天麻中脑线粒体靶向化合物的获取及其神经保护活性研究Δ

余星霖*，杨丽萍，陈　普，段小花#（云南中医药大学云南省傣医药与彝医药重点实验室，昆明　650500）

中图分类号　R917；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）22-2700-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.22.03

摘　要　目的　从天麻中获取脑线粒体靶向化合物，并对获取的化合物进行神经保护活性研究。**方法**　提取大鼠脑组织中线粒体，通过健那绿和中性红染色评估线粒体的纯度，并通过检测线粒体膜电位（MMP）评估纯化线粒体的活性。以纯化线粒体为对照组、失活的纯化线粒体为实验组，测定并计算对照组和实验组的峰面积之差与对照组峰面积的比值（Δ*P*），来验证线粒体靶向化合物获取方法的可行性。通过超滤离心-高效液相色谱（HPLC）法获取天麻中脑线粒体靶向化合物并进行指认，检测其对离体线粒体活性的影响。进一步针对活性较高的化合物，采用缺氧缺糖/复氧（OGD/R）损伤HT22细胞研究其神经保护活性。**结果**　提取所得的脑线粒体纯度高，具有活性。可行性验证结果显示，超滤离心-HPLC法具有识别分离功能，可用于获取具有线粒体靶向功能的化合物。从天麻中获取了2个脑线粒体靶向化合物（对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛），两者均可提高离体线粒体活性，其中对羟基苯甲醇活性更高。细胞实验结果显示，对羟基苯甲醇以给药浓度25、50、100 μmol/L预处理，对HT22细胞存活率影响较小。与模型组相比，对羟基苯甲醇处理可降低OGD/R损伤细胞死亡率，改善模型细胞形态，提高模型细胞ATP、MMP水平，降低模型细胞中乳酸脱氢酶、活性氧水平与线粒体通透性转换孔开放程度，大部分差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。**结论**　从天麻中获取2个脑线粒体靶向化合物（对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛），其中对羟基苯甲醇对OGD/R诱导的神经细胞损伤有明显的保护作用，可能是通过线粒体靶向治疗发挥神经保护作用。

关键词　天麻；脑线粒体；超滤离心；高效液相色谱；靶向治疗；神经保护

Acquisition of brain mitochondria targeting compounds in *Gastrodia elata* and study on their neuroprotective activities

YU Xinglin, YANG Liping, CHEN Pu, DUAN Xiaohua (Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To obtain mitochondria targeting compounds from *Gastrodia elata*, and to study the neuroprotective activities of these compounds. **METHODS** The mitochondria was extracted from cerebral tissue of rats. The purity of mitochondria was evaluated with Janus green staining and neutral red staining. The activity of purified mitochondria was evaluated. The purified mitochondria was included in the control group, and the inactivated mitochondria was included in the experimental group. The ratio of the difference between the peak areas of the control group and the experimental group to the peak areas of control group (Δ*P*) was determined and calculated to verify the feasibility of the method for obtaining the mitochondria targeting compounds. The mitochondria targeting compounds from *G. elata* were obtained by ultrafiltration centrifugation-high performance liquid chromatography (HPLC) and identified, and the effects of the compounds on the acitivities of mitochondria were also detected. The neuroprotective activities of the compounds with better activities were studied with hypoxia glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) damaged HT22 cells. **RESULTS** The extracted mitochondria possessed high purity and activity. Results of feasibility validation showed that ultrafiltration centrifugation-HPLC method had recognition and separation function, and could be used to obtain compounds with mitochondria targeting function. Two mitochondria targeting compounds (*p*-hydroxybenzyl alcohol and *p*-hydroxybenzaldehyde) were obtained from *G. elata*; these 2 compounds could improve the activities of mitochondria *in vitro*, and *p*-hydroxybenzyl alcohol had higher activity. Results of cell experiment showed that pretreatment with *p*-hydroxybenzyl alcohol (25, 50, 100 μmol/L) had little effect on the survival rate of HT22 cells. Compared with the model group, *p*-hydroxybenzyl alcohol could reduce cell mortality of OGD/R damaged cells, improve cell morphology, increase the levels of ATP and MMP, and reduced LDH and ROS levels and MPTP openness; most of the differences were statistically significant (*P*＜0.05). **CONCLUSIONS** Two brain mitochondria targeting compounds (*p*-hydroxybenzyl alcohol and *p*-hydroxybenzaldehyde) are obtained from *G. elata*, among which *p*-hydroxybenzyl alcohol has a significant protective

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81960733）；云南省科技计划项目（No.2019FB120）

＊ **第一作者** 硕士研究生。研究方向：民族药学。E-mail：2515840573@qq.com

通信作者 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：药理学。E-mail：1047896527@qq.com

effect against OGD/R-induced neuronal injury, possibly through mitochondria targeting therapy.
KEYWORDS *Gastrodia elata*; brain mitochondria; ultrafil-tration centrifutgation; HPLC; targeted therapy; neuroprotec-tion

线粒体在维持大脑活动中发挥着重要作用，不仅是神经细胞的主要能量来源，还参与神经细胞凋亡、产生活性氧（reactive oxygen species，ROS）、调节能量代谢和维持钙平衡等生理调节[1]。线粒体功能障碍会导致许多神经类疾病，如：脑缺血再灌注损伤、阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病等[2]。因此，针对线粒体功能障碍，防止线粒体损伤对治疗神经类疾病具有重要意义。

近年来，从中药中获取具有线粒体靶向功能的活性成分已成为研究热点[3]。天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎，具有抗氧化应激、抗衰老、改善记忆障碍、抗抑郁等药理作用，用于治疗帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫、抑郁症、脑缺血损伤等疾病[4]。目前，在天麻中发现了近百种化合物，包括酚类（如天麻素、对羟基苯甲醇）、有机酸类（如巴利森苷）、甾体类（如β-谷甾醇）等[5]。实验研究表明，天麻素、巴利森苷等可发挥抗氧应激、抑制细胞凋亡、保护神经细胞的作用[6]。然而，对天麻改善线粒体功能的活性成分尚未确定，这严重限制了其神经保护机制的进一步研究。

近年来，有研究者基于超滤离心和高效液相色谱（HPLC）-质谱联用的方法获取靶向肝脏、心脏中线粒体的中药活性成分，并通过药理实验证明所获取成分具有活性作用[7－8]，这是从复杂成分中高效获取线粒体靶向化合物的有效方法。基于天麻中主要成分已基本被鉴定，本课题组利用超滤离心选择性分离与脑线粒体结合的天麻成分，并采用HPLC法分析鉴定；最后，通过缺氧缺糖/复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R）细胞实验研究所得化合物的神经保护活性。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有DMi1型倒置生物显微镜（上海徕卡仪器有限公司）、FD-1A-50型冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）、VariosKan型全波长扫描式多功能酶标仪[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]、1260型HPLC仪（美国Agilent公司）、ST60-4型微孔板恒温振荡器（杭州米欧仪器有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

天麻粉由云南省傣医药与彝医药重点实验室提供，经云南省傣医药与彝医药重点实验室尹子丽副教授鉴定为兰科植物天麻 *G. elata* Bl. 的干燥块茎粉末。对照品对羟基苯甲醇（*p*-hydroxybenzyl alcohol，HBA）、对羟基苯甲醛（*p*-hydroxybenzaldehyde，HBD）、尼莫地平、阿莫西林（批号分别为AF21030253、AF20062752、AF21052851、AF21052807）均购自成都埃法生物科技有限公司，纯度均不小于98%；阿司匹林对照品（批号A8830，纯度≥98%）、依达拉奉对照品（批号IE0020，纯度≥98%）、噻唑蓝（MTT）（批号823L051）、线粒体提取试剂盒（批号SM0020）均购自北京索莱宝科技有限公司；中性红（批号DS300-2）购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；健那绿（批号S19083-5g）购自上海源叶生物科技有限公司；线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）检测试剂盒JC-1（批号BL711A）、ROS检测试剂盒（批号S0033S）、线粒体通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore，MPTP）检测试剂盒（批号C2009S）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（批号C0016）均购自上海碧云天生物技术有限公司；腺苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）含量测试盒（批号A095-2-1）购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物和细胞株

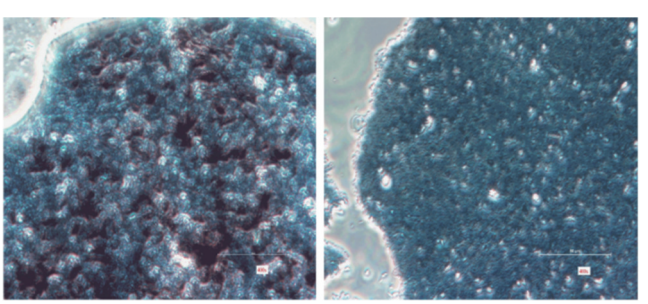
20只SPF级雄性SD大鼠，体质量为250～280 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号SCXK（湘）2019-0004。所有涉及动物的程序均符合《医学实验动物管理实施细则》的要求，伦理审查编号为R-062021088。HT22海马神经元细胞购自上海酶研生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 大鼠脑组织中线粒体的提取及其纯度、活性评估

2.1.1 线粒体的提取 脱颈处死SD大鼠，快速取出大脑，置于预冷的生理盐水中（手术均于冰上进行）。根据线粒体提取试剂盒说明书提取脑线粒体，得纯化线粒体。

2.1.2 线粒体纯度评估 将纯化线粒体与非纯化线粒体（未经线粒体提取试剂盒中Wash Buffer处理的线粒体，含有其他细胞组织）分别悬浮于200 μL磷酸盐缓冲溶液中，并加入0.3%健那绿溶液（线粒体专属染料）和0.15%中性红溶液（溶酶体、高尔基体染色）各100 μL混合。在室温下培养10 min后，置于显微镜下观察[7]。结果显示，非纯化线粒体中可见大量的杂色，纯化线粒体则为单一的蓝绿色，表明经提取的线粒体纯度高（图1）。



A.非纯化线粒体　　B.纯化线粒体

图1 非纯化线粒体、纯化线粒体的健那绿和中性红染色图（×400）

2.1.3　线粒体活性评估　将实验分为对照组和羰基氰化物间氯苯腙（carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone，CCCP）处理组（CCCP可诱导膜电位下降），每组设置4个平行。每组取200 μL纯化线粒体悬浮液（1 mg/mL，磷酸盐缓冲溶液配制，下同），对照组用常规细胞培养液处理，CCCP处理组用含CCCP的细胞培养液（1∶1 000）处理，根据MMP检测试剂盒JC-1说明书检测线粒体活性。采用全波长扫描式多功能酶标仪在激发波长为525 nm、发射波长为590 nm时测定荧光值，荧光值越大，MMP越高。实验数据使用Graphpad Prism 9.0软件进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用t检验，检验水准$\alpha=0.05$。结果显示，与对照组荧光值（154.90±4.05）相比，CCCP处理组荧光值（80.10±4.04）显著降低（$P<0.05$），表明纯化线粒体具有活性。

2.2　天麻中脑线粒体靶向化合物的获取方法可行性验证

采用超滤离心-HPLC法进行测定。以纯化线粒体为对照组；取纯化线粒体在沸水中持续加热2 h，产生失去主要生物学功能的失活线粒体，将其作为实验组。

2.2.1　溶液的制备　（1）混合标准溶液：参考文献[7]，采用二甲基亚砜制备阿司匹林、尼莫地平、阿莫西林质量浓度均为2 mg/mL的混合标准溶液。（2）尼莫地平标准溶液：采用二甲基亚砜制备尼莫地平质量浓度为2 mg/mL的标准溶液。（3）实验组混合标准溶液：精密吸取5 μL混合标准溶液与200 μL失活线粒体悬浮液（1 mg/mL，磷酸盐缓冲溶液配制，下同），在37 ℃条件下孵育60 min（化合物与线粒体特异性结合）；孵育后置于0.5 mL 10 kDa超滤管中，在4 ℃下以14 000 r/min离心25 min（去除未结合成分）后用乙酸铵缓冲液（50 mmol/L，pH7.5）冲洗3次，每次200 μL（清洗未结合成分）；于超滤管中加入400 μL 80%甲醇超声（频率500 W，功率40 kHz，下同）20 min后，在室温下以14 000 r/min离心25 min（分离结合成分），即得超滤液。将超滤液置于氮气气流下干燥，用100 μL 80%甲醇溶解后即得实验组混合标准溶液[7]。（4）对照组混合标准溶液：精密吸取5 μL混合标准溶液与200 μL纯化线粒体悬浮液，按“2.2.1（3）”项下方法制备，即得。（5）实验组尼莫地平标准溶液：精密吸取5 μL尼莫地平标准溶液与200 μL失活线粒体悬浮液，按“2.2.1（3）”项下方法制备，即得。（6）对照组尼莫地平标准溶液：精密吸取5 μL尼莫地平标准溶液与200 μL纯化线粒体悬浮液，按“2.2.1（3）”项下方法制备，即得。（7）尼莫地平对照品溶液：采用80%甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的尼莫地平对照品溶液。

2.2.2　色谱条件　以Agilent SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱；水（A）-乙腈（B）为流动相，梯度洗脱程序见表1；柱温为30 ℃；检测波长为230 nm；流速为1 mL/min；进样量为10 μL。

表1　流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	时间/min	A/%	B/%
0	0	100	15	100	0
12	100	0	18	0	100

2.2.3　实验验证　取“2.2.1（3）～（7）”项下溶液，按“2.2.2”项下色谱条件进样分析。当对照组和实验组的峰面积之差与对照组峰面积的比值（ΔP）>20%时，表明成分与线粒体能特异性结合[7]。ΔP值计算公式如下：$\Delta P=(P_e-P_c)/P_c\times100\%$，其中$P_e$、$P_c$分别代表对照组、实验组的峰面积。由图2可知，与实验组混合标准溶液相比，对照组混合标准溶液中尼莫地平峰面积有明显增加，ΔP为（34.11±1.10）%（>20%），而阿司匹林和阿莫西林均未能被检测出（$\Delta P<20\%$）。此外，结果显示，与实验组尼莫地平标准溶液相比，对照组尼莫地平标准溶液中尼莫地平峰面积有明显增加，ΔP为（43.41±6.06）%（>20%）。有研究表明，阿莫西林和阿司匹林不与线粒体结合[9—10]，尼莫地平可与线粒体特异性结合[11]。因此，上述结果表明超滤离心-HPLC法具有识别分离功能，可用于获取具有线粒体靶向功能的化合物。

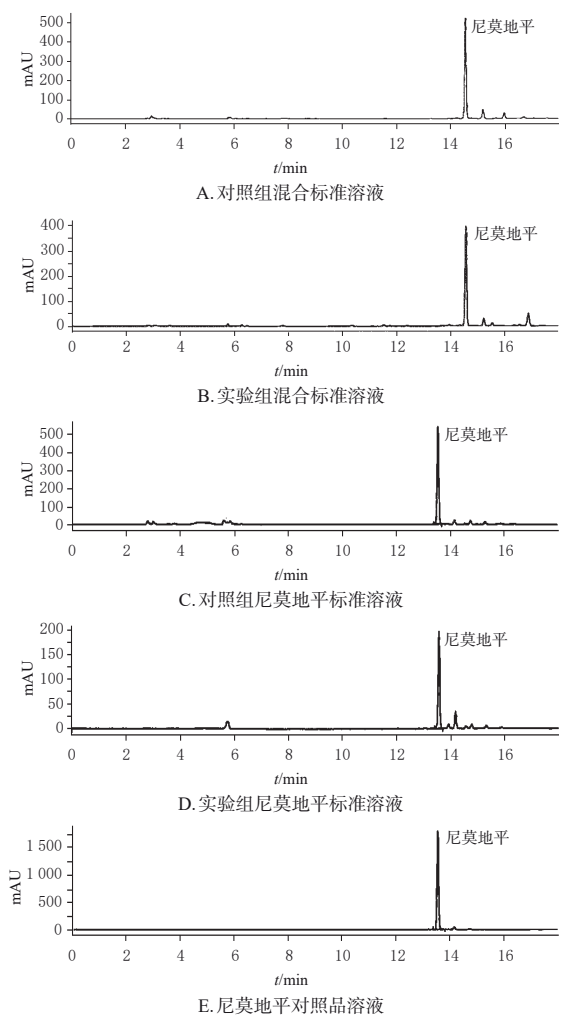


图2　天麻中脑线粒体靶向化合物的获取方法实验验证HPLC图

2.3 天麻中脑线粒体靶向化合物的获取

2.3.1 天麻冻干粉的制备 将50 g天麻粉浸入500 mL 70%甲醇中30 min后，超声提取60 min，过滤提取液；残余物加入400 mL 70%甲醇超声提取60 min，过滤提取液。将2次过滤的提取液通过旋转蒸发器在45 ℃下减压浓缩，浓缩物用冷冻干燥机冻干，即得天麻冻干粉，于室温下储存在干燥器中备用。

2.3.2 单因素实验筛选化合物获取的最佳条件 参考“2.2”项下实验分组和“2.2.1(3)”项下对照组混合标准溶液制备的方法，以天麻冻干粉的3个质量浓度(150、300、600 g/L)标准溶液，孵育时间为60 min进行操作，按“2.2.2”项下色谱条件进样分析，每组平行测定3次，考察标准溶液的最佳浓度。结果显示，质量浓度为300、600 g/L时，天麻提取物有4个峰ΔP>20%，但质量浓度为600 g/L时与线粒体结合的成分含量更高(表2)。进一步以该质量浓度为标准溶液对孵育时间(30、60、90 min)进行检测，考察标准溶液的最佳孵育时间。结果显示，孵育时间为60 min时，孵育效果最好，有4个峰ΔP>20%(表2)。天麻中线粒体靶向化合物获取的最佳条件为：天麻冻干粉质量浓度600 g/L，孵育时间60 min。

表2 不同质量浓度、不同孵育时间下天麻中成分与线粒体结合效果(n=3)

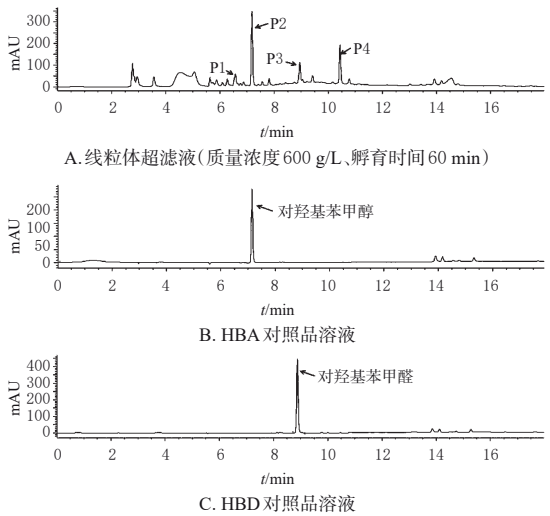
影响因素	与线粒体结合成分的$\Delta P(\bar{x}\pm s)$				结合成分数量/个
	P1	P2	P3	P4	
质量浓度150 g/L	32.33±5.18	33.67±1.86			2
质量浓度300 g/L	34.69±4.42	40.51±3.52	39.97±7.67	28.81±6.67	4
质量浓度600 g/L	45.40±7.06	61.01±7.60	57.26±7.29	39.34±4.33	4
孵育时间30 min	23.24±1.93	33.54±4.23			2
孵育时间60 min	40.49±8.91	52.41±2.50	57.20±8.07	35.74±5.59	4
孵育时间90 min	38.81±8.48	58.37±7.35	54.31±13.35		3

2.3.3 成分指认 取HBA、HBD对照品适量，分别采用80%甲醇制成质量浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将上述色谱图与“2.3.2”项下天麻冻干粉质量浓度为600 g/L、孵育时间为60 min时的实验组线粒体超滤液色谱图进行比对，指认P2为HBA、P3为HBD，结果见图3。

2.4 获得化合物对离体脑线粒体活性的影响

2.4.1 统计学方法 应用Graphpad Prism 9.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验(方差齐)或非参数秩和检验(方差不齐)。检验水准α=0.05。

2.4.2 MMP测定 MMP下降是线粒体活性下降的标志[7]。将纯化线粒体分为对照组(仅纯化线粒体)、CCCP诱导组、HBA处理组(CCCP+HBA 50、100、150 μmol/L)、HBD处理组(CCCP+HBD 50、100、150 μmol/L)，每组设置6个平行。除对照组外，各组按“2.1.3”项下CCCP处理组方法处理并给予相应药物后，按“2.1.3”项下方法进行MMP检测。结果(表3)显示，与对照组比较，CCCP



A. 线粒体超滤液(质量浓度600 g/L、孵育时间60 min)

B. HBA对照品溶液

C. HBD对照品溶液

图3 天麻中线粒体靶向化合物指认的HPLC图

诱导组MMP显著降低(P<0.05)；与CCCP诱导组比较，HBA、HBD处理组MMP显著升高(P<0.05)，表明HBA、HBD处理均能使线粒体活性升高。此外，由表3可知，HBA改善MMP的作用优于HBD，而且2020年版《中国药典》中把HBA列入天麻质量控制的成分之一，因此选取HBA进行后续实验。

表3 获得化合物对MMP的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	化合物浓度/(μmol/L)	MMP	组别	化合物浓度/(μmol/L)	MMP
对照组		12.49±0.58	HBD处理组	50	9.42±0.40[b]
CCCP诱导组		5.76±0.47[a]		100	9.60±0.61[b]
HBA处理组	50	10.77±0.60[b]		150	10.13±0.59[b]
	100	11.01±0.49[b]			
	150	10.27±0.86[b]			

a：与对照组比较，P<0.05；b：与CCCP诱导组比较，P<0.05

2.5 HBA对HT22细胞的神经保护作用

2.5.1 HT22细胞存活率的检测 采用MTT法进行检测。取对数生长期的HT22细胞接种于96孔板，细胞密度为1×10^5个/mL，每孔100 μL，将细胞分为空白对照组(只加培养基，不加细胞)、正常组(正常培养细胞)、不同浓度HBA(25、50、100、200、400 μmol/L)组，每组设置6个复孔。HBA组细胞加入含相应浓度药物的完全培养基(即含10%胎牛血清及1%青链霉素双抗的RPMI 1640培养基，下同)，正常组加入完全培养基，于37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h。使用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度(A)，计算各组细胞存活率：细胞存活率(%)=($A_{HBA组}-A_{空白对照组}$)/($A_{正常组}-A_{空白对照组}$)×100%。按“2.4.1”项下统计方法计算(下同)，结果显示，与正常组相比，HBA给药浓度在25～200 μmol/L时，细胞存活率无显著改变(P>0.05)，分别为(103.70±4.68)%、(99.05±3.66)%、(99.39±5.19)%、(94.50±2.12)%；给药浓度为400 μmol/L时，细胞存活率[(90.49±2.58)%]显著下降(P<0.05)。可见HBA给药浓度在25、50、100 μmol/L时对细胞存活率影响较小，故选择上述浓度用于后续实验。

2.5.2　HBA对OGD/R损伤HT22细胞死亡率与形态学的影响　取对数生长期的HT22细胞接种于6孔板，细胞密度为6.4×10^4个/mL，每孔2 mL，将细胞分为对照组、模型组、阳性对照组（依达拉奉100 μmol/L[12]）和不同浓度HBA（25、50、100 μmol/L）组，每组设置3个复孔，并设置细胞最大酶活性孔（对照组中正常培养细胞加入试剂盒提供的LDH释放剂）。HBA组与阳性组细胞加入含相应浓度药物的完全培养基，对照组加入完全培养基。24 h后，对照组更换新鲜完全培养基，其余各组加入含10 mmol/L连二亚硫酸钠（$Na_2S_2O_4$，常用细胞缺氧诱导剂）的无糖培养基处理细胞2 h进行氧糖剥夺[13]，随后更换为DMEM高糖培养基复氧2 h建立OGD/R细胞模型。细胞死亡率的检测根据LDH检测试剂盒说明书使用酶标仪于490 nm波长下检测A，计算细胞死亡率：细胞死亡率（%）=（$A_{给药组}-A_{对照组}$）/（$A_{细胞最大酶活性孔}-A_{对照组}$）×100%。在实验过程中使用倒置显微镜观察各组HT22细胞的形态并拍摄图片。结果显示，模型组细胞死亡率为（16.66±1.57）%，阳性对照组和不同浓度HBA（25、50、100 μmol/L）组的细胞死亡率均显著低于模型组（$P<0.05$），并呈现剂量依赖性，细胞死亡率分别为（3.34±0.29）%、（12.79±0.57）%、（10.22±0.17）%、（4.39±0.24）%，其中100 μmol/L HBA保护作用最佳。细胞形态学观察如图4所示，模型组出现大量细胞皱缩，细胞突起减少，胞质凝聚；与模型组比较，HBA组细胞的形态得到改善并呈现剂量依赖性。

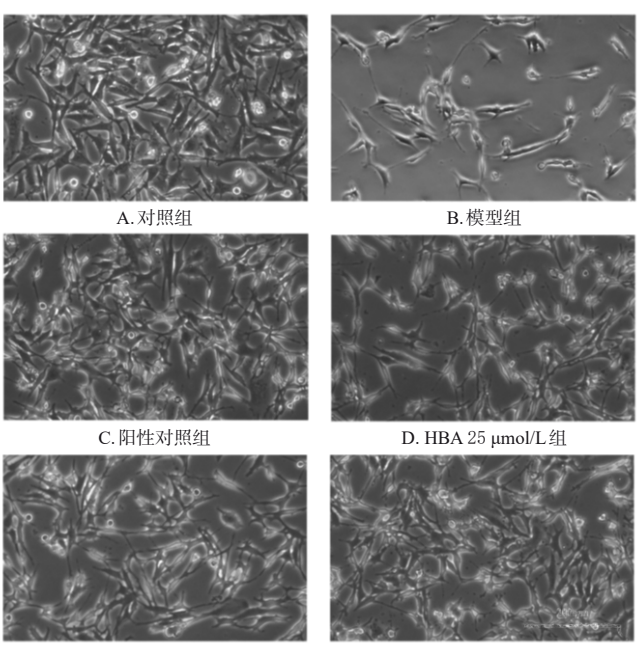


图4　HBA对OGD/R损伤HT22细胞形态影响的显微图（×400）

2.5.3　HBA对OGD/R损伤HT22细胞ATP、ROS水平的影响　按“2.5.2”项下方法进行细胞分组及处理，每组设置5个复孔。根据试剂盒说明书，测定ATP、ROS水平，使用酶标仪于激发波长488 nm、发射波长525 nm处检测。结果显示，与对照组相比，模型组细胞中ATP水平显著降低、ROS水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，阳性对照组和不同浓度HBA组ATP水平（除HBA 25 μmol/L组外）均显著升高、ROS水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组细胞ATP、ROS水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	ATP	ROS	组别	ATP	ROS
对照组	288 996±3 894	2.93±0.02	HBA25 μmol/L组	113 991±3 091	8.98±0.12[b]
模型组	115 843±2 410[a]	10.20±0.33[a]	HBA50 μmol/L组	181 939±5 081[b]	8.23±0.09[b]
阳性对照组	155 414±1 992[b]	3.72±0.07[b]	HBA100 μmol/L组	142 537±1 742[b]	6.22±0.08[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$

2.5.4　HBA对OGD/R损伤HT22细胞线粒体功能的影响　按“2.5.2”项下方法进行细胞分组及处理，每组设置5个复孔。参照MPTP检测试剂盒使用说明书操作，使用酶标仪以激发光波长494 nm、发射光波长517 nm进行检测，评估MPTP开放程度，荧光越强，开放程度越低。参照“2.1.3”项下方法检测MMP。结果显示，与对照组相比，模型组细胞中MMP水平显著降低，MPTP开放程度显著变大（$P<0.05$）；与模型组相比，阳性对照组和不同浓度HBA组MMP水平显著升高，MPTP开放程度（除HBA25 μmol/L组外）显著降低（$P<0.05$）。结果见表5。

表5　各组细胞MMP、MPTP比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	MMP	MPTP荧光值	组别	MMP	MPTP荧光值
对照组	14.82±0.52	258.4±13.03	HBA25 μmol/L组	5.22±0.08[b]	139.8±10.54
模型组	3.60±0.06[a]	127.8±10.33[a]	HBA50 μmol/L组	9.60±0.25[b]	169.4±4.40[b]
阳性对照组	10.95±0.22[b]	225.4±13.92[b]	HBA100 μmol/L组	10.40±0.21[b]	194.2±15.43[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$

3　讨论

基于超滤离心-HPLC法获取线粒体靶向化合物的关键是获得大量具有活性和高纯度的线粒体。本研究采取线粒体提取试剂盒提取高纯度线粒体，用线粒体专属染料健那绿与中性红评估线粒体纯度[14]。采用CCCP处理、检测MMP的方法来确定线粒体活性[15]。结果显示提取的线粒体纯度高、活性强，可以用于进一步研究。

本研究采用阿莫西林、阿司匹林、尼莫地平3种成分混合标准溶液，来检验超滤离心-HPLC法获取线粒体靶向化合物的可行性。实验结果显示，3种成分混合标准溶液中尼莫地平对照组峰面积显著增强，而阿司匹林和阿莫西林条件下均未见对照组峰面积增强。且进一步通过尼莫地平标准溶液结合线粒体，结果与混合标准溶液结果一致，尼莫地平对照组峰面积显著增强，表明超滤离心-HPLC法具有分离和识别能力，可用于获取线粒体靶向化合物。

线粒体质量浓度、样品质量浓度和孵育时间是影响本研究的关键因素。首先，实验的灵敏度由线粒体质量浓度决定，质量浓度越高，灵敏度越高，但当线粒体质量浓度大于1.0 g/L会堵塞超滤膜[7]。所以本研究选择1.0

g/L进行实验。其次，对天麻提取物的3个质量浓度（150、300、600 g/L）进行检测，以明确化合物与线粒体结合的最佳质量浓度，并探讨随化合物质量浓度的增加，与线粒体结合的药物量是否随之增加。结果显示，天麻提取物达到300、600 g/L时，有4个峰ΔP＞20%，但其中质量浓度为600 g/L时与线粒体结合成分含量更高。因此，本研究选取600 g/L进行后续研究。最后，对孵育时间（30、60、90 min）进行筛选。当孵育时间较短时，可能会错过与线粒体松散结合的活性分子，而较长的孵育时间可能会导致结合分子的结构变化。研究结果表明，活性分子在孵育时间为60 min时与线粒体结合化合物的数量最多，达到4个。以上研究结果表明，药物质量浓度为600 g/L、孵育时间为60 min时，与失活线粒体组相比，纯化线粒体组4个峰（P1～P4）的峰面积显著增强（ΔP＞20%）。这表明4个峰（P1～P4）与活性线粒体具有特异性结合。通过与对照品对比后，鉴定出结合量较大的2个成分（P2为HBA，P3为HBD），并且这2个成分可提高离体MMP，提示P2、P3具有线粒体保护作用。

由于HBA提高MMP的作用强于HBD，而且2020年版《中国药典》中把HBA列入天麻质量控制成分之一，本研究通过HT22细胞进一步验证HBA的神经保护作用[13]。本研究结果显示，OGD/R可引起神经细胞结构损伤和坏死，而HBA能明显改善这一情况，与之前的报道一致[16]。在本研究中，HBA预处理可以减轻OGD/R诱导的神经细胞病理改变，减少细胞的死亡率，起到神经保护作用。研究发现，当细胞OGD/R时产生大量ROS，线粒体容易受到氧化损伤，线粒体功能发生障碍导致ATP水平降低，MMP去极化，MPTP开放异常并释放细胞凋亡因子，最终导致细胞凋亡[7]。本研究结果显示，通过HBA处理逆转了OGD/R细胞模型中ROS、ATP、MPTP、MMP的异常变化，表明HBA可通过减少氧化损伤，保护线粒体功能，从而发挥神经保护作用。

综上所述，本实验成功从天麻中获取2个脑线粒体靶向化合物（HBA、HBD），并且验证了结合率最高的HBA对OGD/R诱导的神经细胞损伤有明显的保护作用，可能是通过线粒体靶向治疗而发挥神经保护作用。

参考文献

[1] HE Z, NING N Y, ZHOU Q X, et al. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 146: 45-58.

[2] CABRAL-COSTA J V, KOWALTOWSKI A J. Neurological disorders and mitochondria[J]. Mol Aspects Med, 2020, 71: 100826.

[3] 李振，王科，王凯强，等. 中药介导线粒体防治肝癌的研究进展[J]. 中草药，2022，53(2)：575-589.

[4] 柳威，邓林华，祁东利，等. 天麻及其有效成分的药理作用概述[J]. 中药药理与临床，2021，37(4)：240-244，12.

[5] 李云，王志伟，刘大会，等. 天麻化学成分研究进展[J]. 山东科学，2016，29(4)：24-29.

[6] 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.

[7] YANG X X, LIANG L, LIU X, et al. Efficiently capturing mitochondria-targeted constituents with hepatoprotective activity from medicinal herbs[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 4353791.

[8] YANG X X, ZHOU Y Z, XU F, et al. Screening potential mitochondria-targeting compounds from traditional Chinese medicines using a mitochondria-based centrifugal ultrafiltration/liquid chromatography/mass spectrometry method[J]. J Pharm Anal, 2018, 8(4): 240-249.

[9] MENG L W, LI X K, WANG X R, et al. Amoxicillin effects on functional microbial community and spread of antibiotic resistance genes in amoxicillin manufacture wastewater treatment system[J]. J Environ Sci (China), 2017, 61: 110-117.

[10] DI BELLA S, LUZZATI R, PRINCIPE L, et al. Aspirin and infection: a narrative review[J]. Biomedicines, 2022, 10(2): 263.

[11] CHIOZZI P, SARTI A C, SANZ J M, et al. Amyloid β-dependent mitochondrial toxicity in mouse microglia requires P2X7 receptor expression and is prevented by nimodipine [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6475.

[12] LEE B J, EGI Y, VAN LEYEN K, et al. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress *in vitro*[J]. Brain Res, 2010, 1307: 22-27.

[13] LUO L, LYU L, LU Y H, et al. Effects of hypoxia on progranulin expression in HT22 mouse hippocampal cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1675-1680.

[14] CHAIYARIT S, THONGBOONKERD V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study[J]. Anal Biochem, 2009, 394(2): 249-258.

[15] GEORGAKOPOULOS N D, WELLS G, CAMPANELLA M. The pharmacological regulation of cellular mitophagy [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(2): 136-146.

[16] 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.

（收稿日期：2022-05-17　修回日期：2022-08-26）

（编辑：曾海蓉）