

沙棘籽粕生物碱的提取分离及对乳鼠心肌细胞损伤的保护作用

胡长鹰¹, 徐德平²

(1.暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 2.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 目的: 研究沙棘籽粕中生物碱的提取分离及其对乳鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤的保护作用。方法: 用乙醇提取、利用多种柱层析分离手段从沙棘籽粕中分离单体化合物, 采用质谱、核磁共振法鉴定其结构; 采用乳鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤模型, 利用MTT法测定心肌细胞存活率, 检测乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)含量以反映心肌细胞受损的程度。**结果:** 从沙棘籽粕分离得到SJ-A-I组分, 经鉴定为生物碱5,11-二羟基色胺; 该物质能有效维持心肌细胞活力, 减少培养心肌细胞缺血/再灌注损伤所致心肌酶(LDH、CK)的释放。**结论:** 沙棘籽粕中的生物碱5,11-二羟基色胺对乳鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤具有明显的保护作用, 其最佳质量浓度为150mg/L。

关键词: 沙棘籽粕; 生物碱; 5,11-二羟基色胺; 心肌细胞; 缺血/再灌注

Extraction, Isolation and Protective Effect of Alkaloid from Seabuckthorn Seeds on Injured Cardiomyocytes in Rats

HU Chang-ying¹, XU De-ping²

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Objective: To investigate the protective effect of alkaloid from seabuckthorn seeds on injured cardiomyocytes in rats. Methods: EtOH extract from seabuckthorn seeds was purified by column chromatography and its structure was elucidated by MS and NMR spectroscopic analyses. A model of cardiac ischemic/reperfusion (I/R) *in vitro* was established using the primary cultured rat cardiomyocytes. The viability of cardiomyocytes was evaluated by MTT assay and the contents of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) were measured to verify the protective effect on injured rat cardiomyocytes by I/R. Results: The structure of water-soluble alkaloid was identified as 5,11-dihydroxytryptamine, which could promote the survival rate of cardiomyocytes subjected to I/R injury and reduced the release of myocardial enzymes induced by I/R injury. Conclusion: The identified 5,11-dihydroxytryptamine from seabuckthorn seeds exhibited an excellent protective effect on cultured neonatal rat cardiomyocytes injured by ischemia/reperfusion at the optimal concentration of 150 mg/L.

Key words: seabuckthorn seed; alkaloid; 5,11-dihydroxytryptamine; cardiomyocyte; ischemia/reperfusion

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)09-0234-04

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是胡颓子科沙棘属植物,我国沙棘资源蕴藏量丰富,主要分布在西北、西南、华北和东北等地^[1]。沙棘籽含有丰富的脂肪酸、蛋白质和生物活性物质,具有极高的营养价值。目前沙棘籽主要用来提取沙棘油,脱油后的籽粕大多作为饲料^[2-3]。据报道沙棘籽粕中含有大量的具有多种生理活性的原花青素,因此对沙棘籽粕中原花青素的

研究已成热点^[4-7]。

本课题组在对沙棘籽粕中原花青素组成的研究时发现,沙棘籽粕中除原花青素外还含有大量的生物碱。对生物碱的主要组分进一步分离,得到一个生物碱单体并确定该生物碱的结构。以体外培养乳鼠心肌细胞为基础,通过缺氧/复氧复制心肌缺血/再灌注模型,探讨沙棘籽粕中生物碱对心肌细胞的保护作用。

收稿日期: 2009-09-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD83B02)

作者简介: 胡长鹰(1968—),女,副教授,博士,主要从事食品功能因子和农副产品深加工研究。E-mail: hucy0000@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L. subsp. *Sinensis* Rousi)籽粕为沙棘籽经超临界 CO₂ 萃取后的籽粕, 购自青海省康普生物公司。

无水乙醇、丙酮、硫酸、茴香醛、冰醋酸、甲醇、石油醚(沸程 30~60℃)、正丁醇(均为 AR 级) 上海化学试剂采购供应站; GF254 硅胶板 山东烟台芝罘化工厂; 大孔吸附树脂 AB-8 南开大学化工厂; MCI gelCHP20 柱填料 日本三菱化学公司; HW-40 柱填料日本 Tosoh 公司; 95% 工业乙醇 市购。

SD 乳鼠: 1~3d, 南方医科大学实验动物中心提供(许可证号: SCXK 粤 2006-0015); DMEM 培养基、胎牛血清(FBS) 美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶 美国 Hyclone 公司; 噻唑兰(MTT) 美国 Amresco 公司; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒 东瓯津玛生物科技有限公司; 肌酸激酶(CK)试剂盒 奥斯邦生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

WFJ8-20 中药粉碎机 江阴市灵杏药化设备有限公司; SS800 离心机 江苏华大离心机制造有限公司; 旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; 循环水真空泵、低温冷却液循环泵 巩义市英峪予华仪器厂; 质谱仪 ESI/MS 英国 Micromass 公司; 500MHz 核磁共振仪 Buker Avance 公司; CO₂ 培养箱 Thermo Forma 公司; CKX41 倒置显微镜 Olympus 公司; 96 孔板 广东光华化学厂; 低温恒温离心机 Eppendorf 公司; 酶标仪 Tecan 公司; 7600 全自动生化分析仪 Hitachi 公司。

1.3 方法

1.3.1 沙棘籽生物碱的提取与分离

将 50kg 沙棘籽粕置于 500L 提取罐中, 以体积分数为 60% 的乙醇为溶剂, 料液比 1:5(m/V), 50℃ 搅拌提取 2h, 1200r/min 离心 15min 分离出乙醇液, 渣再重复提取 2 次。合并清液, 浓缩到约 1/10 体积。浓缩液边搅拌边加入 2~3 倍体积乙酸乙酯进行萃取, 反复多次萃取, 直至乙酸乙酯相无色时止。合并乙酸乙酯相, 在低于 55℃ 条件下减压浓缩至无乙酸乙酯味, 得沙棘籽乙酸乙酯萃取物。

将乙酸乙酯萃取物上大孔吸附树脂(型号 AB-8)层析柱(20cm × 130cm), 先用 1 倍柱体积去离子水洗脱, 再用 20% 乙醇洗脱, 收集 20% 乙醇洗脱液, 浓缩到无乙醇止。置于真空干燥箱内, 控制温度 50~60℃, 干燥 3h, 得沙棘籽总生物碱。

将总生物碱溶解, 上 HW-40 柱(50mm × 1500mm), 先用 2000mL 去离子水洗脱, 再用 5%、10%、15%、20% 不同体积分数的乙醇梯度洗脱, 每梯度洗脱

1000mL, 20mL 收集一试管, 经 TLC 鉴定和硫酸茴香醛显色, 将 R_f 值和显色情况相同的洗脱液合并, 选择其中包含含量最高成分的洗脱部分合并浓缩。将该部分浓缩液反复上 MCI 柱(35mm × 1000mm), 分别用去离子水、5%、10% 乙醇洗脱, 每梯度洗脱 500mL, 洗脱流速 5.0mL/min, 20mL 收集 1 管, 经 TLC 鉴定纯度, 得到单体化合物 SJ-A-I。

1.3.2 结构鉴定

将 SJ-A-I 用重水(D₂O)溶解后进行 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹³⁵DEPT 测定。

1.3.3 SJ-A-I 对大鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤的影响

1.3.3.1 心肌细胞原代培养

参照文献[8-10]的方法: 将出生 1~3d 的 SD 乳鼠 20 只于 75% 酒精中浸泡 10s 后取出心脏, 用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗去血液, 取出心尖 1/3 左右, 反复洗 3 次, 剪碎, 加入 0.125% 胰蛋白酶 8mL 消化, 于 37℃ 水浴中磁力搅拌 5min, 自然沉淀后去除上清液, 再加入 8mL 胰蛋白酶反复消化, 取上清液移入 10mL 离心管中, 加等量含血清培养基(DMEM+10% FBS), 800r/min 离心 7min。将离心所得的沉淀用含血清培养基制成细胞悬液, 200 目过滤, 移入细胞培养瓶中, 置二氧化碳培养箱(体积分数为 95% O₂, 5% CO₂)中差速贴壁 2.5h, 纯化心肌细胞。当台盼蓝染色计活细胞数达 95% 以上时, 调整细胞密度 4 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板。置于二氧化碳培养箱中培养。24h 后换 1 次液, 48h 后再换液。待细胞融合, 状态良好, 出现同簇细胞同步搏动时开始实验。

1.3.3.2 实验分组

取培养 3~4d 的心肌细胞, 分 5 组: 正常对照组; 缺血/再灌注模型组; SJ-A-I 50、100、150、200mg/L 剂量给药组。

1.3.3.3 心肌缺血/再灌注损伤模型建立

按文献[11]配制模拟缺血液, 缺血液充入氮气(纯度 99%)饱和 15min, 置换正常培养基后, 放入自制密封盒内, 充氮 10min 后密封, 于培养箱中培养 4h, 造成心肌细胞缺血缺氧。再灌注时以复氧液置换缺血液, 培养箱中培养 2h。

1.3.3.4 检测指标

采用 MTT 法检测心肌细胞存活率^[8]; 采用 LDH(乳酸脱氢酶)、CK(肌酸激酶)含量的高低反映心肌细胞受损的程度(采用试剂盒进行检测)。

1.3.3.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计分析软件进行统计处理, 实验重复 6 次, 所有数据均用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

用单因素方差分析比较各组均数之间的差异。

2 结果与分析

2.1 SJ-A-I 结构的鉴定

SJ-A-I 为白色无定形粉末, 溶于甲醇、乙醇, 易溶于水。ESI-MS 给出 m/z : 178.3[M+H]⁺, SJ-A-I 相对分子质量应为 177.3, 从相对分子质量为奇数来看, SJ-A-I 应含奇数个氮原子。

¹H-NMR 谱: 芳香区有 4 个氢, 其中 δ 7.23(1H, d, $J=8.7$), 6.99(1H, d, $J=2.3$), 6.76(1H, dd, $J=2.3, 8.7$), 这 3 个氢形成一个 AMX 系统, 表明存在苯环邻间位三取代; δ 7.05 为单峰氢。 δ 3.72(2H, d, $J=6.9$), 2.80(2H, d, $J=6.9$), 从偶合常数来看应为相连的两个 CH₂。

¹³C-NMR 谱和 ¹³⁵DEPT 谱: 共有 10 个 C, 其中 δ 134.5、130.7、113.9 为 3 个季碳, δ 127.4、115.4、114.4、105.8 为 4 个 -CH 上的碳, δ 64.8、30.4 为 2 个 -CH₂ 上的碳。从化学位移看 δ 64.8 为一个连氧的 -CH₂, 推断有 -CH₂CH₂OH 结构片断。综合分析并参照文献[12-13]得 SJ-A-I 为 5,11-二羟基色胺, 化学结构见图 1。

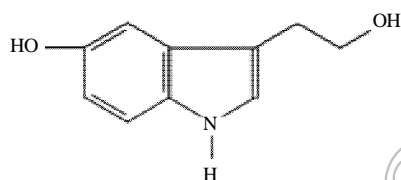


图 1 5,11-二羟基色胺结构

Fig.1 Structure of 5,11-dihydroxytryptamine

2.2 SJ-A-I 对乳鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤的影响

2.2.1 SJ-A-I 对缺血/再灌注损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响

表 1 SJ-A-I 对缺血/再灌注损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of SJ-A-I on viability of neonatal rat cardiomyocytes injured by I/R ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/L)	细胞存活率/%
对照组		98.33 \pm 2.53
缺血/再灌注模型组		27.55 \pm 3.11*
SJ-A-I 组	50	58.26 \pm 3.29#
	100	73.24 \pm 4.06#
	150	85.67 \pm 4.15##
	200	77.87 \pm 4.42##

注: *与对照组比较, $P < 0.05$; #与缺血/再灌注模型组比较, $P < 0.05$; ##与缺血/再灌注模型组比较, $P < 0.01$ 。

由表 1 可见, 在模型组中其细胞存活率仅为 27.55%, 可见缺血/再灌注明显损伤心肌细胞活力, SJ-A-I 能有效提高细胞存活率, 并呈明显的量效关系。SJ-A-I 剂量为 50mg/L 时, 细胞存活率为 58.26% ($P < 0.05$), SJ-A-I 剂量为 150mg/L 时, 心肌细胞存活率高达 85.67% ($P < 0.01$), 但在 200mg/L 时心肌细胞存活率反而有所下降。实验表明 SJ-A-I 具有很强的保护心肌细胞作用, 最佳质量浓度在 150mg/L。这一实验结果提示高质量浓度生物碱 SJ-A-I 对心肌细胞是否有一定负面作用, 课题组正在进一步研究中。

2.2.2 SJ-A-I 对缺血/再灌注损伤心肌细胞液中 LDH、CK 含量的影响

LDH、CK 是细胞能量代谢过程中重要的催化酶, 当心肌细胞受到损伤, 细胞膜破裂后可从细胞内释放。培养液中 LDH、CK 的含量越高反映心肌细胞受损的程度越重。SJ-A-I 对缺血/再灌注损伤心肌细胞液中 LDH、CK 含量的影响如表 2 所示。

表 2 SJ-A-I 对缺血/再灌注损伤心肌细胞中 LDH 和 CK 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SJ-A-I on LDH and CK activities of neonatal rat cardiomyocytes injured by I/R ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/L)	LDH(U/L)	CK(U/L)
对照组		2.56 \pm 0.35	2.04 \pm 0.51
缺血/再灌注模型组		46.22 \pm 2.48**	23.71 \pm 0.53**
SJ-A-I 组	50	19.16 \pm 2.02#	4.82 \pm 0.46#
	100	5.27 \pm 1.13##	3.32 \pm 0.38##
	150	4.43 \pm 0.88##	1.95 \pm 0.50##
	200	4.86 \pm 1.04##	2.41 \pm 0.48##

注: **与对照组比较, $P < 0.01$; #与缺血/再灌注模型组比较, $P < 0.05$; ##与缺血/再灌注模型组比较, $P < 0.01$ 。

由表 2 可见, 在模型组中可见缺血/再灌注损伤导致心肌细胞液中 LDH、CK 含量显著升高, 达到 23.71%, 表明心肌细胞受损严重。沙棘籽粕提取物 SJ-A-I 能有效降低细胞液中 LDH 和 CK 含量, 剂量为 50mg/L 时就能显著降低 LDH 和 CK 含量 ($P < 0.05$), 在 150mg/L 时 LDH、CK 含量最低 ($P < 0.01$), 并且呈剂量依赖关系。表明 SJ-A-I 对缺血/再灌注造成的心肌细胞损伤具有有效保护作用, 150mg/L 效果最好。

3 结论

沙棘是我国古代藏医、蒙医的常用药物。1977 年, 沙棘作为中药被列入《中华人民共和国药典》。目前沙棘活性成分研究多集中在沙棘油、黄酮、原花青素等, 有关沙棘籽粕中生物碱的成分和活性的研究, 国内外少见报道。本实验从沙棘籽粕中分离得到生物碱类物质 5,11-二羟基色胺, 具有类似血清素(5-羟基色胺)的

结构, 而这类化学物质具有很好的保护心血管疾病作用^[14], 乳鼠心肌细胞缺血 / 再灌注损伤的保护研究表明, 沙棘抗心肌缺血活性除黄酮、原花青素外生物碱也起着重要作用。同时, 高质量浓度生物碱 5,11- 二羟基色胺对心肌细胞是否有一定负面作用, 课题组正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 顾关云. 沙棘的化学成分、生物活性与临床研究[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(4): 139-149.
- [2] 李永海, 忻耀年. 沙棘产品的研究与开发[J]. 国际沙棘研究与开发, 2008, 6(3): 4-9.
- [3] 黄铨, 史玲芳, 王士坤. 沙棘种植技术与开发利用[M]. 北京: 金盾出版社, 1998: 113-123.
- [4] 徐晓云, 潘思轶, 谢笔钧, 等. 沙棘籽原花青素体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 216-218.
- [5] 樊金玲, 丁霄霖, 徐德平. 沙棘籽中的原花色苷化合物[J]. 中草药, 2006, 37(4): 514-517.
- [6] VICTOR A P. Characterization of oligomer and polymeric procyanidins from grape seed by liquid secondary ion mass spectrometry[J]. Phytochemistry, 1998, 49(5): 1435-1441.
- [7] AMITABYE L, THEESHAN B, ALAN C, et al. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas[J]. Food Research International, 2005, 38(3): 357-367.
- [8] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2006: 250-252.
- [9] 斯佩克特, 戈德曼, 莱因万. 细胞实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 79-89.
- [10] HARARY L, FARIEY B. *In vitro* studies of single isolated beating heart cells[J]. Science, 1960, 131: 1674-1675.
- [11] BRAR B K, STEPHANOU A, LIAO Z, et al. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischemia and reoxygenation[J]. Cardiovascular Research, 2005, 51: 265-274.
- [12] HUILI Z, NAGATSU A, WATANABE T, et al. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45: 874-876.
- [13] KUMARASAMY Y, MIDDLETON M, REID R G, et al. Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra*[J]. Fitoterapia, 2003, 74: 609-612.
- [14] 金青哲, 易晓霞, 单良, 等. 苯丙烯酰 5- 羟色胺衍生物的分布、提取及其生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 926-933.

WWW.SCIENCE-TRUTH.COM