

· 药理 ·

## 基于析因设计的丹红注射液活性物质配伍 抗神经元损伤的交互作用

王玉<sup>1</sup>, 温伟为<sup>2</sup>, 张宇燕<sup>1</sup>, 杨洁红<sup>1</sup>, 赵涛<sup>3</sup>, 付巍<sup>3</sup>, 邢攀科<sup>3</sup>, 万海同<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 杭州市第三人民医院, 杭州 310009;  
3. 山东步长制药有限公司, 山东 菏泽 274000)

[摘要] **目的:**探讨丹红注射液中中药单体丹酚酸 B (Sal B) 及羟基红花黄色素 A (HSYA) 小复方对神经元糖氧剥夺 (OGD) 损伤的保护作用, 及其抗自由基损伤的交互作用, 优化配比组合。 **方法:**体外培养 SD 大鼠海马神经元, 考虑 A (是否 OGD 造模)、B (Sal B, 25, 50, 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及 C (HSYA, 20, 40, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3 个因素, 采用完全随机分组的  $2\times 3\times 3$  析因设计, 倒置相差显微镜观察细胞形态, 采用黄嘌呤氧化酶法测定细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。 **结果:**A, B, C 三因素均对 SOD 活性具有极显著影响 ( $P < 0.01$ ) 且 B, C 及 A, B 间存在交互作用 ( $P < 0.01$ )。以 Sal B 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HSYA 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, SOD 活力最高。 **结论:**Sal B 与 HSYA 合用在抗自由基损伤方面对缺血缺氧再灌注损伤的海马神经元具有协同保护作用。

[关键词] 单体小复方; 丹酚酸 B; 羟基红花黄色素 A; 脑缺血再灌注损伤; 海马神经元; 析因设计

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)17-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170129

## Compatibility of Active Substance of Danhong Injection Interaction of Anti Neuronal Damage Based on Factorial Design

WANG Yu<sup>1</sup>, WEN Wei-wei<sup>2</sup>, ZHANG Yu-yan<sup>1</sup>, YANG Jie-hong<sup>1</sup>, ZHAO Tao<sup>3</sup>,  
FU Wei<sup>3</sup>, XING Pan-ke<sup>3</sup>, WAN Hai-tong<sup>1\*</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. The Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China; 3. Buchang Pharma Co. Ltd, Heze 274000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of monomer salvianolic acid B (Sal B) and hydroxysafflor yellow A (HSYA) in Danhong injection on neuronal with oxygen-glucose deprivation (OGD) injury, and the interaction of anti-freedom injury to optimize the combination ratio. **Method:** A (whether OGD), B (Sal B different doses) and C (HSYA different doses) were considered three factors, using completely randomized  $2\times 3\times 3$  factorial design, cell morphology was observed under inverted phase contrast microscope, and xanthine oxidase method was used to detect intracellular superoxide dismutase (SOD) activity. **Result:** Factor A, B and C had a significant effect on SOD activity ( $P < 0.01$ ), besides, factor B and C, factor A and B had an interaction ( $P < 0.01$ ), and when Sal B 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HSYA 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , SOD activity was highest. **Conclusion:** Sal B combined with HSYA plays a protection role and against hypoxic-ischemic reperfusion injury of hippocampal neurons *in vitro* through. anti-free radical damage

[Key words] Chinese herbal monomer compound; salvianolic acid B; hydroxysafflor yellow A; cerebral ischemia reperfusion injury; hippocampal neurons; factorial design

[收稿日期] 20140125(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173647, 81274176, 81202636); 浙江省自然科学基金项目(LR12H27001); 浙江省教育厅项目(Y201224666); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目, 浙江省中医药(中西医结合)重点学科(2012-XK-A06)

[第一作者] 王玉, 硕士, 从事中医药防治心脑血管疾病研究, Tel:0571-86613716, E-mail: anita375@sina.com

[通讯作者] \*万海同, 博士后, 教授, 从事心脑血管基础研究, Tel:0571-86613711, E-mail: wanhaitong@zjtcn.net

中药方剂源于长期的医疗实践,是中华民族的智慧结晶和文化瑰宝。如何采用现代科学技术来研究中药复方,阐明其药效物质基础、配伍和作用机制,赋予传统医药以现代的科学内涵,对加速中药的现代化和国际化进程至关重要。丹红注射液是由中药丹参、红花经过提取等制成的复方制剂,红花温性以助丹参消散瘀血,温运血行,二者相辅,祛邪而不伤正,共奏活血通络、祛瘀生新之功,具有保护血管内皮、稳定动脉粥样硬化、改善微循环、降脂、抗炎、抗凝等作用<sup>[1]</sup>,临床主要用于治疗冠心病,心绞痛,心肌梗死等心脑血管疾病<sup>[2]</sup>。丹酚酸 B(Sal B)与羟基红花黄色素 A(HSYA)为丹红注射液中水溶性有效成分,二者作为单体小复方对心脑血管缺血再灌注损伤的保护作用的相关研究多集中在抑制血小板聚集及血栓形成方面<sup>[3-4]</sup>,缺乏对缺血再灌注损伤级联反应其他相关机制的研究,且二者配伍是否发挥协同作用及最优配比组合亟待研究。因此,本实验采用析因设计,从抗自由基损伤方面探讨 Sal B 与 HSYA 配伍对离体海马神经元糖氧剥夺(OGD)模型保护的交互作用及最优配比组合。以进一步研究中药复方“丹红注射液”的药效物质基础、配伍和作用机制。

## 1 材料

**1.1 试剂及药物** 丹红注射液(山东步长制药有限公司,20120711),胰蛋白酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,20120510),DMEM 高糖培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 NYD0843),Neurobasal 培养液(Gibco 公司,批号 121124),B27 补充物(Gibco 公司,批号 121027),青、链霉素(Gibco 公司,批号 121027),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 120118),多聚赖氨酸(Sigma,批号 OJ1219),Sal B 标准品(上海同田生物技术股份有限公司,批号 20120912),HSYA 对照品(上海同田生物技术股份有限公司,批号 20120926),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号 120811),阿糖胞苷(上海华联制药厂,批号 120119),SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20111218)。

**1.2 动物** 新生 24 h 内的 SD 大鼠,浙江中医药大学动物中心提供,清洁级,雌雄各半,许可证号 SYXK(浙)2008-0115。

**1.3 仪器** 倒置相差荧光显微镜(Nikon 公司),超纯水仪(美国 Milipore 公司),DGG-9240B 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),209b

型超净工作台(苏净集团安泰公司),3111 型二氧化碳细胞培养箱(美国 Forma 公司),LDZ5-2 型离心机(北京医用离心机厂),YXQ-SG46-2803 型不锈钢手提式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),ARA-520 型电子精密天平(奥豪斯国际贸易有限公司),BIO-RAD680 型伯乐全自动酶标仪(美国 BIO-RAD 生命医学产品有限公司),HHW21. Cu600 型恒温水槽(上海医疗器械七厂)。

## 2 方法

**2.1 大鼠海马神经元的分离培养** 取新生 24 h 内的 SD 大鼠在无菌条件下分离出双侧海马,用 0.25% 胰蛋白酶消化(37 °C, 20 min),加入含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基以终止消化,用巴斯德管将组织块轻轻吹散,制成密度为  $2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 的单细胞悬液,接种于涂有多聚赖氨酸的 6 孔板上,置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。1 d 后细胞贴壁,全部吸弃 DMEM 培养液,换为完全培养基。完全培养基为 Neurobasal 培养液加 2% B27 补充物,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺及 1% 青链霉素组成。以后每周换液 2 次,每次换半液。于培养第 4 天在培养液中加入阿糖胞苷终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> 作用 48 h 以抑制胶质细胞的过度生长。经免疫荧光鉴定<sup>[3]</sup>,通过细胞计数器统计,90% 以上的细胞均为神经元。培养第 10 天的神经元用于试验。

**2.2 海马神经元离体缺氧缺糖(oxygen glucose deprivation, OGD)模型的建立** 向无糖的人工脑脊液(arificial cerebrospinal fluid, ACSF)中通入 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 通气的同时用溶氧仪测定 ACSF 中溶解氧的浓度,直至将至 0 附近,将原来正常的种植液置换为缺氧缺糖的 ACSF 液,真空袋包裹后放置 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养 4 h,造成神经元缺氧缺糖损伤,建立 OGD 模型。

**2.3 试验设计及药物处理** 采用完全随机分组三因素多水平析因设计全面考察造模与否、Sal B(分高、中、低 3 个剂量水平)、HSYA(分高、中、低 3 个剂量水平)对神经元损伤的保护作用机制。药物剂量水平根据临床剂量及预试验 ED<sub>50</sub> 和 LD<sub>50</sub> 值设定。每组重复 3 次。具体为:①是否造模:造模则 OGD 4 h 后换回原有完全培养基,放回含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内 37 °C 继续培养 24 h;不造模则不作 OGD 处理,加入不经缺氧缺糖处理的 ACSF,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内孵育 4 h 后,换回原有完全培养基,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内继续培养 24 h。②Sal B 3 水平组:OGD 4 h 后,换回原有完全培养基,加入 Sal B(终浓

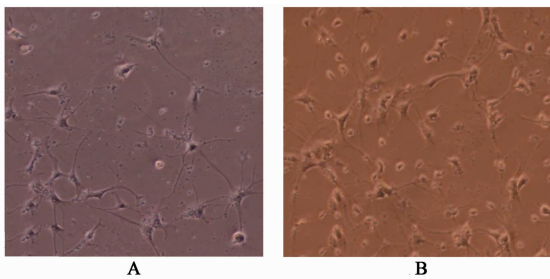
度分别为 25,50,75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内继续培养 24 h。剂量的选择依据预试验  $\text{ED}_{50}$  和  $\text{LD}_{50}$  值设定。③ HSYA 3 水平组:OGD 4 h 后,换回原有完全培养基,加入 HSYA(终浓度为 20,40,60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内继续培养 24 h。每组重复 3 次。

**2.4 标本采集与检测** 取造模前后及治疗前后海马神经元进行形态学观察。处理后的细胞采用 0.125% 胰蛋白酶消化收集,细胞裂解液裂解,取上清,采用黄嘌呤氧化酶法测定细胞内 SOD 活性,检测按试剂盒说明书操作,分别取 550 nm 的波长测定吸光度(A),根据公式计算细胞内 SOD 活性,每样本设 3 个复孔。

**2.5 统计分析** 数值采用  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,首先进行各因素间的方差齐性检验,方差齐则直接进行统计分析,若方差不齐,则对数据变换之后再分析主效应和所有因素不同水平各种组合的交互效应。以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 OGD 诱导后对海马神经元形态学的影响** 新生大鼠海马神经元分散培养 10 d,神经元胞体增大,有明显的折光性,立体感强,多数呈锥体状或多极性,神经突起相互联络成网,细胞已具有成熟神经元的形态学特点<sup>[4-5]</sup>。经 OGD 诱导,部分神经元胞体出现肿胀,胞体增大,少数神经元胞体出现空泡,突起淡化、解离,神经元纤维呈簇状。见图 1。



A. 正常的海马神经元;B. 海马神经元 OGD 模型

图 1 正常海马神经元与经 OGD 诱导后海马神经元形态比较 ( $\times 100$ )

**3.2  $2 \times 3 \times 3$  析因设计各组 SOD 活性比较** 试验具体设计及各组 SOD 活性见表 1。

**3.3 方差分析结果** 对数据进行方差齐性检验,结果  $P < 0.05$ ,说明各因素间方差不齐,取  $\text{Log}_{10}$  (SOD) 进行数据转化,再进行方差齐性检验,结果  $P > 0.05$ ,可以进一步进行方差分析,结果见表 2。结果表明是否造模、Sal B 及 HSYA 不同剂量均对

表 1  $2 \times 3 \times 3$  析因设计各组 SOD 活性比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别 <sup>1)</sup>	Sal B / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HSYA / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD 活性 / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
1	25	20	11.35 $\pm$ 0.44
2	50	20	17.29 $\pm$ 0.31
3	75	20	23.52 $\pm$ 0.69
4	25	40	12.39 $\pm$ 0.52
5	50	40	17.32 $\pm$ 0.70
6	75	40	23.35 $\pm$ 0.23
7	25	60	12.36 $\pm$ 0.79
8	50	60	17.73 $\pm$ 0.54
9	75	60	27.14 $\pm$ 0.73
10	25	20	18.10 $\pm$ 0.58
11	50	20	17.75 $\pm$ 0.44
12	75	20	25.62 $\pm$ 1.42
13	25	40	18.33 $\pm$ 0.48
14	50	40	18.56 $\pm$ 0.59
15	75	40	25.36 $\pm$ 1.30
16	25	60	18.41 $\pm$ 0.65
17	50	60	18.47 $\pm$ 0.27
18	75	60	28.65 $\pm$ 0.31

注: <sup>1)</sup> 组别 1~9 组为 OGD;10~18 组为不进行 OGD。

表 2 析因设计的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	0.691 <sup>1)</sup>	17	0.041	171.448	0.000
截距	87.983	1	87.983	3.709E5	0.000
A(OGD)	0.082	1	0.082	346.127	0.000
B(Sal B)	0.519	2	0.259	1.093E3	0.000
C(HSYA)	0.009	2	0.004	18.568	0.000
A $\times$ B	0.073	2	0.037	154.777	0.000
A $\times$ C	0.000	2	0.000	0.676	0.515
B $\times$ C	0.007	4	0.002	7.319	0.000
A $\times$ B $\times$ C	0.001	4	0.000	1.121	0.362
误差	0.009	36	0.000		
总变异	88.683	54			
总离差	0.700	53			

注: <sup>1)</sup>  $R^2 = 0.988$  (校正  $R^2 = 0.982$ )。

SOD 活性具有极显著影响 ( $P < 0.01$ ),且不同剂量的 Sal B 与 HSYA 之间及是否造模与 Sal B 不同剂量间存在交互作用 ( $P < 0.01$ )。不同剂量的 Sal B 与 HSYA 对  $\text{Log}_{10}$  (SOD) 均值影响的交互作用见图 2。进一步采用 LSD 法进行多重比较,结果显示 Sal

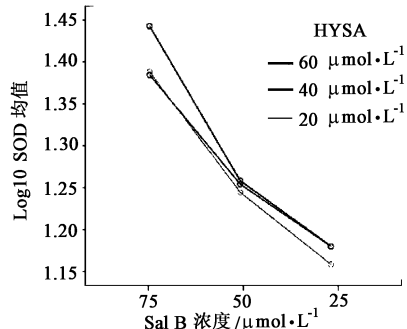


图 2 不同剂量的 Sal B 与 HSYA 对  $\text{Log}_{10}$  (SOD) 均值影响的交互作用

B 高、中、高、低、中、高、低剂量间对 SOD 活性的影响具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); HSYA 高、中、高、低剂量间对 SOD 活性的影响具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但 HSYA 中、低剂量间对 SOD 活性的影响不

具有统计学意义; 不同剂量的 Sal B 及 HSYA 之间具有交互作用, Sal B  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , HSYA  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, SOD 活力最高, Sal B 与 HSYA 的最佳配比为 5:4。见表 3~4。

表 3 Sal B 及 HSYA 不同剂量对体外培养的海马神经元 SOD 活性的单独效应 (LSD 多重比较结果)

(I) Sal B $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	(J) Sal B $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	均数差 (I-J)	标准误	P 值	(I') HSYA $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	(J') HSYA $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	均数差 (I'-J')	标准误	P 值
75	50	0.155 5 <sup>1)</sup>	0.005 13	0.000	60	40	0.021 2 <sup>1)</sup>	0.005 13	0.000
75	25	0.236 1 <sup>1)</sup>	0.005 13	0.000	60	20	0.030 5 <sup>1)</sup>	0.005 13	0.000
50	25	0.080 6 <sup>1)</sup>	0.005 13	0.000	40	20	0.009 3	0.005 13	0.078

注: 数据为  $\text{Log}_{10}(\text{SOD})$ , <sup>1)</sup>  $P < 0.05$

表 4 不同剂量间 Sal B 与 HSYA 对体外培养的海马神经元 SOD 活性的交互作用

Sal B $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HSYA $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	均值	标准误	95% 置信区间	
				下限	上限
75	60	1.445	0.006	1.433	1.458
	40	1.386	0.006	1.373	1.399
	20	1.390	0.006	1.377	1.402
50	60	1.258	0.006	1.245	1.270
	40	1.253	0.006	1.241	1.266
	20	1.244	0.006	1.231	1.256
25	60	1.178	0.006	1.166	1.191
	40	1.178	0.006	1.165	1.191
	20	1.156	0.006	1.144	1.169

注: 数据为  $\text{Log}_{10}(\text{SOD})$ 。

#### 4 讨论

缺血性中风是临床常见疾病, 是成年人致残的主要原因之一。在世界与我国人口老龄化趋势日益加速的情况下, 缺血性中风的危害性亦必然日益突出, 因此, 缺血性中风的防治越来越引起国内外医学界特别是神经科学界的重视。在缺血性中风抢救和治疗过程中, 医者发现, 对组织造成损伤的主要因素, 不是缺血本身, 而是恢复血液供应后, 过量的自由基攻击这部分重新获得血液供应的组织内的细胞造成的, 即“缺血再灌注损伤”。故在缺血性中风的 治疗过程中, 除要对缺血组织恢复血、氧供应, 还需注意使用自由基清除剂——抗氧化剂来降低过量的自由基的危害作用。SOD 具有特殊的生理活性, 是生物体内清除自由基的首要物质。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 具有抗神经细胞凋亡的作用。

中医药治疗缺血性中风有独特优势, 尤以复方疗效显著, 可能与其多途径、多靶点以及组成成分之间的协同作用有关<sup>[5]</sup>。复方有严格的配伍原则, 讲究君臣佐使, 以法统方。方剂的药物组成及剂量配比关系也是中医药现代化研究亟待解决的瓶颈<sup>[6]</sup>,

配伍的最终目的是用尽量少的药味搭配来达到最佳的治疗效果, 因此, 应该寻找一种最佳策略, 针对疾病的关键发病环节来优化方剂中不同组分的配比关系, 强化主效应, 减轻副效应, 形成针对特定病证结合证候的中药组方配伍方剂, 即“单体配伍”模式组成一种新型微观复方来达到减量增效的目的。

析因设计属于完全交叉设计, 不仅可分析出主效应对观测结果的影响, 而且可揭示出实验因素之间各级交互作用的效应大小, 是获得消息量最多且对因素间关系解释的最清楚的试验设计方法。本实验采用析因设计, 完全探讨造模与否、Sal B 及 HSYA 不同剂量水平三因素对神经元损伤的保护作用, 各自的单独效应及交互作用, 结果显示 Sal B 与 HSYA 各自单用及二者合用均能明显提高经 OGD 诱导的海马神经元损伤 SOD 活性, 对受损神经元具有保护作用, 且二者合用具有协同作用, 合用的最优配比为 5:4。

#### [参考文献]

- [1] 常连赢, 朱彦, 高秀梅. 丹红注射液抗血栓作用研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(4): 246.
- [2] 姚灵枝. 丹红注射液治疗短暂性脑缺血发作临床分析[J]. 中国医学工程, 2013, 21(10): 129.
- [3] 王玉, 万海同, 严伟民, 等. 川芎嗪与葛根素合用对海马神经元损伤后的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 424.
- [4] 刘剑刚, 张大武, 李婕, 等. 丹参、红花水溶性组分及配伍对大鼠心肌缺血再灌注损伤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 189.
- [5] 苗明三, 马瑞娟, 魏荣瑞, 等. 组分中药配比研究方法 及思考[J]. 河南大学学报: 医学版, 2011, 30(1): 1.
- [6] 杨鸿, 吴彦, 马琰岩, 等. 具抗氧化活性的中药有效组分的配伍研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1826.

[责任编辑 聂淑琴]