

丹参配方颗粒对乙醇所致 PC12 细胞损伤的保护作用

刘红亮^{1,2}, 王靖凯^{1,3}, 邓锦波¹, 胡磊², 刘诗濛¹, 张路¹, 刘彬^{1*}

1. 河南大学护理学院神经生物学研究所, 河南 开封 475004

2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004

3. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473061

摘要: **目的** 研究丹参配方颗粒对乙醇损伤大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞的保护作用及其机制。**方法** 用乙醇和不同质量浓度丹参配方颗粒溶液处理 PC12 细胞; MTT 法检测细胞存活率, 乳酸脱氢酶(LDH)法检测丹参配方颗粒对乙醇致 PC12 细胞损伤的保护作用; 应用原位末端转移酶标记法(TUNEL)和 Annexin V/PI 标记染色检测 PC12 细胞凋亡情况; 相关试剂盒测定总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和丙二醛(MDA)的量; DCFH-DA 染色法检测胞内活性氧(ROS)水平。**结果** 丹参配方颗粒能够抑制乙醇导致的 PC12 细胞的损伤和死亡, 显著降低乙醇诱导的 PC12 细胞的凋亡率($P < 0.05$), 提高细胞的 T-SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性($P < 0.05$), 降低 MDA 和 ROS 水平($P < 0.05$)。**结论** 丹参配方颗粒能有效保护乙醇损伤的 PC12 细胞, 其作用机制与提高细胞抗氧化能力有关。

关键词: 丹参配方颗粒; 乙醇; PC12 细胞; 细胞凋亡; 活性氧; 抗氧化; 乳酸脱氢酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)12-1800-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.017

Protection of Danshen Formula Granula against damage of PC12 cells induced by alcohol

LIU Hong-liang^{1,2}, WANG Jing-kai^{1,3}, DENG Jin-bo¹, HU Lei², LIU Shi-meng¹, ZHANG Lu¹, LIU Bin¹

1. Institute of Neurobiology of Nursing College, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China

3. Nanyang Medical College, Nanyang 473061, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of Danshen Formula Granula (DFG) against the damage of pheochromocytoma (PC12) cells induced by alcohol. **Methods** PC12 cells were treated with alcohol and DFG at different concentration. The survival rates of PC12 cells were measured by MTT method and the protective effects of DFG against the damage of PC12 cells induced by alcohol were evaluated using the lactate dehydrogenase (LDH) leakage assays ($P < 0.05$). The apoptosis rates in PC12 cells were examined by TUNEL and Annexin V/PI label staining ($P < 0.05$). The antioxidant mechanism was assayed by detecting the activities of total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxide enzyme (GSH-Px), and the levels of malondialdehyde (MDA) and intracellular reactive oxygen species (ROS) ($P < 0.05$) were detected by DCFH-DA staining method. **Results** DFG could reduce the damage of PC12 cells induced by alcohol and significantly decrease the apoptosis rate induced by alcoholic damage in PC12 cells ($P < 0.05$). Meanwhile, DFG could increase the activity of T-SOD, GSH-Px, while CAT, the amounts of MDA, and intracellular ROS were decreased. **Conclusion** DFG has the effective protection against the damaged PC12 cells induced by alcohol. The mechanism may be involved in increasing the cell anti-oxidative function.

Key words: Danshen Formula Granula; alcohol; PC12 cells; apoptosis; reactive oxygen species; anti-oxidation; lactate dehydrogenase

乙醇通过氧化应激作用诱导神经细胞凋亡是损伤神经细胞的重要途径, 结果造成神经细胞数量减少, 中枢神经系统功能受到损害^[1]。乙醇致神经系

统损伤的作用机制并不十分清楚, 目前认为乙醇能够代谢产生大量活性氧(ROS), 破坏 DNA、脂类、蛋白质和线粒体等细胞器结构, 最终导致细胞凋亡

收稿日期: 2014-11-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30670688); 河南省卫生厅 AIDS 科技攻关项目(2006037); 河南省卫生厅科技攻关项目(200803085); 河南省教育厅自然科学研究项目(2009A330001)

作者简介: 刘红亮(1974—)男, 博士, 副教授, 研究方向为中药神经药理。Tel: 13663781771 E-mail: liuhl@henu.edu.cn

*通信作者 刘彬 Tel: (0371)23880399 E-mail: lbgood5912@sina.com

或细胞坏死^[2]。啮齿动物模型的体内外研究显示,乙醇可减少发育中的小脑颗粒细胞、Purkinje 细胞、海马和皮质神经元的数量,诱发凋亡性细胞死亡^[3]。有研究结果显示,利用不同浓度乙醇处理去血清培养的 PC12 细胞 24 h,乙醇浓度达 100 mmol/L 时,细胞生存率显著下降,呈浓度依赖性^[4]。乙醇能够提高细胞 ROS 水平,导致蛋白质、脂肪酸和 DNA 损伤,线粒体功能障碍。乙醇对神经系统的损伤作用,已对公共健康造成严重影响^[5],筛选抑制乙醇对神经系统损伤的药物具有重要的意义。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科 (Labiales)鼠尾草属 *Salvia* L. 植物干燥的根及根茎,性味微苦、微寒,主要具有促进组织再生、活气化瘀、保肝消痛、安神宁心等功效^[6]。药理学研究表明,丹参具有清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应等抗氧化作用^[7-8]。对缺氧缺糖、氧化损伤和钙超载所致神经元损伤有保护作用^[9]。中药配方颗粒具有使用方便的显著特点,在中国台湾、香港地区及韩国应用较为广泛,在国内也逐渐为一些中医所接受。丹参配方颗粒是根据国家标准,用丹参浸提物制备而成的颗粒剂。本研究利用乙醇诱导类神经细胞系 PC12 细胞损伤,观察临床常用丹参配方颗粒对乙醇所致神经损伤的保护效果,并初步探讨其保护机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹参配方颗粒(每袋 0.5 g)购于广东一方制药有限公司(批号 1002014),用时以 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司)配制成所需质量浓度,滤过除菌。无水乙醇,安徽安特生物化学有限公司;丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Hochest-33258、2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),美国 Sigma 公司;TUNEL 检测试剂盒,美国 Promega 公司。

1.2 主要仪器

倒置显微镜、荧光显微镜,日本奥林巴斯公司;高内涵活细胞成像系统(HCS),美国 TFS 公司;酶标仪,美国 BIOTEK 公司,FACScan 型流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;CO₂ 培养箱,美国热电公司。

1.3 细胞

大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞株(PC12)购自中国科

学院上海细胞所。用 DMEM 培养基常规培养,培养基含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期的 PC12 细胞,以每孔 5×10^3 接种于 96 孔板,培养 24 h 后,细胞分为对照组,乙醇(800 mmol/L,根据预试验结果,乙醇对 PC12 细胞的半数致死量为 786.52 mmol/L)处理组,丹参配方颗粒处理组(1、5、25、125 μg/mL 丹参配方颗粒溶液),乙醇+丹参配方颗粒组(800 mmol/L 乙醇+0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/mL 丹参配方颗粒溶液)。继续培养 24 h,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),37 °C 孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,酶标仪于 570 nm 处检测吸光度(A_{570})值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组 } A_{570}}{\text{对照组 } A_{570}}$$

2.2 酶标法检测 LDH 活性

培养细胞过夜,分为对照组、乙醇处理组和乙醇+丹参配方颗粒组,具体加药处理同“2.1”项,继续培养 24 h。按 LDH 试剂盒说明书操作,测定 450 nm 处 A 值,计算 LDH 酶活性。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡

对数生长期的细胞以 5×10^4 /mL 接种于 6 孔板中,培养 24 h。细胞分为对照组、乙醇处理组(800 mmol/L 乙醇)和乙醇+丹参配方颗粒组(800 mmol/L 乙醇+1.0 μg/mL 丹参配方颗粒),按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,在荧光显微镜下观察、拍照,随机选取 3 个视野统计不同组的细胞凋亡数目。计算细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{总细胞数}}$$

2.4 Annexin V/PI 标记染色测定凋亡细胞

细胞分为对照组、乙醇(800 mmol/L)处理组和乙醇+丹参配方颗粒组(800 mmol/L 乙醇+1.0 μg/mL 丹参配方颗粒),每组设 6 个复孔,收集细胞约 1×10^6 /mL,1 000 r/min、4 °C 离心 5 min,弃去培养液;1 mL 冷 PBS 重悬细胞洗涤 2 次,200 μL 结合液重悬细胞,加入 10 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI,4 °C 孵育 20 min,加入 300 μL 结合液终止反应,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。每个样品检测 1 万个细胞,用 Cell Quest 软件进行细胞凋亡分析。

2.5 细胞 ROS 水平测定

取对数生长期的细胞分为对照组、乙醇(800

mmol/L) 处理组和乙醇+丹参配方颗粒组 (800 mmol/L 乙醇+1.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒), PC12 细胞以每孔 5×10^3 接种于 96 孔板, 培养 24 h, 加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst 33258 避光染色 30 min, PBS 洗涤后再加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 溶液染色 30 min, 高内涵活细胞成像系统 (HCS) 在激发光为 485 nm、发射光为 525 nm 的条件下检测荧光值。

2.6 细胞 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 水平测定

对数生长期细胞以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 6 孔板, 实验分组同“2.5”项, 培养 24 h 离心收集细胞, 超声破碎后按照 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 检测试剂盒说明书进行操作, 紫外分光光度计同时检测 A_{530} 、 A_{550} 、 A_{240} 和 A_{412} , 计算 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 的量。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 数据均以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对正常 PC12 细胞存活的影响

与对照组相比, 不同质量浓度的丹参配方颗粒溶液对 PC12 细胞存活率的影响不显著 ($P > 0.05$), 表明单独使用丹参配方颗粒对 PC12 细胞的生长影响不明显。见图 1。

3.2 对乙醇损伤 PC12 细胞存活的影响

MTT 实验检测结果显示, 单独使用 800 mmol/L 乙醇处理 PC12 细胞 24 h, 细胞的存活率仅为对照组的 49.42%; 同时加入丹参配方颗粒溶液, 细胞存活率显著提高。丹参配方颗粒质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率分别为 54.30%、57.20%、61.35%、65.45%、69.69%, 与乙醇处理组相比增加显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 且在实验质量浓度范围内, 保护效果随丹参配方颗粒溶液质量浓度增加而增强。见图 1。

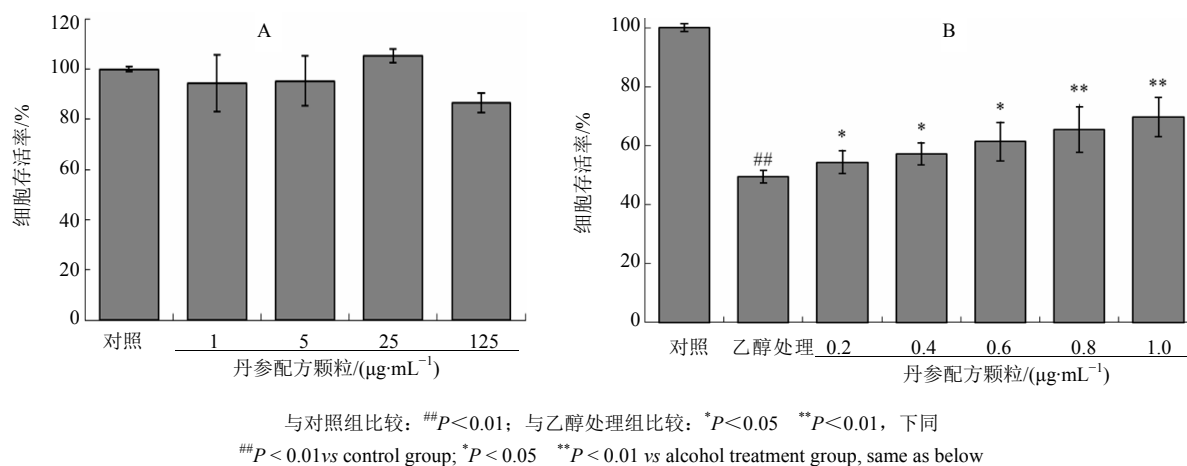


图 1 丹参配方颗粒对正常 (A) 及乙醇损伤 (B) PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of DFG on survival rates of PC12 cells (A) and of damaged PC12 cells induced by alcohol (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 对乙醇损伤 PC12 细胞 LDH 活性的影响

PC12 细胞培养上清中 LDH 活性检测结果显示, 800 mmol/L 乙醇处理 PC12 细胞 24 h, 细胞培养液中 LDH 活性 [(338.83 ± 9.07) U/mL] 显著高于对照组 [(120.92 ± 24.7) U/mL] ($P < 0.01$)。同时加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒溶液的细胞培养液上清中 LDH 活性分别为 (311.55 ± 8.05) 、 (297.09 ± 18.74) 、 (209.9 ± 20.14) 、 (182.11 ± 15.55) 、 (168.34 ± 10.64) U/mL, 与乙醇处理组相比显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。说明丹参配方颗粒减少了细胞内 LDH 的释放, 减少了乙醇诱导的 PC12 细胞死亡。见图 2。

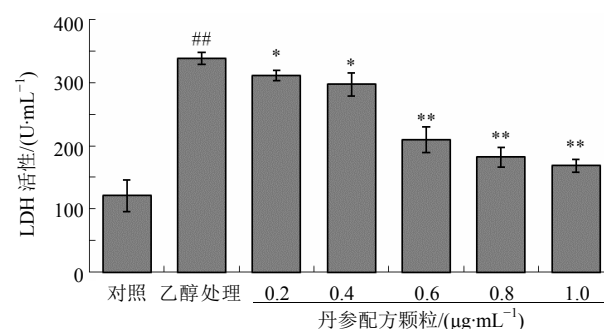


图 2 丹参配方颗粒对乙醇损伤 PC12 细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effects of DFG on LDH release in damaged PC12 cells induced by alcohol ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 对乙醇诱导 PC12 细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测细胞凋亡结果见图 3。对照组细胞凋亡率仅为 $(3.192 \pm 0.658) \%$ ，800 mmol/L 乙醇处理后细胞凋亡率为 $(51.375 \pm 1.901) \%$ ，显著高于对照组 ($P < 0.01$)；经 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒处理后，凋亡率降为 $(30.747 \pm 1.119) \%$ ，较乙醇处理组显著降低 ($P < 0.01$)。为进一步验证丹参配方颗粒对乙醇诱导 PC12 细胞凋亡的影响，用 Annexin V/PI 标记染色，流式细胞仪测定细胞凋亡率，结果见图 4。对照组细胞凋亡率为 $(4.77 \pm 1.51) \%$ ，800 mmol/L 乙醇处理后细胞凋

亡率为 $(30.85 \pm 4.12) \%$ ，显著高于对照组 ($P < 0.01$)；经 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒处理后，凋亡率为 $(12.70 \pm 1.36) \%$ ，较乙醇处理组显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 对乙醇诱导 PC12 细胞 ROS 水平的影响

对照组 PC12 细胞荧光背景很弱，表明细胞内 ROS 的量很少。经 800 mmol/L 乙醇处理的细胞显示了很强的荧光强度，表明乙醇诱导细胞 ROS 生成，氧化应激增强。经 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒处理后，细胞荧光强度明显减弱，提示丹参配方颗粒能抑制乙醇诱导的 ROS 生成，见图 5。

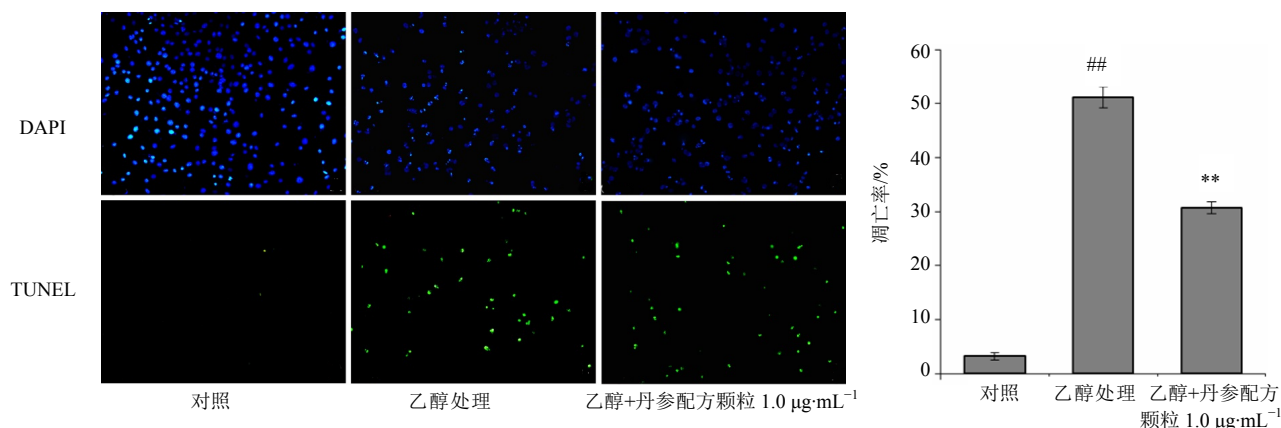


图 3 TUNEL 检测丹参配方颗粒对乙醇损伤 PC12 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Observation on DFG protection against alcohol-induced apoptosis of PC12 cells by TUNEL

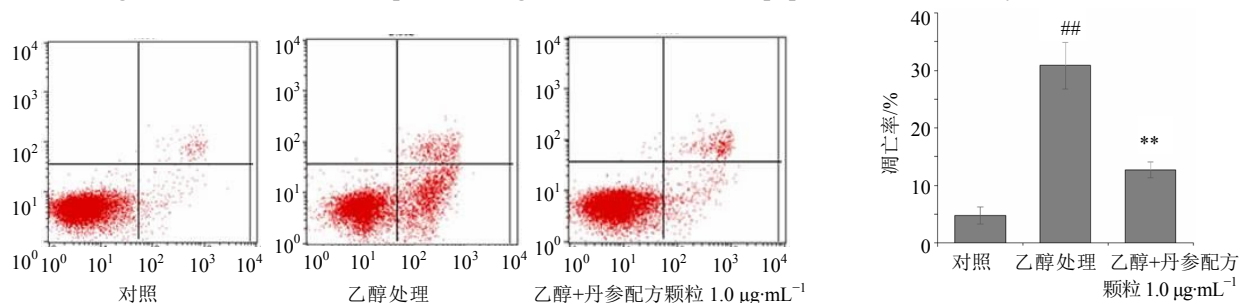


图 4 Annexin V/PI 标记染色检测丹参配方颗粒对乙醇损伤 PC12 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Observation on DFG protection against alcohol-induced apoptosis of PC12 cells by Annexin V/PI label staining

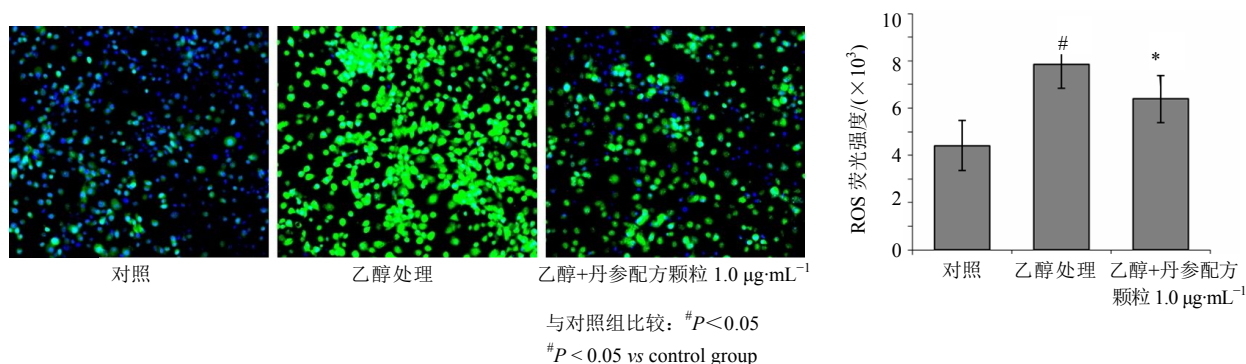


图 5 丹参配方颗粒对乙醇损伤 PC12 细胞 ROS 量的影响

Fig. 5 Effect of DFG on ROS content in damaged PC12 cells induced by alcohol

3.6 对 PC12 细胞 MDA、SOD、CAT、GSH-Px 水平的影响

与对照组比较, 经 800 mmol/L 乙醇处理的 PC12 细胞 MDA 的量显著升高($P<0.01$); 而 SOD、

CAT 和 GSH-Px 活性显著降低($P<0.01$)。同时加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒后, 细胞 MDA 水平显著降低($P<0.01$), 而 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性显著升高($P<0.01$)。见表 1。

表 1 丹参配方颗粒对乙醇损伤 PC12 细胞 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of DFG on levels of MDA, SOD, CAT, and GSH-Px in damaged PC12 cells induced by alcohol ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MDA/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
对照	0.045 1 $\pm$ 0.001 4	1.806 4 $\pm$ 0.114 6	76.355 $\pm$ 11.620	5.676 1 $\pm$ 0.867 9
乙醇处理	0.078 4 $\pm$ 0.007 9 ^{##}	1.312 3 $\pm$ 0.108 5 ^{##}	30.283 $\pm$ 3.848 ^{##}	3.235 6 $\pm$ 0.672 8 ^{##}
乙醇+丹参配方颗粒	0.061 6 $\pm$ 0.004 2 ^{**}	1.534 8 $\pm$ 0.023 8 ^{**}	56.841 $\pm$ 5.621 ^{**}	5.036 5 $\pm$ 0.153 3 ^{**}

4 讨论

PC12 细胞是一种类神经元细胞系, 具有与神经元类似的生长特性, 常用于神经退行性疾病的药物筛选、效果评价及机制研究。本研究的 MTT 实验结果显示, 不同质量浓度的丹参配方颗粒对培养的正常 PC12 细胞存活率影响不显著。但用丹参配方颗粒作用于 800 mmol/L 乙醇损伤的 PC12 细胞时, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 丹参配方颗粒溶液能够显著抑制细胞损伤, 这种保护作用在一定质量浓度 (0.2~1.0 $\mu\text{g/mL}$) 内随丹参配方颗粒浓度的增加而增强, 说明丹参配方颗粒对乙醇所致 PC12 细胞的损伤具有保护作用。LDH 检测结果显示, 丹参配方颗粒能够减少乙醇所致 PC12 细胞的 LDH 释放, 进一步证明丹参配方颗粒对 PC12 细胞的保护作用。

乙醇及其代谢产物能够导致细胞线粒体受损、内质网应激, 并通过某些细胞因子的释放, 大量产生并释放羟自由基、超氧阴离子和过氧化氢等, 氧化应激造成细胞膜脂质过氧化^[10-11], 细胞内各种抗氧化酶活性降低^[12-14], 最终导致细胞凋亡。丹参的活性成分包括脂溶性的丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、红根草邻醌及丹参二醇和水溶性成分丹酚酸 A、丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素等^[15-17], 有研究证明丹参水溶性成分丹酚酸 A 能够显著的清除氧自由基^[18], 丹酚酸 B 则显著减少 H₂O₂ 对 PC12 细胞的氧化损伤^[19]。本实验结果也显示乙醇导致 PC12 细胞 ROS 显著增加, 细胞抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性显著下降。但用 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的丹参配方颗粒溶液处理后, 细胞内 ROS 明显下降, 细胞膜脂类氧化成分 MDA 的量也有效降低, 细胞 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性恢复, 提示丹参配方颗粒可能通过提高细胞抗氧化酶的活性减少 ROS 释

放, 避免细胞进入凋亡程序。TUNEL 和流式细胞仪检测结果也证明, 丹参配方颗粒可以有效降低乙醇诱导的 PC12 细胞凋亡。说明丹参配方颗粒对乙醇所致神经细胞损伤具有潜在的预防和治疗作用, 值得进一步研究和开发。

参考文献

- [1] Sari Y, Weedman J M, Ge S. Activity-dependent neurotrophic factor-derived peptide prevents alcohol-induced apoptosis, in part, through Bcl2 and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways in fetal brain of C57BL/6 mouse [J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 465-473.
- [2] Liu L, Cao J X, Sun B, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibition of chronic ethanol-induced oxidative damage via upregulation of phosphatidylinositol-3 -kinase/Akt and modulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in PC12 cells and neurons [J]. *Neuroscience*, 2010, 167(4): 1115-1124.
- [3] Sheth D S, Tajuddin N F, Druse M J. Antioxidant neuroprotection against ethanol-induced apoptosis in HN2-5 cells [J]. *Brain Res*, 2009, 1285: 14-21.
- [4] 董越娟, 石贞玉, 刘诗濛, 等. 酒精诱导嗜铬细胞瘤细胞自噬及其与 P62 作用的关系 [J]. *解剖学报*, 2013, 44(6): 772-777.
- [5] Casswell S E, Thamarangsi T. Reducing harm from alcohol: call to action [J]. *Lancet*, 2009, 373(9682): 2247-2257.
- [6] Cho K H, Lee S M. Altered activity of cytochrome P450 in alcoholic fatty liver exposed to ischemia/reperfusion [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(1): 50-57.
- [7] Chen C Y, Li H, Yuan Y N, *et al.* Antioxidant activity and components of a traditional Chinese medicine formula consisting of *Crataegus pinnatifida* and *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Compl Alter Med*, 2013, 13(1): 99-104.

- [8] 应 军, 倪庆纯, 杨 威, 等. 杭白菊、当归、丹参提取液抑制黄褐斑形成及机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 958-962.
- [9] Lam B Y, Lo A C, Sun X, *et al.* Neuroprotective effects of tanshinones in transient focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(4): 286-291.
- [10] Tilg H, Moschen A R, Kaneider N C. Pathways of liver injury in alcoholic liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(5): 1159-1161.
- [11] Cohen J I, Roychowdhury S, DiBello P M, *et al.* Exogenous thioredoxin prevents ethanol-induced oxidative damage and apoptosis in mouse liver [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1709-1717.
- [12] Chen Y, Dong H, Thompson D C, *et al.* Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 38-44.
- [13] Wheeler M D, Kono H, Rusyn I, *et al.* Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(5): 1241-1250.
- [14] Kessova I G, Ho Y S, Thung S, *et al.* Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase [J]. *Hepatology*, 2003, 38(5): 1136-1145.
- [15] Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.
- [16] 王冰瑶, 吴晓燕, 樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2571-2575.
- [17] 李红艳, 刘艳杰, 王 倩, 等. 具有酪氨酸酶抑制活性的丹参有效成分筛选研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 85-89.
- [18] Sun Y, Zhu H, Wang J, *et al.* Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(8/9): 733-737.
- [19] Liu C S, Chen N H, Zhang J T. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae* [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(7/8): 492-497.