

山银花提取物抗动脉粥样硬化成分研究

李荣, 周玉生, 匡双玉, 王超, 王娟(南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 对山银花中所含的四类化学成分进行提取, 通过细胞和动物实验找出抗动脉粥样硬化作用相对较强的化学成分。方法 对不同提取物, 采用油红 O 染色观察对荷脂细胞中脂滴形成的影响, 用高效液相色谱法检测荷脂细胞内胆固醇的含量; 对 apoE 敲除小鼠主动脉标本作形态学检查, 观察用药后血管内膜及斑块的变化。结果 山银花提取物中四类化学成分均能不同程度地降低荷脂细胞内胆固醇含量。结论 山银花中黄酮类成分具有较强抗动脉粥样硬化作用。

关键词: 山银花; 提取物; 动脉粥样硬化; 胆固醇; 黄酮类

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)02-0092-04

Study on the Anti-atherosclerosis Effect of *Lonicera Macranthoides* Hand Mazz. Extract

LI Rong, ZHOU Yusheng, KUANG Shuangyu, WANG Chao, WANG Juan(Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To extract four ingredients for medicine in *Lonicera macranthoides* Hand Mazz. and find an ingredient that has strong anti-atherosclerosis effect by cell and animal experiments. **METHODS** Rathanum red stain and high performance liquid phase analytic process were used to assess and detect the level of cholesterol. The shapes of aorta in apoE-deficient mice were examined and the changes of intimal and plaque were observed. **RESULTS** All of the four ingredients in *Lonicera macranthoides* Hand Mazz. can reduce cholesterol of dutch fat cells. **CONCLUSION** Flavonoids in *Lonicera macranthoides* Hand Mazz. have strong anti-atherosclerosis effect.

KEY WORDS: *Lonicera macranthoides* Hand Mazz.; extract; atherosclerosis; cholesterol; flavonoids

山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand-Mazz., 红腺忍冬 *Lonicera hypolauca* Miq. 或华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 的干燥花蕾或带初开的花^[1], 具有清热解毒、疏散风热的功效, 为常用的大宗药材。山银花在我国资源丰富, 分布区域广, 一直以来是多种中成药的主要原料。黄喜茹等^[2]报道山银花的同科植物金银花能显著降低多种模型小鼠血清总胆固醇及动脉粥样硬化指数, 提高高密度脂蛋白含量。本试验研究了山银花提取物的抗动脉粥样硬化作用, 期待找出山银花中抗动脉粥样硬化的有效成分。

1 仪器和材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(日本三洋公司); x-4 型显微熔点测定仪(天津市分析仪器厂); UV-2500 型紫外分光光度计(日本岛津); GSY-8 型电热恒温水浴锅(北京医疗设备厂); AY220 型电子分析天平(日本岛津)。

1.2 材料

山银花(购于湖南隆回县), 经周玉生主任中药

师鉴定为灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand Mazz. 干燥花蕾; 阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司, 批号: 95837014, 规格: 20 mg); 薄层用硅胶 G(青岛海洋化工厂); 人单核巨噬细胞(THP-1 细胞)(中科院上海细胞生物所细胞中心); 小牛血清(杭州四季青公司); RPMI1640 培养基(Gibco 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠, ♂, 体重 18~22 g, 南华大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(湘)2004-0009; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(品系 C57BL/6J), 购于中山大学实验动物研究所, 许可证号: SCXK(粤)2004-0011。

2 实验方法

2.1 提取与分离

取晒干的山银花药材适量, 粉碎, 打磨成粉。称取约 2 000 g, 加入 4 000 mL 60% 乙醇冷浸 30 min, 70 °C 水浴回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液, 乙醇减压浓缩, 得总浸膏(约 850 g)。

浸膏加水分散后, 依次用石油醚(30~60 °C)、

基金项目: 湖南省衡阳市科技局课题(2007KJ019)

作者简介: 李荣, 女, 副主任药师 Tel: (0734)8899735 E-mail: www.L7979R@163.com

乙酸乙酯、正丁醇萃取。石油醚部分减压浓缩后加入 80~90 °C 乙醇溶解, 放置冷却, 滤除杂质, 回收乙醇后得 1 号药^[3]。

将乙酸乙酯部分分成二等份, 一份按文献[4]方法, 加入盐酸, 65 °C 水浴回流浸取 3 h, 重复提取两次, 趁热过滤, 合并滤液分离出乙酸乙酯, 用水洗涤, 减压回收溶剂浓缩得膏状物, 蒸馏水溶解后, 用醋酸铅溶液沉淀, 再用稀硫酸酸化(调 pH 至 3), 减压蒸发至干, 得到 2 号药。另一份按文献[5]方法, 碱水解, 丙酮沉淀, 离心, 大孔树脂柱层析, 活性炭脱色, 蒸发至干得到 3 号药。

正丁醇部分用不高于 70 °C 的微波加热辅助提取, 微波间隙处理 3 次, 每次 15 min, 减压回收溶剂, 蒸发至干得到 4 号药。

2.2 油红 O 染色观察不同提取物对 THP-1 荷脂细胞中脂滴的影响

2.2.1 THP-1 细胞的培养及分化 用含 10% 胎牛血清且已加入 2.5 g 碳酸氢钠的 RPMI 1640 培养基调细胞密度至 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 3~4 d 后换入含 0.1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 2~8 °C 冷冻后以 $160 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的佛波酯诱导 24 h 后分化成为巨噬细胞。

2.2.2 荷脂细胞、药物处理组细胞的形成及分组 正常人血浆低密度脂蛋白(密度 $1.040 \sim 1.063 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$)采用序列超速离心法制备^[6]。实验分为 3 组: 正常对照组(巨噬细胞组); 荷脂细胞组(以 $160 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的佛波酯诱导 THP-1 细胞 24 h 后分化成为巨噬细胞, 继与 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h); 药物处理组(1~4 号药分别用乙醇溶解成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 药物预处理 THP-1 细胞 4 h 后, 再用 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h)。

2.2.3 油红 O 染色 将细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 处理结束后, 用 PBS 冲洗盖玻片 3 次, 每次 5 min, 50% 异丙醇固定 15 min, 油红 O 染色液染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 1 min, 苏木素染色 5 min, 分色和返蓝后, HPIAS-1000 型图像分析系统收集图像。

2.3 细胞内胆固醇的检测

将经“2.2.2”处理后的 3 组细胞参照文献[6]方法制备样品, 采用 C_{18} 柱, 柱温 4 °C, 乙腈-异丙醇(4:1)为流动相, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 细胞蛋白为单位。细胞内胆固醇酯含量为

总胆固醇与游离胆固醇的差值。

2.4 4 号药物的化学成分鉴定及含量测定

2.4.1 化学成分鉴定 外观为黄色粉末, mp 247~280 °C, 盐酸-镁粉反应阳性。TLC 检验: 药物适量, 用甲醇溶解成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, 取 20 μL 点样于硅胶 G 薄层板上, 用正丁醇-冰乙酸-水(4:1:2)为展开剂, 晾干, 置紫外灯下观察, 显出一个黄色斑点^[7]。提示 4 号药为黄酮类化合物。

2.4.2 总黄酮含量测定 按照文献[8]方法, 精密称取 4 号药粉末 0.01 g(120 °C 干燥至恒重)置 50 mL 量瓶中, 加 65% 甲醇适量, 水浴加热溶解, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL 加甲醇定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 于 200~600 nm 处扫描, 以甲醇为空白对照, 结果在 510 nm 处有最大吸收。

精密量取供试品溶液 1 mL 于 10 mL 比色管中, 并另取一支 10 mL 比色管作为参比, 分别加 0.5 mL 亚硝酸钠(1:20)溶液, 摇匀放置 6 min, 加入 0.5 mL 硝酸铝(1:10)溶液 6 min 后, 再加 4 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 用 70% 乙醇定容, 照分光光度法在 510 nm 波长处测定吸光度, 求得总黄酮含量为 1.37%。

2.5 4 号药物对 apoE 敲除小鼠动脉粥样硬化形成的影响

实验动物分为 4 组, 每组各 4 只: ①正常对照组: SPF 级小鼠采用标准饲料喂养; ②模型组(apoE 敲除小鼠组): apoE 敲除小鼠(26 周龄)采用标准饲料喂养; ③药物处理组: 在②组基础上加用 4 号药(浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)喂养; ④阳性对照组(阿托伐他汀钙组): 在②组基础上加用阿托伐他汀钙片(浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)喂养。灌胃给药, 每天 1 次, 每次 2 mL。正常对照组和 apoE 敲除小鼠组分别给予相同体积的生理盐水。各组小鼠分笼喂养, 自由饮水, 连续给药 4 周。处死各组动物, 取主动脉标本作形态学观察并计算主动脉横断面积、斑块病变面积及斑块面积与血管面积的比值。

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 软件作统计分析, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 实验结果

3.1 山银花不同提取物对 THP-1 荷脂细胞中脂滴的影响

10 mg·mL⁻¹的1~4号药作用于THP-1 荷脂细胞4 h后,油红O染色观察细胞内脂滴的蓄积依次减少,见图1。

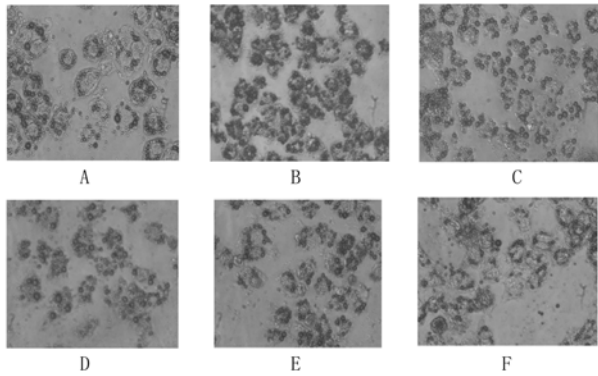


图1 细胞油红O染色结果图
A-正常对照组; B-荷脂细胞组; C-1号药物组; D-2号药物组; E-3号药物组; F-4号药物组
Fig 1 Rathonum red stain of cells map
A-normal group; B-dutch fat cell group; C-No.1 drug group; D-No.2 drug group; E-No.3 drug group; F-No.4 drug group

3.2 山银花不同提取物处理后细胞内胆固醇水平的变化

10 mg·mL⁻¹的1~4号药作用THP-1 荷脂细胞4 h后,高效液相色谱分析法检测细胞内总胆固醇(TC),游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量均有不同程度的下降,见表1。

表1 不同药物对荷脂细胞胆固醇水平的影响
Tab 1 The effect of different drugs on tumor cells in cholesterol levels of lipid

组别	TC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	FC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	CE/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
正常对照组	157 $\pm$ 10	147 $\pm$ 11	10 $\pm$ 2
荷脂细胞组	821 $\pm$ 13 ¹⁾	469 $\pm$ 24 ¹⁾	352 $\pm$ 21 ¹⁾
1号药物组	776 $\pm$ 50	552 $\pm$ 34 ²⁾	224 $\pm$ 28 ²⁾
2号药物组	568 $\pm$ 32 ²⁾	422 $\pm$ 15 ²⁾	146 $\pm$ 20 ²⁾
3号药物组	414 $\pm$ 22 ²⁾	296 $\pm$ 23 ²⁾	118 $\pm$ 19 ²⁾
4号药物组	280 $\pm$ 13 ²⁾	216 $\pm$ 27 ²⁾	64 $\pm$ 18 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾P<0.05;与荷脂细胞组比较,²⁾P<0.05
Note: Compared with nomal group, ¹⁾P<0.05; Compared with dutch fat cell group, ²⁾P<0.05

3.3 主动脉病变的形态学观察

对4组动物行2%戊巴比妥钠45 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉,打开胸腔,分离主动脉,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,HE染色,电镜观察斑块面积,见图2。正常对照组小鼠主动脉未见明显动脉粥样硬化(AS)病变。模型组AS病变明显加重,病变血管内膜增厚明显,增厚内膜存在大量泡沫细胞,病变中膜也明显增厚,平滑肌细胞数

目增多,甚至还有胆固醇结晶和钙化斑的出现。药物处理组小鼠AS病变有所减轻,斑块面积明显缩小,病变血管仅内膜增厚。阳性对照组小鼠主动脉未见明显AS病变,血管内膜仅有轻微增厚。

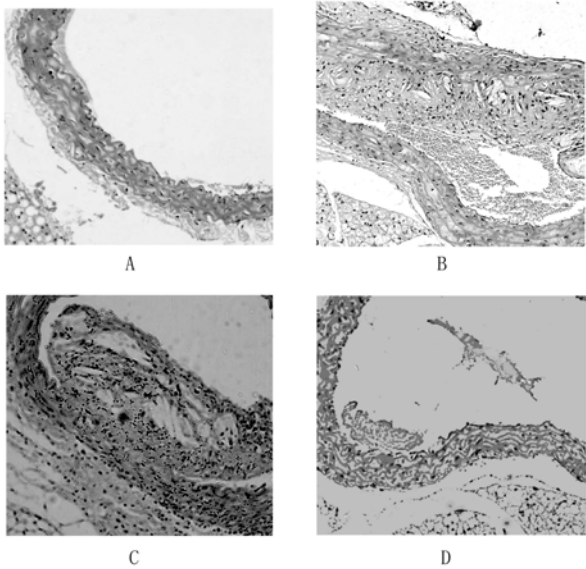


图2 各组小鼠主动脉HE染色(×100)
A-正常对照组; B-模型组; C-药物处理组; D-阳性对照组

Fig 2 The HE dyeing results of aorta in different mice group (×100)

A-normal group; B-model group; C-drug treatment group; D-positive control group

3.4 主动脉横断面积、斑块病变面积及斑块面积与血管面积的比值

图2中不同处理方法的apoE基因敲除小鼠主动脉面积与斑块面积的比值见表2。正常对照组由于未出现动脉粥样斑块,故而斑块面积为零。模型组由于血管内膜及中膜均明显增厚,因此动脉横断面积最大且斑块面积也是最大的。药物处理组及阳性对照组斑块面积与血管面积的比值与模型组比较有显著差异,说明4号药可有效控制斑块总面积。由于4号药仅是粗提物,且含量较低,因此作用比阿托伐他汀钙稍弱。

表2 主动脉面积与斑块面积

分组	动脉总面积/ mm ²	斑块总面积/ mm ²	斑块总面积/ 动脉总面积
正常对照组	14.6 $\pm$ 1.5	0	0
模型组	56.8 $\pm$ 7.3	35.2 $\pm$ 3.1	0.62 $\pm$ 0.028
药物处理组	22.5 $\pm$ 1.9	7.7 $\pm$ 0.6	0.34 $\pm$ 0.017 ¹⁾
阳性对照组	14.4 $\pm$ 1.5	0.58 $\pm$ 0.031	0.04 $\pm$ 0.003 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾P<0.05
Note: Compared with model group, ¹⁾P<0.05

4 讨论

AS 是一个非常复杂的过程,主要以脂质沉积、伴有平滑肌细胞的移行增殖为特征,包括一系列的病理过程:内皮损伤及功能不良,黏附分子表达,单核细胞聚集、白细胞黏附及迁移、氧化低密度脂蛋白被巨噬细胞摄取、泡沫细胞形成,平滑肌细胞迁移和增殖等,最终形成粥样斑块。

近年来研究表明 apoE 具有抗 AS 的作用。文献指出该作用可能与 apoE 增加外周细胞胆固醇的流出及血浆中含胆固醇脂蛋白的清除有关^[9]。1992 年培育成功的 apoE 敲除小鼠^[10],能自发形成动脉粥样硬化。实验用 apoE 敲除小鼠代替喂饲高胆固醇饮食而形成 AS 动物模型。

黄酮类化合物在中草药中分布很广。文献[11]报道,忍冬科植物的化学成分主要有 4 类:绿原酸、苷类、黄酮类及挥发油类,本试验从灰毡毛忍冬中提取分离出了上述成分。现代药理学研究表明,山银花具有抗菌、解热、抗氧化及保护肝、血管的作用,而且毒性小^[12]。

本试验仅对山银花的化学成分做了类别鉴定,已经有研究报道,继续分离纯化可得到 8 个独立结构的黄酮类化合物,其中包括芦丁^[13]。这些都为开发中草药抗动脉粥样硬化提供了进一步研究的可能。

致谢:

感谢已故的本课题项目负责人阳育聪女士!

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [M]. 2005: 21-22.

- [2] WANG X R, LIU W N, CAO D. Study on chemical composition and pharmacological of Honeysuckle [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊), 2005, 23(3): 418-419.
- [3] WU L J. Phytochemistry(天然药物化学) [M]. Vol 4. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 261-262.
- [4] LUO J, LI Y F, HU X L, et al. Study on extraction of chlorogenic acid and determination of antibacterial activity of its rare earth complexes [J]. Chem Ind Forest Prod(林产化学与工业), 2007, 27(2): 85-88.
- [5] Jiangsu Institute of Botany, Chinese academy of Sciences. *Lonicera macranthoides* activity of saponin extract preparation and use. China, 200610039294 [P]. 2008-08-06.
- [6] LI Y, KUANG S Y, WANG B B, et al. The effect of curcumin on the cholesterol metabolism and the expression of Cavelin-1 in macrophage-derived cholesterol-load cell [J]. J Univ South China(南华大学学报), 2009, 37(1): 18-20.
- [7] WU X F, BAI Y. Extraction of leaves and antibacterial medicinal study of Honeysuckle [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2001, 23(6): 448-449.
- [8] LI C H, TIAN J, HE B. Determination of flavonoides and chlorogenic acid in *Lonicera confuse* of Sichuan and Chongqing production [J]. Chin J Clin Rational Drug Use(临床合理用药), 2009, 2(5): 39-40.
- [9] PIEDRAHITA J A, ZHANG S H, HAGAMAN J R, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(10): 4471-4475.
- [10] NAKASHIMA Y, PLUMP A S, RAINES E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(1): 133-140.
- [11] YIN S G, XIN N. Research survey of *Lonicera confuse* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(12): 2920-2921.
- [12] LEI Z J, ZHOU R B, TONG Q Z, et al. Comparison of safety between *Lonicera macranthoides* and Honeysuckle [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(5): 759-760.
- [13] CHAI X Y, WANG L, SONG Y, et al. Flavonoids in *Lonicera confuse* research [J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2004, 35(4): 299-302.

收稿日期: 2010-06-07