赤芍萜苷组分抗缺血缺氧损伤的代表性成分的发现与验证

封　亮[1#], 柯仲成[2, 3#], 汪　刚[2], 林传燕[2], 石心红[1], 贾晓斌[1*]

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198;　2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029;
3. 黄山学院化学化工学院, 安徽 黄山 245041)

摘要: 组分的发现与确证是组分制剂研究的前提。分子对接技术与药效活性评价为赤芍萜苷组分 ($CSTGC_S$) 抗缺血缺氧损伤的代表性成分发现并验证提供有效方法。本研究采用 UPLC-TOF/MS/MS 定性分析 $CSTGC_S$ 的化学成分, 与心肌缺血关键受体蛋白进行分子对接, 并以 Libdockscore 筛选主要活性成分; 建立 H9c2 细胞缺氧损伤模型, 以肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 为评价指标, 辨识能代表 $CSTGC_S$ 防治心肌缺血的成分组合; 进一步以细胞凋亡指数、凋亡蛋白和线粒体相关 mRNA 表达, 验证其对缺氧细胞凋亡的抑制作用, 最终确定 $CSTGC_S$ 的代表性成分。结果显示, 芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷可与 4TWT、3O4O、4KZN 和 1M9J 等靶蛋白在空间、能量上匹配且含量较高, 为 $CSTGC_S$ 的主要活性成分; 在调节 CK、LDH、SOD、MDA 和维持线粒体功能、抑制细胞凋亡方面, 芍药苷+芍药内酯苷+苯甲酰芍药苷组合与 $CSTGC_S$ 作用无统计学差异, 确定为 $CSTGC_S$ 抗缺血缺氧损伤的代表性成分, 为组分整体性质及制剂研究提供依据。

关键词: 赤芍; 萜苷组分; 缺血缺氧损伤; 代表性成分

中图分类号: R285　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870 (2018) 12-1954-09

Discovery and verification of representative ingredients of Chishao terpene glucoside components against ischemia and hypoxia injury

FENG Liang[1#], KE Zhong-cheng[2, 3#], WANG Gang[2], LIN Chuan-yan[2], SHI Xin-hong[1], JIA Xiao-bin[1*]

(*1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;*
2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Huangshan University, Huangshan 245041, China)

Abstract: The discovery and verification of components are prerequisites for developing of component preparations. The molecular docking technique and pharmacodynamic activity evaluation provide effective methods for the discovery and verification of the representative components of Chishao terpene glucoside components ($CSTGC_S$) against ischemia and hypoxia injury. The chemical constituents of $CSTGC_S$ were analyzed qualitatively by UPLC-TOF/MS/MS. Main chemical constituents were docked with key receptor proteins of myocardial ischemia to preliminarily screen anti-ischemia active ingredients, and screening for main active ingredients with Libdockscore. Then a H9c2 cell hypoxia injury model was established, and creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) were

收稿日期: 2018-05-11;　修回日期: 2018-07-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573620); 江苏省六大人才高峰创新团队资助项目 (SWYY-CXTD-004); 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2017A394).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-25-86185239, E-mail: jiaxiaobin2015@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0437

determined to screen the representative combinations in $CSTGC_S$. In addition, apoptosis index, apoptotic protein expression and mitochondria-associated mRNA levels were determined to verify the inhibition of the representative components (RC_S) on the apoptosis of hypoxic cells. Eventually, the representative components of $CSTGC_S$ were determined. The results showed that paeoniflorin, albiflorin, benzoyl paeoniflorin and oxypaeoniflorin were considered to be the main active components because of their high matching with target proteins (4TWT, 3O4O, 4KZN, 1M9J) in space and energy. There was no statistical difference in regulating CK, LDH, SOD, MDA levels and maintaining mitochondrial function as well as inhibiting cell apoptosis between $CSTGC_S$ group and RC_S group (paeoniflorin + albiflorin + benzoyl paeoniflorin combination). Therefore, paeoniflorin, albiflorin and benzoyl paeoniflorin were selected as the most representative ingredients of $CSTGC_S$ against ischemia and hypoxia injury, providing a basis for the overall properties of the components and formulation of $CSTGC_S$.

Key words: Paeoniae radix; terpene glucoside; hypoxia ischemia; representative component

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* PalL. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根，具有清热凉血、散瘀镇痛之功效[1]。现代临床研究表明，赤芍萜苷是防治心血管疾病的药效物质基础，主要包括芍药苷 (paeoniflorin)、芍药内酯苷 (albiflorin)、氧化芍药苷 (oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)、没食子酰芍药苷 (galloylpaeoniflorin)、和芍药新苷 (lactiflorin) 等[2]，具有稳定细胞膜、减少氧化损伤和抗细胞凋亡作用[3]。赤芍萜苷组分作为制剂原料，合理的剂型设计必然离不开中药组分的性质表征。

中药组分构成复杂，是通过多个活性成分与生物体靶蛋白结合，产生协同或拮抗作用发挥药效，若将所有的活性成分都纳入到组分性质表征中，难度大且可行性差。若能甄选出代表组分整体药效的 N 个成分，则可简化中药组分的性质表征。代表性成分的确定需要依据其活性与原提取物的生物活性相似。这就需要采用一些先进分析技术如虚拟计算等[4]对主要活性成分挖掘，经过活性评估并确认获得。分子对接技术作为一种重要的计算机辅助手段，是基于小分子配体与目标蛋白受体之间的“钥−锁原理”，可用于研究靶蛋白受体和小分子配体之间的亲和力以及在空间、能量上的匹配情况，实现中药药效物质基础的高效快速挖掘[5]。LibDock 为常用的分子对接工具，根据小分子构象与受体相互作用热区 (hotspot) 匹配的原理将这些构象对接到受体的结合口袋中，优势在于易操作、速度快，适合于中药活性成分的虚拟筛选。

本研究采用 UPLC-TOF/MS/MS 对赤芍萜苷组分的化学成分进行定性分析，再将各成分与心肌缺血的关键受体蛋白进行分子对接，依据 Libdockscore 分值、成分含量筛选主要活性成分。建立 H9c2 细胞缺氧损伤模型，遵循组分各主要成分的量比关系，构建不同成分组合并客观评价抗缺氧活性，以此辨识能代表赤芍萜苷组分整体药效的 N 个成分。在此基础上，进一步验证其对缺氧细胞凋亡的抑制作用，最终确定赤芍萜苷组分的代表性成分，以期能为赤芍萜苷组分的整体性质研究提供依据。

材料与方法

试剂　溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑 (MTT, 批号 20161107)、DMEM 高糖培养基 (批号 20161226)、胰酶 (批号 20161104)、四季青胎牛血清 (批号 20160716) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 连二亚硫酸钠 ($Na_2S_2O_4$, 批号 20160914, 国药集团化学试剂公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 1601252180, 南京化学试剂股份有限公司); 芍药内酯苷 (纯度≥98%, 批号 JZ16080402)、苯甲酰芍药苷 (纯度≥98%, 批号 JZ16011602)、氧化芍药苷 (纯度≥98%, 批号 JZ15120601)、赤芍萜苷组分 (纯度≥50%, 批号 JZ16011801) 均购自南京景竹生物科技有限公司; 芍药苷 (纯度≥98%, 批号 1523046)、甲酸 (色谱级) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 肌酸激酶 (CK) 测试盒 (批号 20170511)、乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (批号 20170413)、微量丙二醛 (MDA) 测试盒 (批号 20170311)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号 20170415) 均购于南京建成生物工程研究所; 抗体 cleaved caspase-3 (9664) 购于 CST 公司; Bcl-2 (12789-1-AP) 购于武汉三鹰公司; Bax (ab182734) 和 β-actin (ab 8227) 均购于 Abcam 公司; 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为纯化水; 其余试剂均为分析纯。

主要仪器　倒置显微镜 (XDS-1B, 重庆光电仪器总公司); 低速离心机 (Anke TDL-40B, 上海安亭科学仪器厂); 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); 全自动酶标仪 (Spectra, max190, Molecular Devices); Triple Q-TOF 5600 质谱仪 (AB Sciex 公司); LC-20AD 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司)。

赤芍萜苷组分的成分定性分析　① 色谱条件: Welchrom^{TM} C18 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1%甲酸 (A)−乙腈 (B), 梯度洗脱, 0～5 min, 2%～8% A; 5～30 min, 8%～20% A; 30～45 min, 20%～35% A; 45～60 min, 35～60% A; 60～65 min, 60%～100% A。流速 0.4 mL·min^{-1}, 柱温 30 ℃[6]。② 质谱条件: 采用 TOF MS-IDA-MS/MS 模式, 负离子检测模式, 喷雾电压 5 500 eV, 离子源温度 (TEM) 550 ℃, 气帘气 (CUR N_2) 40 psi (1 psi = 6.895 kPa), 雾化气 (GS1 N_2) 60 psi, 辅助气 (GS2 N_2) 60 psi, 去簇电压 (DP) 70 eV, TOF MS 扫描范围 *m/z*: 50～1 500。IDA 条件下设置: 碰撞电压 (CE) 35 eV, 碰撞电压差 (CES) 10 eV, 开启动态背景扣除[7]。取适量浓度的赤芍萜苷溶液, 12 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 利用 UPLC-TOF/MS/MS 对上清液进行分析, 以 Analyst TF 1.6 软件采集数据, 通过 PeakView 1.2.1 软件进行峰提取, 负离子模式下提取$[M+HCOO]^-$分子离子峰, 通过离子碎片质荷比 *m/z* 解析 (信号强度/总信号强度 > 0.1%, 且测定误差 ppm 绝对值 < 10 ppm, 对色谱峰进行筛选和鉴定。

分子对接虚拟筛选赤芍萜苷组分的活性成分　① 心肌缺血相关靶基因的搜集: 从 CTD 数据库 (http://ctdbase.org/) 中选择与心肌缺血 (myocardial ischemia) 有关的基因。利用该数据库的检索功能, 在“Diseases”中输入“myocardial ischemia”, 点击“Gene”项, 即找出与心肌缺血相关联的所有基因, 筛选“Direct Evidence”栏下标记为“M (marker/mechanism)”和“T (therapeutic)”获得经被实验或临床证实的相关靶基因; 对“Inference Score”进行降序排列, 确定分值前 5%的若干个靶基因为研究对象, 输入到 Drug-Bank 数据库, 筛选具有上市小分子药物的目标基因[8]。② 蛋白受体晶体结构的确定: 优先选择含活性配体且分辨率较高的人源蛋白晶体结构, 晶体结构通过 PDB 数据库 (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) 获得, 确定研究靶蛋白, 再将靶蛋白导入 Discovery Studio 中, 补全不完整残基、删去配体分子和水分子、加氢和删除蛋白质变体等[9]。③ 蛋白受体活性位点的确定: 蛋白质晶体结构含有原配体, 以该配体位置为中心再向外扩张一定的范围, 其中受体残基就是相关的活性位点[10]。④ 分子对接可靠性验证: 在赤芍萜苷化学成分与靶蛋白受体分子对接之前, 需要对分子对接的精度及可靠性进行考察。靶蛋白含有原配体时, 先将配体删除, 再将其对接到原活性位点, 若两次配体构象的均方根偏差值 (RMSD)≤2.0×10^{-10}, 即可证实该对接方法的可靠性及对接参数的合理性[11]。⑤ 赤芍萜苷的分子对接: 将 14 个候选成分与受体蛋白导入 Discovery Studio 2.5 中, 将小分子进行能量优化, 利用 LibDock 进行分子对接, 具体对接流程如下: 从活性位点定义 Sphere 球, 修改活性部位球半径为 9; 在 Protocols 中展开 Receptor-Ligand Interactions 文件夹, 双击 Dock Ligands (LibDock), 设置受体、配体和 sphere 坐标, Max Hits to Save 设为“10”, 其余参数均为默认值。以 14 个候选成分的平均对接得分为阈值, 得分高于此阈值的化学成分被认为是赤芍萜苷治疗心肌缺血的主要活性成分[12]。

赤芍萜苷组分主要活性成分的含量测定　采用 Agilent TC-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 1% 甲酸 (A)−乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0～25 min, 90%～82% A; 25～65 min, 82%～50% A, 流速 1.0 mL·min^{-1}, 柱温 30 ℃, 检测波长 230 nm。

基于缺氧 H9c2 细胞模型的代表性成分辨识　① H9c2 心肌细胞, 购于中国科学院上海细胞资源中心。H9c2 细胞的培养: 将快速解冻的 H9c2 细胞, 迅速转移至已添加 5.0 mL DMEM 不完全高糖培养基 (含 10% FBS) 的 15 mL 离心管中, 吹打均匀后, 离心 (2 000 r·min^{-1}, 2 min), 吸除培养基, 再加 DMEM 不完全高糖培养基 5.0 mL, 吹打均匀后转移至 T-25 培养瓶中, 置 37 ℃、5% CO_2 培养箱, 隔天换培养基, 细胞长至 80%～90%传代。② 赤芍萜苷给药浓度的筛选: 取状态良好的 H9c2 细胞, 加培养基吹打均匀成每毫升 1×10^6 个细胞混悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 于 37 ℃、5% CO_2 的环境下培养 24 h, 吸除培养基, 加入空白培养基或浓度为 1 600、800、400、200、100、50、25、12.5 和 6.25 μg·mL^{-1} 的赤芍萜苷 100 μL, 继续培养 24 h 后, 弃去培养基, 每孔加 0.5 mg·mL^{-1} MTT 溶液 100 μL, 继续培养 4 h, 弃去孵育液, 再加入 DMSO 100 μL, 37 ℃恒温摇床振荡 10 min 后, 利用酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度 (OD), 计算各组细胞存活率 (%), 选择存活率 (%) ≥95% 的最高浓度, 为赤芍萜苷的给药浓度[13]。③ 不同的活性成分构成对 H9c2 细胞缺氧损伤的影响:

遵循组分中各成分的比例关系, 研究各成分组合对 $Na_2S_2O_4$ 诱导 H9c2 细胞影响, 以此辨识与赤芍萜苷组分整体药效无统计学差异的 N 个成分作为代表性成分。取状态良好的 H9c2 细胞, 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 分成 12 组, 分别为空白组、模型组 (4 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$)、200 μg·mL^{-1} 赤芍萜苷组、67.6 μg·mL^{-1} 芍药苷 (a) 组、42.3 μg·mL^{-1} 芍药内酯苷 (b) 组、3.8 μg·mL^{-1} 苯甲酰芍药苷 (c) 组、7.0 μg·mL^{-1} 氧化芍药苷 (d) 组、a+b 成分组、a+c 成分组、b+c 成分组、a+b+c 成分组和 a+b+c+d 成分组, 继续培养 24 h 后, 吸弃孔内培养液, 空白组加入空白培养基 2.0 mL, 其余各组加入 4 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$ 2.0 mL 后, 继续培养 24 h, 利用倒置显微镜观察各组 H9c2 细胞的形态。再吸取孔内培养液, 分别收集于 4 mL 离心管中, 3 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒说明书测定 CK、LDH、SOD 活力和 MDA 含量。

赤芍萜苷组分代表性成分抗缺血缺氧损伤作用的验证　① 凋亡指数的测定: 利用结合缓冲液吹打成每毫升 1×10^6 个细胞悬浮液, 吸取 100 μL, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 和碘化丙啶 10 μL, 避光室温反应 15 min 后, 滴加结合缓冲液 150 μL, 并在 1 h 内利用流式细胞仪进行检测 (激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm), 利用 BD FACS 软件计数, 计算各组 H9c2 细胞的凋亡指数。② 凋亡蛋白的表达: 细胞收集后, 用预冷的 PBS 润洗 2 次, 于冰浴上用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白质, 13 000 r·min^{-1} 离心 10 min, 收集上清液; 利用 BCA 蛋白测定试剂盒, 考马斯亮蓝测定蛋白浓度; 取 50 μg 蛋白上样 SDS-PAG 凝胶, 经电泳后转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 再分别与 cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 抗体 (1∶500 稀释), 4 ℃孵育过夜。*β*-actin 作为内标, TBST 漂洗 3 次, 加二抗 (辣根过氧化物酶标记抗体), 室温下孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 加 ECL 发光试剂孵育 1 min, 于暗室将膜曝光并显影洗像, 利用图像分析软件 Image Pro Plus (IPP 6.0, Media Cybernetics, USA) 进行灰度扫描, 计算 capase-3、Bax、Bcl-2 与 *β*-actin 的 OD 比值, 代表其各蛋白的相对表达量。③ 线粒体 mRNA 的表达: 按抽提纯化方法从 H9c2 细胞中提取总 RNA, 并测定纯度和浓度。取各组 RNA 2 μg、50 μmol·L^{-1} OligodT(18) 2 μL, 加 DEPC 水至 12.5 μL, 65 ℃保温 5 min, 冰浴 5 min, 再依次加入 RNase 抑制剂 0.5 μL, 反应缓冲液 (5×) 4.0 μL, 10 mmol·L^{-1} dNTPS 2.0 μL 和 M-MuLV 1.0 μL, 混匀, 2 000 r·min^{-1} 离心 20 s, 42 ℃保温 1 h, 70 ℃保温 10 min, 冰浴 5 min, 合成 cDNA 第 1 链后, 利用 Real-Time PCR 检测 Ndufa4 和 Ndufa8。

统计学处理　实验过程中所有数据均采用 SPSS 16.0 进行处理, 并且各组间数据比较采用 *t* 检验, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。$P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别表示组间有显著性差异和极显著性差异。

结果

1　赤芍萜苷组分的活性成分辨识

赤芍萜苷的定性分析: 利用 UPLC-TOF-MS 负离子模式, 测定分子离子峰 $[M+HCOO]^-$ 的质荷比 *m*/*z*, 获得测定误差绝对值 < 10 ppm 的分子离子峰 14 个, 分别是芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、芍药新苷、没食子酰基芍药苷、没食子酸乙酯 (progallin A)、芍药花苷 (paeonin b)、4-*O*-没食子酰基芍药内酯苷 (4-*O*-galloylalbiflorin)、水杨酸 (salicylic acid)、4-*O*-没食子酰基芍药内酯苷元 (4-*O*-galloylalbiflorin_qt)、蔗糖 (sucrose)、1-*O*-*β*-*d*-glucopyranosyl-8-*O*-benzoylpaeonisuffrone 和 11*α*,12*α*-epoxy-3*β*,23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,13*β*-olide, 详见表 1, 赤芍萜苷组分主要成分的质谱信息见图 1。

Table 1　Composition matching results of Chishao terpene glucoside components ($CSTGC_S$) in UPLC-TOF-MS negative ion mode

No.	Molecule name	$[M+HCOO]^-$ Theoretical value (*m*/*z*)	$[M+HCOO]^-$ Measurement error (ppm)
1	Paeoniflorin	525.160 27	−7.9
2	Albiflorin	525.160 27	−7.9
3	Benzoyl paeoniflorin	629.186 48	−7.8
4	Sucrose	387.113 32	−5.8
5	Salicylic acid	183.028 8	5.6
6	Oxypaeoniflorin	541.155 18	−8.1
7	Paeonin b	403.123 49	−6.7
8	1-*O*-Beta-*d*-glucopyranosyl-8-*O*-benzoylpaeonisuffrone	509.165 35	−8.3
9	Progallin A	243.049 93	−0.2
10	Lactiflorin	507.149 7	−8.4
11	11*α*,12*α*-Epoxy-3*β*,23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,13*β*-olide	531.295 25	7.2
12	4-*O*-Galloylalbiflorin	677.171 23	9.2
13	Galloylpaeoniflorin	677.171 23	9.2
14	4-*O*-Galloylalbiflorin_qt	509.165 35	−8.3

分子对接辅助辨识活性成分: 选择“Inference Score”值前 5% 的 9 个靶基因 TNF、IL6、AGT、NPPA、EDN1、IL1B、NOS3、NFKBIA 和 VEGFA, 输入到 Drug-Bank 数据库 (http://www.drugbank.ca/) 中, 筛

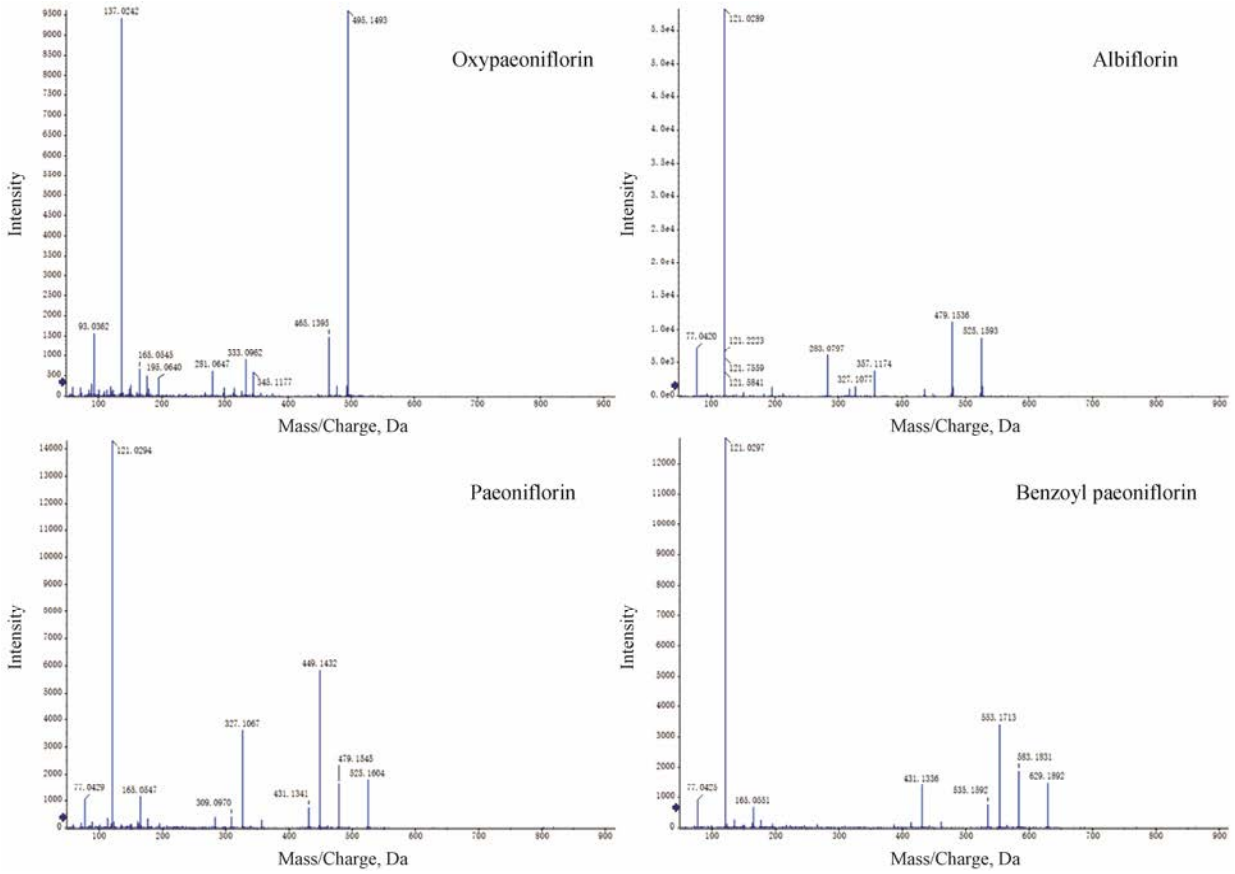

Figure 1　Mass spectrogram of the main components of CSTGC $_{S1}$

选出 4 个已知上市小分子药物作用的基因，分别为 TNF、IL1B、NOS3 和 VEGFA。优先选择复合激动活性配体且分辨率较高的人源受体晶体结构，确定肿瘤坏死因子 (4TWT)、白介素-1β (3O4O)、血管内皮生长因子 A (4KZN) 和一氧化氮合成酶 3 (1M9J) 等 4 个配体−受体复合物作为研究蛋白载体。通过计算比较，确定 1M9J (HEM)、3O4O (NAG)、4TWT (GOL) 和 4KZN (FUC) 等 4 个活性位点坐标 (X、Y、Z 轴) 分别为 (14.621、10.629、54.33)、(6.22、−5.265、4.546)、(−10.293、102.897、252.147) 和 (11.614、−3.171、21.23)。1M9J、3O4O、4TWT、4KZN 的晶体结构中含有的原始配体 HEM、NAG、GOL 和 FUC，采用 LibDock 对接得到的配体构象 (灰色部分) 与原配体的构象 (绿色部分) 能够较好地重合，两者之间 RMSD 值分别为 1.37、1.88、1.91 和 1.97，说明这 4 个靶点的对接方法可靠准确 (图 2)。

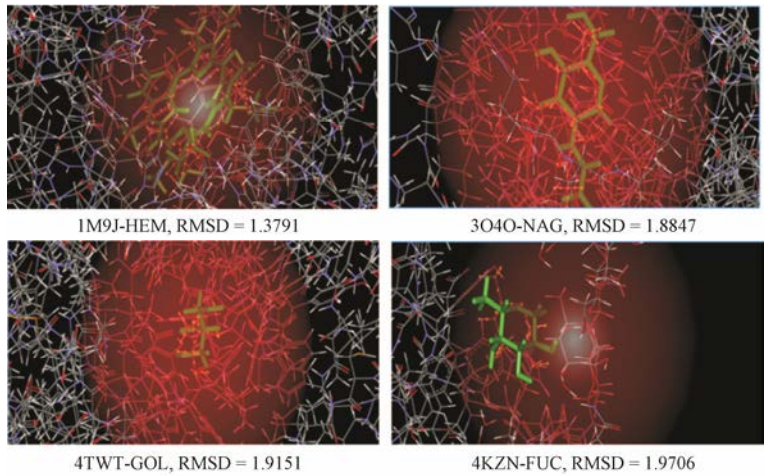

Figure 2　Verification of target protein molecular docking methods

将赤芍萜苷中的 14 个成分与 4TWT、3O4O、4KZN 和 1M9J 进行对接, 得分列于表 2 中, 得出 Libdockscore 分值大于各平均值的有芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、芍药新苷、没食子酰基芍药苷、4-*O*-没食子酰基芍药内酯苷和 4-*O*-没食子酰基芍药内酯苷元, 这些是赤芍萜苷组分抗缺血缺氧损伤的活性成分。

2　赤芍萜苷组分的代表性成分辨识

主要活性成分的含量测定: 芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷的标准曲线回归方程分别为 $Y=1\,703.2X-25.742$ ($R^2=0.999\,4$)、$Y=622.91X-12.323$ ($R^2=0.999\,5$)、$Y=1\,596.2X+2.712\,2$ ($R^2=0.999\,9$) 和 $Y=1\,933.4X+7.616$ ($R^2=0.999\,5$), 线性范围分别为 0.076 2～1.219 2、0.232 0～0.696 0、0.030 5～0.305 0 和 0.032 6～0.521 6 μg; 芍药苷加样回收率为 101.44%, RSD 为 2.43%; 芍药内酯苷的加样回收率为 100.35%, RSD 为 2.14%; 苯甲酰芍药苷的加样回收率为 101.17%, RSD 为 2.74 %; 氧化芍药苷的加样回收率为 99.53%, RSD 为 2.91%。经 HPLC 测定 (图 3), 测得赤芍萜苷组分中芍药苷含量为 338.2 mg·g^{-1}、芍药内酯苷含量为 211.4 mg·g^{-1}、苯甲酰芍药苷含量为 19.12 mg·g^{-1} 和氧化芍药苷含量为 35.1 mg·g^{-1}, 芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷 4 个成分的量比关系为 17.69/11.14/1.0/1.83, 其他成分含量都低于 1.0 mg·g^{-1}。因此, 确定芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷为主要活性成分。

赤芍萜苷组分代表性成分辨识: 与药物共孵育 24 h 后, 若细胞存活率大于 95%时, 则认为该药物没

Table 2　Docking scores for 14 components with various target protein receptors

No.	Molecule name	NOS3 -1M9J	IL1*β* -3O4O	TNF -4TWT	VEGFA -4KZN
1	Paeoniflorin	145.171	126.61	84.210 6	116.001
2	Albiflorin	143.848	127.62	93.188 7	119.292
3	Benzoyl paeoniflorin	140.212	106.55	–	118.37
4	Sucrose	124.182	110.316	68.655 5	100.857
5	Salicylic acid	74.4521	55.057 6	49.282 4	58.672 2
6	Paeonin b	123.29	112.65	–	107.451
7	Lactiflorin	154.095	137.28	102.523	111.567
8	4-*O*-Galloylalbiflorin_qt	155.153	133.75	102.84	122.335
9	1-*O*-Beta-d-glucopyranosyl-8-*O*-benzoylpaeonisuffrone	131.577	105.5	–	102.329
10	Oxypaeoniflorin	128.568	122.23	86.459	118.696
11	Progallin A	101.595	77.145 6	60.126	72.294 1
12	4-*O*-Galloylalbiflorin	177.120	142.26	114.763	136.976
13	Galloylpaeoniflorin	183.832	171.64	78.775	122.945
14	11*α*,12*α*-Epoxy-3*β*,23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,13*β*-olide	103.078	–	–	107.05
	Average value	134.73	117.59	84.08	108.20

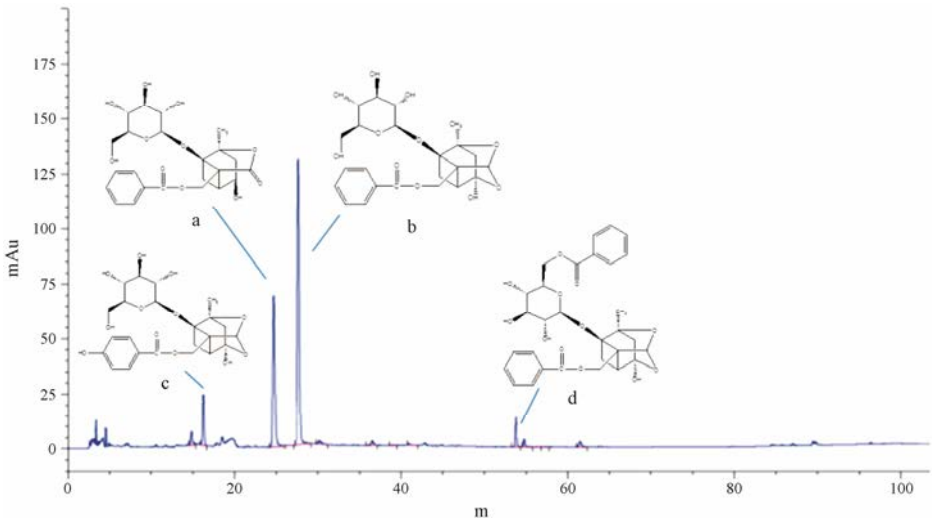

Figure 3　HPLC chromatogram of CSTGC$_S$.　a, b, c, d respectively represent paeoniflorin, albiflorin, benzoyl glucoside and oxypaeoniflorin

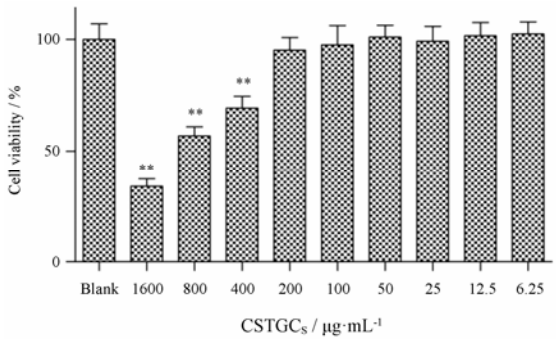

Figure 4　Effect of $CSTGC_S$ concentration on H9c2 cell viability. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{**}P<0.01$ *vs* blank group

有明显细胞毒性。H9c2 细胞的赤芍萜苷给药浓度考察结果见图 4。当质量浓度为 200、100、50、25、12.5 和 6.25 μg·mL^{-1}时 (以萜苷组分重量计), H9c2 细胞存活率都高于 95%; 当质量浓度为 400 μg·mL^{-1}时, H9c2 细胞存活率低于 95%, 且随浓度增加, 细胞存活率逐渐降低, 故选择 200 μg·mL^{-1}赤芍萜苷培养液 (含芍药苷 67.6 μg·mL^{-1}、芍药内酯苷 42.3 μg·mL^{-1}、苯甲酰芍药苷 3.8 μg·mL^{-1}和氧化芍药苷 7.0 μg·mL^{-1})。

对各组 H9c2 细胞形态观察发现, 在空白组中, H9c2 细胞贴壁生长, 细胞呈梭形, 且界限清晰、排列规整, 有少数细胞变圆现象, 可能是由于连续 2 天给予空白培养基, 缺少营养造成的; 当 $Na_2S_2O_4$ 刺激后, 细胞数明显减少, 且排列散乱, 说明缺氧环境对细胞损伤作用明显; 赤芍萜苷和各代表性成分组均能不同程度地缓解细胞数的降低, 减少缺氧对细胞形态的改变。不同代表性成分组合对心肌酶和过氧化物酶的测定结果见图 5, 赤芍萜苷组分及成分组合对 $Na_2S_2O_4$ 诱导 H9c2 细胞的过氧化物酶具有一定调节作用。被 $Na_2S_2O_4$ 刺激后, 细胞 SOD 活性降低, 萜苷组分、成分 a、a+b、a+c、b+c、a+b+c、a+b+c+d 均能显著提高 SOD 活力 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与空白组相比, 模型组 MDA 显著增加 ($P<0.01$), 但给予赤芍成分或不同组合后, 各组都有极显著的降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 在调控 CK、LDH 活力方面, 模型组细胞的 CK、LDH 活力显著增强 ($P<0.01$), 用赤芍成分或组合成分干预后, 赤芍萜苷组分、a、b、a+b、a+c、b+c、a+b+c、a+b+c+d 对 LDH 有显著的改善作用 ($P<0.05$, $P<0.01$), 同时赤芍萜苷组分、a+b、a+c、a+b+c、a+b+c+d 对 CK 均有明显的改善作用 ($P<0.05$, $P<0.01$)。综上, 成分 a+b+c、a+b+c+d 都能很好地代表赤芍萜苷的抗缺氧损伤作用, 考虑成分的简约性, 确定成分 a+b+c、即芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷作为赤芍萜苷的代表性成分。

3　赤芍萜苷代表性成分的抗缺血缺氧损伤作用的验证

各组细胞凋亡指数结果 (图 6) 显示, $Na_2S_2O_4$ 诱

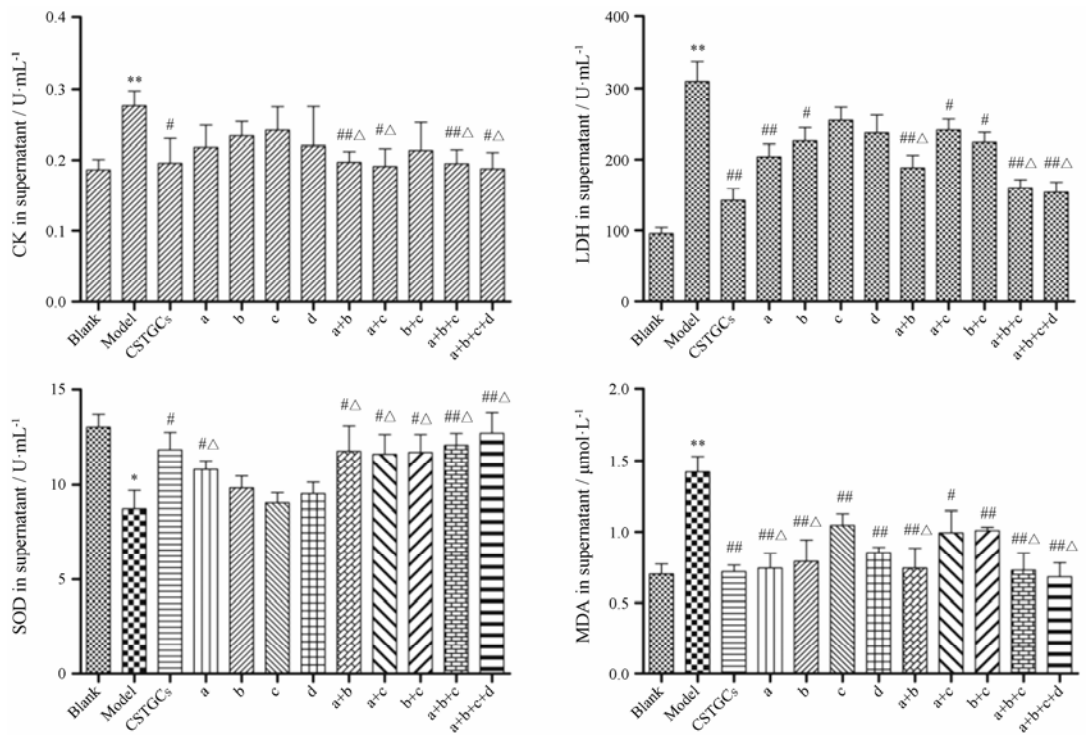

Figure 5　Effects of $CSTGC_S$ and different component compositions on creatine kinase (CK), lactic acid dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in H9c2 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* blank group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* $CSTGC_S$

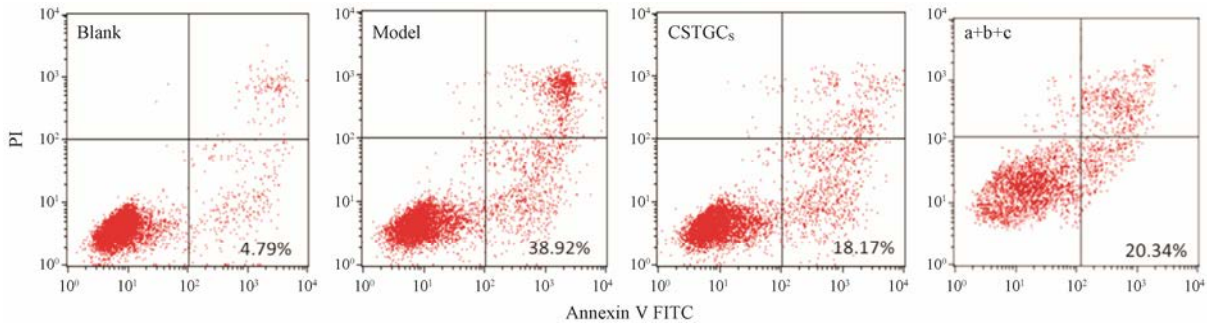

Figure 6　Analysis of apoptosis index of H9c2 cells in each group

导能显著诱导 H9c2 细胞凋亡，凋亡率从正常细胞的 (4.79 ± 0.37) % 升高至 (38.92 ± 3.25) %，赤芍萜苷或代表性成分 a+b+c 都能显著减少 H9c2 细胞损伤，凋亡率分别降低至 (18.17 ± 1.13) % 和 (20.34 ± 1.18) %，说明赤芍萜苷和代表性成分 a+b+c 都能明显抑制缺氧损伤引导的细胞凋亡，且两组对 H9c2 细胞凋亡的抑制作用没有显著性差异。进一步以 Western blot 测定与凋亡相关蛋白表达水平 (图 7)，与空白组相比，模型组中 H9c2 细胞中 Bax 和 caspase-3 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$)，而 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)，说明 $Na_2S_2O_4$ 促进了 H9c2 细胞的凋亡；在给予赤芍萜苷和代表性成分 a+b+c 组，促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 表达被显著降低 ($P < 0.01$)，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达被显著增加 ($P < 0.01$)；重要的是，赤芍萜苷和代表性成分 a+b+c 两组之间无统计学差异。

$Na_2S_2O_4$ 模型组 H9c2 细胞 Ndufa4、Ndufa8 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$)，见图 8，但是赤芍萜苷和代表性成分 a+b+c 都能显著提高 Ndufa4、Ndufa8 mRNA 表达水平，且两组之间无显著性差异。结果表明，赤芍萜苷组或代表性成分组可上调线粒体相关基因表达水平，减轻 $Na_2S_2O_4$ 引起的氧化应激损伤。

讨论

中药组分是一个有序整体，研究模式是一个系统−还原−系统的过程，分为化整为个，化个为整的两个层面。中药组分作为具有特定结构特征的制剂原料，是现代中药制剂研究中最常规的基本单元。科学合理的辨识体现中药组分整体特性的 N 个代表性成分，或许是现代中药制剂处方前研究的关键内容。中药组分的代表性成分与刘昌孝院士提出“中药质量

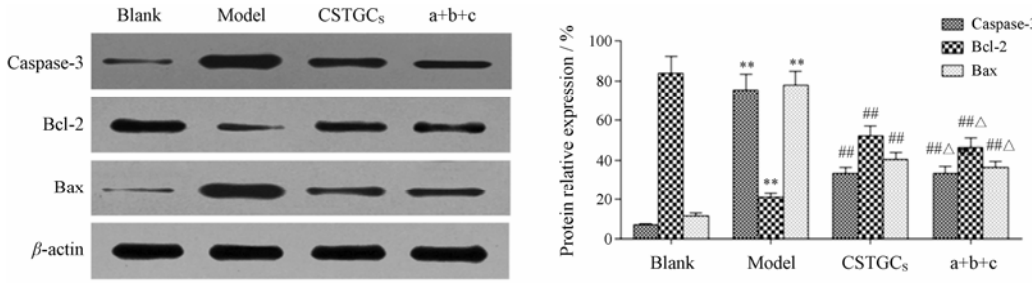

Figure 7　Effect of $CSTGC_S$ and representative component a+b+c on apoptotic proteins in hypoxic H9c2 cells.　$n = 3$, $\bar{x} \pm s$.　$^{**}P < 0.01$ *vs* blank group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* model group; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* $CSTGC_S$

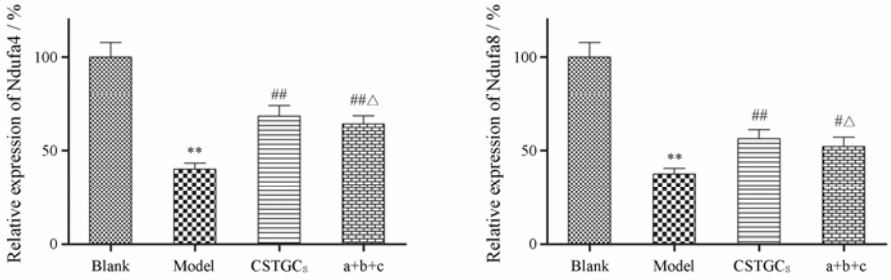

Figure 8　Effect of $CSTGC_S$ and representative component a+b+c on Ndufa4 and Ndufa8 mRNA expression in H9c2 cells.　$n = 3$, $\bar{x} \pm s$.　$^{**}P < 0.01$ *vs* blank group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* model group; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* $CSTGC_S$

标志物 (Q-marker)[14]” 有相似的理论内涵，都指最能代表中药组分安全性、有效性的化学成分群，但研究落脚点存在不同，前者落脚于中药制剂上，后者更多体现在质量控制的范畴。因此，对于中药组分的制剂前研究，代表性成分的辨识是亟待解决的问题。

本文通过分子对接辅助挖掘，得到赤芍萜苷组分的主要活性成分为芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷和苯甲酰芍药苷，含量分别为 33.82%、21.14%、1.91% 和 3.51%，总质量占萜苷组分整体的 60.38%，但是否能够代表萜苷组分防治心肌缺血的整体药效呢？利用细胞实验进行了初步评价，通过 MTT 法筛选赤芍萜苷质量浓度为 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$，并遵循组分中各成分量比关系，通过配伍组合，以 CK、LDH、SOD 和 MDA 为评价指标，辨识发现芍药苷+芍药内酯苷+苯甲酰芍药苷为赤芍萜苷组分的代表性成分。考虑细胞凋亡是心肌缺血缺氧损伤的重要机制，继而对细胞凋亡指数、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、caspase-3 和线粒体功能相关 Ndufa4、Ndufa8 mRNA 表达进行考察，发现成分 a+b+c 具有维持线粒体正常功能、抑制细胞凋亡的作用，并且与赤芍萜苷组分的整体效果无统计学差异。

H9c2 细胞缺氧后，能量代谢发生障碍，Na^+-K^+-ATP 酶、Mg^{2+}-ATP 酶等可将 ATP 催化水解，释放能量的同时，环境 pH 降低，导致 SOD 活性降低；蓄积的氧自由基与膜脂质反应产生过氧化物 MDA，进一步损伤细胞至破裂，CK 和 LDH 等心肌酶泄露。$Na_2S_2O_4$ 对心肌细胞线粒体结构产生严重的破坏作用，可能与活性氧自由基失衡等因素有关，而赤芍萜苷组分及代表性成分 a+b+c 的保护作用可能是通过增加 SOD 等过氧化物酶、减少 MDA 等过氧化物有关。研究结果显示，赤芍萜苷和代表性成分 a+b+c 两组之间无统计学差异。由此可见，芍药苷+芍药内酯苷+苯甲酰芍药苷可作为赤芍萜苷组分抗缺血缺氧损伤的代表性成分，用于后续的中药组分整体生物药剂学性质表征。

References

[1] Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Health. Chinese Pharmacopoeia [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.

[2] Zou ZM, Xu LZ, Yang SL. HPLC fingerprinting of total glucosides of paeony [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 46−49.

[3] Xu XY, Wang W, Wang L, et al. Intervention of paeoniflorin on isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2017, 31: 485.

[4] Tumer TB, Onder FC, Ipek H, et al. Biological evaluation and molecular docking studies of nitro benzamide derivatives with respect to *in vitro* anti-inflammatory activity [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 129−139.

[5] Du YF, Zhang XH, Ye XY, et al. Screening and mechanism analysis of anti-aging active ingredients based on molecular docking [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 2522−2526.

[6] Lian HY, Xu WYJ, Liang GD, et al. Comparison of chemical constituents between Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba by UPLC-QTOF MS method [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2014, 35: 269−278.

[7] Cui XB, Shan CX, Wen HM, et al. Analysis of the material basis of bran-whitening based on UFLC/Q-TOF-MS [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1929−1933.

[8] Du YF, Zhang XH, Ye XY, et al. Screening and mechanism of anti-aging active ingredients based on molecular docking [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 2522−2526.

[9] Yan YW, Xu PP, Huang XA, et al. Basic research on anti-influenza substances of Radix Paeoniae Alba based on computer virtual screening [J]. Chin Med Mat (中药材), 2017, 40: 430−435.

[10] Jhong CH, Riyaphan J, Lin SH, et al. Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico [J]. Biofactors, 2015, 41: 242−251.

[11] Song XG, Zhou W, Chen C, et al. The material basis and molecular mechanism of Chuanxiong for cerebral ischemia based on molecular docking method [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 2195−2198.

[12] Dash R, Uddin M, Hosen S, et al. Molecular docking analysis of known flavonoids as duel COX-2 inhibitors in the context of cancer [J]. Bioinformation, 2015, 11: 543−549.

[13] Sun N, Xu G, Zhang F, et al. Protective effects of Sijunzi Decoction (Shengshen Shen/Red Ginseng) on H2c2 induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 1989−1993.

[14] Liu CX, Chen SL, Xiao XH, et al. Q-Marker: a new concept of quality control of traditional Chinese medicine products [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1443−1457.