

川芎-防风药对通过抗氧化改善大鼠脑缺血再灌注损伤

毛明江， 李秋颖， 郑燕飞， 翁志伟， 罗 杰， 郭 莹*
(浙江中医药大学，浙江 杭州 310053)

摘要：目的 研究川芎-防风体外抗氧化及对大鼠脑缺血再灌注损伤的协同作用。方法 采用 70% 乙醇回流提取得到川芎、防风及不同比例合煎液，1，1-二苯基-2-苦基肼（DPPH）法测定其体外抗氧化活性。SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、川芎组、防风组、川芎防风合用组，通过大脑中动脉栓塞（MCAO）制备脑缺血再灌注损伤模型，观测各组神经功能缺损症状、脑梗死面积百分比及缺血侧脑组织中 SOD、MDA、LD、LDH 水平。结果 川芎-防风比例为 1：2 和 1：1 时，清除 DPPH 自由基具有较好的协同作用；3 个给药组均可改善大鼠神经功能缺损症状，降低脑梗死率及 MDA、LD、LDH 水平，提高 SOD 水平（ $P<0.01$ ）；与防风组比较，合用组 SOD 水平升高（ $P<0.05$ ），MDA、LD、LDH 水平降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）；与川芎组比较，合用组 LD、LDH 水平降低（ $P<0.05$ ）。结论 川芎-防风药对对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的协同保护作用，其机制可能和抗氧化作用有关。

关键词：川芎；防风；抗氧化；DPPH；脑缺血；协同作用

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2021)06-1632-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.047

缺血性脑卒中中具有发病率高等特点，是导致死亡和长期致残的主要原因之一^[1]，给家庭和社会带来沉重的负担^[2]，因此，探寻治疗脑缺血的有效药物迫在眉睫。中医多以中药配伍的形式进行疾病的防治^[3-4]，药对是最简单的中药配伍形式，被历代医家广泛应用。近年来，在脑缺血损伤的防治研究中发现，中药药对的合理运用，可实现中药复方的优化组合，明显减轻缺血半暗带脑组织的损伤以及脑缺血再灌注引起的损伤^[5-6]。

川芎（*Ligusticum wallichii*）具有活血化瘀^[7]、抗氧化、神经保护^[8]等作用，广泛用于脑缺血的治疗，疗效确切。防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata*（Turcz.）Schisch 的干燥块根，具有解表祛风、抗炎抗菌、活血化瘀^[9]、抗氧化^[10]等作用。前期研究中，对中华医典 5.0 系统中治疗脑中风的古代方剂进行频数分析和关联分析，川芎-防风为古代治疗脑中风的最常用药对之一^[11]。目前对于川芎-防风药对配伍治疗脑中风的实验研究尚未见报道，两者是否存在协同作用？协同作用机制如何？是目前要探究的关键问题。本研究从川芎-防风药对体外抗氧化及体内抗脑缺血性损伤两方面开展实验，探究两者是否通过清除自由基和抗氧化作用协同起效。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量（280±20）g，购自浙江中医药大学动物实验研究中心，实验动物使用许

可证号 SYXK（浙）2018-0012。

1.2 药物与试剂 川芎、防风（浙江天道医药有限公司，批号分别为 181003、180902）；95% 乙醇（无锡市晶科化工有限公司，分析纯，批号 20170502）；1，1-二苯基-2-苦基肼（DPPH，上海源叶生物科技有限公司，批号 W10A8E33599）；超氧化物歧化酶（SOD，批号 20181029）、丙二醛（MDA，批号 20181029）、乳酸（LD，批号 20181107）、乳酸脱氢酶（LDH，批号 20181031）、蛋白定量检测试剂盒（批号 20181018）、2，3，5-三苯基氯化四氮唑（2，3，5-Triphenyltetrazolium chloride，TTC，批号 BCBR5462）均购自南京建成生物工程研究所；其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 HWS26 电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）；RE-52 旋转蒸发器（上海嘉鹏科技有限公司）；Spectra Max M3 酶标仪（美国 MD 公司）。

2 方法

2.1 川芎、防风单用及合用对 DPPH 自由基清除率的影响
2.1.1 供试品溶液的配制 精密称取川芎、防风单煎及合煎所用药材 5 g，单煎和合煎组中川芎和防风的质量配比分别为 0：1、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1、1：0，分别加入 70% 乙醇 50 mL，80 ℃ 回流提取 1 h，滤过，即得（0.1 g/mL）。

收稿日期：2019-10-04
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（81503206）；2018 国家级大学生创新创业训练计划（731110V014）；2019 浙江中医药大学学生校级科研基金（22）
作者简介：毛明江（1996—），男，研究方向为脑血管药理学。E-mail：1714784168@qq.com
* 通信作者：郭 莹（1978—），女，博士，副教授，研究方向为中药防治脑缺血疾病。Tel：（0571）86613716，E-mail：guoying@zcmu.edu.cn

2.1.2 DPPH 自由基清除率测定 分别精密移取“2.1.1”中的供试品溶液 800 μL ，加入 70% 乙醇至 2 mL，混匀，稀释 2.5 倍，精密移取 20 μL 于 96 孔板中，再加入 180 μL 50 mg/mL DPPH 溶液，以 70% 乙醇作空白对照，避光反应 30 min，于 517 nm 处测定吸光度，计算清除率，公式为 $[(OD_2-OD_1) / (OD_2-0.036)] \times 100\%$ ，其中 OD_1 为样

品与 DPPH 反应后在 517 nm 处的吸光度， OD_2 为 70% 乙醇与 DPPH 反应后在 517 nm 处的吸光度。

2.1.3 精密度试验 精密移取上述供试品溶液各 20 μL ，加入 DPPH，按“2.1.2”项下方法于 517 nm 波长处测定吸光度，计算清除率，结果见表 1，可知仪器精密度良好。

表 1 酶标法精密度试验结果

样品	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	清除率/%							RSD/%
		1	2	3	4	5	6	平均值	
川芎	8	44.79	45.92	45.78	44.75	42.21	48.74	45.37	4.681
防风	32	50.90	51.51	53.01	48.49	49.75	47.54	50.20	4.016
川芎+防风	8+32	53.52	53.92	52.41	51.91	52.29	52.49	52.75	1.484

2.1.4 稳定性试验 精密移取上述供试品溶液各 20 μL ，于 0、2、4、6 h 按“2.1.2”项下方法在 517 nm 波长处测

定吸光度，计算清除率，结果见表 2，可知 6 h 内样品稳定性良好。

表 2 酶标法稳定性试验结果

样品	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	清除率/%				RSD/%
		0 h	2 h	4 h	6 h	
川芎	8	60.00	56.60	56.00	58.29	3.121
防风	32	42.16	42.82	42.44	41.91	0.922 4
川芎+防风	8+32	48.12	48.68	44.29	45.86	4.361

2.2 川芎、防风单用及合用对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

2.2.1 分组与给药 分别称取川芎 90 g、防风 90 g、川芎和防风各 45 g，70% 乙醇浸泡 30 min 后回流提取 2 次，提取液浓缩至 0.4 g/mL。将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、川芎组（4 g/kg）、防风组（4 g/kg）、川芎防风合用组（4 g/kg），每组 12 只，再灌注同时灌胃给药，每天 1 次，连续 7 d，假手术组和模型组灌胃等量的生理盐水。

2.2.2 大鼠大脑中动脉栓塞模型（MCAO）的建立 将称重后的大鼠用 10% 水合氯醛（350 mg/kg）腹腔注射麻醉，Longa 线栓法^[12]制备 MCAO 模型。缺血 1 h 后松开动脉夹行再灌注，若苏醒后的大鼠出现同侧 Honor 症和对侧前肢提爪，则表示造模成功。

2.2.3 大鼠神经功能评分 参考 Longa^[12] 5 分制评分标准，在大鼠再灌注第 7 天观察并记录神经功能缺损症状，再进行评分。

2.2.4 大鼠脑梗死率计算 第 8 天大鼠断头取脑，用生理盐水漂洗，吸干表面的水分并速冻 20 min，作冠状切片，TTC 溶液 38 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min，利用 Image J 软件计算脑梗死面积和全脑面积，计算出脑梗死面积百分比，脑梗死面积百分比 = $(\text{梗死面积} / \text{全脑面积}) \times 100\%$ 。

2.2.5 脑缺血氧化损伤相关指标检测 取大鼠缺血侧脑组织制备 10% 组织匀浆，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液，按照试剂盒说明书测定脑组织 SOD、MDA、LD、LDH 水平。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析，数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析（One way

ANOVA），组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 川芎、防风单用及合用对 DPPH 自由基清除率的影响

如图 1 所示，在 8 ~ 26.8 mg/mL 范围内，川芎对 DPPH 自由基的清除率随川芎比例增加而逐渐增大，随后保持稳定；在 13.2 ~ 32 mg/mL 范围内，防风对 DPPH 自由基的清除率随防风比例增加而逐渐增大；川芎防风比例为 1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1 时，对 DPPH 清除率具有较好的协同作用，其中以 1 : 2、1 : 1 时协同作用更为明显。

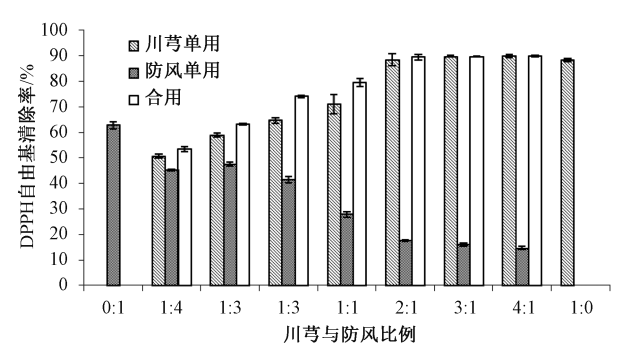


图 1 各组 DPPH 清除率 (n=3)

3.2 各给药组对脑缺血大鼠神经功能和脑梗死面积百分比的影响 与假手术组比较，模型组大鼠神经功能评分及脑梗死面积百分比增加；给药组可改善神经功能缺损症状，降低脑梗死面积百分比（ $P < 0.01$ ）；合用组优于川芎组、防风组（ $P < 0.01$ ）。见图 2、表 3。

3.3 脑组织中脑缺血氧化应激指标

3.3.1 各组大鼠脑组织中 SOD 水平 如图 3 所示，与假

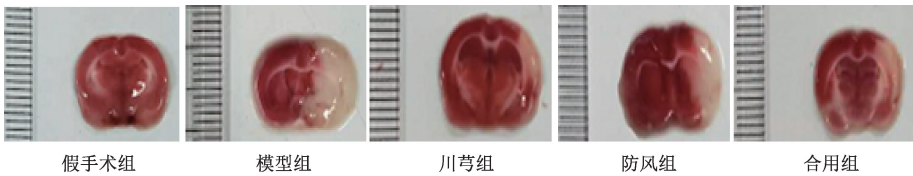


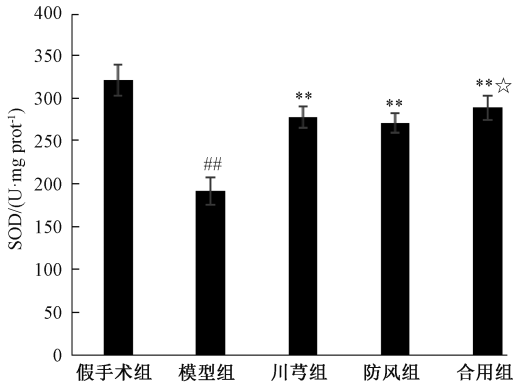
图 2 TTC 染色后各组脑切片

表 3 各组大鼠神经功能评分及脑梗死面积百分比 ($\bar{x}\pm s$)

组别	神经功能评分 (n=12)/分	脑梗死面积 (n=3) 占比/%
假手术组	0	0
模型组	2.58±0.66 ^{##}	27.51±1.85 ^{##}
川芎组	1.82±0.55 ^{**}	17.96±2.75 ^{**}
防风组	1.94±0.82 ^{**}	19.78±1.47 ^{**}
合用组	1.48±0.49 ^{**△△☆☆}	11.27±1.96 ^{**△△☆☆}

注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与川芎组比较,^{△△} $P<0.01$;与防风组比较,^{☆☆} $P<0.01$ 。

手术组比较,模型组大鼠脑组织中 SOD 水平降低 ($P<0.01$);与模型组比较,给药组 SOD 水平升高 ($P<0.01$);与防风组比较,合用组 SOD 水平升高 ($P<0.05$)。



注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与防风组比较,[☆] $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠脑组织中 SOD 水平 ($n=9$)

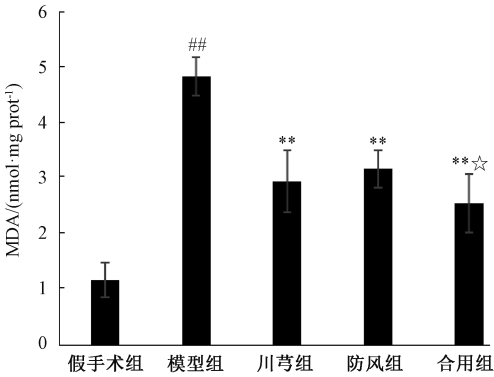
3.3.2 各组大鼠脑组织中 MDA 水平 如图 4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 MDA 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给药组 MDA 水平降低 ($P<0.01$);与防风组比较,合用组 MDA 水平降低 ($P<0.05$)。

3.3.3 各组大鼠脑组织中 LDH 水平 如图 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 LDH 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给药组 LDH 水平降低 ($P<0.01$);与防风组和川芎组比较,合用组 LDH 水平降低 ($P<0.05$)。

3.3.4 各组大鼠脑组织中 LD 水平 如图 6 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 LD 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给药组 LD 水平降低 ($P<0.01$);与川芎组和防风组比较,合用组 LD 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

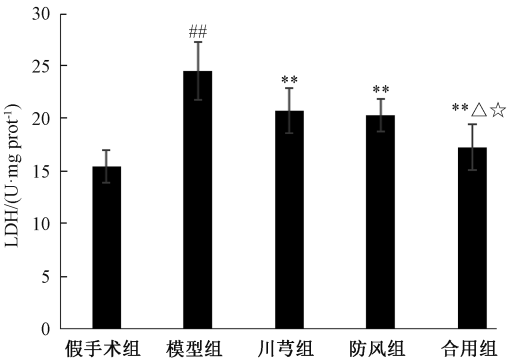
4 讨论

DPPH 是一种稳定的深紫色自由基,通过测定待测物



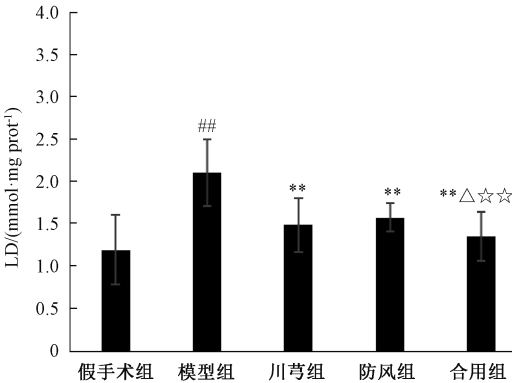
注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与防风组比较,[☆] $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠脑组织中 MDA 水平 ($n=9$)



注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与川芎组比较,[△] $P<0.05$;与防风组比较,[☆] $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠脑组织中 LDH 水平 ($n=9$)



注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与川芎组比较,[△] $P<0.05$;与防风组比较,^{☆☆} $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠脑组织中 LD 水平 ($n=9$)

质与 DPPH 反应后颜色变浅程度来反映该物质清除自由基

的能力和抗氧化能力^[13]。川芎-防风比例为 1：2 和 1：1 时，两者合用对 DPPH 自由基的清除表现出较好的协同作用，表明川芎-防风在这两种配伍比例下具有较好的体外抗氧化协同作用，可为动物体内实验提供配伍比例依据。

脑缺血再灌注损伤是一个复杂的级联反应过程，其发生机制由多种因素共同参与，如过多自由基生成、凋亡基因激活、炎症反应等一系列病理变化，各因素相互影响，最终导致细胞凋亡或坏死，出现脑神经功能缺损等症状^[2]。脑缺血再灌注发生时，局部缺血引发了活性氧簇的大量产生^[14]。SOD 为人体最重要的抗氧化酶之一，过多的氧自由基会消耗大量的 SOD，使其活性降低。SOD 活性下降可导致脑内氧自由基大量堆积，进而攻击生物膜中不饱和脂肪酸，导致 MDA（脂质过氧化产物）大量产生^[15-17]，从而使机体氧化功能紊乱。LDH 是一种和葡萄糖代谢相关的酵素，广泛存在于身体器官组织中。脑缺血发生时，细胞膜因受到损伤而通透性增加，LDH 释放到膜外。由于氧供应被阻断，脑组织细胞只能通过无氧代谢获取能量，产生大量的代谢产物 LD^[18]。

脑缺血动物实验表明，川芎、防风及合用均可改善脑缺血大鼠神经功能的缺损症状、降低脑梗死率、提高脑组织中 SOD 水平，降低 MDA、LD 和 LDH 水平，且川芎-防风合用在抗大鼠脑缺血再灌注损伤方面具有一定的协同效果，其机制可能与清除自由基发挥抗氧化作用有关。

参考文献：

[1] Li L, Chu L, Ren C, *et al.* Enhanced migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with tetramethylpyrazine and its synergistic effect on angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats[J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(13): 871-881.

[2] 万浩芳, 万海同, 周惠芬, 等. 大黄总蒽醌提取物对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *中成药*, 2018, 40(4): 771-776.

[3] 赵 莼. 丹参多酚酸对脑缺血的药理研究进展[J]. *天津药学*, 2018, 30(6): 53-57.

[4] 毛冬雪, 祝美珍, 齐景馨, 等. 中药药对及其有效成分抗脑缺血损伤的研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(13): 3162-3165.

[5] 季梦漂, 李 鑫, 周德生, 等. 中药复方防治脑梗死机制研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(10): 96-99.

[6] 王瑞芳, 李月玲, 杨玉梅. 中药复方制剂抗缺血性脑损伤作用机制研究现状与进展[J]. *包头医学院学报*, 2018, 34(5): 121-123.

[7] 方 翔, 杜建民, 彭 友, 等. 川芎抗脑缺血的神经胶质细胞 Ube3a-as 机制研究[J]. *中国现代医生*, 2017, 55(28): 31-35; 169.

[8] 陈裕琳, 万海同, 周惠芬, 等. 丹参与红花有效成分配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中草药*, 2018, 49(16): 3875-3881.

[9] 刘双利, 姜程曦, 赵 岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2146-2152.

[10] 李 丽, 桂语歌, 时东方, 等. 防风中色原酮类化合物的抗氧化活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(9): 2135-2137.

[11] 施侠威, 林玲香, 毛明江, 等. 从病症结合探讨治疗中风后半身不遂古方的用药规律[J]. *新中医*, 2018, 50(11): 28-32.

[12] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[13] 徐贵华, 张凤梅, 张 磊. 果蔬食品体外抗氧化方法研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(11): 215-219.

[14] 周丽萍, 李 馨, 唐超园, 等. 红景天苷对间充质干细胞缺氧损伤后增殖及抗氧化能力影响的初步研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2016, 40(9): 643-647.

[15] 任新光, 李 昕. 阿托伐他汀、辛伐他汀对脑梗死患者血清 MDA、SOD 的影响[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2013, 16(3): 16-18.

[16] 虞夏晖, 朱雨晴, 王于俊, 等. 大黄蒽醌苷对大鼠脑缺血再灌注损伤及肠道菌群的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(5): 1151-1155.

[17] 汪兴宇, 张宇燕, 万海同, 等. 参芎注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3): 503-506.

[18] 俞建东, 陈 芝, 唐超园, 等. 银杏酮酯缓释微丸多成分体内吸收动力学与体外释药动力学的相关性研究[J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2850-2856.