

# 大海马不同萃取物的抗肿瘤和抗氧化活性研究

王沛政<sup>1</sup> 林雪珂<sup>2</sup> 方倩云<sup>2</sup> 徐云升<sup>1</sup> 李卫东<sup>1\*</sup> 冯丹青<sup>2</sup>

(1. 海南热带海洋学院 海南省海洋食品工程技术研究中心 海南 三亚 572022;

2. 厦门大学海洋与地球学院海洋生物制备技术国家地方联合工程实验室 福建 厦门 361005)

**摘要:**目的 检测新鲜大海马样品的抗肿瘤和抗氧化活性。方法 采用大海马新鲜样品进行冷冻干燥,以 75% 乙醇提取,并进一步以乙酸乙酯、正丁醇和水对提取物进行不同极性部位组分的萃取,对各萃取物分别开展抗肿瘤和抗氧化活性检测和比较,其中抗肿瘤活性检测采用人胶质瘤细胞 LN229,抗氧化活性检测采用 DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法。结果 大海马乙醇提取物的水相萃取物对人胶质瘤细胞 LN229 没有灭活作用,但正丁醇相和乙酸乙酯相萃取物均显示出显著的抗肿瘤活性,其中乙酸乙酯相萃取物的抗肿瘤活性较高;大海马的三种萃取物均具抗氧化活性,其中乙酸乙酯相萃取物在 DPPH 法和 FRAP 法所得结果中均表现出最高的抗氧化活性,水相萃取物在 ABTS 法中显示出最高的抗氧化活性。结论 研究结果为海马活性成分尤其是中低极性活性成分在海洋药物和保健品领域的开发提供重要参考。

**关键词:**大海马; 活性成分; 抗肿瘤; 抗氧化

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.06.018

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2019)06-1333-03

海马作为一种形态特殊的鱼类,也是传统的海洋中药材。中国历版药典记载的海马药材有线纹海马 *Hippocampus erectus*、刺海马 *Hippocampus histrix*、大海马 *Hippocampus ramulosus*、三斑海马 *Hippocampus trimaculatus* 和小海马 *Hippocampus zosterae* 等 5 个品种,为常用的名贵海洋药物,具调气治血、散结消肿的功效,可用于跌打损伤、疮肿、外出血等病症,有较好的医药应用前景。现代药理学研究证明海马具有多方面的药用价值和药理作用。其中报道较多的海马药理作用是性激素样作用,实验证明海马胶囊或提取物对鼠类有性激素样作用,如能明显提高雄性大鼠的交配能力<sup>[1-5]</sup>。另有报道海马提取物在调节机体免疫力、抗疲劳、治疗实验性前列腺增生、抗肿瘤、抗血栓、抗氧化等方面也有活性作用<sup>[6-18]</sup>。目前海马被认为在保健品开发方面也有一定的应用价值<sup>[19]</sup>。

以往研究多是直接利用市场上风干海马中药为实验材料进行海马活性成份研究,海马活体风干后其化学成分有可能发生降解等变化。另外,以往研究多以水、乙醇或甲醇提取海马进行活性研究,而对提取物罕见进一步的活性部位确定。本研究直接对大海马活体进行冷冻,在冻干粉粹后以 75% 乙醇提取,并进一步以乙酸乙酯、正丁醇和水对提取物进行不同极性部位组分的萃取,对各萃取物分别开展抗肿瘤和抗氧化活性检测和比较,以期开发海马相关药品和保健品提供科学参考。

## 1 材料与仪器

1.1 材料 大海马活体于 2016 年 9 月购自福建东山县前楼镇一水产养殖场,其单只的平均体重为  $13.12 \pm 2.56$  g (mean  $\pm$  SD),平均体长为  $14.43 \pm 0.84$  cm (mean  $\pm$  SD)。运回实验室后以淡水清洗除去体表盐分后,于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱进行冷冻,然后放置于冷冻

收稿日期: 2018-09-20; 修订日期: 2019-03-20

基金项目: 海南省重大科技计划(ZDKJ2016009-02);

海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2015006)

作者简介: 王沛政(1972-),男(汉族),陕西西安人,海南热带海洋学院,海南省海洋食品工程技术研究中心研究员,博士学位,主要从事海洋生物分子生物学研究工作。

\* 通讯作者简介: 李卫东(1978-),男(汉族),河南漯河人,海南热带海洋学院,海南省海洋食品工程技术研究中心研究员,博士学位,主要从事海洋生物分子生物学研究工作。

干燥机中冻干,冻干样品以粉碎机粉碎成粉,得大海马干粉。

1.2 主要仪器设备 FreeZone 4.5Plus 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); R-3 Rotavapor 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); HC-400Y 粉碎机(中国永康市天祺盛世工贸有限公司); Synergy2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)。

## 2 方法

2.1 大海马乙醇提取物中不同萃取组分的制备 将大海马粉末置于锥形瓶中,加入 75% 乙醇,用玻棒搅匀后置于摇床中(温度  $28^{\circ}\text{C}$  转速  $120\text{r}/\text{min}$ ) 放置 5h 后从摇床中取出锥形瓶,过滤,滤渣置于锥形瓶中,再加入 75% 乙醇浸泡,并重新放回摇床中,使其震荡 5h。再次重复上述步骤,并过滤,弃滤渣,合并 3 次提取液,将提取液用旋转蒸发仪减压浓缩,得橘黄色浸膏。将大海马乙醇提取物以双蒸水溶解混悬,先加入正己烷脱脂,余下溶液部分加入等体积的乙酸乙酯进行萃取,以分液漏斗分离,收集乙酸乙酯萃取液,重复萃取步骤 2 次,合并 3 次的乙酸乙酯萃取液进行旋转蒸发得到乙酸乙酯相部分(EA 相),余下溶液部分继续用水饱和正丁醇溶液进行萃取,操作方法同上,正丁醇萃取液旋转蒸发得到正丁醇相部分(BU 相),剩余溶液部分冷冻干燥后得到水相部分(AQ 相),称重计算各相萃取物的获得率(%)。

萃取物的获得率(%) = 萃取物重/大海马干粉重  $\times 100\%$

2.2 海马不同萃取物的抗肿瘤活性检测 将大海马 75% 乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物分别进行抗肿瘤活性检测,检测对象为人胶质瘤细胞 LN229(GBM 细胞系),检测方法为 MTS 实验法,具体如下。将 LN229 细胞培养于培养基(DMEM + 10% FBS)按 1000 个/每孔铺在 96 孔板中,24 h 后将各萃取物以二甲基亚砜(DMSO)溶解,以 0.5% 比例加入到每孔中,萃取物检测浓度为  $10\text{mg}/\text{ml}$ ,设三个平行组,同时设立 0.5% DMSO 对照组和空白组(仅含培养基)。48 h 后,将小孔内的溶液丢弃,并用 PBS 清洗三次。然后在每孔中加  $100\mu\text{l}$  培养基和  $10\mu\text{l}$  CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent,在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的环境下孵育 2.5 h,在  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  读取各孔的吸光度值(A),计算细胞存活分数。

细胞存活分数 = 实验组 A 值/DMSO 对照组 A 值

2.3 大海马不同萃取物的抗氧化活性检测 在目前检测物质抗氧化能力的方法中,总抗氧化能力(total antioxidant activity,

TAA) 的评估越来越得到人们的关注。本文将大海马 75% 乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物分别进行抗氧化活性检测。检测方法包括三种常见的测定物质总抗氧化能力的方法,即 DPPH 法<sup>[20]</sup>、ABTS 法<sup>[21]</sup>和 FRAP 法<sup>[22]</sup>。检测浓度均为 10 mg/ml,以维生素 C(VC)作为阳性对照,具体如下。

**DPPH 法:** DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)是一种人工合成的、结构中含有孤对电子的稳定自由基。当有自由基清除剂存在时,深紫色的 DPPH 溶液被还原,颜色逐渐变浅,颜色变化程度与抗自由基物质浓度成比例。本文称取 5.9 mg 的 DPPH 试剂溶解于 80% 的乙醇并稀释 100 倍得到 DPPH 醇溶液,将 50 μL 萃取物的 DMSO 溶液加入 50 μL DPPH 醇溶液(此组为待测样品组 As),同时设置阴性对照组 A<sub>0</sub>(50 μL DMSO + 50 μL DPPH 醇溶液),因海马萃取物溶液呈淡黄色,所以另设色素样品空白组 Ap(50 μL 海马萃取物 + 50 μL 80% 乙醇)。阳性对照 VC 的浓度设为 10 mg/ml。避光反应 30 min 后,检测 λ = 517 nm 处的吸光度值(A),以抑制率(%)表征总抗氧化能力。

$$\text{海马萃取物的抑制率}(\%) = [A_0 - (A_s - A_p)] / A_0 \times 100\%$$

$$\text{维生素 C 的抑制率}(\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

**ABTS 法:** 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)被氧化后,生成蓝绿色的 ABTS·<sup>+</sup>,ABTS·<sup>+</sup>在 734nm 有最大吸收值,利用这一特性,可通过判断抗氧化物质阻止 ABTS 生成自由基的速率来评估抗氧化物质的总氧化能力。ABTS 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。将 ABTS 母液用 80% 乙醇稀释 40 倍,另配制 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L 的抗氧化物 Trolox 溶液作为标曲样品,取各浓度的 Trolox 溶液 10 μL 与 200 μL ABTS 工作液轻轻混匀,室温孵育 3~5 min,检测 λ = 734 nm 处的吸光度值,制作标准曲线,得到线性回归方程为 Y = 0.2956X + 0.135 (R<sup>2</sup> = 0.990)。另将待测的大海马各萃取物的 DMSO 溶液取 10 μL 与 200 μL ABTS 工作液轻轻混匀,室温孵育 3~5 min,检测 λ = 734 nm 处的吸光度值(A<sub>s</sub>)。设 DMSO 阴性对照组(A<sub>0</sub>)、阳性对照 VC 的浓度根据标曲测定范围设为 0.1 mg/ml。根据标准曲线,将大海马萃取物的吸光度值(即 A<sub>0</sub> - A<sub>s</sub>)换算为 Trolox 的浓度值(mmol/L),以此评估大海马萃取物的总抗氧化能力。

**FRAP 法:** 抗氧化物质可将 Ferric-tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup> - TPTZ) 还原为蓝色的 Fe<sup>2+</sup> - TPTZ,在 593 nm 处有最大吸收值,利用这一特性,评估样品的总抗氧化能力。FRAP 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。按说明配置 FRAP 工作液,配制 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液作为标曲溶液,取各浓度的 FeSO<sub>4</sub> 溶液 5 μL 与 180 μL FRAP 工作液混合均匀,37℃ 孵育 5 min 后,测定 λ = 593 nm 处的吸光度值,制作标准曲线,得到线性回归方程 Y = 0.3131X - 0.01 (R<sup>2</sup> = 0.996)。另将待测的大海马各萃取物的 DMSO 溶液取 5 μL 与 180 μL FRAP 工作液混合均匀,37℃ 孵育 5 min 后,测定 λ = 593 nm 处的吸光度值(A<sub>s</sub>)。设 DMSO 阴性对照组(A<sub>0</sub>)、阳性对照 VC 的浓度根据标曲测定范围设为 0.1 mg/ml。根据标准曲线,将海马萃取物的吸光度值(即 A<sub>s</sub> - A<sub>0</sub>)换算为 FeSO<sub>4</sub> 的浓度值(mmol/L),以此评估海马萃取物的总抗氧化能力。

**2.4 实验数据的处理** 应用 GraphPad Prism 6 软件进行实验数据统计处理和作图,并采用 SPSS 22.0 统计软件中的单因素方差分析(one way ANOVA)比较实验数据的显著性差异。

### 3 结果

**3.1 大海马萃取物的获得率** 将大海马新鲜样品(见图 1A)进行冷冻干燥,对冻干样品(见图 1B)进行提取和分相。从冻干样品所制备的大海马粉末中,乙酸乙酯相萃取物的获得率为 0.7%,

正丁醇相萃取物的获得率为 3.0%,水相萃取物的获得率为 3.8%。

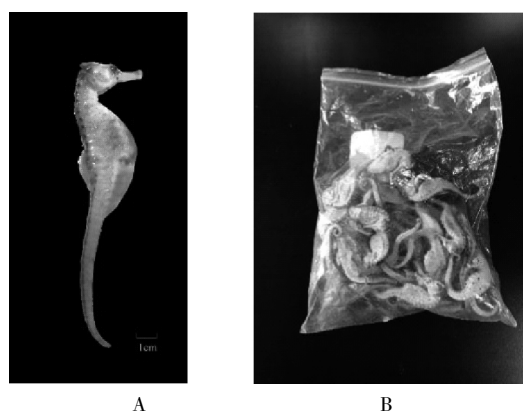
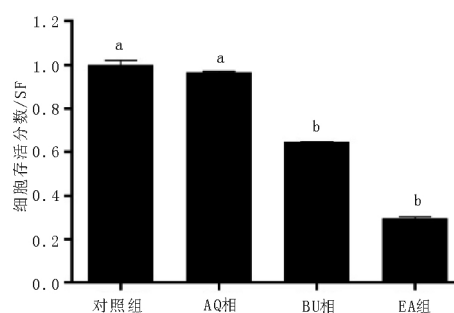


图 1 大海马新鲜样品(A)和冻干样品(B)

**3.2 大海马萃取物的抗肿瘤活性** 本文抗肿瘤活性检测实验中,DMSO 对照组的 A 值(1.523)和空白组(1.511)很接近,无显著差异,表明该实验所采用的人胶质瘤细胞 LN229 活性正常,结果可信。海马萃取物的抗肿瘤活性检测结果如图 2 所示。从图 2 可看出,大海马乙醇提取物的水相萃取物对人胶质瘤细胞 LN229 没有明显的抑制活性,但正丁醇相和乙酸乙酯相萃取物在 10 mg/ml 下均显示出显著的抗肿瘤活性,其中乙酸乙酯相萃取物的抗肿瘤活性较高。



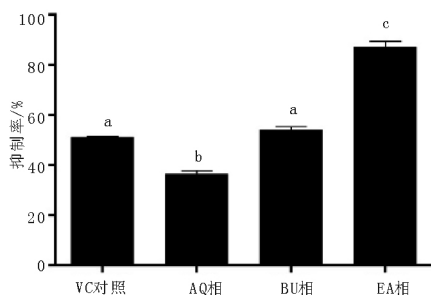
对照组为含 0.5% DMSO 的对照组; AQ 相为 10 mg/ml 的水相萃取物; BU 相为 10 mg/ml 的正丁醇相萃取物; EA 相为 10 mg/ml 的乙酸乙酯相萃取物。图中不同字母表示两组数据间存在显著性差异 P < 0.05, one-way ANOVA

图 2 大海马三种萃取物的抗肿瘤细胞(LN229)活性检测结果

**3.3 大海马萃取物的抗氧化活性检测** 以 DPPH 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果如图 3 所示,该方法以抑制率(%)表征总抗氧化能力。大海马乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物均呈现出抗氧化活性,其中乙酸乙酯相萃取物的抗氧化活性最高,抑制率达到 87.32%,显著高于阳性 VC 对照和其他实验组。另外,正丁醇相萃取物的抑制率(54.13%)与阳性 VC 对照(51.27%)相当,两者无显著差异。水相萃取物的抗氧化活性相对较低(36.64%),其抑制率显著低于阳性 VC 对照。

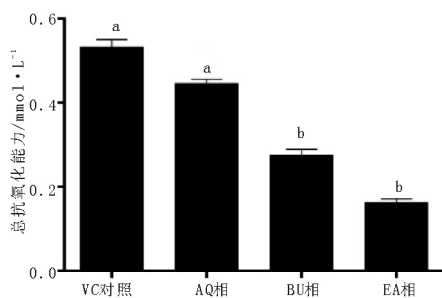
以 ABTS 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果如图 4 所示,该方法以 Trolox 的浓度(mmol/L)来表征总抗氧化能力(相当于 Trolox 的等效浓度 mmol/L)。从图 4 可见,以 ABTS 法测定时,大海马乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物也都呈现出一定的抗氧化活性,其中以水相萃取物的抗氧化活性为最高,达到 0.447 mmol/L Trolox,与阳性 VC 对照的活性(0.533 mmol/L Trolox)无显著差异。正丁醇相萃取物活性次之(0.277 mmol/L Trolox),乙酸乙酯相萃取物活性最低(0.164

mmol/L Trolox) 这两者均显著低于阳性 VC 对照的活性。



阳性对照为 10 mg/ml VC; AQ 相为 10 mg/ml 的水相萃取物;  
BU 相为 10 mg/ml 的正丁醇相萃取物;  
EA 相为 10 mg/ml 的乙酸乙酯相萃取物

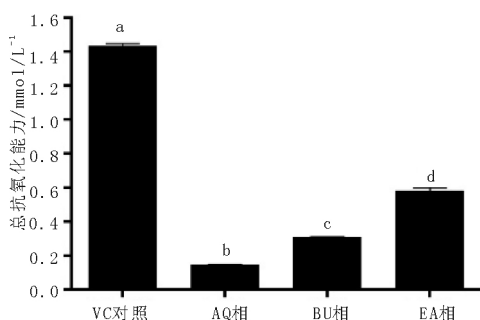
图 3 以 DPPH 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果



阳性对照为 0.1 mg/ml VC; AQ 相为 10 mg/ml 的水相萃取物;  
BU 相为 10 mg/ml 的正丁醇相萃取物;  
EA 相为 10 mg/ml 的乙酸乙酯相萃取物

图 4 以 ABTS 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果

以 FRAP 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果如图 5 所示,该方法以  $\text{FeSO}_4$  的浓度 (mmol/L) 来表征总抗氧化能力(相当于  $\text{FeSO}_4$  的等效浓度 mmol/L)。从图 5 可见,以 FRAP 法测定时,大海马乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物虽然呈现出了一定的抗氧化活性,但均显著低于阳性 VC 对照的活性(1.434 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ )。在这三种萃取物中,乙酸乙酯相萃取物的抗氧化活性最高,为 0.584 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ ,正丁醇相萃取物活性次之(0.310 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ ),水相萃取物活性最低(0.147 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ )。



阳性对照为 0.1 mg/ml VC; AQ 相为 10 mg/ml 的水相萃取物;  
BU 相为 10 mg/ml 的正丁醇相萃取物;  
EA 相为 10 mg/ml 的乙酸乙酯相萃取物

图 5 以 FRAP 法对大海马三种萃取物的抗氧化活性检测结果

综合上述抗氧化活性的检测结果可见,大海马乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物在 10mg/ml 浓度下均显示出了一定的抗氧化活性。本文所采用的三种抗氧化活性检测方

法(DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法)所得到的结果有所差异,相较这三相萃取物,乙酸乙酯相在 DPPH 法和 FRAP 法所得结果中均表现出最高的抗氧化活性。

#### 4 讨论

当前抗肿瘤活性物质的研究受到大量关注,但关于海马的抗肿瘤活性成分研究很少。李文琪等<sup>[11]</sup>报道了线纹海马的黄酒悬液能显著抑制小鼠胸腺和脾脏肿瘤的形成。本文抗肿瘤检测实验中所采用的肿瘤细胞为人胶质瘤细胞 LN229。人脑胶质瘤是原发性神经肿瘤中最为常见和致命的肿瘤,极易复发,且预后较差,其患者的中位生存期通常只有 15~19 个月,5 年存活率仅 5%,全球每年约 18~60 万中青年因罹患胶质瘤而死亡<sup>[23,24]</sup>。胶质瘤作为当今肿瘤研究的热点之一,也是常见的用于研究药物抗肿瘤活性的生物材料。本文实验结果表明,大海马乙醇提取物的正丁醇相和乙酸乙酯相萃取物对 LN229 均显示出抗肿瘤活性,尤其是乙酸乙酯相萃取物的活性非常显著,表明大海马中存在中低极性的抗肿瘤活性物质,有开发利用的潜力。

另一方面,人体体内自由基具有强氧化性,可损害机体的组织和细胞,引起慢性疾病及衰老效应,因此抗氧化的药品和保健品开发具有较好的开发前景。陈成波等发现通过 DPPH 法对三斑海马液化蛋白的抗氧化活性研究,结果表明三斑海马液化蛋白具有较强的抗氧化能力。易美华等用水提法对三斑海马的活性物进行提取,以碘量法发现三斑海马水提取物具抗氧化活性。关于大海马中的抗氧化活性成分研究, Qian<sup>[18]</sup>等发现大海马的甲醇提取物能有效清除 DPPH 等自由基,具抗氧化活性。许多抗氧化活性物质研究的文章采用一种抗氧化检测方法。本文为更全面地评估大海马萃取物的抗氧化活性,以 DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法三种方法进行检测。我们发现大海马乙醇提取物的乙酸乙酯相、正丁醇相和水相萃取物均具有一定的抗氧化活性,这进一步验证了大海马在制备抗氧化药品或保健品方面的应用潜力。在大海马这三种萃取物中,乙酸乙酯相萃取物在 DPPH 法和 FRAP 法所得结果中均表现出最高的抗氧化活性,尤其是在 DPPH 法所得结果中,乙酸乙酯相萃取物的抗氧化活性甚至超过 VC 对照,表明大海马存在抗氧化活性较高的中低极性物质。

不同于以往海马活性成份研究中多以风干海马为实验材料,本文采用了大海马新鲜样品进行冷冻干燥和提取,发现了大海马乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物呈现出较高的抗肿瘤活性和抗氧化活性,表明今后在对海马活性成分的开发利用中,值得关注其体内的中低极性成分。海马目前已有开展人工养殖,生物资源有一定保证。对海马活性成分的研究将有利于推动海马这种海洋传统中药材的现代化利用进程。

#### 参考文献:

- [1] 陈维宁,许兰之,高尔,等. 海马提取物的药理实验研究[J]. 潍坊医学院学报,1995,17(2):105.
- [2] 陆茵,陈文星,华永庆,等. 海马壮阳软胶囊温肾壮阳的实验药理学研究[J]. 南京中医药大学学报自然科学版,2001,17(2):99.
- [3] 许东辉,梅雪婷,李秉记,等. 海马胶囊提高大鼠性功能的药理作用[J]. 中药材,2003,26(11):807.
- [4] 张前进. 海龙海马的化学成分和药理活性[J]. 陕西中医,2004,25(4):363.
- [5] 梅雪婷,许东辉,林子力,等. 海马胶囊对肾虚大鼠的扶正固本作用[J]. 中草药,2005,36(3):409.
- [6] Mac Donald J F, Nowak I M. Mechanism of blockade of excitatory amino acid receptor channels[J]. TIPS,1990(11):167.
- [7] 洪涛. 深海龙的抗疲劳作用及对人体运动能力的影响[J]. 中国海洋药物,1995,54(2):41.
- [8] 胡建英,李八方,李志军,等. 八种海洋生药抗疲劳作用的初步研

- 究[J]. 中国海洋药物, 2000, 74(2): 56
- [9] 孟学强, 许东辉, 梅雪婷, 等. 海马胶囊治疗实验性前列腺增生的研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(3): 190
- [10] 张民庆, 龚惠民. 抗肿瘤中药的临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 402.
- [11] 李文琪, 倪庆桂, 赵振金, 等. 海马对小鼠 S180 实体肿瘤的抑制作用[J]. 安徽医学, 1999, 20(6): 6.
- [12] 朱爱民. 海马乙醇提取物药理作用的研究[J]. 中国药事, 2005, 19(1): 23.
- [13] 许东辉, 许实波. 斑海马提取物抗血栓药理研究[J]. 中药材, 1995, 18(11): 573.
- [14] 冯星, 巫志峰, 杨柳, 等. 中药海马提取物对实验性脑缺血再灌注损伤的药理作用[J]. 湖南师范大学学报医学报, 2005, 2(1): 1.
- [15] Zheng L, Chen J, Zhao H, et al. Rapid finding and quantification of the major antioxidant in water extracts of three marine drug organisms from China by online HPLC-DAD/MS-DPPH[J]. Nat Prod Res, 2012, 26(9): 873.
- [16] 张朝晖, 徐国均, 徐璐珊, 等. 五种海马提取物对 L-谷氨酸致大鼠神经元钙内流的拮抗作用[J]. 中国海洋药物, 1994, 52(4): 6.
- [17] 陈成波, 袁学会, 陈政, 等. 三斑海马液化蛋白的提取及抗氧化研究[J]. 中国热带医学, 2011, 11(3): 329.
- [18] Qian Z J, Ryu B M, Kim M M, et al. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of the extracts from seahorse, Hippocampus kuda Bleeler[J]. Biotechnol Biop Eng, 2008, 13(6): 705.
- [19] 洪美华. 海马的药理作用研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(6): 9.
- [20] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1578.
- [21] Luo J, Li L, Kong L. Preparative separation of phenylpropenoid glycerides from the bulbs of *Lilium lancifolium* by high-speed counter-current chromatography and evaluation of their antioxidant activities[J]. Food Chem, 2012, 131(3): 1056.
- [22] Zhang D Y, Wan Y, Xu J Y, et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 473.
- [23] 许蓓, 李爱群, 江高峰. 胶质瘤的细胞来源研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(3): 566.
- [24] Furnari F B, Fenton T, Bachoo R M, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683.

## 化痰祛痰方干预 MAPK 信号通路 对 AS 小鼠心功能的影响及其机制研究

李阳<sup>1</sup>, 冷雪<sup>2\*</sup>, 宋囡<sup>2</sup>, 王莹<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学实验动物中心 辽宁 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室 辽宁 沈阳 110847)

**摘要:** 目的 探讨化痰祛痰方通过干预 MAPK 信号通路改善心功能延缓 AS 的作用机制。方法 将 10 只 C57BL/6/J 小鼠作为正常组, 50 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠喂食高脂饲料 8 周后随机分为 模型组、丹参酮 II A 组(简称丹参组)、化痰祛痰方低剂量组(简称化痰方低组)、化痰祛痰方中剂量组(简称化痰方中组)、化痰祛痰方高剂量组(简称化痰方高组), 每组 10 只。在造模 8 周后, 以对应药物灌胃 8 周。超声检测小鼠心功能, 取血与心脏, 采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)含量, 油红 O 染色观察小鼠肝脏脂质沉积情况, ELISA 方法检测小鼠心肌组织 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、VCAM-1 含量, Western Blot 法检测小鼠心肌组织 JNK、p38、ERK 蛋白的磷酸化水平。结果 与正常组比较, 模型组小鼠 LVIdd 及 LVIdS 增大( $P < 0.05$ ), LVEF 及 LVFS 均显著降低( $P < 0.05$ ); 肝脏脂质沉积明显, 血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高( $P < 0.05$ ), HDL-C 水平显著降低( $P < 0.05$ ); 心肌组织 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、VCAM-1 含量、JNK、p38、ERK 的磷酸化水平升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 丹参组、化痰方低、中、高组 LVIdd 及 LVIdS 减小( $P < 0.05$ ), LVEF 及 LVFS 均显著降低( $P < 0.05$ ), 肝脏脂质沉积改善, 血清 TG、TC、LDL-C 水平下降, HDL-C 水平显著升高, 心肌组织 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、VCAM-1 含量、JNK、p38、ERK 的磷酸化水平下降( $P < 0.05$ )。结论 化痰祛痰方具有通过改善小鼠心功能, 延缓 AS 的作用, 其机制与降低 TNF- $\alpha$  诱导 ICAM-1、VCAM-1 的表达, 抑制 JNK、ERK、p38MAPK 等 MAPK 信号途径引起的炎症反应有关。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 化痰祛痰方; 心功能; MAPK 信号通路

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.06.019

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2019)06-1336-03

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病等多种心脑血管

疾病共同的发病基础<sup>[1]</sup>。研究表明, 调节炎症信号通路控制炎症反应可延缓管腔狭窄, 改善心功能, 减轻 AS 斑块的病变程度。化痰祛痰方具有健脾益气、祛痰化痰之功效, 临床主要用于 AS 的防治。本课题组前期已经证实该方调控血脂与胆固醇代谢, 抑制主动脉斑块形成的作用<sup>[2]</sup>, 但其能否通过干预 MAPK 信号通路改善心功能, 延缓 AS 尚未做过研究。为此本实验通过检测化痰祛痰方对 AS 小鼠心肌组织 MAPK 信号通路 JNK、p38、ERK 蛋白表达的影响, 探讨化痰祛痰方改善心功能防治 AS 的作用机制。

### 1 材料与仪器

1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只, 7 周龄, 体重 18 ~

收稿日期: 2018-09-24; 修订日期: 2019-03-21

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划项目(20170540592);

辽宁省沈阳市科技计划项目(17-139-8-00);

辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2015332)

作者简介: 李阳(1986-), 男(汉族), 辽宁沈阳人, 辽宁中医药大学助理实验师, 硕士学位, 主要从事心血管病研究工作。

\* 通讯作者简介: 冷雪(1983-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 辽宁中医药大学实验师, 博士学位, 主要从事心血管病研究工作。