

丹酚酸 B、三七皂苷 R₁ 不同配伍比例对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响

赵学萍， 吴苗苗， 吴志刚， 董晓华*
(河北北方学院，河北 张家口 075000)

摘要：目的 考察丹酚酸 B、三七皂苷 R₁ 不同配伍比例对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响。**方法** 线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型。大鼠随机分为假手术组、模型组、丹酚酸 B 组（120 mg/kg）、三七皂苷 R₁ 组（120 mg/kg）、配伍组〔丹酚酸 B + 三七皂苷 R₁，60 mg/kg + 60 mg/kg（1 : 1）、40 mg/kg + 80 mg/kg（1 : 2）、80 mg/kg + 40 mg/kg（2 : 1）〕，各组给药 14 d。然后，计算神经功能缺损评分，评价学习记忆能力，测定海马 SOD 活性、MDA 含量。**结果** 与模型组比较，给药组神经功能缺损评分均有所降低，学习记忆能力均有所改善，以配伍组（1 : 2）作用最强；除丹酚酸 B 组外，给药组 SOD 活性显著升高，MDA 含量显著降低（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），以配伍组（1 : 2）作用最强。**结论** 丹酚酸 B 与三七皂苷 R₁ 的最佳配伍比例为 1 : 2，此时对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用最强。

关键词：丹酚酸 B；三七皂苷 R₁；配伍比例；脑缺血再灌注损伤

中图分类号：R966 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2018)10-2131-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.004

Effects of different compatibility proportions of salvianolic acid B and notoginsenoside R₁ on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHAO Xue-ping, WU Miao-miao, WU Zhi-gang, DONG Xiao-hua*
(Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of different compatibility proportions of salvianolic acid B and notoginsenoside R₁ on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **METHODS** The rat model for right middle cerebral artery embolism was prepared by thread embolism method. The rats randomly divided into sham operation group, model group, salvianolic acid B group (120 mg/kg), notoginsenoside R₁ group (120 mg/kg) and compatibility groups [salvianolic acid B + notoginsenoside R₁, 60 mg/kg + 60 mg/kg (1 : 1), 40 mg/kg + 80 mg/kg (1 : 2), 80 mg/kg + 40 mg/kg (2 : 1)] were all given administration for 14 d, then neural function defect score was calculated, learning and memory abilities were evaluated, hippocampus SOD activity and MDA content were determined. **RESULTS** Compared with the model group, neural function defect scores were decreased in the administration groups with improved learning and memory abilities, especially for those in the compatibility group (1 : 2). Except for the salvianolic acid B group, the administration groups demonstrated significantly increased SOD activities and decreased MDA contents ($P < 0.05$, $P < 0.01$), especially for those in the compatibility group (1 : 2). **CONCLUSION** The optimal compatibility proportion of salvianolic acid B to notoginsenoside R₁ is 1 : 2, which exerts the strongest neuroprotective effects on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.

KEY WORDS: salvianolic acid B; notoginsenoside R₁; compatibility proportions; cerebral ischemia-reperfusion injury

收稿日期：2017-10-25
基金项目：河北省教育厅重点课题（ZD2014065）；张家口市科技局资助课题（0291098D）；河北北方学院自然科学研究计划项目（2009033）
作者简介：赵学萍（1993—），女，硕士生，从事神经精神药理学研究。Tel：(0313) 4029421，E-mail：940048064@qq.com
* 通信作者：董晓华（1976—），女，博士，教授，从事神经精神药理学研究。Tel：(0313) 4029421，E-mail：hbdxh76@163.com

随着人口老龄化程度加剧，脑缺血性疾病已成为一个备受关注的问题，寻找有效的相关防治药物具有重大医学价值和社会意义。以丹参、三七和冰片为主要成分的复方丹参片临床上用于活血化瘀及心脑血管疾病的预防和治疗，但不同厂家产品中丹参、三七所含成分含有量和药材配伍比例差异很大，临床疗效也参差不齐，阻碍了该制剂的深度开发。

研究表明，丹酚酸 B、三七皂苷 R₁ 分别是丹参、三七发挥活血化瘀功效的主要活性成分，同时也是中药传统煎煮方式下所得的主要成分，本实验将在单独用药及不同配伍比例情况下，研究这 2 种成分对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响。

1 材料

健康雄性 SD 大鼠，体质量 180 ~ 200 g，购自中国医学科学院动物繁育厂（京动字 01-1300）。丹酚酸 B（批号 20160723）、三七皂苷 R₁（批号 20160614）对照品（南京泽朗医药技术有限公司）；栓线（北京沙东生物技术有限公司，产品编号 2432-100）；Morris 水迷宫（中国医学科学院药物研究所）。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备 大鼠随机分为 7 组，即假手术组、模型组、丹酚酸 B 组（120 mg/kg）、三七皂苷 R₁ 组（120 mg/kg）、配伍组[丹酚酸 B + 三七皂苷 R₁，60 mg/kg + 60 mg/kg（1 : 1）、40 mg/kg + 80 mg/kg（1 : 2）、80 mg/kg + 40 mg/kg（2 : 1）]。从实验第 1 天起，给药组大鼠每天腹腔注射三七皂苷 R₁ 和/或丹酚酸 B，连续 14 d，而模型组、假手术组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。第 4 天给药后参照文献 [1]，除假手术组外各组大鼠采用腔内线栓法制备右侧大脑中动脉栓塞模型，缺血 2 h 后再灌注；假手术组大鼠不插入栓子，其余操作相同。

2.2 神经功能缺损评分 大鼠缺血再灌注后 12、

24、48、72 h，按 Longa 法 5 分制评分标准进行神经功能缺损评分，1 ~ 3 分为手术成功标志，具体如下：0 分，未观察到神经功能缺陷症状；1 分，不能完全伸展手术对侧前肢（轻度局灶性神经功能缺陷）；2 分，向手术对侧转圈（中度局灶性神经功能缺陷）；3 分，行走时向手术对侧倾倒（重度神经功能缺陷）；4 分，不能自行行走，意识昏迷。

2.3 Morris 水迷宫实验^[2] 于第 10 ~ 14 天进行，包括第 10 ~ 13 天的训练实验和第 14 天的测试实验，每天训练 4 次，间隔 3 min，每次训练 120 s。训练时，大鼠从 4 个不同象限面朝池壁放置，记录找到站台的时间（逃避潜伏期）；如果在 120 s 内未能找到站台，则将其放置在站台上 20 s。训练实验后 24 h 移走站台，进行测试实验，时间 120 s，记录大鼠目标象限（训练时站台所在的象限）停留时间率和穿越平台次数^[3]。

2.4 脑海马组织 SOD 活性及 MDA 含有量测定 大鼠给药 14 d 后麻醉处死，冰盒上迅速取出海马组织，按照试剂盒方法测定 SOD 活性及 MDA 含有量。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 13.0 软件进行处理，数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先将各组数据进行方差齐性检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者用 LSD-*t* 检验，不齐者先将数据转换以使其方差齐后再同法进行分析。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能缺损评分 表 1 显示，模型组、丹酚酸 B 组、三七皂苷 R₁ 组神经功能缺损评分均在 24 h 时最高，然后逐渐下降，但配伍组未出现该现象，而是随着时间推移逐渐下降；与模型组比较，丹酚酸 B 组、三七皂苷 R₁ 组评分均在 48、72 h 时显著降低（*P* < 0.05），而配伍组均在 24、48、72 h 时显著降低（*P* < 0.05，*P* < 0.01）。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Tab. 1 Scores of neural function defect for rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, <i>n</i> = 8)					
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	—	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
模型组	—	3.0 ± 0.7 ^{##}	3.7 ± 0.6 ^{##}	3.5 ± 0.6 ^{##}	2.9 ± 0.4 ^{##}
丹酚酸 B 组	120	2.6 ± 0.6	2.9 ± 0.7	2.4 ± 0.6 [*]	2.0 ± 0.5 [*]
三七皂苷 R ₁ 组	120	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.8	2.3 ± 0.5 [*]	2.2 ± 0.4 [*]
配伍组(1 : 1)	60 + 60	2.7 ± 0.5	2.3 ± 0.6 [*]	2.0 ± 0.5 ^{**}	1.5 ± 0.6 ^{**}
配伍组(1 : 2)	40 + 80	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.4 [*]	1.6 ± 0.5 ^{**}	1.2 ± 0.3 ^{**}
配伍组(2 : 1)	80 + 40	2.6 ± 0.6	2.5 ± 0.6 [*]	2.1 ± 0.6 [*]	1.7 ± 0.5 [*]

注：与假手术组比较，^{##}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01
2132

3.2 Morris 水迷宫实验 表 2 显示,随着训练天数增加,各组潜伏期均不断缩短;与假手术组比较,模型组从第 2 天开始潜伏期显著延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间率均显著缩短 ($P < 0.01$);与模型组比较,给药组从第 2 天开始潜伏期均有所缩短(丹酚酸 B 组从第 3 天开始),穿越平台次数和目标象限停留时间率均显著延长 ($P < 0.05$);从第 3 天开始,

配伍组(1:1、1:2)潜伏期较丹酚酸 B 组、三七皂苷 R_1 组均显著缩短,穿越平台次数和目标象限停留时间率均显著延长 ($P < 0.05$),同时配伍组(1:2)潜伏期显著短于配伍组(1:1、2:1),穿越平台次数和目标象限停留时间率均显著延长 ($P < 0.05$),并且后两组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠学习记忆能力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 2 Abilities of learning and memory for rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	潜伏期/s				穿越平台次数/次	目标象限停留时间率/%
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天		
假手术组	51 ± 22	40 ± 17	27 ± 14	13 ± 6	6.2 ± 2.1	62.6 ± 7.8
模型组	70 ± 34	65 ± 23 [#]	59 ± 19 ^{##}	47 ± 15 ^{##}	2.4 ± 0.6 ^{##}	28.9 ± 5.4 ^{##}
丹酚酸 B 组	67 ± 26	61 ± 20	48 ± 10 [*]	35 ± 9 [*]	3.9 ± 1.4 [*]	41.2 ± 6.1 [*]
三七皂苷 R_1 组	69 ± 20	56 ± 15 [*]	47 ± 13 [*]	32 ± 4 [*]	3.7 ± 1.5 [*]	39.4 ± 6.9 [*]
配伍组(1:1)	65 ± 25	53 ± 19 [*]	37 ± 10 ^{**△}	21 ± 5 ^{**△}	4.3 ± 1.6 ^{**△}	49.4 ± 7.2 ^{**△}
配伍组(1:2)	64 ± 21	49 ± 14 [*]	31 ± 9 ^{**△☆}	15 ± 3 ^{**△☆}	5.6 ± 1.3 ^{**△☆}	55.4 ± 6.7 ^{**△☆}
配伍组(2:1)	61 ± 24	51 ± 17 [*]	40 ± 11 [*]	23 ± 6 ^{**}	4.2 ± 1.4 ^{**}	48.4 ± 7.9 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与丹酚酸 B 组或三七皂苷 R_1 组比较,[△] $P < 0.05$;与配伍组(1:1 或 2:1)比较,[☆] $P < 0.05$

3.3 SOD 活性及 MDA 含有量 表 3 显示,与假手术组比较,模型组 SOD 活性显著降低,MDA 含有量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,三七皂苷 R_1 组、配伍组均可显著升高 SOD 活性,显著降低 MDA 含有量 ($P < 0.05$),而丹酚酸 B 组无显著变化 ($P > 0.05$);配伍组(1:2) SOD 活性较三七皂苷 R_1 组显著增加 ($P < 0.05$),该组中 SOD 活性和 MDA 含有量也显著高于其他 2 个配伍组 ($P < 0.05$)。

线粒体损伤和神经细胞凋亡^[5-6],抗血小板聚集、抗血栓^[7],抑制 $A\beta_{1-40}$ 凝聚和纤维形成、老化 $A\beta_{1-40}$ 引起的 PC12 细胞毒性^[8],抗肿瘤,防治动脉粥样硬化^[9-10];三七总皂苷药理活性包括改善微循环而增加脑血流量、保护脑缺血再灌注损伤,抗疲劳、耐缺氧,抗突变、抗肿瘤^[11-13],增加中枢 M 胆碱受体密度、脑内脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白质合成,明显促进记忆^[14-16]。目前,三七皂苷 R_1 作为三七总皂苷的有效单体,国内外对其作用的报道较少,并且尚无有关它与丹酚酸 B 配伍治疗脑缺血性疾病作用机制的研究。

表 3 各组大鼠 SOD 活性、MDA 含有量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 3 SOD activities and MDA contents of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	MDA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
假手术组	—	243 ± 13	6.55 ± 1.23
模型组	—	134 ± 19 ^{##}	13.28 ± 3.14 ^{##}
丹酚酸 B 组	120	141 ± 11	12.15 ± 2.13
三七皂苷 R_1 组	120	173 ± 9 [*]	9.52 ± 1.97 [*]
配伍组(1:1)	60 + 60	191 ± 8 ^{**▲}	8.28 ± 1.35 ^{**▲}
配伍组(1:2)	40 + 80	217 ± 12 ^{**△☆}	7.76 ± 1.56 ^{**☆}
配伍组(2:1)	80 + 40	168 ± 7 [*]	10.33 ± 2.15 [*]

注:与假手术组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与三七皂苷 R_1 组比较,[△] $P < 0.05$;与配伍组(1:1 或 2:1)比较,[☆] $P < 0.05$;与配伍组(2:1)比较,[▲] $P < 0.05$

4 讨论

研究表明,丹酚酸 B 药理活性包括抗氧化、清除氧自由基^[4],保护脑缺血再灌注损伤所致的

本实验发现,模型组、丹酚酸 B 组、三七皂苷 R_1 组在 24 h 时 Longa 评分最高,然后逐渐下降,这可能与脑缺血再灌注后继发性损害有关;配伍组未出现此高峰,而是随着时间推移评分逐渐降低。与模型组比较,单独给予丹酚酸 B 或三七皂苷 R_1 在再灌注后 48 h 时出现差异,而配伍组在 24 h 时便出现明显的神经功能改善作用,虽然各组间无明显差异,但神经保护作用时间有所提前,在相关治疗中存在较大意义。同时在用药总量不变的情况下与模型组比较,配伍组神经功能保护作用更显著,表明配伍后可能存在某种协同机制。

Morris 水迷宫实验显示,与模型组比较,丹酚酸 B、三七皂苷 R_1 均可改善大鼠学习记忆能力;但就改善程度而言,在药物总量不变的情况下,配

伍组（1：1、1：2）在逃避潜伏期、穿越平台次数、目标象限停留时间率方面的改善作用更显著，但配伍组（2：1）作用并不明显。同时，配伍组（1：2）作用最强。

本实验测定了海马组织 SOD 活性及 MDA 含量，发现除了丹酚酸 B 组外，各组抗氧化活性均较模型组升高，以配伍组（1：1、1：2）SOD 活性更显著。文献 [4] 报道，丹酚酸 B 具有抗氧化活性，但本实验并未发现这一点，可能与该成分剂量及测定部位不同有关。与丹酚酸 B 组、三七皂苷 R₁ 组比较，仅配伍组（1：2）SOD 活性显著升高，表明产生了协同作用；但 MDA 含量变化不明显，可能是由于 SOD 活性的协同作用并未改变对其的影响；3 个配伍组的改善程度依次为配伍组（1：2）> 配伍组（1：1）> 配伍组（2：1）。另外，虽然丹酚酸 B 未显著增加 SOD 活性，但可改善大鼠学习记忆能力，其原因可能是该成分作用广泛而通过其他机制产生的。在用药总量不变的情况下，配伍组（1：2）SOD 活性较三七皂苷 R₁ 组显著升高，表明在该配伍比例下丹酚酸 B 可增加三七皂苷 R₁ 抗氧化作用。

综上所述，丹酚酸 B、三七皂苷 R₁ 在抗氧化方面存在协同作用，两者配伍比例为 1：2 时对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用，以及对学习记忆能力的改善作用最强。本实验填补了国内外对于这两种成分配伍研究的空白，但同时也观察到两者抗氧化活性和行为学结果并非完全一致，推测可能存在其他协同机制，今后尚需作进一步研究。

参考文献：

[1] 董晓华, 张丹参, 张 力, 等. 蛇床子素对脑缺血/再灌注大鼠海马 LTP 及氨基酸含量的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1267-1271.

[2] Rich N J, Van Landingham J W, Figueiroa S, *et al.* Chronic caloric restriction reduces tissue damage and improves spatial memory in a rat model of traumatic brain injury[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(13): 2933-2939.

[3] Zhang W W, Sun Q X, Liu Y H, *et al.* Chronic administration of Liu Wei Dihuang protects rat's brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system[J]. *Acta Physiol Sin*,

2011, 63(3): 245-255.

[4] 吴兴军, 王逸平, 王 唯, 等. 丹酚酸 B 镁盐对自由基的清除作用和对脂质过氧化的抑制作用 (英文) [J]. 中国药理学报 (英文版), 2000, 21(9): 855-858.

[5] Guo G Q, Li B, Wang Y Y, *et al.* Effects of salvianolic acid B on proliferation, neurite outgrowth and differentiation of neural stem cells derived from the cerebral cortex of embryonic mice [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(6): 653-662.

[6] 林 超, 刘兆国, 钱 星, 等. 丹酚酸 B 在心血管疾病中药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(4): 449-452.

[7] 石少明, 李泽慧, 田书林, 等. 丹酚酸 B 对脑缺血再灌注损伤大鼠纹状体氨基酸类神经递质的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(8): 535-538.

[8] 吴继超, 王 彬, 田 振, 等. 丹酚酸 B 对异丙肾上腺素所致乳鼠心肌细胞肥大的保护作用[J]. 中草药, 2013, 44(17): 2422-2426.

[9] Jack C R Jr, Albert M S, Knopman D S, *et al.* Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 257-262.

[10] Swerdlow R H, Burns J M, Khan S M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(8): 1219-1231.

[11] 唐兰兰, 王淑君, 黎关龙, 等. 三七皂苷单体 R₁ 对低氧二氧化碳肺动脉平滑肌细胞 ERK1/2 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(11): 1216-1221.

[12] 黄小平, 邓常清, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的三种有效成分配伍对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激和 Nrf2/HO-1 途径的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(11): 1596-1601.

[13] 吴 颖, 孙 冰, 肖 静, 等. 三七皂苷 R₁ 对 LPS 诱导的小鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 179-184.

[14] 马 涛, 辛文锋, 张文生, 等. 三七皂苷 R₁ 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 303-307.

[15] Guo Y Q, Qi D M, Hao Y, *et al.* Regulation of sanchinoside R1 on inflammatory T lymphocytes in protecting vascular endothelium lesion in ApoE -/-mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, 28(2): 240-244.

[16] Braun-Dullaes R C, Dietrich S, Schoaff M J, *et al.* Protective effect of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction [J]. *Shock*, 2003, 19(3): 245-251.