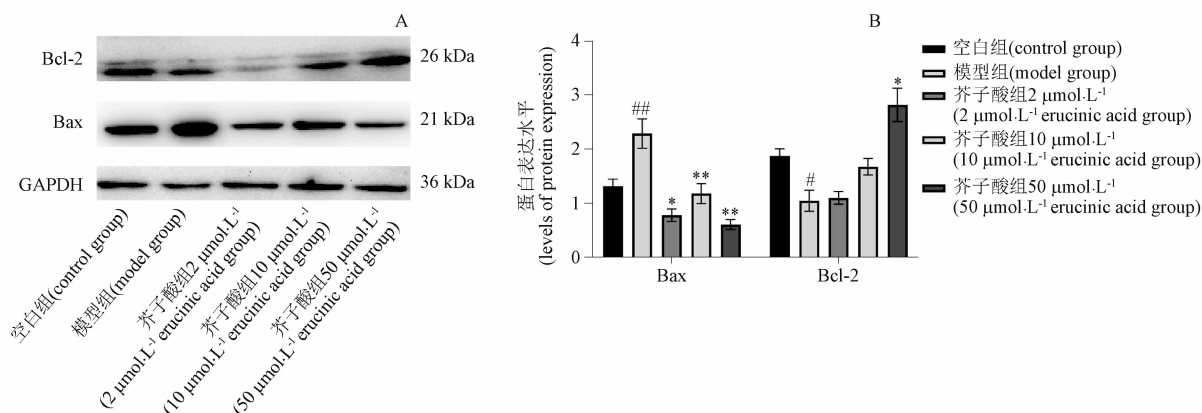
| 组别 (group) | 细胞存活率 (cell survival rate)/% |
|--|------------------------------|
| 空白组(control group) | 94.3 ± 3.21 |
| 模型组(model group) | 47.6 ± 2.5 [*] |
| 芥子酸 2 μmol·L ⁻¹ 组(2 μmol·L ⁻¹ erucinic acid group) | 63.0 ± 3.0 ^{**} |
| 芥子酸 10 μmol·L ⁻¹ 组(10 μmol·L ⁻¹ erucinic acid group) | 74.7 ± 2.52 ^{**} |
| 芥子酸 50 μmol·L ⁻¹ 组(50 μmol·L ⁻¹ erucinic acid group) | 76.3 ± 4.16 ^{**} |

注 (note): 与空白组比较, ^{*} $P < 0.01$ (comparing with blank group, ^{*} $P < 0.01$);与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ (compared with model group, ^{**} $P < 0.01$)

保护作用,结果如图 5,在剂量 2 ~ 50 μmol·L⁻¹芥子酸作用下, HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达与模型组差异有统计学意义,且随着芥子酸浓度的增加, ICAM-1 和 VCAM-1 的表达量逐渐下降,具有剂量依赖性。

3 讨论

莱菔子中主要含有主要含有硫苷类、生物碱类、黄酮类和脂肪酸类等成分,目前,对莱菔子的研究多集中在莱菔子的有效部位或芥子碱硫氰酸盐、芥子碱氯化盐、芥子酸、萝卜硫苷等主要成分的定量研究或相关药理作用研究。莱菔子中活性成分作用靶点的研究较少。早在 1996 年,贺浪冲教授和他的团队发明了 CMC 技术,该技术不仅具有色谱的分离



A, B. Bcl-2, Bax 蛋白表达水平 (expression levels of Bcl-2 and Bax proteins); 与空白组比较, [#] $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; (compared with blank group, [#] $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.01$; compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$).

图6 芥子酸对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响

Fig. 6 Effects of erucic acid on the expression levels of Bcl-2 and Bax proteins in HUVEC induced by ox-LDL

能力,还兼具生物活性,是一种从复杂中药体系快速筛选活性成分的有效方法^[15]。CMC 技术自问世以来,经历了从一维到多维、从线下到线上的发展,实现了高通量筛选^[16-17]。此外,CMC 也从多靶点发展到特异靶点,其特异性在不断提高^[18]。将来 CMC 应该从未知的受体数量发展到可控的受体数量,从而大大提高分析的准确性。基于药物与膜受体之间的特异性识别或亲和力,CMC 可以帮助快速筛选复杂样品中可以结合靶膜受体的活性成分。因此,CMC 为复杂样品中的靶点鉴定、创新药物发现、药物机制研究和药物质量控制提供了有效的分析方法。HUVEC 细胞含有丰富的 β_1 -AR 受体,即 β_1 -AR 受体高表达细胞,是研究心脑血管疾病常用的细胞类型。Zhang 等^[13]采用 HUVEC/CMC-LC-LC/MS² 快速筛选和鉴定了葛根治疗心脑血管疾病的 4 种有效成分。本研究建立了 HUVEC/CMC 在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统,从莱菔子中筛选出的抗心脑血管疾病组分为芥子酸,说明了 HUVEC/CMC-HPLC-ESI IT TOF MS 系统可以快速地复杂天然药物中筛选目标成分,相比于传统复杂样本中的活性成分筛选,大大节约了时间。后期将构建过表达 β_1 -AR 受体的细胞,明确芥子酸的结合受体。

芥子碱硫氰酸盐或芥子碱氯化盐具有降压、抑制动脉粥样硬化等药理作用^[10-11]。查阅文献可知,芥子碱是芥子酸与胆碱形成的酯,两者在体内可以发生相互转化^[19-20]。本研究发现芥子酸可以与 HUVEC 膜受体结合,并且在细胞内能检测到芥子酸,推

测芥子碱可能通过水解或酶解的方式转换成芥子酸进入细胞内发挥药理作用。

ox-LDL 损伤 HUVEC 后,可诱导炎症性因子的释放,其中就包括 VCAM-1 和 ICAM-1 等。细胞粘附因子在细胞信号传导与活化、凝血和血栓形成、组织损伤修复等生理和病理过程中发挥重要作用,当机体内黏附分子水平升高时,很容易形成血栓。ICAM-1 主要分布于上皮细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等,其血清含量升高提示单核细胞、内皮细胞和淋巴细胞的黏附作用增强^[21];VCAM-1 可介导单核细胞、内皮细胞和淋巴细胞等的黏附作用,脱落于血管内皮细胞表面的 VCAM-1 能够促进区域内血小板聚集,从而加速血栓形成^[22]。本研究对芥子酸的活性进行了评价,发现芥子酸在剂量 2~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内显著下调 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,并呈剂量依赖性,提示芥子酸可能通过调节黏附分子的分泌减轻内皮细胞损伤。

β_1 -AR 是细胞膜上的 G 偶联蛋白受体,在心肌细胞及血管内皮细胞凋亡的发展过程中起重要调控作用^[23-24]。在细胞凋亡的发生进程中,Bax、Bcl-2 是调节线粒体凋亡途径的关键信号因子,Bcl-2/Bax 比例失衡,将诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖^[25-26]。实验结果发现,ox-LDL 可以使 HUVEC 中 Bcl-2 蛋白表达水平显著下降,Bax 蛋白表达显著升高,细胞存活率显著下降;经不同浓度芥子酸处理后,低、中、高剂量组细胞内 Bax 蛋白表达显著降

低,高剂量组细胞内 Bcl-2 蛋白显著升高,提示芥子酸可通过调节 Bcl-2/Bax 通路减轻细胞损伤。本文后期将进一步研究 β_1 -AR 受体和 Bcl-2/Bax 蛋白之间的关系,明确芥子酸减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的具体作用机制。

综上所述,本研究采用 CMC 模型与液相色谱-质谱联用仪构成 HUVEC/CMC 在线联用 HPLC-ESI IT TOF MS 系统,可快速筛选莱菔子中心脑血管疾病的潜在活性成分,且活性成分芥子酸可通过调节 Bcl-2/Bax 通路减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。

参考文献

- [1] 董梅月,闫志,杜镇,等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 和碎片离子检索技术分析莱菔子中硫苷类化合物[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(12):7428
DONG MY, YAN Z, DU Z, *et al.* Glucosinolates analysis in Raphani Semen based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS and fragment ion search technology[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 37(12):7428
- [2] 高思佳,王计瑞,秦伟瀚,等. 莱菔子炮制前后 HPLC 特征图谱及 4 种成分含量变化研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(5):70
GAO SJ, WANG JR, QIN WH, *et al.* Study on characteristic fingerprint of raw and processed raphani semen and changes of four chemical components [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021, 28(5):70
- [3] 冯俊杰,蒋海强,董梅月,等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法分析莱菔子化学成分[J]. 化学分析计量, 2021, 30(11):14
FENG JJ, JIANG HQ, DONG MY, *et al.* Analysis of compositions of Raphani Semen by UPLC-Q-Orbitrap-MS[J]. *Chem Anal Meter*, 2021, 30(11):14
- [4] 朱立俏,盛华刚,郑德,等. HPLC-TOF/MS 对莱菔子中化学成分的快速鉴定[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2):358
ZHU LQ, SHENG HG, ZHENG D, *et al.* Rapid identification of chemical compositions in *Semen raphani* by HPLC-TOF/MS[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2018, 45(2):358
- [5] 高世杰,乔利,齐冬梅. 莱菔子水煎液降低自发性高血压大鼠血压的粪便代谢组学研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(4):853
GAO SJ, QIAO L, QI DM, *et al.* Fecal metabolomics study of Radish seed decoction on reducing blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(4):853
- [6] 代孟孟,张茜,能纪娟,等. 基于谱效关系探讨莱菔子促进肠运动活性成分[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(6):806
DAI MM, ZHANG Q, NENG JJ, *et al.* Study on active components of Laifuzi (Raphani Semen) in promoting intestinal motility based on spectrum-effect relationship [J]. *J Shangdong Univ Tradit Chin Med*, 2021, 45(6):806
- [7] 李莉,黄涵桢. 莱菔子乙醇提取物对 ApoE^{-/-}小鼠血脂血糖及肝脂肪变性的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6):622
LI L, HUANG HC. Effects of alcohol extract of radish seed on blood lipid, glucose and liver steatosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2021, 37(6):622
- [8] 李丽. 芥子和莱菔子炮制前后镇咳、祛痰药效学筛选及炒莱菔子 PK-PD 相关性分析[D]. 北京:中国中医科学院, 2020
LI L. Pharmacodynamic Screening of Antitussive and Expectorant Effects of Sinapis Semen and Raphani Semen Before and After Processing and Correlation Analysis of PK-PD of Stir-fried Raphani Semen [D]. Beijing: Chinese Acad Chinese Medicine Science, 2020
- [9] 黄旭鑫. 莱菔子素下调紫杉醇介导的 MyD88 + 人卵巢癌细胞 PD-L1, IDO1 和 AhR mRNA 表达以及 IDO1 活性[D]. 成都:成都中医药大学, 2019
HUANG XX. Sulforaphane down-regulates Paclitaxel-mediated Expression of PD-L1, IDO1 and AhR and Activity of IDO1 in MyD88 + Humanovarian Cancer Cells [D]. Chengdu: Chengdu Traditional Chinese Medicine University, 2019
- [10] 黄涵桢,张祝,张希洲,等. 芥子碱硫氰酸盐抑制 IR 小鼠血脂血糖升高、动脉粥样硬化及肝细胞脂肪变性[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1):1
HUANG HC, ZHANG Z, ZHANG XZ, *et al.* Sinapine thiocyanate inhibits hyperlipidemia, hyperglycemia, atherosclerosis and hepatocellular steatosis in IR mice [J]. *China J Pathophysiol*, 2018, 34(1):1
- [11] 王惠国,张楠楠,秦海宏,等. 芥子碱氯化盐对肾素-血管紧张素系统的作用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2):292
WANG HG, ZHANG NN, QIN HH, *et al.* The effect of sinapine chlorate on Renin-angiotensin system [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2016, 27(2):292
- [12] HAN S, LÜ Y, WEI F, *et al.* Screening of bioactive components from traditional Chinese medicines using cell membrane chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29(4):341
- [13] ZHANG YN, ZHU SJ, LI N, *et al.* Screening and identification of the active components from Puerariae Radix by HUVEC/CMC-LC-MS² [J]. *J Chromatogr B*. 2019, 1132: 121825
- [14] ZHANG YN, ZHU SJ, LI N, *et al.* Screening and identification of the active components from Puerariae Radix by HUVEC/CMC-LC-MS² [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1132:121825
- [15] HE LC, GENG XD. Cell membrane chromatography—a new method for studying the drug-receptor interaction [J]. *New Process Biomed Chromatogr*, 1996, (3):8
- [16] HE LC, WANG SC, GENG XD. Coating and fusing cell mem-

- branes onto a silica surface and their chromatographic characteristics[J]. *Chromatographia*, 2001, 54(1-2):71
- [17] LI M, WANG S, ZHANG Y, HE L. An online coupled cell membrane chromatography with LC/MS method for screening compounds from *Aconitum carmichaeli* Debx. acting on VEGFR-2[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(4):1063
- [18] MA W, WANG C, LIU R, *et al.* Advances in cell membrane chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1639:461916
- [19] 朱立俏, 于绍华, 张茜, 等. 基于 HPLC-DAD 特征图谱分析莱菔子饮片酶解过程中化学成分的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4):140
- ZHU LQ, YU SH, ZHANG Q, *et al.* Analysis on changes of chemical components in enzymolysis process of raphani semen pieces based on HPLC-DAD characteristic spectra[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(4):140
- [20] 高磊, 张茜, 盛华刚, 等. 炒莱菔子中萝卜苷、芥子碱硫酸盐在肠道菌群体外代谢的研究[J]. *中成药*, 2022, 44(7):2396
- GAO L, ZHANG Q, SHENG HG, *et al.* Study on metabolism of glucoside and sinapine thiocyanate in stir-fried radish seeds outside intestinal bacterial population[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(7):2396
- [21] 李伟霞, 王晓艳, 贾文汇, 等. 脑心通胶囊药效成分对人脐静脉内皮细胞 JAK/STAT 信号通路、血管活性物质、黏附分子、炎症因子的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(3):301
- LI WX, WANG XY, JIA WH, *et al.* Effects of active components of naoxintong capsule on the jak/stat signal pathway, vasoactive substances, adhesion molecules and inflammatory factors of HUVEC[J]. *J China Pharm*, 2021, 32(3):301
- [22] 郑书国, 赵梦秋, 任尤楠, 等. 番红花酸对人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 表达和单核-内皮细胞黏附的影响[J]. *药学学报*, 2015, 50(1):34
- ZHENG SG, ZHAO MQ, REN YN, *et al.* Effects of crocetin on VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells and monocyte-endothelial cell adhesion[J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(1):34
- [23] 王赛, 胡焯, 包斯图. 黄芩苷对扩张型心肌病大鼠心室重构、心室肌细胞凋亡及 β_1 -AR/PKA/CaMK II 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(9):140
- WANG S, HU Y, BAO ST. Effects of baicalin on ventricular remodeling, ventricular myocyte apoptosis and β_1 -AR/PKA/CaMK II signaling pathway in dilated cardiomyopathy rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(9):140
- [24] WANG YY. β_1 -adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and $I\kappa B\alpha$ phosphorylation[J]. *Critical Care*, 2015, 19(1):76
- [25] 戴璐彬, 刘竣玮, 关婉辰. 参麦饮含药血清对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(1):2
- DAI LB, LIU JW, GUAN WC, *et al.* Protective effect of Shenmai Yin medicated serum on H_2O_2 -induced oxidative damage of HUVEC cells[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med*, 2022, 38(1):2
- [26] 李开言, 王军, 杨丹. 野蔷薇根总黄酮对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 线粒体功能及凋亡通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(10):1431
- LI KY, WANG J, YANG D. Effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb. on mitochondrial function and apoptin pathway of HUVEC induced by hydrogen peroxide[J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol*, 2021, 32(10):1431

(本文于 2023 年 12 月 1 日收到)