

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003473

逍遥散对皮质酮诱导的 PC12 损伤模型保护作用及神经保护成分分析验证研究

孙璐¹, 吴亚运², 刘丽娟², 赵亚², 黎雄², 赵瑞芝², 胡巧红¹

(1. 广东药科大学药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第二临床医学院/广东省中医院/广东省中医药科学院, 广州 510006)

【摘要】目的:通过探究逍遥散的神经保护作用及其化学组成,发现逍遥散中可能发挥神经保护作用的有效活性成分。**方法:**采用水提法提取逍遥散,通过高分辨质谱-液相色谱质谱联用仪分析提取液的化学成分;制备逍遥散含药血清;构建皮质酮(Corticosterone, CORT, 400 $\mu\text{mol/L}$)诱导 PC12 细胞损伤模型,检测含药血清对 PC12 细胞增殖率的影响;用 SIMCA 软件进行细胞增殖率-成分含量相关性分析,找到逍遥散中可能具有神经保护作用的化合物。**结果:**与模型组相比,逍遥散含药血清可减轻 CORT 诱导的细胞损伤,并促进细胞增殖($P=0.000$)。液质谱图结合软件分析比对发现,主要药效化合物有:芍药苷、甘草酸、甘草苷、迷迭香酸、没食子酸、2-苯基乙醛、(15Z)-9, 12, 13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid、丹酚酸 B、甘草皂苷 G2 等,单体验证结果显示苯乙醛具有一定的神经保护作用($P=0.000$)。**结论:**证明逍遥散具有神经保护作用,分析并鉴定出 55 种化合物有可能是其发挥作用的主要成分,发现逍遥散中未曾报道的 7 种可能具有神经保护作用的化合物,并验证出苯乙醛具有神经保护作用且此前从未报道。本研究成果将为阐明逍遥散神经保护作用的物质基础提供参考,也为拓展逍遥散的临床应用提供数据支撑。

【关键词】逍遥散;神经保护作用;化学成分**【中图分类号】**R285**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2024-02-21

Study on the protective effect of Xiaoyaosan on corticosterone-induced PC12 injury model and its neuroprotective components

Sun Lu¹, Wu Yayun², Liu Lijuan², Zhao Ya², Li Xiong², Zhao Ruizhi², Hu Qiaohong¹

(1. School of pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University; 2. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Academy of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine))

【Abstract】Objective: To study the neuroprotective effect of Xiaoyaosan and its chemical composition, and to identify the active ingredients in Xiaoyaosan responsible for neuroprotection. **Methods:** Xiaoyaosan was extracted using water, and the chemical composition of extract was analyzed using high-resolution mass spectrometry and liquid chromatography. Moreover, we prepared Xiaoyaosan-containing serum and established a corticosterone (CORT, 400 $\mu\text{mol/L}$) -induced PC12 cell injury model to evaluate the impact of the drug-containing serum on the proliferation rate of PC12 cells. Then we used SIMCA software to analyze the correlations between cell proliferation rate and drug components to identify the compounds in Xiaoyaosan that may have neuroprotective effects. **Results:** Compared with the model group, the drug-containing serum could reduce the cell injury induced by CORT and promote cell proliferation ($P=0.000$). Analysis of liquid chromatography-mass spectrometry data in software showed that the main medicinal compounds were: paeoniflorin, glycyrrhizic acid, liquiritin, rosmarinic acid, gallic acid, 2-phenylacetaldehyde, (15Z)-9, 12, 13-trihydroxy-15-octadecenoic acid, salvianolic acid B, and licorice saponin G2. The experimental results of individual compounds showed that phenylacetaldehyde was effective in neuroprotection ($P=0.000$). **Conclusion:** This research proves that Xiaoyaosan has neuroprotective effect. Fifty-five compounds were identified as potential ingredients involved in neuroprotection. Seven compounds, previously unreported and possessing potential neuroprotective properties, were identified in Xiaoyaosan. In addition, we demonstrate that phenylacetaldehyde has a neuroprotective effect, which has not been reported. The results of this study provide a reference for elucidating the material basis of the neuroprotective effect of Xiaoyaosan, and also provide data support for expanding the clinical application of Xiaoyaosan.

【Key words】Xiaoyaosan; neuroprotective effect; chemical composition

作者介绍: 孙璐, Email: sunlu0109@126.com,

研究方向: 中药药理学, 物质基础研究。

通信作者: 胡巧红, Email: hu_qiaohong@163.com。

基金项目: 广州市科技计划资助项目(编号: 202102020543); 广东省基础与应用基础研究基金资助项目(编号: 2021A1515110846)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1518.026>
(2024-04-22)

经典名方逍遥散出自《太平惠民和剂局方》，由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜八味药材组成，该方在临床上被广泛应用，常被用于治疗经期肝郁气滞、乳腺增生、月经不调、更年期综合征、失眠^[1]、甲状腺功能亢进症^[2]、胃肠功能紊乱、偏头痛^[3]等。现代药理学研究发现逍遥散具有神经保护作用^[4-5]，在治疗阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病，焦虑、抑郁等精神类疾病，以及缺血性脑卒中等神经损伤类疾病方面具有一定的应用前景。然而，逍遥散发挥神经保护作用的物质基础和主要药效成分并不明确，严重制约着它在神经疾病治疗中的拓展应用。

本研究提取逍遥散的有效成分并制备含药血清，通过皮质酮(Corticosterone, CORT)损伤的PC12细胞模型探究其神经保护作用。利用高分辨质谱-液相色谱质谱联用仪分析提取液的化学成分，通过Compound Discoverer软件分析比对各方法提取物中的化学成分，并与细胞实验结果结合分析，预测可能具有神经保护作用的活性成分，并选择对松苓新酸、苯乙醛两种未见神经保护作用报道的化合物进行验证，进一步验证本研究方法可靠性的同时为后续逍遥散活性成分开发及其临床应用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 细胞和动物

PC12细胞购自中国科学院细胞库。Sprague Dawley (SD)雄性大鼠，SPF级，体质量250~280 g，购买于广东维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(粤)2022-0063]，并饲养于本研究院屏障环境动物房[SYXK(粤)2018-0094]内，实验动物合格证编号为：No. 44829700015874。正式实验前适应性饲养7 d。实验方案经广东省中医院实验动物伦理委员会批准(2023032)，实验动物按照3R原则执行。

1.2 药材

北柴胡(2212001)、白芍(220400159)、白术(2212001)、薄荷(2211001)购自岭南中药饮片有限公司。当归(230100491)、甘草(YPB2L0001)购自广州白云山中药饮片有限公司。茯苓(221202)购自广州至信中药饮片有限公司。新鲜生姜购自当地市场。以上药材经广东省中医院丘亮日主管药师鉴定符合《中华人民共和国药典》2020版项下标准。

1.3 主要仪器与试剂

Sartorius电子天平(Sartorius, 德国);超高效液相色谱-

质谱联用仪 Thermo Scientific Q Exactive LC-MS(Thermo, 美国);Milli-Q纯水机(Millipore, 美国);多功能酶标仪(Tecan, 瑞士);倒置荧光显微镜(Evident, 日本)。色谱乙腈、色谱甲醇(Fisher scientific, F22MCM202, 225331);质谱甲酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, G2203293);胰酶、DMEM培养基、PBS缓冲液(美国Grand Island Biological公司, 2468314、8123078、8123181), DMSO(美国MP Biomedical公司, YB0506), 胎牛血清(以色列Biological Industries公司, 货号:04-001-1ACS), 皮质酮(成都华夏化学试剂有限公司, P91622);Western及IP细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司, 032123230418)。芍药苷、苯乙醛、松苓新酸(上海源叶生物科技有限公司, G17A11L111364、S24N11Y132110、P24J10S80630)。

1.4 方法

1.4.1 药材提取 药材烘干后打成细粉，生姜切小块，按处方配比(6:6:6:6:6:3:2:2)称取各药材，加入10倍量水浸泡1.5 h，回流提取1 h，移出药液，药渣用四层纱布加140目筛滤过；提取3次，料液比分别为10:8:8，合并3次煎煮的药液，以4 500 r/min离心10 min，用旋转蒸发仪浓缩，定容到1.151 g/mL，于-80℃冰箱保存备用。

1.4.2 含药血清制备 16只SD大鼠适应性喂养结束后，按照体质量随机分为空白对照组、逍遥散给药组。按人与大鼠等效临床剂量折算，逍遥散的临床等效剂量为0.945 g/kg，按照临床等效剂量10倍计算，制备含药血清时，大鼠灌胃剂量为9.45 g/kg，空白组给予等体积生理盐水。连续灌胃7次，每日2次，末次给药前12 h禁食不禁水，给药2 h后，腹主动脉取血，室温静置1 h后，4℃3 500 r/min离心10 min，取上清，将同组大鼠血清收集混合；56℃水浴灭活30 min，0.22 μm滤膜过滤除菌后，分装于离心管中-80℃保存备用。

1.4.3 细胞试验

1.4.3.1 皮质酮浓度筛选 取对数生长期的PC12细胞，以 5×10^5 个/mL的密度将100 μL细胞悬液接种于96孔板中，每组设置6个复孔。培养24 h后，弃去培养基，分别加入含有800、400、200、100、50、25、12.5 μmol/L的CORT的完全培养基；对照组加入等量的完全培养基，连续培养24 h、48 h后，加入MTT(5 mg/mL)至终浓度为1 mg/mL，继续培养4 h后，吸弃上清液，每孔加入150 μL DMSO，混匀后于490 nm测定吸光度值，计算PC12细胞存活率，筛选建立CORT诱导PC12细胞损伤模型的最佳浓度。实验重复3次。

1.4.3.2 逍遥散含药血清对CORT损伤PC12细胞的影响 逍遥散大鼠含药血清分为：空白组、模型组(400 μmol/L CORT)、高剂量组(400 μmol/L CORT+15%含药血清+5%FBS)、中剂量组(400 μmol/L CORT+7.5%含药血清+5%FBS)、低剂量组(400 μmol/L CORT+3.25%含药血清+5%FBS)、空白血清对照组。前期研究发现不同浓度空白血清对细胞增殖效果影响不明显，故仅选择中剂量空白血清作为对照组。取对数生长期的细胞，以 5×10^5 个/mL的密度将100 μL细胞悬液

接种于96孔板中;培养24 h后,弃去培养基,分别加入预先配制好的药液,空白组加入等量完全培养基,放入培养箱培养;使用倒置荧光显微镜观察细胞形态,并测定48 h的吸光度值,计算细胞存活率,实验重复3次。

1.4.4 逍遥散提取液的化学成分分析

1.4.4.1 样品制备 供试品:适量的逍遥散水提取液加入90%乙醇沉淀2次,12 000 r/min离心5 min,收集上清液,氮气吹干,加入乙腈:0.1%甲酸水(50%:50%)溶液复溶,过0.22 μm微孔滤膜,得到50 mg/mL供试品。

1.4.4.2 液质条件 色谱条件:ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm,1.8 μm)色谱柱,柱温30℃;流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B);梯度洗脱程序如下:0~4 min,4%~10%A;4~20 min,10%~18%A;20~40 min,18%~27%A;40~50 min,27%~42%A;50~55 min,42%~50%A;55~60 min,50%~95%A;60~63 min,95%~4%A;63~65 min,4%A。体积流量为0.3 mL/min;进样量为5 μL。质谱条件:采用ESI离子源;负离子模式;喷雾电压2.5 kV;毛细管温度350℃;鞘气流速40 Arb;辅助气流速15 Arb;扫描模式:Full MS/dd-MS2,扫描范围m/z 120~1800。

1.4.4.3 主要成分与药效实验结果分析 利用Compound Discoverer 3.1软件(ThermoFisher,美国)分析比对液质谱图中的化学成分,再结合文献比对可以得到各成分的保留时间、母离子、子离子以及峰面积,峰面积可表示待测物的含量,面积越大,即含量越高。结合逍遥散含药血清对CORT损伤PC12细胞模型保护作用的实验结果,若该成分含量越高,则可能对神经保护作用的贡献越大。

1.4.5 逍遥散中单体化合物神经保护作用验证 配制40 μmol/L芍药苷、10 μmol/L松苓新酸、100 μmol/L苯乙醛,难溶药液中DMSO含量小于0.1%,设置芍药苷组、松苓新酸组、苯乙醛组。采用400 μmol/L CORT造模PC12细胞,种板方法同“1.4.3.1”,培养24 h后更换药液,继续培养24 h后采用MTT法测定细胞活率。

1.5 统计学方法

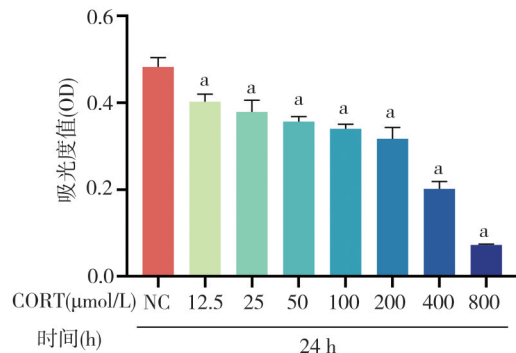
实验数据用GraphPad Prism 8软件进行多组间比较,所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据采用单因素方差分析(Ordinary one-way ANOVA),满足方差齐性采用LSD法进行多重比较,方差不齐则用Dunnett T3法进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

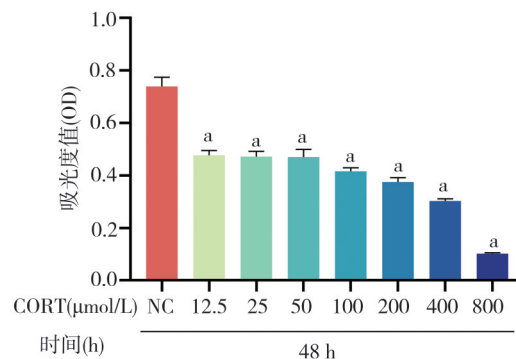
2.1 皮质酮最佳造模浓度筛选

不同浓度CORT作用于PC12细胞24 h、48 h的结果见图1、表1,结果显示12.5~800 μmol/L CORT对PC12细胞存活率呈剂量依赖的抑制作用,48 h后各浓度对细胞的损伤作用加剧。在400 μmol/L CORT作用下,24 h、48 h PC12细胞的存活率分别为41.74%($P=0.000$)、40.98%($P=0.000$),损伤程

度较为合适,差异有统计学意义($P<0.01$),因此选择该浓度作为最佳造模浓度。



A. CORT对PC12细胞24 h作用



B. CORT对PC12细胞48 h作用

注:a,与NC组相比, $P<0.01$

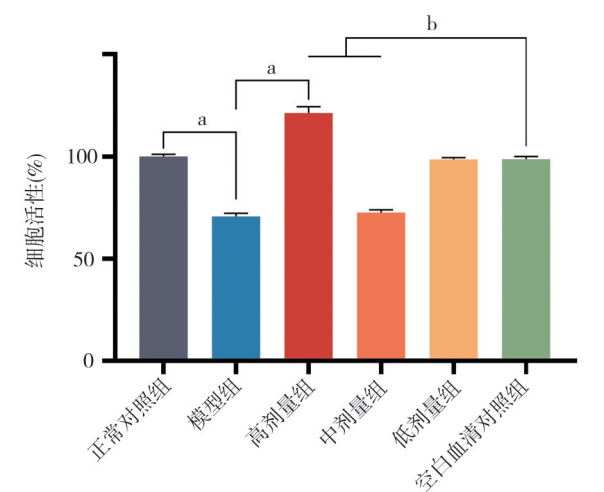
图1 不同浓度CORT对PC12细胞活力的影响($n=6$)

表1 不同浓度CORT处理PC12细胞MTT法测定细胞活力($\bar{x} \pm s$)

组别	MTT(OD490 nm值)	
	24 h	48 h
NC	0.48 ± 0.02	0.74 ± 0.03
12.5 μmol/L CORT	0.40 ± 0.02	0.48 ± 0.02
25 μmol/L CORT	0.38 ± 0.03	0.47 ± 0.02
50 μmol/L CORT	0.36 ± 0.01	0.47 ± 0.03
100 μmol/L CORT	0.34 ± 0.01	0.42 ± 0.01
200 μmol/L CORT	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.02
400 μmol/L CORT	0.20 ± 0.02	0.30 ± 0.01
800 μmol/L CORT	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.00
F值	288.200	469.100
P值	0.000	0.000

2.2 逍遥散含药血清对CORT损伤PC12细胞活力的影响

逍遥散含药血清作用于经400 μmol/L CORT损伤的PC12细胞后,与模型组相比,逍遥散含药血清高剂量组具有保护神经细胞和显著的增殖效果,其细胞增殖率约为121.2%($P=0.000$),结果见图2、表2,细胞形态如图3所示,进一步分析提取液中化学成分含量,推测最有可能发挥神经保护作用的化合物。



注:a,与模型组相比, $P<0.01$;b,与空白血清对照组相比, $P<0.01$
图2 逍遥散含药血清对CORT损伤PC12细胞活力的影响($n=3$)

表2 逍遥散含药血清对CORT损伤PC12细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率 (%)
正常对照组	100.00 ± 0.89
模型组	70.72 ± 1.22
高剂量组	121.20 ± 2.52
中剂量组	72.65 ± 1.08
低剂量组	98.61 ± 0.69
空白血清对照组	98.73 ± 1.03
F 值	385.200
P 值	0.000

2.3 逍遥散化学成分分析
逍遥散提取液的液质图谱见图4。
采用Compound Discoverer 3.0软件比对液质图谱中的化合物,结合文献比对出逍遥散中化学成分见表3。

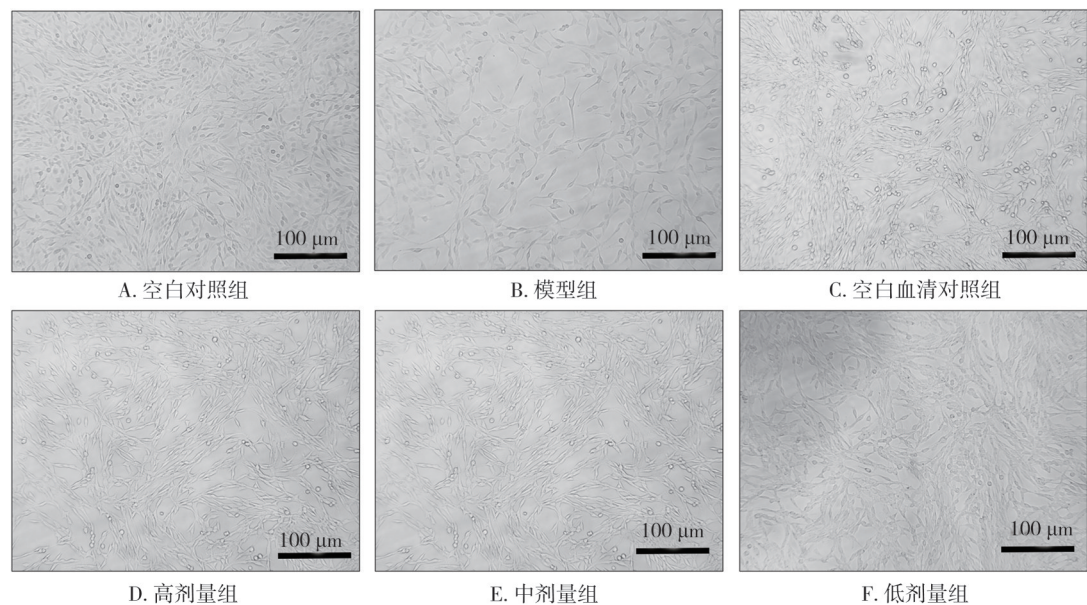


图3 逍遥散含药血清作用于CORT损伤PC12细胞的细胞形态

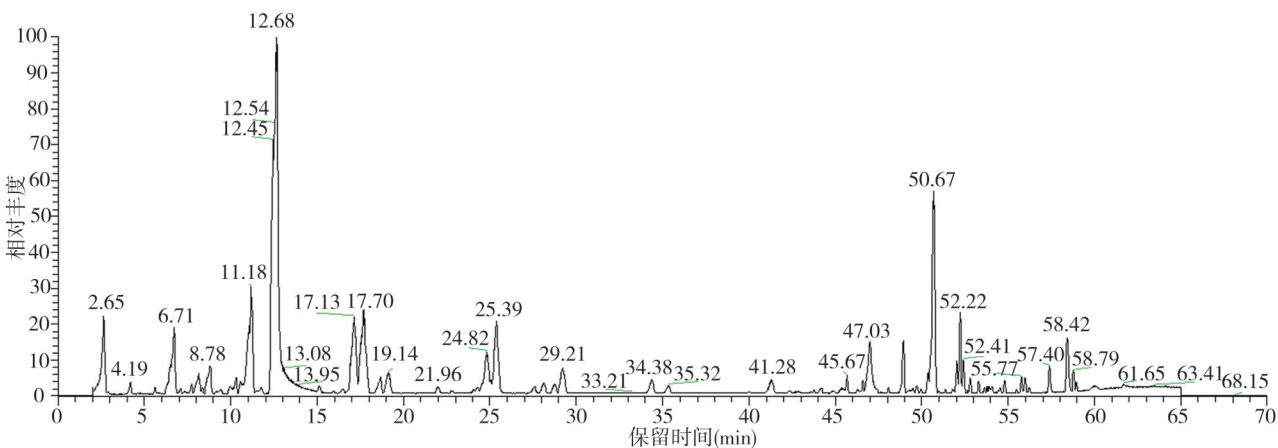


图4 逍遥散提取液负离子模式液质图谱

表 3 逍遥散中主要化合物

峰号	t_R/min	分子式	离子峰(m/z)	离子碎片(MS)	偏差值	化合物	药材来源
1	2.64	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	169.01297[M-H]-1	125.02274, 97.02773, 81.03296	-1.277	没食子酸	白芍
2	6.73	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$	165.0544[M+FA-H]-1	59.01222, 121.06419, 93.03284	-1.317	苯乙醛	柴胡
3	6.73	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$	209.044427[M-H]-1	165.05424, 121.02792, 59.01225	-1.117	Butanedioic acid	甘草
4	12.66	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	525.16083[M+FA-H]-1	121.02779, 165.05415, 327.10800	-0.592	芍药苷	白芍
5	15.13	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	177.05409[M+H-H ₂ O]+1	145.02798, 117.03346, 149.05930	-0.541	阿魏酸	当归
6	17.16	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	417.118847[M-H]-1	255.06577, 135.00716, 166.02585	-0.265	甘草苷	甘草
7	17.68	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	549.16101[M-H]-1	255.06581, 135.00717, 153.01778	-0.294	蔗糖甘草苷/芹糖异甘草苷	茯苓
8	19.14	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	631.16595[M-H]-1	169.01263, 313.05533, 465.13840	-0.893	6'-O-没食子酰芍药苷	白芍
9	22.71	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	207.10088[M+H-H ₂ O]+1	189.09042, 161.09589, 119.08514	-0.681	洋川芎内酯 I	当归
10	24.09	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$	509.1655[M-H]-1	121.02789, 72.81155, 179.07001	-0.949	牡丹皮苷 D	白芍
11	24.58	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	609.181347[M-H]-1	301.07092, 286.04761, 242.05782	-1.153	橙皮苷	薄荷
12	24.82	$\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_{16}$	717.14484[M-H]-1	295.06067, 311.05536, 135.04358	-1.720	丹酚酸 B	薄荷
13	25.07	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	607.16627[M-H]-1	299.05542, 284.03207, 232.53540	-0.643	地奥司明	薄荷
14	25.39	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	163.03845[M+H-H ₂ O]+1	139.98161, 135.04364, 145.02785	-0.491	咖啡酸	薄荷
15	25.35	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.077677[M-H]-1	161.02292, 197.04420, 179.03358	0.429	迷迭香酸	薄荷
16	27.57	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	475.12469[M-H]-1	267.06610, 252.04231, 74.06840	0.105	芒柄花苷	甘草
17	28.74	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	417.119057[M-H]-1	255.06580, 135.00713, 148.01503	-0.055	异甘草苷	甘草
18	29.19	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	255.06578[M-H]-1	119.04856, 135.00714, 153.01781	-0.502	甘草素/异甘草素	甘草
19	34.37	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	637.17627[M+FA-H]-1	283.06158, 268.03729, 131.03235	-1.339	蒙花苷	薄荷
20	38.05	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	271.0611[M-H]-1	151.00217, 119.04861, 93.03288	-0.097	柚皮素	白芍
21	41.31	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	629.18634[M+FA-H]-1	121.02787, 165.05464, 413.42883	-1.190	苯甲酰芍药苷/苯甲酰芍药内酯苷	白芍
22	41.73	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$	301.07166[M-H]-1	286.04764, 164.00993, 242.05759	-0.101	橙皮素	薄荷
23	42.90	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	301.07019[M+H]+1	286.04651, 258.05176, 273.07462	-0.565	高车前素	薄荷
24	45.69	$\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{O}_{21}$	983.4472[M-H]-1	351.05563, 113.02273, 193.03391	-1.609	甘草皂苷 A3	甘草
25	46.46	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	269.08112[M+H]+1	254.05659, 213.09003, 237.05429	0.285	芒柄花黄素	甘草
26	46.60	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{18}$	879.40051[M-H]-1	351.05557, 193.03418, 175.02332	-0.230	22-beta-Acetoxyglycyrrhizin	甘草
27	46.95	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	469.33002[M+H]+1	175.14783, 451.31973, 233.15338	-1.066	Glabric acid	甘草
28	47.02	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$	329.23398[M-H]-1	211.13255, 229.14334, 171.10114	0.383	(15Z)-9, 12, 13-Trihydroxy-15-octa-decenoic acid	薄荷
29	48.92	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	837.38965[M-H]-1	351.05551, 193.03392, 85.02776	-0.700	甘草皂苷 G2	甘草
30	50.70	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	821.39502[M-H]-1	351.05560, 193.03407, 289.07404	-1.000	甘草酸	甘草
31	51.62	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$	277.18015[M+H]+1	177.09064, 145.06445, 137.05933	0.479	6-姜烯酚	生姜
32	51.82	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.06161[M-H]-1	268.03735, 79.95594, 231.59460	0.413	金合欢素/芫花素	薄荷
33	52.04	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	825.46283[M+FA-H]-1	617.40411, 101.02270, 779.45599	-0.470	柴胡皂苷 a	柴胡
34	52.30	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$	193.12172[M+H]+1	137.05937, 147.11653, 93.07027	-0.446	蒿本内酯	当归
35	52.39	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	455.35068[M+H]+1	73.05730, 187.14738, 285.21994	-1.292	松苓新酸	茯苓
36	52.95	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	249.14838[M+H]+1	231.13737, 163.07497, 69.07059	-0.141	白术内酯 III	白术
37	52.95	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	231.13745[M+H]+1	163.07489, 185.13193, 135.04366	-0.336	白术内酯 I	白术
38	53.29	$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$	825.42383[M+H]+1	141.01775, 189.16310, 85.02886	-3.620	乌拉尔甘草皂苷 C	甘草
39	54.06	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	367.118877[M-H]-1	309.03970, 139.00215, 352.09396	0.158	甘草香豆素/姜黄素	甘草/生姜
40	54.79	$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{15}$	807.41602[M-H]-1	627.35156, 583.36139, 351.05524	-0.450	甘草皂苷 B2	甘草
41	55.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	353.103917[M-H]-1	125.02277, 285.11279, 243.10214	0.848	Liconeolignan	甘草
42	56.37	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6$	381.13345[M-H]-1	351.08615, 323.05569, 311.05515	-0.912	甘草利酮	甘草
43	56.62	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$	339.12271[M-H]-1	151.00214, 187.11142, 107.01217	-0.507	Licocoumarone	甘草
44	56.83	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	191.10611[M+H]+1	173.09569, 145.10078, 117.06983	-0.656	丁苯酞	当归
45	57.13	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$	339.12152[M+H]+1	322.24774, 323.23120, 330.82108	-1.180	去甲氧基姜黄素	生姜
46	58.41	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	233.15317[M+H]+1	151.07504, 187.14758, 215.14243	-0.436	白术内酯 II	白术
47	58.69	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$	371.14935[M-H]-1	109.02784, 246.08914, 231.06514	-0.662	四氢姜黄素	生姜
48	58.94	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$	351.088177[M-H]-1	283.09711, 241.08623, 83.01216	0.759	半甘草异黄酮 B	甘草
49	59.78	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$	335.09186[M-H]-1	266.15073, 75.11533, 320.06833	-0.667	Isoderrone	甘草
50	60.68	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$	423.181157[M-H]-1	233.08098, 193.08569, 124.01504	-0.162	Gancaonin E	甘草
51	60.97	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	219.17357[M+H]+1	95.08579, 123.08025, 145.10074	-0.772	Selina-4(14), 7(11)-dien-8-one	白术
52	61.22	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$	483.347417[M-H]-1	72.65161, 405.31638, 337.25113	-6.446	去氢土莫酸	茯苓
53	61.43	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$	421.165347[M-H]-1	352.09406, 365.10162, 309.03967	-0.322	粗毛甘草素 A/2'-hydroxylupalbigenin	甘草
54	61.55	$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4$	485.362927[M-H]-1	277.21667, 75.12524, 338.25394	14.543	土莫酸	茯苓
55	62.46	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$	481.33182[M-H]-1	73.61987, 175.11450, 283.26385	-7.246	多孔菌酸 C	茯苓

2.4 结合细胞实验结果推断逍遥散中发挥神经保护作用的主要成分

逍遥散化学成分峰面积排序见图 5, 本研究组选取峰面积前 25 个化合物, 对其进行神经保护作用相关文献检索, 结果发现, 除苯乙醛、(15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid、甘草皂苷 G2、Butanedioic acid、Glabric acid、松苓新酸、苯甲酰芍药苷和苯甲酰芍药内酯苷, 其他 18 个化合物均已有神经保护相关报道, 可以治疗阿尔茨海默病、帕金森病、缺血性脑卒中等疾病。这些化合物包括: 黄酮类化合物芹糖甘草苷或芹糖异甘草苷、甘草苷、甘草素或异甘草素、地奥司明、蒙花苷、橙皮苷; 萜类化合物芍药苷、甘草酸、白术内酯 I、白术内酯 II、6'-O-没食子酰芍药苷; 皂苷类化合物甘草皂苷 G2 和柴胡皂苷 a; 酚酸类化合物迷迭香酸和丹酚酸

B; 另外, 没食子酸属于多酚类化合物, 洋川芎内酯 I 属于苯酞类化合物, 阿魏酸属于苯丙素类化合物, 咖啡酸属于有机酸类化合物, 这些化合物可能是逍遥散发挥神经保护作用的主要活性成分。

结合上述几种未报道神经保护作用的化合物获得的难易程度, 本研究选择苯乙醛和松苓新酸进行单体化合物神经保护作用的验证, 并用含量最高且神经保护作用已被广泛证实的芍药苷作为对照阳性药进行实验。

2.5 单体化合物神经保护作用验证

单体化合物的神经保护作用如图 6、表 4, 相较于模型组, 芍药苷、苯乙醛、松苓新酸的细胞增殖率分别为 136.46% ($P=0.000$)、120.18% ($P=0.000$) 和 85.23% ($P=0.004$), 可见苯乙醛也具有一定的神经保护作用, 但效果不及芍药苷。

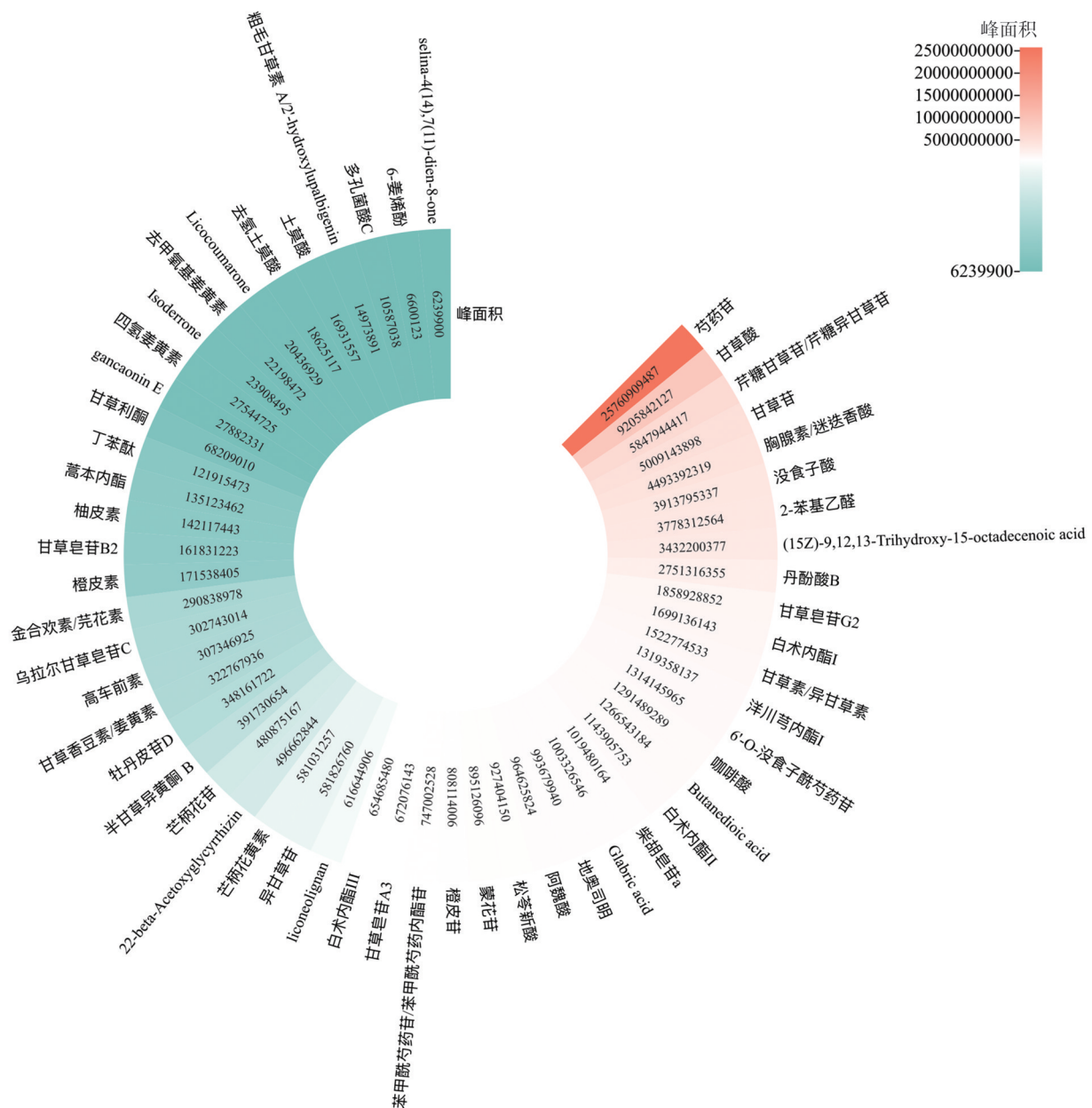
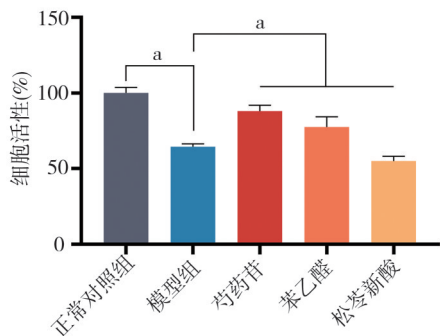


图5 逍遥散中化合物峰面积排序



注:a,与模型组相比, $P<0.01$

图6 逍遥散中单体化合物的神经保护作用($n=6$)

表4 3种化合物对CORT损伤的PC12细胞的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率(%)
正常对照组	100.00 \pm 3.38
模型组	64.57 \pm 1.67
茛菪苳	88.10 \pm 3.48
苯乙醛	77.60 \pm 6.08
松苓新酸	55.03 \pm 2.90
F值	112.500
P值	0.000

3 讨论

神经系统疾病是当代最严重的疾病之一,神经损伤是其共同的发病特点,诸多神经系统疾病都可以通过保护神经细胞和脑组织展开治疗。抑郁患者脑内常伴有神经元萎缩现象,帕金森病通过多种作用机制^[6-7],最终导致发病部位神经元受损。另外缺血性脑卒中是由局部脑区血流供应障碍导致脑组织缺血缺氧而发生病变和坏死,这使得保护神经细胞和促进神经可塑性成为主要的治疗手段。由此可见,大部分神经系统疾病均伴随脑组织不同程度的器质性病变,因此神经保护作用对这些疾病的预防和治疗具有重要意义。

基于神经疾病的复杂性,临床应用的神经保护药物因其作用途径单一可能收效甚微,且存在疗效期短、效果不佳、毒副作用大、长期服用易产生依赖性等问题,中药凭借其多途径、多靶点、多机制、多层次的作用方式,可以从多方面干预神经细胞损伤的病理过程,相比于传统西药的单一化学成分能够更好地治疗神经系统疾病。逍遥散凭借其疗效确切、不良反应少的特点,一直被中医临床广泛沿用至今,近年来,逍遥散的神经保护作用逐渐被人们发现。逍遥散能有效改善焦虑障碍^[8],并能通过不同机制治疗多种疾病伴发的抑郁症^[9-13],同时还具

有治疗阿尔兹海默症和帕金森病的应用前景^[14-15]。但逍遥散发挥神经保护作用的主要药效化合物和作用机制并不清楚,有待进一步研究发现。

本课题组初步研究发现逍遥散中可能发挥神经保护作用的化合物,前25种化合物中包含18种已有神经保护作用报道的化合物,主要分为黄酮类、萜类、皂苷类、酚酸类等。经报道,这些化合物可从抑制神经细胞凋亡^[16]、促进神经细胞增殖^[17,18]、抗氧化应激损伤^[19]、抑制炎症反应^[20]、调节NO合成^[21]、保护线粒体功能^[22]、抑制兴奋性神经毒性、抑制细胞内钙离子超载^[23]及调控自噬^[24-25]等方面发挥疗效。

此外,苯乙醛、(15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid、甘草皂苷 G2、Butanedioic acid、Glabric acid、松苓新酸、苯甲酰茛菪苳和苯甲酰茛菪内酯苳这几种化合物未见神经保护相关报道,因苯乙醛廉价易得,故本研究仅进一步验证了苯乙醛的神经保护作用,其他成分有望在后续实验中继续探究。另外,逍遥散中已经报道具有神经保护作用的化合物中,仅有丁苯酞是目前已经上市的药物,它是继青蒿素、双环醇之后,我国第三个拥有自主知识产权的国家Ⅰ类新药,也是中国脑血管领域第一个国产创新药。其他多种化学成分的神保护作用陆续也有研究报道,有望最终成为上市药物造福数以万计的患者,帮助他们减轻病痛和身心负担。

本研究将细胞药效指标结合成分分析结果进行相关性分析,具有方便快捷的特点,且通过研究列举出逍遥散中主要提供神经保护作用的化合物,其中部分已有文献报道,这也显示出本研究方法的准确性。但是采用单一细胞模型的实验结果进行相关性分析得到的数据缺乏普适性,后续应采用多种细胞模型和多种检测指标进行实验,综合各类细胞模型相关性分析的结果,得到逍遥散中为发挥神经保护作用贡献较大的化合物,并采用动物模型进行化合物单体验证。另外,为了更好地发现提取中多种溶出成分的含量和神经保护效果的相关性,可以采用多种提取方法,比较其中不同化合物的含量,结合不同提取方法逍遥散的神经保护作用,推测复方中发挥作用的主要化合物。然而,具有神经保护作用的化合物结构种类多样,其作用机制也非常复杂,化合物的作用靶点和构效关系还有待进一步探讨,后续可以采用分子对接技术进行研究,以期促进神经保护药物的研发。

参 考 文 献

- [1] 丁竹松. 加味逍遥散的临床应用体会[J]. 大家健康(学术版), 2014, 8(8): 52-53.
- Ding ZS. Clinical application experience of Jiawei Xiaoyao Powder[J]. Health, 2014, 8(8): 52-53.
- [2] 张明瑞, 王 镁. 王镁教授运用富碘中药联合逍遥散加减治疗甲亢经验总结[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(4): 129-133.
- Zhang MR, Wang M. Summary of professor Wang Mei's experience in treating hyperthyroidism with iodine-rich traditional Chinese medicine combined with Xiaoyao Powder[J]. Asia Pac Tradit Med, 2023, 19(4): 129-133.
- [3] 俞 芹. 临床应用逍遥散的体会[J]. 世界中医药, 2009, 4(1): 40-41.
- Yu Q. Experience of clinical application of Xiaoyao Powder[J]. World Chin Med, 2009, 4(1): 40-41.
- [4] Chen JB, Lei CF, Li XJ, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula Xiaoyaosan in the treatment of depression[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 925514.
- [5] 石博宇, 刘 蓉, 饶志粒, 等. 逍遥散对 LPS 所致大鼠神经损伤的保护作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 50-56.
- Shi BY, Liu R, Rao ZL, et al. Neuroprotective effect and mechanism of Xiaoyaosan on lipopolysaccharide-induced nerve injury in rat[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(5): 50-56.
- [6] 张莹林, 姚俊岩. 神经炎症在阿尔茨海默病中作用的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2022, 43(1): 90-94.
- Zhang YL, Yao JY. Research advances of the role of neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Int J Anesthesiol Resusc, 2022, 43(1): 90-94.
- [7] Nakamura T, Oh CK, Liao LJ, et al. Noncanonical transnitrosylation network contributes to synapse loss in Alzheimer's disease[J]. Science, 2021, 371(6526): eaaw0843.
- [8] 杨厚增, 赵鸿君, 任 路. 中医对焦虑障碍证候的经典名方治疗及其机理研究[J]. 中华中医药学刊, 2023: 1-12.
- Yang HZ, Zhao HJ, Ren L. A study on the treatment of anxiety disorders by classical Chinese medicine and its mechanism[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023: 1-12.
- [9] 吴佳佳, 卞庆来, 丁凤敏, 等. 逍遥散抗抑郁作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023: 1-11.
- Wu JJ, Bian QL, Ding FM, et al. Research progress on antidepressant effect of Xiaoyaosan[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023: 1-11.
- [10] 张碧涛, 李媛媛, 辛泰然, 等. 逍遥散治疗抑郁症的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 273-282.
- Zhang BT, Li YY, Xin TR, et al. Xiaoyaosan in treatment of depression: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(23): 273-282.
- [11] 刘加河, 洪冠宇, 纪春敏, 等. 逍遥散治疗糖尿病合并抑郁症的疗效观察[J]. 糖尿病新世界, 2018, 21(10): 77-78, 81.
- Liu JH, Hong GY, Ji CM, et al. Observation on the therapeutic effect of Xiaoyao Powder on diabetes mellitus complicated with depression[J]. Diabetes N World, 2018, 21(10): 77-78, 81.
- [12] 李云开. 逍遥散加减治疗中风后抑郁症的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2013, 11(31): 345-346.
- Li YK. The observation of clinical effect of post stroke depression treated by appropriate[J]. Guide China Med, 2013, 11(31): 345-346.
- [13] 李劲松. 晚期癌症患者治疗中逍遥散抗抑郁的疗效观察[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(24): 3267-3268.
- Li JS. Observation on antidepressant effect of Xiaoyaosan in the treatment of advanced cancer patients[J]. J Med Theory Pract, 2013, 26(24): 3267-3268.
- [14] 李琼峰, 杜义斌, 赵 义. 立论于肝脾同治研究逍遥散对老年性痴呆模型鼠行为学及神经可塑性的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 1124-1127.
- Li QF, Du YB, Zhao Y. Effect of Xiaoyao Powder on praxiology and neural plasticity in rats with Alzheimer's diseases from simultaneous treatment in liver and spleen theory[J]. World Chin Med, 2017, 12(5): 1124-1127.
- [15] 富文俊, 曹国平, 富丽俊. 慢性应激触发帕金森病神经损伤的分子生物学机制及调肝方药逍遥散保护作用的探讨[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 239-242.
- Fu WJ, Cao GP, Fu LJ. The study on molecular mechanism of chronic stress triggering Parkinson's disease and the effect of Tiaogan compound[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(1): 239-242.
- [16] More SV, Choi DK. Atractylenolide-I protects human SH-SY5Y cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1012.
- [17] Wu QL, Cheng YQ, Liu AJ, et al. Formononetin recovered injured nerve functions by enhancing synaptic plasticity in ischemic stroke rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 525(1): 67-72.
- [18] Liang K, Ye Y, Wang Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Neurol Sci, 2014, 344(1/2): 100-104.
- [19] Chen X, Zhang M, Ahmed M, et al. Neuroprotective effects of ononin against the aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats[J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(8): 4232-4239.
- [20] Zhu XB, Liu JK, Chen SJ, et al. Isoliquiritigenin attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment through antioxidant and anti-inflammatory activity[J]. BMC Neurosci, 2019, 20(1): 41.
- [21] Ha SK, Moon E, Lee P, et al. Acacetin attenuates neuroinflammation via regulation the response to LPS stimuli *in vitro* and *in vivo*[J]. Neurochem Res, 2012, 37(7): 1560-1567.
- [22] Que RF, Zheng JL, Chang ZH, et al. DL-3-n-butylphthalide rescues dopaminergic neurons in Parkinson's disease models by inhibiting the NLRP3 inflammasome and ameliorating mitochondrial impairment[J]. Front Immunol, 2021, 12: 794770.
- [23] Lin TY, Huang WJ, Wu CC, et al. Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88644.
- [24] Huang LB, Huang KJ, Ning H. Autophagy induction by hispidulin provides protection against sevoflurane-induced neuronal apoptosis in aged rats[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 460-468.
- [25] Huang LB, Huang KJ, Ning H. Hispidulin prevents sevoflurane-Induced memory dysfunction in aged rats[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 412-422.

(责任编辑:李青颖)