

基于抗氧化活性研究淫羊藿黄酮类化合物对脑缺血再灌注损伤的保护作用

陈颖^{1,2}, 刘秋^{1,2}, 吉春燕^{1,2}, 李良^{1,2}, 王振中^{1,2}, 王欣², 肖伟^{1,2*}

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 筛选具有抗氧化及神经系统保护活性的淫羊藿 *Epimedium Folium* 黄酮类化合物 (flavonoids extract from *E. Folium*, FEE), 为缺血性脑卒中药物的开发奠定实验基础。**方法** 以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力与铁离子还原抗氧化能力 (ferric reducing ability of plasma, FRAP) 为评价指标, 筛选 FEE 中具有抗氧化活性的化合物, 并以此为研究对象, 建立强氧化剂过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤模型和 PC12 细胞氧糖剥夺损伤模型评估其神经细胞保护活性, 并观察其对急性脑缺血再灌注 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型的保护作用。**结果** 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷、 β -脱水淫羊藿素具有较高的 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力 ($P < 0.01$); 淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷可显著抑制 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤, 保护缺糖缺氧损伤的 PC-12 细胞, 表现为细胞活力升高 ($P < 0.01$)、活性氧水平降低 ($P < 0.05, 0.01$)、SH-SY5Y 细胞丙二醛产生减少 ($P < 0.01$) 且胞内超氧化物歧化酶水平升高 ($P < 0.05, 0.01$); 淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷可改善缺血再灌注大鼠脑组织抗氧化能力、调节神经功能、减少脑梗死面积 ($P < 0.05, 0.01$), 具有神经保护作用。**结论** 淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷具有良好的体外抗氧化及神经系统保护活性, 对 MCAO 大鼠具有保护作用。

关键词: 淫羊藿黄酮类化合物; 淫羊藿素; 金丝桃苷; 槲皮苷; 抗氧化; 神经保护; 缺血性脑卒中

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-8046-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.012

Protective effect of flavonoids extract from *Epimedium Folium* on cerebral ischemia-reperfusion injury based on antioxidant activity

CHEN Ying^{1,2}, LIU Qiu^{1,2}, JI Chunyan^{1,2}, LI Liang^{1,2}, WANG Zhenzhong^{1,2}, WANG Xin², XIAO Wei^{1,2}

1. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To screen effective compounds with antioxidant and neuroprotective activities of flavonoids extract from Yinyanghuo (*Epimedium Folium*, FEE) for laying the experimental foundation for the development of drugs with ischemic stroke. **Methods** The study used 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability and ferric reducing ability of plasma (FRAP) as indicators to screen compounds with high antioxidant activities from FEE. Based on the results, the oxidative stress model induced by hydrogen peroxide in SH-SY5Y cells and oxygen-glucose deprivation model in PC-12 cells were established to evaluate the neuroprotective activities. The acute middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was used to verify their protective effects on rats. **Results** Antioxidant assay showed that icaritin, icaraside I, hyperoside, quercitrin, β -anhydroicaritin had high DPPH radical scavenging ability and total antioxidant capacity ($P < 0.01$). Evaluation of neuroprotective activity showed that icaritin, hyperoside and quercitrin could significantly inhibit oxidative stress injury in SH-SY5Y cells and improve oxygen-glucose deprivation in PC12 cells, as demonstrated by increased cell viability ($P < 0.01$), decreased levels of reactive oxygen species ($P < 0.05, 0.01$), decreased production of malondialdehyd ($P < 0.01$) and increased levels of superoxide dismutase ($P < 0.05, 0.01$) in SH-SY5Y cells. Effects of

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 国家中医药管理局“岐黄学者”中医药领军人才项目

作者简介: 陈颖, 女, 硕士研究生, 工程师, 从事中药新药研发研究。E-mail: cyv1914@kanion.com

*通信作者: 肖伟, 男, 中国工程院院士, 博士生导师, 从事中药新药研发及过程质量控制研究。E-mail: kanionlunwen@163.com

cerebral ischemia-reperfusion showed that icaritin, hyperoside and quercitrin could improve the anti-oxidation ability of brain tissue, regulate nerve function and reduce the area of cerebral infarction ($P < 0.05, 0.01$), showing a good neuroprotective effects. **Conclusion** Icaritin, hyperoside and quercitrin had antioxidant and neuroprotective activities, exhibiting protective effects on rats with MCAO.

Key words: flavonoids extract from *Epimedii Folium*; icaritin; hyperoside; quercitrin; antioxidant activity; neuroprotection; ischemic stroke

脑血管疾病已成为当今世界人类健康与生存的重大威胁之一,其中以脑卒中为主的临床类型主要是由脑血管病变引起的脑部血液供应障碍所致,导致局部脑组织缺血、缺氧性坏死,出现相应神经功能缺损的临床综合征。缺血性卒中是较为常见的临床病症,其发病率占总发病率的 60%~80%^[1]。在缺血发生之后,神经元细胞不能维持正常的跨膜离子梯度和平衡,进而可能引起细胞凋亡、兴奋性毒性、氧化应激以及炎症等问题^[2-4]。结合脑缺血的病理特征,各相关领域的技术人员从血管功能和神经细胞功能 2 个方面提出了保护方案。大量研究表明,通过药物阻断活性氧物质引起的氧化应激反应可有效抑制缺血损伤的扩展^[5-6]。因此,寻找安全有效的抗氧化剂可能是延缓卒中病变发展的治疗策略之一。

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicomum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶,为传统补益类中药。淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效^[7]。据历代本草书籍记载,淫羊藿除上述功效以外,还具有强志的功效。《神农本草经》曰:“淫羊藿,主治阴萎绝伤,利小便,益气力,强志”;《本草蒙筌》曰:“淫羊藿,却老景昏耄,除中年健忘,益骨坚筋,增力强志”;《日华子本草》曰:“淫羊藿,治一切冷风劳气,补腰膝,强心力,治筋骨挛急,四肢不任,老人昏耄,中年健忘”^[8]。临床以 3%淫羊藿煎液离子透入法治疗神经衰弱,效果明显^[9];以“填精益气守神、补肾养心通脑,活血除痰开窍”之法,用淫羊藿补精壮阳,伍用其他功能中药治疗心脑血管痴呆患者有效率高^[10]。淫羊藿在抗应激方面亦具有多种药理活性,具有较高的药用和保健价值,其中所含的总黄酮、多糖和微量元素等成分对应激所产生的各类自由基具有消除作用,能够显著调节、修复应激造成的免疫系统、神经内分泌系统和心脑血管系统损伤^[11]。淫羊藿黄酮类化合物(flavonoids extract from *Epimedii Folium*, FEE)作为淫羊藿中发挥药效的主要成分群,具有良好的抗

氧化应激、促进髓鞘再生、扩张脑血管、增加脑血流量、抑制血栓等作用^[12-13],可减少缺血性脑损伤自由基的产生,升高抗氧化酶活性,改善脑循环,减少脑梗死面积,具有治疗神经系统疾病的优势^[14-16]。FEE 所含化学成分众多,关于其中哪种成分发挥抗氧化应激及神经保护作用的研究较少,因此,本研究体外筛选 FEE 中抗氧化活性较好的化学成分,辅以 2 种细胞模型进行神经保护作用研究,并利用大鼠脑缺血再灌注模型加以验证,以期对缺血性脑卒中治疗药物的进一步科学开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株、大鼠嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞均购自上海中科院细胞库。

1.2 动物

SD 大鼠 60 只,SPF 级,雄性,体质量 250~320 g,由斯贝福(苏州)生物技术有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK(苏)2022-0006,动物合格证号 No.202400311。动物饲养于江苏康缘药业股份有限公司室温 20~26 °C、湿度 40%~70%、光照/黑暗周期为 12 h 的屏障环境,饲养期间自由摄食和饮水。本研究动物实验经江苏康缘药业实验动物伦理委员会批准(批准号 2023122211)。

1.3 药品与试剂

淫羊藿苷(批号 1128F021,质量分数 98.0%)购自北京索莱宝科技有限公司;朝藿定 A1(批号 P02J9S64790,质量分数 99.8%)、朝藿定 A(批号 P10J11F118161,质量分数 99.5%)、朝藿定 B(批号 P19A11F121806,质量分数 99.8%)、朝藿定 C(批号 R01J11F117173,质量分数 98.8%)、淫羊藿素(批号 A25IB224115,质量分数 99.4%)、淫羊藿次苷 I(批号 M14J12S137378,质量分数 98.6%)、宝藿苷 I(批号 T19D9Z77828,质量分数 98.1%)、金丝桃苷(批号 J16GB143379,质量分数 99.2%)、槲皮苷(批号 P02J12F136478,质量分数 98.6%)、宝藿苷 II(批号 P16N11S131051,质量分数 98.8%)、宝藿苷 VI(批号 R01J11F117173,质量分数 98.8%)、宝藿苷 VII(批号 P06J9S63029,质量分数 99.9%)、箭藿苷

A (批号 P23A9F68561, 质量分数 99.3%)、箭藿苷 B (批号 C30J9G66922, 质量分数 98.0%)、鼠李糖基淫羊藿次苷 II (批号 P28J9S66923, 质量分数 99.0%) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 朝藿素 B (批号 CFS202001, 质量分数 98.0%)、朝藿素 C (批号 CFS202002, 质量分数 98.0%)、朝鲜淫羊藿苷 A (批号 CFS202001, 质量分数 98.0%), 淫羊藿素 B (批号 CFS202001, 质量分数 98.0%) 均购自武汉天植生物技术有限公司; β -脱水淫羊藿素 (批号 YA0903SA13, 质量分数 98.0%) 购自宝鸡辰光生物科技有限公司; 淫羊藿素-3-O-鼠李糖苷 (批号 wkq21090602, 质量分数 95.0%) 购自成都超九八生物科技有限公司; 大花淫羊藿苷 A (批号 67603, 质量分数 99.27%) 购自美国 MedChemexpress 生物科技公司; DPPH 自由基清除能力检测试剂盒 (批号 20210910) 购自北京索莱宝科技; 总抗氧化能力 (ferric reducing ability of plasma, FRAP) 检测试剂盒 (批号 20211008)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20220206)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20220206) 购自南京建成生物工程研究所; 活性氧检测试剂盒 (批号 111922230413)、MTT (批号 05162222060) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; H_2O_2 (批号 210405) 购自广东恒建制药公司; MEM 非必需氨基酸溶液 (100 $\times$, 批号 2517569)、丙酮酸钠 (批号 2276850)、GlutaMAXTM-1 添加剂 (批号 2360320)、Ham's F-12 培养基 (批号 2553719x)、MEM 不含谷氨酰胺培养基 (批号 2120463)、RPMI 1640 培养基 (批号 8122606)、RPMI 1640 不含葡萄糖培养基 (批号 2458379)、胎牛血清 (批号 2377222RP) 均购自美国 Gibco 公司; TTC 染料 (批号 T8877) 购自美国 Sigma 公司; 舒泰 50 [批号 8ECXA, 进口兽药注册证号 (2020) 外兽药证字 06 号] 购自法国 Virbac 公司; 盐酸赛拉嗪 (批号 20210102, 质量分数 99.8%) 购自长沙拜特生物科技公司; 丁苯酚 (批号 110862-202213, 质量分数 99.6%) 购自中国食品药品检定研究院。

1.4 仪器

3111 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CB150 三气培养箱 (德国 BINDER 公司); Flexstation 3 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); S1003S101 型电子天平 (瑞士 METTLER TOLEOM 公司); ACX-SC-DA 型动物体

重称 (上海香川电子秤公司)。

2 方法

2.1 抗氧化筛选

2.1.1 DPPH 自由基清除能力检测 按照说明书配制 DPPH 工作液及对照品, 设置空白、对照、FEE 各化合物组及 FEE 各化合物对照组。空白组加入 10 μ L 蒸馏水, 对照组加入 10 μ L 不同浓度维生素 C 标准溶液, FEE 各化合物组及 FEE 各化合物对照组均分别添加 10 μ L FEE 中的 23 种化合物溶液 (50 μ mol/L)。除 FEE 对照组外, 各孔加入 190 μ L DPPH 工作液, FEE 对照组加入 190 μ L 无水乙醇平衡误差, 轻轻混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 于 515 nm 处测定吸光度 (A) 值。

2.1.2 FRAP 检测 按照说明书配制 FRAP 工作液及对照品, 设置空白、对照、FEE 各化合物组, 空白组加入 5 μ L 蒸馏水, 对照组加入 5 μ L 不同浓度 $FeSO_4$ 标准溶液, FEE 各化合物组分别添加 5 μ L FEE 中的 23 种化合物溶液 (50 μ mol/L), 并分别加入 180 μ L FRAP 工作液, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3~5 min, 于 593 nm 处测定 A 值。

2.2 神经细胞保护活性评估

2.2.1 细胞培养 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株来源于人类胚胎中脑, 其形态、生理生化功能与正常神经元相似, 被广泛应用于神经系统疾病发病机制和药物作用机制方面的研究^[17]。采用含 10% 胎牛血清、1% MEM 非必需氨基酸溶液、1% 丙酮酸钠、1% GlutaMAXTM-1 添加剂及 1% 青霉素/链霉素混合液的 MEM/F12 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 环境中培养 SH-SY5Y 细胞。

大鼠嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞具备交感神经元特征, 某些生理功能亦与正常神经元相似, 其氧糖剥离模型常用于脑卒中生物学和药物作用机制方面的研究^[18-19]。采用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素/链霉素混合液的 1640 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 环境中培养 PC-12 细胞。

2.2.2 细胞造模、分组与给药

(1) SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤模型: 取对数生长期细胞, 以 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板培养 24 h, 将细胞分为对照组 (不含药物)、淫羊藿素 (5、10、25 μ mol/L) 组、淫羊藿次苷 I (5、10、25 μ mol/L) 组、金丝桃苷 (25、50、100 μ mol/L) 组、槲皮苷 (25、50、100 μ mol/L) 组及 β -脱水淫羊藿素 (25、50、100 μ mol/L) 组, 除对照组外, 其余孔加入 400 μ mol/L H_2O_2 孵育 1 h 建立 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤模型, 更换培养液, 各组

细胞加入相应药物孵育 24 h。

(2) PC-12 细胞氧糖剥离损伤模型：取对数生长期细胞，以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板培养 24 h，无糖培养基洗涤 2 次，置于三气培养箱中培养 6 h，弃上清，加入正常培养基继续培养 24 h 建立 PC-12 细胞氧糖剥离损伤模型。将细胞分为对照组（不含药物）、淫羊藿素（25 $\mu\text{mol/L}$ ）组、淫羊藿次苷 I（25 $\mu\text{mol/L}$ ）组、金丝桃苷（25 $\mu\text{mol/L}$ ）组、槲皮苷（25 $\mu\text{mol/L}$ ）组及 β -脱水淫羊藿素（25 $\mu\text{mol/L}$ ）组，更换培养液，各组细胞加入相应药物孵育 24 h。

2.2.3 MTT 法检测细胞存活率 按“2.2.2”项下方法，待药物孵育结束，去上清，0.5 mg/mL MTT 孵育 4 h，去上清，加入 DMSO 振荡溶解，于 490 nm 处测定 A 值。

2.2.4 DCFH-DA 荧光探针法测定细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平按“2.2.2”项下方法，待药物孵育结束，去除上清，以 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 荧光探针染料避光孵育 30 min，洗涤细胞以充分去除未进入细胞内的染料。使用 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长检测各组细胞荧光值。

2.2.5 生物化学法检测细胞 SOD、MDA 水平 将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板培养，加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷、 β -脱水淫羊藿素孵育 23 h，加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 继续孵育 1 h，待孵育结束洗涤细胞 3 次，胰酶消化收集各组细胞进行冰水浴超声破碎取样，300 W 功率，破碎 3~5 s，重复 4 次，每次间隔 30 s。按照试剂盒说明书进行 SOD、MDA 水平检测。

2.3 动物分组、造模与给药

2.3.1 建立脑缺血再灌注（middle cerebral artery occlusion, MCAO）大鼠模型 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、丁苯酞（80 mg/kg）组、淫羊藿素（100 mg/kg）组、金丝桃苷（100 mg/kg）组和槲皮苷（100 mg/kg）组，每组 10 只。根据前期文献报道^[20-24]及预实验结果进行造模，采用舒泰 50（40 mg/kg）与盐酸赛拉嗪（5 mg/kg）进行联合麻醉，分离并充分暴露左侧颈总、颈外、颈内动脉，除假手术组动物进行结扎颈总动脉近心端但不进行栓塞外，其余 50 只动物暂时夹闭颈外、颈内动脉，结扎颈总动脉近心端，于远心端剪一小口，插入栓线，沿颈内动脉入颅至大脑前动脉以阻断大脑中动脉供血，缺血 2 h 后栓塞动物缓慢拔出栓线实现大

脑中动脉再灌注。各组动物在实现再灌注后即进行 ig 给药（10 mL/kg），每天 1 次，连续 3 d，假手术和模型组 ig 给予等体积的 5% 聚山梨酯-80 溶液。

2.3.2 神经行为学评分 造模后 24、48、72 h，分别对动物的行为缺陷进行评分，除假手术组外，评分 ≥ 1 分的动物为造模成功，造模未成功大鼠即淘汰，具体标准见表 1^[25]。

表 1 Bederson 评分标准
Table 1 Bederson scoring criteria

分值	评分标准
0	无神经损伤症状
1	从尾部提起大鼠，大鼠向手术对侧前肢屈
2	大鼠置于光滑平面上，用手推梗死侧对侧肩部，抵抗力降低
3	动物自由行走时向梗死对侧倾倒或转圈
4	瘫软，肢体无自发活动

2.3.3 解剖及病理学（TTC）检查 剔除造模未成功大鼠（造模成功率为 84%，其中模型、丁苯酞组各死亡 1 只，淫羊藿、槲皮苷组死亡 2 只，丁苯酞、金丝桃苷组各有 1 只造模未成功），每组预留 3 只动物进行脑组织生化指标检测，对其余动物进行安乐死，快速取脑，将脑组织冷冻至变硬后均匀切成 2 mm 薄片，置于 2% TTC 溶液（PBS 配制）中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。将染色后的切片按序摆放、拍照，以 Image Pro 图像处理软件计算脑梗死率，以梗死组织面积占全脑面积的百分比为梗死率，计算各给药组的抑制率。

抑制率 = (模型组梗死率 - 治疗组梗死率) / 模型组梗死率

2.3.4 脑组织生化指标检测 每组取 3 只动物，安乐死后快速取脑，去掉嗅球、小脑和低位脑干后，加入预冷的生理盐水制成组织匀浆，按照试剂盒说明书进行 SOD、MDA 水平检测。

2.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0.2 统计软件进行分析处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间统计学差异比较用 t 检验进行分析。

3 结果

3.1 FEE 抗氧化活性检测

采用 DPPH 自由基清除能力与 FRAP 为评价指标检测 23 种 FEE 化合物 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的抗氧化活性，结果显示，淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷、 β -脱水淫羊藿素具有较高的 DPPH 自由基清除能力和 FRAP，表明这 5 种化合物具有

较好的体外抗氧化活性。进一步考察该 5 种化合物的抗氧化剂量效应, 将其各设置 6 个浓度梯度 (15.625~500.000 $\mu\text{mol/L}$) 进行检测, 结果显示, 5 种化合物的 DPPH 自由基清除能力和 FRAP 具有浓度相关性 (图 1-A、B)。

3.2 FEE 神经细胞保护活性评估

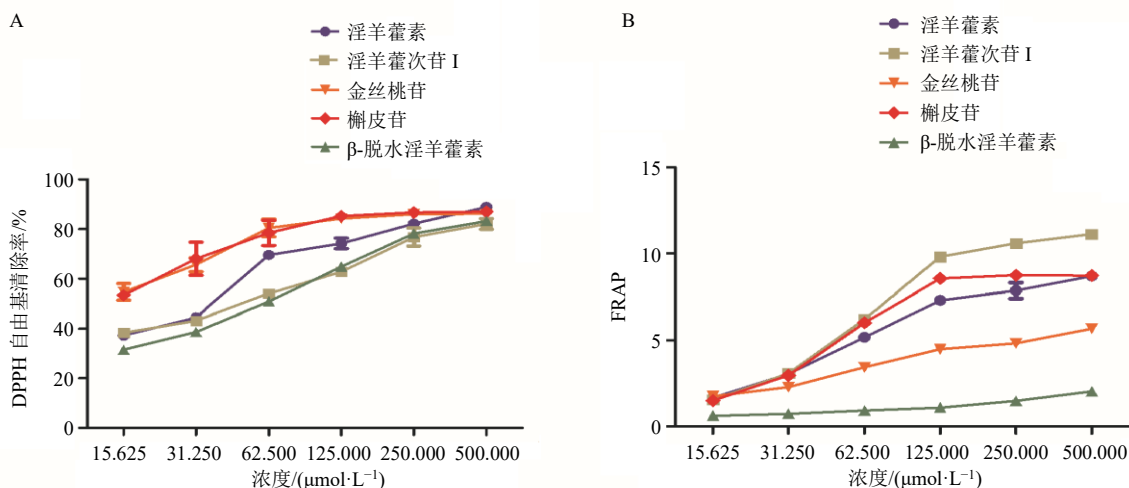
3.2.1 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的影响 为排除 5 种化合物自身毒性对 SH-SY5Y 细胞产生损伤, 本研究评估了 SH-SY5Y 细胞与 5 种化合物孵育 24 h 后的细胞活力水平。如图 2-A 所示, 0~25 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I 及 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃苷、槲皮苷、 β -脱水淫羊藿素对 SH-SY5Y 细胞活力无影响, 表明该浓度范围内的化合物对 SH-SY5Y 细胞无明显毒性作用。选取无毒剂量 5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I 与 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃苷、槲皮苷、 β -脱水淫羊藿素添加至培养板中孵育 23 h, 添加 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 继续孵育 1 h。如图 2 所示, 与空白组比较, H_2O_2 可诱导 SH-SY5Y 细胞活力显著降低 ($P<0.01$) 及 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$); 而淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷能够显著抑制 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力降低 ($P<0.05$ 、 0.01) 及 ROS 水平升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 提高细胞 SOD 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 抑制 MDA 升高 ($P<0.01$), 其中淫羊藿素组 MDA 水平具有降低趋势。提示淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷能够抑制 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激水平, 提

高胞内抗氧化酶活性, 减少脂质过氧化, 对神经细胞氧化应激损伤具有明显的保护作用。

3.2.2 对 PC-12 细胞缺糖缺氧损伤的影响 25 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷和 β -脱水淫羊藿素作用于细胞 24 h, 研究其对神经细胞缺糖缺氧损伤的作用。如图 3 所示, 当缺糖缺氧 6 h 时, PC-12 细胞存活率为 (60.85 ± 3.52)%, ROS 水平为 (158.29 ± 6.92)%, 与空白组比较具有显著性差异 ($P<0.01$), 表明此时细胞损伤严重; 而淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷可明显抑制缺糖缺氧诱导的 PC-12 细胞损伤, 表现为细胞活力升高 ($P<0.01$) 及 ROS 水平降低 ($P<0.05$, 0.01), 其中 β -脱水淫羊藿素可显著降低 PC-12 细胞 ROS 水平 ($P<0.05$)。提示淫羊藿素、金丝桃苷及槲皮苷可抑制缺糖缺氧诱导的 PC-12 细胞损伤, 对其具有明显的保护作用。

3.3 FEE 抗脑缺血再灌注损伤模型评价

3.3.1 对 MCAO 大鼠神经行为学、全脑梗死范围的影响 临床上脑梗死治疗的主要目的是恢复患者的神经功能, 提高患者生活质量。本研究于造模给药后的 24、48、72 h 参照 Bederson 评分标准对存活动物的神经行为功能进行评价, 如图 4-A 所示, 假手术组动物术后各时间点神经行为学评分均为 0, 模型组动物评分显著升高 ($P<0.01$), 行为障碍明显; 各给药组干预后, 可见动物神经行为学评分出现不同程度降低, 表明淫羊藿素、



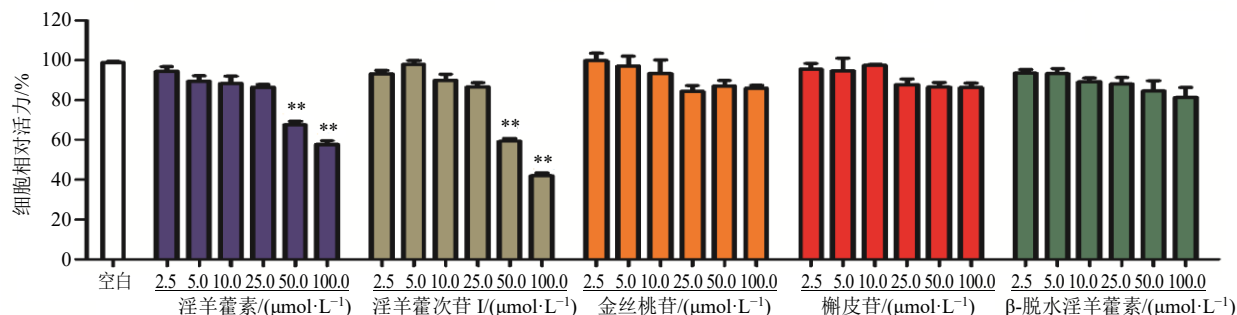
A-5 种 FEE 在不同浓度下的 DPPH 自由基清除率检测; B-5 种 FEE 在不同浓度下的 FRAP 检测。

A-DPPH radical scavenging ability of five kinds of FEE in different concentrations; B-FRAP of five kinds of FEE in different concentrations.

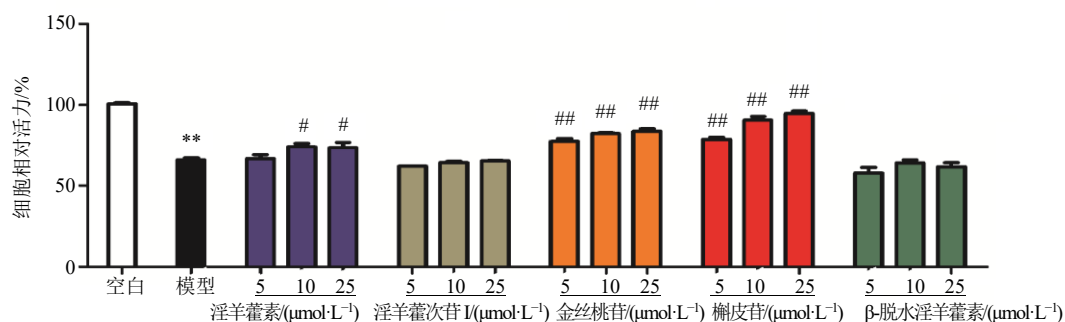
图 1 FEE 抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Antioxidant activity of FEE ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

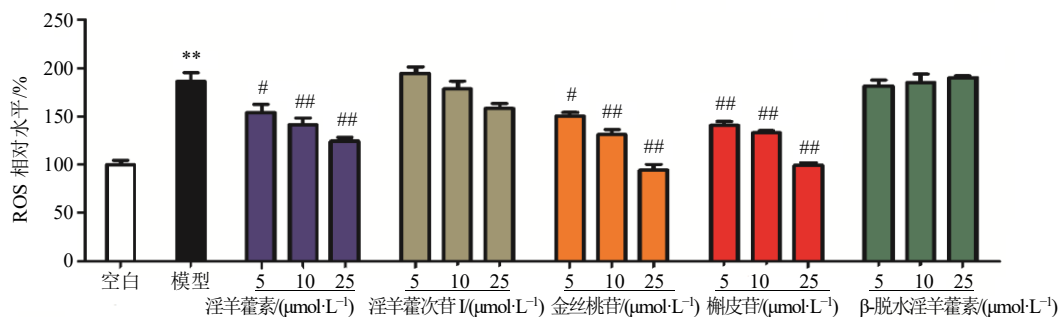
A



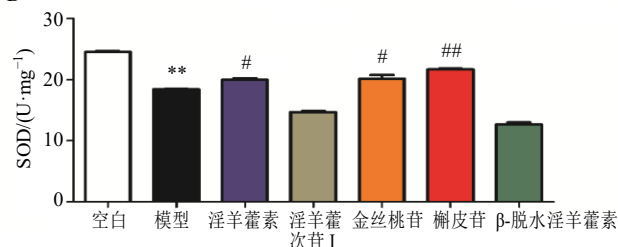
B



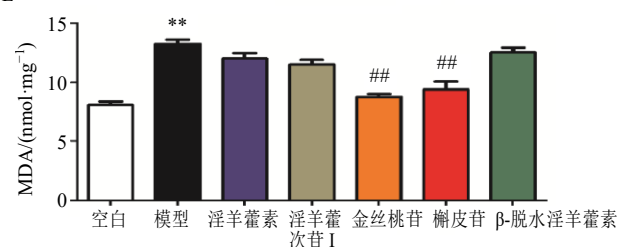
C



D



E

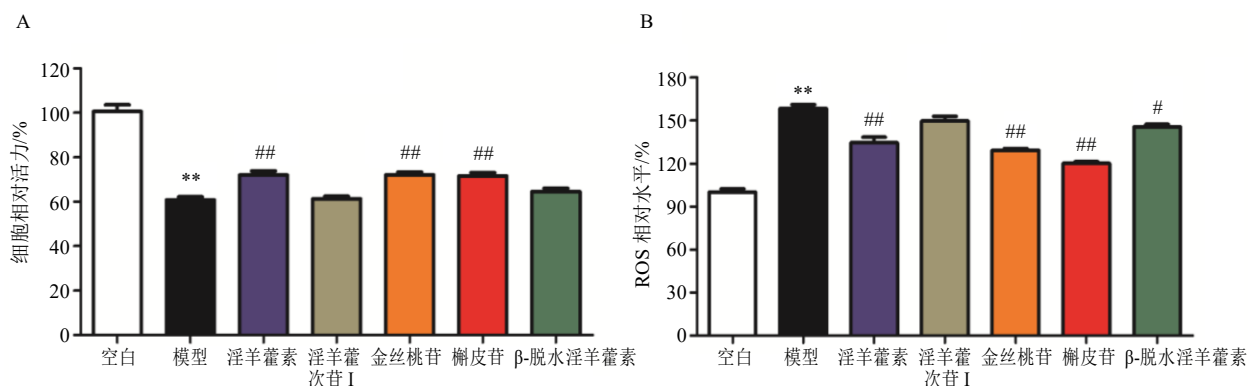


A-5 种 FEE 对 SH-SY5Y 细胞的毒性影响; B-5 种 FEE 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激模型细胞活力的影响; C-5 种 FEE 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激模型活性氧水平的影响; D-5 种 FEE 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激模型 SOD 水平的影响; E-5 种 FEE 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激模型 MDA 水平的影响, 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同。

A-toxic effects of five kinds of FEE in SH-SY5Y cells; B-effects of five kinds of FEE on cell viability in oxidative stress model of SH-SY5Y cells; C-effects of five kinds of FEE on reactive oxygen species in oxidative stress model of SH-SY5Y cells; D-effects of five kinds of FEE on SOD levels in oxidative stress model of SH-SY5Y cells; E-effects of five kinds of FEE on MDA levels in oxidative stress model of SH-SY5Y cells, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 2 FEE 对 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

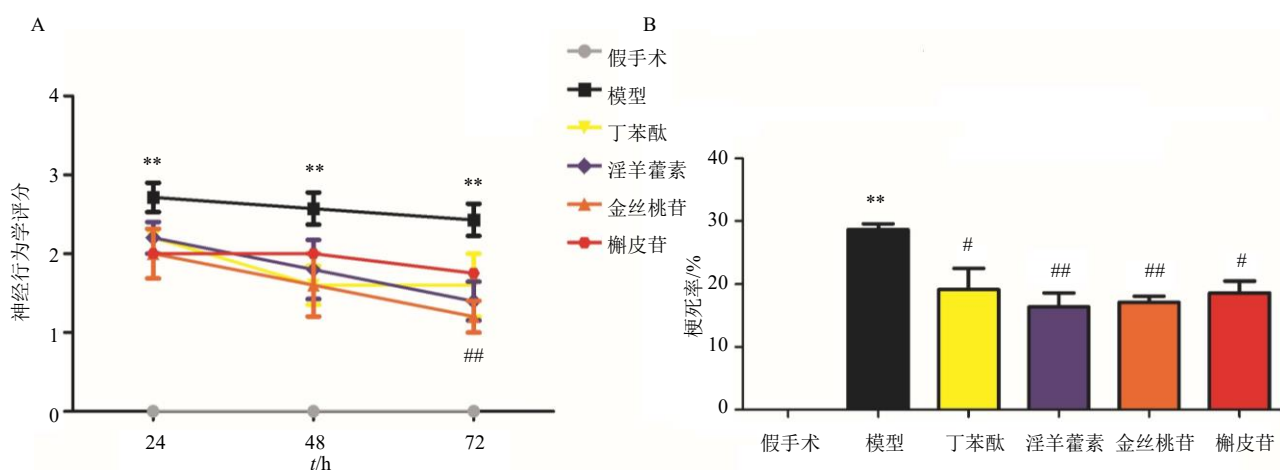
Fig. 2 Protective effects of FEE on oxidative stress damage in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-5 种 FEE 对 PC-12 细胞氧糖剥离模型细胞活力的影响；B-5 种 FEE 对 PC-12 细胞氧糖剥离模型 ROS 水平的影响。
A-effects of five kinds of FEE on cell viability in oxygen-glucose deprivation model of PC-12 cells; B-effects of five kinds of FEE on ROS in oxygen-glucose deprivation model of PC-12 cells.

图 3 FEE 对 PC-12 细胞缺糖缺氧损伤的保护作用研究 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Protective effects of FEE on oxygen-glucose deprivation-induced damage in PC-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-FEE 对 MCAO 大鼠神经行为学的影响；B-FEE 对 MCAO 大鼠脑梗死率的影响，与假手术组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同。

A-effects of FEE on neuro-behavioral function in MCAO rats; B-effects of FEE on cerebral infarction rate in MCAO rats, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 4 FEE 对 MCAO 大鼠神经行为学及脑梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of FEE on neurobehavioral sciences and cerebral infarction rate in MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

金丝桃苷和槲皮苷均可改善 MCAO 大鼠神经功能。与模型组比较，淫羊藿素、槲皮苷组术后各时间点评分具有下降趋势，金丝桃苷组术后 24、48 h 评分有下降趋势，术后 72 h 评分显著降低 ($P < 0.01$)。如图 4-B 所示，假手术组动物脑组织无梗死，模型组梗死明显 ($P < 0.01$)，可达 (28.66 ± 4.83) %；与模型组比较，丁苯酞在 80 mg/kg 剂量下显现出良好的降低脑梗死率的作用 ($P < 0.05$)；淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷组的梗死率分别为 (16.39 ± 5.43) %、(16.97 ± 5.39) %和 ($18.61 \pm$

3.74) %，与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01)，其梗死抑制率分别为 42.81%、40.79%和 35.07%。提示 100 mg/kg 淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷可降低 MCAO 大鼠脑梗死范围，改善大鼠神经功能。

3.3.2 对 MCAO 大鼠 GSH、MDA 水平及 SOD 活性的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑组织 GSH 水平及 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，MDA 水平升高 ($P < 0.05$)，表明术后机体清除氧自由基能力的改变。各给药组干预后，如图 5 所示，

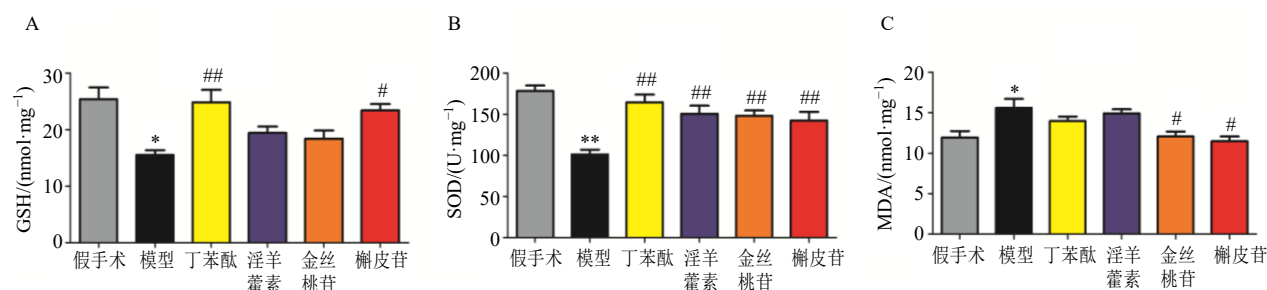


图 5 FEE 对 MCAO 大鼠 GSH (A)、SOD (B)、MDA (C) 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of FEE on contents of GSH (A), SOD (B), MDA (C) in MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

80 mg/kg 丁苯酞 ig 给药可显著升高机体 GSH 水平、SOD 活性 ($P < 0.01$), MDA 水平有降低趋势; 淫羊藿素可显著升高 SOD 活性 ($P < 0.01$), 对 GSH 水平的降低及 MDA 水平的升高具有改善作用, 但无显著性差异; 金丝桃苷可显著升高 SOD 活性、降低 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 对 GSH 水平具有升高趋势; 槲皮苷可显著升高 GSH 水平、SOD 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低 MDA 水平 ($P < 0.05$)。以上结果显示, 淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷可不同程度改善 MCAO 大鼠机体清除氧自由基的能力, 对控制脑缺血氧化应激过程具有积极作用。

4 讨论

长期以来, 围绕脑缺血治疗, 无论是基础理论研究或是药物研发, 一直受到广大研究者的重视。目前治疗脑卒中的实际用药情况并不容乐观, 临床上疗效确切的药物仍十分罕见。在缺血性脑卒中急性期治疗中, 其治疗关键是恢复脑血流, 但随之而来的是再灌注引起的损伤。该损伤主要是指缺血期间神经细胞功能和生物活性受到抑制导致神经元功能丧失, 同时又诱导出大量氧自由基等物质, 从而进一步加重神经元损伤^[26]。许多动物和临床实验研究试图通过拮抗、阻断或减缓脑卒中的病理相关分子开拓缺血性脑损伤的神经保护疗法, 减轻脑损伤从而达到治疗的目的^[27-28]。有专家指出, 在临床实际应用中联合氧化应激治疗以防止低回声易损斑块破裂对于早期预防卒中及疾病预后具有潜在的有效性^[29-31]。《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》(2018 版)^[32]中推荐的神经保护用药仅有依达拉奉、丁基苯酞以及细胞膜稳定剂胞二磷胆碱, 因此, 继续开发新的、对缺血再灌注损伤具有治疗作用的神经保护药物具有重要意义。

我国是中草药资源的自然储库, 许多天然产物中含有丰富的抗神经系统类疾病的化合物成分。淫

羊藿作为我国传统常用中药, 资源丰富, 相关的药理活性研究也取得了丰硕成果。淫羊藿主要化学成分 FEE 在抗神经系统氧化损伤方面作用突出, 在治疗脑卒中疾病中表现出了良好的开发前景^[12-16]。本研究基于抗氧化活性筛选出 FEE 中具有抗缺血再灌注损伤活性的化学成分。目前, 抗氧化活性检测的方法较多, 但大部分是针对特定自由基的清除活性, 并不能代表检测物整体^[33]。FRAP 检测方法是针对样品总还原能力进行的检测方法^[34], 其原理明确, 操作简便, 被认为是反映样品整体抗氧化活性的有效手段。本研究采用 FRAP 与 DPPH 检测相结合的方法综合评估化合物抗氧化活性, 结果显示 FEE 中淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷和 β -脱水淫羊藿素均有较强的 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力, 且具有浓度相关性, 与相关研究结论一致^[35]。

现代药理学研究表明, 淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、金丝桃苷、槲皮苷和 β -脱水淫羊藿素均为有价值的抗氧化剂, 其药理活性在众多研究中已得到证实^[36-40]。淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷具有抗氧化损伤、神经细胞保护、促进神经元再生、减少脑组织病理变化等作用。淫羊藿素可明显改善局灶性脑缺血再灌注损伤小鼠神经细胞凋亡、氧化和硝化应激、脂质过氧化和细胞外基质在大脑中的积累, 降低神经损伤、梗死体积和组织病理学变化, 逆转与脑萎缩、衰老相关的信号蛋白表达^[20-21,41]; 金丝桃苷和槲皮苷具有与淫羊藿素类似的药理活性, 金丝桃苷可通过抑制自由基生成、 Ca^{2+} 内流及脂质过氧化物生成对缺氧/再给氧的神经细胞和离体脑片发挥保护作用^[42-43], 有效减轻大鼠脑缺血再灌注早期脑水肿及氧化应激损伤, 改善低氧大鼠认知功能, 具有显著的脑保护作用^[22,44]; 槲皮苷亦可通过调节 ROS 和 ATP 的生成, 保护缺氧神经元免于死亡, 促进皮质神经元存活,

通过抑制氧化应激及炎症反应对脑组织产生保护作用^[45-47]。本研究结果表明,淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷可显著抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤和缺糖缺氧诱导的 PC12 细胞损伤,具有显著的神经细胞保护作用;通过对再灌注前后动物神经行为学指标及脑组织梗死面积进行检测发现,淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷均可改善 MCAO 大鼠神经功能,不同程度地降低脑梗死面积,对急性缺血性再灌注大鼠具有保护作用,且淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷还能够提高 GSH、SOD 含量,改善 MCAO 大鼠机体清除氧自由基的能力,对控制脑缺血氧化应激过程具有积极作用。淫羊藿次苷 I 和 β-脱水淫羊藿素虽在体外表现出了良好的抗氧化活性,但在细胞模型验证中仅在个别氧化应激检测指标中发挥作用,未能达到改善神经细胞损伤的目的,这可能与本研究在论证过程中设置的浓度剂量未达到起效浓度有关,但更多的原因可能在于其化合物的药理活性。研究显示,淫羊藿次苷 I 和 β-脱水淫羊藿素被报道最多的是抗肿瘤及骨保护作用^[48-49],β-脱水淫羊藿素虽有报道具有神经保护功能,但其机制目前并不明晰,可能与雌激素受体等其他信号通路有关^[50]。本研究表明,淫羊藿素、金丝桃苷和槲皮苷在同一剂量下对神经系统的保护作用优于淫羊藿次苷 I 和 β-脱水淫羊藿素。

综上,淫羊藿素、金丝桃苷、槲皮苷具有良好的体外抗氧化及神经系统保护活性,是 FEE 发挥抗缺血再灌注损伤作用的主要抗氧化活性成分,在治疗缺血性卒中病变中存在巨大潜力。本研究有助于了解 FEE 生物活性及药理作用,为其用于治疗中枢神经系统疾病的药物开发提供依据,为促进中药材在临床治疗中的应用奠定理论基础。在后续研究中,还需继续挖掘 FEE 抗缺血性脑卒中疾病的其他作用机制,进一步探讨其对卒中疾病的防治作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu M, Wu B, Wang W Z, *et al.* Stroke in China: Epidemiology, prevention, and management strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(5): 456-464.
- [2] Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(6): 649-671.
- [3] Zhang X H, Lei H, Liu A J, *et al.* Increased oxidative stress is responsible for severer cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(6): 590-598.
- [4] 陈祥宇, 张晶涵, 赖嘉豪, 等. 基于数据挖掘的益气活血类防治脑缺血再灌注损伤用药规律及其作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3221-3236.
- [5] 刘海超. 益母草碱对实验性脑缺血大鼠神经保护作用及其机制的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [6] 宋金艳, 张力, 赵晓倩, 等. 大黄酚脂质体对脑缺血再灌注损伤小鼠海马神经元凋亡的影响 [J]. *神经药理学报*, 2011, 1(2): 7-13.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 341.
- [8] 马子密, 傅延龄. 历代本草药性汇解 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 808-810.
- [9] 刘根节. 淫羊藿有效成分的药理作用与临床应用研究进展 [J]. *中外医疗*, 2007, 26(19): 40-42.
- [10] 王炎焱, 路辉, 陈馥, 等. 神通胶囊治疗脑血管性痴呆临床与实验研究 [J]. *中医杂志*, 2002, 43(6): 437-439.
- [11] 李作洲, 徐艳琴, 王瑛, 等. 淫羊藿属药用植物的研究现状与展望 [J]. *中草药*, 2005, 36(2): 289-295.
- [12] 韩庆贤, 丁智斌, 李晓慧, 等. 淫羊藿总黄酮通过抑制小胶质细胞/巨噬细胞介导的氧化应激反应促进髓鞘再生 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(4): 405-409.
- [13] 刘崇铭, 王敏, 梁利春. 淫羊藿黄酮对脑血流与脑缺血的作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 1995, 12(3): 192-194.
- [14] 沈磊, 张鸽, 吴玉林. 淫羊藿总黄酮对大鼠局灶性脑缺血的保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(4): 266-269.
- [15] 杨娟, 许立, 方泰惠. 淫羊藿总黄酮对实验性脑缺血的保护作用初探 [J]. *安徽医药*, 2009, 13(3): 259-260.
- [16] 赖丽娟, 刘松, 谢佳丽, 等. 三氟淫羊藿素通过抑制氧化应激对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *赣南医学院学报*, 2017, 37(3): 343-346.
- [17] 于蕾, 白雪, 车若梅, 等. 山茱萸新苷对过氧化氢诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(3): 95-100.
- [18] Zhu J R, Tao Y F, Lou S, *et al.* Protective effects of ginsenoside Rb(3) on oxygen and glucose deprivation-induced ischemic injury in PC12 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(3): 273-280.
- [19] Huang S L, He X J, Li Z F, *et al.* Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 on oxygen-glucose deprivation reperfusion in PC12 cells [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(3): 208-211.
- [20] Wu C T, Yang T H, Chen M C, *et al.* Therapeutic effect of icaritin on cerebral ischemia-reperfusion-induced senescence and apoptosis in an acute ischemic stroke mouse model [J]. *Molecules*, 2022, 27(18): 5783.
- [21] Wu C T, Chen M C, Liu S H, *et al.* Bioactive flavonoids icaritin and icariin protect against cerebral ischemia-reperfusion-associated apoptosis and extracellular matrix accumulation in an ischemic stroke mouse model [J].

- Biomedicines*, 2021, 9(11): 1719.
- [22] 陈红艳, 王建华, 杨新波, 等. 金丝桃苷对大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的影响 [J]. 解放军药理学学报, 2007, 23(2): 88-91.
- [23] 江飞飞, 陈志志, 徐晏雯, 等. 金丝桃苷保护大鼠脑缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1448-1453.
- [24] 周峦, 熊英, 彭安林. 卷丹百合花金丝桃苷对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 1-6.
- [25] McAuley M A, Breu V, Graham D I, *et al.* The effects of bosentan on cerebral blood flow and histopathology following middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, 307(2): 171-181.
- [26] Yu Y P, Chi X L, Liu L J. A hypothesis: Hydrogen sulfide might be neuroprotective against subarachnoid hemorrhage induced brain injury [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 432318.
- [27] 毛春, 张苏明. 镁对缺血性脑损伤的神经保护作用 [J]. 国际脑血管病杂志, 2000, 8(1): 31-34.
- [28] A·巴赫, K·斯特罗姆戈德. 作为缺血性脑损伤的有效神经保护剂并用于治疗疼痛的 PSD-95 的高亲和力的二聚抑制剂: 中国, CN 201280023754.8 [P]. 2024-09-09.
- [29] 逯蕊芳, 曹旻, 王玉宁, 等. 阿托伐他汀联合银杏二萜内酯葡胺注射液治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2193-2197.
- [30] 安婷, 冶生寿. 注射用丹参(冻干)联合阿托伐他汀治疗伴出血急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(11): 2844-2847.
- [31] 李炳东, 李国萍. 他汀类药物联合普罗布考治疗缺血性脑卒中的效果分析 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(34): 77-79.
- [32] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.
- [33] 刘志东, 郭本恒, 王荫榆. 抗氧化活性检测方法的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 563-567.
- [34] 郭长江, 杨继军, 韦京豫, 等. 两种方法测定坚果类食物抗氧化活性的比较 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(2): 135-136.
- [35] 陈玉霞, 刘建华, 林峰, 等. DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性 [J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(6): 11-14.
- [36] 杨诗婷, 王晓倩, 廖广辉. 金丝桃苷的药理作用机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 947-951.
- [37] 包宇, 杨建雄, 孙润广. 淫羊藿苷与脱水淫羊藿素的体外抗氧化研究 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2012, 40(3): 67-70.
- [38] 包宇, 杨建雄, 孙润广. 淫羊藿苷与淫羊藿次苷 II 的体外抗氧化作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(3): 423-428.
- [39] 李佳银, 于欢, 石伯阳, 等. 甘薯茎叶中异槲皮苷及咖啡酰基奎宁酸类衍生物的抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 111-114.
- [40] 朱学鑫, 蒋福升, 丁志山. 槲皮苷生物活性的研究进展 [J]. 蛇志, 2012, 24(1): 47-50.
- [41] Zhang W, Xing B C, Yang L L, *et al.* Icaritin attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury via anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(6): 1083-1097.
- [42] 周晓隆, 陈志武. 金丝桃苷对新生大鼠神经细胞缺氧/再给氧损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 83-86.
- [43] 彭国平, 魏尔清, 葛求富, 等. 金丝桃苷对离体缺氧/缺糖再灌注脑损伤的保护作用 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(6): 434-437.
- [44] 李锦松. 金丝桃苷对低氧时大鼠认知功能损伤的改善作用及其抗氧化应激损伤机制 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [45] 薛冰洁, 黄吉生, 马博, 等. 槲皮苷通过调节 ROS 和 ATP 保护缺氧原代皮层神经元的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(4): 1-6.
- [46] 薛小燕, 巫莉萍, 赖珺. 槲皮苷对新生大鼠皮质神经元存活影响研究 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(18): 2-3.
- [47] Ma J Q, Luo R Z, Jiang H X, *et al.* Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. *Food Funct*, 2016, 7(1): 549-556.
- [48] 张月, 刘格歌, 陈旺. 淫羊藿次苷 I 的药理活性研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(9): 1380-1384.
- [49] 向玉玲, 谭佳杰, 熊远果, 等. 淫羊藿成分脱水淫羊藿素研究进展 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(12): 2636-2642.
- [50] Wang Z, Zhang X, Wang H, *et al.* Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(3): 911-922.

[责任编辑 罗 曦]