·论　著·

丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的药效物质基础研究

金楷钰[1]，徐小晶[1]，李白玲[2]，何容[2]，李辉[2]，张禄权[2]，陆晓燕[1*]，范骁辉[1](1.浙江大学药学院，中药科学与工程学系，杭州 310058；2.贵州拜特制药有限公司，贵阳 550014)

摘要：目的　从注射液、组分、成分3个层面，探究丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤作用及其药效物质基础。**方法**　首先采用SH-SY5Y神经细胞构建氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R)损伤模型，以细胞活力为指标，考察丹参川芎嗪注射液对神经细胞的保护作用。其次，采用制备液相色谱等技术制备丹参川芎嗪注射液标准组分，然后在SH-SY5Y神经细胞OGD/R模型上，系统筛选丹参川芎嗪注射液组分和成分中抗脑缺血缺氧损伤的药效物质，最后进一步通过LC-MS对有效组分进行分析，并对有效成分进行归属，初步明确丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的药效物质基础。**结果**　与模型组相比，丹参川芎嗪注射液在2.5%~15%的稀释浓度下，具有显著的抗SH-SY5Y细胞OGD/R损伤的作用；组分I、J、L、M、O、P、Q以及丹酚酸C、丹酚酸A、丹参素和盐酸川芎嗪均具有显著的抗SH-SY5Y细胞OGD/R损伤的作用。LC-MS分析结果表明，组分O、P中均含有丹酚酸C，组分O中含有丹酚酸A、盐酸川芎嗪，组分P中含有丹参素。**结论**　丹参川芎嗪注射液具有显著的抗脑缺血缺氧损伤作用，而丹酚酸C、丹酚酸A、丹参素和盐酸川芎嗪可能是其抗脑缺血缺氧损伤的主要药效物质。

关键词：丹参川芎嗪注射液；抗脑缺血缺氧；药效物质；氧糖剥夺/复氧
中图分类号：R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2020)01-0001-08
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.01.001
引用本文：金楷钰，徐小晶，李白玲，等. 丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的药效物质基础研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 1-8.

Study of the Effective Constituents of Danshen Chuanxiongqin Injection Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury

JIN Kaiyu[1], XU Xiaojing[1], LI Bailing[2], HE Rong[2], LI Hui[2], ZHANG Luquan[2], LU Xiaoyan[1*], FAN Xiaohui[1] *(1. Department of Chinese Medicine Science & Engineering, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Guizhou Baite Pharmaceutical Company, Guiyang 550014, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To explore the effective constituents of Danshen Chuanxiongqin injection against hypoxic-ischemic brain injury from the three levels of injection, components and ingredients. **METHODS**　Firstly, oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R) model was constructed in SH-SY5Y neuroblastoma cells. The protective effect of Danshen Chuanxiongqin injection on this ODG/R model was then detected by cell viability. Secondly, standard components of Danshen Chuanxiongqin injection were prepared by preparative liquid chromatography. The effective components and constituents of Danshen Chuanxiongqin injection were identified by the OGD/R model in SH-SY5Y cells. Finally, the active components and ingredients were analyzed by LC-MS, aiming to identify the effective constituents of Danshen Chuanxiongqin injection against hypoxic-ischemic brain injury. **RESULTS**　Compared with the model group, Danshen Chuanxiongqin injection had a markedly protective effect on OGD/R injured SH-SY5Y cells in the dose range of 2.5%−15%. Further screening found that the components I, J, L, M, O, P, Q and salvianolic acid C, salvianolic acid A, Danshensu and ligustrazine hydrochloride could significantly alleviate OGD/R-induced injury in SH-SY5Y cells. The results of LC-MS analysis indicated that the components O and P contained salvianolic acid C, the component O contained salvianolic acid A and ligustrazine hydrochloride, and the component P contained Danshensu. **CONCLUSION**　Danshen Chuanxiongqin injection has a markedly protective effect on hypoxic-ischemic brain injury, and salvianolic acid C, salvianolic acid A, Danshensu and ligustrazine hydrochloride may be the effective constituents of Danshen Chuanxiongqin injection against hypoxic-ischemic brain injury.

KEYWORDS: Danshen Chuanxiongqin injection; against hypoxic-ischemic brain injury; effective constituents; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R)

基金项目：“重大新药创制”国家科技重大专项(2018ZX09201011)

作者简介：金楷钰，女，博士生　Tel: (0571)88208596　E-mail: 425694@zju.edu.cn　***通信作者：**陆晓燕，女，博士，副教授　Tel: (0571)88208596　E-mail: luxy@zju.edu.cn

丹参川芎嗪注射液是由丹参提取液和盐酸川芎嗪组成的复方制剂，临床主要用于治疗闭塞性脑血管疾病如缺血性中风、脑供血不足、脑栓塞等症[1]。研究资料显示，丹参川芎嗪注射液是各大医院首选的治疗心脑血管疾病的药物之一，占有巨大的市场份额，年销售额已达数十亿，且有非常可观的发展前景[2]。尽管如此，目前关于其治疗心脑血管疾病的药效物质仍未明确，限制了其临床用药与质量控制的科学性。

明确丹参川芎嗪注射液中的化学组成是开展其药效物质研究的基础。孙进华等[3]采用超高效液相结合二维线性离子肼静电轨道肼组合式高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap)从丹参川芎嗪注射液中定性鉴别出 15 个化学成分，大多为来源于丹参提取液的水溶性酚酸类化合物，例如丹参素、丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C 等。此外，也有研究表明丹参川芎嗪注射液中还含有一些脂溶性的成分，如川芎嗪和丹参酮ⅡA[4]。

现代药理学研究表明丹参川芎嗪注射液具有抗炎、保护血管内皮细胞和改善氧化应激紊乱的作用，这可能是其治疗多种心脑血管疾病的基础。余涛[5]通过研究发现丹参川芎嗪注射液可以使冠心病患者体内血清中的抗炎因子白细胞介素-4 含量增加，炎症趋化因子白细胞介素-6、白细胞介素-8 含量降低。汪伟等[6]采用肿瘤坏死因子 α 致人脐静脉内皮细胞 ECV304 损伤模型发现丹参川芎嗪注射液可以降低内皮细胞的损伤，保护其调节血管舒缩状态的功能，进而起到抑制动脉粥样硬化斑块形成的作用。林小艳等[7]通过测定老年脑栓塞患者在进行丹参川芎嗪治疗之后的氧化应激指标，发现丹参川芎嗪的使用可以有效改善患者的氧化应激紊乱，从而减轻脑部神经细胞的缺血再灌注损伤。同时，也有研究证明丹参川芎嗪注射液可以改善急性脑梗死患者的脑部血液供应，促进神经功能恢复[8]。

此外，丹参川芎嗪注射液中的主要成分也具有相关的药理活性，对于其发挥临床疗效也有重要的作用。例如，川芎嗪具有抗炎[9]，神经保护[10]，促进血管扩张，抑制血管痉挛等功能[11]。丹参素与丹参酮ⅡA 均对缺血再灌注损伤的大鼠有保护作用[12-13]。丹酚酸 A 也可以缓解 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP^+)诱导的神经细胞毒性，同时可以降低活性氧的水平和抑制细胞凋亡[14]。

综上所述，丹参川芎嗪注射液及其单体成分具有多种药理活性，但关于其治疗心脑血管疾病的药效物质尚未明确。因此，本研究依据丹参川芎嗪注射液临床主要用于治疗闭塞性脑血管疾病的定位，采用神经细胞氧糖剥夺/复氧损伤(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R)模型[15]，从注射液、组分、成分 3 个层面，对丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的作用及其药效物质基础进行了研究，为后续研究其作用机制和构建以药效物质为核心的质控体系提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

XS105 型分析天平(Mettler-Toledo)；AG 22331 Hamburg 离心机、5424 R 离心机(Eppendorf)；1300 系列Ⅱ级 A2 型生物安全柜(Thermo Scienfitic)；IX53 或 CKX41 倒置相差荧光显微镜(Olympus)；Infinite F200 型多功能酶标仪(Tecan)；MIC-101 型缺氧小室(Billups Rothenberg)；Agilent 1200 型制备液相色谱仪，配二元输液泵、手动进样器、DAD 检测器和 ChemStation 色谱工作站(Agilent)；型号 R-200 减压旋蒸仪(BUCHI Rotavapor)；3131 及 3111 型 CO_2 细胞培养箱、Y14R-651981-YR 冷冻干燥仪、SPD121P/RVT4104 离心浓缩冷冻系统均来自 Thermo。

1.2 试剂与材料

SH-SY5Y 细胞：人神经母细胞瘤细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。丹参川芎嗪注射液(贵州拜特制药有限公司，批号：20171202；规格：每支 5 mL)；细胞培养试剂(Gibco)；噻唑蓝(MTT，Sigma，货号：M2128)。

乙腈(用于制备型液相)(北京百灵威科技有限公司，货号：134752；纯度≥99.9%)；丹酚酸 C(批号：17031402；纯度≥98%)、丹酚酸 A(批号：17022805；纯度≥98%)、丹酚酸 B(批号：17040503；纯度≥98%)、紫草酸(批号：17053003；纯度≥98%)、丹酚酸 B 二甲酯(批号：17041514；纯度≥90%)、迷迭香酸(批号：17040532；纯度≥98%)、丹参素(批号：17060910；纯度≥98%)、丹参酮ⅡA(批号：17101811；纯度≥98%)、异阿魏酸(批号：17051016；纯度≥98%)、异欧前胡素(批号：17030420；纯度≥98%)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司；盐酸川芎嗪(西安力邦制药有限公司，批号：180403B)。

2 方法

2.1 丹参川芎嗪注射液标准组分的制备

将 10 L 丹参川芎嗪注射液旋转蒸发浓缩至

6 L，10 000 r·min^{-1}离心 10 min 后，取上清液进制备液相分离制备组分。

色谱条件：Agilent Zorbax SB-C_{18}色谱柱(21.2 mm×250 mm，7 μm)；流动相：超纯水(A 相)-纯乙腈(B 相)；梯度洗脱：0~7 min，98%→90%A，7~20 min，90%→77%A，20~35 min，77%→73%A，35~50 min，73%→40%A，50~55 min，40%→0A；流速 10 mL·min^{-1}；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 5 mL；组分从 0.2 min 开始收集，每 3 min 收集 1 个组分，共收集 17 个组分，分别记为 A~Q。

共计进样 70 针，分离获得 A~Q 的标准组分各约 2 L。减压浓缩之后，进行冷冻干燥得到冻干粉末，由于组分 A 在浓缩后含量过低，因此舍去，最终得到 B~Q 共 16 个组分，将这 16 个组分储存在 4 ℃冰箱中保存，用于后续细胞实验。

2.2 细胞毒性试验

SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板上，密度为每孔 1×10^4 个。由于后期 OGD/R 实验所用的为无糖 DMEM 培养液，所以用无糖 DMEM 来稀释药物。给药组以每孔 100 μL 分别加入梯度稀释的丹参川芎嗪注射液及其组分或成分供试液，对照组以每孔 100 μL 加入无糖 DMEM，将细胞置于 37 ℃、5%CO_2的细胞培养箱中孵育 14 h 后弃去药液，每孔加入 100 μL 0.5 mg·mL^{-1}的 MTT 溶液，于培养箱中避光孵育 4 h，然后吸净上清液，每孔加入 100 μL DMSO，于振荡器上 37 ℃振荡混匀 10 min。采用酶标仪在 580 nm 波长条件下测定各组吸光度(A)值，计算不同浓度给药组的细胞存活率(细胞活力)，公式为细胞存活率(%)=($A_{给药组}$/$A_{对照组}$)×100%。平行 3 次试验，汇总作图。

2.3 丹参川芎嗪注射液及其组分、成分抗神经细胞 OGD/R 损伤作用研究

SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板中，密度为每孔 1×10^4 个。给药组以每孔 100 μL 分别加入梯度稀释的丹参川芎嗪注射液及其组分或成分供试液，模型组以每孔 100 μL 加入无糖 DMEM，然后将细胞置于缺氧小室中，用氮气(N_2)替换缺氧小室中的空气，具体操作为持续通入 N_2 5 min 后，夹紧缺氧小室排气管。每隔 10 s 松开排气管 1 次，如此反复 5 min，最后 1 次充气 10 s 后立即夹紧进气管与排气管。将缺氧小室置于 37 ℃、1%O_2的缺氧培养箱中孵育 12 h 后，从小室中取出细胞培养板放置于正常培养箱(37 ℃、5%CO_2)中复氧 2 h，建立 OGD/R 模型。另设正常对照组，以每孔 100 μL 加入 DMEM 高糖完全培养基，始终放置于正常培养箱中同步孵育。然后按“2.2”项下方法测定各组的 A 值，计算不同浓度给药组的给药保护率，公式为给药保护率(%)=($A_{给药组}$−$A_{模型组}$)/($A_{正常对照组}$−$A_{模型组}$)×100%。平行 3 次试验，汇总作图。

2.4 基于 LC-MS 的有效组分化学成分定性分析

对照品溶液及有效组分溶液制备：称取丹酚酸 A、丹酚酸 C、盐酸川芎嗪、丹参素对照品适量，用甲醇溶解，配制成 100~200 μg·mL^{-1}的混合溶液；称取组分 I、J、L、M、O、P、Q 适量，用甲醇溶解，配成约 500 μg·mL^{-1}溶液。对照品溶液与组分溶液均以 10 000 r·min^{-1}离心 10 min，取上清进样。

色谱条件：色谱柱：Agilent Zorbax SB-C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相：0.05%甲酸-水(A)和纯乙腈(B)；柱温 30 ℃；流速 0.6 mL·min^{-1}；梯度洗脱：0~7 min，98%→90%A，7~20 min，90%→77%A，20~35 min，77%→73%A，35~50 min，73%→40%A，50~60 min，40%→0A；进样量：20 μL。

质谱条件：Finnigan LCQ Deca XPplus 型质谱仪；负离子模式，全扫描；检测范围：m/z 100~1 500；以高纯氮作为辅助气和鞘气，流速分别为 20 arb、60 arb；碰撞气：超纯氦；ESI 电压：−3 kV(负离子)/4 kV(正离子)，毛细管温度：350 ℃；毛细管电压：−15 V(负离子)/19 V(正离子)；管透镜电压：−30 V(负离子)/25 V(正离子)；CID 碰撞能量：35%~45%。

2.5 统计学分析

采用 Xcalibur 1.3 软件分析 LC-IT-MS 质谱数据；细胞实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 GraphPad Prism 7 对细胞活力进行作图和统计分析。组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Dunnett 后验分析，P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的体外药效评价

采用 MTT 法检测丹参川芎嗪注射液对 SH-SY5Y 细胞的无毒浓度范围，结果表明在 2.5%~15%的稀释浓度下，细胞存活率均>90%，因此，在该浓度范围内采用 OGD/R 模型，考察丹参川芎嗪注射液对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 神经细胞的保护作用。

与正常对照组相比，模型组的细胞活力显著降低，表明缺氧缺糖 12 h，复氧 2 h 能对神经细胞 SH-SY5Y 造成严重损伤。与模型组相比，丹参川芎嗪注射液在 2.5%，5%，10%，15%的稀释浓度下，均能显著提高 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的活力，其保护率分别为 27.00%，29.54%，38.03%，33.47%，表明丹参川芎嗪注射液具有明显的抗神经细胞 OGD/R 损伤作用。结果见图 1。

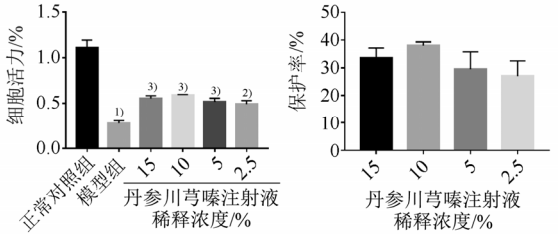

图 1　丹参川芎嗪注射液对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用(n=3)

与正常对照组比，[1)]P<0.01；与模型组比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 1　Protective effect of Danshen Chuanxiongqin injection on OGD/R injured SH-SY5Y cells(n=3)

Compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

3.2　基于细胞水平的丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的药效物质发现研究

3.2.1　丹参川芎嗪注射液组分抗 SH-SY5Y 神经细胞 OGD/R 损伤作用研究

采用 MTT 法检测 16 个丹参川芎嗪注射液标准组分对 SH-SY5Y 细胞的无毒浓度范围。分别选择其中高、低 2 个剂量，采用 OGD/R 模型，以细胞活力为指标，考察丹参川芎嗪注射液各组分对 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。与正常对照组相比，模型组的细胞活力均显著降低，表明 OGD/R 对神经细胞 SH-SY5Y 造成严重损伤；与模型组相比，组分 B~D 在 400，200 μg·mL^{-1} 的浓度下，组分 F 在 25，12.5 μg·mL^{-1} 的浓度下未提高 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的活力；组分 E 在 25 μg·mL^{-1} 的浓度下，组分 G、H 在 100 μg·mL^{-1} 的浓度下，组分 K、N 在 100，50 μg·mL^{-1} 的浓度下可以使 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的细胞活力上升，但与模型组相比，差异不显著；组分 I 在 50 μg·mL^{-1} 的浓度下，组分 J、O、P 和 Q 在 100，50 μg·mL^{-1} 的浓度下，组分 L 和 M 在 100 μg·mL^{-1} 的浓度下，可以显著地增加 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的活力。组分 P、Q 的给药保护率可达 45.61%和 44.45%。以上结果表明组分 I、J、L、M、O、P 和 Q 可能是丹参川芎嗪注射液中抗脑缺血缺氧损伤的药效物质。细胞活力结果见图 2，给药保护率见图 3。

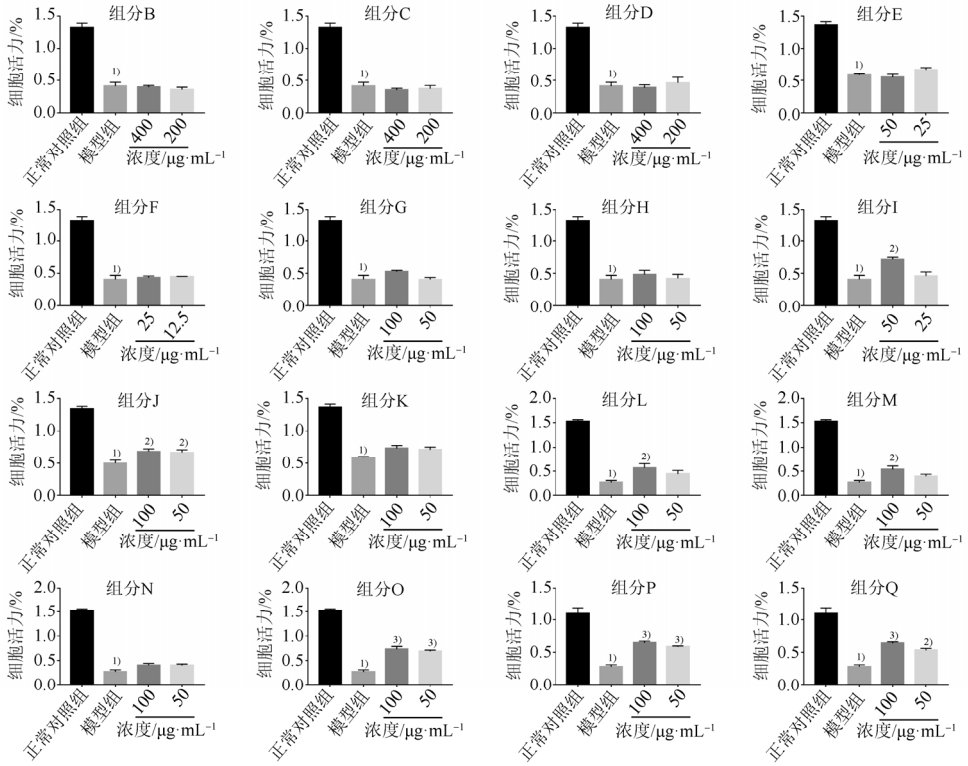

图 2　16 个丹参川芎嗪注射液组分对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的细胞活力影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

与正常对照组比，[1)]P<0.01；与模型组比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 2　Cell viability effect of 16 standard components of Danshen Chuanxiongqin injection on OGD/R injured SH-SY5Y cells($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

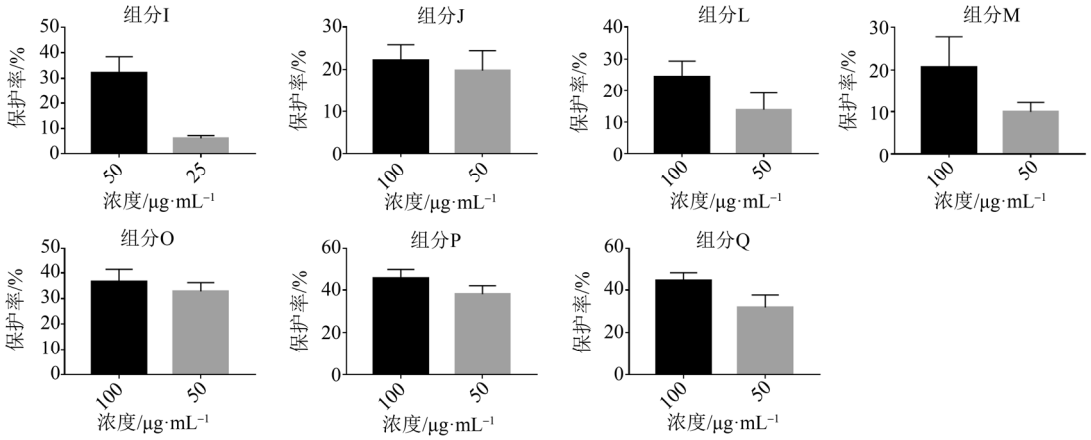

图 3　7 个丹参川芎嗪注射液组分对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护率($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 3　Protection rate of 7 standard components of Danshen Chuanxiongqin injection on OGD/R injured SH-SY5Y cells($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.2.2　丹参川芎嗪注射液中的单体成分抗 SH-SY5Y 神经细胞 OGD/R 损伤的作用　进一步采用 MTT 法检测丹参川芎嗪注射液中的单体成分对 SH-SY5Y 细胞的无毒浓度范围，用于后续其抗 SH-SY5Y 细胞 OGD/R 损伤作用研究。与正常对照组相比，模型组的细胞活力均显著降低，表明 OGD/R 对神经细胞 SH-SY5Y 造成严重损伤；与模型组相比，丹酚酸 A 在 15，10 μmol·L^{-1} 的浓度下，丹酚酸 C 在 100，50 μmol·L^{-1} 的浓度下，丹参素在 1 μmol·L^{-1} 的浓度下，盐酸川芎嗪在 200 μmol·L^{-1} 的浓度下，均可以使 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的细胞活力显著增加，丹酚酸 C 的保护率甚至可以达到 39.81%。其余单体成分如丹酚酸 B 在 80，40 μmol·L^{-1} 的浓度下，紫草酸在 400，200 μmol·L^{-1} 的浓度下，丹酚酸二甲酯在 60，30 μmol·L^{-1} 的浓度下可以增加 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的细胞活力，但与模型组相比，无显著差异；剩余单体成分如异阿魏酸等未表现出保护作用。综上，丹酚酸 C、丹酚酸 A、丹参素和盐酸川芎嗪可能是丹参川芎嗪注射液中抗脑缺血缺氧损伤的主要药效物质。细胞活力结果见图 4，给药保护率见图 5。

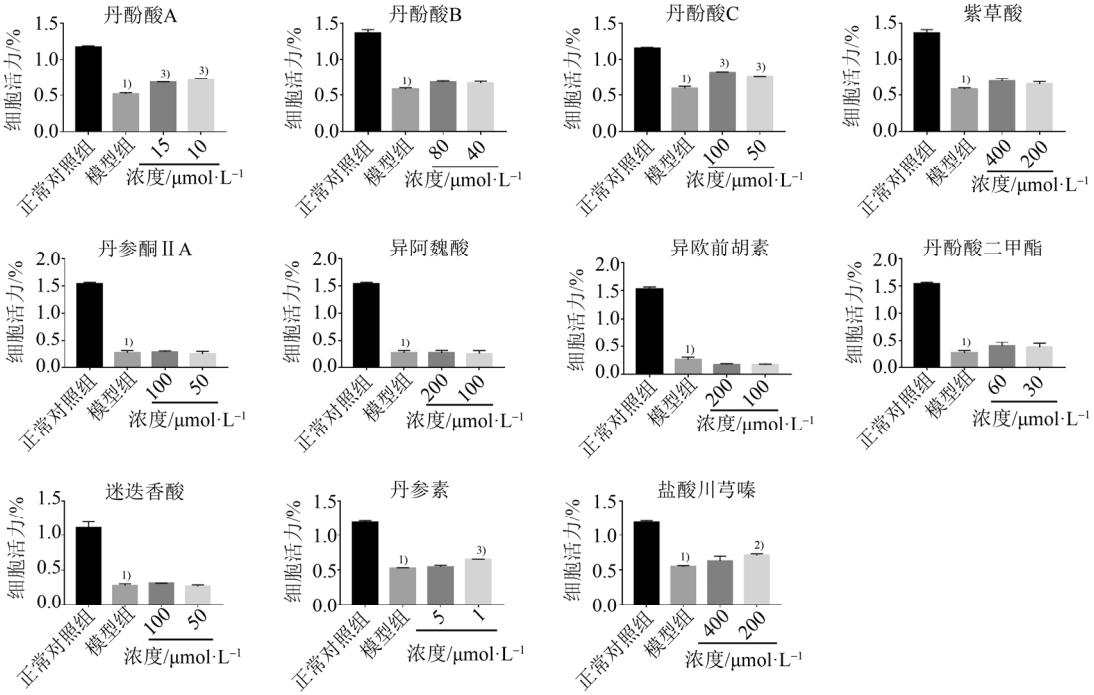

图 4　11 个丹参川芎嗪注射液中的单体成分对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞活力影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

与正常对照组比，[1)]P<0.01；与模型组比，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 4　Cell viability effect of 11 constituents of Danshen Chuanxiongqin injection on OGD/R injured SH-SY5Y cells($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

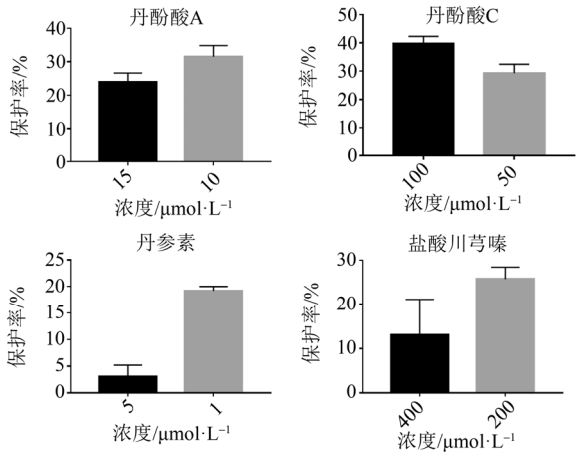

图 5 4 个丹参川芎嗪注射液单体成分对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的给药保护率($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 5 Protection rate of 4 constituents of Danshen Chuanxiongqin injection on OGD/R injured SH-SY5Y cells($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.2.3 基于 LC-MS 的有效组分化学成分定性分析 采用 LC-MS 进一步对有效组分 I、J、L、M、O、P 和 Q 中的成分进行定性分析，并对前述有效单体成分进行归属，结果见图 6~7。组分 I、J、L、M 的色谱峰可能受辅料等影响较大，出现峰未分离的情况(数据未显示)，组分 O、P、Q 的总离子流图各峰分离较好。由图 7A 可知，组分 P 中含有丹参素，但其响应值较低；由图 7B、D 可知，组分 O 中含有丹酚酸 A、盐酸川芎嗪；由图 7C 可知，组分 O、P 中均含有丹酚酸 C；但组分 Q 中未发现上述有效的单体成分。综上，丹酚酸 C、丹酚酸 A、丹参素和盐酸川芎嗪可能是丹参川芎嗪注射液中抗脑缺血缺氧损伤的主要药效物质。

4 讨论

缺血性脑卒中、急性脑梗死等是临床多发的闭塞性脑血管疾病，是危害人类健康和生命最常见的疾病之一。世界范围内中风事件的发生次数，涉及到的患者以及由中风引起的死亡数量都在上升[16]，中国也不例外。有研究表明，2013 年中国中风的患病率按年龄标准化后为 1 114.8/10 万人，对比于三十年前的报道有显著增加，并在农村地区更为明显[17]。目前已有很多研究对脑卒中的发病机制进行了探究[18-19]，急性缺血性脑卒中是由缺血引起的一系列级联事件，包括多个复杂的神经化学过程，例如细胞能量的耗竭、氧化应激损伤、缺血后炎症以及最终引起的神经元、胶质细胞和内皮细胞的死亡[20]。长时间的缺血事件也会

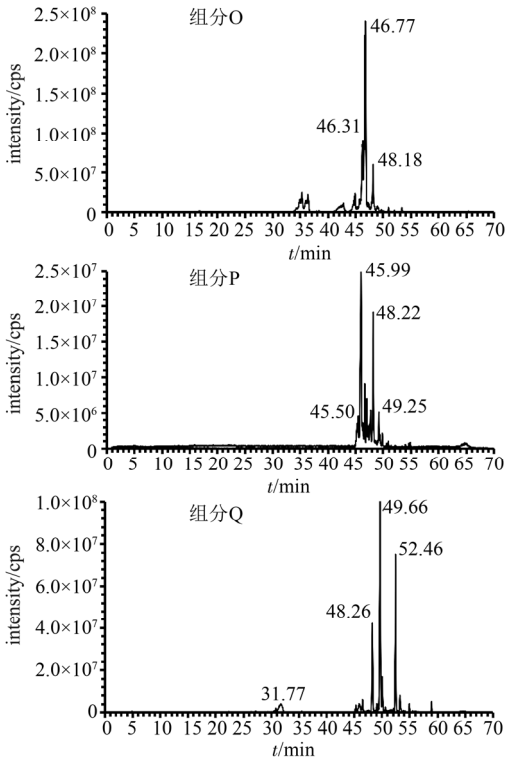

图 6 组分 O、P、Q 的总离子流图

Fig. 6 Total ion current chromatogram of composition Q, P, Q

引起神经细胞缺糖缺氧并对其造成不可逆的损伤，进而引发其他中枢系统疾病[21]。此外，也有研究表明，长时间缺血缺氧的小鼠在进行血流再灌注之后，其脑部遭受的损伤可能会超过最初由缺血引起的损伤[22]。因此缺血再灌注是脑卒中非常重要的一个病理过程，目前神经细胞 OGD/R 模型是公认的能模拟脑缺血缺氧损伤主要病理状态的体外评价模型[23]，已有多篇文献借助此模型成功地研究了药物抗脑缺血缺氧的作用及其机制[24-25]。人神经母瘤细胞 SH-SY5Y 是常用于该模型的细胞，因为其具有低分化、快速繁殖、与正常神经细胞在细胞形态和生理功能上有很多相似性等优点[26]。因此，本研究采用 SH-SY5Y 细胞构建 OGD/R 模型，以细胞活力为指标，评价丹参川芎嗪注射液抗脑缺血缺氧损伤的作用。

丹参川芎嗪注射液临床上治疗缺血性脑病的作用已经被很多文献报道，但关于其药效物质的研究却很少。前期的实验表明盐酸川芎嗪可在一定程度上通过改善大鼠海马神经元的受损程度来保护低压低氧环境下大鼠大脑的认知功能[27]。而本研究通过实验证明盐酸川芎嗪对缺血缺氧复氧损伤的神经细胞也有保护作用。丹参川芎嗪注射

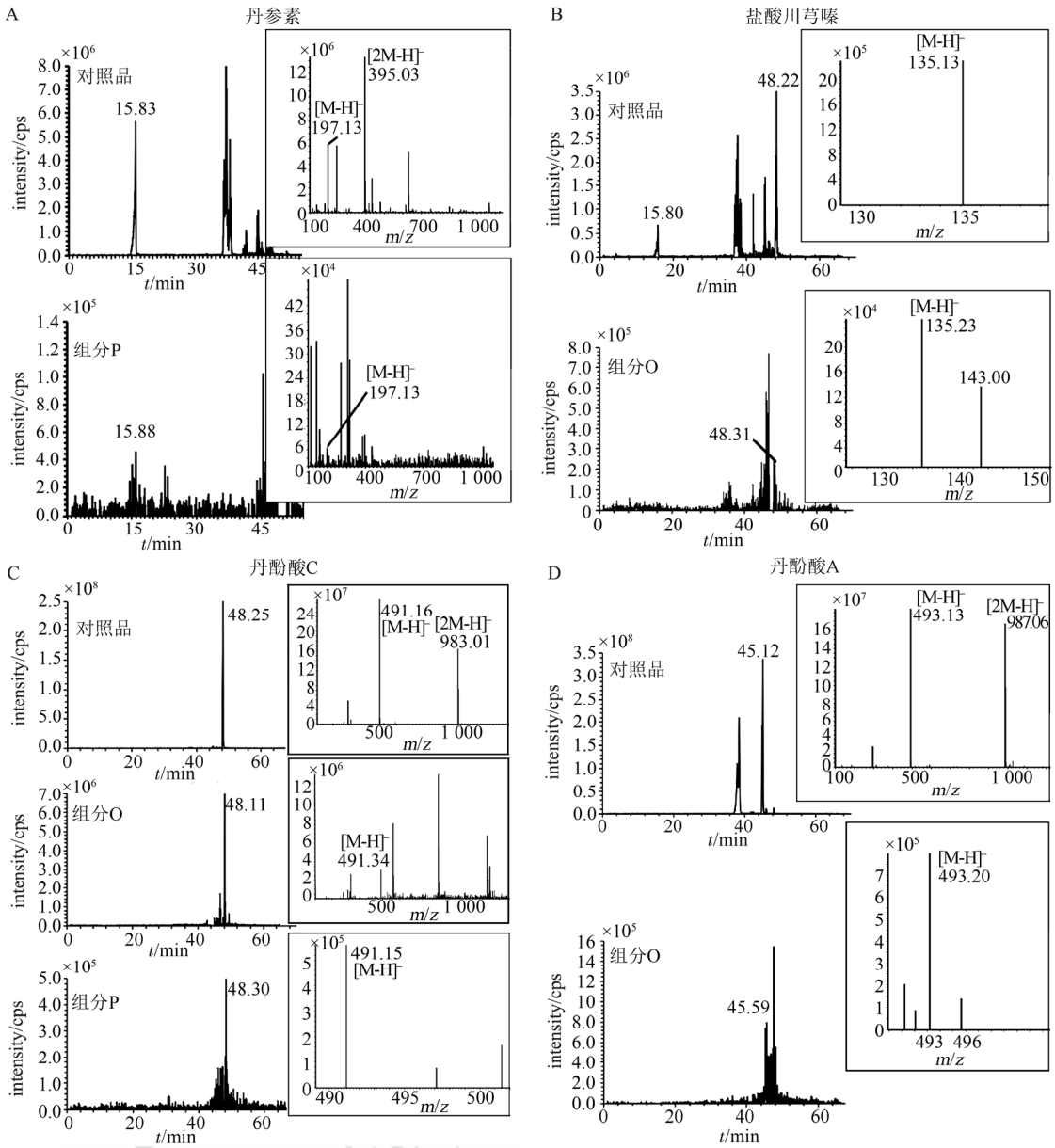

图 7　组分 O、P 的 LC-MS 分析

A–组分 P 中含有丹参素；B–组分 O 中含有盐酸川芎嗪；C–组分 O、P 中含有丹酚酸 C；D–组分 O 中含有丹酚酸 A。

Fig. 7　LC-MS analysis of component O and P

A–component P contains Danshensu; B–component O contains ligustrazine hydrochloride; C–component O and P contain salvianolic acid C; D–component O contains salvianolic acid A.

液中的酚酸类化合物是其主要的活性物质[28]。孙大伟等[29]通过 Langendorff 系统复制离体心肌缺血再灌注损伤模型，研究丹参素在治疗离体大鼠心脏缺血再灌注损伤中自噬相关的通路和靶点，发现丹参素可能是基于 Sirt1-FoxO1-Rab7 通路，调控自噬，抑制 ROS，改善心肌能量代谢，发挥心肌保护作用，从而治疗缺血再灌注损伤。宋俊科等[30]也通过实验发现丹酚酸 C 可以抑制 MPP^+诱发的 SH-SY5Y 细胞氧化应激及其介导的细胞凋亡。此外，也有相关研究通过线拴法构建大脑中动脉缺血再灌注、中脑动脉梗阻等动物模型验证了丹酚酸 A 对脑缺血后的细胞凋亡和神经损伤起到保护作用[31-32]。本研究通过 SH-SY5Y 细胞的 OGD/R 模型，证明了盐酸川芎嗪、丹参素、丹酚酸 C、丹酚酸 A 这 4 种单体成分可以显著地增加缺血缺氧/复氧损伤条件下 SH-SY5Y 细胞的细胞活力，与前期研究结果一致。

综上，本研究从注射液、组分、成分 3 个层面，考察了丹参川芎嗪注射液抗神经细胞缺血缺氧损伤作用，并采用 LC-MS 进一步对有效组分 I、

J、L、M、O、P 和 Q 中的成分进行定性分析，并对有效单体成分进行了归属。本研究结果显示，丹参川芎嗪注射液具有显著的抗脑缺血缺氧损伤的作用；而丹酚酸 C、丹酚酸 A、丹参素和盐酸川芎嗪可能是其抗脑缺血缺氧损伤的主要药效物质。

REFERENCES

[1] 王瑜. 丹参川芎嗪注射液的临床应用研究进展[J]. 天津药学, 2015, 27(4): 53-55.

[2] 李梦琼. 康恩贝并购贵州拜特动因及绩效分析[D]. 深圳: 深圳大学, 2017.

[3] SUN J H, LI X R. Rapid identification of chemical constituents in Danshen-chuanxiongqin injection by using UPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(15): 64-67.

[4] LI W, ZHONG S H, GUO L M, et al. Determination of tanshinone Ⅱ A and ligustrazine in Salvia Ligustrazine In-jection by HPLC [J]. China Med Her(中国医药导报), 2008, 5(34): 13-15.

[5] 余涛. 丹参川芎嗪注射液对冠心病患者血清细胞因子的影响[J]. 中国临床医师杂志, 2014, 42(11): 58-60.

[6] 汪伟, 吕清国. 丹参川芎嗪注射液对 TNFα 干预血管内皮细胞损伤 ET-1 和 ICAM-1 基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(22): 5006-5007.

[7] LIN X Y, BAI J E, WANG X N. Effects of Danshen Chuanxiongqin Injection for the indexes of hemorheology, blood coagulation and oxidative stress after treatment with hyperbaric oxygen in elderly patients with cerebral embolism [J]. China Med Her(中国医药导报), 2017, 14(30): 143-146, 75.

[8] 李丽. 丹参川芎嗪注射液对急性脑梗死患者神经功能及血液流变学的影响[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(2): 225-227.

[9] 魏文君. 川芎嗪对哮喘患者白介素-4、干扰素-γ 的影响及对 Th1/Th2 细胞因子平衡失调的干预作用[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(5): 743-745.

[10] CHEN Z, PAN X, GEORGAKILAS A G, et al. Tetramethylpyrazine(TMP) protects cerebral neurocytes and inhibits glioma by down regulating chemokine receptor CXCR4 expression [J]. Cancer letters, 2013, 336(2): 281-289.

[11] JIN C B. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of chuanxiong [J]. Chin Comm Doc(中国社区医师), 2017, 33(16): 8, 13.

[12] XU H, LIU W, LIU T, et al. Synergistic neuroprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(70): 115434-115443.

[13] WENG Y, LIN J, LIU H, et al. AMPK activation by Tanshinone IIA protects neuronal cells from oxygen-glucose deprivation [J]. Oncotarget, 2018, 9(4): 4511-4521.

[14] WANG X J, XU J X. Salvianic acid A protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP^+-induced cytotoxicity [J]. Neurosci Res, 2005, 51(2): 129-138.

[15] SHI X, YU W, YANG T, et al. Panax notoginseng saponins provide neuroprotection by regulating NgR1/RhoA/ROCK2 pathway expression, *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2016(190): 301-312.

[16] HANKEY G J. Stroke [J]. Lancet, 2017, 389(10069): 641-654.

[17] WANG W Z, JIANG B, SUN H X, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. Circulation, 2017, 135(8): 759.

[18] WANG J, CAO B, HAN D, et al. Long Non-coding RNA H19 induces cerebral ischemia reperfusion injury via activation of autophagy [J]. Aging Dis, 2017, 8(1): 71-84.

[19] KLEINSCHNITZ C, KRAFT P, DREYKLUFT A, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature [J]. Blood, 2013, 121(4): 679-691.

[20] BROUNS R, DE DEYN P P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2009, 111(6): 483-95.

[21] YAN J, SHEN N, YE Q, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 again PC-12 cells in OGD injury through mTOR/Akt/Fox03 signaling pathway [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(8): 1554-1559.

[22] OHSHIMA M, TSUJI M, TAGUCHI A, et al. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Exper Neurol, 2012, 233(1): 481-489.

[23] HARUKUNI I, BHARDWAJ A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia [J]. Neurol Clin, 2006, 24(1): 1-21.

[24] PARK S Y, CHOI Y W, PARK G. Nrf2-mediated neuroprotection against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by emodin via AMPK-dependent inhibition of GSK-3 beta [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(4): 525-535.

[25] LEE H J, LYU D H, KOO U, et al. Inhibitory effect of 2-arylbenzofurans from the mori cortex radicis (moraceae) on oxygen glucose deprivation(OGD)-induced cell death of SH-SY5Y cells [J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(8): 1373-1380.

[26] ZHOU Q B, JU X N, WANG X Y, et al. Pretreatment with baicalin attenuates hypoxia and glucose deprivation-induced injury in SH-SY5Y cells [J]. Chin J Integr Med(中国中西医结合杂志), 2016, 22(3): 201-206.

[27] LI X N, SUN L, JIN G E, et al. Influence of tetramethylpyrazine on the morphology and expression of GABAB1R and FOXP2 protein on the hypobaric hypoxia in hippocampus of rats [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2018, 33(3): 254-258.

[28] 袁园. 丹参川芎嗪注射液中丹参总酚酸的含量测定分析[J]. 中医研究, 2018, 31(11): 63-65.

[29] SUN D W, QI X, GAO Q. Research progress of autophagy regulated by tanshinol to reduce ischemia reperfusion injury [J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医), 2017, 37(5): 923-927.

[30] SONG J K, ZHANG W, ZHANG X, et al. Protective effect of salvianolic acid C against oxidative stress and apoptosis of SH-SY5Y cells injured by MPP^+ [J]. Chin J Pharm Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2018, 32(5): 392-399.

[31] PENG X, FANG S J, ZHENG L Y, et al. The protective effect of salvianolic acid A against apoptosis in middle cerebral artery ischemia reperfusion model and its mechanism [J]. J Wenzhou Med Univ(温州医科大学学报), 2017, 47(9): 674-677.

[32] 龚冬梅, 潘越, 胡筱箐, 等. 丹酚酸 A 对脑缺血再灌注后神经损伤的保护作用[C]. 浙江省药理学高峰论坛暨浙江省药理学会、浙江省药学会药理专业委员会 2017 年会. 杭州, 2017.

收稿日期：2019-03-11

(本文责编：沈倩)