

丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞保护作用研究

周惠芬, 万海同, 何 昱, 王慧君, 万浩宇, 李 畅, 虞 立, 杨洁红*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: 观察丹参-川芎有效成分(丹参素、原儿茶醛、川芎嗪、阿魏酸)配伍对体外原代培养的海马神经元细胞缺氧(氧糖剥夺)损伤的保护作用,并优选较佳组合。**方法** 原代培养乳鼠海马神经元细胞,免疫组化法进行神经元特异性烯醇化酶(NSE)鉴定,并建立海马神经元细胞氧糖剥夺模型。MTT 法确定丹参素、原儿茶醛、川芎嗪、阿魏酸及尼莫地平的非细胞毒性剂量范围,以 $L_9(3^4)$ 正交表设计安排成分配伍给药。将培养的细胞随机分为 12 组:对照组、模型组、尼莫地平阳性对照组及正交配伍 1~9 组。采用比色法、WST-1 法、硫代巴比妥酸(TBA)法分别检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)水平,酶联免疫吸附试验检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 水平变化,Hoechst33258 荧光染色法观察海马神经元细胞凋亡情况,流式细胞术检测细胞早期凋亡率。采用极差分析法分析正交试验结果。**结果** 药物正交配伍组合均可显著改善缺氧海马神经元细胞的形态,显著减弱 LDH 活力,增强 SOD 的活性以及降低 MDA 的水平,显著抑制细胞 TNF- α 的释放,降低 IL-1 β 和 IL-6 的水平,明显减少了细胞的凋亡。丹参-川芎有效成分对 LDH 活力的影响大小依次为丹参素>川芎嗪>原儿茶醛>阿魏酸,最佳配伍组合为丹参素(120 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(120 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(20 $\mu\text{g/mL}$)。对 SOD 活性的影响主次因素依次为阿魏酸>川芎嗪>丹参素>原儿茶醛,最佳配伍组合为丹参素(120 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(120 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(40 $\mu\text{g/mL}$)。对 MDA 水平的影响主次因素依次为丹参素>原儿茶醛>阿魏酸>川芎嗪,最佳配伍组合为丹参素(60 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(60 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(20 $\mu\text{g/mL}$)。对 TNF- α 水平影响的主次因素依次为川芎嗪>原儿茶醛>丹参素>阿魏酸,最佳配伍组合为丹参素(60 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(60 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(40 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(10 $\mu\text{g/mL}$)。影响 IL-1 β 水平的主次因素依次为川芎嗪>阿魏酸>丹参素>原儿茶醛,最佳配伍组合为丹参素(30 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(30 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(20 $\mu\text{g/mL}$)。影响 IL-6 水平的主次因素依次为原儿茶醛>川芎嗪>阿魏酸>丹参素,最佳配伍组合为丹参素(120 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(120 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(80 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(10 $\mu\text{g/mL}$)。影响细胞早期凋亡率主次因素为阿魏酸>原儿茶醛>川芎嗪>丹参素,最佳配伍组合为丹参素(60 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶醛(30 $\mu\text{g/mL}$)、川芎嗪(20 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸(40 $\mu\text{g/mL}$)。**结论** 丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞的保护作用机制可能与减轻氧化应激损伤、减轻炎症损伤和抑制细胞凋亡有关,可参考实验结果为临床不同病程需要更改组方配比,指导临床用药。

关键词: 丹参; 川芎; 配伍; 海马神经元细胞; 氧糖剥夺; 细胞凋亡; 丹参素; 原儿茶醛; 川芎嗪; 阿魏酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1372-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.017

Protective effects of compatibility of effective constituents in *Salvia miltiorrhiza* and *Ligusticum chuanxiong* on hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation

ZHOU Hui-fen, WAN Hai-tong, HE Yu, WANG Hui-jun, WAN Hao-yu, LI Chang, YU Li, YANG Jie-hong

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To observe the protective effect of *Salvia miltiorrhizae* and *Ligusticum chuanxiong* effective constituents: danshensu, protocatechuic aldehyde, ligustrazine, and ferulic acid combination on primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation, and find out an optimized combination. **Methods** Primary cultured rats hippocampal neurons was

收稿日期: 2018-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81630105); 国家自然科学基金资助项目(81874366); 浙江省自然科学基金资助项目(LZ17H270001); 浙江省自然科学基金资助项目(LZ18H270001); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ19H270001)

作者简介: 周惠芬, 实验师, 从事中药分离及药动学、药效学研究。Tel: (0571)86633135 E-mail: zhouhuifen2320@126.com

***通信作者** 杨洁红, 教授, 博士生导师。Tel: (0571)86613711 E-mail: yjzhong@zcmu.edu.cn

chosen as research objects by adopting immunohistochemistry of the neuron-specific enolase IgG to authenticate, then the OGD model of the hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation was established. The non-cytotoxic dose range of danshensu, protocatechuic aldehyde, ligustrazine, ferulic acid, and nimodipine was studied by MTT method. The compatibility of components was arranged by $L_9(3^4)$ orthogonal design. Primary cultured rats hippocampal neurons was divided into 12 groups: control group, model group, Nimodipine positive control group, and orthogonal design 1—9 group. The activity of LDH was measured by colorimetry, the activity of SOD was tested by WST-1 and the levels of MDA were examined by TBA. The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in cell culture supernate were examined by ELISA, the apoptosis of hippocampal neurons was detected by Fluorochrome Hoechst33258 staining and the cell early apoptosis rate was detected with flow cytometry. The results of orthogonal test was analyzed by using range analysis method. **Results** The orthogonal compatibility of reagents played significant roles against the hypoxia damage of hippocampal neurons, improved the cellular morphology obviously, reduced the activity of LDH, increased the activity of SOD and decreased the content of MDA significantly, inhibited the release of TNF- α , and reduced the content of IL-1 β and IL-6, reduced the apoptosis of cells apparently. The effect of active ingredients of *S. miltiorrhiza* and *L. Chuanxiong* on LDH activity was danshensu > ligustrazine > protocatechuic aldehyde > ferulic acid, and the best combination was danshensu (120 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (120 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (20 $\mu\text{g/mL}$). The effect on SOD activity was ferulic acid > ligustrazine > danshensu > protocatechuic aldehyde. The best combination was danshensu (120 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (120 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (40 $\mu\text{g/mL}$). The order of influence on MDA content was danshensu > protocatechuic aldehyde > ferulic acid > ligustrazine, and the best combination was danshensu (60 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (60 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (20 $\mu\text{g/mL}$). The effect on TNF- α content were: ligustrazine > protocatechuic aldehyde > danshensu > ferulic acid, and the best combination was danshensu (60 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (60 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (40 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (10 $\mu\text{g/mL}$). The order of influence on the content of IL-1 β was ligustrazine > ferulic acid > danshensu > protocatechuic aldehyde, and the best combination was danshensu (30 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (30 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (20 $\mu\text{g/mL}$). The effect on the content of IL-6 was protocatechuic aldehyde > ligustrazine > ferulic acid > danshensu, and the best combination was danshensu (120 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (120 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (80 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (10 $\mu\text{g/mL}$). The effect on the early apoptosis rate was ferulic acid > protocatechuic aldehyde > ligustrazine > danshensu, and the best combination was danshensu (60 $\mu\text{g/mL}$), protocatechuic aldehyde (30 $\mu\text{g/mL}$), ligustrazine (20 $\mu\text{g/mL}$), and ferulic acid (40 $\mu\text{g/mL}$). **Conclusion** The protective mechanism of the effective constituents of *S. miltiorrhizae* and *L. chuanxiong* were relied on reducing the oxidative damage, reducing inflammation damage, and antagonizing cell apoptosis. According to the experimental results, we need to change the prescription ratio and guide clinical medication for different clinical courses.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge. ; *Ligusticum chuanxiong* Hort; compatibility; hippocampal neurons; oxygen glucose deprivation; apoptosis; danshensu; protocatechuic aldehyde; ligustrazine; ferulic acid

脑卒中是由于阴阳失调、气血逆乱，上犯于脑部而引起的以猝然昏倒、不省人事或突然发生口眼喎斜、半身不遂、语言障碍等为主要临床表现的一种病症，其具有致残率高、复发率高、病死率高及治愈率低的特点，严重威胁人类的生命健康和生活质量^[1-3]，给社会和家庭带来沉重负担，因此，防治该病有着重大的临床价值与意义。

中药配伍理论是中医方剂的重要内容，从单味药到多种药物配伍应用，历经各代医家的实践与总结。“药对”是方剂基本结构和临床常用的固定配伍形式，本项目基于方剂配伍用药的理论和经验，选择临床常用的2味中药丹参和川芎为研究对象。丹参-川芎配伍已是中医临床许多活血化瘀类方剂和制剂的核心配伍^[4]，如参芎注射液、丹参川芎嗪注

射液，已被广泛应用于心脑血管疾病的治疗。丹参活血散瘀，但其性微寒，辅以川芎，借其温性，行血中之气，上行于脑，以助消散瘀血，温运血行；丹参-川芎配伍相辅相成，共奏活血化瘀，通心养脉之效^[5]。研究表明丹参与川芎配伍治疗急性缺血性脑卒中可显著改善患者神经功能、提高生活质量、临床疗效显著^[6]，其配伍后可以促进有效成分吸收，提高其血药浓度，延长其体内作用时间^[7]。丹参素是从丹参中提取的主要酚性芳香酸类化合物，多项研究表明^[8-10]，丹参素具有改善微循环、扩张冠状动脉、抑制细胞凋亡、抗菌消炎、增强机体免疫力的作用。原儿茶醛是丹参主要水溶性成分之一，具有抗菌消炎、抑制细胞凋亡、清除自由基、减轻脑水肿的作用，能有效改善脑缺血损伤^[11-12]。川芎嗪

是从川芎中提取的主要生物碱类化合物,能有效抑制脑缺血后炎症级联反应,调节凋亡基因表达,改善微循环,减轻脑缺血损伤^[13-16]。阿魏酸是从川芎中提取的主要酚酸类化合物,能清除自由基,促进清除自由基的酶的产生,增加谷胱甘肽转硫酶还原酶的活性,抑制酪氨酸酶活性,来调节生命体的机能,还可以增加抗凋亡基因 Bcl-2 表达,抑制海马神经元凋亡,促进神经元修复^[17-19]。

目前丹参-川芎配伍研究大多集中在饮片层面,难以阐明药物体内药效变化特征。基于生物等效性和中药方剂配伍等理论指导,本项目组前期已研究了丹参-川芎有效成分不同配伍对缺氧损伤大鼠脑微血管内皮细胞的影响,发现其有效成分不同配伍可在一定程度上保护缺氧对大鼠脑微血管内皮细胞的损伤,不同配伍作用方式的侧重不同^[20]。海马组织是中枢神经系统的重要组成部分,是脑组织中对缺氧反应最为敏感的部位之一。因此本实验选用乳鼠海马神经元原代培养,体外建立氧糖剥夺模型,进一步研究丹参-川芎主要有效成分配伍对体外培养的大鼠海马神经元细胞历经缺氧缺糖损伤的作用,并对涉及其中的相关机制进行研究,进一步研究其配伍规律,以期为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹参素(质量分数 $\geq 98\%$,批号 SZ201601002)、原儿茶醛(质量分数 $\geq 98\%$,批号 SZ201605065)、川芎嗪(质量分数 $\geq 98\%$,批号 SZ201606005)、阿魏酸(质量分数 $\geq 98\%$,批号 SZ201604019),南京世洲生物科技有限公司;尼莫地平(批号 BXHJXB1,规格 50 mL: 10 mg),Bayer Pharma AG 公司;DMEM/F-12 培养基、DMEM 高糖培养液、青-链霉素溶液、0.25%胰蛋白酶、0.02% EDTA、磷酸盐缓冲液(PBS)、Eagle's 液,杭州吉诺生物医药技术有限公司;胎牛血清(FBS,批号 20170413),杭州天杭生物科技股份有限公司;Neurobasal®-A Medium 培养基(批号 1821110)、B-27® Supplement(批号 1813319);L-谷氨酰胺(批号 1799923),美国 Gibco 公司;多聚赖氨酸(相对分子质量 $1.5 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$,美国 Sigma 公司);兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体、生物素化山羊抗兔 IgG 二抗(兔 IgG)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶

(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物

出生 24 h 内的清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,由浙江省医科院提供,许可证号 SCXK(浙)2014-0001。

1.3 仪器

DMI4000B 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);Forma 310 型直热式 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);明澈™-D 24UV 纯水仪(美国 Merck Millipore 公司);AR153CN 电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);梅特勒 XP105DR 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);TS-1 型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);SX-500 高压蒸汽灭菌锅(日本 Tomy 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);GR-140 热空气消毒箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);移液器(德国 Eppendorf 公司);Millex-GR 0.22 μm 滤膜(美国 Millipore 公司);WHB 圆形细胞爬片(上海卧宏生物科技有限公司);细胞培养板(美国 Costar 公司)。

2 方法

2.1 乳鼠海马神经元的原代培养^[21]

出生 24 h 内的 SD 乳鼠,颈椎脱臼处死,放入 75%乙醇内浸泡消毒 3 min,无菌条件下分层剪开头皮、颅骨,充分暴露两侧大脑半球,取出全脑,置于预冷 D-Hank's 液中清洗数次。分离海马组织,剪碎成 1 mm³ 大小,收集后,加入 2 倍 0.25%胰蛋白酶,置于 37 °C 培养箱内消化 25 min,终止培养基终止消化,轻柔吹打至组织块消失,200 目过筛,收集细胞悬液于离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入种植培养基,吹打成细胞悬液,细胞计数,调整细胞终浓度为 5×10^5 个/mL,将其接种于事先包被好的 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。接种后 6 h 将种植培养基全量换成饲养培养基,随后每 3 天半量换液 1 次,置于显微镜下观察细胞生长状态,待细胞成熟(约第 7 天)后,用于后续实验。

2.2 原代海马神经元的免疫组织化学法鉴定

海马神经元细胞培养至第 7 天,取出细胞爬片,用 37 °C 温浴的 PBS 冲洗 3 次。预冷的 4%多聚甲醛溶液室温固定 30 min,用 PBS 冲洗 3 次。3%双

氧水室温孵育 10 min 后用 PBS 冲洗 3 次, 0.25% 的 Triton X-100 37 °C 孵育 15 min, 增加抗体对细胞膜的通透性, 随后用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。10% 正常山羊血清 37 °C 封闭非特异性抗体 30 min, 倾去山羊血清。滴加兔抗大鼠 NSE 一抗 (1:250), 阴性对照滴加 PBS 代替一抗, 置于湿盒内, 4 °C 过夜。用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG 二抗 (1:100), 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加 SABC 液, 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加 DAB 显色液, 镜下观察显色情况, 待细胞核中出现黄色颗粒及胞浆染色之后, 滴加双蒸水终止反应。滴加苏木素染液复染, 染色后滴加双蒸水终止反应。滴加盐酸-酒精分化与淡氨水返蓝。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 倒置相差显微镜下随机选取 4 个非连续视野观察并拍照, 细胞核成淡紫色, 胞浆及突起成棕黄色或棕褐色者为阳性细胞, 计算阳性细胞数。

2.3 海马神经元细胞氧糖剥夺模型制备^[22]

取无糖的 Eagle's 液, 通入 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 混合气, 置换出液体中多余的 O₂, 制备成无糖无氧的氧糖剥夺液。选取原代培养至第 7 天的乳鼠海马神经元细胞, 吸弃原有的饲养培养基, 常温 PBS 漂洗 2 次, 换成制备的氧糖剥夺液, 置于缺氧盒中, 通入 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 混合气, 当 O₂ 体积分数下降至 1% 时, 夹闭进气出气孔, 将缺氧盒放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养造模 4 h, 模拟大脑缺血过程。4 h 后置于倒置显微镜下观察并拍照。

2.4 分组及给药

在确定丹参-川芎有效成分的非细胞毒性剂量范围内选取低、中、高质量浓度, 按照正交试验设计 L₉(3⁴) 原则配伍成 4 个有效成分、3 个剂量水平不同配比的 9 个组方; 尼莫地平在非细胞毒性剂量范围内选取合适质量浓度 (200 μg/mL) 作为阳性对照组。确定给药浓度后进行分组, 分别为对照组、模型组、尼莫地平组、正交配伍 9 个给药组 (即配伍 1~9 组, 各组成分质量浓度配比见表 1)。对照组给予有糖 Eagle's 液并正常细胞培养, 模型组给予无糖 Eagle's 液, 尼莫地平组、各配伍组分别给予无糖 Eagle's 液配制的相应药物, 6 孔板每孔 2 mL 体积 (Hoechst33258 染色实验使用 24 孔板)。细胞给药同时缺糖缺氧培养 4 h 后, 检测各指标。

2.5 LDH 和 SOD 活性及 MDA 水平检测

细胞原代培养、造模、分组及给药方法同“2.1”

表 1 丹参-川芎有效成分剂量配比

Table 1 Proportion of effective constituents in *S. miltiorrhiza* and *L. chuanxiong*

编号	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)			
	丹参素 (A)	原儿茶醛 (B)	川芎嗪 (C)	阿魏酸 (D)
1	30	30	20	10
2	30	60	40	20
3	30	120	80	40
4	60	30	40	40
5	60	60	80	10
6	60	120	20	20
7	120	30	80	20
8	120	60	20	40
9	120	120	40	10

“2.3”“2.4”项, 去除细胞培养基, PBS 清洗 2 次, 用 0.125% 胰蛋白酶消化后超声法破碎细胞, 收集裂解液, 按试剂盒说明书操作, 测定 LDH 和 SOD 活性及 MDA 的水平。

2.6 细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 以及 IL-6 水平的检测

细胞原代培养、造模、分组及给药方法同“2.1”“2.3”“2.4”项, 去除细胞培养基, PBS 清洗 2 次, 用 0.125% 胰蛋白酶消化后超声法破碎细胞, 收集裂解液, 按照 TNF-α、IL-1β 以及 IL-6 试剂盒说明书进行测定。

2.7 Hoechst33258 荧光染色镜下观察细胞变化

参照“2.1”项原代培养海马神经元细胞, 以 2×10⁵ 个/mL 细胞密度接种 1 mL 在含有细胞爬片的 24 孔细胞培养板中。细胞生长成熟后, 分组及给药同“2.4”项, 加样体积均 1 mL, 给药后同时制备氧糖剥夺模型, 缺氧缺糖 4 h, 吸弃 Eagle's 液, 常温 PBS 漂洗 2 次。滴加预冷的 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min, 弃去多聚甲醛, 预冷 PBS 漂洗 3 次, 随后每孔滴加 10 mg/L 的 Hoechst33258 荧光染料 100 mL, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 min, 荧光倒置显微镜下观察。

2.8 Annexin V-FITC/PI 检测细胞早期凋亡率

细胞原代培养、造模、分组及给药方法同“2.1”“2.3”“2.4”项, 去除培养液, 常温 PBS 漂洗 2 次, 滴加适量 0.25% 的胰蛋白酶, 轻轻拍打细胞, 终止消化后, 1 000 r/min 离心 5 min。预冷 PBS 漂洗 2 次后, 用 1×Binding Buffer 重悬细胞, 显微镜下快速计数, 调整细胞密度为 1×10⁶ 个/mL。用移液枪吸取 100 μL 含有细胞的 Binding Buffer 至流式管中。

每管滴加 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL PI, 轻轻吹打混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。每管滴加 400 μL 1 $\times$ Binding Buffer, 轻轻吹打后, 过膜, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 计算早期凋亡率。

2.9 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。

3 结果

3.1 原代海马神经元细胞的形态学观察及免疫组化鉴定

海马神经元接种 6 h 绝大部分细胞均已贴壁, 呈椭圆形。培养至第 3~4 天, 神经元胞体变大变圆,

立体感较强, 神经元突起延长, 交织呈稀疏的网状。培养至第 7 天, 神经元胞体饱满, 折光性好, 核仁可见, 突起分支增粗并交织形成致密的神经网络, 为海马神经元的典型结构特征, 是用于实验研究的最佳时期。结果见图 1。

神经元细胞的鉴定结果见图 2, 海马神经元细胞胞体饱满, 突起相互交织成网状, 胞浆及较为粗大的突起呈棕黄色或棕褐色, 细胞核呈蓝紫色, 鉴定为神经元。纯度 $\geq 90\%$ 可用于后续实验。

3.2 氧糖剥夺对原代海马神经元细胞形态的影响

造模后, 海马神经元细胞形态学发生明显变化, 胞体肿胀或变形, 光晕消失, 胞体内出现空泡, 突起缩短, 连接断裂, 视野内颗粒样物质增多, 结果见图 3。

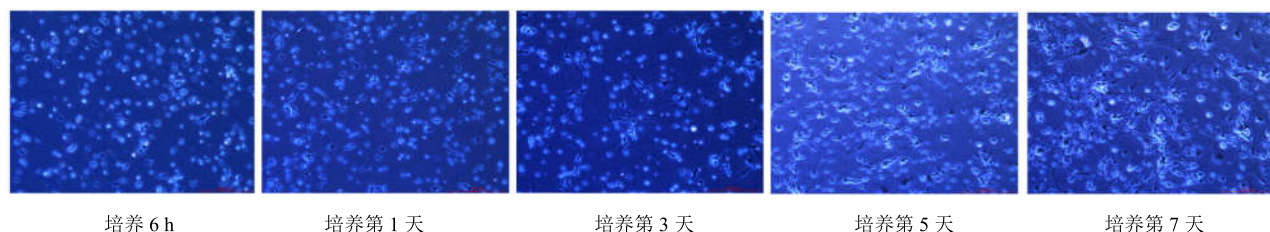


图 1 海马神经元细胞的生长形态学观察 ($\times 100$)

Fig. 1 Morphological observation on growth of hippocampal neurons ($\times 100$)

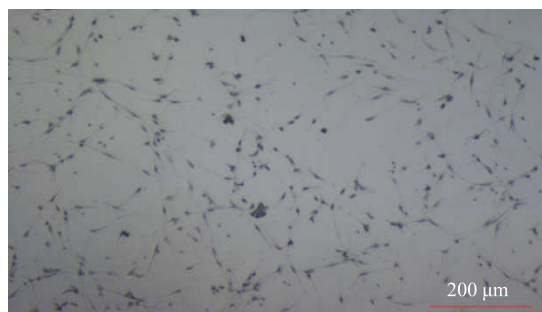
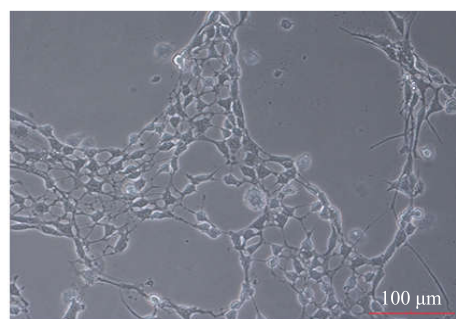


图 2 海马神经元细胞 NSE 免疫组化法鉴定 ($\times 100$)

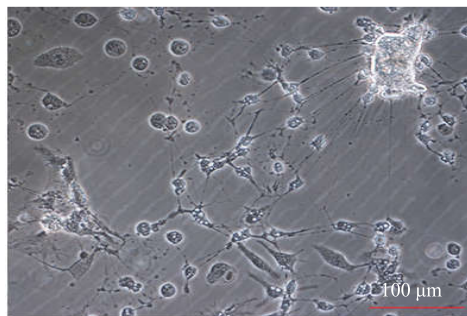
Fig. 2 Identification of hippocampal neurons by NSE immunohistochemistry ($\times 100$)

3.3 对氧糖剥夺海马神经元细胞 LDH 活力的影响

与对照组相比, 模型组细胞中 LDH 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 配伍 1 组 LDH 活性差异无显著性 ($P > 0.05$), 尼莫地平组及配伍 2~9 组 LDH 活性均显著降低 ($P < 0.01$)。各组 LDH 活性测定结果见图 4。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 LDH 活性的影响, 结果见表 2。结果显示, 根据 R 大小, 4 个有效成分对 LDH 活性的影响大小依次为丹参素 > 川芎嗪 > 原儿茶醛 > 阿魏酸, 最佳配伍组合为 $A_3B_3C_3D_2$ 。



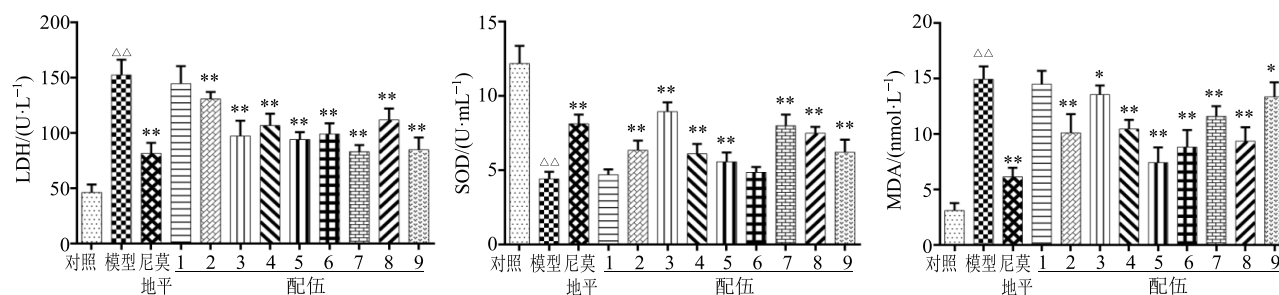
正常神经元细胞



氧糖剥夺神经元细胞

图 3 氧糖剥夺对海马神经元细胞形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effects of oxygen-glucose deprivation on morphology of hippocampal neurons ($\times 200$)



与对照组比较: △△ $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
△△ $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 4 丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of *S. miltiorrhizae* and *L. chuanxiong* effective constituents compatibility on oxidative indices of hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 氧化指标正交设计直观分析

Table 2 Visual analysis of orthogonal design of oxidation index

指标	因素	K_1	K_2	K_3	R
LDH	A	124.36	100.12	93.50	30.86
	B	111.68	112.38	93.93	18.45
	C	118.75	107.60	91.63	27.12
	D	108.08	104.49	105.42	3.58
SOD	A	6.68	5.52	7.24	1.72
	B	6.28	6.48	6.69	0.41
	C	5.69	6.24	7.51	1.82
	D	5.51	6.41	7.53	2.02
MDA	A	12.74	8.92	11.45	3.82
	B	12.20	8.98	11.93	3.22
	C	10.91	11.32	10.87	0.45
	D	11.78	10.19	11.15	1.59

3.4 对氧糖剥夺海马神经元细胞 SOD 活性的影响

与对照组相比,模型组细胞中 SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,尼莫地平组及配伍 2~5、7~9 组 SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$)。各组 SOD 活性测定结果见图 4。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 SOD 活性的影响。结果显示,根据 R 大小可知,4 个有效成分对 SOD 活性的影响大小依次为阿魏酸 > 川芎嗪 > 丹参素 > 原儿茶醛,最佳配伍组合为 A₃B₃C₃D₃。

3.5 对氧糖剥夺海马神经元细胞 MDA 水平的影响

与对照组相比,模型组细胞中 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,除配伍 1 组外,尼莫地平组及其他配伍组细胞 MDA 水平均不同程度地降低,其中配伍 3、9 组差异显著 ($P < 0.05$),配伍 2、4~8 组差异非常显著 ($P < 0.01$)。各组

MDA 水平测定结果见图 4。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 MDA 水平的影响。结果见表 2。结果显示,根据 R 大小可知,4 个有效成分对 MDA 水平的影响大小依次为丹参素 > 原儿茶醛 > 阿魏酸 > 川芎嗪,最佳配伍组合为 A₂B₂C₃D₂。

3.6 对氧糖剥夺海马神经元细胞 TNF- α 水平的影响

图 5 显示,对照组 TNF- α 水平较低,模型组细胞 TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,除配伍 3 组外,尼莫地平组及其他配伍组 TNF- α 水平均有不同程度的降低,其中配伍 7 组差异显著 ($P < 0.05$),其余给药组差异非常显著 ($P < 0.01$)。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 TNF- α 水平的影响。结果见表 3。根据 R 大小,4 个有效成分影响 TNF- α 水平的主次因素依次为川芎嗪 > 原儿茶醛 > 丹参素 > 阿魏酸,最佳配伍组合为 A₂B₂C₂D₁。

3.7 对氧糖剥夺海马神经元细胞 IL-1 β 水平的影响

图 5 显示,对照组相比,模型组 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,配伍 1、8 组差异无显著性 ($P > 0.05$),尼莫地平组及配伍 2~7、9 组 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$)。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 IL-1 β 水平的影响。结果见表 3。根据 R 大小,4 个有效成分影响 IL-1 β 水平的主次因素依次为川芎嗪 > 阿魏酸 > 丹参素 > 原儿茶醛,最佳配伍组合为 A₁B₁C₃D₂。

3.8 对氧糖剥夺海马神经元细胞 IL-6 水平的影响

图 5 显示,与对照组相比,模型组 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,配伍 1、4 组差

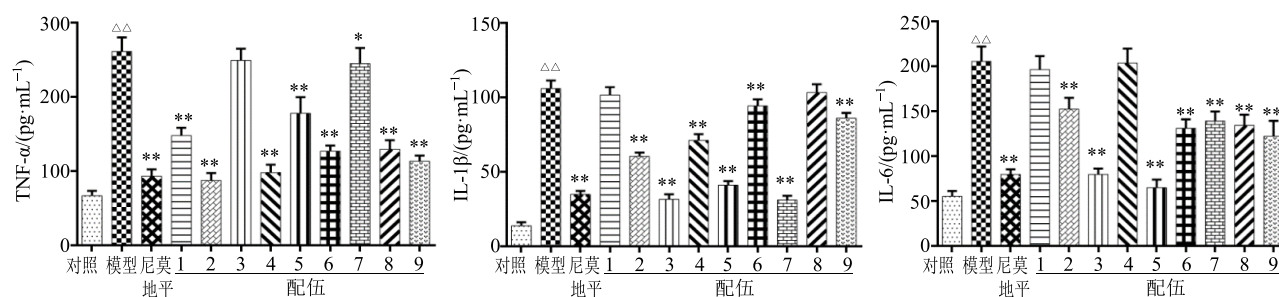


图 5 丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞炎症指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of *S. miltiorrhizae* and *L. chuanxiong* effective constituents compatibility on inflammatory indices of hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 3 炎症指标的正交设计直观分析

Table 3 Visual analysis of inflammation indicators by orthogonal design

指标	因素	K_1	K_2	K_3	R
TNF- α	A	161.74	134.45	162.79	28.34
	B	163.82	131.74	163.42	32.08
	C	134.90	99.71	224.37	124.67
	D	146.58	153.29	159.12	12.54
IL-1 β	A	64.57	68.96	73.55	8.97
	B	68.01	68.35	70.72	2.71
	C	99.84	72.66	34.58	65.26
	D	76.30	62.04	68.74	14.25
IL-6	A	143.01	133.37	132.04	10.97
	B	180.01	117.27	111.13	68.88
	C	154.13	159.66	94.63	65.03
	D	127.94	141.02	139.46	13.08

异无显著性 ($P > 0.05$), 尼莫地平组及配伍 2、3、5~9 组 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$)。采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对 IL-6 水平的影响。结果见表 3。根据 R 大小, 4 个有效成分影响 IL-6 水平的主次因素依次为原儿茶醛 > 川芎嗪 > 阿魏酸 > 丹参素, 最佳配伍组合为 $A_3B_3C_3D_1$ 。

3.9 Hoechst33258 荧光染色镜下观察各组细胞形态学变化

荧光倒置显微镜下观察各组细胞形态, 结果见图 6, 对照组细胞整体呈淡蓝色荧光, 染色均匀, 细胞核整体形态较完整, 伴有极少量的亮点。模型组出现细胞核染色质固缩, 细胞核呈致密浓染, 细胞内出现碎片状或点状亮蓝色荧光, 与对照组相比, 细胞整体荧光显著增强。与模型组相比, 尼莫地平组与配伍 1~9 组荧光强度均不同程度减弱,

细胞核固缩情况较模型组有改善, 表现为视野内亮点数量减少。

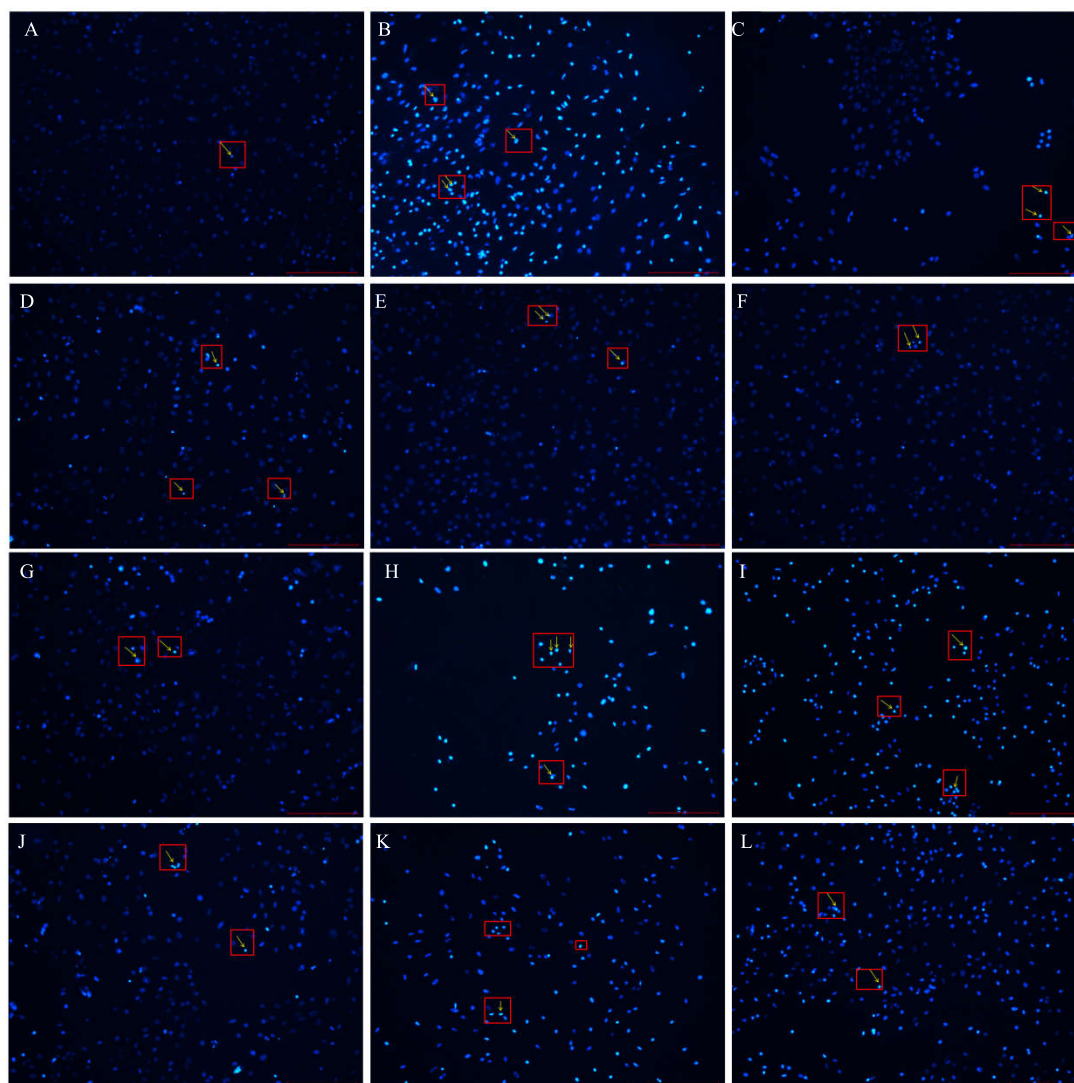
3.10 对氧糖剥夺海马神经元细胞早期凋亡率的影响

对照组只有少数出现早期凋亡, 与对照组相比, 模型组早期凋亡率明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 尼莫地平组及配伍 1~9 组细胞早期凋亡率均有下降, 其中, 配伍 9 组差异显著 ($P < 0.05$), 其他给药组差异均非常显著 ($P < 0.01$), 结果见图 7。各组细胞早期凋亡率结果见表 4, 采用正交设计直观分析法考察丹参-川芎有效成分配伍对细胞早期凋亡率的影响, 结果见表 5。结果显示, 根据 R 大小, 4 个有效成分影响细胞早期凋亡率主次因素为阿魏酸 > 原儿茶醛 > 川芎嗪 > 丹参素, 最佳配伍组合为 $A_2B_1C_1D_3$ 。

4 讨论

缺血性卒中是危害人类健康和生命的主要疾病之一。已知的诸多病理机制主要包括氧自由基过度生成、脑内能量枯竭、细胞凋亡、兴奋性氨基酸毒性、胞内 Ca^{2+} 超载、炎症免疫反应等^[23-25], 这些机制往往密不可分, 相伴发生。中药复方用于脑缺血, 具有多途径、多靶点防治之优势, 更加安全、有效, 临床应用前景广阔。中药配伍具有很强的科学性, 即按病情需要和药性特点, 将 2 种及以上药物配合使用, 从而适应复杂病情增效、减毒、扩大治疗范围的需要。

大脑缺血缺氧时, 活性氧产生增加, 引发自由基生成, 细胞膜磷脂中不饱和双键极易受到氧自由基的攻击, 导致脂质过氧化反应, 激起自由基连锁反应, 形成一系列的脂质自由基及其降解产物 MDA, 同时导致 SOD 活性下降。LDH 是一种糖酵解酶, 普遍存在机体细胞中。正常生理状态下, LDH



A-对照 B-模型 C-尼莫地平 D~L-配伍 1~9, 图 7 同

A-control B-model C-Nimodipine D—L-proportion 1—9, same as figure 7

图 6 Hoechst33258 荧光染色结果 (×100)

Fig. 6 Fluorescence staining results of Hoechst 33258 (× 100)

存在于细胞内，很少外漏；当脑缺血发生时，细胞膜受损，结构遭到破坏，通透性增加，使 LDH 大量释放到细胞外，因此，检测细胞上清液中 LDH 的活性可间接反映细胞健康与否^[26]。

炎症反应是机体对抗外界危险因素和维持内环境稳定的一种保护机制，同时又能导致机体损伤，血脑屏障通透性增加后，大量的炎性因子通过血脑屏障加重脑缺血损伤。在脑缺血发生的早期阶段即能产生 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子，其中 TNF- α 对炎症反应有重要的介导作用，参与了脑组织损伤的发生和发展。IL-1 β 在脑缺血损伤中起关键作用，能够通过促进白细胞和内皮细胞发生黏附而诱发炎

症反应，同时可以协同其他细胞因子促进 B 细胞和 T 细胞活化以及增加其他炎症因子的生成，导致神经元损伤。当脑缺血发生时，IL-6 表达水平在血清及脑内均呈上升趋势，并且与脑组织受损状况呈正相关。因此，检测细胞上清液中 IL-6 的水平变化，可以有效评估细胞损伤程度^[27]。

Hoechst33258 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料，对细胞毒性较低，操作简便。流式细胞术可以检测大量样本，并且能够精准地反映群体细胞的凋亡状态，因此，本实验采用 Hoechst 系列荧光染料染色法对细胞进行形态学观察和流式细胞术检测细胞早期凋亡率。

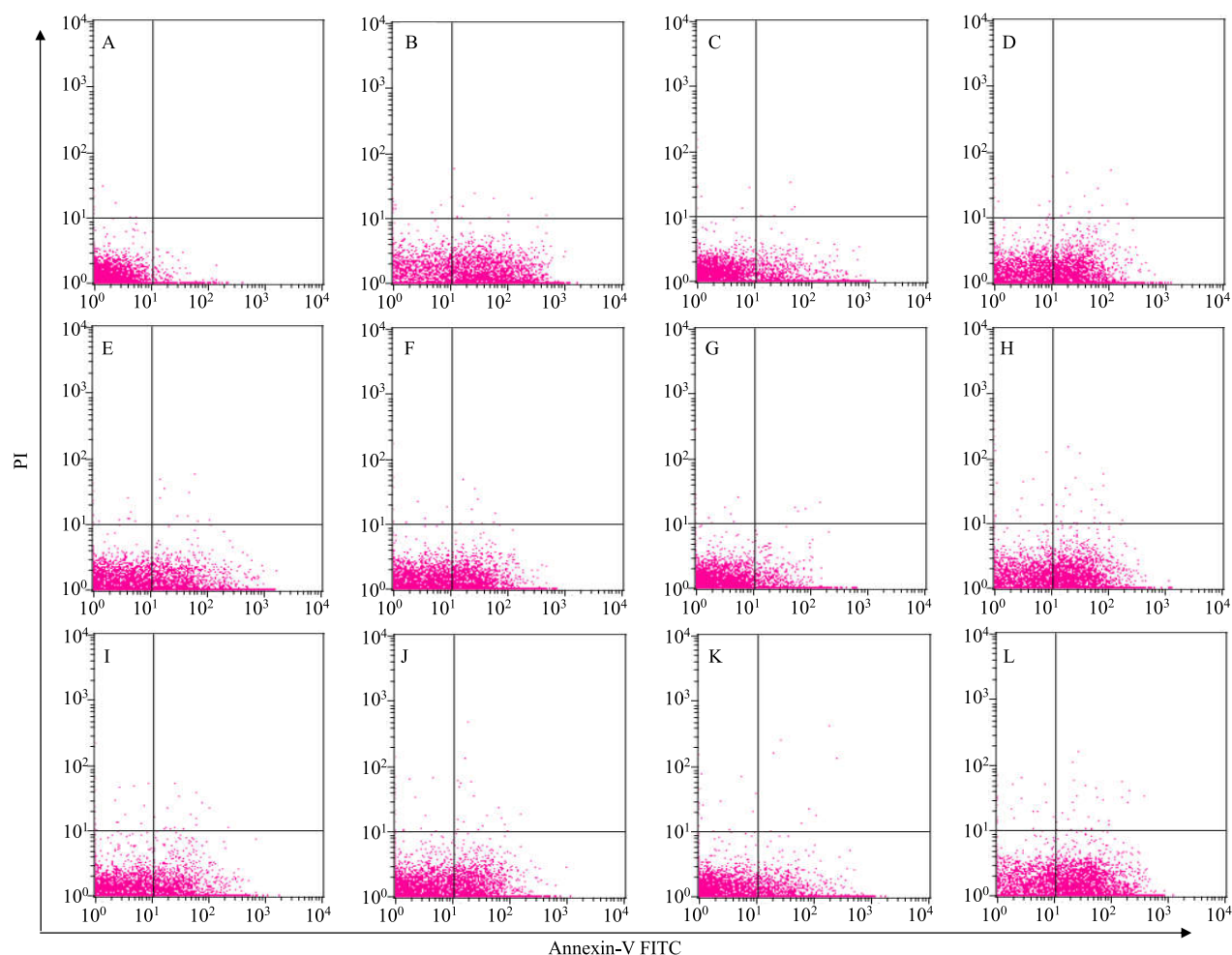


图 7 丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞早期凋亡率的影响

Fig. 7 Effect of *S. miltiorrhizae* and *L. chuanxiong* effective constituents compatibility on early apoptotic rate of hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation

表 4 丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞早期凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of *S. miltiorrhizae* and *L. chuanxiong* effective constituents compatibility on early apoptotic rate of hippocampal neurons injured by oxygen glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞早期 凋亡率/%	组别	细胞早期 凋亡率/%
对照	6.25±2.81	配伍 4	16.60±2.37**
模型	66.54±4.83 ^{△△}	配伍 5	53.04±1.45**
尼莫地平	21.93±4.09**	配伍 6	39.04±1.90**
配伍 1	41.38±2.34**	配伍 7	32.93±4.59**
配伍 2	45.41±2.69**	配伍 8	25.19±2.49**
配伍 3	33.00±4.40**	配伍 9	60.50±2.08*

表 5 早期凋亡率的正交设计直观分析

Table 5 Visual analysis of early apoptotic rate by orthogonal design

因素	K_1	K_2	K_3	R
A	39.93	36.23	39.54	3.70
B	30.30	41.21	44.18	13.88
C	35.20	40.84	39.66	5.64
D	51.64	39.13	24.93	26.71

本实验研究结果表明,丹参-川芎有效成分配伍与尼莫地平能明显抑制细胞上清液中 LDH 水平的增加,从而维持细胞膜的稳定性;能明显增强 SOD 的活性,降低 MDA 的水平,增强细胞清除氧自由基能力,减轻脂质过氧化反应,减少脂质过氧化物的生成,说明丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞有抗氧化保护作用,抗氧化作用较优

配伍分别为 A₃B₃C₃D₂、A₃B₃C₃D₃、A₂B₂C₃D₂，主要贡献有效成分丹参素和阿魏酸。能不同程度地抑制海马神经元细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的增加，抑制炎症级联反应，说明丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞有抗炎症保护作用，抗炎作用较优配伍分别为 A₂B₂C₂D₁、A₁B₁C₃D₂、A₃B₃C₃D₁，主要贡献有效成分川芎嗪和原儿茶醛。模型组细胞核染色质固缩，呈致密浓染，细胞内出现碎片状或点状亮蓝色荧光，与对照组相比，细胞整体荧光显著增强，细胞早期凋亡率明显升高；尼莫地平组与有效成分配伍组荧光强度均不同程度地降低，细胞核固缩情况较模型组有改善，细胞早期凋亡率均有降低。说明丹参-川芎有效成分配伍对氧糖剥夺海马神经元细胞有抗凋亡保护作用，影响细胞早期凋亡率最佳配伍组合为 A₂B₁C₁D₃，主要贡献有效成分阿魏酸。本研究初步探讨了丹参-川芎有效成分配伍对海马神经元细胞缺氧损伤的保护作用及机制，并对涉及其中的相关机制进行研究，为中医临床用药提供新的配伍思路。

参考文献

- [1] Xiong L, Tian G, Leung H, *et al.* Autonomic dysfunction predicts clinical outcomes after acute ischemic stroke: A prospective observational study [J]. *Stroke*, 2018, 49(1): 698-706.
- [2] Gharibani P, Modi J, Menzie J, *et al.* Comparision between single and combined post-treatment with S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide ischemia in rat brain [J]. *Neuroscience*, 2015, 300: 460-473.
- [3] 万海同, 别晓东, 姚政, 等. 养阴益气活血方治疗气阴两虚证、瘀血阻络证缺血性中风疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 281-286.
- [4] 张翠英. 丹参川芎对药及其组方冠心病心制剂治疗心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(5): 1018-1024.
- [5] 辛国臣, 牛丽颖, 丛劲松. 参芎注射液联合依达拉奉治疗脑梗死 64 例观察 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(12): 81.
- [6] 张曦, 陈明津. 丹参川芎治疗急性缺血性脑卒中的效果分析 [J]. 吉林医学, 2016, 37(10): 2417-2418.
- [7] 章洪. 丹参-川芎药对的药代动力学研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2015.
- [8] 滕文兵, 李承, 郑颖御, 等. 丹参素钠对大鼠局灶性脑缺血的治疗时间窗研究 [J]. 中药材, 2016, 39(10): 2359-2362.
- [9] 陈娟, 邓军, 张宇燕, 等. 丹参素对高脂血症大鼠脂代谢调节机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 313-317.
- [10] 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.
- [11] 周惠芬, 何昱, 艾进超, 等. 丹红注射液主要有效成分配伍在脑缺血再灌注大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3656-3661.
- [12] 张翠英, 郭丽丽, 王阶. 原儿茶醛的药理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 338-342.
- [13] Li G, Tian Y, Zhang Y, *et al.* Novel ligustrazine derivative T-VA prevents neurotoxicity in differentiated PC12 cells and protects the brain against ischemia injury in MCAO rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21759-21774.
- [14] 汪秋成, 陈勤. 川芎嗪对小鼠颅脑损伤后大脑组织细胞凋亡相关因子的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(2): 116-119.
- [15] 王青, 陶定波, 姜宾, 等. 不同剂量川芎嗪辅助治疗缺血性脑血管病疗效及对相关血清因子水平的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(16): 1722-1724.
- [16] 孙斯琪, 李琳, 储利胜, 等. 川芎嗪预处理骨髓间充质干细胞移植对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1259-1262.
- [17] Sung J H, Kim M O, Koh P O. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 516(1): 146-150.
- [18] 王卓, 周瑾, 曾泌梅, 等. 阿魏酸钠对氧糖剥夺所致星形胶质细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 26-30.
- [19] Zhang X, Zheng W, Wang T, *et al.* Danshen-Chuanxiong-Honghua ameliorates cerebral impairment and improves spatial cognitive deficits after transient focal ischemia and identification of active compounds [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 7(8): 1-11.
- [20] 管敏国, 张宇燕, 万海同, 等. 丹参川芎有效成分配伍对缺氧损伤大鼠脑内皮细胞的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(2): 74-78.
- [21] 姜海英, 杨进, 刘涛. 乳鼠海马神经元细胞代培养及 AD 损伤模型制备 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(19): 94-95.
- [22] 郑敏, 郭莲军, 吕青, 等. 大鼠皮质及海马神经元体外缺氧模型建立 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(3): 333-335.
- [23] 李梦阳, 曲鹏. 脑缺血-再灌注损伤时兴奋性递质谷氨酸的释放机制 [J]. 科技资讯, 2015, 13(24): 244-245.
- [24] 高轩, 陈荔枝, 刘振红, 等. 白藜芦醇通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1): 92-96.
- [25] 柳四新, 何丹, 余孝君, 等. 谷氨酸致脑缺血再灌注损伤中钙超载的信号转导机制 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(7): 20-23.
- [26] Sun M S, Jin H, Sun X, *et al.* Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: An obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 31: 3804979.
- [27] Rust R, Grönnert L, Schwab M E. Inflammation after stroke: A local rather than systemic response? [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(12): 877-879.