

UPLC-MS/MS 联合细胞膜固相色谱法分析补阳还五汤作用于神经元样 PC12 细胞的效应成分

郑华珠¹, 王利胜^{1*}, 吴银爱¹, 范有明^{2*}, 孟英姣¹, 沈晓¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 第三军医大学 高原军事医学系, 重庆 400038)

[摘要] 目的: 筛选补阳还五汤(BYHWT)中特异作用于神经元样 PC12 细胞的化学成分, 为该复方的后续研究与应用提供实验依据。方法: 采用固相萃取、神经元样 PC12 细胞细胞膜固相色谱法富集补阳还五汤特异结合神经元样 PC12 的效应成分, 采用超高效液相色谱联用电喷雾飞行时间质谱(UPLC-MS/MS)鉴定特异结合成分, 色谱条件为流动相甲醇-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱, 进样量 3 μL , 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 质谱条件为雾化器压力和辅助气压力均为 379.2 kPa, 气帘气压力 241.3 kPa, 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 -4.5 kV。结果: 补阳还五汤特异结合神经元 PC12 细胞的化学成分可能为 6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷, 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮苷。结论: 6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷, 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮苷可特异结合神经元样 PC12 细胞, 可能是补阳还五汤中发挥神经保护的效应成分。

[关键词] 固相萃取; 神经元样 PC12 细胞; 细胞膜固相色谱法; 补阳还五汤; 6-羟基山柰酚-3, 6-二-*O*-葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮苷

[中图分类号] R22;R283.6;R284;R945;R289;R969.1;O657.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)04-0014-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040014

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0916.026.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:16

Effective Components in Buyang Huanwu Tang on Neuron-like PC12 Cells by UPLC-MS/MS Combined with Cell Membrane Solid-phase Chromatography

ZHENG Hua-zhu¹, WANG Li-sheng^{1*}, WU Yin-ai¹, FAN You-ming^{2*},
MENG Ying-jiao¹, SHEN Xiao¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the specific binding components in Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on neuron-like PC12 cells, and to provide experimental basis for further study and application of this compound. **Method:** A method on analysis neuron-like PC12 cells specificity binding components in BYHWT by solid-phase extraction (SPE), neuron-like PC12 cells binding assay combined with SPE was employed, and the samples were analyzed by UPLC-MS/MS, mobile phase was methanol-0.1% formic acid aqueous solution under gradient elution, the injection volume was 3 μL and the flow rate was set as 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The mass spectrometric conditions were set as following: atomizer pressure and auxiliary gas pressure of 379.2 kPa, air curtain gas pressure of 241.3 kPa, ion source temperature at 500 $^{\circ}\text{C}$, spray voltage of -4.5 kV. **Result:** The neuron-like PC12 cells specificity binding components in BYHWT were found as follows: 6-hydroxykaempferol-3, 6, 7-tri-*O*-

[收稿日期] 20170528(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373973,81573872);广东省省级科技计划项目(2013B032500015)

[第一作者] 郑华珠,在读硕士,从事药物制剂新技术与新剂型研究,E-mail:1101400051@qq.com

[通信作者] *王利胜,博士,教授,从事药物制剂新技术与新剂型研究,Tel:020-39358043,E-mail:wlls68@126.com;

*范有明,博士,副教授,从事病理生理学研究,E-mail:214810781@qq.com

glucoside, 6-hydroxykaempferol-3, 6-di-*O*-glucoside and calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside. **Conclusion:** These three components may be the important compositions for neuroprotective function in BYHWT.

[Key words] solid-phase extraction; neuron-like PC12 cells; cell membrane solid-phase chromatography; Buyang Huanwu Tang; 6-hydroxykaempferol-3, 6-di-*O*-glucoside; calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside

补阳还五汤首载于《医林改错》，由黄芪（君药），当归（臣药）及赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙（佐药）组成，具有补气、活血、通络的功效，是中医临床上广泛用于治疗中风的经典方剂。Shaw 等^[1]利用 HPLC-MS/MS 技术研究口服补阳还五汤后血清中药效成分，同时鉴定了 9 种药效成分，包括黄芪皂苷 I，II，IV 和芒柄花苷、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、蒿本内酯、芍药苷。黄海艳等^[2-3]通过大鼠口服补阳还五汤提取液获取含药血浆的方式，发现 19 个药源性成分，其中药材原型成分 4 个，代谢成分 15 个，并确定了 2 个代谢成分分别来自黄芪和桃仁。

目前，关于口服补阳还五汤血清成分的研究较多^[4-5]，而针对该复方在脑部或脑脊液的研究，则大部分集中在对川芎嗪及阿魏酸等小分子单体成分上，通过脑部神经元样 PC12 细胞对补阳还五汤进行研究可更直接地阐明其治疗脑缺血的效应成分，而目前此类研究尚属空白，具有较高的研究价值。本实验拟采用神经元样 PC12 细胞膜固相色谱法联合 UPLC-MS/MS 检测并初步鉴定补阳还五汤中特异结合于 PC12 细胞上的效应成分，推测补阳还五汤发挥神经保护作用的药效物质基础，为该复方的临床合理用药提供参考。

1 材料

LC-30AD 型超高效液相色谱仪（日本岛津公司），Triple TOF 5600 型高分辨液相色谱质谱联用仪（美国 AB Sciex 公司），Strata-X 型固相萃取柱（美国菲罗门公司），240i 型 CO₂ 恒温培养箱（美国 Thermo 公司），XTU-20C 型倒置相差显微镜（上海豫光仪器有限公司），FLV 1000 型激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司），5803R 型高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司），LDZX-75KBS 型蒸汽压力灭菌锅（上海申安医疗器械厂），CS101-3EB 型恒温干燥箱（重庆四达试验设备有限公司）。

黄芪、当归、赤芍等药材均购自广州致信中药饮片有限公司，经广州中医药大学李薇教授鉴定，均符合 2015 年版《中国药典》的相关要求；磷酸盐缓冲液（PBS）粉末（武汉博士德生物工程有限公司），青霉素-链霉素溶液和 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶

（DAPI）染色液（10 × 双抗，碧云天生物技术有限公司），胎牛血清（德国 PAN 公司，批号 P12211ES），马血清和改良杜氏伊格尔培养基（DMEM）（美国 Hyclone 公司），山羊血清、山羊抗小鼠二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司），驴血清、驴抗绵羊二抗（美国 Jackson ImmunoResearch 公司，批号分别为 120858 和 121278），神经生长因子（NGF，美国 R&D Systems 公司），聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100，美国 Sigma 公司，批号 BW42030000），生长相关蛋白-43（GAP-43）一抗（美国 Novus Biological 公司，批号 NBP1-41123）， β -微管蛋白（TUJ1）一抗（美国 Abcam 公司，批号 GR247915-3），神经胶质纤维酸性蛋白（GFAP）一抗（Invitrogen 公司，批号 WL02027），Dako CS703 封片剂（美国 Agilent 公司），水为双蒸水或超纯水，甲醇为色谱纯，其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试液的制备

2.1.1 补阳还五汤提取液 依据补阳还五汤处方要求（黄芪 60 g，当归 9 g，赤芍 9 g，川芎 6 g，桃仁 9 g，红花 9 g，地龙 9 g）称取处方量药材，按文献^[6]中方法制备 1.1 g·mL⁻¹补阳还五汤提取液，冷藏备用。

2.1.2 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.3） 取 PBS 粉末 23.09 g，用水定容至 2 L，用 500 mL 小瓶分装，高压蒸汽灭菌锅处理，冷却后置 4 °C 冰箱中保存备用。

2.1.3 PBS（pH 4.0） 取 2.1.2 项下配制好的 PBS 1 L，用 5% 磷酸调节 pH 4.0，经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，于 4 °C 保存备用。

2.1.4 补阳还五汤 PBS 稀释溶液 取 2.1.1 项下补阳还五汤提取液，用灭菌后 PBS（pH 7.3）稀释，得 0.11 g·mL⁻¹补阳还五汤 PBS 稀释溶液。

2.1.5 神经元样 PC12 细胞完全培养基 取 DMEM 84 mL，加入马血清 10 mL，胎牛血清 5 mL，青霉素-链霉素溶液 1 mL，得含 10% 马血清，5% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的培养基。

2.1.6 5% Triton X-100 贮备液 取 Triton X-100 2.5 mL，加 2.1.2 项下 PBS 稀释并定容至 50 mL，置 4 °C 冰箱中保存备用。临用时加 PBS 稀释成 0.2%

Triton X-100 使用。

2.1.7 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NGF 工作液 取 NGF 100 μg , 加入含 0.1% 胎牛血清的 PBS [PBS 980 μL (pH 7.3) + 5% 胎牛血清 20 μL] 1 mL, 得 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NGF 浓液, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 用时加 PBS (pH 7.3) 稀释 1 000 倍, 即得。

2.1.8 4% 多聚甲醛 称取多聚甲醛粉末 40 g 于锥形瓶中, 加入 PBS (pH 7.3) 1 L, 用封口膜封口, 置磁力搅拌器上搅拌过夜至溶解, 置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.2 神经元样 PC12 细胞培养、传代及观察

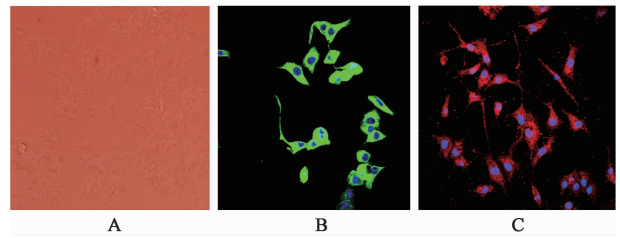
2.2.1 培养 将 PC12 细胞接种于完全培养基中, 调节细胞浓度密度至 $4\times 10^6\sim 5\times 10^6$ 个/mL 后接种, 过夜贴壁, 换液, 加入 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NGF 工作液^[7] 诱导分化 4 d, 并置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 含 5% CO_2 的培养箱中培养, 2 d 换液 1 次, 在倒置显微镜下观察细胞的形态特征及生长状况。

2.2.2 传代培养 待诱导分化的神经元样 PC12 细胞在显微镜下观察细胞生长铺满培养瓶底 80% 左右时, 以 1:3 比例传代, 传代前 1 d 换液。传代时, 吸弃原培养基并加入新培养基 5 mL, 用巴氏吸管轻轻将细胞吹打下来, 转移至离心管中, 使用 5 mL 灭菌注射器将细胞吹散, 加入新培养基 10 mL 并吹打均匀, 将细胞重悬, 细胞悬液转移至新培养瓶中, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 含 5% CO_2 的培养箱中培养。

2.2.3 免疫组化染色观察^[8] 将诱导分化培养的 PC12 细胞进行免疫荧光染色。胰酶消化后将细胞以 0.5×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 放入盖玻片进行细胞爬片。细胞爬片取出后, 用多聚甲醛固定并漂洗, 用 0.2% Triton X-100 室温通透 30 min, 10% 山羊血清或 5% 驴血清室温封闭 1 h, 滤纸吸干, 分别加入 TUJ1 一抗 (1:50) 和 GAP-43 抗体 (1:50) 各 100 μL , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 湿盒中过夜, 加 PBS (pH 7.3) 清洗 3 次, 吸干, 分别加入 1:200 的山羊抗小鼠二抗和驴抗绵羊二抗, 避光室温孵育 4 h, DAPI 避光作用 5 min, 加 PBS (pH 7.3) 清洗 3 次, 吸干, 封片剂封片, 利用荧光显微镜观察。荧光显微镜观察的标准为绿色表示 TUJ1 染色阳性, 红色表示 GAP-43 染色阳性, 蓝色表示细胞核染色阳性。见图 1。

2.3 固相色谱法分析

2.3.1 神经元样 PC12 细胞的收集 按 2.2.1 项下方法操作, 加入 NGF 诱导 4 d 后用 0.25% 胰酶消化 1~2 min, 终止培养基和胰酶消化, 于 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集细胞沉淀, 加 PBS (pH 7.3) 洗涤 3



A. 普通荧光显微 ($\times 200$); B. TUJ1 免疫荧光 ($\times 600$); C. GAP-43 免疫荧光 ($\times 600$)

图1 神经元样 PC12 细胞的荧光显微观察

Fig.1 Fluorescence microscopy images of neuron-like PC12 cells

次, 细胞沉淀供固相色谱法使用。

2.3.2 解离液的制备 将 $0.11\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 补阳还五汤 PBS 稀释溶液 15 mL 加入到神经元样 PC12 细胞沉淀中, 轻轻吹打使其混合均匀, 用封口膜封口, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴振荡 60 min, 使效应成分充分与神经元样 PC12 细胞膜受体结合; 将振荡后的悬液离心 3 min ($4\text{ }^\circ\text{C}$, $500\times g$, 下同), 弃去上清液, 得结合补阳还五汤效应成分的神经元样 PC12 细胞沉淀; 在结合有补阳还五汤效应成分的神经元样 PC12 细胞沉淀中, 加入 PBS (pH 7.3) 10 mL, 反复吹打均匀, 离心 3 min, 洗去未结合成分, 重复洗涤 5 次取下层神经元样 PC12 细胞沉淀洗涤离心 5 次。在已洗涤未结合成分的神经元样 PC12 细胞沉淀中加入 PBS (pH 4.0) 10 mL, 反复吹打均匀悬液, 用封口膜密封, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中振荡 60 min, 使神经元样 PC12 细胞膜上效应靶点失活, 已结合的效应成分从神经元样 PC12 细胞膜上解离, 将振荡后的悬液离心 15 min, 取上清液, 即得效应成分的解离液。以 PBS (pH 7.3) 15 mL 代替 $0.11\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 补阳还五汤 PBS 稀释溶液加入神经元样 PC12 细胞沉淀中, 其余步骤均同上, 得空白组。

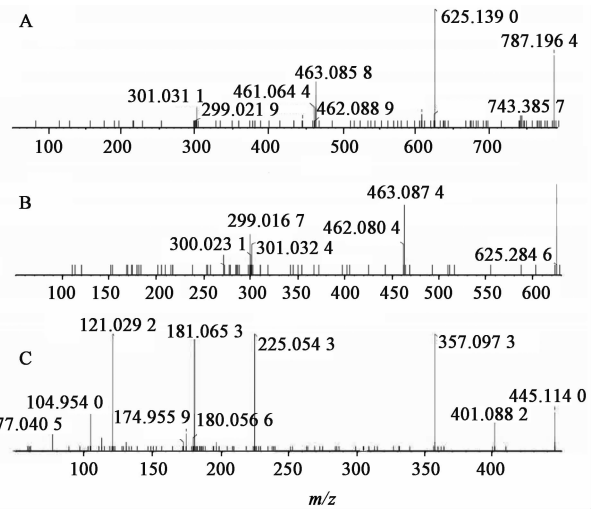
2.3.3 固相萃取柱富集 分别吸取甲醇 4 mL 和水活化或平衡固相萃取小柱 (SPE 小柱), 吸取 2.3.2 项下解离液 2 mL, 以 $1\sim 2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速上样, 加 2% 甲醇 2 mL 清洗 SPE 小柱, 收集清洗液, 加 2% 甲酸乙腈溶液和甲醇各 4 mL 洗脱, 收集洗脱液后合并。清洗液及洗脱液真空浓缩, 分别用水定容于 1 mL 量瓶中, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 供 UPLC-MS/MS 分析使用。

2.4 UPLC-MS/MS 分析 分别吸取经 SPE 小柱富集的实验组和空白组溶液进行 UPLC-MS/MS 分析, 检测条件为菲罗门 C_{18} 反向色谱柱 ($2.1\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}$, $2.6\ \mu\text{m}$), 流动相甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~5 min, 10%~40% A; 5~

10 min, 40% ~ 60% A; 10 ~ 15 min, 60% ~ 10% A; 15 ~ 16 min, 10% A), 检测时间 16 min, 进样量 3 μL , 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱条件为雾化器压力 (GS1) 379.2 kPa, 辅助气压力 (GS2) 379.2 kPa, 气帘气压力 (Cur) 241.3 kPa, 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 (ISVF) -4.5 kV; 二级质谱参数分别为去簇电压 (DP) -100 V, 碰撞能量 (CE) -45 eV, 碰撞能量扩展 (CES) 15 eV。

2.5 特异结合成分的结构解析 扣除空白组的背景后, 神经元样 PC12 细胞特异结合成分的二级质谱图见图 2。

峰 1 在负离子模式下, 一级质谱 m/z 787.196 4 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$, 可推测其相对分子质量 788 Da, 可能的分子式为 $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{22}$, 质量误差 2.1 ppm。对 m/z 787.196 4 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 二级质谱进行分析, 得 m/z 625.139 0 $[\text{M} - \text{H} - \text{glc}]^{-}$, m/z 463.085 8 $[\text{M} - \text{H} - 2\text{glc}]^{-}$, m/z 301.031 1 $[\text{M} - \text{H} - 3\text{glc}]^{-}$, m/z 299.021 9 等二级碎片离子, 通过对其碎片离子进行归属, 初步推断其可能是 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-



A. 化合物 $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{22}$; B. 化合物 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$; C. 化合物 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$

图 2 神经元样 PC12 细胞特异结合成分在负离子模式下的二级质谱

Fig. 2 Secondary mass spectra of neuron-like PC12 cells specific binding components under negative ion mode

葡萄糖苷。其可能的裂解方式见图 3。

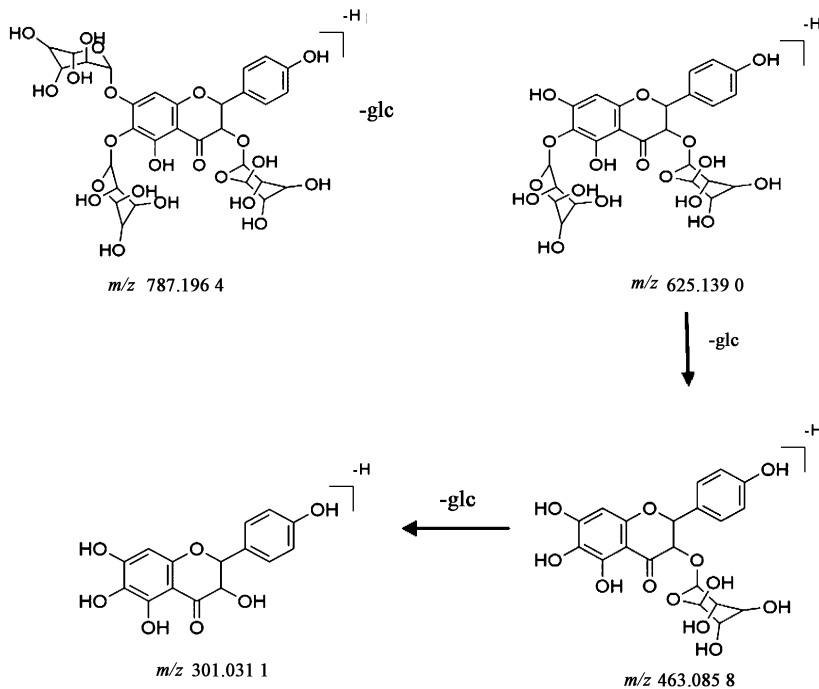


图 3 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷可能的裂解方式

Fig. 3 Fragmentation pathway of 6-hydroxykaempferol-3,6,7-tri-*O*-glucoside

峰 2 在负离子模式下, 一级质谱中 m/z 625.284 6 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$, 可推测其相对分子质量为 626 Da, 可能分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$, δ -3.6 ppm。对 m/z 625.284 6 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 二级质谱进行分析, 得 m/z 463.087 4 $[\text{M} - \text{H} - \text{glc}]^{-}$, m/z 301.032 4 $[\text{M} - \text{H} -$

2glc] $^{-}$, m/z 299.016 7, m/z 271.029 5 等二级碎片离子, 通过对其碎片离子进行归属, 初步推断其可能是 6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷。其可能的裂解方式见图 4。

峰 3 在负离子模式下, 一级质谱 m/z 445.114 0

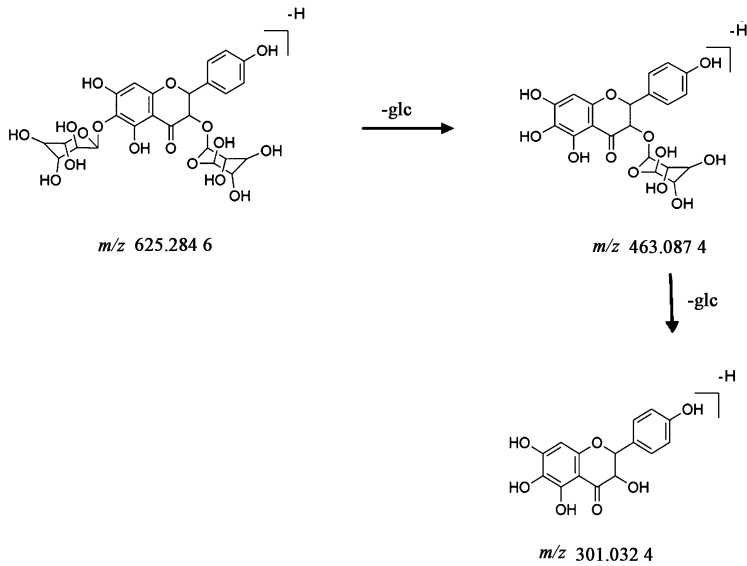


图 4 6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷可能的裂解方式

Fig. 4 Fragmentation pathway of 6-hydroxykaempferol-3,6-di-O-glucoside

$[M - H]^-$, 可推测其相对分子质量为 446 Da, 可能的分子式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$, 质量误差 -2.8 ppm。对 m/z 445.114 0 $[M - H]^-$ 二级质谱进行分析, 得 m/z

401.088 2 $[M - C_2H_4O - H]^-$ 二级碎片离子, 通过对其碎片离子进行归属, 初步推断其可能为毛蕊异黄酮苷。其可能的裂解方式见图 5。

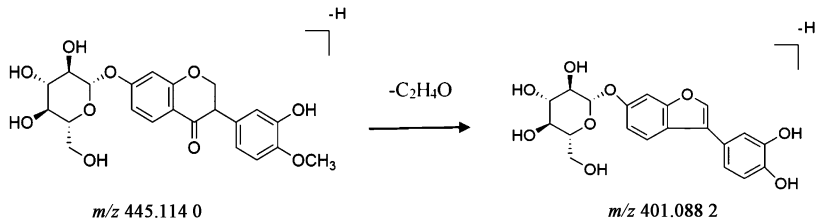


图 5 毛蕊异黄酮苷可能的裂解方式

Fig. 5 Fragmentation pathway of calycosin-7-O- β -D-glucoside

将以上离子信息与 LIU 等^[9] 筛选补阳还五汤中 54 种主要化合物的二级图谱以及祁晓霞等^[10] 分

析黄芪-丹参药对化学成分二级图谱进行比对, 结果吻合, 故初步筛选并确定出以下 3 个成分, 见表 1。

表 1 补阳还五汤神经元样 PC12 细胞固相色谱法结合化合物的色谱峰分析

Table 1 Analysis of chromatographic peaks of specific binding components in Buyang Huanwu Tang

峰号	化合物	t_R /min	分子离子峰 m/z	δ /ppm	二级碎片离子 m/z	λ_{max} /nm
1	6-羟基山柰酚-3,6,7-三-O-葡萄糖苷	3.014	788	2.1	625.139 0, 463.085 8, 301.031 1, 299.021 9	212, 273, 362
2	6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷	4.625	626	-3.6	463.087 4, 301.032 4, 299.016 7, 271.029 5	216, 268, 344
3	毛蕊异黄酮苷	8.657	446	-2.8	401.088 2	223, 248, 283

注: 检测条件均在负离子模式下进行。

3 讨论

细胞膜固相色谱法是利用色谱学技术研究流动相中药物与受体相互作用规律的受体动力学新方法, 具有与受体特异结合、高效、稳定的特性; 而液质联用技术将色谱分析对复杂样品的高分离能力与 MS 具有高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子

质量与结构信息的优点相结合, 可快速筛选与神经元样 PC12 细胞特异结合的效应成分。本实验采用液质联用技术检测细胞破碎液中的成分, 可克服皂苷类成分及含量较低化合物在紫外检测器上没有吸收或吸收不明显的问题, 从而更加全面分析和鉴别补阳还五汤与靶细胞有特异性结合的成分。

本实验采用通过固相色谱法筛选出的可能特异结合成分为 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷,6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮苷。其中前二者来源于红花^[11];毛蕊异黄酮苷来源于黄芪^[12]。张继平等^[13]利用 PC12 细胞制备氧糖剥夺模型(oxygen-glucose deprivation, OGD)时研究发现,补阳还五汤中抑制 OGD 损伤 PC12 细胞凋亡的药味包括桃仁、红花和赤芍。另外,张继平等^[14]利用 PC12 细胞制备 OGD 模型研究发现补阳还五汤能提高 OGD 损伤的 PC12 细胞活力,其发挥保护作用的药物来源为黄芪、当归尾、赤芍。

毛蕊异黄酮苷是来源于补阳还五汤中君药黄芪的特异结合成分,具有抗心肌细胞缺氧缺糖损伤、抗脑缺血损伤、促进血管新生等作用。REN 等^[15]利用 Wistar 大鼠心肌缺血再灌注模型研究发现,毛蕊异黄酮苷具有激活磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)通路、抑制氧化应激和细胞凋亡的作用。李晶晶等^[16]利用 H9c2 心肌细胞研究发现,毛蕊异黄酮苷的抗缺糖缺氧损伤作用可能与激活核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)和 PI3K/Akt 通路有关。FU 等^[17]利用大脑中动脉栓塞(MCAO)模型的 SD 大鼠研究发现,毛蕊异黄酮苷通过一氧化氮/小窝蛋白-1/基质金属蛋白酶(NO/cav-1/MMPs)通路来保护血脑屏障完整性,降低梗死面积。郭超^[18]研究发现毛蕊异黄酮苷具有抗大鼠脑缺血再灌注损伤的作用,主要机制与消除氧自由基有关。赵跃东^[19]发现黄芪注射液可通过有效降低血液中纤维蛋白原含量、降低血浆黏度来抗脑缺血再灌注损伤。路芳等^[20]发现毛蕊异黄酮苷抗脑缺血再灌注损伤机制与缓解细胞毒作用、抑制钙离子超载有关;周立亚^[21]发现毛蕊异黄酮苷可通过抑制水通道蛋白 4(AQP4)表达、下调脊髓组织中细胞凋亡指数来对脊髓缺血再灌注损伤起到保护作用。JIANG 等^[22]利用人脐静脉内皮细胞研究发现毛蕊异黄酮苷能抗脂多糖引起的内皮细胞损伤,其机制可能与小分子 G 蛋白/Rho 相关激酶(Rho/ROCK)通路和 Akt 通路有关。

6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷和 6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷是来源于佐药红花中的特异结合成分。王媛凯^[23]发现 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷具有抑制芬顿(Fenton)反应和减少自由基产生的作用,机制可能与其影响 Fe²⁺络合有关。Bulgantuya 等^[24]发现 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷和 6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷

的 3 种水解苷元对 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)离子基的清除作用较其苷类的作用更强。乐世俊等^[25-26]发现含 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷的红花水提取物部位抗氧化活性较强。

6-羟基山柰酚-3,6-二-*O*-葡萄糖苷,6-羟基山柰酚-3,6,7-三-*O*-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮苷这 3 种特异结合成分具有多重的抗氧化、抗炎、抗损伤、促进再生等作用,可能是补阳还五汤发挥神经保护作用的有效成分。因每次实验细胞膜蛋白含量略有不同,导致与细胞膜受体结合的效应成分含量稳定性受到影响;在本文中只筛选出了可能具有神经保护的 3 个有效成分,具有一定的局限性,有待后续实验进一步完善。

[参考文献]

- [1] Shaw L H, LIN L C, Tsai T H. HPLC-MS/MS analysis of a traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats [J]. PLoS One, 2012, 7 (8): e43848.
- [2] 黄海艳,祝赫,韩彬,等.补阳还五汤血浆指纹图谱的建立[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):96-99.
- [3] 黄海艳.补阳还五汤指纹图谱及血清药物化学初步研究[D].广州:广东药科大学,2016.
- [4] 刘芳,杨岩涛,贺福元,等.补阳还五汤类方成分的药代动力学比较研究[J].中国中医药信息杂志,2016,23(7):82-86.
- [5] 雷明.补阳还五汤及黄芪红花“益气活血”功效物质基础的移行分析[D].广州:广东药学院,2015.
- [6] 王珂,王利胜,巴文强,等.HPLC 同时测定补阳还五汤提取液中 4 种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):46-49.
- [7] TIAN H, YANG F F, LIU C Y, et al. Effects of phenolic constituents of daylily flowers on corticosterone-and glutamate-treated PC12 cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):69.
- [8] NING Y, HUANG J H, Bill K, et al. Oleanolic acid induces differentiation of neural stem cells to neurons: an involvement of transcription factor Nkx-2.5 [J]. Stem Cells Int, 2015, doi:10.1155/2015/672312.
- [9] LIU E H, QI L W, PENG Y B, et al. Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23 (8):828-842.
- [10] 祁晓霞,董宇,单晨啸,等.基于 UFLC-Q-TOF/MS 分析黄芪-丹参药对化学成分研究[J].南京中医药大

- 学学报, 2017, 33(1):93-96.
- [11] ZHANG Q Q, DONG X, LIU X G, et al. Rapid separation and identification of multiple constituents in Danhong injection by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(2):147-160.
- [12] 孙玉平, 龚苏晓, 曹煌, 等. 不同加工方法的蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素定量分析[J]. 中草药, 2015, 46(11):1678-1681.
- [13] 张继平, 刘俊娥, 姚晖, 等. 补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞凋亡影响的正交试验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(3):469-474.
- [14] 张继平, 刘俊娥, 姚晖, 等. 正交试验法研究补阳还五汤中保护 OGD 损伤 PC12 细胞的主要药味[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11):134-138.
- [15] REN M, WANG X, DU G, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside attenuates ischemia-reperfusion injury *in vivo* via activation of the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1):633-640.
- [16] 李晶晶, 崔国祯, 王亮, 等. 毛蕊异黄酮对 H9c2 细胞缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5):32-35.
- [17] FU S, GU Y, JIANG J Q, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside regulates nitric oxide /caveolin-1/matrix metalloproteinases pathway and protects blood-brain barrier integrity in experimental cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1):692-701.
- [18] 郭超. 毛蕊异黄酮的提取工艺优化及其对大鼠脑缺血损伤的保护作用[D]. 西安:陕西师范大学, 2011.
- [19] 赵跃东. 黄芪注射液的化学成分及其对脑梗死的系统评价分析[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [20] 路芳, 蒋芦荻, 陈艳昆, 等. 基于神经保护探讨补阳还五汤抗脑缺血损伤的多靶点作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(9):744-749.
- [21] 周立亚. 黄芪注射液对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的保护作用及机理研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2015.
- [22] JIANG Y H, SUN W, LI W, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside promotes oxidative stress-induced cytoskeleton reorganization through integrin-linked kinase signaling pathway in vascular endothelial cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0839-5.
- [23] 王媛凯. 6-羟基山萘酚-3-氧葡萄糖苷抑制 Fenton 反应氧化损伤初步研究[D]. 太原:山西大学, 2012.
- [24] Bulgantuya B, Narantsetseg B, 叶日贵, 等. 红花的抗氧化活性成分研究[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版, 2015, 46(3):301-307.
- [25] 乐世俊. 红花化学成分研究与活性评价[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [26] 乐世俊, 唐于平, 王林艳, 等. 红花中黄酮类化合物的分离与体外抗氧化研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17):3295-3300.

[责任编辑 刘德文]