

## 蜂胶血液移行成分对心肌细胞的保护作用<sup>①</sup>

张奇峰,周威,章琪,许红梅,程清洲<sup>②</sup>

(武汉轻工大学医学技术与护理学院,湖北 武汉 430023 E-mail:whzqf@126.com)

**摘要:** **目的** 观察蜂胶及其特征单体血液移行成分对离体心肌细胞的保护作用。**方法** 大鼠连续灌胃蜂胶提取物及其特征单体白杨素、高良姜素 7 d,最后一次灌胃 45 min 后,腹主动脉取血,离心制备含蜂胶及其特征单体移行成分的血清。提取 SD 大鼠乳鼠心肌细胞并培养,采用阿霉素(DOX)制备心肌细胞损伤模型,使用四甲基偶氮唑盐(MTT)代谢率法研究心肌细胞存活率;用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)制备心肌细胞损伤模型并测定不同样品中心肌细胞培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及乳酸脱氢酶(LDH)含量。**结果** MTT 实验结果表明,蜂胶提取物组、白杨素组、高良姜素组能明显改善心肌细胞的存活率( $P < 0.05$ )。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 心肌细胞损伤实验结果表明,蜂胶提取物组较模型组 LDH、MDA 生成量降低,SOD 活性提高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而白杨素、高良姜素的 LHD、MDA 和 SOD 与模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 药典剂量下,蜂胶血液移行成分具有心肌细胞保护作用,减轻阿霉素、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞损伤,其机制可能与抗氧化有关;白杨素、高良姜素可改善阿霉素引起的心肌细胞损伤,其机制可能与抗氧化无关。

**关键词:** 蜂胶;血液移行成分;白杨素;高良姜素;心肌细胞

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)02-0087-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.02.001

### Protection on cardiomyocytes by blood transitional components of propolis

Zhang Qifeng, Zhou Wei, Zhang Qi, Xu Hongmei, Cheng Qingzhou

(School of Health Science & Nursing, Wuhan Polytechnic University,  
Wuhan 430023, Hubei, China E-mail:whzqf@126.com)

**Abstract:** **Objective** To observe the protective effects of blood transitional components of propolis and its characteristic flavonoid compounds on cardiomyocytes *in vitro*. **Methods** The rats were given intragastric administration with propolis extract and its characteristic flavonoids: chrysin and galangin continuously for 7 days. Forty-five minutes after the rats received last intragastric administration, blood was drawn from abdominal aorta and different centrifuged serum containing transitional components of propolis and its characteristic flavonoid compounds were prepared. Extracted ventricular cells from neonatal rats and cultivated, prepared myocardial injury cell models by doxorubicin (DOX), and the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) metabolic rate method was used to study the survival rates of cardiomyocytes; then prepared myocardial injury cell models by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and detected concentrations of SOD, MDA and LDH in cultivated myocardial cells solution of different samples. **Results** MTT results showed that the survival rates of cardiomyocytes in propolis extract group, chrysin group and galangin group were obviously increased ( $P < 0.05$ ). Results of myocardial cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> test showed that LDH and MDA concentrations in propolis extract group were lower than those of model group, and SOD activity increased, and the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ); and compared LDH, MDA and SOD measurements of chrysin group and galangin group with model group showed that there were no statistical differences ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** According to the pharmacopoeia dose, blood transitional elements of propolis can significantly protect myocardial cells, can alleviate damage of myocardial cells caused by DOX and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the mechanism may be related with antioxidant effect; chrysin and galangin can alleviate the myocardial cell injury caused by DOX, and the mechanism may not be related with antioxidant effect.

**Key words:** propolis; blood transitional components; chrysin; galangin; myocardial cells

① 基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2015CFC844)

② 通信作者,E-mail:chqz5758@sina.com

蜂胶(propolis)是蜜蜂从植物幼芽与树干上采集的树脂与其上腺分泌物和蜂蜡等混合加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物。它主要由蜂胶香脂、蜂蜡、树脂、花粉等组成<sup>[1]</sup>。已有研究资料显示,蜂胶及其制剂具有良好的心肌保护作用<sup>[2-3]</sup>;但现有文献研究集中在蜂胶原料、复方及其不同提取部位、单体等的体外作用或整体动物实验。本实验研究是在大鼠灌服蜂胶及其特征单体白杨素、高良姜素一段时间后,以灌服后的移行成分为研究对象,研究其对离体心肌细胞的作用,并测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及乳酸脱氢酶(LDH)等分子生物学指标,探讨蜂胶对心肌细胞保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 KQ-500DE型超声波清洗器(江苏昆山超声仪器公司);RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣公司);凯达TGL-20LM台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器公司);CO<sub>2</sub>培养箱(长沙华曦电子科技有限公司);倒置相差显微镜CK-40(Olympus, Japan);全自动洗板机(北京普朗新技术有限公司)。白杨素(批号:130402)、高良姜素(批号:120815),纯度以HPLC≥98%(北京盛世康普化工技术研究院)。注射用盐酸阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,批号:140412);四甲基偶氮唑盐(MTT)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)(南京建成生物工程研究所)。健康SD雄性大鼠[华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,许可证号为SCXK(鄂)2004-0007]。蜂胶原料(神农架玉泉绿色产品有限公司),经陈平教授(武汉轻工大学生物及制药工程学院)鉴定。蜂胶提取物为本课题组按照文献<sup>[4]</sup>方法自制,并根据《中华人民共和国药典2010年版》蜂胶含量测定中的高效液相测定方法<sup>[5]</sup>,测得白杨素浓度为15.26%,高良姜素浓度为7.11%。

## 1.2 实验方法

1.2.1 含蜂胶血清的制备 参照文献<sup>[6]</sup>方法,根据《中华人民共和国药典2010年版》<sup>[5]</sup>成人剂量折算成大鼠给药剂量,取SD大鼠灌胃剂量为60 mg/kg,并通过蜂胶提取物中白杨素、高良姜素的含量计算灌胃剂量。大鼠随机分生理盐水、蜂胶提取物、白杨素、高良姜素4组给药,每组4只,每只大鼠每日2次,连续7 d,对照组给予同剂量的生理盐水,每次灌胃体积按1 ml/kg进行。末次灌胃前禁食12 h。末次灌胃45 min后,腹主动脉采血,静置,3 000 r/min离心分离血清,置-20℃保存备用。

1.2.2 心肌细胞的分离提取 参照文献<sup>[6]</sup>方法,取日龄1~3 d的SD大鼠乳鼠,无菌条件下开胸,取出心脏,浸入预冷的盛有PBS的培养皿中,转入超净工作

台中操作,去除血管、心房、结缔组织及残留的血液,剪成碎块,加入含胰酶和EDTA的消化液,37℃水浴锅中重复消化,制成细胞悬液,200目尼龙网过滤,收集滤液,1 000 r/min,离心5 min。弃上清,加入含13% FBS的DMEM完全培养基10 ml,接种于培养瓶中,置培养箱培养后接种到细胞板中,视细胞生长情况,每2 d换液。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)法细胞存活率测定 参照文献<sup>[6]</sup>方法,将1.2.2提取的心肌细胞纯化并接种于96孔细胞板中,用含15%FBS的DMEM按常规完全培养液培养,每24 h换液一次,72 h后将细胞分组,每组12个复孔,分成:正常组、模型组(2 μg/ml阿霉素处理)、蜂胶血液移行成分及不同的特征黄酮组(阿霉素+蜂胶成分),置于培养箱中培养,在药物作用48 h后每孔加入MTT 20 μl,共孵育4 h后,弃去培养液,每孔加入DMSO 150 μl,震荡15 min后,在酶标仪于570 nm波长处测定各孔吸光度值。存活率(%)=实验组A值/正常组A值×100%。

1.2.4 心肌损伤相关因子检测 参照文献<sup>[7]</sup>方法,将1.2.2提取的心肌细胞纯化后接种,按每毫升 $5 \times 10^5$ 个的密度接种于96孔细胞板,分组:正常组、氧化应激组(心肌细胞培养液中添加终浓度为200 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用2 h)、蜂胶可血液移行成分及不同的特征黄酮组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+蜂胶成分),每样品6孔,共培养24 h后,收集心肌细胞及培养上清液用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及乳酸脱氢酶(LDH)。

1.2.5 统计学方法 应用SPSS 17.0软件对实验数据进行分析,各变量均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MTT法细胞存活率测试结果 与正常组比较,阿霉素(模型组)能使心肌细胞存活率下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。蜂胶提取物和白杨素、高良姜素血液移行成分对阿霉素引起的心肌细胞存活率下降具有缓解作用,能使心肌细胞存活率升高,与模型组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 MTT法检测各组心肌细胞存活率结果 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	存活率
正常组	12	100 <sup>a</sup>
模型组	12	64.72±2.97
蜂胶提取物组	12	72.61±2.86 <sup>a</sup>
白杨素组	12	73.26±3.12 <sup>a</sup>
高良姜素组	12	73.17±3.02 <sup>a</sup>

注:与模型组比较,a: $P < 0.05$

2.2 心肌损伤相关因子检测结果 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能使心肌细胞损伤相关因子 MDA、LDH 明显升高,使抗氧化酶 SOD 明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。蜂胶提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的心肌细胞氧化损伤具有缓解作用,能使 MDA、LDH 明显降低, SOD 明显升高,与模型组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),白杨素、高良姜素血液移行成分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所引起的 MDA、LDH、SOD 改变无明显作用。见表 2~表 4。

表 2 不同组别心肌细胞上清液中 MDA 测试结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6, \text{nmol/ml}$ )

组别	血清加入量		
	2.5 $\mu\text{l}$	5.0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
正常组	0.191 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.307 $\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	1.276 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>
模型组	0.273 $\pm$ 0.015	0.472 $\pm$ 0.022	1.674 $\pm$ 0.082
蜂胶提取物组	0.249 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	0.356 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>	1.381 $\pm$ 0.087 <sup>a</sup>
白杨素组	0.265 $\pm$ 0.017	0.450 $\pm$ 0.029	1.491 $\pm$ 0.080
高良姜素组	0.257 $\pm$ 0.015	0.436 $\pm$ 0.023	1.464 $\pm$ 0.083

注:与模型组比较,a:  $P < 0.05$

表 3 不同组别心肌细胞中 SOD 活力测试结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6, \text{U/L}$ )

组别	血清加入量		
	2.5 $\mu\text{l}$	5.0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
正常组	19.121 $\pm$ 0.913 <sup>a</sup>	21.214 $\pm$ 1.197 <sup>a</sup>	23.336 $\pm$ 1.224 <sup>a</sup>
模型组	12.274 $\pm$ 0.814	14.898 $\pm$ 0.998	15.529 $\pm$ 0.997
蜂胶提取物组	16.852 $\pm$ 0.886 <sup>a</sup>	17.846 $\pm$ 1.188 <sup>a</sup>	18.010 $\pm$ 1.265 <sup>a</sup>
白杨素组	13.693 $\pm$ 0.966	14.023 $\pm$ 1.012	14.933 $\pm$ 1.101
高良姜素组	13.460 $\pm$ 0.967	13.693 $\pm$ 0.990	15.002 $\pm$ 0.947

注:与模型组比较,a:  $P < 0.05$

表 4 不同组别心肌细胞上清液中 LDH 含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 6, \text{U/L}$ )

组别	血清加入量		
	2.5 $\mu\text{l}$	5.0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
正常组	392.67 $\pm$ 21.23 <sup>a</sup>	342.37 $\pm$ 19.98 <sup>a</sup>	236.44 $\pm$ 16.87 <sup>a</sup>
模型组	485.93 $\pm$ 27.21	436.39 $\pm$ 22.53	390.59 $\pm$ 19.98
蜂胶提取物组	413.15 $\pm$ 29.53 <sup>a</sup>	370.66 $\pm$ 26.65 <sup>a</sup>	308.39 $\pm$ 17.79 <sup>a</sup>
白杨素组	466.28 $\pm$ 27.38	397.79 $\pm$ 28.89	368.66 $\pm$ 20.87
高良姜素组	462.68 $\pm$ 26.77	412.33 $\pm$ 27.89	366.10 $\pm$ 19.98

注:与模型组比较,a:  $P < 0.05$

### 3 讨论

蜂胶的化学成分极为复杂,黄酮类化合物是蜂胶主要的功效成分及发挥保健营养功能的重要物质基础,目前仍以总黄酮的高低来确定蜂胶的质量,药典中也以两个特征性黄酮:白杨素、高良姜素的含量来确定蜂胶的质量<sup>[6]</sup>;已有文献及本课题组前期的研究表明,

蜂胶具有良好的心肌保护作用<sup>[4,8-9]</sup>。本研究分析了在药典推荐剂量下,大鼠灌胃蜂胶提取物、白杨素、高良姜素一段时间后取出的血清对体外培养的造模后心肌细胞的影响。MTT 试验结果证明,阿霉素能使细胞存活率下降,含蜂胶提取物、白杨素和高良姜素含药血清能明显提高细胞存活率。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用后的心肌细胞,细胞上清液中 MDA、LDH 含量升高, SOD 活力下降;含蜂胶提取物血液移行成分能明显改善由于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 MDA、SOD 及 LDH 指标改变;白杨素、高良姜素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 MDA、SOD 及 LDH 变化无作用。上述结果表明,蜂胶提取物血液移行成分能保护心脏,作用机制可能与抗氧化相关;而药典中作为液相检测指标性黄酮成分的白杨素与高良姜素在药典推荐剂量下,心脏保护作用可能与抗氧化作用无关,但对阿霉素引起的心肌细胞损伤有缓解作用。此结果说明,蜂胶对心脏有保护作用,不仅有抗氧化机制,还有其他途径产生效果。

蜂胶作为一种具有明显保护心脏作用的天然药物和保健食品,其成分复杂,保护心肌细胞的机制也有多种途径。天然保健品的研究必须考虑到全成分效应及合适配比,在今后的研究中值得推广。

### 参考文献:

- [1] Vassya Bankova, Gergan Boudourova-krasteva, Simeon Popov, et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis[J]. Apidologie, 1998, 29(4): 361-367.
- [2] 隋玲娟,刘义. 辽西蜂胶醇提取物与槲皮素对培养心肌细胞氧化损伤保护作用的比较研究[J]. 世界临床药物, 2008, 29(1): 37-40.
- [3] 马士巧,马海乐,潘忠礼,等. 黑蜂蜂胶不同极性提取物的体外抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 53-58.
- [4] 周威,程清洲,陈新,等. 浙江桐庐产蜂胶中黄酮类化合物研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 394-397.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 336.
- [6] 雷雪,周俊冬,王雪梅,等. 参附汤血中移行成分对阿霉素所致心肌细胞凋亡及自噬的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(8): 1125-1127.
- [7] 刘羿男,王卫平,贾竹青,等.  $\alpha$ -硫辛酸对在 H<sub>9</sub>c2 细胞在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的氧化应激损伤中的保护作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 227-233.
- [8] 瞿永华,周威,李伟,等. 蜂胶提取物对小鼠肝脑组织 SOD、GSH-Px、MDA 影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(5): 1018-1019.
- [9] 何佳丽,周威,程清洲,等. 鄂产蜂胶的抗氧化效能研究[J]. 中国药物经济学, 2014(2): 204-205.

收稿日期: 2017-04-04; 修回日期: 2017-04-14