

基于析因设计的川芎嗪和阿魏酸配伍抗 PC12 氧糖剥夺损伤的交互作用研究

刘璐¹, 徐士欣^{2*}, 张军平^{2*}, 张男男¹, 杨惠林¹

1. 天津中医药大学, 天津 300073

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300112

摘要: **目的** 观察川芎嗪和阿魏酸配伍对 PC12 糖氧剥夺 (OGD) 损伤的预保护作用, 优化配比组合。**方法** 体外培养 PC12, 考虑 A (是否 OGD 造模)、B (川芎嗪 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 及 C (阿魏酸 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 3 个因素, 采用完全随机分组的 $2 \times 3 \times 3$ 析因设计。倒置相差显微镜观察造模前后细胞形态; MTS 测细胞活力; 采用乳酸脱氢酶 (LDH) 法测定细胞损伤, 并进行析因分析。**结果** 与对照组比较, 模型组细胞变圆或肿胀, 突起回缩或消失, 细胞膜褶皱或破损, 胞体折光性差, 细胞数目明显减少, 细胞活力降低; 与模型组比较, 加药组细胞损伤得到不同程度的改善, 细胞活力增加, 川芎嗪 2 $\mu\text{mol/L}$ +阿魏酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 改善作用最明显。A、B、C 3 因素均对 LDH 值具有显著影响 ($P < 0.01$), 且 B、C 间存在交互作用 ($P < 0.01$), 以川芎嗪 2 $\mu\text{mol/L}$ 、阿魏酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 配比时, LDH 值最低。**结论** 川芎嗪与阿魏酸合用对 PC12 剥夺糖氧损伤具有预保护作用, 川芎嗪与阿魏酸配比具有交互作用, 最佳配比为 2 : 20。

关键词: 川芎嗪; 阿魏酸; PC12 细胞; 析因分析

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018)09- 1597- 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.006

Compatibility of Tetramethylpyrazine and Ferulic Acid Interaction of anti PC12 damage based on Factorial Design

LIU Lu¹, XU Shixin², ZHANG Junping², ZHANG Nannan¹, YANG Huilin¹

1. Tianjin Chinese Medical University, Tianjin 300073, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300112, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of monomer tetramethylpyrazine (TMP) and ferulic acid (FA) on PC12 with oxygen-glucose deprivation (OGD) injury and optimize the combination ratio. **Method** PC12 cells were cultured *in vitro*, and A (whether OGD), B (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ TPM), and C (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ FA) were considered as three factors. Adopting completely randomized $2 \times 3 \times 3$ factorial design, using inverted phase contrast microscope to observe cell morphology, and MTS and lactic dehydrogenase method were used to detect cell activity. **Results** Compared with the control group, the cells in the model group became round or swollen, the processes were retracted or disappeared, the cell membrane was folded or damaged, the refraction of cell body was poor, the number of cells was significantly reduced, and the cell viability was decreased; Compared with the model group, the cell injury was improved in varying degrees and the cell viability was increased in the treated group, and 2 $\mu\text{mol/L}$ TMP + 20 $\mu\text{mol/L}$ FA had the most obvious positive effect. Factor A, B, and C had a significant effect on LDH ($P < 0.01$), and there is an interaction between factor B and C ($P < 0.01$), and when the dose of TMP and FA respectively was 2 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$, the value of LDH was lowest. **Conclusion** TMP combined with FA had a protective effect on PC12 cells with OGD injury. There is an interaction between TMP and FA, and their best ratio is 2:20.

Key words: tetramethylpyrazine; ferulic acid; PC12; factorial analysis

脑卒中是当今世界引起死亡的疾病之一, 该病在 2012 年世界死亡人数已达到 6 671 万人, 在所有疾病死亡中占了 11.9%, 其中, 缺血性脑卒中大约占 80%^[1]。川芎-当归是治疗缺血性脑血管病的常用

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373850, 81774059)

第一作者: 刘璐, 硕士, 从事中医药防治心脑血管疾病。Tel: 15902263080 E-mail: 631249259@qq.com

*通信作者: 张军平, 博士, 教授, 主要从事中医药防治心脑血管疾病的研究工作。Tel: (022)27432016 E-mail: tjzhtcm@163.com

徐士欣, 博士, 副教授, 主要从事中医药防治心脑血管疾病的研究工作。Tel: (022)27987795 E-mail: xushixintj@163.com

药对^[2], 川芎, 性温味辛, 具有祛风行气, 活血止痛的功效; 当归, 性温味甘辛, 具有补血和血、调经止痛、润肠通便之功效^[3]。两药伍用共奏养血活血、化瘀通络之效。通过对川芎、当归有效成分进行药理研究发现, 川芎嗪、阿魏酸等均在脑损伤病理机制的不同环节产生效应。如川芎嗪可透过血脑屏障, 抑制钙超载、减少细胞凋亡基因表达、抑制血小板凝集、抑制炎症反应等^[4]; 阿魏酸可抑制炎症反应、清除自由基、抗血栓等^[5]。二者配比是否有交互作用尚不明确。因此, 本实验采用析因设计, 从抗细胞损伤方面探讨阿魏酸与川芎嗪配伍对 PC12 氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型预保护的交互作用及最优配比组合。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

川芎嗪 (Solarbio, 批号 ST8120); 阿魏酸 (Solarbio, 批号 SF8030); 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 批号 25200); DMEM 高糖培养基 (HyClone, 批号 AC10231031); 胎牛血清 (货号 04-001-1ACS, 批号 1729601, Gibco); 无糖培养基 (Gibco, 批号 1868979); 0.25% 胰蛋白酶、青霉素和链霉素混合液 (HyClone, 批号 J160021); MTS 试剂盒 (Promega, 批号 0000251174); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成生物研究工程所)。

1.2 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (高分化; PC12), 购自武汉博士德生物科技有限公司, 批号 CX0247。

1.3 仪器

倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); DL-CJ-2NDI 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); Hera cell 150i 型 CO₂ 恒温孵育箱 (德国 Thermo 公司); TDZ4-WS 台式低速离心机 (湖南湘仪仪器有限公司); BGZ-240 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 立式压力蒸气灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

2 方法

2.1 PC12 细胞的培养

PC12 细胞经复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养。当细胞覆盖瓶底面积达 80% 时, 倒掉培养液, 用 PBS 轻轻荡洗 1 次, 加入浓度为 0.25% 的胰蛋白酶液, 消化 1~2 min 离心, 用完全培养基重悬, 以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔中, 置于 37 °C、5%

CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养。24 h 后细胞贴壁, 吸弃全部完全培养基并加入相应药物配比培养基。

2.2 实验设计

本实验采用完全随机分组 3 因素多水平析因设计全面考察造模与否、阿魏酸 (高、中、低剂量)、川芎嗪 (高、中、低剂量) 对 PC12 损伤的预保护作用。具体为: ①是否造模: 造模则药物同步处理 OGD 12 h (A1); 不造模则不作 OGD 处理 (A2); ②阿魏酸: 终浓度分别为 5、10、20 μmol/L (B1、B2、B3); ③川芎嗪: 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0 μmol/L (C1、C2、C3), 药物剂量的设定依据预实验的 EC₅₀ 值。

2.3 分组、给药设计

实验分为 3 组: 对照组加入高糖培养基, 正常培养 12 h; OGD 模型组加入无糖培养基, 置于 5% CO₂ 和 95% N₂ 和 1% O₂ 的 37 °C 三气培养箱中培养 12 h; 模型加药组的设计: 两种药物交叉组合 B1C1、B1C2、B1C3、B2C1、B2C2、B2C3、B3C1、B3C2、B3C3 共 9 个加药组, 用无糖培养基配比, 放入 37 °C 含 5% CO₂、94% N₂ 和 1% O₂ 的培养箱内培养 12 h。每组重复 3 次。

2.4 标本采集与检测

取造模前后的 PC12 于显微镜下进行形态学观察。提取处理后的细胞上清, 采用 LDH 法测细胞活力。用 MTS 法检测细胞增殖, 在 96 孔板培养体系中加入 20 μL 试剂 (每孔 100 μL 完全培养基); 置于 37 °C、5% CO₂ 环境下孵育 4 h; 490 nm 处读取吸光度 (A) 值并计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药/模型}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 统计分析

数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 首先对各因素间进行方差齐性检验, 方差齐则进行析因分析统计分析, 若方差不齐, 将数据变换之后再行统计分析。

3 结果

3.1 倒置显微镜观察 PC12 细胞形态变化

对照组 PC12 细胞贴壁生长, 细胞膜光滑且完整, 胞体折光性较强, 细胞伸出单个或多个突起, 突起之间交织成网状; 与对照组比较, 模型组细胞变圆或肿胀, 突起回缩或消失, 细胞膜褶皱或破损, 胞体折光性差, 细胞数目明显减少; 与模型组比较, 加药组细胞损伤得到不同程度的改善, 川芎嗪 2 μmol/L+阿魏酸 20 μmol/L 改善作用最明显。见图 1。

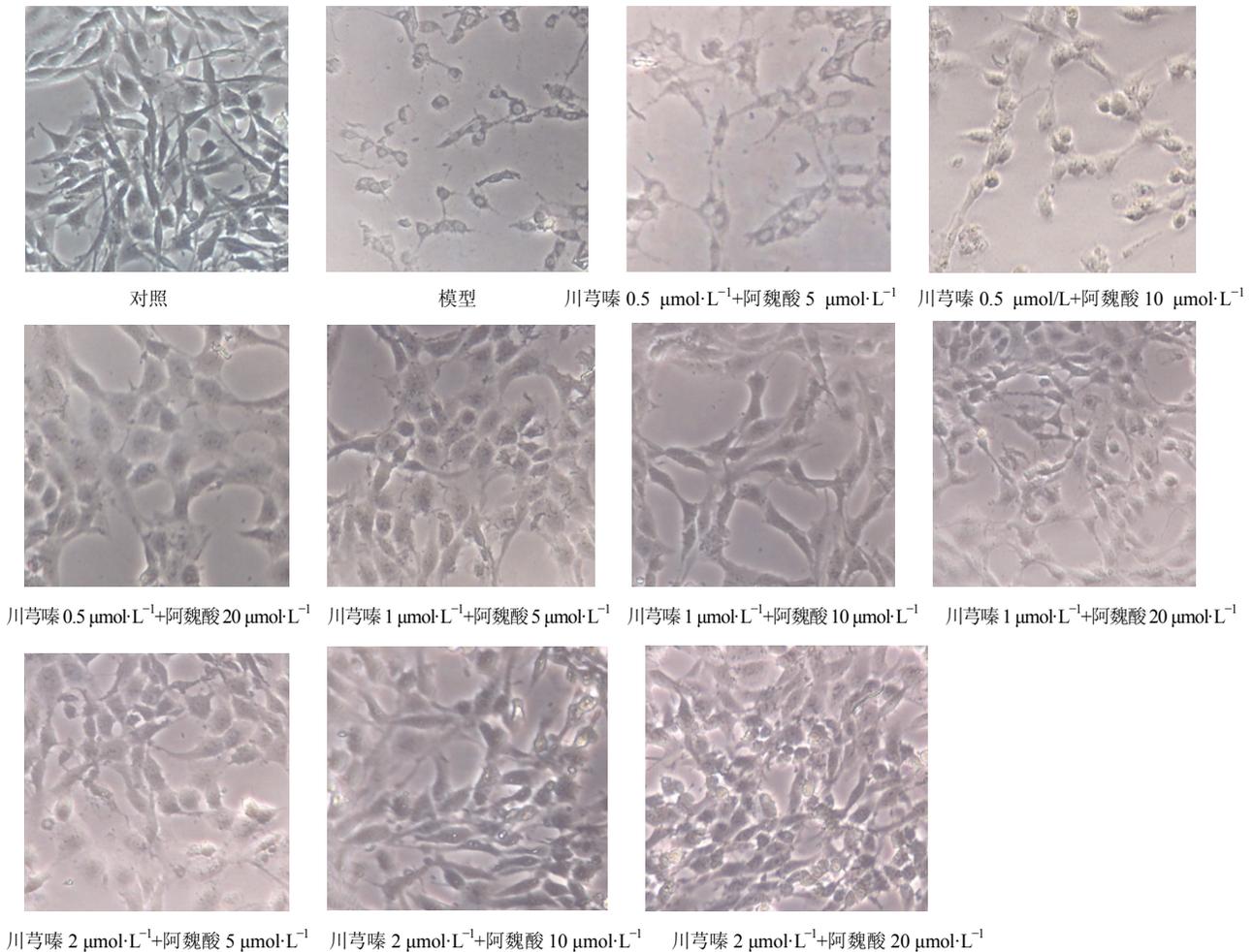


图 1 PC12 细胞造模前后形态对比

Fig. 1 Morphological change of PC12 cells before and after model establishment

3.2 析因设计各组 LDH 活性比较及 MTS 法检测各组 PC12 细胞存活率

2×3×3 析因设计各组 LDH 活性比较及 MTS 法检测各组 PC12 细胞存活率, 见表 1。结果表明, 同等剂量川芎嗪配伍, 随着阿魏酸的剂量增加, 细胞存活率明显提高, LDH 值与细胞存活率成反比; 同等剂量阿魏酸配伍, 随着川芎嗪剂量的增加, 细胞存活率明显提高, LDH 值与细胞存活率成反比。川芎嗪与阿魏酸合用对 PC12 糖氧剥夺损伤具有保护作用。

3.3 方差分析结果

结果表明是否造模、川芎嗪及阿魏酸不同剂量配比均对 LDH 值具有极显著影响 ($P < 0.01$)。见表 2。进一步采用 LSD 法进行多重比较, 结果显示川芎嗪低、中、高、低, 中、高剂量间对 LDH 值的影响具有统计学意义 ($P < 0.01$); 阿魏酸低、中, 中、高, 高、低剂量间对 LDH 值的影响具有统计

表 1 各组 LDH 活性及细胞存活率比较

Table 1 Comparison of LDH and cell survival rate in each group

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDH/ ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	存活率/%
对照	—	16.17±0.83	100.00±0.000
模型	—	92.95±4.07	63.44±2.19
川芎嗪+	0.5+5	80.82±5.09	69.28±2.36
阿魏酸	0.5+10	71.95±2.21	74.16±1.92
	0.5+20	62.30±2.01	79.72±2.04
	1.0+5	67.45±2.20	76.43±2.25
	1.0+10	63.82±3.36	78.37±1.84
	1.0+20	58.95±2.36	80.95±2.44
	2.0+5	55.07±3.14	83.00±2.60
	2.0+10	44.28±3.12	88.14±1.66
	2.0+20	35.95±2.10	93.08±1.19

学意义 ($P < 0.01$), 不同剂量的川芎嗪及阿魏酸之间具有交互作用, 川芎嗪 2 $\mu\text{mol/L}$, 阿魏酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, LDH 值最低, 川芎嗪与阿魏酸的最佳配比为 2:20。见表 3~4。

表 2 析因设计的方差分析

Table 2 Analysis of variance of factorial design

变异来源	平方和	自由度	均方	F	Sig.
校正模型	9 013.885A	8	1 126.736	125.908	0.000
截距	194 820.227	1	194 820.227	21 770.416	0.000
B (川芎嗪)	6 664.056	2	3 332.028	372.341	0.000
C (阿魏酸)	2 128.347	2	1 064.174	118.917	0.000
B×C	221.482	4	55.370	6.187	0.000
误差	402.698	45	8.949		
总计	204 236.810	54			
校正的总计	9 416.583	53			

$R^2 = 0.957$ (校正 $R^2 = 0.950$)

$R^2 = 0.957$ (corrected $R^2 = 0.950$)

表 3 川芎嗪及阿魏酸不同剂量对 PC12 LDH 值的单独效应 (LSD 多重比较结果)

Table 3 Separate effects of different doses of TMP and FA on LDH values of PC12 cells (LSD multiple comparison results)

(I)川芎嗪	(J)川芎嗪	均值差(I-J)	标准误	P 值	(I')阿魏酸	(J')阿魏酸	均值差(I'-J')	标准误	P 值
0.5	1	8.283 3*	0.997	0.000	5	10	7.761 1*	0.998	0.000
0.5	2	26.588 9*	0.997	0.000	5	20	15.377 8*	0.998	0.000
1	2	18.305 6*	0.997	0.000	10	20	7.616 7*	0.998	0.000

* $P < 0.05$

表 4 不同剂量间川芎嗪与阿魏酸对体外培养的 PC12 LDH 值的交互作用

Table 4 Interaction between different doses of TMP and FA on LDH values of PC12 cells *in vitro*

川芎嗪/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	阿魏酸/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	均值	标准误	95%置信区间	
				下限	上限
2	20	35.950	1.221	33.490	38.410
	10	44.283	1.221	41.824	46.743
	5	55.067	1.221	52.607	57.526
1	20	58.950	1.221	56.490	61.410
	10	63.817	1.221	61.357	66.276
	5	67.450	1.221	64.990	69.910
0.5	20	62.300	1.221	59.840	64.760
	10	71.950	1.221	69.490	74.410
	5	80.817	1.221	78.357	83.276

4 讨论

缺血性脑卒中属于中医学“中风”“卒中”等范畴, 尽管其病机变化多端, 但瘀阻脑络贯穿脑缺血损伤的始末, 应用活血化瘀药常可收到不同程度的治疗效果。当归甘辛性温, 质润, 具有养血活血之效。川芎辛温而燥, 善于行走, 既活血化瘀又行气祛风。二者是中医常用药对, 如《普济本事方》中的佛手散和芎归汤就是当归川芎两味药配伍组成。

该对药亦常用于治疗缺血性脑血管疾病。川芎嗪是川芎的有效成分之一, 可透过血脑屏障, 抑制钙超载、减少细胞凋亡基因表达、抑制炎症反应等。实验研究发现, 川芎嗪在大鼠局灶性脑缺血模型中对神经元具有神经保护作用, 并减轻大脑缺血再灌注损伤^[6]。川芎嗪保护大脑的机制可能与其减少神经递质释放, 抑制中性粒细胞激活, 促进大脑内皮细胞增殖有关^[7-9]。阿魏酸是川芎和当归的主要水溶性

成分,具有减少自由基、抑制炎症反应、削弱细胞凋亡等作用。在脑缺血和再灌注损伤后,阿魏酸可防止氧化应激引起的细胞凋亡,对大脑缺血具有神经保护作用^[10-11]。通过检测川芎-当归配伍后煎出物成分的改变,发现没有新的峰出现,但阿魏酸的含量存在不同程度的增加,由此推测阿魏酸可能是川芎-当归配伍增效的物质基础之一^[12-13]。川芎嗪和阿魏酸具有生物利用性低,代谢快,半衰期短等特点。有实验证明,与单独用药比较,川芎嗪和阿魏酸合用半衰期和平均驻留时间均延长^[14-15]。因此优化川芎嗪和阿魏酸的生物利用性,以增强其治疗效果,对于临床药物的应用至关重要。

本实验以 PC12 细胞为实验对象,模拟神经体外缺氧缺糖模型,缺氧缺糖的同时给予药物预处理,探讨阿魏酸与川芎嗪配伍对 PC12 OGD 模型损伤的预保护的交互作用及最优配比组合。本实验研究发现:与对照组比较,缺氧缺糖使 PC12 细胞存活率减少、LDH 漏出率增加。与 OGD 模型组比较,给予药物干预后,PC12 细胞存活率增加、LDH 漏出减少,减轻了 OGD 引起的细胞损伤。表明川芎嗪阿魏酸配伍对 PC12 缺氧缺糖具有预保护作用,提高细胞活性,减少细胞损伤,从而发挥神经保护作用。本研究证实,川芎嗪与阿魏酸配比具有交互作用。同等剂量川芎嗪配伍,随着阿魏酸的剂量增加,细胞存活率明显提高;同等剂量阿魏酸配伍,随着川芎嗪剂量的增加,细胞存活率明显提高,最佳配比为 2:20。

本研究通过阿魏酸和川芎嗪的配比应用,提高了二者的生物利用性,有助于药对的基础研究以及当归-川芎药对为主的新药开发。但二者的药效物质基础和作用机制还需进一步的实验研究。

参考文献

- [1] Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [2] 王宜艳,滕晶. 基于中医传承辅助系统的治疗中风病古方用药规律分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21): 197-201.
- [3] 金益,濮宗进,唐于平,等. 当归-红花药对活血功效相互作用研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2087-2092.
- [4] Tang Z, Wang Q, Xu H, et al. Microdialysis sampling for investigations of tetramethylpyrazine following transdermal and intraperitoneal administration [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50(3-4): 454-458.
- [5] Wu K, Wang Z, Liu D, et al. Pharmacokinetics, brain distribution, release and blood-brain barrier transport of Shunaoxin pills [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(3): 1133-1140.
- [6] Xiao X, Liu Y, Qi C, et al. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(5): 547-555.
- [7] Han J, Wan H T, Yang J H, et al. Effect of ligustrazine on levels of amino acid neurotransmitters in rat striatum after [8] cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(11): 1060-1067.
- [9] Chang C Y, Kao T K, Chen W Y, et al. Tetramethylpyrazine inhibits neutrophil activation following permanent cerebral ischemia in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 421-427.
- [10] Zhang M, Gao F, Teng F, et al. Tetramethylpyrazine promotes the proliferation and migration of brain endothelial cells [J]. *Mol Med Reports*, 2014, 10(1): 29-32.
- [11] Cheng C, Su S, Tang N, et al. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats [J]. *Brain Res*, 2008, 1209: 136-150.
- [12] Zhang L, Wang H, Wang T, et al. Ferulic acid ameliorates nerve injury induced by cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(3): 972-976.
- [13] 张焕,王一涛,严灿,等. 当归与川芎药理作用研究进展与比较 [J]. *时珍国医国药*, 2008, (2): 293-295.
- [14] 周长征. 当归川芎药对研究概况 [J]. *山东中医杂志*, 2011, 30(8): 587-589.
- [15] 冯彬彬,张建海,张继芬,等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍药代动力学比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(7): 900-903.
- [16] 冯彬彬,张建海,张继芬,等. 不同配伍对川芎嗪体内药代动力学影响 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(9): 1311-1314.