

· 配伍 ·

丹参-葛根提取物对氧糖剥夺/复氧损伤人神经母细胞瘤 SH-SY5Y细胞的保护作用

车若梅, 涂舒欣, 贺晓丽*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 基于氧化应激和凋亡探究丹参-葛根提取物对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)损伤SH-SY5Y细胞的保护作用。方法: 采用水提法制备不同配伍比例丹参-葛根提取物, 体外培养人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞并建立OGD/R损伤模型, 采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法筛选最佳配伍比例提取物用于后续实验。将SH-SY5Y细胞分为空白组、OGD/R组和丹参-葛根(SP)提取物低、中、高剂量组(10、30、100 mg·L⁻¹), 除空白组外, 其余各组细胞在氧糖剥夺4 h后迅速复氧12 h进行OGD/R造模。采用CCK-8法检测细胞存活率, 显微条件下观察细胞形态, 分光光度计法检测乳酸脱氢酶(LDH)释放率、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量, 2, 7-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光探针法(DCFH-DA)检测细胞活性氧(ROS)水平, JC-1法检测线粒体膜电位, Hoechst 33342染色法观察细胞核形态, 流式细胞术结合异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染检测细胞凋亡。结果: 丹参-葛根2:1配伍时SH-SY5Y细胞的存活率最佳, 与空白组比较, OGD/R组细胞形态破损, 细胞上清液LDH释放率、细胞ROS水平和MDA含量显著升高($P<0.01$), SOD活性和GSH水平显著降低($P<0.01$), 线粒体膜电位下降, 细胞凋亡率升高($P<0.01$); 与OGD/R组比较, SP提取物各给药组可呈浓度依赖性地提高细胞存活率, 改善细胞形态, 降低细胞上清液LDH释放率($P<0.01$); SP提取物30、100 mg·L⁻¹组可明显降低细胞内ROS水平, 明显提高细胞中SOD活性和GSH水平($P<0.05$, $P<0.01$), 100 mg·L⁻¹可明显降低细胞内MDA含量($P<0.05$); 此外, 丹参-葛根提取物给药后可提高线粒体膜电位, 30、100 mg·L⁻¹可显著降低细胞凋亡率($P<0.01$)。结论: 丹参-葛根提取物2:1配伍对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞有较好的保护作用, 这可能与降低细胞氧化损伤, 抑制细胞凋亡相关。

[关键词] 缺血性脑卒中; 氧糖剥夺/复氧模型; 丹参-葛根药对; 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0024-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221109

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220411.1824.004.html>

[网络出版日期] 2022-04-12 17:40

Protective Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Puerariae Lobatae Radix* Extract on SH-SY5Y Cells Injured by Oxygen-glucose Deprivation/Reoxygenation

CHE Ruomei, TU Shuxin, HE Xiaoli*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Puerariae Lobatae Radix* (SP) extract on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-injured SH-SY5Y cells based on oxidative stress and apoptosis. **Method:** The extracts of the two medicinal materials mixed in different ratios were prepared. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured *in vitro* and the injury was induced by OGD/R. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the optimal ratio of the

[收稿日期] 2022-02-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473586)

[第一作者] 车若梅, 在读硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 2670393801@qq.com

[通信作者] *贺晓丽, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事神经药理学研究, E-mail: xlhe@implad.ac.cn

two medicinals and then the extract was used for further experiment. SH-SY5Y cells were classified into normal control group, OGD/R group, and low-, medium-, and high-dose SP (2:1) extract groups (10, 30, 100 mg·L⁻¹, respectively). Cells in the groups, except the normal control group, were rapidly reoxygenated for 12 h after 4 h OGD for modeling. Then cell viability was detected by CCK-8 and cell morphology was observed under the microscope. The release rate of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) activity, and content of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined by spectrophotometry. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected with 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and mitochondrial membrane potential with JC-1 assay. The nuclear morphology was observed based on Hoechst 33342 staining, and apoptosis was examined by flow cytometry combined with Annexin V-FITC/PI staining. **Result:** The viability of the cells was highest in the presence of the extract of the two medicinals mixed at the ratio of 2:1. Compared with normal control group, OGD/R group showed damaged cell morphology, high release rate of LDH and levels of ROS and MDA ($P<0.01$), low SOD activity and GSH level ($P<0.01$), low mitochondrial membrane potential, and high apoptosis rate ($P<0.01$). Compared with OGD/R group, SP extract improved cell viability and cell morphology and reduce cell LDH release rate in a concentration-dependent manner ($P<0.01$). In addition, SP extract at 30, 100 mg·L⁻¹ reduced the level of intracellular ROS and increased SOD activity and GSH level ($P<0.05$, $P<0.01$), and SP extract at 100 mg·L⁻¹ decreased the content of MDA ($P<0.05$). Moreover, SP extract increased mitochondrial membrane potential, and SP extract at 30, 100 mg·L⁻¹ lowered the apoptosis rate ($P<0.01$). **Conclusion:** The extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Radix Puerariae* mixed at 2:1 shows better protective effect on OGD/R-injured SH-SY5Y cells. The mechanism is the likelihood that it alleviates oxidative damage of cells and inhibits cell apoptosis.

[Keywords] ischemic stroke; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Puerariae Lobatae Radix*; oxidative stress; apoptosis

脑卒中是一种急性脑血管疾病,指由于脑部血管突然破裂或各种原因的血管阻塞而引起的脑组织损伤,主要包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中两大类。缺血性脑卒中占我国卒中总数的绝大部分,据最新统计,2019年我国约2 876万脑卒中病例中,约2 418万为缺血性脑卒中^[1],且缺血性脑卒中病理生理机制复杂,缺血再灌注后出现的线粒体功能障碍、氧化应激、钙超载、兴奋性毒性、细胞凋亡和炎症反应等相互作用^[2-3],导致更为严重的神经症状。随着我国人口老龄化进程的深入,脑血管疾病的发病率快速上升,因此,防治缺血性脑卒中意义重大。

中药丹参为唇形科植物丹参的干燥根和根茎,可活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈^[4],现代药理研究表明丹参具有抗凝血及抗血小板聚集、调血脂、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗动脉粥样硬化、降血压和免疫调节等作用^[5];中药葛根为豆科植物野葛的干燥根,可解肌退热,透疹,生津止渴,升阳止泻^[4],现代药理研究表明葛根具有血管舒张、心脏保护、神经保护、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、解酒保肝和减轻胰岛素抵抗作用^[6]。丹参-葛根药对记录于《施今墨对药》中,二者配伍使用,相互促进,可活血化痰、

祛瘀生新^[7]。目前丹参-葛根药对的研究主要集中在心肌缺血^[8]、动脉粥样硬化^[9]、高脂血症^[10]和糖尿病^[11]等方面,而对于脑缺血方面的研究仅有的文献报道丹参-葛根配伍能够通过上调血管内皮生长因子(VEGF)表达减轻缺血再灌注损伤大鼠脑梗死灶面积^[12],因此,有必要进一步明确丹参-葛根药对对缺血性脑卒中的作用及机制。本课题组前期从自由基清除、氧化还原和脂质过氧化3个角度对丹参-葛根药对提取物的体外抗氧化活性进行了评估,发现丹参-葛根提取物具有良好的抗氧化活性,而氧化应激作为缺血再灌注损伤的关键环节,可引发缺血再灌注后的一系列病理生理事件,包括炎症反应、血脑屏障破坏、细胞凋亡和自噬等,丹参-葛根提取物能否在缺血性脑卒中的发生发展中起到保护作用值得深入研究。因此,本实验选用缺血性脑卒中研究中公认的氧糖剥夺/复氧损伤模型,从氧化应激和凋亡2个角度进一步研究丹参-葛根对氧糖剥夺/复氧损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用,并阐述可能的机制。

1 材料

1.1 细胞 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中

国医学科学院基础研究所(1101HUM-PUMC000026),在本实验室进行培养。

1.2 药品及试剂 丹参饮片[中国北京同仁堂(集团)有限责任公司,产地山东,批号200114003];葛根饮片[中国北京同仁堂(集团)有限责任公司,产地河北,批号181112302];胎牛血清(FBS)、DMEM无糖培养基(美国Gibco公司,批号分别为16000-044、2192829);DMEM/F12培养基、青霉素链霉素混合液、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Hyclone公司,批号分别为AG29749915、J200044、AG29741569);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(碧云天生物科技有限公司,批号分别为C0038、042821211101、071521211013、093020201026、080521211116、051821211012);DCFH-DA活性氧(ROS)荧光探针、Hoechst 33342荧光染料、异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为20210911、20211011、20210929)。

1.3 仪器 HERACELL 150i型二氧化碳培养箱、SORVALL ST-16R型台式高速低温冷冻离心机(美国Thermo公司);Infinite M1000型酶标仪(瑞士Tecan公司);EVOS FL型荧光显微镜(美国Life公司);Eclipse Ts2R型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);TYPE III型厌氧手套培养箱(美国COY公司);FD-1A-50型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);BD FACS Aria II型分选型流式细胞仪(美国BD公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 SH-SY5Y细胞复苏后,用DMEM/F12完全培养基(DMEM/F12培养基+10% FBS+100 U·mL⁻¹青霉素链霉素混合液)于5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养,镜下观察细胞为细长梭形,待细胞单层贴壁生长至90%时,弃去原培养液,加入PBS清洗2次,加入胰蛋白酶1 mL消化,镜下观察细胞触角消失、皱缩变圆,立即加入完全培养基2 mL终止消化,收集细胞悬液至离心管,1 500 r·min⁻¹离心5 min(离心半径11 cm,下同),弃去培养液,加入新鲜完全培养基重悬后按照1:5进行传代,3代后取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 丹参-葛根提取物的制备 按照丹参-葛根1:0、1:4、1:2、1:1、2:1、4:1和0:1称取适量丹参-葛

根药材,剪碎成小块,加入10倍量水浸泡60 min,冷凝回流提取60 min,稍冷却后收集滤液,剩余药渣加入8倍量水再次回流提取60 min,合并2次滤液,减压抽滤,滤液于-40℃过夜预冻,后置于冷冻干燥机冻干(丹参提取物收率为38.13%,葛根提取物收率29.4%,丹参-葛根1:4提取物收率43.37%,丹参-葛根1:2提取物收率34.07%,丹参-葛根1:1提取物收率44.63%,丹参-葛根2:1提取物收率51.86%,丹参-葛根4:1提取物收率45.43%)。使用时称量适量丹参-葛根冻干粉溶于DMEM/F12培养基中,用孔径为0.22 μm针式过滤器过滤,细胞实验给药浓度按生药量计算。

2.3 CCK-8法检测不同比例丹参-葛根提取物对正常SH-SY5Y细胞的作用 取对数生长期的SH-SY5Y细胞,PBS清洗胰酶消化后,离心重悬,稀释成6.5×10⁴个/mL的单细胞悬液,以每孔200 μL接种至96孔板。于5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养24 h后弃去上清,分别加入不同浓度的丹参-葛根提取物。药物处理4 h后弃去上清,换为100 μL DMEM/F12培养基,每孔加入CCK-8溶液10 μL,培养2 h后,450 nm处测定吸光度A,计算细胞活力值。细胞活力值=[(给药组A-空白组A)/(容积组A-空白组A)]×100%。

2.4 CCK-8法检测不同比例丹参-葛根提取物对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞存活率的影响 细胞培养24 h后,弃去上清,空白组每孔加DMEM/F12培养基200 μL,OGD/R组每孔加入DMEM无糖培养基200 μL,分别置于厌氧手套培养箱缺氧培养1、2、4 h,缺氧相应时间后取出细胞,将无糖培养基换为DMEM/F12培养基并置于正常培养箱继续培养12 h,计算细胞活力值,确定OGD/R损伤细胞时间。

OGD/R损伤细胞时间确定后,进行后续实验。细胞培养24 h后,弃去上清,空白组加入DMEM/F12培养基200 μL,于正常培养箱培养;OGD/R组加入DMEM无糖培养基200 μL,给药组分别加入含有30、100 mg·L⁻¹丹参-葛根提取物的无糖培养基200 μL,均于厌氧手套培养箱缺氧4 h。厌氧培养4 h后换为200 μL DMEM/F12培养基,于正常培养箱培养12 h后,弃去原培养基,换为100 μL DMEM/F12培养基,每孔加入CCK-8溶液10 μL,培养2 h后,450 nm处测定A,计算细胞活力值,筛选丹参-葛根提取物的最佳配伍比例。

确定丹参-葛根提取物的最佳配伍比例后,加入最佳配伍提取物使终质量浓度分别为10、30、

100 mg·L⁻¹的无糖培养基,按上述方法操作,计算细胞活力值。

2.5 显微镜下观察 SH-SY5Y 细胞形态 常规处理细胞,以每孔 400 μL 接种到 48 孔板中。分为空白组、OGD/R 损伤组,SP 提取物 10、30、100 mg·L⁻¹组,按照 2.4 项下方法处理,12 h 后,吸去培养基,换为 PBS,显微条件下拍照观察。

2.6 LDH 释放、GSH 含量、SOD 活性和 MDA 水平测定 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,PBS 清洗胰酶消化后,离心重悬,稀释成 1.3×10⁵个/mL 的单细胞悬液,以每孔 2 mL 接种至 6 孔板,给药处理后,按照试剂盒说明书分别测定细胞上清液 LDH 释放率及细胞中 GSH 含量、SOD 活性和 MDA 水平。LDH 释放率(%)=[(各组 A-空白组 A)/(样品最大酶活性对照 A-空白组 A)]×100%。

2.7 ROS 生成检测 常规处理细胞,OGD/R12 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,每孔装载浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 DCFH-DA 探针 200 μL,放于 37 °C 孵育 40 min,用无血清培养基洗涤 3 次,加入 Hoechst 33342 染色液 200 μL 标记细胞核,37 °C 孵育 15 min,PBS 洗涤 3 次后,加入无血清培养基 200 μL,荧光显微镜下观察并拍照,使用 Image J 软件分析荧光强度。

2.8 JC-1 法检测线粒体膜电位 常规处理细胞,OGD/R 12 h 后,PBS 洗涤细胞 2 次,每孔加入 JC-1 染色工作液 200 μL,充分混匀,37 °C 孵育 20 min,JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后,加入无血清培养基 200 μL,荧光显微镜下观察并拍照。

2.9 Hoechst 33324 法检测细胞凋亡 常规处理细胞,OGD/R 12 h 后,PBS 清洗细胞 2 次,加入 10 mg·L⁻¹ Hoechst 33342 染色液 200 μL,37 °C 孵育 15 min,PBS 洗涤 3 次后,加入无血清培养基 200 μL,荧光显微镜下观察并拍照。

2.10 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡 常规处理细胞,OGD/R 12 h 后,PBS 清洗胰酶消化收集细胞,使用预冷 PBS 清洗 1 次,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,加入结合液重悬细胞 1 mL,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,使用结合液重悬细胞使密度达到 1×10⁶个/mL,每管加入细胞 100 μL,加入 Annexin V-FITC 5 μL,10 min 后加入 PI 5 μL,5 min 后加入 PBS 400 μL,随后使用流式细胞仪测定。

2.11 统计学分析 采用 SPSS 25 软件分析数据,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均值使用单因素方差分析,组间多重比较使用最小显著性差异法(LSD), $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同配伍比例、质量浓度丹参-葛根提取物对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响 不同比例丹参-葛根提取物处理细胞 4 h 后,与空白组比较,各给药组细胞存活率差异无统计学意义,表明丹参-葛根提取物在 30、100 mg·L⁻¹ 质量浓度范围内对正常 SH-SY5Y 细胞无增值抑制作用,可进行后续细胞实验。见表 1。

表 1 不同配伍比例丹参-葛根提取物对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different compatibility ratios of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Puerariae Lobatae Radix extract (SPE) on SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
丹参提取物组	30	97.52±3.11
葛根提取物组	30	102.08±1.65
丹参-葛根 1:4 提取物组	30	102.32±4.08
丹参-葛根 1:2 提取物组	30	100.55±1.45
丹参-葛根 1:1 提取物组	30	96.08±4.18
丹参-葛根 2:1 提取物组	30	101.03±4.89
丹参-葛根 4:1 提取物组	30	97.98±2.10

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
丹参提取物组	100	99.01±3.38
葛根提取物组	100	99.69±1.20
丹参-葛根 1:4 提取物组	100	102.10±1.26
丹参-葛根 1:2 提取物组	100	100.32±0.96
丹参-葛根 1:1 提取物组	100	96.60±0.66
丹参-葛根 2:1 提取物组	100	99.25±1.31
丹参-葛根 4:1 提取物组	100	96.87±1.61

3.2 不同配伍比例丹参-葛根提取物对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞的影响 在进行丹参-葛根提取物对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 药效实验之前,首先对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞的缺氧时间进行探索,使其对细胞的损伤率达到 40%~60%,确定为合适的缺氧条件。随着缺氧时间延长,SH-SY5Y 细胞活力值降低,在缺氧 4 h 时细胞存活率约为 57%,且损伤较稳定,故选取缺氧 4 h 复氧 12 h 作为氧糖剥夺复氧模型条件,进行后续药效实验。与 OGD/R 组比较,不同比例丹参-葛根提取物组细胞存活率均有明显提高,在 30、100 mg·L⁻¹ 质量浓度下均具有明显差异 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中丹参-葛根配伍比例为 2:1

时, OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞的存活率最高, 在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下达到 84.04%, 故选取丹参-葛根 2:1 配伍比例得到的提取物进行后续实验。见表 2 和表 3。

表 2 不同缺氧时间处理后 SH-SY5Y 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Survival rate of SH-SY5Y cells after different hours of hypoxia treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	缺氧时间/h	细胞存活率/%
空白组	0	100.00±0.00
OGD/R 组	1	82.97±15.44
OGD/R 组	2	77.01±10.55 ¹⁾
OGD/R 组	4	57.42±1.19 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

3.3 丹参-葛根 2:1 提取物(简称 2:1 SPE)对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞的作用 与 OGD/R 组比较, 2:1 SPE $10 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞存活率明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且呈现一定的剂量依赖性, 故选用 2:1 SPE $10, 30, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续实验。见表 4。

3.4 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞形态的影响 空白组细胞形态正常, 大部分细胞呈现细长梭形; OGD/R 组细胞皱缩, 数量明显减少, 形态破碎不完整; 给药 2:1 SPE 后, 细胞数量增多, 随着给药浓度的升高细胞形态逐渐趋于正常。见图 1。

3.5 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放的影响 与空白组比较, OGD/R 组细胞上清液中 LDH 释放率显著升高 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组比较, 2:1 SPE 各给药组 LDH 释放率呈剂量依赖性下降 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.6 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞 ROS 的影响 空白组细胞绿色荧光弱, 与空白组比较, OGD/R 组细胞呈明亮绿色荧光, 提示 ROS 堆积增多 ($P < 0.01$); 给药 2:1 SPE 后, 绿色荧光减弱, 随着给药浓度的升高绿色荧光强度降低, 2:1 SPE $30, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显降低细胞的荧光强度 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6、图 2。

表 3 不同配伍比例丹参-葛根提取物对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of different compatibility ratios of SPE on OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

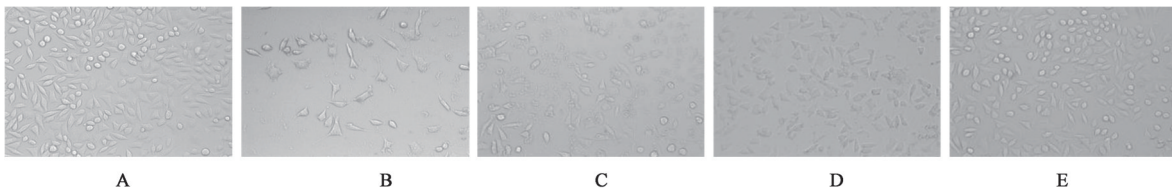
组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
OGD/R 组		56.46±7.57 ¹⁾
丹参提取物组	30	64.22±8.98 ³⁾
葛根提取物组	30	62.40±4.11 ²⁾
丹参-葛根 1:4 提取物组	30	66.40±4.67 ³⁾
丹参-葛根 1:2 提取物组	30	69.48±3.87 ³⁾
丹参-葛根 1:1 提取物组	30	69.13±0.61 ³⁾
丹参-葛根 2:1 提取物组	30	74.74±4.93 ³⁾
丹参-葛根 4:1 提取物组	30	68.72±12.16 ³⁾

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
OGD/R 组		53.19±9.00 ¹⁾
丹参提取物组	100	75.02±7.25 ³⁾
葛根提取物组	100	69.08±7.29 ²⁾
丹参-葛根 1:4 提取物组	100	74.27±2.02 ²⁾
丹参-葛根 1:2 提取物组	100	76.66±6.61 ³⁾
丹参-葛根 1:1 提取物组	100	77.32±3.44 ³⁾
丹参-葛根 2:1 提取物组	100	84.04±8.53 ³⁾
丹参-葛根 4:1 提取物组	100	76.64±5.82 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4-表 8 同)

表 4 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞的作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Effect of 2:1 SPE on OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.00
OGD/R 组		51.07±1.14 ¹⁾
2:1 SPE 组	3	51.06±2.19
	10	66.22±3.44 ²⁾
	30	71.70±2.26 ³⁾
	100	78.53±2.91 ³⁾
	300	88.38±5.09 ³⁾



注:A.空白组;B.OGD/R组;C.SP $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D.SP $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;E.SP $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2-图 4 同)

图 1 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞形态的影响(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of 2:1 SPE on morphology of OGD/R injured SH-SY5Y cells (inverted microscope, $\times 200$)

表5 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞LDH释放的作用 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of 2:1 SPE on LDH release from OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH释放率/%
空白组		1.70±0.23
OGD/R组		4.53±0.32 ¹⁾
2:1 SPE组	10	2.92±0.16 ³⁾
	30	2.58±0.47 ³⁾
	100	2.18±0.12 ³⁾

表6 2:1 SPE对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞ROS的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of 2:1 SPE on ROS level in OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS/%
空白组		100.00±0.00
OGD/R组		274.84±12.21 ¹⁾
2:1 SPE组	10	237.73±51.16
	30	213.15±21.78 ²⁾
	100	117.19±6.26 ³⁾

3.7 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞抗氧化能力的影响 与空白组比较,OGD/R组细胞中SOD活性和GSH含量显著降低($P<0.01$),MDA水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与OGD/R组比较,给药2:1 SPE后,30、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 可明显提高细

胞SOD活性($P<0.05$)和GSH含量($P<0.01$),100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 可明显降低MDA含量,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表7。

表7 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞抗氧化能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of 2:1 SPE on antioxidant capacity of OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白组		13.38±1.25	11.74±0.10	1.31±0.53
OGD/R组		6.74±0.89 ¹⁾	5.66±0.09 ¹⁾	3.23±0.40 ¹⁾
2:1 SPE组	10	8.50±2.46	6.01±0.07	2.51±0.79
	30	9.63±1.68 ²⁾	8.34±0.52 ³⁾	2.30±0.80
	100	9.56±1.11 ²⁾	10.01±0.17 ³⁾	1.72±0.63 ²⁾

3.8 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件,在线粒体膜电位较高时,JC-1聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集在线粒体的基质中,此时JC-1为单体,可以产生绿色荧光。与空白组比较,OGD/R组绿色荧光强度升高,红色荧光强度降低,提示线粒体膜电位下降;与OGD/R组比较,SH-SY5Y细胞给药2:1 SPE后,绿色荧光强度有所降低,红色荧光增强。见图3。

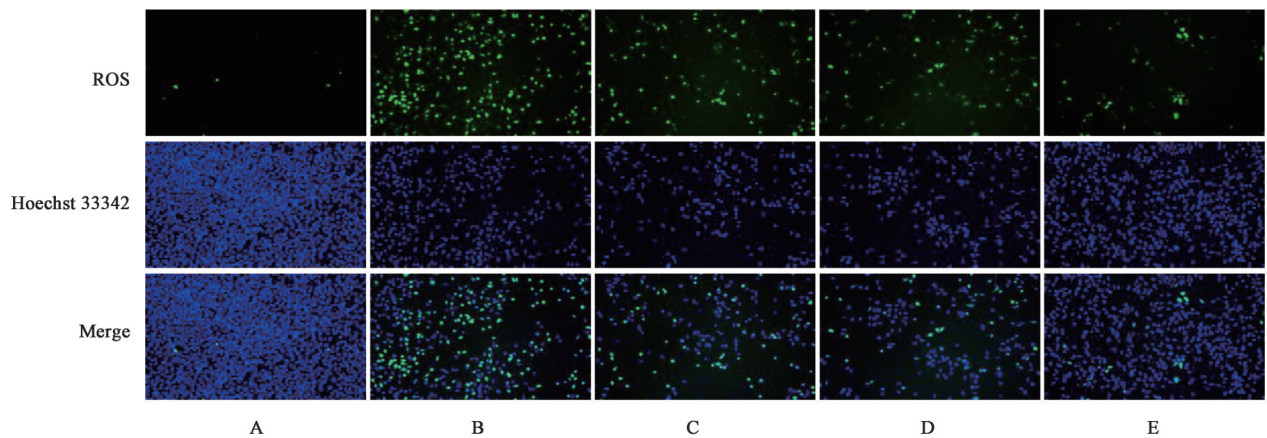


图2 2:1 SPE对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞ROS的影响(DCFH-DA荧光探针,×40)

Fig. 2 Effect of 2:1 SPE on ROS level in OGD/R injured SH-SY5Y cells (DCFH-DA fluorescent probe, ×40)

3.9 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞核形态的影响 Hoechst 33342可以穿透细胞膜,染色后凋亡细胞荧光会比正常细胞明显增强。Hoechst 33342染色后,空白组细胞核染色呈正常蓝色,OGD/R损伤后部分细胞核出现固缩,呈现为致密浓染,颜色呈亮蓝色,提示细胞进入凋亡状态;给药

2:1 SPE后,细胞核固缩数量有所减少,呈现均匀低强度蓝色荧光的细胞数量增多,随着给药浓度的升高细胞核形态趋于正常,2:1 SPE 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组效果最好。见图4。

3.10 2:1 SPE对OGD/R损伤SH-SY5Y细胞凋亡的影响 Annexin V能与细胞凋亡过程中翻转到膜

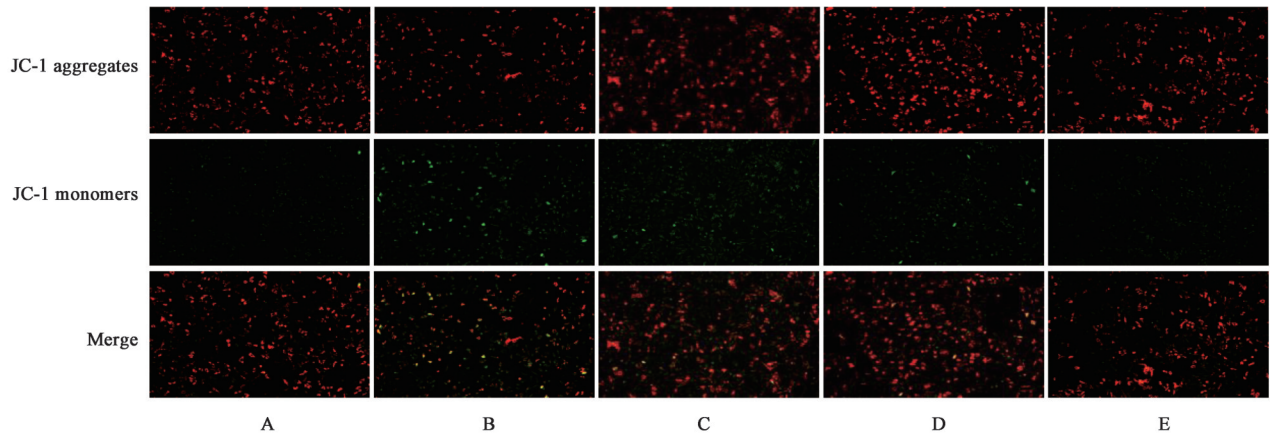


图3 2:1 SPE对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响(JC-1, ×40)

Fig. 3 Effect of 2:1 SPE on mitochondrial membrane potential of OGD/R injured SH-SY5Y cells (JC-1, ×40)

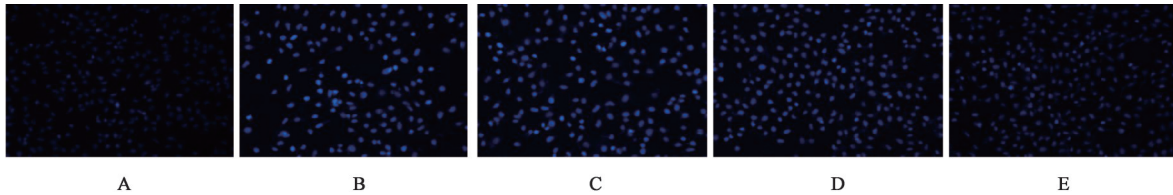


图4 2:1 SPE对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞核形态的影响(Hoechst 33342, ×200)

Fig. 4 Effect of 2:1 SPE on nuclear morphology of OGD/R injured SH-SY5Y cells (Hoechst 33342, ×200)

外的磷脂酰丝氨酸高亲和力特异结合,用荧光探针 FITC 结合 Annexin V 能够区分凋亡细胞和正常细胞,PI 可以穿透细胞膜破损的凋亡晚期细胞和死细胞, FITC-Annexin V 与 PI 联合使用可区分早期凋亡和晚期凋亡细胞。OGD/R 后,SH-SY5Y 细胞凋亡率有显著升高 ($P < 0.01$),早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞数量明显增多,给药 2:1 SPE 30 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后可显著降低细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。见表 8。

表 8 2:1 SPE 对 OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Effect of 2:1 SPE on apoptosis rate of OGD/R injured SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白组		3.10 ± 0.10
OGD/R 组		$20.57 \pm 0.96^{1)}$
2:1 SPE 组	10	19.17 ± 1.26
	30	$17.73 \pm 0.32^{3)}$
	100	$9.37 \pm 0.31^{3)}$

4 讨论

缺血性脑卒中发病机制复杂,氧化应激和细胞凋亡是缺血性脑卒中病理生理学中密切相关的两部分,自由基损伤和氧化应激是缺血再灌注损伤的关键环节并参与了损伤级联反应的每个步骤^[13-14],抑制细胞凋亡是缺血性脑卒中治疗中的神经保护

策略之一^[15-18],因此,针对氧化应激及细胞凋亡治疗,可能对减轻脑缺血再灌注损伤起到关键作用。SH-SY5Y 细胞在形态和生理功能等方面与正常神经元具有相似性,被广泛用于神经系统疾病药物作用的研究。氧糖剥夺/复氧模型能最大程度模拟缺血性脑卒中病理生理情况下的细胞状态,是缺血性脑卒中研究的经典细胞模型。本文建立 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞模型,初步探讨丹参-葛根提取物对缺血性脑卒中的保护作用。

中药药对是在药性和长期遣方用药过程中,医家逐渐积累经验而来的精妙应用形式^[19],由 2 味药成对相配,起到协同增效或减毒的作用。丹参-葛根作为药对使用记录于《施今墨对药》,但书中并未提到二者配伍比例如何。因此,选取了两首含有丹参-葛根的最小药味数的方剂,分别为收录于《卫生部药品标准》中药成方制剂第四册(1991)中的通脉颗粒和《中药方剂现代研究大典》(1996)中丹参-葛根元胡片,选用其中丹参-葛根的配伍比例 1:1 和 2:1,并选取反比例 1:2 及扩大比例至丹参-葛根 1:4 和 4:1,结合单独的丹参组和葛根组,对不同配伍比例得到的丹参-葛根提取物对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用进行比较,实验结果显示在 30 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药时,2:1 SPE 较单独丹参、葛根提取物及其他比例提取物组均有更好的保护作用,初步

确定了丹参-葛根的配伍比例。李媛等^[20]、赵玉华等^[21]分别报道了丹参-葛根不同比例配伍和单煎共煎等会影响丹参-葛根有效成分的溶出率,而结合本实验提取物冻干粉得率,不同配比中丹参-葛根2:1配伍组收率最高,可能由于此时丹参-葛根提取物有效成分的相对溶出率较高,从而对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞起到更好的保护作用,这表明不同配伍比例的丹参-葛根中不同化学成分的配伍变化规律有所不同,且可能与较优配比有关。下一步应从提取物的化学成分角度对丹参-葛根的最佳配伍比例关系进行探讨,以期对丹参-葛根药对的最佳配伍比例的确定提供更全面详实的实验依据。

进一步研究发现,2:1 SPE在不影响细胞存活率的前提下可提高OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞存活率,这可能与降低细胞氧化损伤和抑制细胞凋亡相关。LDH是胞浆内的乳酸脱氢酶,当细胞受到缺氧复氧损伤时,细胞膜受损,导致胞浆内的LDH释放,因此LDH的释放量与细胞受损程度相关,可作为细胞毒性评价指标^[22],而本实验结果显示OGD/R损伤SH-SY5Y细胞后,2:1 SPE给药可抑制LDH的释放,保护细胞膜完整性。而脑缺血后持续的氧化应激导致细胞代谢副产物ROS堆积,此时在正常生理状态下机体维持氧化-抗氧化系统平衡的内源性抗氧化剂SOD和GSH等不足以清除ROS,进而氧化细胞大分子如核酸、蛋白质和脂质等^[23-24],加剧机体损伤。由此本研究进行了氧化应激相关指标的检测,实验结果显示,OGD/R损伤后,ROS大量生成,抗氧化物质SOD及GSH等被大量消耗,持续生成的活性氧自由基作用于脂质发生过氧化反应生成MDA,加剧细胞膜损伤,而2:1 SPE给药可降低细胞内ROS含量,提高以ROS为底物的抗氧化酶SOD活力和抗氧化物质GSH含量,降低脂质过氧化产物MDA水平,初步验证了SP提取物降低细胞氧化损伤的作用。过量堆积的ROS可攻击线粒体造成线粒体渗透性转换孔开放,致使线粒体膜电位下降^[25],并促使细胞色素C和凋亡诱导因子等凋亡蛋白释放到细胞质中,进而导致内源性细胞凋亡^[26];而显微镜下可观察到凋亡细胞形态学表现为细胞皱缩变圆、遗传物质聚集碎裂、胞膜空泡化、核固缩碎裂、凋亡小体形成等^[27]。因此进一步对细胞凋亡指标检测,结果显示2:1 SPE给药后能够提高OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞的线粒体膜电位,并改善Hoechst 33342染色后细胞核固缩的形态,同时减少Annexin V-FITC/PI双染呈早期凋亡和晚期凋

亡细胞的数量,提示2:1 SPE具有良好的抗凋亡作用,进一步证明了2:1 SPE对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用。综上所述,丹参-葛根药对对OGD/R损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用是通过抗氧化及抑制细胞凋亡实现的,具体的靶点有待进一步明确。

丹参和葛根是我国常用的传统中药,二者配伍,相使为用,活血化瘀。现代药理研究表明丹参-葛根药对在舒张脑血管^[28]、改善模型大鼠糖尿病眼病^[29]和调节免疫^[30]等方面具有协同作用,因此,丹参-葛根药对具有广泛的应用前景。近年来,研究人员围绕丹参和葛根的指标性成分对缺血性脑卒中的作用进行了深入细致的研究,丹参中主要脂溶性成分丹参酮类丹参酮Ⅱ_A^[31]、隐丹参酮^[32]、丹参酮Ⅰ^[33]和水溶性成分丹酚酸类丹酚酸B^[34]均可发挥神经保护作用;葛根的主要异黄酮类成分葛根素也可通过抗氧化应激^[35]、抑制自噬^[36]、抗炎^[37]等对脑缺血再灌注损伤产生保护作用,因此推测丹参-葛根药对保护缺血性脑卒中中具有巨大潜力。此外,这些成分也是丹参-葛根药对成分研究^[38-39]中定性定量分析的主要成分,这些成分之间有可能相互作用,其相互作用的特点和机制是揭示药对配伍机制研究的重要内容,需要进一步探讨。

目前丹参-葛根药对在保护缺血性脑卒中方面的研究较少,而本实验发现丹参-葛根对OGD/R损伤神经细胞具有保护作用且最佳的配伍比例为2:1,可降低OGD/R对神经细胞的损伤,改善细胞氧化损伤,并降低细胞凋亡,与CHIU等^[40]报道的丹参-葛根可抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡一致,为丹参-葛根药对保护缺血性脑卒中的研究提供了依据,在后续实验中,应继续对其机制进行探索,并结合经典动物模型,进一步探讨丹参-葛根药对对缺血性脑卒中的保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MA Q, LI R, WANG L, et al. Temporal trend and attributable risk factors of stroke burden in China, 1990-2019: An analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Public Health, 2021, 6(12):e897-e906.
- [2] ZHOU Z, LU J, LIU W W, et al. Advances in stroke pharmacology[J]. Pharmacol Ther, 2018, 191:23-42.
- [3] JURCAU A, ARDELEAN I A. Molecular pathophysiological mechanisms of ischemia/

- reperfusion injuries after recanalization therapy for acute ischemic stroke[J]. *J Integr Neurosci*, 2021, 20(3):727-744.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [5] 万新焕,王瑜亮,周长征,等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(3):788-798.
- [6] ZHOU Y X, ZHANG H, PENG C. Puerarin: A review of pharmacological effects[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7):961-975.
- [7] 吕景山. 施今墨对药[M]. 北京:人民军医出版社, 2013.
- [8] CHIU P Y, WONG S M, LEUNG H Y, et al. Acute treatment with Danshen-Gegen decoction protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury via the redox-sensitive PKC ϵ /mK(ATP) pathway in rats[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(11):916-925.
- [9] KOON C M, WOO K S, LEUNG P C, et al. Salvia Miltiorrhizae Radix and Puerariae Lobatae Radix herbal formula mediates anti-atherosclerosis by modulating key atherogenic events both in vascular smooth muscle cells and endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1):175-183.
- [10] CHEUNG D W, KOON C M, WONG P H, et al. Evaluating efficacy and safety of combination medication of atorvastatin and a herbal formula containing salvia miltiorrhiza and pueraria lobata on hyperlipidemia[J]. *Phytother Res*, 2017, 31(10):1579-1589.
- [11] ZHAO W, YUAN Y, ZHAO H, et al. Aqueous extract of Salvia miltiorrhiza Bunge-Radix Puerariae herb pair ameliorates diabetic vascular injury by inhibiting oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 129:97-107.
- [12] 马和硕,吕杰,刘森,等. 葛根增效丹参在脑缺血再灌注中的保护作用研究[J]. *西南医科大学学报*, 2019, 42(6):523-526.
- [13] JURCAU A, ARDELEAN I A. Molecular pathophysiological mechanisms of ischemia/reperfusion injuries after recanalization therapy for acute ischemic stroke[J]. *J Integr Neurosci*, 2021, 20(3):727-744.
- [14] SHI H, LIU K J. Cerebral tissue oxygenation and oxidative brain injury during ischemia and reperfusion [J]. *Front Biosci*, 2007, 12:1318-1328.
- [15] UZDENSKEY A B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(9/10):687-702.
- [16] BROUGHTON B R, REUTENS D C, SOBEY C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40(5):e331-e339.
- [17] 吴旦,郑亚纯,丁楠,等. 银杏与三七制剂在治疗缺血性脑血管疾病中的异同[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(13):3063-3072.
- [18] 陈孝男,杨爱琳,赵亚楠,等. 缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3):422-432.
- [19] 王胜鹏,陈美婉,王一涛. 中药药对的系统研究(I)——理论与物质基础研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(2):1317-1321.
- [20] 李媛,池加美. 丹参-葛根药对中7种成分的含量测定及其配伍影响考察[J]. *中国药师*, 2021, 24(12):2280-2283.
- [21] 赵玉华,崔晓娟,樊萍,等. 丹参葛根对药不同提取方法薄层特征比较研究[J]. *中医临床杂志*, 2011, 23(10):900-901.
- [22] MENG X, CHU G, YANG Z, et al. Metformin protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by down-regulating MAD2B [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4):477-485.
- [23] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66:75-87.
- [24] FINKEL T. Signal transduction by reactive oxygen species[J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(1):7-15.
- [25] CHEN L, XU B, LIU L, et al. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(5):624-632.
- [26] COIMBRA-COSTA D, ALVA N, DURAN M, et al. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain [J]. *Redox Biol*, 2017, 12:216-225.
- [27] XU X, LAI Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1):BSR20180992.
- [28] DENG Y, NG E S, KWAN Y W, et al. Cerebral vasodilator properties of Danshen and Gegen: A study of their combined efficacy and mechanisms of actions [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4):391-399.
- [29] 唐洪梅,柴玉娜,涂星,等. 丹参联合葛根对糖尿病眼病模型大鼠的协同作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(11):977-980.
- [30] 孟祥博. 基于微量热学的丹参、葛根对脾淋巴细胞的

- 协同作用及相关机制研究[D]. 锦州:锦州医科大学, 2019.
- [31] LIU L, ZHANG X, WANG L, et al. The neuroprotective effects of tanshinone II_A are associated with induced nuclear translocation of TORC1 and upregulated expression of TORC1, pCREB and BDNF in the acute stage of ischemic stroke[J]. *Brain Res Bull*, 2010, 82(3/4):228-233.
- [32] ZHU F, CHEN H, XU M, et al. Cryptotanshinone possesses therapeutic effects on ischaemic stroke through regulating STAT5 in a rat model [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1):465-471.
- [33] PARK J H, PARK O, CHO J H, et al. Anti-inflammatory effect of tanshinone I in neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in the gerbil hippocampus[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7):1300-1312.
- [34] LV H, WANG L, SHEN J, et al. Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats [J]. *Brain Res Bull*, 2015, 115:30-36.
- [35] 陈博新,刘义楠,李洪岩,等. 葛根素通过抗氧化应激对缺血性脑损伤小鼠的神经保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(11):1355-1357, 1362.
- [36] WANG J F, MEI Z G, FU Y, et al. Puerarin protects rat brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(6):989-998.
- [37] 巫朝银,陈桐楷,王奇. 葛根素制剂的研究进展[J]. *世界中医药*, 2020, 15(14):2188-2192.
- [38] 李燕燕. 葛根丹参药对有效成分提取分离及其胶囊制剂的研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2008.
- [39] CHANG Q, SUN L, ZHAO R H, et al. Simultaneous determination of ten active components in traditional Chinese medicinal products containing both Gegen (*Pueraria lobata*) and Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) by high-performance liquid chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2008, 19(4):368-375.
- [40] CHIU P Y, LEUNG H Y, LEONG P K, et al. Danshen-Gegen decoction protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial permeability transition via the redox-sensitive ERK/Nrf2 and PKCepsilon/mKATP pathways in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Phytochemistry*, 2012, 19(2):99-110.

[责任编辑 周冰冰]