

• 药理与临床 •

川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响

杨 珍, 周惠芬, 周 鹏, 杨洁红, 万海同, 管敏国, 张宇燕*
浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 观察黄芪、川芎中的有效成分黄芪甲苷、川芎嗪、阿魏酸、毛蕊异黄酮、藜本内酯的正交组合配伍对 SD 乳鼠脑微血管内皮细胞 (rBMVECs) 缺氧损伤的保护作用, 并找出较优组合。方法 rBMVECs 原代传代培养, 并建立缺氧模型, 4 h 后观察细胞形态, MTT 法测定各成分的最大耐药质量浓度, 以 $L_{18}(3^5)$ 正交表设计安排成分配伍给药, 采用黄嘌呤氧化酶显色法检测细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期, RT-PCR 法测定 caspase-3 与 caspase-8 基因在细胞中的表达。采用极差分析法分析正交试验结果。结果 药物正交配伍组合可显著改善缺氧 rBMVECs 的形态, 有效增强 SOD 活性, 有效抑制缺氧诱导的 rBMVECs 发生 G_1/S 期阻滞, 明显减少了细胞的凋亡, 减弱细胞中 caspase-3 和 caspase-8 基因表达。正交试验结果分析显示其较优组合为藜本内酯 5 $\mu\text{g/mL}$ 、川芎嗪 10 $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 20 $\mu\text{g/mL}$ 、毛蕊异黄酮 10 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芪甲苷 10 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 黄芪、川芎有效成分组合配伍对内皮细胞缺氧损伤有明显的保护作用。

关键词: 黄芪; 川芎; 脑微血管内皮细胞; 缺氧; 超氧化物歧化酶; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1326-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.013

Effects of compatibility of main components from *Chuanxiong Rhizoma* and *Astragali Radix* on hypoxia damaged brain microvascular endothelial cells

YANG Zhen, ZHOU Hui-fen, ZHOU Peng, YANG Jie-hong, WAN Hai-tong, GUAN Min-guo, ZHANG Yu-yan
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To observe the protective effect of orthogonal compatibility of astragaloside IV (A), ligustrazine (B), ferulic acid (C), calycosin (D), and ligustilide (E), the main components from *Chuanxiong Rhizoma* and *Astragali Radix*, on the brain micro vascular endothelial cells (rBMVECs) of SD neonatal rat damaged by hypoxia, and find out an optimized combination. **Methods** To prepare the normal primary rBMVECs from SD rats, to establish the hypoxia model, and to observe cellular morphology after 4 h; The maximum concentration of drug resistance was determined by MTT method. The compatibility of components was arranged by $L_{18}(3^5)$ orthogonal design; The levels superoxide dismutase (SOD) was tested as kits instruction, the cells apoptosis rates and DNA stages were assayed with flow cytometry, and the expressions of caspase-3 and caspase-8 in cells were tested by using the method of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Analyze the results of orthogonal test by using range analysis method. **Results** The orthogonal compatibility of reagents could play an significant roles against the hypoxia damage of rBMVECs, improve the cellular morphology obviously, enhance the activity of SOD, reduce the apoptosis of cells apparently, restrain the retardant of G_1/S stage induced by hypoxia effectively, and decrease the expression of caspase-3 and caspase-8 in cells. The analysis of test results shows that the combination with ligustilide 5 $\mu\text{g/mL}$, ligustrazine 10 $\mu\text{g/mL}$, ferulic acid 20 $\mu\text{g/mL}$, calycosin 10 $\mu\text{g/mL}$, and astragaloside 10 $\mu\text{g/mL}$ is the superior one. **Conclusion** The protective effect of the compatibility with the main components from *Chuanxiong Rhizoma* and *Astragali Radix* on hypoxia-damaged rBMVECs is obvious.

Key words: *Astragali Radix*; *Chuanxiong Rhizoma*; brain microvascular endothelial cells; hypoxia; superoxide dismutase; cell apoptosis

近年来,随着人们生活水平的提高及饮食结构的变化,缺血性脑卒中的发生率呈现逐年增加的趋势,严重影响了患者的生活质量。脑微血管内皮细胞 (rBMVECs) 是毛细血管微循环中的一种特殊细

收稿日期: 2014-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202636, 81274176, 81374053); 浙江省自然科学基金资助项目 (LR12H27001); 浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科 (2012-XK-A06)

作者简介: 杨 珍 (1988—), 女, 研究方向为方剂学配伍规律研究。E-mail: holly8808@163.com

*通信作者 张宇燕 Tel: (0571)86613716 E-mail: yannoo7376@sina.com

胞,在脑内分布广泛,地位特殊,功能复杂,在刺激因素作用下参与多种神经系统疾病特别是脑血管疾病的病理生理过程^[1-2]。黄芪、川芎单味药对脑缺血保护作用的研究多有报道^[3-5],但对于二者配伍后的研究报道甚少。黄芪甲苷、毛蕊异黄酮为黄芪的主要活性成分,川芎嗪、阿魏酸、藁本内酯为川芎的主要活性成分,因此本实验采用原代培养的乳鼠 rBMVECs,建立缺氧损伤模型,从细胞水平上探讨黄芪、川芎主要活性成分配伍对缺氧所致 rBMVECs 损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄芪甲苷(批号 20120420)、毛蕊异黄酮(批号 20130219)、川芎嗪(批号 20100611)、阿魏酸(批号 20061103)、藁本内酯(批号 20130420),质量分数均 $\geq 98\%$,天津马克生物技术有限公司;M199 培养基、胎牛血清, Gibco 公司;D-Hank's 液、II 型胶原酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所;FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒、PI/RNase Staining 缓冲液试剂盒, BD 公司;SYBR Green I 试剂盒, RNA 提取试剂盒, Bio-Rad 公司。

1.2 动物

清洁级 SD 乳鼠 10 只,1~3 日龄,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供,许可证号 SCXK(沪)2008-0016。

1.3 仪器

3111 型 CO₂ 培养箱, Thermo Scientific 公司;DMI4000B 荧光倒置显微镜,德国徕卡公司;LDZ5-2 型低速自动平衡离心机,北京京立离心机有限公司;TU-1900 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Thermo Scientific VarioskanFlash 酶标仪、BD FACSCulibur 流式细胞仪,美国 BD 公司;CFX 96 实时定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司;自制缺氧罐。

2 方法

2.1 rBMVECs 的原代、传代培养

取 10 只 SD 乳鼠,颈椎脱臼处死,消毒后在无菌条件下取出大脑,置于含有冷的 D-Hank's 液的培养皿中,分离出较纯的大脑皮质,用 D-Hank's 液漂洗 3 次后将组织剪碎至 1 mm³ 并移入无菌 15 mL 离心管中,加入适量的含乙二胺四乙酸(EDTA)的

0.25%的胰蛋白酶,于 37 °C 培养箱中消化 20 min;加入完全培养基终止消化,吹打均匀后依次通过 80、200 目不锈钢筛滤过,收集 200 目的滤液,1 000 r/min 离心 10 min;去除上清液,沉淀加入适量的 0.1% II 型胶原酶并置于培养箱中消化,25 min 后 1 000 r/min 离心 10 min;沉淀加入适量 M199,漂洗离心后将最终沉淀用 M199 完全培养基悬浮接种到细胞培养瓶中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,3 d 后换液,每 2 天换液 1 次,细胞长成“铺路石”样的致密单层后,用 0.125%的胰蛋白酶消化传代培养,并进行兔抗鼠 VIII 因子鉴定。将第 3 代的细胞接种到 6 孔板中培养,细胞长成“铺路石”样的致密单层后用于实验。

2.2 川芎、黄芪各活性成分的细胞毒性剂量测定

用 M199 完全培养基配制各单体药物,将第 3 代细胞接种到 96 孔板中长成致密单层后,依次加入不同质量浓度的药物,采用 MTT 法^[6]确定各单体药物给药的高、中、低质量浓度。

2.3 分组、给药、造模

将 6 孔板中长成致密单层的细胞分成 20 组,对照组、模型组、18 个给药组。弃去 6 孔板中的培养基,用 PBS 洗 2 次后按组合浓度给药,对照组加入完全培养基 1 mL,模型组加入无血清的 M199 1 mL,给药组分别加入不同浓度组合的药物 1 mL。对照组置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,其他各组于 37 °C 自制密闭缺氧罐中持续通入 95% N₂+5% CO₂ 混合气体,5 min 后封口膜密封缺氧罐口,于 37 °C 恒温箱中培养 4 h。倒置显微镜下观察各组细胞形态。

2.4 SOD 活性检测

按“2.3”项方法分组、给药及造模,培养 4 h 后取各组样品细胞,每组 6 个复孔,去除细胞培养基, PBS 洗 2 次,用 0.125%胰蛋白酶消化后用超声法破碎细胞,收集裂解液,按试剂盒说明书操作,测定 SOD 活性。

2.5 流式细胞仪检测 rBMVECs 早期凋亡率及细胞周期

按“2.3”项方法分组、给药及造模,培养 4 h 后取各组样品,每组 3 个复孔,按试剂盒说明书加缓冲液,用 FITC Annexin/PI 双染后,流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

按“2.3”项方法分组、给药及造模,培养 4 h 后取样品,每组 3 个复孔,用冷的酒精培养 2 h,缓冲液洗后离心,沉淀加入 PI 和染色缓冲液混匀,置于 25 °C 避光处 15 min 后用流式细胞仪检测细

胞周期。

2.6 caspase-3 和 caspase-8 基因表达测定

按“2.3”项方法分组、给药及造模，培养 4 h 后取各组样品，每组 3 个复孔，分别加入 1 mL trizol，按说明书操作总 RNA 提取和逆转录，保存于 -70 °C 备用。实时荧光定量 PCR 检测：扩增产物为 β -actin。反应程序为预变性 95 °C、10 min，然后 95 °C、10 s，55 °C、10 s，72 °C、15 s，共 40 个循环；熔解曲线：65~95 °C，扩增 0.5 °C、5 s。应用 Delta-delta C1 法进行 caspase-3 和 caspase-8 基因的表达分析。

2.7 统计学处理

数据用 SPSS 17.0 统计软件处理，用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间两两比较采用方差分析；采用一般线性模型的 Univariate 程序进行正交试验结果的分析。

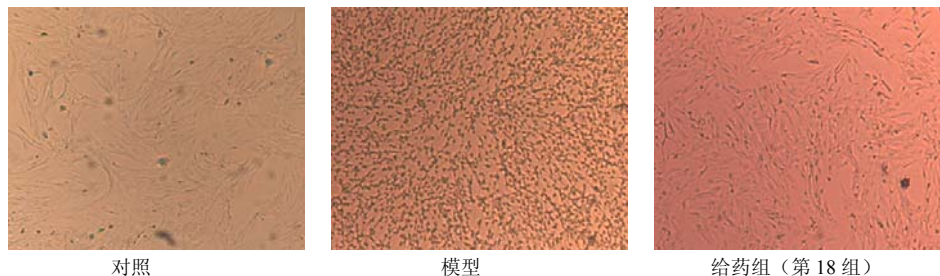


图 1 rBMVECs 细胞形态学观察结果

Fig. 1 Cell morphological observation of rBMVECs

3.2 MTT 法确定各有效成分给药质量浓度及各组成分配比情况

经 MTT 法测定川芎、黄芪各活性成分的细胞毒性，选取细胞存活率在 80% 以上的药物质量浓度，具体各成分给药的质量浓度分别为黄芪甲苷 (A): 40、20、10 $\mu\text{g/mL}$ ，川芎嗪 (B): 20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ ，阿魏酸 (C): 20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ ，毛蕊异黄酮 (D): 20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ ，藜本内酯 (E): 10.0、5.0、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。按照正交设计表 $L_{18}(3^5)$ 设计的药物分组及各组成分配比情况见表 1。

3.3 各组细胞 SOD 活性比较

与对照组相比，模型组细胞 SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$)；而各给药组 SOD 活性较模型组增加，2、3、4、5、6、9、10、12、13、16、17、18 作用较显著 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.4 各组细胞凋亡率及细胞周期比较

与对照组相比，模型组细胞早期凋亡率、 G_1 期细胞比例明显增高 ($P < 0.01$)，S、 G_2 期细胞比例显著减少 ($P < 0.01$)，各给药组细胞较模型组细

3 结果

3.1 形态学观察结果

原代细胞培养瓶中，分离、获得的微血管段形态各异，在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 3 d 后，可见少量内皮细胞呈散在性生长，细胞呈长梭型或多角形；培养 7~8 d 后，细胞长成“铺路石”样致密单层铺满瓶底。其生长特点和形态与大多数文献报道相似^[7-8]，兔抗鼠 VIII 因子鉴定结果显示所培养的细胞存在兔抗鼠 VIII 因子相关抗原，可鉴定培养细胞为内皮细胞。

造模结束后，在倒置显微镜 ($\times 100$) 下观察细胞形态，对照组 rBMVECs 呈梭形或多角形，形态饱满，生长旺盛成铺路石状。模型组细胞轮廓不清，细胞体积缩小，出现较多的凋亡与坏死细胞。给药各组均能有效减轻缺氧对细胞形态的损伤。结果见图 1。

表 1 18 个给药组成分配比情况

Table 1 Composition in 18 administration groups

组号	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
	A	B	C	D	E
1	10 (1)	5 (1)	5 (1)	5 (1)	2.5 (1)
2	10 (1)	10 (2)	10 (2)	10 (2)	5.0 (2)
3	10 (1)	20 (3)	20 (3)	20 (3)	10.0 (3)
4	20 (2)	5 (1)	5 (1)	5 (1)	2.5 (1)
5	20 (2)	10 (2)	10 (2)	20 (3)	10.0 (3)
6	20 (2)	20 (3)	20 (3)	5 (1)	2.5 (1)
7	40 (3)	5 (1)	10 (2)	5 (1)	10.0 (3)
8	40 (3)	10 (2)	20 (3)	10 (2)	2.5 (1)
9	40 (3)	20 (3)	5 (1)	20 (3)	5.0 (2)
10	10 (1)	5 (1)	20 (3)	20 (3)	5.0 (2)
11	10 (1)	10 (2)	5 (1)	5 (1)	10.0 (3)
12	10 (1)	20 (3)	10 (2)	10 (2)	2.5 (1)
13	20 (2)	5 (1)	10 (2)	20 (3)	2.5 (1)
14	20 (2)	10 (2)	20 (3)	5 (1)	5.0 (2)
15	20 (2)	20 (3)	5 (1)	10 (2)	10.0 (3)
16	40 (3)	5 (1)	20 (3)	10 (2)	10.0 (3)
17	40 (3)	10 (2)	5 (1)	20 (3)	2.5 (1)
18	40 (3)	20 (3)	10 (2)	5 (1)	5.0 (2)

表2 各组细胞 SOD 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Activity of SOD in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组号	SOD/(U·mg ⁻¹)	组号	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	65.17±6.64	9	57.29±7.59**
模型	22.82±2.10 ^{△△}	10	59.15±6.23**
1	24.61±1.20	11	38.55±0.14
2	59.91±6.66**	12	48.42±2.96**
3	58.18±7.69**	13	43.73±1.11**
4	59.74±5.21**	14	37.36±0.57
5	47.05±2.64**	15	36.69±1.39
6	50.87±1.25**	16	55.56±5.96**
7	36.32±2.21	17	53.93±4.99**
8	30.05±1.26	18	57.21±3.73**

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$, 下同
^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

胞早期凋亡率、G₁期细胞比例明显下降, S期细胞比例明显增加。2、3、4、5、6、9、17、18组细胞凋亡率及细胞周期变化较模型组均显著($P < 0.01$)。结果见表3。

3.5 各组细胞 caspase-3 和 caspase-8 基因表达

实时荧光定量 PCR 法 β-actin、caspase-3 和 caspase-8 基因的扩增曲线为“S”型, 溶解曲线呈单一峰, 溶解温度分别为 87.0、83.5、85.0 °C。用 Delta-delta C1 法对各基因表达水平进行相对定量分析结果表明, 模型组相对于对照组的 caspase-3 和 caspase-8 基因表达增加显著($P < 0.01$), 各给药组细胞相对于模型组细胞 caspase-3 和 caspase-8 基因表达降低, 4、5、8、10、11、12、13 组细胞 caspase-3 和 caspase-8 基因表达下降较显著($P < 0.01$)。结果见表4。

表3 各组细胞早期凋亡率及细胞周期比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Comparison on early apoptosis rates and condition of cell cycle of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组号	细胞凋亡率/%	细胞周期比例/%		
		G ₁ 期	S期	G ₂ 期
对照	4.18±2.98	75.62±1.41	16.63±2.14	7.75±0.96
模型	43.97±1.47 ^{△△}	84.33±5.98 ^{△△}	9.89±1.59 ^{△△}	5.78±1.07 ^{△△}
1	39.17±2.77	79.59±6.23	13.01±1.82	7.40±2.43
2	20.42±4.12**	77.18±3.56**	15.83±2.67**	6.99±5.87
3	5.72±1.18**	79.04±2.43**	14.06±1.03**	6.90±2.52
4	10.65±3.67**	76.35±5.37**	16.42±0.54**	7.23±1.89
5	32.08±0.42**	78.46±1.91**	14.65±4.19**	6.89±0.77
6	30.73±1.10**	78.10±5.66**	14.88±2.57**	7.02±1.52
7	37.19±1.82	79.00±0.39**	14.54±1.04**	6.46±1.67
8	37.59±3.71	78.16±1.26**	15.05±0.93**	6.79±1.49
9	26.46±1.93**	77.46±2.83**	15.35±2.71**	7.19±2.69
10	25.03±2.11**	79.50±2.02	13.65±1.20	6.85±1.93
11	35.69±1.12	77.72±5.09**	15.01±1.51**	7.27±0.65
12	31.04±2.68**	79.35±1.55**	13.66±1.96	6.99±1.39
13	33.64±1.62	79.59±3.58	14.05±2.66	6.36±0.81
14	36.24±1.82	79.76±5.02	14.27±3.50**	5.97±2.57
15	36.46±1.54	79.86±3.84	13.79±2.88	6.35±1.44
16	28.74±1.53**	78.83±1.47**	13.97±1.75	7.20±2.09
17	29.76±2.36**	78.90±1.84**	14.30±5.18**	6.80±1.13
18	25.96±1.15**	79.16±3.61**	14.95±1.05**	5.89±1.43

3.6 正交试验结果极差分析

3.6.1 直观分析法 由表5可知, 有效成分对 SOD 活性的影响按大小顺序排列为 E>D>B>C>A, 较优方案是 E₂D₃B₃C₂A₃; 对细胞凋亡率的影响按大小

顺序为 E>D>B>A>C, 较优方案是 E₂D₃B₃A₁C₃; 对 G₁期细胞比例的影响按大小顺序为 E>D>C>B>A, 较优方案是 E₂D₂C₁B₂A₃; 对 S期细胞比例的影响按大小顺序为 E>B>A>D>C, 较优方案

表 4 各组细胞 caspase-3 和 caspase-8 基因的表达分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Analysis on gene expression of caspase-3 and caspase-8 of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组号	基因相对表达量		组号	基因相对表达量	
	caspase-3	caspase-8		caspase-3	caspase-8
对照	1.00±0.63	1.00±1.11	9	1.02±0.26**	3.31±0.69
模型	9.84±1.10 ^{△△}	6.88±1.42 ^{△△}	10	1.73±0.63**	1.21±1.27**
1	4.30±1.31**	3.16±0.67	11	1.53±1.31**	1.45±0.68**
2	1.10±1.03**	3.44±1.14	12	1.19±0.66**	1.95±0.49**
3	1.14±0.96**	4.33±0.86	13	4.79±0.91**	1.19±1.64**
4	1.20±0.62**	1.34±1.11**	14	6.26±1.60	1.39±1.23**
5	2.37±1.25**	1.84±1.07**	15	5.61±1.83	3.23±0.49
6	1.68±1.74**	3.79±0.29	16	5.73±1.35	2.49±0.66**
7	1.43±0.92**	4.57±0.95	17	7.32±0.92	1.83±1.21**
8	1.08±1.43**	2.15±1.19**	18	6.89±0.43	1.76±0.93**

表 5 正交设计极差分析结果

Table 5 Orthogonal design and range analysis results

因素	水平	SOD/(U·mg ⁻¹)		细胞凋亡率/%		G ₁ 期细胞比例/%		S期细胞比例/%		caspase-3		caspase-8	
		均值	极差	均值	极差	均值	极差	均值	极差	均值	极差	均值	极差
A	1	48.14	2.49	26.18	4.77	78.73	0.15	14.20	0.49	1.83	2.08	2.59	0.56
	2	45.91		29.97		78.69		14.68		3.65		2.13	
	3	48.39		30.95		78.59		14.69		3.91		2.69	
B	1	46.52	6.97	29.07	5.90	78.81	0.47	14.27	0.58	3.20	0.36	2.33	1.05
	2	44.48		31.96		78.36		14.85		3.28		2.02	
	3	51.44		26.06		78.83		14.45		2.92		3.06	
C	1	45.14	3.64	29.70	2.71	78.31	0.59	14.65	0.33	3.50	0.56	2.39	0.17
	2	48.88		30.06		78.79		14.61		2.96		2.46	
	3	48.53		27.34		78.90		14.31		2.94		2.56	
D	1	40.82	12.40	34.16	8.72	78.89	0.60	14.44	0.44	3.68	1.03	2.69	0.40
	2	48.40		27.48		78.29		14.79		2.65		2.43	
	3	53.22		25.45		78.83		14.34		3.06		2.29	
E	1	41.94	13.18	33.66	9.53	78.95	0.71	14.16	0.92	3.39	0.43	2.35	0.91
	2	55.11		24.13		78.24		15.08		3.03		2.08	
	3	45.39		29.31		78.82		14.34		2.97		2.99	

是 E₂B₂A₃D₂C₁; 对 caspase-3 基因表达的影响按大小顺序为 A > D > C > E > B, 较优方案是 A₁D₂C₃E₃B₃; 对 caspase-8 基因表达的影响按大小顺序为 B > E > A > D > C, 较优方案是 B₂E₂A₂D₃C₁。

3.6.2 综合平衡法 藁本内酯 (E) 对各指标的影响: 从表 5 看出, 对 SOD、细胞凋亡率、G₁ 期细胞比例、S 期细胞比例 4 个指标来讲, 藁本内酯的极差均最大, 也就是说藁本内酯是影响最大的因

素, 且以取 E₂ 水平为最好; 对 caspase-3 和 caspase-8 来讲, 藁本内酯的极差不是最大, 但取 E₂ 水平也不是太差。总的来说, 对 7 个指标来讲, 藁本内酯以取 E₂ 水平为最好。

川芎嗪 (B) 对各指标的影响: 从表 5 看出, 对 SOD 和细胞凋亡率来说, 取 B₃ 水平为好。但是, 对 caspase-8 和 S 期细胞比例来说, 川芎嗪都是影响较大的因素。对 6 个指标综合考虑, 选取 B₂ 为好。

阿魏酸(C)对各指标的影响:从表5看出,对6个指标来说,阿魏酸的极差都不是最大的,也就是说阿魏酸不是影响最大的因素。对G₁期细胞比例和caspase-3来说,阿魏酸是影响较大的因素,且对caspase-8、S期细胞比例和细胞凋亡率来说,它的影响都是最小的。对6个指标综合考虑,阿魏酸取C₃水平为好。

毛蕊异黄酮(D)对各指标的影响:从表5看出,对G₁期细胞比例、S期细胞比例和caspase-3表达来讲,毛蕊异黄酮取D₂最好;对SOD活性、细胞凋亡率和caspase-8来讲,毛蕊异黄酮取D₃最好,D₂次之。对7个指标综合考虑,毛蕊异黄酮取D₂水平为好。

黄芪甲苷(A)对各指标的影响:从表5看出,对细胞凋亡率和caspase-3表达来说,黄芪甲苷都是以取到A₁水平为最好,且对caspase-3表达来说,黄芪甲苷为影响最大的因素;对SOD活性、G₁期细胞比例和S期细胞比例来讲,黄芪甲苷都不是影响最大的因素;而且对SOD活性和G₁期细胞比例来讲,黄芪甲苷是最次要的影响因素,取A₁水平也不是太差。对7个指标综合考虑,黄芪甲苷取A₁水平为好。

通过各因素对各指标影响的综合分析,得出较好的试验方案是E₂B₂C₃D₂A₁,即藁本内酯5 μg/mL、川芎嗪10 μg/mL、阿魏酸20 μg/mL、毛蕊异黄酮10 μg/mL、黄芪甲苷10 μg/mL。

4 讨论

脑血管病的发病从病理学角度主要涉及血流动力学、血液理化特性及血管壁完整性的改变,而血管壁的结构破坏是脑血管病的基础,rBMVECs的损伤是脑缺血损伤最直接的原因^[9]。因此,对rBMVECs损伤机制^[10]及保护措施进行深入研究有重要的临床意义。

鉴于“肾阴亏虚,气血不足影响脑功能及其他脏腑功能,因虚致实,实邪瘀阻脑络则发为中风”的病机认识,提出了“益气活血”改善中风之症。“药对”在中医方剂配伍中占有非常重要的地位,较之用单味药简单堆砌可以成倍提高。临床中常用黄芪、川芎配伍治疗中风。黄芪为补气要药,为“气中血药”,川芎辛散温通,既能活血,又能行气,为“血中气药”,重用可引药上达巅顶,旁通四肢。二者配伍,使补而不滞,从而消散血瘀。近年来有很多对黄芪、川芎各有效成分对脑缺血内皮细胞的

研究报告^[11-12],但对于配伍组合^[5,13]的研究较少,本实验研究了黄芪、川芎的有效成分正交组合对缺氧rBMVECs的保护作用。

脑缺血缺氧时,能量代谢障碍,导致大量Na⁺内流,K⁺外流,细胞膜电位下降,产生去极化,引发大量Ca⁺内流引起脑细胞损伤,血脑屏障破坏,产生大量氧自由基可使生物膜中的多不饱和脂肪酸发生过氧化反应,引起细胞损伤,诱导细胞凋亡^[14]。SOD是机体内一种清除氧自由基的特异酶,有抗氧化作用,SOD活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。细胞凋亡是由多因素引起的,研究显示caspase底物的切割是细胞凋亡过程中最关键的事件,其中caspase-3作为主要的效应caspase,经过活化后作用于胞内多种的蛋白质和酶类,产生多种凋亡信号来切割某些蛋白质,诱导细胞凋亡^[15]。Caspase-8作为启动型发挥作用,作为执行型参与细胞凋亡^[16]。

本实验研究表明,模型组较对照组SOD活性、细胞早期凋亡率、细胞周期、caspase-3和caspase-8基因的表达有显著差异(P<0.01),与模型组相比,给药组明显增强了细胞内SOD活性,改善了细胞能量代谢,有效抑制了细胞G₁/S期阻滞以及caspase-3和caspase-8基因的表达,抑制了细胞早期凋亡。在保护rBMVECs缺氧损伤作用时,不同给药组在不同的保护机制差异较显著(P<0.01),通过用极差分析法分析正交试验结果,最终选出E₂B₂C₃D₂A₁(即藁本内酯5 μg/mL、川芎嗪10 μg/mL、阿魏酸20 μg/mL、毛蕊异黄酮10 μg/mL、黄芪甲苷10 μg/mL)为较优组合。综上所述,黄芪、川芎的有效成分配伍对SD乳鼠rBMVECs缺氧损伤有显著的保护作用,其机制可能与保护细胞膜稳定性,提高氧自由基清除能力,抑制细胞凋亡有关。

本研究初步探讨了黄芪、川芎药对中主要成分配伍对rBMVECs缺氧损伤的保护作用及机制,并初步确定了各成分配伍的较优比例,为黄芪、川芎临床用药配伍应用提供了依据,但具体组方比例仍需深入研究确定,配伍组方的药理作用也需体内实验验证。

参考文献

- [1] Teinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, et al. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(5): 302-312.
- [2] Goon P K, Lip G Y, Boos C J et al. Circulating endothelial cells endothelial progenitor cells and

- endothelial microparticles in cancer [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(2): 79-88.
- [3] 张国平, 孙梅, 杨洁红, 等. 川芎嗪对缺氧人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 71-73.
- [4] 杨富国, 刘革新, 董果雄, 等. 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤人脐静脉内皮细胞与中性粒细胞粘附能力及细胞核转录因子 kB 表达的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(15): 2843-2846.
- [5] 张宇燕, 李剑, 万海同, 等. 黄芪甲苷与川芎嗪合用对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 9(28): 2788-2792.
- [6] 阎祖炜, 朱欣, 李闻文. MTT法、CPE观察法用于药物细胞毒性实验的比较与分析 [J]. *实用预防医学*, 2007, 14(5): 1552-1554.
- [7] Kis B, Chen L, Ueta Y, *et al.* Autocrine peptides mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier [J]. *Peptides*, 2006, 27(1): 211-222.
- [8] Jong A Y, Wu C H, Jiang S, *et al.* HIV-1 gp41 ectodomain enhances *Cryptococcus neoformans* binding to HBMEC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 899-905.
- [9] 罗玉敏. 内皮细胞与脑缺血 [J]. *国外医学: 脑血管疾病分册*, 1998, 10(6): 271-273.
- [10] 马桂鑫, 赵文文, 陈修平, 等. 血管内皮细胞损伤模型及中药保护作用研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 276-283.
- [11] 王雪婷, 王俭勤, 宁雅娟, 等. 黄芪单体毛蕊异黄酮对血管内皮细胞前列环素和血栓素 A_2 的影响 [J]. *广东医学*, 2011, 10(32): 2519-2522.
- [12] 黄小平, 王蓓, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 220-226.
- [13] 冯青, 徐大基, 陈丽名, 等. 香港中医师运用经方常用药物的剂量特点探析 [J]. *中草药*, 2014, 45(3): 443-446.
- [14] 周鹏, 周惠芬, 何昱, 等. 丹红注射液对乳鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2013, 44(19): 2727-2731.
- [15] Zhu Y S, Chen Q. Mitochondria and apoptosis regulation [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2008, 20(4): 506-513.
- [16] 毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(10): 148-150.