

川芎挥发油防治脂多糖致小鼠血管认知障碍的作用机制研究

周 雪^{1,2}, 李小清^{1,2}, 刘 琪², 熊静悦², 向菊芳^{1,2}, 曹方引^{2,3}, 赵 科^{2,4}, 唐大轩², 谭正怀^{2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610072

2. 四川省中医药科学院 药理毒理研究所防治重大疾病中药药效学评价平台, 四川 成都 610041

3. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

4. 西南医科大学, 四川 泸州 646000

摘要:目的 探索川芎挥发油对脂多糖(LPS)引起小鼠血管性认知障碍(VCI)的作用及其相关机制。方法 雄性 C57BL/C 小鼠随机分为假手术组、模型组、美金刚(10 mg/kg)组及川芎挥发油高、中、低剂量(30、15、7.5 mg/kg)组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 14 d, 于第 8 天单侧 icv LPS, 第 11 天及第 12 天分别进行 Y 迷宫与跳台实验; 末次给药后 24 h 断头处死小鼠, 取脑组织测定其中单胺氧化酶(MAO)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、乙酰胆碱(Ach)水平; 同时体外考察药物对电鳗 AchE、大鼠脑线粒体中超氧化物歧化酶(SOD)的直接作用和对 LPS 损伤的小鼠小胶质瘤 BV-2 细胞的作用。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠脑内 MAO 和 AchE 水平显著升高, 多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)水平均显著降低; 川芎挥发油高、中剂量均能显著降低 VCI 小鼠脑内 MAO 水平, 各剂量均能显著降低 VCI 小鼠脑内 AchE 水平; 行为学实验结果显示川芎挥发油各剂量均能够显著增加 VCI 小鼠的在 Y 迷宫实验中自发交替反应次数, 川芎挥发油中剂量能显著降低 VCI 小鼠在跳台实验中的潜伏期。体外实验发现, 川芎挥发油质量浓度为 1 mg/mL 时对电鳗 AchE 有微弱的抑制作用; 川芎挥发油 0.5 μg/mL 能显著抑制 BV-2 细胞肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和 NO 水平的升高。结论 川芎挥发油能够明显改善 LPS 致 VCI 小鼠的认知能力, 其机制可能与抑制脑内炎症反应、减轻对神经元损伤有关。

关键词: 血管性认知障碍; 川芎挥发油; 脂多糖; 脑立体定位; 单胺氧化酶; 乙酰胆碱酯酶; 乙酰胆碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)10-2390-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.020

Mechanism of essential oil of *Ligusticum chuanxiong* to prevent and treat vascular cognitive impairment induced by lipopolysaccharide in mice

ZHOU Xue^{1,2}, LI Xiao-qing^{1,2}, LIU Qi², XIONG Jing-yue², XIANG Ju-fang^{1,2}, CAO Fang-yin^{2,3}, ZHAO Ke^{2,4}, TANG Da-xuan², TAN Zheng-huai²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

3. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

4. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To explore the effect of volatile oil of *Ligusticum chuanxiong* on vascular cognitive impairment (VCI) induced by lipopolysaccharide (LPS) and its related mechanism. **Methods** Male C57BL/C mice were randomly divided into sham-operated group, model group, memantine (10 mg/kg) group, and volatile oil of *L. chuanxiong* (30, 15, and 7.5 mg/kg) groups, drugs were given by ig administration once a day for 14 d. On day 8, LPS was injected into the lateral ventricle in mice. On day 11 and day 12, the cognitive ability were checked by the Y maze and step down test. On day 15 the mice were decapitated and the brain tissue was taken to determine the levels of monoamine oxidase (MAO), acetylcholinesterase (AchE), and acetylcholine (Ach); At the same time, the effect of the drug on superoxide dismutase (SOD) in mitochondria of brain in SD rats and the activity of Ec AchE, and BV-2 cells of microglia injured by LPS were also investigated *in vitro*. **Results** LPS significantly increased the levels of MAO and AchE in the brain in mice, while decreased the levels of dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and norepinephrine (NE). The volatile oil of

收稿日期: 2019-01-28

基金项目: 四川省科技厅成果转化项目(2018YSZH0012); 成都市科技局科技惠民技术研发项目(2016-HM01-00378-SF)

作者简介: 周 雪(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: 751558401@qq.com

*通信作者 谭正怀 Tel: (028)85258992 E-mail: tanzhh616@163.com

L. chuanxiong 30 or 15 mg/kg decreased the level of MAO and AchE in the brain of LPS mice. The volatile oil of *L. Chuanxiong* could significantly increase the times of spontaneous alternation reaction in Y maze in VCI mice, and the middle dose could significantly decrease the latency of VCI mice in step down test. *In vitro*, the volatile oil of *L. chuanxiong* 1 mg/mL had a weak inhibitory effect on AchE of electric eel. The volatile oil of *L. chuanxiong* 0.5 μ g/mL could significantly increase the activity of SOD in brain mitochondria of rats, and decrease the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO) increased significantly in BV-2 cells induced by LPS. **Conclusion** The volatile oil of *L. chuanxiong* can significantly improve the cognitive ability of VCI induced by LPS in mice, and its mechanism may be related to inhibit the inflammatory response in the brain and alleviate the injury of neurons.

Key words: vascular cognitive impairment; essential oil of *Ligusticum chuanxiong* Hort.; lipopolysaccharide; brain stereotyping; monoamine oxidase; acetylcholinesterase; acetylcholine

血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是由轻度认知障碍到痴呆的一系列疾病的综合征, 主要由脑血管疾病引起, 是继阿尔茨海默病之后的第 2 大痴呆类型^[1]。1980 年至今, VCI 的发病率逐年上升, 有数据表明, 中国 55 岁以上人群中 VCI 的患病率、发病率、死亡率分别为 0.8%、0.27%、14.6%, 给患者的家庭和社会带来了严重的负担^[2]。

目前, VCI 的发病机制还未得到系统阐明, 普遍认为其与遗传因素及脑血管因素有关^[3], 其中, 神经炎症扮演了重要的角色。有学者发现, 通过侧脑室注射脂多糖 (LPS) 可复制由中枢炎症引发的认知障碍模型^[4]。侧脑室注射 LPS 将会导致单胺氧化酶和乙酰胆碱酯酶的升高, 从而引起相应神经递质去甲肾上腺素 (NE)、5-羟色氨 (5-HT) 及多巴胺 (DA) 水平的降低, 从而导致 VCI 的发生^[5]。

川芎挥发油是川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的有效部位提取物, 其代表性成分是洋川芎内酯 A 和藁本内酯^[6]。本课题组在前期研究中, 发现其对双侧颈总动脉结扎引起的大鼠血管性痴呆模型有较好的防治作用^[7], 为验证川芎挥发油对血管性认知障碍动物模型的作用, 本课题组用 LPS 侧脑室注射 (icv) 来复制小鼠 VCI 模型, 探究川芎挥发油对其作用及可能的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量为 18~20 g, 由四川省医学科学院四川省人民医院动物研究所养殖研究室提供, 动物许可证号 SCXK (川) 2013-15。SPF 级 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 由四川省中医药科学院实验动物中心提供, 生产合格证号 SYXK (川) 2013-19, 饲养于四川省中医药科学院药理毒理研究所 SPF 级屏障系统, 温度 20~22

℃, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替照明, 自由饮水。

1.2 细胞

小鼠小胶质瘤 BV-2 细胞、大鼠肾上腺嗜铬 PC12 细胞由四川大学生物治疗国家重点实验室罗有福教授惠赠。

1.3 药物与试剂

川芎挥发油 (棕红色油状液体, 批号 20160523, 每克相当于原生药 50 g, 藁本内酯质量分数 31.1%, 洋川芎内酯质量分数 19.6%), 提取工艺及质量控制按专利 (ZL201610688564.8) 执行, 本实验剂量按川芎有效部位挥发油计算, 金龙鱼食用调和油稀释成所需浓度; 美金刚 (规格 10 mg/片, 批号 580978), 丹麦灵北药厂; LPS, 美国 Sigma 公司; 重酒石酸去甲肾上腺素 (批号 140110)、5-羟基色胺盐酸盐 (批号 1301009)、盐酸多巴胺 (批号 130911), 成都植标化纯生物技术有限公司; DEME 高糖培养基, Hyclone 公司; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技股份有限公司; RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 马血清、二甲基亚砜 (批号 1213C029), Solarbio 公司; 氟比洛芬 (批号 F8514), Sigma 公司。MTT, Amresco 公司。乙酰胆碱酯酶 (AchE)、乙酰胆碱 (Ach)、单胺氧化酶 (MAO)、丙二醛 (MDA)、总蛋白定量、一氧化氮 (NO)、乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒, R&D Systems 公司。水溶性维生素 E (VE, 批号 2HD5C-ST), 东京化成工业株式会社; 电鳗乙酰胆碱酯酶、硫代乙酰胆碱、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB), Sigma 公司; 盐酸多奈哌齐 (批号 1601044), 卫材 (中国) 药业有限公司。

1.4 仪器

Y 迷宫系统, 成都泰盟科技有限公司; Observer

XT 行为观察记录分析系统, 荷兰 Noldus 公司; VF 多功能全波长读数扫描仪, Thermo 公司; MagNA Lyser 全自动组织匀浆机, Roche 公司; CX21 显微镜, Olympus 公司; HJ-CJ-2FD 双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 3111CO₂ 恒温培养箱, Thermo 公司; DW-2000 脑立体定位仪, 成都泰盟科技有限公司。

2 方法

2.1 川芎挥发油对 LPS 致 VCI 小鼠的影响

2.1.1 分组、造模及给药 取体质量为 18~20 g 雄性 C57BL/6 小鼠 66 只, 适应性喂养 7 d 后随机分成 6 组, 分别为假手术组、模型组、美金刚 (10.0 mg/kg) 组及川芎挥发油高、中、低剂量 (30.0、15.0、7.5 mg/kg) 组。各组小鼠 ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 14 d, 假手术组和模型组小鼠给予同等体积的植物油, 于第 8 天禁食 12 h 后单侧 icv LPS。小鼠用 3% 异氟烷麻醉后, 剃去头部的毛, 碘伏消毒后, 用剪刀沿垂直于两耳之间的连线纵向打开大脑皮肤, 然后用镊子轻轻地钝性分离头骨皮肤, 暴露出前囟。然后将小鼠固定于脑立体定位仪上, 用 2% 异氟烷维持麻醉, 以前囟为中线, 参照坐标 (-0.5 mm, +1 mm, -2 mm), 即向后 0.5 mm, 向右 1 mm, 硬脑膜下 2 mm 注射 LPS (1 μg/μL) 或者人工脑脊液 5 μL/只, 注射结束后, 留针 2 min。碘伏消毒后, 缝合头部皮肤^[8]。

2.1.2 Y 迷宫试验 小鼠造模 72 h 后进行 Y 迷宫检验。本实验所用 Y 迷宫是 1 个水平迷宫 (长 40 cm, 宽 3 cm, 高 12 cm), 由 3 个相同的臂组成, 彼此之间以 120° 排列, 分别将这 3 个臂设置为 A、B、C 臂。迷宫的底部和墙壁都布置成白色。将小鼠随机从其中的 1 个臂放入, 打开摄像头, 让小鼠在 Y 迷宫内自由活动 8 min, 记录小鼠有效的自发交替反应次数 (即 ABC、ACB、BAC、BCA、CAB、CBA) 和进入各个臂的总次数^[9]。每只小鼠测试前需用 75% 乙醇擦拭迷宫的底部和墙壁, 彻底去除异味。有效自发交替反应 = 有效自发交替反应次数 / (进入各臂总次数 - 2)^[10]。

2.1.3 跳台实验 Y 迷宫结束后 24 h 进行跳台学习, 学习 24 h 后进行跳台实验的记忆检测。首先将小鼠放入反应箱内适应环境 3 min, 然后立即通以 36 V 的交流电, 小鼠在受到电击后, 将跳回到反应箱内的安全平台上, 但多数小鼠可能会再次或者多次跳至铜栅上, 受到电击后又再次跳回平台, 训练

5 min 后, 记录每只小鼠受到的电击次数, 将其作为学习成绩。每批小鼠实验结束后, 都需要用 75% 乙醇对跳台进行擦拭。24 h 后, 将小鼠直接放至已经通电跳台的安全平台上, 观察并记录小鼠首次跳下安全平台的时间, 记作潜伏期, 5 min 内小鼠总共跳下平台的次数记作错误次数。

2.1.4 生化检测 注射 LPS 后第 8 天, 于冰上处死小鼠并取脑, 分离海马、皮层, 称质量后冻存于 -80 °C 冰箱中, 临用前取出组织, 加入 9 倍体积生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。NO 采用硝酸还原酶法测定; AchE、MAO 均按照试剂盒说明书进行测定; DA、5-HT、NE 均采用荧光分光光度法测定^[11]。

2.2 川芎挥发油对电鳗 AchE 活性的影响

向 96 孔板中依次加入硫化硫代乙酰胆碱 (1 mmol/L) 30 μL、PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 40 μL、不同质量浓度的川芎挥发油溶液或不同浓度的多奈哌齐溶液 20 μL, 电鳗 AchE 10 μL (终浓度为 0.05 U/mL), 混匀, 于 37 °C 恒温孵育箱中孵育 15 min, 取出, 加入 0.2% DTNB 溶液 30 μL, 37 °C 条件下继续孵育 2 h, 酶标仪测定 412 nm 处吸光度 (A) 值。每个化合物每个浓度平行测定 3 孔。

$$\text{酶抑制率} = 1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}}$$

2.3 川芎挥发油对大鼠脑线粒体中 SOD 活性的影响

2.3.1 脑线粒体的制备 将 2 只 SD 大鼠断头处死, 迅速取出大脑皮层, 将大脑皮层置于预冷的小烧杯中, 剔除血管, 用预冷的制备缓冲液冲洗 3 次, 去除淤血。取出脑组织, 吸净缓冲液, 称质量后剪碎, 将脑组织转入玻璃匀浆器中, 按 10 mL/g 组织加入制备缓冲液, 手动匀浆 10 次左右。将匀浆液于 4 °C 离心 (1 000×g, 3 min), 取上清液, 4 °C 离心 (12 000×g, 10 min), 弃上清, 沉淀物即为线粒体。最后以 5 倍体积制备缓冲液将所得沉淀混悬, 于 4 °C 离心 (12 000×g, 10 min)。重复离心 2 次后, 用 SET 缓冲液制备成 25% 线粒体悬浮液 (终浓度为 5%), 以 Lowry 法测定蛋白含量。注意整个线粒体制备过程均应在 4 °C 进行。

2.3.2 SOD 活性检测 取事先制备好的 25% 脑线粒体 50 μL, 加入到一次性软管中。实验共设对照组, 模型组, 阳性药组 (维生素 E, VE, 终质量浓度 5 μg/mL), 川芎挥发油高、中、低剂量 (500、50、5 μg/mL) 组。每组设 3 个复孔。分别向各管加入相应药物 50 μL, 模型组和对照组加入 50 μL 1%

乙醇溶液,涡旋混匀,37 ℃恒温水浴中孵育 60 min,取出,再向各管中加入 50 μL 的 H_2O_2 (使其终浓度为 50 mmol/L),对照组加入 SET 缓冲溶液 50 μL 。混匀,继续放入 37 ℃恒温水浴锅中孵育 60 min,取脑线粒体混悬液,按照 SOD 检测试剂盒的检测方法检测 SOD 活力。

2.4 川芎挥发油对 LPS 损伤的 BV-2 细胞的保护作用研究

2.4.1 MTT 法确定川芎挥发油与 LPS 用药浓度 取对数生长期的 BV-2 细胞,制成细胞悬液后,通过细胞计数板调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,加入 96 孔板的中间 60 孔,每孔加入 100 μL 细胞悬液,96 孔板的周围 36 孔用新鲜培养基填充。将培养板放入 5% CO_2 、37 ℃恒温培养箱中过夜。待细胞生长到 60%时,弃去上清液,加入含不同质量浓度的川芎挥发油 200 μL ,使其终质量浓度分别为 0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$,同时设定对照组(加入 200 μL 新鲜培养基),每组设置 3 个复孔,继续放入恒温培养箱中孵育 24 h 后,弃去上清液,加入现配的 MTT 0.5 mg/mL,继续放入 5%、37 ℃的恒温培养箱中继续孵育 4 h,取出,轻轻地吸出 MTT 溶液,然后加入 DMSO 150 μL ,在摇床上振荡 5 min,使 DMSO 能够充分溶解甲瓚结晶。酶标仪检测 570 nm 处各孔的 A 值。结果通过药物组与对照组细胞的存活率进行比较,无统计学差异则说明该质量浓度范围内的药物对细胞活性的影响不大。LPS 用药浓度按同样方法测定。

细胞存活率 = $A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$

2.4.2 川芎挥发油对 LPS 损伤的 BV-2 细胞上清液中 TNF- α 、NO 水平的影响 取对数生长期的 BV-2 细胞接种于 96 孔板上,密度 4×10^4 个/mL,每孔加入 100 μL ,于 37 ℃、5%的恒温箱中培养,过夜。随机分为对照组(只加入培养基),模型组(只加入 LPS),川芎挥发油 0.5、0.1、0.02、0.004 $\mu\text{g/mL}$ 组(加入 LPS 和相应质量浓度的川芎挥发油),氟比洛芬 10、1、0.1、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组(加入 LPS 和相应浓度的氟比洛芬),每孔加入 180 μL 含药培养基。设 3 个复孔。预孵育 2 h 后,再加入 LPS 20 μL ,使得 LPS 的终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,于培养箱中继续培养 24 h 后,取上清液,按试剂盒方法检测 TNF- α 、NO 的含量变化。

2.4.3 BV-2 细胞上清液对 PC12 细胞存活率及释放 LDH 的影响 取对数生长的 PC12 细胞接种于 96 孔板上,接种密度为 1×10^5 个/mL,每孔加入 100

μL ,于 37 ℃、5% CO_2 的恒温箱中培养,过夜。另取对数生长的 BV-2 细胞接种于另一 96 孔板上,密度 4×10^4 个/mL,每孔加入 100 μL ,于 37 ℃、5% CO_2 的恒温箱中培养,过夜。BV-2 细胞分为对照组(只加入培养基),模型组(只加入 LPS),川芎挥发油 0.5、0.1、0.02、0.004 $\mu\text{g/mL}$ 组,每孔加入 180 μL 含药培养基。每个组设置 5 个复孔。预孵育 2 h 后,再加入 LPS 20 μL ,使得 LPS 的终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,于培养箱中继续培养 24 h,然后取出上清液,每组 5 个复孔的上清液混匀,然后分别加入到事先接种好的 PC12 细胞中,每孔加入对应的上清液 200 μL ,然后将 PC12 细胞放入 37 ℃、5% CO_2 恒温箱中继续培养 24 h,取出上清液,按试剂盒说明检测 LDH 的活力,同时向接种 PC12 细胞的 96 孔板中加入 MTT,按“2.4.1”项下方法检测 PC12 细胞的存活率。

2.5 数据统计与分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 23.0 对数据进行统计分析,采用单因素方差分析。两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 川芎挥发油对 LPS 致 VCI 小鼠脑组织生化指标的影响

从表 1 中可以看出,小鼠单侧 icv LPS 后,与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 MAO、AChE 水平显著升高,单胺类神经递质 DA、NE、5-HT 均显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,川芎挥发油高、中、低剂量均能显著降低小鼠脑组织 AChE 水平 ($P < 0.05$);川芎挥发油高、中剂量能显著降低 MAO 水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.2 川芎挥发油对 LPS 致 VCI 小鼠记忆、学习能力的影

从表 2 可以看出,与假手术组比较,模型小鼠的 Y 迷宫自发交替反应次数显著减少,跳台潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$)。与模型组比较,川芎挥发油高、中剂量组和美金刚组小鼠自发交替反应次数显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01);川芎挥发油中剂量组和美金刚组小鼠的跳台潜伏期显著增加 ($P < 0.05$)。

3.3 川芎挥发油对电鳗 AChE 活性的影响

由表 3 可知,当川芎挥发油质量浓度达到 1 mg/mL 时,其对电鳗 AChE 表现出较弱的抑制作用,而阳性药多奈哌齐对电鳗 AChE 有较强的抑制作用。

表 1 川芎挥发油对 LPS 致 VCI 小鼠脑组织生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)Table 1 Effect of volatile oil of *L. chuanxiong* on biochemical indexes in brain tissue of VCI mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MAO/(U·g ⁻¹)	DA/(μg·g ⁻¹)	NE/(μg·g ⁻¹)	5-HT/(μg·g ⁻¹)	AchE/(U·g ⁻¹)	NO/(μg·g ⁻¹)
假手术	—	6.07±0.61	28.79±9.55	15.66±1.96	17.31±2.20	0.76±0.10	0.68±0.37
模型	—	6.97±0.99 [#]	18.61±7.69 [#]	13.16±2.61 [#]	15.31±2.08 [#]	0.89±0.17 [#]	1.58±1.83
美金刚	10.0	5.94±1.05 [*]	21.82±6.38	16.02±2.29 [*]	15.24±2.76	0.76±0.10 [*]	0.96±0.62
川芎挥发油	30.0	5.28±1.01 ^{**}	21.93±10.63	12.13±1.81	14.07±3.01	0.73±0.12 [*]	1.09±0.73
	15.0	6.10±0.84 [*]	14.17±7.29	12.77±1.78	15.77±1.80	0.67±0.10 [*]	1.54±0.83
	7.5	6.44±0.74	20.94±10.72	14.45±2.42	16.57±2.25	0.73±0.12 [*]	0.72±0.33

与假手术组比较: [#]*P*<0.05; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01, 表 2 同[#]*P*<0.05 vs Sham group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group, same as table 2表 2 川芎挥发油对 LPS 致 VCI 小鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)Table 2 Effect of volatile oil of *L. chuanxiong* on behavior of VCI mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	自发交替反应次数	跳台潜伏期/s
假手术	—	59.69±7.76	283.88±38.85
模型	—	53.12±7.33 [#]	178.38±128.10 [#]
美金刚	10.0	63.04±8.73 ^{**}	282.20±40.44 [*]
川芎挥发油	30.0	60.51±8.81 [*]	187.58±141.46
	15.0	61.02±8.43 [*]	276.92±79.96 [*]
	7.5	57.99±5.51	271.20±91.07

表 3 川芎挥发油对电鳗 AchE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of volatile oil of *L. chuanxiong* on AchE activity of Ec ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	<i>C</i> 或 ρ	抑制率/%
多奈哌齐	1×10^{-6} mol·L ⁻¹	3.23±2.63
	2×10^{-7} mol·L ⁻¹	29.92±1.28
	8×10^{-8} mol·L ⁻¹	79.72±0.19
	4×10^{-8} mol·L ⁻¹	62.21±8.35
川芎挥发油	1.0 mg·mL ⁻¹	22.74±0.78
	0.5 mg·mL ⁻¹	3.36±1.26
	0.2 mg·mL ⁻¹	1.10±3.82
	0.1 mg·mL ⁻¹	-0.73±1.45

3.4 川芎挥发油对大鼠脑线粒体中 SOD 活力的影响

从表 4 中可以看出, 与对照组比较, 模型组大鼠脑线粒体中 SOD 活力显著降低 (*P*<0.01)。与模型组相比, 川芎挥发油高剂量组和 VE 组大鼠脑线粒体中 SOD 活力均显著增加 (*P*<0.05)。

3.5 川芎挥发油对 LPS 损伤 BV-2 细胞的影响

3.5.1 MTT 法确定川芎挥发油与 LPS 用药浓度
表 5 结果表明, 与对照组比较, 川芎挥发油 0.5 μg/mL 组细胞 *A* 值显著降低 (*P*<0.05), 且细胞存

活率降低。表 6 结果表明, 与对照组比较, LPS 100 μg/mL 组细胞 *A* 值显著降低 (*P*<0.05), 且细胞存活率降低。

表 4 川芎挥发油对大鼠脑线粒体中 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effect of volatile oil from *L. chuanxiong* on activity of SOD in mitochondria in rat brain ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ /(μg·mL ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	19.29±1.43
模型	—	14.10±0.85 ^{##}
VE	5	16.32±1.30 [*]
川芎挥发油	500	15.82±0.71 [*]
	50	13.45±1.07
	5	13.89±3.27

与对照比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 vs model group表 5 川芎挥发油质量浓度筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Screening of volatile oil concentration of *L. chuanxiong* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ /(μg·mL ⁻¹)	<i>A</i> 值	存活率/%
对照	—	0.33±0.03	100.00
川芎挥发油	0.500	0.28±0.02 [#]	86.37
	0.100	0.37±0.04	112.75
	0.020	0.37±0.01	112.48
	0.004	0.35±0.06	108.69

与对照比较: [#]*P*<0.05, 表 6 同[#]*P*<0.05 vs control group, same as table 6表 6 LPS 质量浓度筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Screening of LPS concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ /(μg·mL ⁻¹)	<i>A</i> 值	存活率/%
对照	—	1.19±0.07	100.00
LPS	100.0	0.73±0.15 [#]	61.19
	10.0	1.26±0.08	105.76
	1.0	1.29±0.11	108.16
	0.1	1.24±0.08	103.95

3.5.2 川芎挥发油对 LPS 损伤的 BV-2 细胞上清液组织 TNF- α 、NO 水平的影响 从表 7 可以看出, LPS 作用于 BV-2 细胞后, 能够激活细胞, 诱导其产生 TNF- α 和 NO。与对照组比较, 模型组细胞 TNF- α 和 NO 的释放量显著增多 ($P<0.05$)。川芎

挥发油 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、氟比洛芬 10、1、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 均能显著降低 BV-2 细胞 TNF- α 的释放 ($P<0.05$ 、0.01)。能够显著减少 BV-2 细胞 TNF- α 和 NO 的释放 ($P<0.05$)。

3.5.3 BV-2 细胞上清液对 PC12 细胞存活率及释放

表 7 川芎挥发油对 LPS 损伤的 BV-2 及 PC12 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effects of volatile oil of *L. chuanxiong* on BV-2 cells damaged by LPS and PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C 或 ρ	BV-2		PC12	
		TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	存活率/%	LDH/(U·L ⁻¹)
对照	—	46.70 $\pm$ 5.63	31.89 $\pm$ 4.09	100.00	43.70 $\pm$ 4.73
模型	—	67.22 $\pm$ 10.33 ^{##}	39.23 $\pm$ 4.08 [#]	64.93 ^{##}	51.63 $\pm$ 3.75 [#]
川芎挥发油	0.500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	48.57 $\pm$ 7.33 [*]	27.93 $\pm$ 4.82 ^{**}	92.81 ^{**}	47.90 $\pm$ 1.01
	0.100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	73.27 $\pm$ 9.10	29.15 $\pm$ 9.85	87.67 ^{**}	48.53 $\pm$ 0.65
	0.020 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	71.93 $\pm$ 32.81	33.24 $\pm$ 3.75	80.98 ^{**}	48.51 $\pm$ 0.68
	0.004 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	62.93 $\pm$ 7.77	35.24 $\pm$ 4.85	81.62 ^{**}	47.39 $\pm$ 1.28
氟比洛芬	10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	38.31 $\pm$ 13.57 [*]	43.10 $\pm$ 11.35	—	—
	1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	35.41 $\pm$ 10.59 ^{**}	38.88 $\pm$ 8.15	—	—
	0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	58.91 $\pm$ 2.35	41.29 $\pm$ 7.75	—	—
	0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	45.14 $\pm$ 7.67 [*]	40.38 $\pm$ 3.23	—	—

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

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

LDH 的影响 由表 7 可以看出, 取 LPS 作用后的 BV-2 细胞上清液作用于 PC12 细胞, PC12 细胞存活率显著降低 ($P<0.01$), 而不同浓度川芎挥发油给药组的上清液作用于 PC12 细胞, 能够使细胞存活率显著升高 ($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组细胞 LDH 活性显著升高 ($P<0.05$), 而不同浓度的川芎挥发油给药组上清液能够使 PC12 细胞 LDH 释放量降低, 但与模型组比较差异不显著。

4 讨论

VCI 包括从非痴呆型血管性认知障碍到轻度痴呆血管性认知障碍乃至血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 全过程, 其特征为有明显或无明显临床卒中症状的脑血管损伤伴有至少影响一个认知区域的认知障碍^[12]。目前对于 VCI 的防治并无疗效确切的方法或药物, 临床上主要使用抗氧化剂、脑营养剂、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 阻断剂、胆碱酯酶抑制剂等进行对症治疗, 部分临床研究显示美金刚、多奈哌齐、卡巴拉汀以及尼莫地平对 VaD 患者的行为、执行功能以及认知能力有一定的改善作用, 但对疾病的本质并无明显的防治作用^[13-14]。

临床研究资料统计分析发现轻度认知障碍患者

脑组织血流量、血流速度均显著降低, 其脑血管阻力显著升高^[15]。近年来许多无创检测脑功能、脑血流技术进一步证明了脑血管功能与大脑活动的紧密关系。为了强调脑神经组织与血管之间的紧密关系, 美国国立神经疾病与中风研究所中风进展评审小组于 2001 年提出了神经血管单元 (neurovascular unit, NVU) 这个概念, 目前从解剖学上已经证实 NVU 的组成可能会因在脑血管树 (cerebrovascular tree) 位置不同而有较大的差异。在细小血管阶段参与 NVU 组成的主要有神经元、星型胶质细胞、小胶质细胞、平滑肌、周细胞、内皮细胞以及红细胞等, 但在毛细血管段主要是神经突触、星型胶质细胞以及内皮细胞等^[16]。

研究表明, NVU 发挥调控功能是通过神经血管偶联 (neurovascular coupling, NVC) 实现的。在 NVC 中, 神经元直接或间接通过相关细胞生成信号介质引起血管反应^[17-18]。研究发现 NO 在 NVC 中发挥着非常关键的作用^[19]。在 NVU 中, NO 既可由神经元上的神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 活化产生, 也可由内皮细胞上内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 活化生成^[20]。

目前认为调控 NVU 功能的既有 NVC, 也有血管神经偶联 (vasculo-neuronal coupling, VNC), 在正常生理情况下 NVC 发挥着主要作用, 但在病理情况下, 特别是 VCI 中, VNC 异常是其关键因素^[21]。运用抑制 NO、环氧化二十碳三稀酸 (EETs) 和前列腺素生成的物质或单独局部注射内皮素-1 (ET-1) 成功复制卒中动物模型已经证明了 VNC 失偶联在 VCI 发生、发展中的重要性^[22]。

由此可见, 当血管方面出现故障时, 一方面使神经系统的能量供应得不到满足, 导致神经功能受损, 引起 VNC 失偶联; 而受损的神经系统通过多种途径, 如刺激星型胶质细胞分泌大量的炎症介质、单胺氧化酶物质等。炎症介质作用于已经受损的血管, 使其炎症增加, 血脑屏障通透性增加, 使众多大分子物质进入脑组织, 进一步加重脑组织水肿, 压迫脑组织, 从而加重脑组织损伤, 形成恶性循环。而单胺氧化酶的活性增加将显著降低儿茶酚胺的水平, 从而降低血管的收缩性, 特别是通过逆向传播使软脑膜小血管处于舒张状态, 使过量的血液进入病变区, 进一步加重脑组织水肿的发生、发展, 加重 NVC 失偶联^[23]。

项目组前期研究发现慢性脑组织低灌后 2 个月, 大鼠的认知能力显著降低, 其大脑皮层神经元数量显著减少、乙酰胆碱及单胺类神经递质水平显著降低。川芎挥发油可显著改善 VCI 大鼠上述症状, 由此推测该药防治 VCI 可能与其调控大脑皮层神经元胆碱酯酶活性有关^[7]。本实验研究发现, 川芎挥发油体外对乙酰胆碱酯酶作用较弱, 提示川芎挥发油对 VCI 大鼠脑组织神经递质的影响并非直接作用于相关酶类的结果。

研究发现长期脑组织低灌大鼠海马区脑组织的 NO 含量显著降低, 而川芎挥发油可以显著增加大鼠海马区脑组织的 NO 含量^[7]。本实验研究发现川芎挥发油可显著改善 LPS 致 VCI 小鼠的认知能力。活化小胶质细胞或者星形胶质细胞引起的神经炎症在中枢神经系统中扮演着重要的角色。胶质细胞的过度激活将会促进炎症因子如 TNF- α 、NO 的大量释放, 从而对神经元造成损伤, 引起神经退行性疾病的发生^[24]。本研究发现川芎挥发油能够抑制 LPS 诱导的 BV-2 的激活以及减少 TNF- α 和 NO 的释放。LPS 激活胶质细胞产生炎症因子, 炎症因子进一步作用于神经元, 引起神经元的凋亡, 从而导致神经退行性疾病的发生^[25]。本研究发现 LPS 与 BV-2 细

胞作用后的上清液再与 PC12 细胞共培养, 可引起 PC12 细胞死亡, 而用川芎挥发油预处理 BV-2 细胞后, 其上清液 TNF- α 和 NO 水平明显降低, 对 PC12 细胞的损伤作用也显著减弱。由于 TNF- α 是诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的主要诱导剂, nNOS 活性改变不大, 因此, 推测川芎挥发油升高长期大脑低灌大鼠海马区 NO 水平可能与其具有 eNOS 保护作用有关。

综上所述, 川芎挥发油防治血管性认知障碍可能与其能够抑制胶质细胞炎症反应、减少炎症因子对神经细胞的损伤有关, 也可能与其能够调控 eNOS 增加 NO 生成, 改善大脑局部微循环有关, 其详细作用机制有待进一步阐明。

参考文献

- [1] Dichgans M, Leys D. Vascular cognitive impairment [J]. *Circul Res*, 2017, 120(3): 573-591.
- [2] 曲艳吉, 卓琳, 王华丽, 等. 1980—2011 年中国社区 55 岁及以上人群中血管性痴呆流行病学的 Meta 分析 [J]. *中国卒中杂志*, 2013, 8(7): 533-543.
- [3] 孙宇, 韩璠, 戴建平. 血管性认知障碍诊断标准的演变与解读 [J]. *中国卒中杂志*, 2017, 27(1): 13-17.
- [4] Lee J W, Lee Y K, Yuk D Y, et al. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation [J]. *J Neuroinflam*, 2008, doi: 10.1186/1742-2094-5-37.
- [5] 张娜. 单胺氧化酶抑制剂治疗神经退行性疾病的研究进展 [J]. *医学理论与实践*, 2015, 28(13): 1713-1715.
- [6] 杨艳, 易进海, 黄志芳, 等. 川芎、当归和藁本中挥发油成分比较研究 [J]. *中药材*, 2015, 38(6): 1212-1216.
- [7] 李小龙, 艾佳晨, 刘琪, 等. 智复欣防治血管性认知障碍的作用机理研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(1): 180-184.
- [8] 张晓莹, 张黎明, 李云峰, 等. 脑室注射脂多糖建立小鼠认知行为障碍模型 [J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(5): 487-491.
- [9] 王志强, 王庆松. 血管性认知障碍动物模型神经行为学评价工具研究进展 [J]. *中风与神经疾病*, 2015, 32(10): 949-951.
- [10] Miedel C J, Patton J M, Miedel A N, et al. Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb clasping in transgenic mouse models of amyloid- β and tau neuropathology [J]. *J Vis Exp*, 2017, doi: 10.3791/55523.
- [11] 张燕, 王洪斌, 杨海霞, 等. 荧光分光光度法测定大

- 鼠不同脑区单胺类神经递质 [J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(1): 93-96.
- [12] Gorelick P B, Scuteri A, Black S E, *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association [J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2672-2713.
- [13] Román G C, Salloway S, Black S E, *et al.* Randomized, placebocontrolled, clinical trial of donepezil in vascular dementia: Differential effects by hippocampal size [J]. *Stroke*, 2010, 41(6): 1213-1221.
- [14] Ballard C, Sauter M, Scheltens P, *et al.* Efficacy, safety and tolerability of rivastigmine capsules in patients with probable vascular dementia: The Vantag E study [J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(9): 2561-2574.
- [15] Yew B, Nation D A. Cerebrovascular resistance: Effects on cognitive decline, cortical atrophy, and progression to dementia [J]. *Brain*, 2017, 140(7): 1987-2001.
- [16] Mishra A, Reynolds J P, Chen Y, *et al.* Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(12): 1619-1627.
- [17] Attwell D, Buchan A M, Charpak S, *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow [J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 232-243.
- [18] Hamilton N B, Attwell D, Hall C N. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: A component of neurovascular coupling in health and disease [J]. *Front Neuro-energetics*, 2010, doi: 10.3389/fnene.2010.00005.
- [19] Lourenco C F, Ledo A, Barbosa R M, *et al.* Neurovascular-neuroenergetic coupling axis in the brain: Master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.
- [20] Liu P, Smith P F, Appleton I, *et al.* Hippocampal nitric oxide synthase and Arginase and age-associated behavioral deficits [J]. *Hippocampus*, 2005, 15(5): 642-655.
- [21] Tarantini S, Hertelendy P, Tucsek Z, *et al.* Pharmacologically-induced neuro-vascular uncoupling is associated with cognitive impairment in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, doi:10.1038/jcbfm.2015.162.
- [22] Lake E M R, Bazzigaluppi P, Mester J, *et al.* Neurovascular unit remodelling in the subacute stage of stroke recovery [J]. *Neuroimage*, 2017, doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.09.016.
- [23] Kim K J, Ramiro D J, Iddings J A, *et al.* Vasculo-neuronal coupling: Retrograde vascular communication to brain neurons [J]. *J Neurosci*, 2016, 14, 36(50): 12624-12639.
- [24] Damisah E C, Hill R A, Tong L, *et al.* A fluoro-nissl dye identifies peri-cytes as distinct vascular mural cells during *in vivo* brain imaging [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(7): 1023-1032.
- [25] Lecrux C, Hamel E. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, doi: 10.1098/rstb.2015.0350.