

## 复方姜参胶囊成分分析及对缺血性脑卒中大鼠的保护作用

崔小丽<sup>1</sup>, 山媛<sup>1</sup>, 马妮<sup>1</sup>, 赵瑞<sup>1</sup>, 柴春艳<sup>2\*</sup> ( <sup>1</sup>陕西省人民医院神经内一科, 西安 710068; <sup>2</sup>陕西省人民医院老年病院西院一病区; \* 通讯作者, E-mail: swallowchai3412@163.com)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 方法分析复方姜参胶囊 (FFJSC) 成分, 探讨其对大鼠缺血性脑卒中模型的保护作用。方法 ①建立 HPLC 法分析 FFJSC 的成分姜黄素、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、桂皮醛、丹酚酸 B。②采用双侧颈总动脉永久性结扎法制备缺血性脑卒中模型, 120 只大鼠分两个实验 (每个实验 60 只), 每个实验随机分为: 假手术组、模型组、阳性对照 (吡拉西坦) 组、大剂量及小剂量 FFJSC 组, 每组 12 只。药物灌胃处理 8 周后, 采用干湿重法测定大鼠脑组织含水量; 采用 ELISA 法检测各组大鼠脑组织和血清炎症因子 ICAM-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的表达水平。结果 ①建立了 FFJSC 的 HPLC 分析方法, 各成分在相应浓度范围内, 线性关系良好 ( $r \geq 0.9996$ ); 各成分平均回收率在 98.02%~99.36% 之间。3 批制剂中成分姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 等, 其平均含量分别为 6.97 mg/g, 0.63 mg/g, 5.07 mg/g, 6.32 mg/g, 4.75 mg/g; 其 RSD 分别为 1.20%, 1.09%, 0.89%, 1.18%, 1.22%。②与假手术组比较, 模型组大鼠的脑组织含水量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 小剂量 FFJSC 组、大剂量 FFJSC 组、阳性对照组大鼠脑组织的含水量明显降低 ( $P < 0.01$ )。与假手术组比较, 除阳性对照组脑组织 TNF- $\alpha$  外, 模型组、大、小剂量 FFJSC 组和阳性对照组大鼠的血清和脑组织中 ICAM-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 除小剂量组脑组织 IL-6 外, 大、小剂量 FFJSC 组和阳性对照组血清和脑组织中 ICAM-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 建立了复方姜参胶囊 HPLC 分析方法, 可作为本制剂的质量控制方法。复方姜参胶囊可以通过降低炎症细胞因子的表达、减轻脑水肿从而达到对大鼠脑缺血损伤保护作用。

**关键词:** 复方姜参胶囊; 缺血性脑卒中; 炎症因子; 高效液相色谱法; 功效成分; 神经保护

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-6611(2020)09-0948-07 DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2020.09.012

### Analysis of components of Fufang Jiangshen capsule and its protective effect against ischemic stroke in rats

CUI Xiaoli<sup>1</sup>, SHAN Yuan<sup>1</sup>, MA Ni<sup>1</sup>, ZHAO Rui<sup>1</sup>, CHAI Chunyan<sup>2\*</sup> ( *Department of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; No.1 Ward of West Hospital of Geriatric Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital; \*Corresponding author, E-mail: swallowchai3412@163.com* )

**Abstract:** *Objective* To establish a HPLC method for analyzing the components of Fufang Jiangshen capsules (FFJSC) and to explore its protective effect on rat model of ischemic stroke. *Methods* HPLC method was established to analyze the components of FFJSC, such as curcumin, hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, cinnamaldehyde and salvianolic acid B. The ischemic stroke model was made by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. Totally 120 rats were randomly divided into two experiments (60 rats in each experiment). Sixty rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control (piracetam) group, high dose FFJSC group and low dose FFJSC group. After 8 weeks of drug treatment, the wet weight of rat brain tissues was determined by dry-wet weight method. The expression levels of ICAM-1, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in rat brain tissues and serum were determined by ELISA.

*Results* HPLC analysis method of FFJSC was successfully established. The linear relationship of each component was good in the corresponding concentration range ( $r \geq 0.9996$ ). The average recovery of each component was 98.02%~99.36%. The average content of curcumin, ferulic acid, cinnamaldehyde, hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in of 3 batches of preparation was 6.97 mg/g, 0.63 mg/g, 5.07 mg/g, 6.32 mg/g, and 4.75 mg/g, respectively. And the RSD was 1.20%, 1.09%, 0.89%, 1.18%, and 1.22%, respectively. Compared with sham operation group, the wet weight of rat brain tissues in model group was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the wet weight of rat brain tissues was decreased significantly in low dose FFJSC group, high dose FFJSC group and positive control group ( $P < 0.01$ ). Compared with sham operation group, the expression levels of ICAM-1, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in serum and brain tissues in model group, high dose FFJSC group and low dose FFJSC group and positive control group, except the expression of TNF- $\alpha$  in brain tissue for positive control group, were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the expression levels of ICAM-1, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in serum and brain tissue in high dose FFJSC group and low dose FFJSC group and positive control group, except the expression of IL-6 in brain tissue in low dose FFJSC group, were significantly reduced ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). *Conclusion* HPLC analysis method for this preparation is successfully established, and the method

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2017SF-264); 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2015SF209)

作者简介: 崔小丽, 女, 1983-11 生, 硕士, 主治医师, E-mail: lili6416669@126.com

收稿日期: 2020-05-06

can be used as a quality control method for this preparation. This preparation has protective effect against ischemic stroke in rats by reducing the expression levels of inflammatory cytokines and alleviating brain edema.

**Key words:** Fufang Jiangshen capsule; ischemic stroke; inflammatory factors; high performance liquid chromatography; components; nerve protection

脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)是我国中老年人常见的脑血管疾病,由多种原因引起的突然发病的一种脑血液循环相关障碍性疾病,具有高发病率、高死亡率和高致残率的特点。目前临床上主要采取抗凝、抗血小板聚集、降低颅内压、控制脑水肿、保护神经细胞等多种治疗措施。脂蛋白相关磷脂酶2、炎症因子 ICAM-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等在心脑血管病发生和发展过程中的作用已经引起人们的关注,可诱发并加重动脉粥样硬化,引发急性损害,且对病情严重程度也有一定的评估作用<sup>[1]</sup>。研究报告炎症细胞因子等是造成脑缺血后第二次损伤的重要原因<sup>[2]</sup>。复方姜参胶囊为本院院内制剂,对脑卒中患者临床应用多年,疗效显著。为更好服务于临床患者,本文通过建立脑卒中大鼠模型及制剂中成分的 HPLC 定量分析方法,旨在证实复方姜参胶囊对脑卒中大鼠的保护作用,并通过炎症因子、脑含水量以及制剂物质基础分析等指标探讨其相关作用机制,为应用提供理论基础。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

瑞士 Tecan sunrise 酶标仪,北京世贸远东科学仪器有限公司; TGL-16gR 型高速台式冷冻离心机,上海圣科仪器设备有限公司; HWT-6B 型恒温水浴箱,天津市恒奥科技发展有限公司; DY89-I 型电动玻璃匀浆机,上海将来实验设备有限公司。高效液相色谱仪(UFLC-20AD-PDA),日本岛津公司; 色谱柱: Kromasil C18 柱(5  $\mu$ m 4.6 mm $\times$ 250 mm,瑞典 NOBEL 公司); 电子分析天平,型号 ME235S,德国塞多利斯公司; 超声波发生器,型号 KQ-300DE 数控,昆山超声仪器有限公司。

### 1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠。体质量 180-220 g,雌雄各半(由西安交通大学医学实验动物中心提供,许可证编号: SCXK(陕)2008-004)。

### 1.3 试剂试药

复方姜参胶囊(由陕西人民医院制剂室制备); 阳性对照药: 吡拉西坦片(批号 20190912; 南京白敬宇制药有限责任公司); 试剂: 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 购于南京卡米洛生物工程有限公司; 细胞

间黏附分子-1(ICAM-1)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8),测定试剂盒均购自上海心语生物科技有限公司; 水合氯醛,批号 190405,分析纯,西安天茂化工有限公司。甲醇、乙腈均为 HPLC 级,美国 Honeywell 公司; 其余试剂为分析纯; 对照品: 姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B,纯度均为 98.0%,均购自宝鸡市晨光生物科技有限公司; 复方姜参胶囊(批号 20180901、20180902、20180903,规格 0.3 g/粒),为陕西省人民医院药剂科研制。

## 2 实验方法

### 2.1 HPLC 法测定复方姜参胶囊 5 个成分

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱: 0-20 min, A 5% $\rightarrow$ 10%; 20-40 min, A 10% $\rightarrow$ 30%; 40-60 min, A 30% $\rightarrow$ 70%; 60-80 min, A 70% $\rightarrow$ 100%。记录时间为 80 min。流速: 1.0 ml/min; 姜黄素、羟基红花黄色素 A 检测波长为 403 nm; 阿魏酸、桂皮醛、丹酚酸 B 检测波长为 300 nm; 进样量为 10  $\mu$ l,柱温为 35  $^{\circ}$ C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 8.00 mg 置于 100 ml 量瓶中加 70% 甲醇至刻度为 A 溶液; 另再分别称取姜黄素对照品 8.00 mg、丹酚酸 B 对照品 6.00 mg、羟基红花黄色素 A 对照品 8.00 mg、桂皮醛对照品 6.00 mg 置于 10 ml 量瓶中,加 A 溶液至刻度,摇匀,即得 5 种物质混合对照品溶液为 B 溶液,作为储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 ml,称定质量,超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz) 1 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例,分别制备缺姜黄、川芎、桂枝、丹参、红花等制剂,再分别按“2.1.3”项制备阴性对照溶液。

2.1.5 标准曲线及线性范围 分别精密量取储备液 B 溶液 0.01、0.05、0.10、0.50、1.0 ml,分别置于各个 1 ml 的量瓶中,加 70% 甲醇定容至 1 ml,分别得混合对照品溶液 1、2、3、4、5。进样测定,记录峰

面积,考察对照品浓度(x)与峰面积(y)的线性关系。

2.1.6 精密度实验 取混合对照品溶液3,连续测定6次,进样测定峰面积,计算RSD值。

2.1.7 稳定性实验 使用混合对照品溶液3,分别于0,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,12.0,24h,进样测定峰面积,计算RSD值。

2.1.8 重复性实验 称取样品(批号20180901)1g,精密称定,按上述2.1.3项方法制备6份供试品溶液及按2.1.1项色谱条件测定。

2.1.9 加样回收率 称取样品(批号20180901)1g,精密称定,精密称定6份,分别添加对照品溶液(分别取对照品姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素A、丹酚酸B适量,制成浓度为每1ml 70%甲醇分别含7.00,0.60,5.00,6.30,4.70mg混合对照溶液,分别添加0.8,1.0,1.2ml对照品溶液),依据上述2.1.3项方法制备供试品溶液与2.1.1项色谱条件测定。

2.1.10 样品含量测定 测定3批样品中姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素A、丹酚酸B的含量,按照2.1.3项方法制备供试品溶液与2.1.1项色谱条件测定。

### 2.2 缺血性脑卒中大鼠的保护作用

2.2.1 建立模型 依据文献[3]方法,采用双侧颈总动脉永久性结扎法(2 vessels obstruction, 2-VO)制备大鼠缺血性脑卒中模型。大鼠术前禁食12h,禁水4h;0.3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉;仰卧位固定,常规备皮碘伏消毒,颈部正中切开皮肤,钝性分离各层组织,避免损伤迷走神经和气管;暴露并分离双侧颈总动脉,5号丝线结扎双侧颈总动脉,然后逐层缝合。手术过程中保持室温在24-25℃,大鼠肛温在37℃。术后第3周开始采用Morris水迷宫实验对模型大鼠进行筛选,测定各慢性脑缺血大鼠的平均潜伏期,计算(平均潜伏期-参考值)/平均潜伏期的比值,当该值大于0.2时,认为大鼠出现认知障碍,判定慢性脑缺血模型成功<sup>[4]</sup>。

2.2.2 制备药物 复方姜参胶囊由本院药剂科制取,处方由姜黄、地龙、川芎、远志、桂枝、红花、丹参等组成。临用前用蒸馏水将药物粉末制成含不同浓度的均匀混悬液(浓度为0.150,0.450g/ml),置于4℃下冷藏备用。

2.2.3 分组及给药 实施假手术的12只大鼠设为假手术组(手术操作同2.2.1项,但不结扎双侧颈总动脉)。选48只造模成功的大鼠随机分为4组,每组

12只:模型组、小剂量复方姜参胶囊组(1.5g/kg)、大剂量复方姜参胶囊组(4.5g/kg)、阳性对照组(0.18g/kg),每组12只。阳性药及复方姜参胶囊小剂量组的大鼠等效剂量按60kg体质量成人给药剂量(0.06g/kg,0.5g/kg)的3倍折算。每天灌胃给药1次,连续8周。假手术组和模型组灌胃给予等量(10ml/kg)生理盐水。本实验共120只大鼠,60只大鼠用于检测血清炎症因子与脑组织含水量;60只大鼠用于检测脑组织炎症因子。

### 2.2.4 指标检测

2.2.4.1 血清炎症因子 末次给药后,大鼠眼眶采血,分离血清,采用ELISA法按照相应试剂盒检测血清中TNF-α、ICAM-1、IL-6、IL-8含量<sup>[5]</sup>。

2.2.4.2 脑组织含水量 完成2.2.4.1项后,以过量乙醚麻醉处死大鼠(每组12只),立即解剖,取出完整的脑组织,分别称定湿质量和干质量(60℃,干燥3h),计算脑组织含水量(=脑湿质量-脑干质量<sup>[3]</sup>)。

2.2.4.3 脑组织炎症因子 末次给药后,断头取脑(取剩余的每组12只),冰水浴中用0.9%氯化钠溶液制成10%匀浆[以脑组织(g):生理盐水(ml)为1:9比例在匀浆机中匀浆]。3000r/min离心20min,取上清液于-20℃以下低温保存。采用相应试剂盒检测脑组织中TNF-α、IL-6、ICAM-1、IL-8含量<sup>[6]</sup>。

2.2.5 统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验;以P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HPLC法测定复方姜参胶囊功效成分

3.1.1 标准曲线及线性范围 各成分在相应浓度范围内,线性关系良好(见表1)。

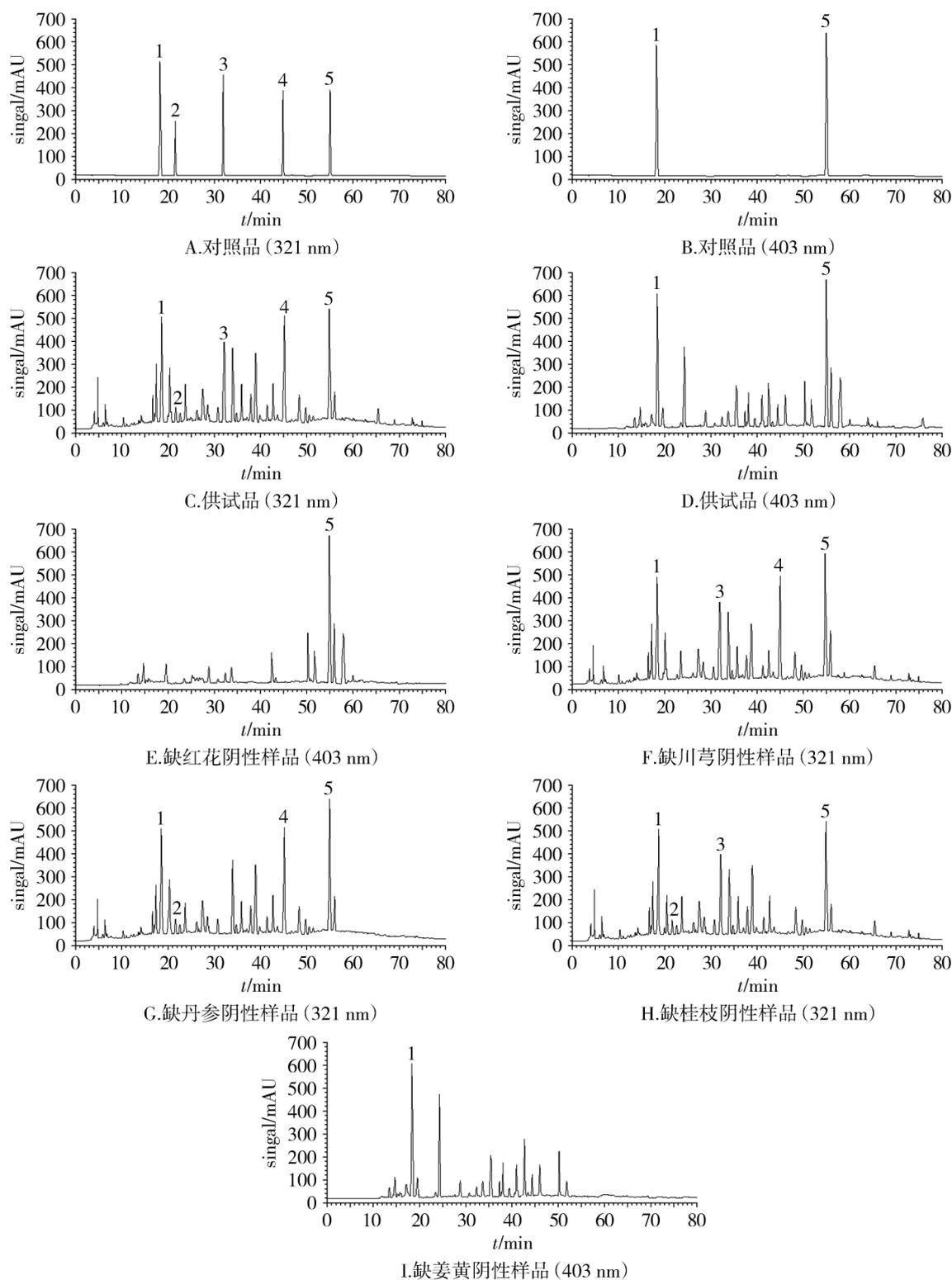
表1 对照品的线性方程及其浓度范围

Table 1 Linear equations and their concentration range of the reference substance

对照品名称	线性范围(μg/ml)	线性方程	R <sup>2</sup>
姜黄素	7.84-784.00	y=79 804x-88 448	0.999 7
阿魏酸	0.78-78.40	y=81 577x-13 611	0.999 7
桂皮醛	5.88-588.00	y=30 988x-48 642	0.999 5
羟基红花黄色素A	7.84-784.00	y=5 510.6x-12 161	0.999 4
丹酚酸B	5.88-588.00	y=10 771x+15 808	0.999 3

3.1.2 专属性实验 按上述色谱条件分别进样缺姜黄、川芎、桂枝、丹参、红花阴性对照溶液、供试品

溶液、对照品溶液 结果 阴性对照均无干扰,专属性强(见图1)。



1. 羟基红花色素 A; 2. 阿魏酸; 3. 丹酚酸 B; 4. 桂皮醛; 5. 姜黄素

图1 对照品、供试品和阴性样品 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of reference , test substance and negative control samples

3.1.3 精密度实验 精密度实验结果显示,姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 的 RSD 分别为 1.09%、1.03%、0.84%、1.01% 和 1.15%,说明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性实验 稳定性结果显示,姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 的 RSD 分别为 1.12%、1.21%、0.97%、1.31% 和 1.18%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.1.5 重复性实验 重复性结果表明,姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 的含量、RSD 结果见表 2,表明本方法重复性良好。

3.1.6 加样回收率实验 姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B(批号 20180901 样品含量见 3.1.5 项)的平均回收率和 RSD 见表 3,结果表明本方回收率良好。

表 2 复方姜参胶囊 5 个成分重复性测定结果

Table 2 Repeatability test results of five components in Fufang Jiangshen capsules

成分名称	成分含量( mg/g)						平均值 ( mg/g)	RSD ( %)
	1	2	3	4	5	6		
姜黄素	6.963 1	6.975 5	6.958 3	6.967 2	6.976 3	6.956 9	6.966 2	1.20
阿魏酸	0.632 2	0.633 4	0.634 2	0.633 7	0.632 9	0.633 5	0.633 3	1.09
桂皮醛	5.068 3	5.068 1	5.068 4	5.067 7	5.069 8	5.057 6	5.066 7	0.89
羟基红花黄色素 A	6.334 5	6.323 4	6.326 5	6.334 6	6.344 3	6.336 6	6.333 3	1.18
丹酚酸 B	4.744 9	4.746 5	4.747 3	4.757 1	4.746 6	4.757 8	4.750 0	1.22

表 3 加样回收率测定结果

Table 3 Sample recovery test results

化合物名称	取样量( mg)	原含量( mg)	添加量( mg)	测定量( mg)	回收率( %)	平均回收率( %)	RSD( %)
姜黄素	0.998 5	6.955 8	5.60	12.401 6	97.25	98.27	1.13
	0.998 7	6.957 1	5.60	12.399 5	97.18		
	0.994 2	6.925 8	7.00	13.901 1	99.65		
	0.991 5	6.907 0	7.00	13.880 6	99.62		
	0.996 6	6.942 5	8.40	15.173 2	97.98		
	0.997 8	6.950 9	8.40	15.178 9	97.95		
阿魏酸	0.998 5	0.632 4	0.48	1.103 6	98.18	98.98	0.75
	0.998 7	0.632 5	0.48	1.114 3	100.38		
	0.994 2	0.629 6	0.60	1.223 2	98.93		
	0.991 5	0.627 9	0.60	1.220 4	98.75		
	0.996 6	0.631 1	0.72	1.342 6	98.81		
	0.997 8	0.631 9	0.72	1.343 3	98.80		
桂皮醛	0.998 5	5.059 1	4.00	9.000 2	98.53	99.36	0.71
	0.998 7	5.060 1	4.00	9.000 1	98.50		
	0.994 2	5.037 3	5.00	10.011 2	99.48		
	0.991 5	5.023 6	5.00	10.002 1	99.57		
	0.996 6	5.049 5	6.00	11.060 1	100.18		
	0.997 8	5.055 6	6.00	11.050 3	99.91		
羟基红花黄色素 A	0.998 5	6.323 8	5.04	11.179 8	96.35	98.02	1.41
	0.998 7	6.325 1	5.04	11.171 2	96.15		
	0.994 2	6.296 6	6.30	12.506 6	98.57		
	0.991 5	6.279 5	6.30	12.506 5	98.84		
	0.996 6	6.311 8	7.56	13.807 5	99.15		
	0.997 8	6.319 4	7.56	13.806 7	99.04		
丹酚酸 B	0.998 5	4.742 9	3.76	8.403 3	97.35	98.64	1.11
	0.998 7	4.743 8	3.76	8.404 5	97.36		
	0.994 2	4.722 5	4.70	9.406 6	99.66		
	0.991 5	4.709 6	4.70	9.405 8	99.92		
	0.996 6	4.733 9	5.64	10.308 1	98.83		
	0.997 8	4.739 6	5.64	10.308 2	98.73		

3.1.7 样品含量测定 测定3批样品中姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素A、丹酚酸B的含量、RSD分别见表4,结果说明三批样品均一性良好,方法可行。

表4 3批复方姜参胶囊5种成分测定结果 (mg/g)  
Table 4 Contents of 5 components in 3 batches of Fufang Jiangshen capsules (mg/g)

批号	姜黄素	阿魏酸	桂皮醛	羟基红花黄色素A	丹酚酸B
20180901	6.966 2	0.633 3	5.066 7	6.333 3	4.750 0
20180902	6.971 4	0.632 8	5.068 8	6.312 8	4.748 3
20180903	6.958 5	0.634 4	5.079 2	6.319 1	4.739 5
平均(mg/g)	6.97	0.63	5.07	6.32	4.75
RSD(%)	0.93	1.29	1.32	1.66	1.19

### 3.2 缺血性脑卒中大鼠的保护作用

3.2.1 大鼠脑组织含水量的测定结果 与假手术组比较,模型组大鼠的脑组织含水量明显增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,小剂量组、大剂量组及阳性组缺血性脑卒中大鼠脑组织的含水量明显降低( $P < 0.01$ ,见表5)。

表5 复方姜参胶囊对缺血性脑卒中大鼠脑组织含水量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

表5 复方姜参胶囊对缺血性脑卒中大鼠脑组织含水量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

Table 5 Effect of Fufang Jiangshen capsules on brain tissue water content in rats with chronic cerebral ischemia ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

组别	脑组织含水量(g)
假手术组	0.70±0.03
模型组	0.99±0.11 <sup>##</sup>
阳性对照组	0.71±0.05 <sup>**</sup>
FFJSC 大剂量组	0.67±0.04 <sup>**</sup>
FFJSC 小剂量组	0.87±0.08 <sup>###</sup>

与假手术组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

3.2.2 血清 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 含量测定结果 模型组大鼠血清炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 的含量较假手术组升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,大、小剂量组和阳性对照组血清 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 的含量降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与假手术组比较,大、小剂量组和阳性对照组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 含量升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ,见表6)。

表6 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、IL-8 含量比较 (pg/ml  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8	ICAM-1
假手术组	1.42±0.19	0.76±0.17	0.73±0.15	1.79±0.14
模型组	2.84±0.36 <sup>##</sup>	1.72±0.20 <sup>##</sup>	1.84±0.22 <sup>##</sup>	5.24±0.26 <sup>##</sup>
阳性对照组	2.04±0.22 <sup>###</sup>	1.18±0.15 <sup>###</sup>	1.27±0.19 <sup>###</sup>	3.79±0.14 <sup>###</sup>
FFJSC 大剂量组	1.65±0.23 <sup>###</sup>	0.92±0.21 <sup>###</sup>	1.06±0.18 <sup>###</sup>	2.54±0.17 <sup>###</sup>
FFJSC 小剂量组	2.19±0.21 <sup>###</sup>	1.26±0.19 <sup>###</sup>	1.34±0.23 <sup>###</sup>	3.88±0.21 <sup>###</sup>

与假手术组比较,<sup>##</sup> $P < 0.05$ ,<sup>###</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

3.2.3 脑组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 含量测定结果 模型组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 含量较假手术组升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,大剂量组、小剂量组(除小剂量组 IL-6 外)和阳性药假手术组大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、

IL-8 的含量均降低( $P < 0.01$ )。与假手术组比较,除阳性对照组 TNF- $\alpha$  外,大、小剂量组和阳性对照组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-6、IL-8 含量升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ,见表7)。

表7 各组大鼠脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、IL-8 含量比较 ( $n=12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/g}$ )	IL-6( $\text{pg/g}$ )	IL-8( $\text{pg/mg}$ )	ICAM-1(OD 值)
假手术组	2.13±0.39	8.89±1.78	0.19±0.01	0.056±0.029
模型组	3.68±0.73 <sup>##</sup>	21.86±3.72 <sup>##</sup>	0.42±0.02 <sup>##</sup>	0.088±0.022 <sup>##</sup>
阳性药假手术组	2.44±0.41 <sup>**</sup>	12.55±2.88 <sup>###</sup>	0.24±0.03 <sup>###</sup>	0.057±0.016 <sup>###</sup>
FFJSC 大剂量组	2.65±0.49 <sup>###</sup>	15.45±2.96 <sup>###</sup>	0.26±0.03 <sup>###</sup>	0.055±0.014 <sup>###</sup>
FFJSC 小剂量组	2.84±0.46 <sup>###</sup>	19.93±3.18 <sup>##</sup>	0.32±0.02 <sup>###</sup>	0.059±0.027 <sup>###</sup>

与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

#### 4 讨论

缺血性脑卒中的损伤机制包括炎症反应、脑水肿等,其炎症反应以免疫炎症反应为主,以细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、ICAM-1 等为代表的多种炎性介质大量释放,加速脑组织的损伤<sup>[7]</sup>。IL-6 可加重脑损伤与脑水肿<sup>[8]</sup>。减少 ICAM-1 的表达可减轻缺血性脑卒中的炎症反应<sup>[9]</sup>。IL-8 参与脑缺血再灌注损伤<sup>[10]</sup>。复方姜参胶囊由姜黄、地龙、川芎、桂枝、远志、红花、丹参 7 味中药组成。姜黄素为姜黄的主要成分,可降低炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等含量<sup>[11]</sup>;红花主要成分羟基红花黄色素 A 可以降低痴呆发生率,抑制 TNF- $\alpha$  的激活和 IL-6 等因子的产生<sup>[12,13]</sup>。丹酚酸 B 可显著减轻脑水肿,抑制 TNF- $\alpha$  等的表达<sup>[14]</sup>。阿魏酸可明显抑制 IL-6、TNF- $\alpha$  等的表达,对缺血性脑卒中患者具有保护作用<sup>[15,16]</sup>;远志有抗痴呆、保护心脑血管等药理活性<sup>[17]</sup>。

依据文献笔者选择了 5 种功效成分即姜黄素、阿魏酸、桂皮醛、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B,建立了 HPLC 分析方法,该方法经过方法学考察,专属性强,重复性与稳定性良好,回收率高,可以作为该制剂的 5 种成分的定量方法。其在制剂中平均含量分别为 6.97 mg/g,0.63 mg/g,5.07 mg/g,6.32,4.75 mg/g,说明可以检测出制剂中多种功效成分。药理研究结果显示:大、小剂量 FFJSC 组均可显著降低缺血性脑卒中大鼠脑组织含水量,说明其可以减轻大鼠炎症性脑水肿;FFJSC 可不同程度降低血清与脑组织中 ICAM-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,说明 FFJSC 可抑制卒中后脑组织的炎症反应。通过上述研究对制剂中 5 种功效成分进行了定量,证实了本制剂对缺血性脑卒中有保护作用,为本制剂的临床应用提供了理论依据。

综上所述,本研究建立了复方姜参胶囊中 5 种功效成分 HPLC 分析方法,可作为本制剂的质量控制方法。动物实验研究结果证明对大鼠缺血性脑卒中有保护作用,其作用机制可能是通过降低细胞炎症因子的表达,减轻脑水肿、神经元损伤等途径起到保护作用。在随后研究中我们将通过血清药理学、组织分布、相关传导通路等作用机制作进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 张建民.缺血性脑血管疾病手术治疗新进展[J].浙江大学学报(医学版),2019,48(3):233-240.
- [2] 赵世亮,王少洲,徐榛,等.缺血性脑血管病的相关危险因素[J].吉林中医药,2016,36(10):1072-1074.
- [3] 吕小波,张明泽,黄春球,等.血塞通分散片对慢性脑缺血大鼠的作用及相关机制[J].中药新药与临床药理,2018,29(6):698-701.
- [4] 陈翔.普罗布考对血管性痴呆大鼠海马组织 SOD、MDA 影响的实验性研究[D].石家庄:河北医科大学,2013.
- [5] 韩济生.神经科学[M].3版.北京:北京大学医学出版社,2009:299-303.
- [6] 陈利平,王发渭,孙志高,等.参龙汤对脑缺血大鼠血清炎症因子的影响[J].中国中医急症,2013,22(2):201-202.
- [7] 吴咏梅,陶茹莹,孟祥宝,等.缺血性缺血性脑卒中损伤机制研究进展[J].吉林中医药,2018,38(3):368-372.
- [8] 刘尊敬,杨期东.脑梗死患者血清 IL-6 和 ICAM-1 变化及临床意义[J].中南大学学报(医学版),2004,29(3):326-329.
- [9] 张丽慧,魏尔清.ICAM-1、VCAM-1 在脑缺血损伤炎症机制中的作用及调控[J].中国药理学通报,2005,21(11):1281-1285.
- [10] 王磊.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和脑自由基影响的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2002:19-21.
- [11] Xu H, Nie B, Liu L, et al. Curcumin prevents brain damage and cognitive dysfunction during ischemic-reperfusion through the regulation of miR-7-5p[J]. Curr Neurovasc Res, 2019, 16(5):441-454.
- [12] 刘飞,邓云,段春寒.中药红花抗脑缺血损伤作用机制的研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(1):151-154.
- [13] 马嘉翼,褚松龄.羟基红花黄色素 A 改善缺血性脑卒中机制的研究进展[J].中国现代应用药学,2019,36(8):1012-1017.
- [14] 艾艳萍,丁涛.丹参多酚酸对缺血性脑卒中再灌注损伤的保护效果分析[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(20):3195-3198.
- [15] 龚婉,陈晓玲,周莉,等.阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用及机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):94-99.
- [16] Cheng Chin-Yi, Kao Shung-Te, Lee Yu-Chen. Ferulic acid exerts anti-apoptotic effects against ischemic injury by activating HSP70/Bcl-2-and HSP70/autophagy-mediated signaling after permanent focal cerebral ischemia in rats. [J]. Am J Chin Med, 2019, (2): 1-23.
- [17] 徐雪婷,陈勤.远志神经系统药理作用研究进展[J].现代中药研究与实践,2015,29(6):77-82.