

丹参与红花有效成分配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

陈裕琳, 万海同, 周惠芬, 虞立, 何昱, 李畅, 程兰, 杨洁红*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 探究丹参与红花有效成分的不同配伍组方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 选取成年雄性 SD 大鼠, 通过大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注模型, 随机分成假手术组、模型组、阳性对照组(丹红注射液 2 mL/kg)以及采用正交试验法 $L_9(3^4)$ 对丹参与红花主要有效成分[丹参素、丹酚酸 A、丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A (HYSA)] 剂量配伍 9 组。大鼠尾 iv 给药, 每天 1 次, 连续给药 3 d 后进行神经功能缺损评分; 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠大脑皮层中葡萄糖调控蛋白 78 (GRP-78)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、内质网源性转录因子 (CHOP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 表达; HE 染色检测大鼠大脑皮层病理变化; 免疫组化法检测大鼠大脑皮层中 NF- κ B p65 蛋白的表达情况。结果 与模型组比较, 丹红注射液、丹参与红花主要有效成分配伍可显著降低脑缺血再灌注大鼠的神经功能评分, 使大鼠大脑皮层 GRP-78 mRNA 表达水平升高, NF- κ B p65、CHOP、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平降低, 抑制大鼠大脑皮层中 NF- κ B p65 蛋白表达。丹参与红花主要有效成分配伍 9 组中第 4 组(丹参素 30 mg/kg、丹酚酸 A 2.5 mg/kg、丹酚酸 B 16 mg/kg、HYSA 8 mg/kg)、第 6 组(丹参素 30 mg/kg、丹酚酸 A 10 mg/kg、丹酚酸 B 8 mg/kg、HYSA 4 mg/kg)对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用更为显著。结论 丹参与红花有效成分各配伍组方均能对脑缺血再灌注损伤大鼠内质网应激、炎症等方面起良好的保护作用。

关键词: 丹参; 红花; 丹红注射液; 脑缺血再灌注; 内质网应激; 抗炎; 丹参素; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 羟基红花黄色素 A
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3875-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.022

Protective effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* active ingredients in different compatibility on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

CHEN Yu-lin, WAN Hai-tong, ZHOU Hui-fen, YU Li, HE Yu, LI Chang, CHENG Lan, YANG Jie-hong

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To explore the protective effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* active ingredients in different compatibility on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Adult male Sprague-Dawley (SD) rats were selected to establish a cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury model by middle cerebral artery occlusion (MCAO) method. The rats were randomly divided into sham operation group, model group, and positive control group (Danhong Injection 2 mL/kg); And orthogonal test method $L_9(3^4)$ was adopted to compose nine compatibility groups from main active ingredients of *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius* (trashinol, salvianolic acid A, salvianolic acid B, and HYSA). Rats were tail iv administrated once daily for continuous 3 d. Score neurological deficit was evaluated after 3 d; qRT-PCR was used to detect mRNA expression of glucose regulated protein 78 (GRP-78), nuclear factor- κ B (NF- κ B), C/EBP homologous protein (CHOP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6); HE staining was used to detect the pathological changes of cerebral cortex, and the expression of NF- κ B p65 protein in cerebral cortex was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared to the model group, Danhong Injection group and orthogonal compatibility nine groups significantly reduced the neurological deficit scores of rats with cerebral ischemia-reperfusion; increased the mRNA expression of GRP-78 in the cerebral cortex; decrease the mRNA expression of NF- κ B, CHOP, TNF- α , and IL-6, and decrease the protein expression of NF- κ B p65 in the cerebral cortex. The results also showed that the protective effects of the 4th group (danshensu 30 mg/kg, salvianolic acid A 2.5 mg/kg, salvianolic acid B 16 mg/kg, and HYSA 8 mg/kg), 6th group (trashinol 30 mg/kg, salvianolic acid A 10 mg/kg, salvianolic acid B 8 mg/kg, and HYSA 4 mg/kg) in the 9th group were more significant for cerebral ischemia reperfusion

收稿日期: 2018-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630105); 浙江省自然科学基金项目 (LZ17H270001, LZ18H270001)

作者简介: 陈裕琳 (1993—), 女, 浙江杭州人, 主要从事中药治疗脑血管相关药理、药动学研究。E-mail: chenylun0911@126.com

*通信作者 杨洁红 Tel: (0571)86613711 E-mail: yjhong@zjctcm.net

injury in rats. **Conclusion** The active components of *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius* can play a good protective role in endoplasmic reticulum stress and inflammation in rats with cerebral ischemia reperfusion injury.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *Carthamus tinctorius* L.; Danhong Injection; ischemia-reperfusion; endoplasmic reticulum stress; anti-inflammation; trashinol; salvianolic acid A; salvianolic acid B; hydroxysafflor yellow A

缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 是与心脏疾病、恶性肿瘤并列的人类三大致死性疾病之一, 流行病学研究表明, 脑血管病的死亡率居世界第 2 位^[1], 具有高发病率、高致残率、高致死率等特点, 由于其诱发因素多且复杂、发病急骤、最佳治疗时间窗短、损伤机制复杂, 现有的抗脑缺血化学药往往通过干预某一环节或某一途径进行治疗, 效果不甚理想, 而中医在治疗 ICVD 上多以中药复方进行预防与治疗, 因其多环节、多途径、多靶点的作用特点, 在临床用药中展现了确切的疗效及独特的优势^[2]。

药对是历代医家长期用药过程中的经验总结, 两药相合, 配伍简单、比例精巧、合群妙用, 是中药复方的重要基础, 既有复方的特性, 又因成分简单而更易于科学研究的深入。丹参-红花是经典药对之一。丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 在《中国药典》2015 年版中记载为“微寒, 归心、肝经, 活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效”, 大量实验研究与临床用药发现丹参对心脑血管疾病有良好的治疗效果^[3]。而红花 *Carthamus tinctorius* L. 则为常见活血化瘀之品, 性温, 归心、肝经, 功在活血通经、祛瘀止痛。故以丹参为君药, 红花为臣药, 二者合用, 一寒一温, 相辅相成, 除邪而不伤正, 活血通络、祛瘀生新, 成为中医临床常用的经典药对之一^[4], 其中以此为基础研发的中药制剂丹红注射液 (Danhong Injection, DHI) 现已在临床上广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[5], 大数据统计结果显示, 该品种为临床应用最多的活血化瘀中药注射剂之一^[6]。本实验选用丹参与红花中的主要有效成分 [丹参素、丹酚酸 A、丹酚酸 B 以及羟基红花黄色素 A (HYSA)]^[7], 采用正交试验设计方法, 对丹参与红花的有效成分与剂量配伍进行优选, 为中药复方制剂到简单组分配伍的优选提供新的实验研究思路和方法^[8], 并探究丹参与红花有效成分配伍对大鼠脑缺血再灌注的内质网应激、抗炎等多方面的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (270±20) g,

由浙江省医学科学院提供, 实验动物许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。所有大鼠均适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.2 药品、试剂及仪器

DHI (菏泽步长制药有限公司, 批号 16121045); 丹参素 (南京世洲生物科技有限公司, 批号 SZ201707038DSS, 质量分数 98%); 丹酚酸 A (南京世洲生物科技有限公司, 批号 SZ201706001DA, 质量分数 98%); 丹酚酸 B (南京世洲生物科技有限公司, 批号 SZ201706003DB, 质量分数 98%); HYSA (南京世洲生物科技有限公司, 批号 SZ201702005QA, 质量分数 98%)。

线栓 (北京西浓科技有限公司); 逆转录试剂盒 (ABM 公司); qRT-PCR 试剂盒 (ABM 公司); Trizol Reagent (日本 TakaRa 公司); 苏木素精 (美国 Simga 公司); 伊红 (上海三爱思试剂有限公司); 抗体稀释液 (北京中杉金桥生物有限公司); 葡萄糖调控蛋白 78 (GRP-78)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、内质网源性转录因子 (CHOP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; NF- κ B p65 抗体 (美国 Santacruz 公司)。

低温离心机 (北京医用离心机厂); 纯水仪 (美国 Millipore 公司); StepOne™ 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 石蜡切片机 (德国 Microm 公司); 显微镜摄像机、摊片机 (德国 Leica 公司); 隔水式恒温培养箱、电热恒温干燥箱 (中国上海精宏医疗设备有限公司)。

2 方法

2.1 脑缺血再灌注损伤大鼠模型制备

采用 Longa 等^[9]改良的线栓法制备大鼠大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型。手术前 12 h 大鼠禁食不禁水, ip 10% 水合氯醛 (4 mL/kg) 麻醉, 仰卧位固定, 腹面向上, 颈部正中位置切口, 钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌体肌间的间隙, 充分暴露颈总动脉 (CCA), 并分离颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA)。用丝线结扎 CCA 近心端以及 ECA 根部, 微型动脉夹夹闭 ICA, 在 CCA 近分叉部剪一“V”

形小口，将线栓光滑圆头端自切口处轻轻推入，打开颈内动脉夹，使线栓沿颈内动脉进入大脑中动脉起始端以完全阻断供血，固定栓线，1 h 后轻轻抽出线栓实现再灌注，扎紧切口，缝合回笼。假手术组除不插入线栓外，其他过程同上。整个过程均在室温（24~25 ℃）下进行。除假手术组外，大鼠苏醒后均出现右眼 Homer 征，提尾出现左前肢内收屈曲，行走时向左侧转圈或倾倒，且取材时未发现颅底出血者为模型制备成功。

2.2 分组及给药

将符合标准的 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组（DHI 2 mL/kg）、以及丹参与红花有效成分 L₉(3⁴) 正交配伍 9 组，共 12 组，每组 12 只。阳性对照组、丹参与红花有效成分配伍组于大鼠脑缺血后 1 h 立即尾 iv 给药，此后 2 d 相同时间段连续给药，连续 3 d，每天 1 次，假手术组与模型组尾 iv 给予等量生理盐水。丹参与红花有效成分配伍组配伍剂量见表 1。

表 1 丹参与红花有效成分配伍剂量

Table 1 Compatibility dose of active ingredients from *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius*

编号	剂量/(mg·kg ⁻¹)			
	丹参素	丹酚酸 A	丹酚酸 B	HYSA
配伍 1	15 (1)	2.5 (1)	8 (1)	2 (1)
配伍 2	15 (1)	5 (2)	16 (2)	4 (2)
配伍 3	15 (1)	10 (3)	24 (3)	8 (3)
配伍 4	30 (2)	2.5 (1)	16 (2)	8 (3)
配伍 5	30 (2)	5 (2)	24 (3)	2 (1)
配伍 6	30 (2)	10 (3)	8 (1)	4 (2)
配伍 7	60 (3)	2.5 (1)	24 (3)	4 (2)
配伍 8	60 (3)	5 (2)	8 (1)	8 (3)
配伍 9	60 (3)	10 (3)	16 (2)	2 (1)

2.3 大鼠神经功能症状评分

大鼠连续给药 3 d 后进行神经功能评分，采用 Longa^[9]5 级评分标准：0 分，未见神经功能缺损表现；1 分，轻度，提尾时对侧前肢向内屈曲，无法完全伸展对侧前肢；2 分，中度，行走时身体向偏瘫侧转圈（追尾症）；3 分，重度，行走困难，身体向偏瘫侧跌倒；4 分，不能自发行走或意识水平丧失。

2.4 HE 染色观察大鼠大脑皮层病理学状态

各组大鼠于给药 3 d 后，ip 10%水合氯醛（350

mg/kg）深度麻醉，心脏灌注生理盐水及 4%多聚甲醛至身体僵直，断头取脑，取脑组织切块，浸入 4%多聚甲醛磷酸缓冲溶液固定 24 h，自动脱水机内脱水、透明、浸蜡，透明石蜡包埋，石蜡切片机作连续冠状切片，HE 染色后光学显微镜观察脑组织皮层病理学特征，并采集图像。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大鼠大脑皮层 GRP-78、NF-κB p65、CHOP、TNF-α、IL-6 mRNA 表达情况

各组大鼠 ip 10%水合氯醛深度麻醉后，立即取脑，快速分离缺血侧大脑皮层，Trizol 法抽提总 RNA，逆转录得 cDNA，采用 qRT-PCR 检测。所用引物分别为 GRP78：上游 5'-TCAAGGTCTACGAA-GGTGAACGA-3'，下游 5'-CTCAAAGGTGACTTC-AATCTGGG-3'；NF-κB p65：上游 5'-ACAACATGAGGTCTCTGGGGG-3'，下游 5'-TCATCTATGTGCTGTCTTGTGGAG；CHOP：上游 5'-CACACCTGAAAGCAGAAACCG-3'，下游 5'-TGCCCCCAA-TTTCATCTGAG-3'；IL-6：上游 5'-TTGGAAATGAGAAAAGAGTTGTGC-3'，下游 5'-ACCAGAGCAGATTTTCAATAGGC-3'；TNF-α：上游 ACAAGGAGGAGAAGTTCCCAAAT，下游 5'-GTCTTTGAGATCCATGCCATTG-3'；GAPDH：上游 5'-GTCGGTG-TGAACGGATTG-3'，下游 5'-GTGCCGTTGAACTTGCCG-3'。逆转录反应条件：反应体系为 20 μL，25 ℃、10 min；42 ℃、15 min；85 ℃、5 min。qRT-PCR 反应条件：反应体系为 10 μL，95 ℃、3 min；95 ℃、15 s；53 ℃、30 s；72 ℃、15 s；共 40 个循环。反应结束后作溶解曲线分析，以 GAPDH 作为内参基因，采用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

2.6 免疫组化法检测大鼠大脑皮层 NF-κB p65 蛋白表达

大鼠脑组织石蜡包埋切片后，采用 EnVision^{TMM} 二步法进行免疫组化染色。二甲苯脱蜡后水化，采用高温高压进行抗原修复，3% H₂O₂ 水溶液阻断内源性过氧化物酶，滴加 NF-κB p65 一抗，37 ℃下孵育 60 min，PBS 冲洗后，滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体的二抗，在 37 ℃下孵育 30 min 后 PBS 冲洗 3 次，DAB 显色液显色 1 min，显微镜下控制反应，自来水冲洗终止反应，苏木素液复染细胞核 1 min，95%、100%乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

免疫组化 NF-κB p65 蛋白阳性定位于细胞浆和/

或核内，呈黄色，细胞核衬染呈蓝色；主要表达于脑内血管内皮细胞、神经元细胞和胶质细胞等。采用半定量计分方法，对阳性强度和阳性细胞数的乘积进行统计分析。

2.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析，组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响

假手术组大鼠未见神经功能行为异常（表 2）。与假手术组比较，模型组大鼠神经功能缺损严重（ $P < 0.001$ ）。与模型组比较，DHI 组、丹参与红花有效成分各配伍组大鼠神经功能缺失症状均有显著改善（ $P < 0.05$ ）；但 DHI 组与各配伍组之间未见显著性差异。

3.2 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮层病理变化的影响

光学显微镜下观察可见（图 1），假手术组大鼠大脑皮层结构完整，神经细胞形态规整，排列有序，胞质丰富，细胞核呈现圆形且核仁明显。模型组大鼠大脑皮层神经细胞间隙增宽，排列紊乱，胞体收缩明显，神经元中央性尼氏小体溶解和坏死，细胞核固缩为三角。DHI 组、丹参与红花有效成分各配伍组大鼠也出现了与模型组相似的病理变化，但与

模型组比较，神经细胞的结构形态变化有所减轻，其中配伍 4 组、6 组的损伤降低更为明显。HE 染色结果表明脑缺血再灌注发生后，DHI、丹参与红花有效成分配伍均能有效改善大鼠脑组织的病理变化。

表 2 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达量的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）
Table 2 Effects of main active ingredients compatibility of *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius* on neurological function and protein expression of NF- κ B p65 in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	神经功能评分	NF- κ B p65 蛋白表达量
假手术	0	1.50 $\pm$ 0.61
模型	3.17 $\pm$ 0.37**	11.25 $\pm$ 1.25**
DHI	1.83 $\pm$ 0.69 [#]	5.00 $\pm$ 0.89 ^{##}
配伍 1	1.67 $\pm$ 0.47 [#]	4.50 $\pm$ 0.55 ^{##}
配伍 2	1.50 $\pm$ 0.50 [#]	4.88 $\pm$ 1.22 ^{##}
配伍 3	1.67 $\pm$ 0.75 [#]	4.67 $\pm$ 0.52 ^{##}
配伍 4	1.33 $\pm$ 0.47 [#]	3.08 $\pm$ 0.79 ^{##SS}
配伍 5	1.80 $\pm$ 0.75 [#]	7.00 $\pm$ 0.77 ^{##SS}
配伍 6	1.33 $\pm$ 0.47 [#]	4.21 $\pm$ 1.25 ^{##}
配伍 7	1.67 $\pm$ 0.75 [#]	5.54 $\pm$ 0.60 ^{##}
配伍 8	1.50 $\pm$ 0.76 [#]	3.71 $\pm$ 1.14 ^{##}
配伍 9	2.00 $\pm$ 0.82 [#]	8.00 $\pm$ 1.22 ^{##SS}

与假手术组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与 DHI 组比较：^{SS} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^{SS} $P < 0.01$ vs DHI group

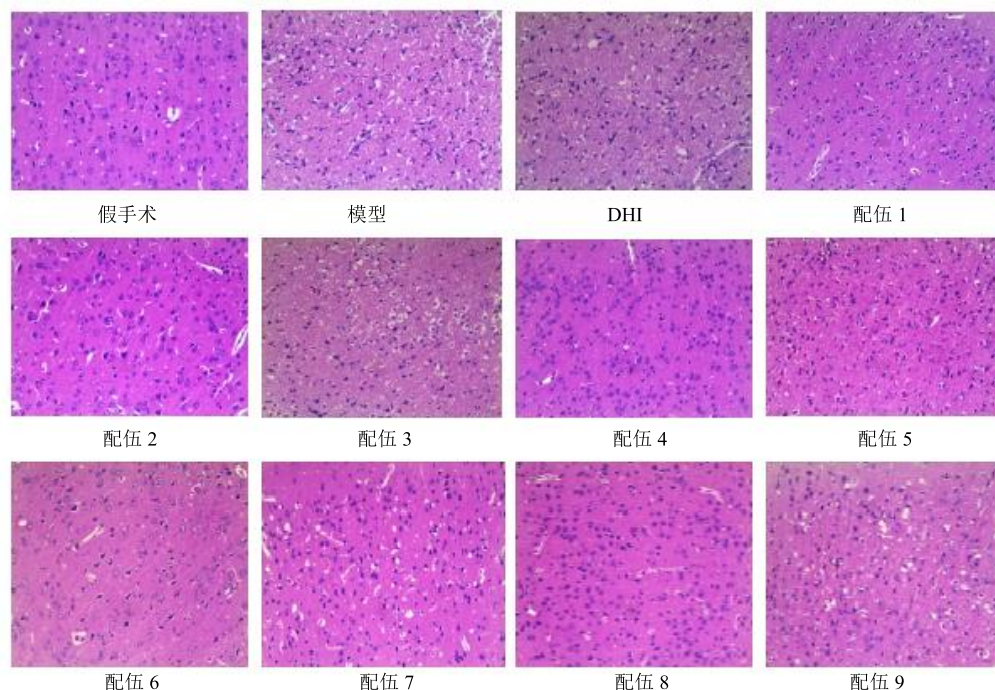


图 1 各组大鼠大脑皮层 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining of the cerebral cortex in each group of rats

3.3 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮层 GRP-78、NF-κB p65、CHOP、TNF-α、IL-6 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示(表 3),与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层中 GRP-78、NF-κB p65、CHOP、IL-6、TNF-α mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,DHI 组、配伍 1、2、4、6、8、9 组大鼠大脑皮层中 GRP-78 mRNA 表达水平

显著升高($P<0.05$ 、 0.01);各给药组 NF-κB p65、CHOP、IL-6、TNF-α mRNA 的表达水平不同程度的降低,其中配伍 4、6 组更为明显($P<0.01$)。与 DHI 组相比较,配伍 6 组 GRP-78 mRNA 的表达水平显著升高($P<0.05$)。结果表明 DHI、丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠有保护作用,其中配伍 4、6 组的保护作用优于其他配伍组方。

表 3 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 GRP-78、NF-κB p65、CHOP、IL-6、TNF-α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of main active ingredients compatibility of *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius* on expression of GRP-78, NF-κB p65, CHOP, IL-6, TNF-α mRNA in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	mRNA 相对表达量				
	GRP-78	NF-κB p65	CHOP	IL-6	TNF-α
假手术	1.02±0.24	1.13±0.18	1.02±0.22	1.03±0.22	1.02±0.21
模型	1.38±0.21*	2.22±0.31**	2.16±0.25**	3.45±0.16**	2.09±0.22**
DHI	1.77±0.26 [#]	1.86±0.39 [#]	1.72±0.12 [#]	2.23±0.13 ^{##}	1.62±0.23 ^{##}
配伍 1	1.80±0.34 [#]	1.71±0.32 ^{##}	1.47±0.26 ^{##}	2.44±0.42 ^{##}	1.65±0.30 ^{##}
配伍 2	2.04±0.39 ^{##}	1.79±0.26 [#]	1.50±0.38 ^{##}	2.37±0.32 ^{##}	1.87±0.20
配伍 3	1.58±0.23	1.79±0.24 [#]	1.76±0.32 [#]	2.58±0.19 ^{##}	1.68±0.25
配伍 4	2.10±0.31 ^{##}	1.62±0.27 ^{##}	1.51±0.38 ^{##}	2.26±0.25 ^{##}	1.40±0.12 ^{##}
配伍 5	1.52±0.30	1.88±0.35 ^{##}	1.83±0.42	2.98±0.12 ^{##}	1.89±0.30
配伍 6	2.21±0.21 ^{##}	1.58±0.32 ^{##}	1.46±0.16 ^{##}	2.05±0.28 ^{##}	1.60±0.33 ^{##}
配伍 7	1.62±0.38	2.01±0.31	1.75±0.37	2.68±0.22 ^{##}	1.62±0.19 ^{##}
配伍 8	1.85±0.35 ^{##}	1.75±0.36 ^{##}	1.49±0.25 ^{##}	2.54±0.16 ^{##}	1.76±0.30 [#]
配伍 9	1.79±0.28 [#]	2.10±0.22	2.00±0.34	2.82±0.23 ^{##}	1.72±0.37 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与 DHI 组比较: ^{\$} $P<0.05$ ^{\$\$} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; ^{\$} $P<0.05$ ^{\$\$} $P<0.01$ vs DHI group

3.4 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF-κB p65 蛋白表达的影响

免疫组化结果(表 2、图 2)显示, NF-κB p65 蛋白主要表达在脑内血管内皮细胞、神经元细胞和胶质细胞中,激活的 NF-κB p65 从胞质进入到胞核内呈黄色或棕黄色。假手术组大鼠脑组织未见有明显的 NF-κB p65 阳性细胞表达。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织细胞中 NF-κB p65 表达明显增加($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠脑组织细胞中 NF-κB p65 表达水平显著降低($P<0.01$);与 DHI 组比较,配伍 4 组 NF-κB p65 表达水平显著下调($P<0.01$)。

4 讨论

中药复方制剂是在继承传统中医文化和积累大

量临床应用经验的基础上,采用现代化研究方式和制备工艺研发的中药药物^[10]。但中药复方制剂成分复杂,难以标准化,体内作用机制难以阐述清楚^[11],极大地限制了中药在国际上的认可和发展。中药组分配伍是指将药理作用相对明确、成分相对清楚的有效组分配伍进行新药开发,是现阶段中药应用的新形式。鉴于中药组分配伍的研究思路,可将在临床广泛应用的中药复方药物再进行简化优化,对其主要有效成分进行筛选和剂量配伍优选,既能保留中药多靶点、整体调节的作用特点,又可以使其安全性、质量可控性更高。

正交试验是一种为寻求最优化水平组合而设计的高效多因素实验。其特点是消除了各效应间的相关性,而且可通过部分实验反映整体实验的情况,

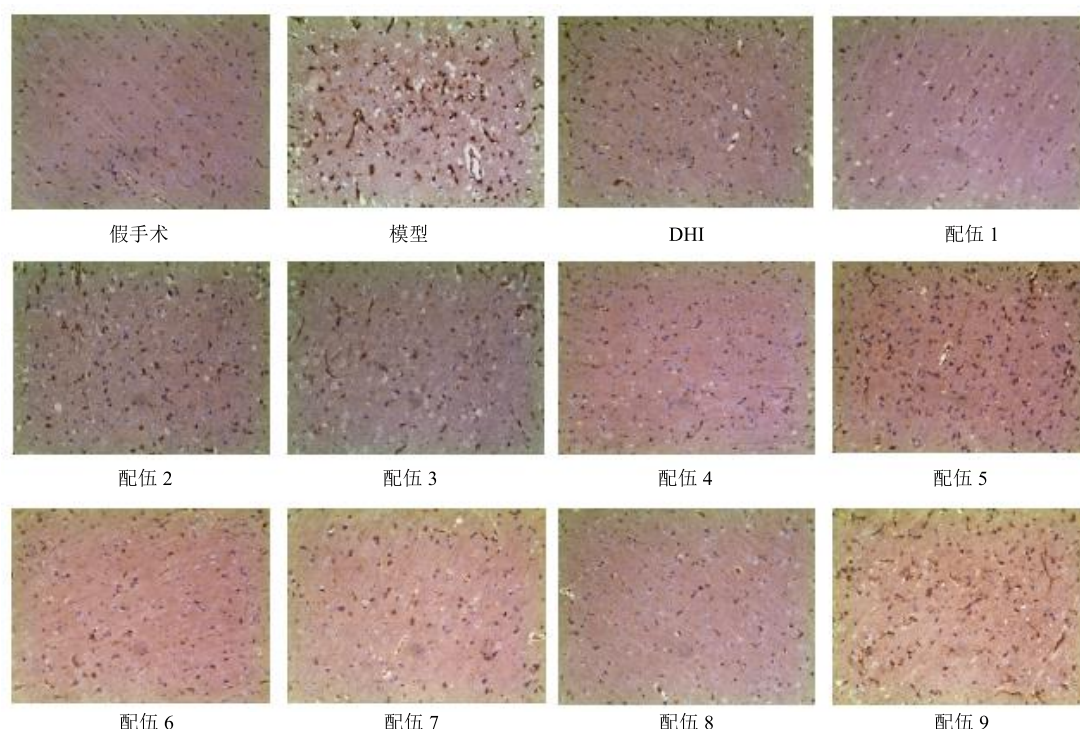


图 2 丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of main active ingredients compatibility of *S. miltiorrhiza* and *C. tinctorius* on expression of NF- κ B p65 protein in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury

广泛应用于药物提取的条件优化、中药复方的组分优化等方面。对丹参、红花有效成分的配伍进行优化不仅能够提升药物的治疗效果,而且有利于阐述其作用机制,同时也为指导临床精准用药、中药新药的开发奠定了实验基础^[7]。

丹红注射液由丹参、红花 2 味药组成,于 2002 年获准上市,为国家医保乙类品种,广泛应用于治疗多种心脑血管疾病,是目前临床上使用较多的中药注射剂之一^[12]。目前已鉴定了丹红注射液中 63 个化合物^[13]。Liu 等^[14]基于波长切换技术的 HPLC-UV 同时对 10 个批次的丹红注射液中 16 个成分(胞苷、尿苷、腺苷、苯丙氨酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、HYSA、紫丁香苷、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹酚酸 C)进行了含量测定,研究发现丹红注射液中丹参素最为丰富,为 1 408.7~1 120.5 $\mu\text{g/mL}$,丹酚酸 A 与丹酚酸 B 的质量浓度也相对较高,分别为 523.1~187.4 $\mu\text{g/mL}$ 和 801.0~324.2 $\mu\text{g/mL}$,但 HYSA 在丹红注射液中含量很低,不能被 HPLC-UV 检测出,但由于该成分是红花中最具代表性的活性成分^[15],所以在进行丹参与红花有效成分的选择时,我们除选取了含量较高、药理活性

较好的丹参素、丹酚酸 A 和丹酚酸 B 外,还选择了 HYSA,适当增加其配伍的比例,采用正交试验设计,对丹红注射液成分进行精简优化,以期在精简成分的同时,能够保证其治疗效果。

缺血性脑卒中发生时,会诱发一系列的病理变化,如能量代谢障碍、氧化应激反应、钙离子超载、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)以及炎症反应。内质网作为人体主要的蛋白质合成、加工、转运场所,在维持微环境的稳态中起着至关重要的作用。GRP-78 是一种位于内质网内的钙离子结合的分子伴侣,在正常情况下,GRP-78 与双链 RNA 依赖蛋白激酶样 ER 激酶(PERK)、肌醇必需酶 1 (IRE1)、激活转录因子 6 (ATF6) 结合处于失活状态。当 ERS 发生时,GRP-78 与这 3 种物质发生解离,产生大量表达,因此,GRP-78 被认为是内质网应激的标志性蛋白^[16],但 GRP-78 的上调可减轻内质网未折叠蛋白质反应(unfolded protein response, UPR)负荷,促进蛋白正常结构的恢复,表现出减轻神经元死亡、抗凋亡的作用。当 ERS 过度表达时,就会启动 PERK/CHOP 途径,引起大量的细胞死亡,CHOP 作为第 1 个被鉴定的促凋亡蛋白,同样也被认为是 ERS 发生时的重要标志物^[17]。

研究表明, ERS 与炎症也存在着广泛的联系^[18], NF- κ B 参与调控多种炎症因子及凋亡基因的转录, 是炎症反应的中心环节。有研究表明, NF- κ B 与 UPR 相互作用而触发炎症, 而炎症的产生又会加重内环境的紊乱, 进一步加重 ERS^[19]。随着 NF- κ B 信号通路的激活, 促进 TNF- α 、IL-6、IL-1 等大量炎症因子的释放, 加重脑组织损伤。

本实验采用正交试验设计实验分组, 初步探究了丹参与红花有效成分配伍对脑缺血再灌注大鼠的内质网应激、炎症等方面的作用。从神经功能评分和 HE 染色结果可以看出, DHI 和丹参与红花有效成分配伍组均能不同程度地改善大鼠神经功能缺损症状以及大脑皮层的病理损伤程度, 其中配伍 4、6 组的改善情况最为明显。通过 qRT-PCR 检测大鼠缺血侧皮层 GRP-78、CHOP、NF- κ B p65、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达量的结果显示, 配伍 4、6 组作用优于 DHI 组以及其余各组。而免疫组化检测结果表明配伍 4、6 组对 NF- κ B p65 蛋白的表达量下调更为明显。故而初步确定了配伍 4 组(丹参素 30 mg/kg、丹酚酸 A 2.5 mg/kg、丹酚酸 B 16 mg/kg、HYSA 8 mg/kg)、第 6 组(丹参素 30 mg/kg、丹酚酸 A 10 mg/kg、丹酚酸 B 8 mg/kg、HYSA 4 mg/kg)为较优的配伍组方。由于临床上脑缺血是依其病理机制的不同进行对症治疗, 而这 2 个较优组方从不同方面展现其保护作用的优势, 可为临床精准用药提供参考, 为这一经典药对的临床应用和新药开发提供了新的研究思路与实验基础。

参考文献

- [1] Consoli D, Paciaroni M, Aguggia M, *et al.* Prevalence of patent foramen ovale in ischemic stroke in Italy: The SISIFO study [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(6): 867-873.
- [2] 卢国, 徐阳美, 季晖. 中药复方防治脑缺血的研究进展 [J]. *药学进展*, 2015, 39(7): 514-524.
- [3] Xu H, Liu W X, Liu T L, *et al.* Synergistic neuroprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Oncotarget*, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23272.
- [4] 吕燕妮, 付龙生, 魏筱华. 丹参与红花配伍机制的系统生物学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(5): 220-224.
- [5] 任攀, 周明学, 刘卫红, 等. 丹红注射液治疗心脑血管疾病的药理作用研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(31): 6197-6200.
- [6] 李贵华, 姜红岩, 谢雁鸣, 等. 基于大数据 84 697 例冠心病中医证候及其中西药使用分析 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(18): 3462-3468.
- [7] 高丽娜, 崔元璐, 延阔, 等. 丹参红花配伍研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 671-679.
- [8] 麦蓝尹, 李怡萱, 陈勇, 等. 基于数理统计方法学的中药复方配伍研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(10): 1749-1756.
- [9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] 阳长明. 中药复方新药研究的质量设计、质量完善与技术审评的分阶段要求 [J]. *中草药*, 2017, 48(16): 3253-3258.
- [11] 王淳, 刘丽梅, 宋志前, 等. 心血管疾病常用中药注射液及相关中药有效组分研究概况 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2315-2328.
- [12] 李建萍. 丹红注射液与阿司匹林药物相互作用特征与机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [13] Zhang Q Q, Dong X, Liu X G, *et al.* Rapid separation and identification of multiple constituents in Danhong Injection by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(2): 147-160.
- [14] Liu H T, Wang Y F, Olaleye O, *et al.* Characterization of *in vivo* antioxidant constituents and dual-standard quality assessment of Danhong injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, doi: 10.1002/bmc.2842.
- [15] 吴唐静, 王静, 刘瑞宁, 等. 羟基红花黄色素 A 脑保护作用的研究进展 [J]. *中国医药*, 2017, 12(11): 1754-1757.
- [16] Yousefi H, Ahmadiasl N, Alihemmati A, *et al.* Effect of renal ischemia-reperfusion on lung injury and inflammatory responses in male rat [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(10): 802-807.
- [17] Poone G K, Hasseldam H, Munkholm N, *et al.* The hypothermic influence on CHOP and Ero1- α in an endoplasmic reticulum stress model of cerebral ischemia [J]. 2015, 5(2): 178-187.
- [18] Zhang K, Kaufman R J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 455-462.
- [19] Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, *et al.* A molecular web: Endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00213.