

• 药理与临床 •

电化学模拟制备天麻素体内氧化代谢产物及其神经保护作用研究

冯梦晗^{1,3}, 刘 洁^{1,2*}, 刘力榕^{1,3}, 黄蓓蓓^{1,3}, 李月婷^{1,3}, 贾志鑫^{1,2}, 肖红斌^{1,2*}

1. 北京中医药大学, 中药分析与转化研究中心, 北京 100029

2. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘 要: 目的 采用电化学模拟技术制备天麻素体内 I 相氧化代谢产物, 并确认其为潜在起效成分。方法 采用电化学模拟技术 (μ Prepcell 电池及 SynthesisTM 制备型电池), 优化电压、电解液、反应物浓度和体积流量等, 制备天麻素体内 I 相氧化代谢产物。构建缺氧/复氧 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导的 PC12 细胞模型, 考察天麻素及其 5 个代谢产物的神经保护作用。结果 通过优化参数, 确定薄层电化学电池 (μ Prepcell) 模拟天麻素代谢为对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲酸-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷的反应条件为: 掺硼金刚石 (borondoped diamond, BDD) 为工作电极, 最佳底物浓度为 100 μ mol/L, 最佳电解液浓度为 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9), 最佳体积流量为 50 μ L/min, 最佳电压为 1.6 V。再利用电化学合成电池 (SynthesisCell) 进行大量制备, 玻碳 (reticulated glassy carbon, RGC) 电极为工作电极, 从 240 mg 天麻素中制备得到 77 mg 对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。神经保护活性评价表明天麻素及其 5 个代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞均具有较好的保护作用 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且浓度为 50 μ mol/L 时, 与天麻素相比, 代谢产物对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲酸-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷神经保护作用相对显著 ($P < 0.05$), 存活率分别提高了 8.63%、9.42%, 细胞凋亡率分别降低了 29.27%、45.30%。Western blotting 结果表明对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲酸-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷均可显著增加 OGD/R 诱导的 PC12 细胞 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 降低 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3) 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。结论 天麻素及其代谢产物均具有神经保护作用, 首次应用电化学模拟新技术制备天麻素体内 I 相氧化代谢产物并初步阐明了其发挥神经保护作用的机制, 为阐明天麻素的起效物质奠定基础。

关键词: 天麻素; 电化学; 氧化代谢产物; 神经保护; 活性评价; 对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 对羟基苯甲酸-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0569-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.024

Preparation of oxidative metabolites of gastrodin *in vivo* by electrochemical technology and its neuroprotective effectFENG Meng-han^{1,3}, LIU Jie^{1,2}, LIU Li-rong^{1,3}, HUANG Bei-bei^{1,3}, LI Yue-ting^{1,3}, JIA Zhi-xin^{1,2}, XIAO Hong-bin^{1,2}

1. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To prepare the phase I oxidative metabolites of gastrodin *in vivo* by electrochemical technology, and then confirm the potential active components. **Methods** Electrochemical technologies (μ Prepcell and SynthesisTM cell) were used to

收稿日期: 2022-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173957); 国家自然科学基金资助项目 (81774155); 国家自然科学基金资助项目 (81803703); 中央高校基本科研基金资助项目 (2020-JYB-XJSJJ-022)

作者简介: 冯梦晗 (1999—), 女, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 18729196576 E-mail: fmh990219@163.com

*通信作者: 肖红斌, 教授, 从事中药复方药效物质及作用机制研究。Tel: (010)53911883 E-mail: hbxiao69@163.com

刘 洁, 助理研究员, 从事中药活性成分及药效物质研究。Tel: (010)53911875 E-mail: znyspa.xf@163.com

optimize the voltage, electrolyte, reactant concentration and flow rate, etc., and prepare phase I oxidation metabolites of gastrodin *in vivo*. Oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) induced PC12 cells model was constructed to investigate the neuroprotective effects of gastrodin and its five metabolites. **Results** By optimizing the parameters, μ Prepcell of electrochemical was determined to simulate the metabolism of gastrodin to *p*-hydroxybenzaldehyde-*O*- β -*D*-glucopyranoside and *p*-hydroxybenzoic acid-*O*- β -*D*-glucopyranoside. The optimized reaction conditions: Borondopeddiamond (BDD) working electrode was used as the working electrode; Optimal substrate concentration was 100 μ mol/L; Optimal concentration of electrolyte was 20 mmol/L ammonium formate water-methanol (1 : 9), optimal flow rate was 50 μ L/min, and optimal voltage was 1.6 V. Using electrochemical SynthesisCell, reticulated glassy carbon (RGC) electrode for bulk preparation, 77 mg *p*-hydroxybenzaldehyde-*O*- β -*D*-glucopyranoside was prepared from 240 mg gastrodin. The neuroprotective activity evaluation showed that gastrodin and its five metabolites had a good protective effect on OGD/R induced PC12 cells ($P < 0.05, 0.01$), and when the concentration was 50 μ mol/L, *p*-hydroxybenzaldehyde-*O*- β -*D*-glucopyranoside and *p*-hydroxybenzoic acid-*O*- β -*D*-glucopyranoside had a relatively significant neuroprotective effect ($P < 0.05$), survival rate increased by 8.63% and 9.42%, and apoptosis rate decreased by 29.27% and 45.30%, respectively. The results of Western blotting showed that *p*-hydroxybenzaldehyde-*O*- β -*D*-glucopyranoside and *p*-hydroxybenzoic acid-*O*- β -*D*-glucopyranoside could obviously increase the protein expression level of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ($P < 0.01$), and reduce the protein expression levels of Bcl-2 associated X protein (Bax) and cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3) in OGD/R induced PC12 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** For the first time, electrochemistry was used to simulate the *in-vitro* phase I oxidative metabolism of gastrodin and the mechanism of its neuroprotective effect was preliminarily elucidated. It was preliminarily found that gastrodin had neuroprotective effects, which laid a foundation for clarifying the active substances of gastrodin.

Key words: gastrodin; electrochemistry; oxidative metabolites; neuroprotection; activity evaluation; *p*-hydroxybenzaldehyde-*O*- β -*D*-glucopyranoside; *p*-hydroxybenzoic acid-*O*- β -*D*-glucopyranoside

中药进入体内的化合物是中药发挥药效的物质来源, 目前认为在体内达到一定血药浓度的原型成分及代谢产物为药效物质, 其可能通过叠加作用或协同作用共同参与发挥药效^[1-2]。天麻素是天麻的主要活性成分之一^[3], 其对帕金森^[4]、脑缺血^[5]、神经保护^[6-7]、头晕^[8]等神经系统疾病具有很好的治疗效果。研究者对天麻素体内代谢产物进行了大量研究, 发现天麻素进入血浆中的代谢产物有对羟基苯甲醇、对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷的磺基化产物、对羟基苯甲醇的磺基化产物、对羟基苯甲酸的磺基化产物、对羟基苯甲酸的甘氨酸化产物以及脱羟基、脱甲氧基的 2 个 I 相代谢产物和 2 个乙酰化氨基酸结合的 II 相代谢产物^[9-10]。Jia 等^[11]进一步采用绝对定量和半定量法研究发现血浆中天麻素及其代谢产物暴露量达峰浓度 ($C_{\max}$) 大小依次为天麻素 > 对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 > 对羟基苯甲酸 > 对羟基苯甲醇 > 对羟基苯甲醛-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 > 对羟基苯甲醛, 其中对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲酸的暴露量远高于对羟基苯甲醇, 且对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲醛-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷的暴露量高于其苷元对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛。目

前对羟基苯甲醇、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛均已报道具有一定的神经保护作用^[12-14], 然而天麻素中进入体内经 I 相氧化生成的具有较高暴露量的代谢产物对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲醛-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷是否也具有很好的神经保护作用尚不清楚。本研究首先制备得到代谢产物对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷和对羟基苯甲醛-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷, 并进一步评价确认其活性。

目前, 对于体内代谢产物的制备有化学合成法^[15]、体外生物合成法^[16]、从体内排泄物直接提取法等^[17]。近年来, 电化学系统是高效的代谢产物合成的一种新的技术工具, 其可模拟自然氧化还原反应以及结合反应^[18-20], 如 Baumann 等^[21]分别采用体内实验、体外实验、电化学-质谱 (EC-MS) 法模拟药物代谢得到化学药四氢西洋的代谢数据, 说明 EC-MS 法模拟药物代谢具有极高的一致性; Khera 等^[22]通过比较电化学和酶氧化制备他汀类药物代谢物研究发现电化学模拟方法具有较高的得率; Brauckmann 等^[23]通过使用 LC/ESI-MS 检测到顺铂及西咪替丁之间的加合物与产品其各自的电化学氧化产物; Szultka-Młyńska 等^[24]对利用 EC-MS 模拟药物/异生物质的 I 相氧化和 II 相结合代谢产物进行总结。目前该技术已广泛应用于模拟制备已上市化

学药的代谢。中药及其复方含有的化学成分繁杂,其吸收进入体内的化学成分及代谢产物亦繁杂,且代谢产物不易鉴定,因此,基于电化学技术模拟中药中的单体成分的代谢,对于阐明中药体内药效成分具有极高的应用价值。本研究利用电化学模拟技术制备天麻素体内 I 相氧化代谢产物,并评价天麻素及其体内代谢产物对缺糖缺氧/复氧(oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)诱导的 PC12 神经细胞损伤的保护作用,以期充分阐明天麻素在体内的起效物质,为研究其作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 细胞

PC12 细胞购自北京北纳生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

天麻素(批号 M11GS148059)、对羟基苯甲醛(批号 Y02J7C15574)、对羟基苯甲酸(批号 D-063-161216)购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数>98%;对羟基苯甲醇(批号 RFSD05911812016,质量分数>98%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;对羟基苯甲酸-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(质量分数>98%)由本实验室氧化合成制备所得;氯化钠(批号 20220107)、氯化钾(批号 20200103)、无水氯化钙(批号 20190822)、无水硫酸镁(批号 20200116)、碳酸氢二钠(批号 20180108)、碳酸氢钠(批号 20220215)、氢氧化钠(批号 20211224)均购自国药集团化学试剂有限公司;HEPES(批号 7365-45-9)购自美国 Amresco 公司;甲醇(批号 206403)、乙腈(批号 207296)、甲酸(批号 207034)、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,批号 20210927)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,批号 31909)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;甲酸铵(批号 L0810)、乙酸铵(批号 160267A)购自美国 Flucka analytical 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号 24117007)购自美国 Sigma 公司;不完全 RPMI 1640 培养基(含双抗,批号 20211015)购自北京百诺威生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶(含 EDTA,批号 202011229)、CCK-8 检测试剂盒(批号 K001062211)购自北京兰博利德商贸有限公司;凋亡试剂盒(批号 20210831)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;RIPA 裂解液(批号 9116)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 9232)、4%~15%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)制备试剂盒(批号 P1200)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;SDS-PAGE 电

泳缓冲液(批号 B1005)、TBST 洗膜液(批号 B1009)购自北京普利莱基因技术有限公司;PVDF 膜(批号 IPSN08132)购自美国 Merck Millipore 公司;B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 AF6285)购自碧云天生物技术有限公司;Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 bs-28034R)购自北京博奥森生物技术有限公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 E1121)购自美国 Santa 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 G1401)、488 标记的山羊抗小鼠抗体(批号 GB25301)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 仪器

1290 型超高效液相色谱仪、6550 型 Q-TOF 质谱(美国 Agilent 公司);ROXY 电化学模拟系统[μ PrepCell™、掺硼金刚石(borondoped diamond, BDD)工作电极、Pd/H₂ 参比电极, SynthesisCell™、玻碳(reticulated glassy carbon, RGC)工作电极, 美国 Antec 公司];制备型高效液相色谱, LC-100P 型泵和 LC-100UV 型检测器(大连江申分离科技有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);SQP 型十万分之一电子天平(美国 Mettler Toledo 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);5305 型真空浓缩仪(德国 Eppendorf 公司);3-18KS 型离心机(美国 Sigma 公司);NU-5810E 型 CO₂ 培养箱(美国 NuAire 公司);IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);FACS Canto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);SK-D3309-Pro LCD 数控三维摇床(大龙兴创实验仪器股份公司);Amersham Imager 680 型化学发光成像仪(美国 Cytiva 公司)。

2 方法

2.1 电化学模拟技术制备天麻素体内 I 相氧化代谢产物

2.1.1 电化学反应条件的优化

(1) 电压条件的优化:取 100 μ mol/L 天麻素 5 mL,通过注射泵输入电化学反应小室,体积流量为 50 μ L/min,在 Roxy 电化学反应监测系统离线模式下,分别设置 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 V 恒定电压,使用 μ PrepCell™进行反应,收集反应液,液质联用检测分析。

(2) 电解液优化:取 100 μ mol/L 天麻素底物溶液,以 50 μ L/min 将底物溶液输入反应小室中,电

压设为 1.6 V, 电解液为含有 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇-水 (9:1), 对溶剂甲醇和乙腈、甲酸铵和乙酸铵进行优化选择, 收集不同电解液下的氧化产物溶液, 液质联用检测分析。

(3) 体积流量优化: 其他条件不变, 体积流量选择 50、100、200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 收集反应液, 液质联用检测分析。

(4) 反应底物浓度优化: 其他条件不变, 称取适量天麻素底物溶于 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9) 溶液中, 浓度分别为 50、100、150 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 收集反应液, 液质联用检测分析。

2.1.2 电化学和质谱联用在线模拟天麻素 I 相氧化代谢产物 利用 ROXY™ 电化学系统对天麻素进行电化学氧化, 该系统装备了薄层反应池 ($\mu\text{PrepCell}$) 以及掺硼金刚石工作电极和 Pd/H_2 参比电极, 天麻素浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ [溶于 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9)], 通过 5 mL 注射泵注射到电化学反应池中, 体积流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳模拟条件, 施加 1.6 V 电压, 连接质谱, 采用 ESI-MS 对氧化产物进行检测 (干燥气温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气体积流量 11 L/min, 喷雾气压力 275.8 kPa, 鞘气温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气体积流量 12 L/min), 通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 软件在线观察天麻素 I 相氧化代谢产物的生成。

2.1.3 电化学离线模拟制备天麻素 I 相代谢产物 以 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 天麻素 [溶于 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9)]、体积流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、电压 1.6 V、氧化过程中的温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳模拟条件, 反应过程中不连接质谱, 收集反应溶液后, 进行液质分析。

Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 5% 乙腈等度洗脱 10 min; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 紫外检测器波长 220 nm; 进样量 2 μL 。质谱参数同“2.1.2”项。

2.1.4 电化学 SynthesisCell™ 制备池制备天麻素的体内 I 相氧化代谢产物

(1) 最佳反应时间考察: 电化学 SynthesisCell™ 制备池中装有 RGC 工作电极 (4.5 cm $\times$ 4.5 cm $\times$ 0.2 cm) 和参比电极 (Pd/H_2), 使用 ROXY™ 系统控制电化学电位, 底部放有磁力转子, 使转子和玻碳电极保持一定的空间距离, 将制备池放在磁力搅拌器上。量取 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 天麻素 [溶于 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9)] 80 mL 放置于制备池中,

电化学电池在氧化过程中的温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 电压设置为 1.6 V, 反应过程中用磁力搅拌器低速搅拌。在电化学反应过程中对反应时间进行考察, 分别于 5、10、15、20 min 后收集反应液, 取 1 mL 反应液经 0.22 μm 滤膜滤过, 进行液质分析。

(2) 放大制备: 称取天麻素, 用缓冲液 [20 mmol/L 甲酸铵水溶液 (pH 7.4)-甲醇 (1:9)] 配制成浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 天麻素溶液, 放置于制备池中进行反应, 收集所有反应液。

2.1.5 代谢产物分离制备 收集的所有反应液通过旋转浓缩仪浓缩, 浓缩温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 7% 乙腈溶解, 在下列条件下对该溶液进行制备: 制备型色谱柱 YMC-Pak ODS-A C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μm), 紫外波长 220 nm, 流动相为 7% 乙腈, 进样量 0.2 mL; 体积流量 8 mL/min。流出液经真空旋转浓缩仪浓缩至小体积后, 加水溶解, 冻干。

2.1.6 代谢产物结构鉴定 通过高分辨质谱 (HR ESI-MS)、核磁共振波谱 (^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR) 等方法对代谢产物进行结构鉴定。

2.2 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞的影响

2.2.1 药物的配制

(1) 天麻素及代谢产物的配制: 精密称取适量天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲酸对照品, 用 DMSO 溶解, 得各母液浓度为 10 mmol/L。

(2) 缺糖缺氧液的配制: 称取氯化钠 6.8 g、氯化钾 0.4 g、无水氯化钙 0.2 g、无水硫酸镁 0.1 g、磷酸氢二钠 0.3 g、碳酸氢钠 2.2 g、HEPES 4.8 g, 溶于 1 L 超纯水, 即得缺糖缺氧液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2 细胞 OGD/R 模型的制备、分组和给药 将培养 3~5 d 的 PC12 细胞用于建立 OGD/R 模型。细胞消化后按 1.5×10^5 个/孔接种于 96 孔板中培养 24 h。给药组和模型组加入缺糖缺氧液, 放入缺氧小室后通入混合气体 (1% O_2 、5% CO_2 、94% N_2) 缺糖缺氧 6 h。之后模型组更换为完全培养基, 给药组分别加入 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 天麻素及其代谢产物。模型组和给药组在恒温培养箱中复糖复氧 24 h; 空白组为不含细胞的空白培养基, 对照组细胞加入含 0.5% DMSO 的培养基, 在恒温培养箱中培养 24 h。

2.2.3 细胞存活率检测 各组每孔分别加入 CCK-8 溶液孵育 2 h, 空白孔为空白培养基, 450 nm 波长

下测定吸光度 (A), 计算细胞存活率。每组平行 6 个复孔, 实验重复 3 次。

细胞存活率 = $(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

2.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 按“2.2.2”项下方法进行分组、造模, 分别加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 天麻素及其代谢产物, 取上清液, 600 $\times g$ 离心 5 min, 收集沉淀, 用胰酶消化后于 400 $\times g$ 离心 5 min, 收集细胞。加入 100 μL binding buffer 缓冲液重悬细胞, 再分别加入 5 μL 硫氰酸荧光素标记磷脂结合蛋白 (Annexin V-FITC) 与 5 μL 碘化丙啶 (PI) 混匀, 避光孵育 15 min, 应用 FACS Canto II 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

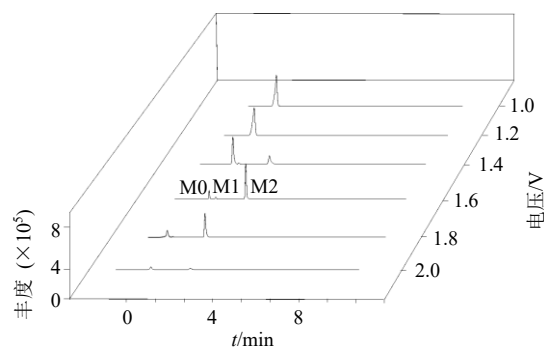
2.2.5 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达 按“2.2.2”项下方法进行分组、造模, 分别加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷后, 收集细胞, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取并定量蛋白, 加热使蛋白变性。取蛋白样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 室温孵育一抗、二抗。以 β -tubulin 作为内参, ECL 试剂检测免疫反应蛋白, Chemi-Doc XRS+曝光, Image LabTM 分析化学发光强度, 各蛋白与内参的比值进行半定量分析。

2.2.6 统计分析 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立检验。

3 结果

3.1 电化学系统制备天麻素体内 I 相代谢产物

3.1.1 电化学反应条件优化 通过施加不同恒定电压, 收集反应液, 液质联用分析, 结果见图 1。在 1.4 V 时氧化产物已有形成, 1.6 V 时氧化产物大量生成, 天麻素含量急剧下降, 电压达到 2.0 V 时, 天麻素和氧化产物色谱峰均趋于消失, 这可能是由于高



M0-天麻素 M1-对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷 M2-对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷, 图 2、3 同

M0-gastrodin M1- p -hydroxybenzoic acid- O - β -D-glucopyranoside M2- p -hydroxybenzaldehyde- O - β -D-glucopyranoside, same as fig. 2, 3

图 1 不同电压下氧化产物 EIC 图

Fig. 1 EIC diagram of oxidation products under different voltages

电压下天麻素及其氧化产物会被氧化为 CO_2 和 H_2O 。

同此, 确定最佳浓度电解液为 20 mmol/L 甲酸铵水溶液-甲醇 (1:9), 最佳体积流量为 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, 最佳底物浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.1.2 电化学 $\mu\text{PrepCell}^{\text{TM}}$ 模拟系统在线和离线模拟制备代谢产物 电化学模拟系统和质谱联用分别在线和离线模拟生成天麻素体内代谢产物。在线系统中, 天麻素的 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 在电池关闭状态 (图 2-A) 下被检测到, 当电化学仪器连接到质谱并施加 1.6 V 电压时, $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 离子丰度下降。在电池开启模式下获得的质谱离子图 (图 2-B) 显示氧化产物的产生, M1 为 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 经质谱裂解碎片初步分析确定为对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷; M2 为 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, 经质谱裂解碎片分析确定天麻素在体内转化的代谢产物为对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷。

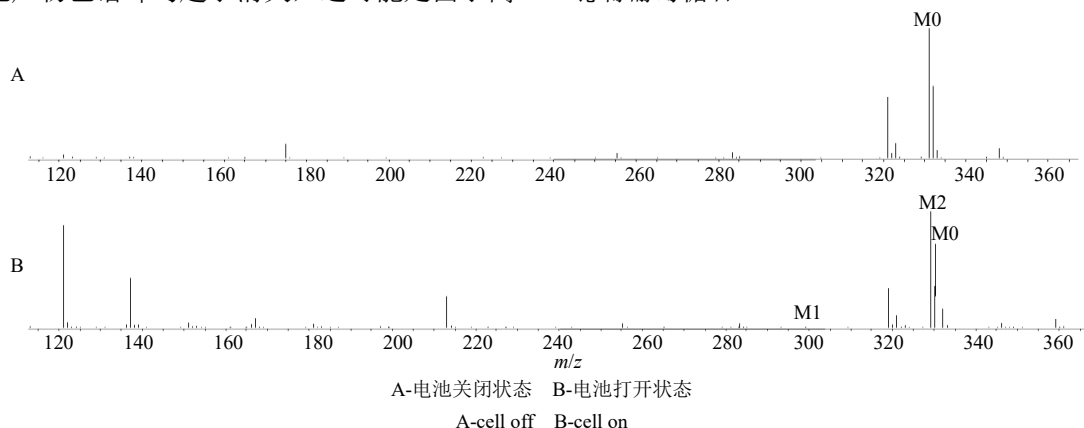


图 2 EC-MS 在线检测天麻素代谢产物的生成

Fig. 2 EC-MS online system detect metabolites of gastrodin

3.1.3 LC-MS 检测电化学系统离线模拟制备得到的反应液 收集电化学系统离线模拟制备得到的天麻素反应液, 进行 LC-MS 分析, 利用氧化产物的碎片离子进行定性鉴定, 得到了 **M1** 和 **M2** 2 种代谢产物, 见图 3。

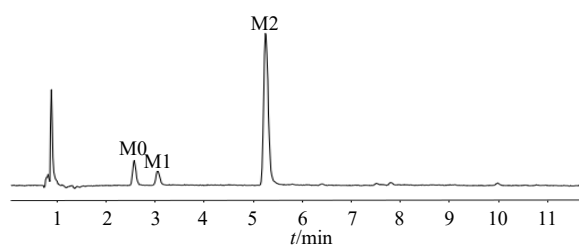


图 3 LC-MS 离线检测天麻素代谢产物的生成

Fig. 3 LC-MS offline system detect metabolites of gastrodin

3.1.4 电化学 SynthesisCell™ 制备天麻素的体内 I 相氧化代谢产物 利用电化学 SynthesisCell™ 制备型电极对其天麻素的 I 相氧化代谢产物进行大量制备, 通过对反应时间考察发现, 反应 20 min 时氧化代谢产物转化率最大。因此, 称取 240 mg 天麻素, 使其浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 分多次放置于制备池中进行反应, 每次反应 20 min 后停止, 收集得到所有反应液。

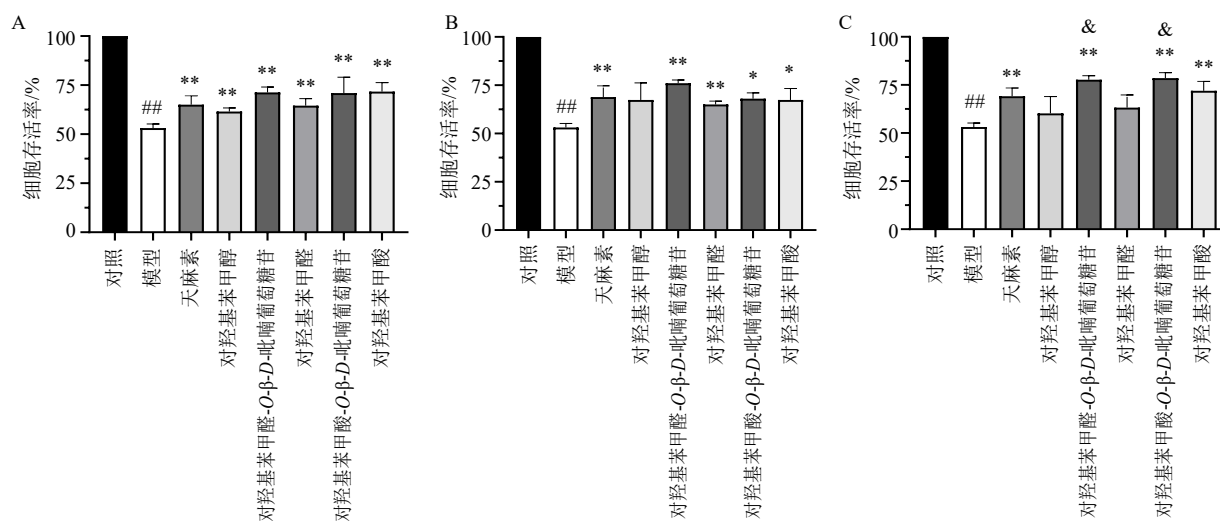
3.1.5 代谢产物分离及鉴定 经分离制备得到代谢产物, 制备液经真空旋转浓缩仪浓缩至干, 加水溶解, 冷冻干燥, 得到代谢产物对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (77 mg)。

其结构鉴定如下: 白色粉末, HR ESI-MS m/z

$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 329.0869, 推断其相对分子质量为 284, 计算得分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_7$, 其偏差为 2.36×10^{-6} 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ : 9.78 (1H, s, CHO), 7.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 7.26 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 5.08 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, glu-H1), 3.61~3.62 (2H, m, glu-H2, 5), 3.67 (1H, m, glu-H3), 3.52 (1H, m, glu-H4), 3.72 (1H, dd, $J = 12.3, 5.6$ Hz, glu-H6a), 3.92 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, glu-H6b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ : 192.90 (CHO), 132.849 (C-1), 132.578 (C-2, 6), 117.2 (C-3, 5), 164.0 (C-4), 101.5 (glu-C-1), 74.77 (glu-C-2), 78.3 (glu-C-3), 71.2 (glu-C-4), 77.9 (glu-C-5), 62.4 (glu-C-6)。以上数据与文献报道^[25]对照, 鉴定该化合物为对羟基苯甲醛-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

3.2 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞的影响

3.2.1 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 如图 4 所示, 经缺氧处理后, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), 表明 OGD/R 损伤 PC12 细胞造模成功。与模型组比较, 天麻素 (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞存活率均显著升高 ($P < 0.01$); 当天麻素的 5 个代谢产物作用于损伤的 PC12 细胞后, 除 25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的对羟基苯甲醇和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的对羟基苯甲醛外, 其他浓度的代谢产物均可显著提高细胞的存活率 ($P < 0.05$ 、0.01)。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与天麻素组比较: & $P < 0.05$, 下图同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ vs gastrodin group, same as below figures

图 4 12.5 (A)、25.0 (B)、50.0 (C) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of 12.5 (A), 25.0 (B), 50.0 (C) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gastrodin and its metabolites on survival rate of OGD/R induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.2 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 如图 5 所示,与对照组比较,模型组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.2.3 对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 如

图 6 所示,与对照组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$),Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$),Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷组 Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

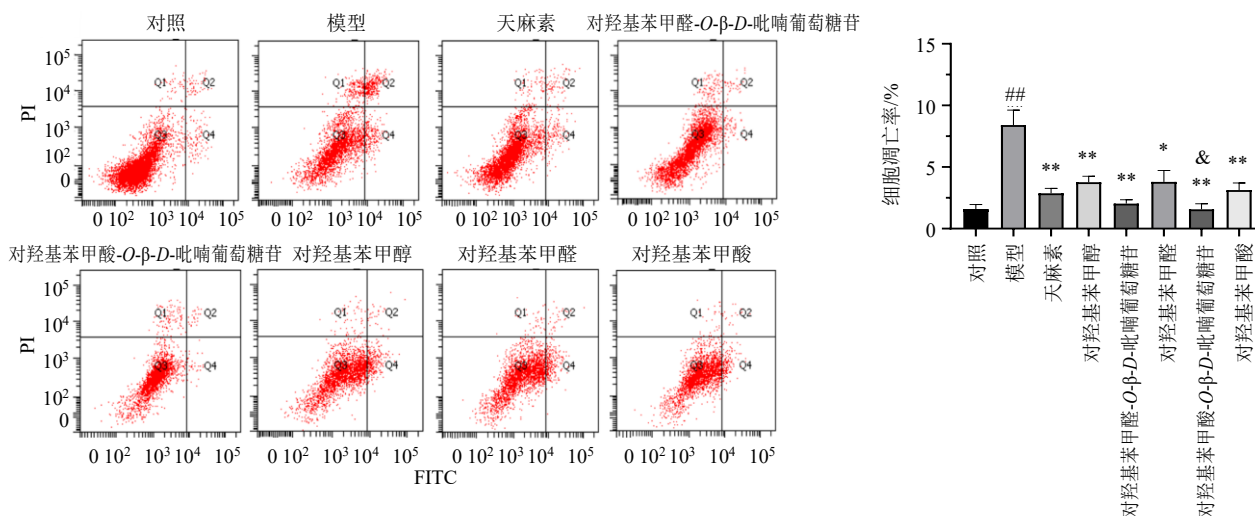


图 5 天麻素及其代谢产物对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of gastrodin and its metabolites on apoptosis of OGD/R induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

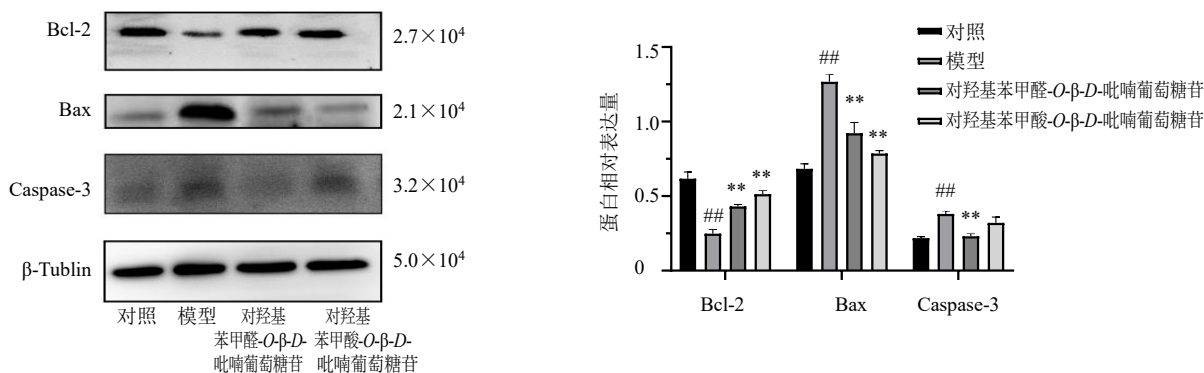


图 6 对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of *p*-hydroxybenzaldehyde- O - β -D-glucopyranoside and *p*-hydroxybenzoic acid- O - β -D-glucopyranoside on expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in OGD/R induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

4.1 代谢产物制备方法比较

目前用于体内代谢产物制备的方法有从生物样品中分离、微生物转化法、化学结构修饰法、植物组织培养法、从原植物中分离。然而生物样品富集过程比较复杂,代谢产物分离难度大(内源性干扰多),产率低,且需要较多的实验动物;微生物转化需要筛选可转化得代谢产物的菌种,该操作耗时长,

操作复杂,且需在已确定代谢产物结构的基础上进行;化学结构修饰法需在代谢产物结构确定的基础上进行合成,某些合成反应复杂,且产率低;植物组织培养法需根据文献筛选可转化得代谢产物的植物,操作周期长,且获得代谢产物种类有限,无法充分模拟体内代谢;从原植物中分离获取代谢产物,往往数量有限,且操作繁琐、复杂,产率低。

电化学反应作为一种新兴技术手段,可以提供

快速、可靠且详细的药物可能的代谢产物,很好地弥补药物体内代谢研究的不足。对于氧化反应,通过在反应电极的正负极之间施加电压,在电极表面形成氧自由基,当反应底物流经反应池时,氧自由基会攻击底物的不饱和基团,将底物氧化^[26]。通过优化电极、电解液、电压等条件最终可选择性地制备代谢产物。而在线观测电化学氧化可以观察得到氧化反应过程中的中间代谢产物,为药物的药效研究提供依据。电化学反应的机制为通过施加电压,在电极表面形成氧自由基,从而模拟体内的各种代谢反应。本课题组前期也采用电化学模拟技术制备得到藁本内酯的体内关键 I 相代谢产物环氧藁本内酯^[27]。

本研究中采用电化学系统中 μ Prepcell 电池的 BDD 电极实现了在线和离线模拟制备天麻素的 2 个体内 I 相代谢产物,然而由于尚未购得制备型的 BDD 电极,故采用制备型玻碳电极制备时仅制备得到了 1 个体内 I 相代谢产物(对羟基苯甲醛- O - β -D-葡萄糖苷),说明电化学模拟系统中不同电极其氧化能力不同,所生成的产物也有所差别。此外,本研究采用 μ Prepcell 电池制备时,反应体系太小,故暂未能大量获得天麻素的 2 个体内 I 相代谢产物;采用制备型玻碳电极制备时,由于制备池容量限制,故 240 mg 天麻素分多次制备得到 77 mg 产物 1,制备条件均为在 1.6 V 电压下,100 μ mol/L 天麻素溶液于 80 mL 反应池中反应 20 min,不需要其他氧化剂。表明电化学制备代谢产物时,制备型电极反应时间短,而 μ Prepcell 电池反应时间较长,反应方法简单,但若获取大量产物,则需多次制备。

4.2 天麻素及其体内代谢产物神经保护作用比较

细胞存活率结果表明天麻素及其代谢产物对 OGD/R 损伤细胞均具有一定程度的保护作用。且当浓度为 50 μ mol/L 时,与天麻素相比,对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷对于损伤后的细胞具有更为明显的保护作用,存活率分别提高了 8.63%、9.42%;且给予对羟基苯甲醛及对羟基苯甲酸后的 PC12 细胞也具有更高的存活率,较于对羟基苯甲醇,提高了 3.01%、11.75%。

PC12 细胞缺糖缺氧后,早期凋亡率和晚期凋亡率显著增加,正常细胞减少。给予 50 μ mol/L 的天麻素和代谢产物后,早期凋亡率和晚期凋亡率均有所降低。与天麻素相比,对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃

葡萄糖苷能显著降低 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡率,降低了 45.30%,对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷较天麻素作用于 OGD/R 诱导的 PC12 细胞后,其凋亡率下降了 29.27%。

4.3 对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷神经保护作用

细胞凋亡途径包括线粒体途径、死亡受体途径及内质网应激途径^[28]。Bcl-2 蛋白家族(主要包括促凋亡因子 Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2)通过调节线粒体通透性从而调节细胞凋亡。正常生理条件下,Bax 和 Bcl-2 处于平衡状态;在缺糖缺氧条件下,诱导破坏 Bax 和 Bcl-2 的平衡,导致 Bax 表达量增加,Bcl-2 表达量减少,线粒体膜的通透性增加,细胞色素 C 进一步释放激活主要的凋亡执行蛋白 Caspase-3,最终引起细胞凋亡^[29]。

通过进一步的流式细胞术及 Western blotting 实验检测细胞凋亡情况,本研究发现天麻素体内代谢产物对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷均可显著减少 PC12 细胞凋亡进而保护神经细胞,其机制是通过升高 Bcl-2 的表达水平,降低 Bax 及 caspase-3 的表达水平发挥作用。

此外,已有学者研究发现天麻素可通过降低细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 的磷酸化状态及抑制 Caspase-3 表达减少神经细胞凋亡^[30];对羟基苯甲醇也通过增加 Bcl-2 的表达和抑制 Caspase-3 的活化抑制细胞凋亡从而保护神经细胞^[31];对羟基苯甲醛通过下调 Caspase-3 及 Bax 蛋白的表达抑制神经细胞凋亡发挥对脑缺血再灌注大鼠的保护作用^[32];对羟基苯甲酸可通过减少氧化应激抑制神经细胞凋亡^[33]。而对羟基苯甲醛- O - β -D-吡喃葡萄糖苷及对羟基苯甲酸- O - β -D-吡喃葡萄糖苷这 2 个代谢产物也通过抑制 Bax/Bcl-2/Caspase-3 线粒体凋亡途径发挥神经保护作用,这与天麻素在抑制细胞凋亡发挥神经保护作用方面的药理机制一致。

本研究首次采用电化学模拟法制备了天麻素体内 I 相代谢产物,并发现其对于 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活率、凋亡抑制率均有一定程度的提升,提示其在体内可能与天麻素共同发挥对神经系统的保护作用,且可能通过抑制 Bax/Bcl-2/caspase-3 线粒体凋亡途径发挥神经保护作用。本研究为今后天麻药效物质基础研究提供了重要的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐风, 杨东辉, 尚明英, 等. 中药药效物质的“显效形式”、“叠加作用”和“毒性分散效应”: 由中药体内代谢研究引发的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 688-703.
- [2] 蔡少青, 王璇, 尚明英, 等. 中药“显效理论”或有助于阐释并弘扬中药特色优势 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3435-3443.
- [3] 徐德宏, 崔培梧, 罗怀浩, 等. 天麻素生物合成的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5877-5883.
- [4] Wang X L, Xing G H, Hong B, *et al.* Gastrodin prevents motor deficits and oxidative stress in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2014, 114(2): 77-85.
- [5] Wu F, Li H B, Zhao J, *et al.* Effect of electroacupuncture intervention combined with gastrodin administration on neurological function, nogo-A and NgR expression in the frontal lobe cortex of focal cerebral ischemia rats [J]. *Acupunct Res*, 2016, 41(1): 65-69.
- [6] Song C W, Fang S Q, Lv G, *et al.* Gastrodin promotes the secretion of brain-derived neurotrophic factor in the injured spinal cord [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(15): 1383-1389.
- [7] 周红平, 张三妮, 曹栋, 等. 天麻素对帕金森病小鼠多巴胺能神经元的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(6): 1069-1075.
- [8] 蒋时习. 针刺配合穴位注射天麻素治疗眩晕 87 例 [J]. 中国针灸, 2013, 33(6): 538.
- [9] Lin L C, Chen Y F, Lee W C, *et al.* Pharmacokinetics of gastrodin and its metabolite *p*-hydroxybenzyl alcohol in rat blood, brain and bile by microdialysis coupled to LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 909-917.
- [10] 柳立新, 单锋, 季婷婷, 等. 天麻的主要成分及体内代谢机制研究进展 [J]. 北方药学, 2019, 16(8): 134-135.
- [11] Jia Y W, Shen J, Li X, *et al.* Identification and analysis of gastrodin and its five metabolites using ultra fast liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to investigate influence of multiple-dose and food [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1358: 110-116.
- [12] 孙晓芳, 王巍, 王丹巧, 等. 天麻及其制剂神经保护机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 292-295.
- [13] 张成宸, 石京山. 天麻的酚类成分及其中枢神经药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 167-174.
- [14] 周晓楠, 宋雪兰, 李艳, 等. 对羟基苯甲醛对脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(12): 1729-1735.
- [15] Portychová L, Schug K A. Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 993: 1-21.
- [16] 杨华, 徐镇平, 何梦婷, 等. 芒果苷代谢产物的合成及黄嘌呤氧化酶抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(8): 1352-1356.
- [17] 郑金铠, 赵成英, 田桂芳, 等. 一种粪便中脂溶性代谢产物的提取分离方法: 中国, CN106370500B [P]. 2019-11-22.
- [18] Gutmann A, Wesenberg L J, Peez N, *et al.* Charged tags for the identification of oxidative drug metabolites based on electrochemistry and mass spectrometry [J]. *ChemistryOpen*, 2020, 9(5): 568-572.
- [19] Portychová L, Schug K A. Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 993: 1-21.
- [20] Abbott A, Aldous L, Borisenko N, *et al.* Electrochemistry: General discussion [J]. *Faraday Discuss*, 2018, 206: 405-426.
- [21] Baumann A, Lohmann W, Schubert B, *et al.* Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to *in vivo* and *in vitro* methods [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(15): 3192-3198.
- [22] Khera S, Hu N. Generation of statin drug metabolites through electrochemical and enzymatic oxidations [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(18): 6009-6018.
- [23] Brauckmann C, Faber H, Lanvers-Kaminsky C, *et al.* Influence of cimetidine and its metabolites on cisplatin: Investigation of adduct formation by means of electrochemistry/liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1279: 49-57.
- [24] Szultka-Młyńska M, Bajkacz S, Baranowska I, *et al.* Structural characterization of electrochemically and *in vivo* generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach [J]. *Talanta*, 2018, 176: 262-276.
- [25] 王莉, 肖红斌, 梁鑫淼. 天麻化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1186-1189.
- [26] Jurva U, Wikström H V, Weidolf L, *et al.* Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(8): 800-810.
- [27] Duan F P, Xu W J, Liu J, *et al.* Preparing the key metabolite

- of Z-ligustilide *in vivo* by a specific electrochemical reaction [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(13): 2799-2807.
- [28] Zhou A F, Zhu K, Pu P M, *et al.* Neuroprotective effect and possible mechanisms of ginsenoside-Rd for cerebral ischemia/reperfusion damage in experimental animal: A meta-analysis and systematic review [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7650438.
- [29] Chen B, Zhao J J, Zhang R, *et al.* Neuroprotective effects of natural compounds on neurotoxin-induced oxidative stress and cell apoptosis [J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25(5): 1078-1099.
- [30] 武海云, 蒋根灵, 李庆林. 天麻素通过抑制细胞凋亡保护谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(12): 1361-1367.
- [31] Yu S S, Zhao J, Zheng W P, *et al.* Neuroprotective effect of 4-hydroxybenzyl alcohol against transient focal cerebral ischemia via anti-apoptosis in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1308: 167-175.
- [32] Cai S X, Yang H, Wen B B, *et al.* Inhibition by microbial metabolites of Chinese dark tea of age-related neurodegenerative disorders in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(10): 5455-5462.
- [33] Orrenius S. Receive oxygen species in mitochondria-mediated cell death [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(2/3): 443.

[责任编辑 李亚楠]