

复方丹参片及其拆方对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的改善作用和机制探讨

梁小娜¹, 林娟³, 李新^{2,6,7}, 徐旭^{2,6,7}, 王德勤³, 王玉丽^{2,6,7}, 匡艳辉³, 李晓霞⁵, 黄启和⁴, 侯文彬^{2,7*}, 郭海彪^{3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

4. 天津医科大学, 天津 300070

5. 华北理工大学, 河北 唐山 063200

6. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

7. 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 比较复方丹参片及其拆方对血管性痴呆(VD)模型大鼠的学习记忆能力的改善作用和机制。**方法** 通过穿梭箱筛选出学习记忆能力处于正常范围内的大鼠, 随机分为假手术组、模型组、阳性药组(甲磺酸双氢麦角毒碱片 0.65 g/kg)、丹参组(丹参乙醇提取物 0.3 g/kg)、三七组(三七粉 0.3 g/kg)、复方丹参片组(0.3、0.6 g/kg)组, ig 给药, 每日1次, 预防给药7 d后, 通过双侧颈总动脉结扎再灌注法制备 VD 大鼠模型, 连续给药7 d后, 进行穿梭箱实验和神经功能缺损评分; TTC 染色检测脑梗死面积, Nissl 染色检测大鼠大脑皮层病理变化; 试剂盒法检测脑组织内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乙酰胆碱(Ach)、5-羟色胺(5-HT)及血清血管内皮生长因子(VEGF)、内皮素(ET)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、白细胞介素-6(IL-6)等指标的变化。**结果** 与模型组比较, 复方丹参片组可一定程度地提高 VD 大鼠条件刺激回避次数, 降低神经功能缺损评分和脑梗死面积, 减少大鼠脑组织 MDA 和血清 ET、eNOS 和 IL-6 水平, 升高脑组织 Ach、5-HT 及 SOD 和血清 VEGF 水平; 拆方研究显示, 丹参提取物在减少大鼠脑组织 MDA 和血清 ET、eNOS、IL-6 水平, 升高脑组织 SOD 水平方面较三七表现更出色; 三七在提高脑组织 Ach、5-HT 含量方面表现更突出。复方丹参片高剂量组在提高 SOD、降低 MDA 水平, 提高 Ach、5-HT、VEGF 水平等方面优于单方组, 与丹参组或三七组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 复方丹参片能够较好地改善 VD 大鼠的认知学习记忆能力, 其作用机制可能是通过增强中枢胆碱能神经系统分泌 Ach 的功能, 提高海马及下丘脑区单胺类神经递质 5-HT 等的释放, 减轻脑组织脂质过氧化损伤, 抑制炎症损伤反应和促进血管生成等多条途径实现的。在复方中丹参提取物发挥主要作用, 起到君药的作用, 三七辅佐君药治疗 VD。

关键词: 复方丹参片; 血管性痴呆; 学习记忆能力; 神经递质; 氧化应激; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2884-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.021

Comparison of efficacy and mechanism of Compound Danshen Tablets and its decomposed prescriptions on learning and memory ability of rats with vascular dementia

LIANG Xiao-na¹, LIN Juan³, LI Xin^{2,6,7}, XU Xu^{2,6,7}, WANG De-qin³, WANG Yu-li^{2,6,7}, KUANG Yan-hui³, LI Xiao-xia⁵, HUANG Qi-he⁴, HOU Wen-bin^{2,7}, GUO Hai-biao³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

4. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

5. North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China

6. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

7. Tianjin Key Laboratory of Quality Markers for Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-C-GD-05)

作者简介: 梁小娜(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学成分及质量控制。Tel: 15822735600 E-mail: misscatliang@163.com

*通信作者 侯文彬, 男, 研究员, 主要从事中药新药研发和质量研究。E-mail: houwb@tjpr.com

郭海彪, 男, 博士后, 主要从事中成药大品种二次开发研究。E-mail: taylorgbh@qq.com

Abstract: Objective To compare the effect and mechanism of Compound Danshen Tablets and its disassembled prescription on learning and memory ability of rats with vascular dementia (VD). **Methods** Rats with normal learning and memory ability were screened through the shuttle box, and then divided into seven groups: sham group, model group, contrast group (dihydroergotaminemesylate 0.65 g/kg), Danshen group (ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* 0.3 g/kg), Senqi group (*Panax notoginseng* powder 0.3 g/kg), Compound Danshen Tablets group (low dose 0.3 g/kg, high dose 0.6 g/kg), ig administration, once daily one time, after 7 d of continuous administration, the VD rat model was established by bilateral common carotid artery ligation and reperfusion. After 7 d of continuous administration, the shuttle box test and neurological deficit score were performed; TTC staining and Nissl staining were used to detect the area of cerebral ischemia and the pathological changes of rat in the cerebral cortex respectively. The changes of SOD, MDA, Ach, 5-HT in the brain and VEGF, ET, eNOS, IL-6 in the serum were detected by kit. **Results** Compared with the model group, the Compound Danshen Tablets group increased the number of conditional stimulation avoidance in VD rats, reduced the neurological function score and cerebral ischemia area, and reduced the MDA in rat brain tissue and ET, eNOS, IL-6 in rat serum, and increased Ach, 5-HT, SOD in the brain and VEGF in the serum. *S. miltiorrhiza* extract had better performance in reducing MDA in rat brain tissue and ET, eNOS, IL-6 in rat serum, SOD in the brain than in *P. notoginseng*; *P. notoginseng* was more advantageous in improving the content of Ach and 5-HT in rat brain tissue. The high-dose group of Compound Danshen Tablets had significant differences in SOD, MDA, ACH, 5-HT, and VEGF compared with Danshen group or Senqi group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Compound Danshen Tablets can improve the cognitive learning and memory ability of VD rats. The mechanism maybe enhance the secretion of Ach by the central cholinergic nervous system, improve the content of the monoamine neurotransmitters 5-HT in the hippocampus and hypothalamus, reduce the lipid peroxidation damage of the brain tissue, inhibit the inflammatory injury reaction and promote angiogenesis. In the compound, *S. miltiorrhiza* extract as the role of “Jun medicine”, plays a major role, while *P. notoginseng* assists “Jun medicine” in treating VD.

Key words: Compound Danshen Tablets; vascular dementia; learning and memory ability; neurotransmitter; oxidative stress; VEGF

近年来随着中国人口的老龄化进程加快,脑血管病发病率逐年上升,痴呆性疾病也随之而来,其发病逐渐呈现上升趋势。老年人常见的痴呆症种类包括:阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和血管性痴呆(vascular dementia, VD)。AD是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病,以认知功能缺损为核心症状,以记忆障碍、执行功能障碍及人格和行为改变等表现为特征的获得性智能损害综合征。VD主要是由缺血性或出血性的脑损伤引起脑组织的血液循环障碍、脑功能减退,产生获得性认知功能损害或衰退的综合征,表现为记忆力、定向力、计算力等认知功能的减退以及情感行为的异常。然而无论是手术或是药物方面都没有完全治愈AD的有效方法,而VD是迄今为止唯一可以防治的痴呆,其早期治疗具有可逆性^[1]。因此,研究有效治疗VD的药物就显得更加重要。

现代药理研究表明,中医药治疗VD具有一定疗效。复方丹参片为丹参、三七、冰片3味中药制成的复方制剂,具有活血化瘀、理气止痛的功效,临床上用于治疗冠心病、心绞痛。药理实验研究显示复方丹参片还具有调节机体脂质代谢、抗氧化^[2]和减少并缓解脑外伤后缺氧所致的神经肽功能紊乱,清除血管瘀积,对抗血栓的形成及抗凝,减少

脑损伤和脑水肿,促进脑组织的修复等作用^[3-5]。其中,丹参可减少血小板聚集,具有抗菌、抗炎、抗凝、抗氧化、调血脂、脑神经保护和抑制成纤维细胞增生及分泌基质等药理作用^[6-7]。三七的主要成分是三七总皂苷(PNS),其具有止血、抗血栓、抗炎、调血脂、保护脑组织^[8],增强抗脑缺血/再灌注损伤的作用^[9]。冰片是经特殊工艺制作出的一种固态形式存在的分散物,可透过血脑屏障,并开放血脑屏障,促进其他药物透过血脑屏障^[10-11]。

本研究通过观察复方丹参片、丹参乙醇提取物和三七分别对VD大鼠认知学习记忆能力、海马区组织改变、神经递质、氧化应激反应、炎症损伤和血管生成等相关指标的影响,探讨其改善VD大鼠学习记忆的可能作用机制及物质基础,为中医药防治VD提供实验参考依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

复方丹参片(市售片剂,批号D17A008,广州白云山和记黄埔中药有限公司);丹参乙醇提取物(含丹参酮II_A 294.0~433.3 μg/g、丹酚酸B 6.884 4~8.829 3 mg/g,批号20180408,广州白云山和记黄埔中药有限公司提供);三七粉(批号20180408,广州白云山和记黄埔中药有限公司提供);甲磺酸双

氢麦角毒碱片(批号 6L872T, 天津华津制药有限公司); 注射用硝普钠(批号 18040312, 华润双鹤药业股份有限公司); 注射用青霉素钾(批号 20171016, 合肥中龙神力动物药业有限公司); 大鼠 5-羟色胺(5-HT, 批号 2018-11)、大鼠丙二醛(MDA, 批号 2018-11)、大鼠超氧化物歧化酶(SOD, 批号 2018-11)、大鼠血管内皮生长因子(VEGF, 批号 2018-11)、大鼠内皮型一氧化氮合酶(eNOS, 批号 2018-11)、大鼠内皮素(ET, 批号 2018-11)、大鼠白细胞介素-6(IL-6, 批号 2018-11)、大鼠乙酰胆碱(Ach, 批号 2018-11) ELISA 试剂盒均购于江苏酶免实业有限公司。

1.2 仪器

JLBehv-STR-4 大鼠穿梭箱、4 通道大鼠穿梭实验视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司); TD10001 电子天平(天津天马衡基仪器有限公司); HHW21.800AII 电热恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司); 显微止血夹[上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂]; ASP200S 全自动脱水机、RM2235 石蜡切片机、HI1220 烤片台、G1150H 加热石蜡包埋系统、DM3000 显微镜(Leica 公司)。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体质量(170 ± 10) g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2014-0004。动物饲养温度为(25 ± 2) °C, 湿度(50 ± 10) %, 自然昼夜节律光照, 自购入时起适应性饲养 7 d 后开始实验, 期间自由摄食和饮水。

2 方法

2.1 动物分组、给药及造模

经大鼠穿梭箱筛选出学习记忆能力处于正常值范围(躲避电刺激平均时间 <25 s) SD 大鼠 70 只, 随机分为 7 组($n=10$), 即假手术组、模型组、阳性药组(甲磺酸双氢麦角毒碱片 0.65 g/kg)、丹参组(丹参乙醇提取物 0.3 g/kg)、三七组(三七粉 0.3 g/kg)、复方丹参片组(复方丹参片 0.3、0.6 g/kg), 以上药物均用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液配制成所需浓度, ig 给药; 假手术组和模型组 ig 给予 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液。每组给药体积均为 10 mL/kg, 1 次/d, 预防给药 7 d 后造模。

除假手术组外, 其余大鼠采用双侧颈总动脉结扎再灌注法进行造模。大鼠称体质量后 ip 10% 水合氯醛溶液(3 mL/kg)麻醉, 仰卧位, 颈前去毛, 常

规消毒, 颈正中切口, 分离两侧颈总动脉, ip 硝普钠溶液(2.5 mg/kg)。随即使用动脉夹夹闭两侧颈总动脉 10 min 后, 灌通 10 min, 再次夹闭 10 min, 灌通后缝合伤口, im 青霉素钾(每只 20 万单位), 放回笼中保温饲养。假手术组麻醉及手术过程同模型组, 但不注射硝普钠及阻断双侧颈总动脉。术后第 1 天按上述方法开始 ig 给药, 连续给药 7 d。

2.2 神经功能损害程度和认知学习记忆能力测定

神经功能损害程度评分: 给药结束后依据大鼠神经功能损害程度评分标准^[12]进行评分。穿梭箱实验: 实验时将大鼠放进打开挡板的穿梭箱适应 5 min, 穿梭次数 20 次, 间隙时间 10 s, 光照及蜂鸣时间(10 s), 电击时间 10 s, 电刺激电流 0.8 mA。记录大鼠受电击次数(被动逃避次数)、电击时间及主动逃避次数。大鼠完成一轮实验后, 穿梭箱实验软件系统自动识别计算并导出结果。大鼠给药前起, 每天训练 1 次, 连续训练 5 d, 给药结束采用同样刺激条件观察大鼠对刺激条件的回避次数。

2.3 样本采集

2.3.1 血标本采集 第 14 天末次给药, 进行神经功能损害程度和认知学习能力测试结束后, 每只大鼠腹主动脉取血 5 mL, 血液静置 30 min 后, 2 500 r/min 离心 10 min, 分离血清并分装, -20 °C 冰箱暂时冷冻保存。

2.3.2 组织标本采集 大鼠腹主动脉取血后, 迅速在冰袋上断头取脑, 置于 -20 °C 冰箱下冷冻保存。

2.4 TTC 染色

取 -20 °C 冰箱下保存的样本切片, 约 2 mm/片, 间隔取 3 个切片置于 2% TTC 中, 于 37 °C 的恒温水浴锅中放置 15~30 min, 不时翻动脑片, 使其均匀接触到染色液, 观察脑梗死面积。将染后脑组织切片拍照输入计算机, ImageJ 软件计算每个大脑 3 个脑片 6 个平面脑梗死面积和大脑总面积, 以脑梗死面积占大脑总面积的百分比作为统计参数。其余脑切片用于 Nissl 染色和生化指标检测。

2.5 Nissl 染色

取样本用 10% 福尔马林固定液固定后, 定位脑缺血区, 常规脱水, 石蜡包埋, 冠状切片, 片厚 5 μ m, 二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水, Nissl 染色液染色, 中性树脂封片, 光镜下观察大脑海马组织尼氏小体变化。

2.6 生化指标检测

脑组织 SOD、MDA、Ach、5-HT 及血清 VEGF、ET、eNOS、IL-6 水平测定方法操作均按照试剂盒说明书进行。

2.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据用 SPSS 17.0 统计软件处理, 各组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠神经功能损害程度评分比较

对大鼠进行神经损害程度评分, 模型组与假手术组比较评分显著升高 ($P < 0.01$); 给药后大鼠神经功能损害得到不同程度地改善, 与模型组比较, 丹参组、三七组和复方丹参片低剂量组评分显著降低 ($P < 0.05$), 阳性药组和复方丹参片高剂量组评分降低非常显著 ($P < 0.01$); 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组。结果见表 1。

3.2 各组大鼠认知学习记忆能力比较

与假手术组比较, 模型组大鼠回避反应次数显著减少 ($P < 0.01$), 说明大鼠经造模后其认知学习记忆能力明显下降。大鼠给药后的认知学习记忆能力得到不同程度地改善, 与模型组比较, 丹参组和复方丹参片低剂量组差异显著 ($P < 0.05$), 阳性药组和复方丹参片高剂量组差异非常显著 ($P < 0.01$), 三七组回避次数有所增加, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组, 结果见表 1。

3.3 各组大鼠脑梗死面积比较

各组大鼠脑组织 TTC 染色后, 正常组织染成红色, 缺血部位染成白色。假手术组未发现有脑缺血现象, 模型组与假手术组比较脑梗死面积显著增加 ($P < 0.01$), 表明脑缺血模型成功。给药后大鼠脑梗死面积均有不同程度减小, 与模型组比较, 丹参组、三七组明显减少 ($P < 0.05$), 阳性药组、复方丹参片低剂量组和高剂量组脑梗死面积减少更为显著

($P < 0.01$); 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组, 结果见表 1。

3.4 各组大鼠脑组织切片 Nissl 染色结果

Nissl 染色后尼氏小体呈蓝紫色, 当神经细胞合成蛋白质的功能较强时, 尼氏小体大且数量多; 神经细胞受到损伤时, 尼氏小体的数量会减少甚至消失。假手术组的神经细胞排列规整, 尼氏小体丰富, 染色均匀。模型组的细胞损伤严重, 排列紊乱, 尼氏小体着色较浅。与模型组相比, 给药组细胞状态明显好转, 形态较完整, 尼氏小体增多, 染色较均匀, 表明复方丹参片具有保护神经细胞的作用, 其中阳性药组、复方丹参片高剂量组损伤减轻程度更为明显; 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组。结果见图 1。

3.5 大鼠脑组织各指标测定结果

3.5.1 SOD 活性、MDA 水平比较 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 SOD 活性明显降低, 脂质过氧化物 MDA 水平明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性药组、丹参组、三七组、复方丹参片低剂量组和高剂量组可显著提高 SOD 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 阳性药组、丹参组、复方丹参片低剂量组和高剂量组可显著降低 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组。结果见表 2。

3.5.2 Ach、5-HT 水平比较 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 Ach、5-HT 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药组均能升高脑组织 Ach、5-HT 水平, 丹参组和三七组效果显著 ($P < 0.05$), 阳性药组、复方丹参片低剂量组和高剂量组效果非

表 1 各组大鼠神经功能损害程度评分、认知学习记忆能力、脑梗死面积比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison on scores of neurological impairment, cognitive learning ability, and cerebral ischemic area of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能损害程度评分	条件刺激回避次数	脑梗死面积/%
假手术	—	0.30 ± 0.48	9.30 ± 5.56	0.00 ± 0.00
模型	—	7.70 ± 1.49 ^{###}	2.50 ± 1.96 ^{###}	25.40 ± 6.52 ^{###}
阳性药	0.65	5.50 ± 1.72 ^{**}	5.80 ± 2.97 ^{**}	18.52 ± 3.13 ^{**}
丹参	0.3	6.20 ± 1.55 [*]	4.70 ± 2.21 [*]	19.48 ± 4.52 [*]
三七	0.3	6.30 ± 1.34 [*]	3.80 ± 2.74	20.36 ± 3.09 [*]
复方丹参片	0.3	5.80 ± 1.69 [*]	5.10 ± 3.03 [*]	18.08 ± 4.69 ^{**}
	0.6	5.30 ± 1.57 ^{**}	7.10 ± 4.20 ^{**}	17.79 ± 4.24 ^{**}

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

^{###} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

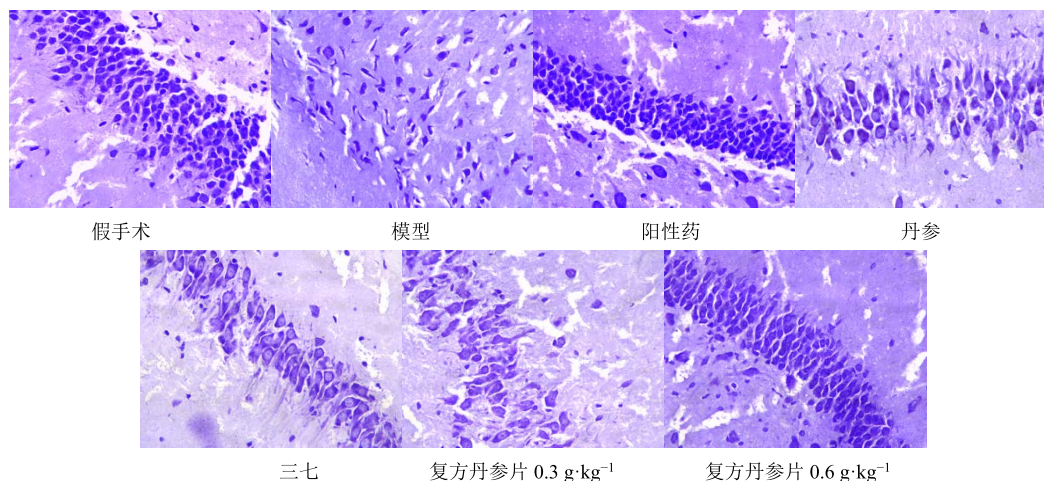


图 1 各组大鼠脑组织 Nissl 染色结果 (×400)

Fig. 1 Nissl staining results of brain tissue of each group (×400)

表 2 各组大鼠脑组织 SOD、MDA、Ach、5-HT 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Levels of SOD, MDA, Ach, and 5-HT in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	Ach/(pmol·L ⁻¹)	5-HT/(ng·L ⁻¹)
假手术	—	97.33 ± 14.70	6.85 ± 1.07	395.06 ± 67.86	536.83 ± 33.37
模型	—	72.02 ± 11.50 ^{##}	10.33 ± 1.38 ^{##}	278.43 ± 55.44 ^{##}	351.10 ± 50.94 ^{##}
阳性药	0.65	95.06 ± 14.61 ^{**}	8.67 ± 1.46 [*]	386.19 ± 55.24 ^{**}	431.47 ± 47.55 ^{**}
丹参	0.3	84.93 ± 12.03 [*]	8.76 ± 1.44 [*]	330.88 ± 48.35 [*]	410.16 ± 56.63 [*]
三七	0.3	84.87 ± 13.11 [*]	9.37 ± 1.20	344.41 ± 52.75 [*]	425.63 ± 60.10 [*]
复方丹参片	0.3	85.78 ± 13.84 [*]	8.50 ± 1.17 ^{**}	352.69 ± 51.76 ^{**}	454.85 ± 43.34 ^{**}
	0.6	97.14 ± 13.00 ^{**△▲}	7.66 ± 1.38 ^{**△△}	390.38 ± 46.27 ^{**△▲}	468.61 ± 53.45 ^{**△▲}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与三七组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与丹参组比较: [▲] $P < 0.05$, 下同

^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Sanqi group; [▲] $P < 0.05$ vs Danshen group, same as below

常显著 ($P < 0.01$)。复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 三七组 > 丹参组。结果见表 2。

3.6 大鼠血清内各指标测定结果

与假手术组比较, 模型组血清 VEGF 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 复方丹参片低剂量组血清 VEGF 水平显著升高 ($P < 0.05$), 丹参组、复方丹参片高剂量组效果更为显著 ($P < 0.01$), 阳

性药组和三七组未见显著升高 ($P > 0.05$), 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组 > 复方丹参片低剂量组 > 丹参组 > 三七组。结果见表 3。

与假手术组比较, 模型组血清 ET 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 三七组 ET 水平显著降低 ($P < 0.05$), 丹参组、复方丹参片低剂量组及高剂量组 ET 水平降低更显著 ($P < 0.01$), 阳性药组差异不显著 ($P > 0.05$); 复方及拆方作用强度

表 3 各组大鼠血清 VEGF、ET、eNOS、IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Levels of VEGF, ET, eNOS, and IL-6 in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	VEGF/(pg·mL ⁻¹)	ET/(ng·mL ⁻¹)	eNOS/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	97.60 ± 10.93	105.09 ± 14.69	546.59 ± 51.77	104.32 ± 12.38
模型	—	145.19 ± 17.88 ^{##}	142.34 ± 20.79 ^{##}	433.45 ± 47.62 ^{##}	140.87 ± 14.22 ^{##}
阳性药	0.65	155.05 ± 14.03	128.64 ± 13.31	503.03 ± 58.08 ^{**}	128.23 ± 14.57
丹参	0.3	168.10 ± 17.13 ^{**}	118.78 ± 12.55 ^{**}	522.99 ± 59.59 ^{**}	117.39 ± 17.36 ^{**}
三七	0.3	155.15 ± 16.09	123.78 ± 13.69 [*]	521.13 ± 60.94 ^{**}	121.82 ± 16.03 [*]
复方丹参片	0.3	165.46 ± 14.84 [*]	118.95 ± 12.70 ^{**}	497.27 ± 58.47 [*]	116.69 ± 16.03 ^{**}
	0.6	177.27 ± 17.95 ^{**△△}	115.53 ± 16.74 ^{**}	531.01 ± 56.94 ^{**}	113.60 ± 15.11 ^{**}

比较, 复方丹参片高剂量组>丹参组≈复方丹参片低剂量组>三七组。结果见表 3。

与假手术组比较, 模型组血清 eNOS 水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 复方丹参片低剂量组 eNOS 水平显著升高 ($P<0.05$), 阳性药组、丹参组、三七组、复方丹参片高剂量组 eNOS 水平升高更显著 ($P<0.01$); 复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组>丹参组>三七组>复方丹参片低剂量组。结果见表 3。

与假手术组比较, 模型组血清炎症因子 IL-6 明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 三七组显著降低 IL-6 水平 ($P<0.05$), 丹参组、复方丹参片低剂量组、高剂量组 IL-6 水平降低更明显 ($P<0.01$), 阳性药组 IL-6 水平有所下降, 但无统计学差异 ($P>0.05$)。复方及拆方作用强度比较, 复方丹参片高剂量组>复方丹参片低剂量组>丹参组>三七组。结果见表 3。

4 讨论

目前, VD 的具体发病机制尚未完全阐明, 缺血性卒中、出血性卒中和脑缺血缺氧等原因均可导致 VD 的发生。本研究采用缺血再灌注损伤方法, 造成大鼠 VD 模型, 使用复方丹参片及其拆方对模型进行干预, 探讨其作用机制。

在脑缺血缺氧时, 会产生过量自由基, 从而影响生物体膜磷脂中的不饱和脂肪酸含量, 导致过氧化及 MDA 产生, 引起脑组织脂质过氧化损伤, 进而引起认知功能障碍^[13]。缺血损伤后产生的炎症因子又会对血管造成直接损伤, 加重脑血管病变, 使血管狭窄或闭塞进一步恶化, 导致神经细胞凋亡, 最终引起患者智能减退, 出现不同程度的痴呆。IL-6 属于细胞因子中的神经生成素家族, 它可以促进星形胶质细胞聚集、激活小胶质细胞, 刺激急性期蛋白的产生^[14]。已有证据证实 IL-6 参与致炎过程^[15]。一氧化氮 (NO) 是一种非典型神经递质, 具有保护血管内皮细胞的作用, 能够减轻氧化应激产生的损害, 参与调节脑内血流、学习、记忆形成等生理过程。血管内皮细胞中 NO 的生成量主要取决于其合成关键酶 eNOS 的活性。ET 是一种内源性长效血管收缩调节因子, 缺血、缺氧状态下能刺激该物质的释放, 导致脑组织缺血、缺氧进一步加重^[16]。VEGF 是具有特异性促进内皮细胞增殖的一类生长因子, 缺血缺氧时可刺激大脑 VEGF 表达, 促进内皮细胞增殖, 诱导血管新生。大脑皮层中 Ach 及单胺类神

经递质的减少与 VD 的认知障碍密切相关, 当 Ach 合成不足时, 学习记忆能力会受到影响^[17]。5-HT 是一种抑制性单胺类神经递质, 主要分布于下丘脑和松果体, 能增强记忆力, 充足的 5-HT 可以在老化过程中防止脑损害发生。

本实验结果显示给予复方丹参片后 VD 大鼠的 SOD 升高, MDA 下降, IL-6、ET 降低, eNOS、VEGF 升高, Ach、5-HT 增加, 表明复方丹参片防治 VD 的作用与抗氧化损伤、抗炎、血管调节、促血管生成、促进神经递质释放等机制有关。复方丹参片高剂量组在提高 SOD、降低 MDA, 提高 Ach、5-HT、VEGF 等方面优于单方组, 与丹参组或三七组比较有显著性差异。拆方研究显示, 在抗氧化、调节血管收缩、促血管生成、抗炎等方面, 丹参提取物的作用强于三七, 发挥主要作用, 起到君药的作用。三七在抗氧化、调节血管、抗炎方面作用弱于丹参提取物, 在促进神经递质 Ach、5-HT 释放方面略强于丹参提取物, 在血管因素和神经因素两方面, 辅助君药治疗主证。

另有研究发现丹参酮 II_A^[18]、丹参素^[19]、三七皂苷 R_{g1}^[20]、三七皂苷 R₁^[21]等可以减少 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 减轻氧化应激损伤, 具有显著的抗氧化作用。丹参水提取物^[22]、丹参酮 II_A^[23]、PNS^[24]、三七三醇皂苷 (PTS)^[25]等均可使 IL-6 水平降低, 抑制免疫炎症, 具有抗炎作用。丹参酮 II_A^[26]、丹参素^[27]等通过降低血浆 ET-1 水平及调节 NOS 的活性进而调节 NO 含量, 促进 NO 合成; PNS^[28]能够增加 NO、eNOS 生成, 降低血浆 ET-1 水平; 丹参多酚酸盐^[29]、丹参素^[30]能够上调 VEGF 的表达, 减轻血管损伤, 具有调节血管生成的作用。丹参的乙醇及水提取物^[31]、丹参酮 II_A^[32]、三七皂苷 R_{g1}^[33]可以抑制 AchE 活性, 减少 AchE 生成; 三七皂苷 R_{g1} 可以下调 AchE 水平, 升高 Ach 含量^[34], 进而调节 5-HT 水平, 具有调节神经递质的作用。上述成分可能是复方丹参片发挥作用的物质基础的组成部分, 但其确切物质基础与作用机制的联系有待进一步研究。

参考文献

- [1] 石苗茜. 血管性痴呆发病机制研究进展 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(9): 273-276.
- [2] 张晓燕, 覃璇, 张一凡, 等. 复方丹参片对大脑中动脉缺血再灌注所致血管性痴呆大鼠的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 177-180.

- [3] 袁德培, 黄琼, 张茂林. 复方丹参方对拟血管性痴呆大鼠脑内神经递质的影响 [J]. 山西中医, 2002, 18(6): 47-49.
- [4] 郭玉东, 左泽平, 高阳, 等. 复方丹参片对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(5): 35-39.
- [5] 黄自冲. 抗高血压药联合复方丹参滴丸对舒张压偏高的高血压患者的疗效观察 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2014, 14(5): 399.
- [6] 戴新新, 宿树兰, 郭盛, 等. 丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1442-1448.
- [7] 李敬, 苏保林. 丹参酮对糖尿病肾病患者凝血功能及炎症因子的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(7): 48-49.
- [8] 董婧婧, 刘艳菊, 涂济源, 等. 三七粉调血脂作用及机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1957-1603.
- [9] 黄小平, 邓常清, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的三种有效成分配伍对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激和 Nrf2/HO-1 途径的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(11): 1596-1601.
- [10] 周陆怡, 鲁澄宇. 冰片对丹参脂溶性药效成分促吸收作用研究 [J]. 中国药业, 2019, 28(1): 14-18.
- [11] Yi T, Tang D, Wang F, *et al.* Enhancing both oral bioavailability and brain penetration of puerarin using borneol in combination with preparation technologies [J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 422-429.
- [12] 覃仁安, 臧忠良, 赵专友, 等. 脑心清对实验性脑缺血的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 105-108.
- [13] 刘晓惠, 刘学源. 血管性痴呆的分子机制和遗传机制 [J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2016, 12(2): 87-93.
- [14] 张璐, 翟薇, 庞杰, 等. 红花黄色素对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的痴呆大鼠脑组织炎症因子释放的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 85-89.
- [15] 吕立峰, 亓爱芹, 李秀芹. 温脾通络开窍汤联合丁苯酞治疗老年血管性痴呆的疗效及对高血浆同型半胱氨酸、炎症因子的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1262-1265.
- [16] 张宪忠, 高磊, 焦静, 等. 复方苻蓉益智胶囊对中风后轻度认知障碍患者脑血流及血管内皮功能的影响研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(4): 533-536.
- [17] O'Brein M D. How does cerebrovascular disease cause dementia [J]. *Dementia*, 1994, 5(3/4): 133-136.
- [18] 陈海明, 叶攀. 丹参酮 II_A 对血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 569-572.
- [19] 王胜男, 叶攀, 敖杰男. 丹参素对过氧化氢所致人脐静脉内层细胞损伤的保护作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 66-69.
- [20] 温得中, 曲极冰, 石卓, 等. 三七皂甙 R_{g1} 对 D-半乳糖衰老鼠脑星型胶质细胞保护作用的研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2005, 21(6): 667-670.
- [21] 黄金兰, 秦嫦云, 周楠, 等. 三七皂苷 R₁ 对 D-半乳糖诱导痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响及抗氧化应激作用研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4336-4338.
- [22] Kim M S, Bang J H, Lee J, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* extract protects white matter and the hippocampus from damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2015, 15(1): 415-424.
- [23] 畅君毅, 王素珍, 闫吉霞. 丹参酮 II_A 对急性心肌梗死患者心功能及 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 水平的影响 [J]. 中国医药科学, 2016, 6(17): 142-145.
- [24] 黄金兰, 陆璐, 黄丹, 等. 三七总皂苷对快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 炎症因子及小胶质细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 171-174.
- [25] 罗永杰, 王晓平. 三七通舒胶囊对急性脑梗死不同时间点血清 VEGF 和 IL-6 表达的影响 [J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(10): 1155-1158.
- [26] 孔德燕. 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠脑组织一氧化氮含量、一氧化氮合酶活性及胆碱能系统的影响 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(17): 2797-2799.
- [27] Xiao D Z, Yan G Y, Ye S C, *et al.* Bivariate correlation analysis of the chemometric profiles of Chinese wild *Salvia miltiorrhiza* based on UPLC-Qq-MS and antioxidant activities [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 538-550.
- [28] 王钢, 陈琼芳, 俞献文, 等. 三七总皂苷对血管紧张素 II 致脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 591-595.
- [29] 苗常青, 刘鹏. 注射用丹参多酚酸盐在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(18): 2627-2630.
- [30] Solomon H. Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: Potential seeds for Alzheimer's and vascular dementia drugs [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 458.
- [31] Smith M L, Bendek G, Dahlgren N, *et al.* Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A2-vessel occlusion model [J]. *Acta Neurol Scand*, 1984, 69(6): 385-401.
- [32] 孔德燕. 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠脑组织一氧化氮含量、一氧化氮合酶活性及胆碱能系统的影响 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(17): 2797-2799.
- [33] 宋晓斌, 何波, 陈鹏, 等. 三七皂苷 R_{g1} 对动物学习记忆功能的影响及其机理研究 [J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(6): 21-27.
- [34] 张小超, 何波, 陈鹏, 等. 三七皂苷 R_{g1} 对学习记忆功能障碍的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 13-16.