

· 专题 ·

何首乌中大黄素-大黄素二蒽酮抗心肌缺血作用研究[△]

杨建波¹, 汪祺^{1a}, 王莹¹, 程显隆¹, 魏锋¹, 陈子涵², 孙华^{2*}, 高慧宇¹,
王雪婷¹, 宋云飞¹, 马双成^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;

2. 中国医学科学院 药物研究所, 北京 100050

[摘要] 目的: 研究何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根中大黄素-大黄素二蒽酮的抗心肌缺血作用。方法: 采用大孔吸附树脂、反相硅胶和制备型高效液相色谱等柱色谱方法快速制备大黄素-大黄素二蒽酮。采用雄性昆明种小鼠制备异丙肾上腺素诱导的心肌缺血模型, 灌胃给予大黄素-大黄素二蒽酮 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 以地尔硫卓为阳性对照组, 观察其对小鼠的保护作用。采用心电图检测仪监测小鼠心电图 ST 段抬高情况。采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒检测小鼠血清中心肌损伤生物标记物心肌钙蛋白-T (cTn-T)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 水平。结果: 何首乌中分离得到的大黄素-大黄素二蒽酮在 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下能显著改善心肌缺血小鼠心电图 ST 段抬高情况, 降低血清 cTn-T、CK-MB 水平, 改善心肌缺血损伤状态。结论: 何首乌中大黄素-大黄素二蒽酮显示较好的抗心肌缺血作用, 值得深入研究。

[关键词] 何首乌; 分离与纯化; 大黄素-大黄素二蒽酮; 抗心肌缺血

[中图分类号] R284; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)08-1420-05

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20220207001

Effect of Emodin-emodin Dianthrone from *Polygoni Multiflori* Radix on Myocardial Ischemia

YANG Jian-bo¹, WANG Qi^{1a}, WANG Ying¹, CHENG Xian-long¹, WEI Feng¹, CHEN Zi-han², SUN Hua^{2*},
GAO Hui-yu¹, WANG Xue-ting¹, SONG Yun-fei¹, MA Shuang-cheng^{1*}

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of emodin-emodin dianthrone isolated from *Polygoni Multiflori* Radix (PMR) on myocardial ischemia. **Methods:** The emodin-emodin dianthrone was isolated by macroporous adsorption resin, reversed-phase silica, and preparative high performance liquid chromatography. Myocardial ischemia was induced in male Kunming mice with isoprenaline, and then the model mice were given (*i.g.*) the emodin-emodin dianthrone ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and diltiazem was used in the positive control group. Then the effect on the disease was observed. Electrocardiogram detector was used to monitor the elevation of ST elevations on the electrocardiogram in mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to detect the levels of cardiac troponin T (cTn-T) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB), biomarkers of myocardial injury in serum of mice. **Results:** The emodin-emodin dianthrone significantly improved the ST elevations on the electrocardiogram, decreased the level of serum myocardial damage biomarker cTn-T and the level of myocardial enzyme, and alleviated myocardial ischemia in mice. **Conclusion:** The emodin-emodin dianthrone is effective against myocardial ischemia, which are worthy of further research.

[Keywords] *Polygoni Multiflori* Radix; separation and purification; emodin-emodin dianthrone; anti-myocardial ischemia

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目 (81973476)

* [通信作者] 孙华, 研究员, 研究方向: 天然产物生物活性及靶点; E-mail: sunhua@imm.ac.cn

马双成, 研究员, 研究方向: 中药民族药质量标准及安全性评价研究; E-mail: masc@nifdc.org.cn

^a 并列第一作者

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 生何首乌具有解毒、消痈、截疟、润肠通便等功效^[1]; 制何首乌具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功效^[1]。文献报道, 何首乌中化学成分主要有蒽醌(单核和双核蒽醌)、二苯乙烯、黄酮、多酚及多糖类等^[2-10]。现代药理学研究发现, 何首乌具有抗衰老、抗炎、调血脂、保肝、神经保护和抗糖尿病等作用^[11-14]。何首乌水提取物作用于犬急性心肌缺血再灌注模型, 能够使血清中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化酶(CAT)活性升高, 有效缩小心肌梗死面积, 对犬急性心肌缺血再灌注损伤具有良好的预防作用^[15]。进一步研究发现, 何首乌中主要活性成分二苯乙烯苷能够显著降低缺血再灌注模型心肌细胞中活性氧(ROS)含量, 并进一步抑制细胞凋亡, 发挥抗心肌缺血活性^[16]。目前临床心肌缺血的治疗包括药物治疗、支架等的介入治疗和冠状动脉搭桥术等的手术治疗。其中药物治疗主要包括硝酸酯类药物、镇痛剂、 β 受体阻断剂、钙通道阻断剂、肾素-血管紧张素-醛固酮系统药物、调脂药, 以及丹参片、速效救心丸、银杏叶制剂等中成药, 但这些药物仅能用于缓解症状, 难以彻底治愈^[17-18]。

本课题组首次从何首乌中分离得到一类新的成分二蒽酮类成分, 除了发现其在体外细胞和斑马鱼模型中表现出一定的肝毒性外^[19-21], 还发现二蒽酮类成分具有较好的抗病毒和抗抑郁等活性^[22-23]。因此, 为了进一步丰富该类成分的药理活性研究, 本研究对分离得到的反式(顺式)-大黄素-大黄素二蒽酮(图1)混合样品进行抗心肌缺血活性评价。

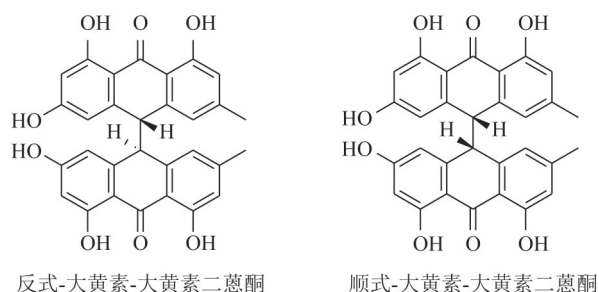


图1 反式(顺式)-大黄素-大黄素二蒽酮结构式

1 材料

1.1 实验动物

无特定病原体(SPF)级雄性昆明种小鼠, 38只, 体质量18~20 g, 购于北京华阜康生物技术有限公司,

实验动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008, 动物实验由中国医学科学院药物研究所伦理委员会审批, 审批号为00003037。动物饲养于中国医学科学院药物研究所良好实验室管理规范(GLP)动物实验中心, 自由摄食、饮水, 饲养温度为(20±3)℃, 相对湿度为(50.0±10.0)%, 间隔12 h开灯光照。

1.2 试药

异丙肾上腺素(ISO, 批号: I5627-5G, Sigma公司); 地尔硫卓(批号: E017, 天津田边制药有限公司); 心肌肌钙蛋白-T(cTn-T, 批号: 202011025016)、肌酸激酶-同工酶(CK-MB, 批号: 20210501033)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒均购于上海纪宁实业有限公司; 反式-大黄素-大黄素二蒽酮和顺式-大黄素-大黄素二蒽酮对照品为实验室制备(纯度≥98%); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 天津市福晨化学试剂厂); 其他试剂均为分析纯。

何首乌药材样品于2020年10月购于广东省茂名市高州市, 经中国食品药品检定研究院杨建波副研究员鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 样品标本(GDGZ2020)保存于中国食品药品检定研究院。

1.3 仪器

LC-6AD型半制备高效液相色谱仪(日本岛津公司); e2695型高效液相色谱仪, 配2998型光电二极管阵列检测器(PDA)、Empower色谱工作站(Waters公司); ZORSAX SB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5μm, 美国Agilent公司); DM-8型大孔吸收树脂(天津津达正源化工有限公司); C₁₈反相填料(日本YMC公司); XPE105型万分之一电子分析天平、ME303/02型千分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司); VIM3000型小动物专用吸入麻醉机(美国SurgiVet公司); MD3000-E型心电图检测仪(安徽正华生物仪器设备公司); Multiskan FC型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 大黄素-大黄素二蒽酮样品的制备

取何首乌干燥块根10 kg, 粉碎后用70%乙醇加热回流提取3次, 每次2 h, 合并3次提取液, 减压回收溶剂得70%乙醇浸出物(1.5 kg)。将上述浸出物混悬于水(1 L)中, 再加水稀释至5 L, 过DM-8

型大孔吸附树脂,依次用水和不同体积分数的乙醇洗脱,得到3个不同组分,分别为水洗脱部分(组分A)、55%乙醇洗脱部分(组分B)和95%乙醇洗脱部分(组分C)。组分C用甲醇溶解,拌样十八烷基硅烷键合硅胶(ODS),干法上样,经ODS中压柱色谱分离,依次用50%甲醇、70%甲醇和甲醇洗脱,再经过反相硅胶薄层色谱检测、合并,共获得5个组分,分别为C1~C5。组分C3(4.5 g)经过半制备液相色谱纯化,流动相为甲醇-水(80:20),检测波长为230 nm,流速为5.0 mL·min⁻¹,得到大黄素-大黄素二萜酮样品(1.5 g)。

2.2 大黄素-大黄素二萜酮样品分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORSAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5μm);流动相为甲醇-水(75:25);柱温为35℃;检测波长为360 nm;流速为1.0 mL·min⁻¹;进样量为10 μL。

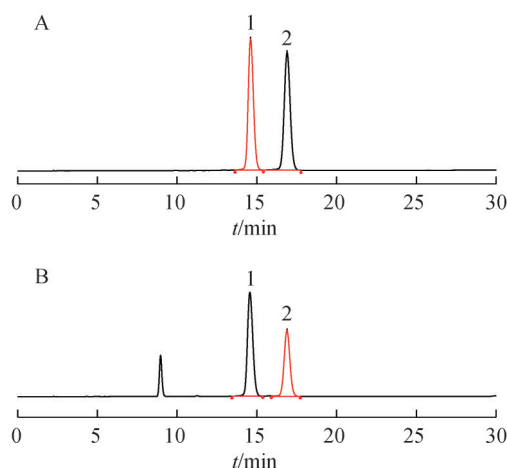
2.2.2 对照品溶液配制 分别取反式(顺式)-大黄素-大黄素二萜酮对照品适量,精密称定,加甲醇溶液制成含反式(顺式)-大黄素-大黄素二萜酮分别为0.31、0.32 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液配制 取大黄素-大黄素二萜酮样品适量,精密称定,加甲醇溶液制成含大黄素-大黄素二萜酮0.67 mg·mL⁻¹的供试品溶液,即得。

2.2.4 含量测定 分别取对照品和供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样分析,结果显示在对照品色谱峰保留时间的位置上,供试品溶液显相同保留时间的色谱峰,见图2。并进一步用外标法对供试品中反式(顺式)-大黄素-大黄素二萜酮进行含量测定,结果发现其质量分数分别为50.7%和35.8%,总质量分数为86.5%。

2.3 模型制备、分组与给药

雄性昆明种小鼠适应环境后随机分为4组,分别为对照组、ISO模型组、地尔硫卓(20 mg·kg⁻¹)阳性对照组和大黄素-大黄素二萜酮(10 mg·kg⁻¹,根据预试验结果确定剂量)组,每组9~10只。大黄素-大黄素二萜酮组小鼠每天灌胃给药相应剂量的大黄素-大黄素二萜酮1次,地尔硫卓组每天腹腔注射给药1次,对照组及模型组给予相同量的CMC-Na溶液,给药量均为10 mg·kg⁻¹,连续给药10 d。给药第4天,除对照组外,各组小鼠皮下注射ISO(40 mg·kg⁻¹)1次,给药第5~10天ISO皮下注射剂



注: A. 混合对照品; B. 样品; 1. 反式-大黄素-大黄素二萜酮; 2. 顺式-大黄素-大黄素二萜酮。

图2 反式(顺式)-大黄素-大黄素二萜酮混合对照品和样品的高效液相色谱图

量调整为20 mg·kg⁻¹,均为给药后2 h造模,第10天给予ISO造模2 h,眼眶取血后处理动物。

2.4 心电图监测

实验第10天,每组小鼠随机选取4只,于造模0.5 h后记录Ⅱ导联心电图,并分析ST段抬高的情况^[24]。

2.5 心肌损伤生物标记物及心肌酶检测

末次造模后2 h,小鼠眼眶静脉丛取血,室温静置2 h后,3500 r·min⁻¹离心20 min(离心半径8.6 cm)分离血清,按ELISA试剂盒说明书测定血清CK-MB和cTn-T水平^[25]。

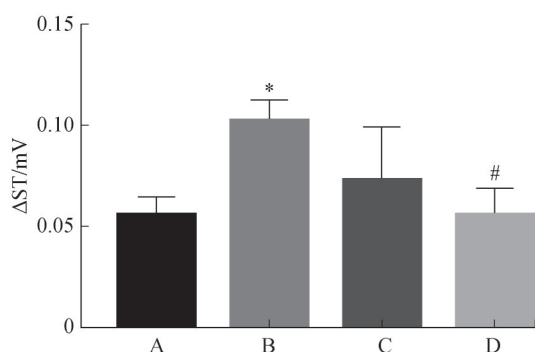
2.6 统计学分析

实验数据均采用SPSS 13.0软件处理分析,组间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄素-大黄素二萜酮对ISO致心肌缺血小鼠Ⅱ导联心电图的影响

心电图检查是诊断心肌缺血最常用的无创性方法。ISO给药引起小鼠心电图出现ST段持续弓背抬高,表现出典型的心肌缺血性改变。计算ST段抬高程度(Δ ST),模型组与对照组比较显著升高(图3)。大黄素-大黄素二萜酮10 mg·kg⁻¹能显著降低ISO引起的心电图ST段抬高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且活性优于地尔硫卓(20 mg·kg⁻¹)。



注: A. 对照组; B. 模型组; C. 地尔硫卓组; D. 大黄素-大黄素二萜酮组; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 图4~5同。

图3 各组小鼠Ⅱ导联心电图ST段变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3.2 大黄素-大黄素二萜酮对ISO致心肌缺血小鼠血清心肌损伤生物标记物cTn-T的影响

心肌坏死时, 心肌内含有的一些蛋白质类物质会从心肌组织内释放出来, 并出现在外周循环血中, 可作为心肌损伤的判断性指标。肌钙蛋白(Tn)是心肌组织收缩的调节蛋白, 心肌肌钙蛋白(cTn)与骨骼肌中的Tn在分子结构和免疫学上是不同的, 因此是心肌所独有的, 是判断心肌坏死最特异和敏感的首选标志物。cTn有3个亚型, 分别为cTn-T、cTn-I和cTn-C。cTn-T对早期和晚期心肌坏死均具有很高的诊断价值。

各组小鼠血清中cTn-T检测结果见图4。ISO引起小鼠血清心肌损伤生物标记物cTn-T水平显著升高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 大黄素-大黄素二萜酮 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著降低小鼠血清cTn-T水平($P < 0.05$), 且活性优于阳性对照药地尔硫卓($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

3.3 大黄素-大黄素二萜酮对ISO致心肌缺血小鼠血清心肌酶CK-MB含量的影响

CK-MB是判断心肌坏死的另一个临床特异性和

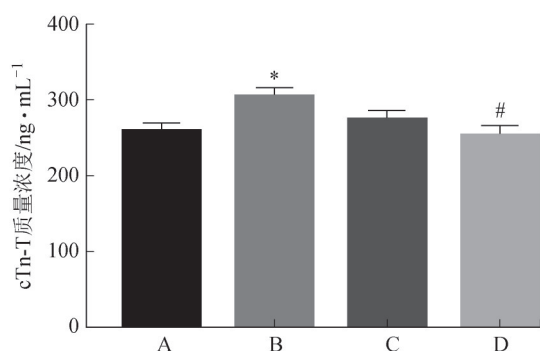


图4 各组小鼠血清中cTn-T水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

敏感性指标。各组小鼠血清中CK-MB水平检测结果见图5。ISO能引起小鼠血清CK-MB水平显著升高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 大黄素-大黄素二萜酮($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)能显著降低ISO引起的血清CK-MB水平升高($P < 0.05$), 且活性优于阳性对照药地尔硫卓($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

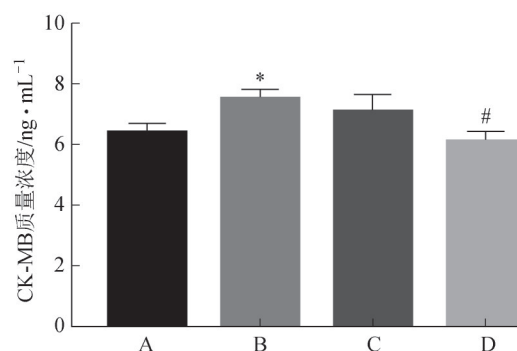


图5 各组小鼠血清中CK-MB水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

4 讨论

本课题组首次建立从何首乌中快速制备大黄素-大黄素二萜酮的分离方法, 并对其进行了抗心肌缺血活性筛选, 初步确定其在 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量显示较好的活性, 且活性优于阳性对照药地尔硫卓($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 为进一步深入系统地研究该类成分的药理活性提供参考。在后续的研究中, 一方面要分别考察反式、顺式-大黄素-大黄素二萜酮的抗心肌缺血活性, 另一方面还需要考察其不同剂量的抗心肌缺血活性, 进而获得半数有效量, 有助于系统评价其治疗指数, 从而评价该类成分的安全性。

与此同时, 本课题组研究发现, 何首乌中二萜酮类成分为微量成分^[26], 除了大黄素-大黄素二萜酮, 还存在40余个潜在二萜酮类成分^[27]。为了进一步评价该类成分的抗心肌缺血活性及其作用机制, 有必要对该类成分进行靶向分离与纯化, 从而阐明何首乌抗心肌缺血活性的潜在物质基础, 进一步为其临床应用提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:183.
- [2] 沈晓静, 张敢娟, 吕奇, 等. 何首乌化学成分及其药理活性的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(4): 439-450.

- [3] 王浩,杨健,周良云,等. 何首乌化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):192-205.
- [4] TEKA T, WANG L M, GAO J, et al. *Polygonum multiflorum*: Recent updates on newly isolated compounds, potential hepatotoxic compounds and their mechanisms[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113864.
- [5] 杨建波,高慧宇,王雪婷,等. 何首乌中1个新的木脂素酰胺类化合物[J]. 中草药,2021,52(18):5475-5482.
- [6] YANG J B, SUN H, MA J, et al. New phenolic constituents obtained from *Polygonum multiflorum* [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(3): 342-346.
- [7] YANG J B, YE F, TIAN J Y, et al. Multiflorumisides HK, stilbene glucosides isolated from *Polygonum multiflorum* and their *in vitro* PTP1B inhibitory activities [J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104703.
- [8] NGUYEN T A, HA M T, PARK S E, et al. Stilbenes with potent protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activity from the roots of *Polygonum multiflorum* [J]. J Nat Prod, 2020, 83(2): 323-332.
- [9] YANG J B, YAN Z, REN J, et al. Polygonumnolides A₁-B₃, minor dianthrone derivatives from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(6): 617-624.
- [10] YANG J B, LI L, DAI Z, et al. Polygonumnolides C₁-C₄; minor dianthrone glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(9): 813-822.
- [11] 袁炜. 何首乌的化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [12] 张静娴. 何首乌神经保护活性成分研究[D]. 北京:北京协和医学院,2016.
- [13] 林艳,肖榕,李春,等. 生/制/发酵何首乌化学成分、药理作用及肝毒性研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 661-672.
- [14] 陈冰冰,姜爱玲,张岩. 何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(6): 710-715.
- [15] 戴友平,唐国华,郭衍坤. 何首乌提取液对犬心肌缺血再灌注损伤的预防作用实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 18(2): 79-81.
- [16] 林忠晓. 二苯乙烯苷通过PI3K/AKT途径影响缺血再灌注心肌细胞凋亡的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2018.
- [17] 蒋炜,樊鹏程,马慧萍,等. 抗心肌缺血药物的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(6): 1064-1066.
- [18] 刘俊彤,赖思含,付东兴,等. 抗心肌缺血天然药物研究进展[J]. 药学学报, 2021, 56(10): 2761-2768.
- [19] LI H Y, YANG J B, LI W F, et al. *In vivo* hepatotoxicity screening of different extracts, components, and constituents of *Polygoni multiflori* Thunb. in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110524.
- [20] YANG J B, LI W F, LIU Y, et al. Acute toxicity screening of different extractions, components and constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. on zebrafish (*Danio rerio*) embryos *in vivo* [J]. Biomedicine Pharmacother, 2018, 99: 205-213.
- [21] WANG Q, WANG Y D, LI Y, et al. Identification and characterization of the structure-activity relationships involved in UGT1A1 inhibition by anthraquinone and dianthrone constituents of *Polygonum multiflorum* [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17952.
- [22] HUDSON J B, HARRIS L, TOWERS G H. The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin [J]. Antiviral Res, 1993, 20(2): 173-178.
- [23] BARNES J, ANDERSON L A, PHILLIPSON J D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties [J]. J Pharm Pharmacol, 2010, 53(5): 583-600.
- [24] 张东,贾连群,杨关林,等. 化痰祛痰方对异丙肾上腺素(ISO)急性心肌缺血大鼠心肌细胞结构、心电图ST段总偏移值、MDA、SOD、LDH、CK表达影响随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(6): 69-74.
- [25] 覃斐章,秦秋华,裯霏霏,等. 玉郎伞查尔酮对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(5): 1054-1059.
- [26] YANG J B, SONG Y F, LIU Y, et al. UHPLC-QQQ-MS/MS assay for the quantification of dianthrone as potential toxic markers of *Polygonum multiflorum* Thunb.: Applications for the standardization of traditional Chinese medicines (TCMs) with endogenous toxicity [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 51.
- [27] YANG J B, LIU Y, WANG Q, et al. Characterization and identification of the chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection and linear ion trap FT-ICR hybrid mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 172: 149-166.

(收稿日期: 2022-02-07 编辑: 田苗)