

· 基础研究 ·

黄连解毒汤抗原代皮层神经元缺氧缺糖
损伤的活性部位筛选黄竹燕^{1,2} 潘蓓蓓^{1,2} 黄春燕³ 叶夷露² 刘丹丹² 俞月萍² 张 琦^{1,2}

摘要 目的 观察黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HJD)各部位和指标性成分对大鼠原代皮层神经元缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)再灌注损伤的保护作用。**方法** 采用大孔吸附树脂法分离制备 30%、50%、75% 和 95% 乙醇的洗脱物(HJDFE30、HJDFE50、HJDFE75 和 HJDFE95), 采用反向高效液相色谱(reverse phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)法测定各部位中指标性成分的含量。建立连二亚硫酸钠诱导的大鼠原代皮层神经元 OGD 再灌注损伤模型, 运用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法, 观察 HJD 的 4 个部位(HJDFE30、HJDFE50、HJDFE75 和 HJDFE95)和 7 个指标性成分对神经元活性的影响。**结果** HJDFE30 主要含有栀子苷; HJDFE50 主要含有黄芩苷、巴马汀、小檗碱和汉黄芩苷; HJDFE75 主要含有黄芩苷、小檗碱、黄芩素和汉黄芩素。原代皮层神经元 OGD 20 min 再灌注 1 h 后, 细胞活性降低($P < 0.01$), HJD、HJDFE30、HJDFE50 和 HJDFE75 可提高神经元存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各指标性成分栀子苷、黄芩苷、黄芩素、巴马汀、汉黄芩苷和汉黄芩素均可提高神经元存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** HJDFE30、HJDFE50 和 HJDFE75 对大鼠原代皮层神经元 OGD 损伤具有保护作用, 是 HJD 的活性部位。栀子苷、黄芩苷和黄芩素是 HJD 的主要有效成分。

关键词 黄连解毒汤; 原代皮层神经元; 缺氧缺糖; 活性部位

Screening of Active Fractions from Huanglian Jiedu Decoction against Primary Neuron Injury after Oxygen-Glucose Deprivation HUANG Zhu-yan^{1,2}, PAN Bei-bei^{1,2}, HUANG Chun-yan³, YE Yi-lu², LIU Dan-dan², YU Yue-ping², and ZHANG Qi^{1,2} 1 School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035); 2 Faculty of Basic Medicine, Zhejiang Pharmaceutical College, Hangzhou (310053); 3 Department of Pharmacy, Ruian People's Hospital, Zhejiang (325200)

ABSTRACT Objective To observe the protective effect of active fractions of Huanglian Jiedu Decoction (HJD) on primary cortical neuron injury after oxygen-glucose deprivation (OGD)/reperfusion (R) injury. **Methods** Using macroporous resin method, HJDFE30, HJDFE50, HJDFE75, and HJDFE95 with 30%, 50%, 75%, and 95% alcohol were respectively prepared. Then the content of active components in different HJD fractions was determined with reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The OGD/R injury model was induced by sodium dithionite on primary cortical neurons in neonate rats. MTT assay was used to observe the effect of four fractions (HJDFE30, HJDFE50, HJDFE75, and HJDFE95) and seven index components of HJD on the neuron viability. **Results** RP-HPLC showed active component(s) contained in HJDFE30 was geniposide; baicalin, palmatine, berberine, and wogonin contained in HJDFE50; baicalin, berberine, baicalein, and wogonin contained in HJDFE75. The neuron viability was decreased after OGD for 20 min and reperfusion for 1 h ($P < 0.01$), and significantly in-

基金项目:浙江省中医药科学研究基金计划项目(No. 2011ZA018, No. 2012ZA025)

作者单位:1. 温州医科大学药学院(浙江 325035); 2. 浙江医学高等专科学校基础医学部(杭州 310053); 3. 浙江省瑞安市人民医院药剂科(浙江 325200)

通讯作者:张 琦, Tel: 0571-87692673, E-mail: zhangqiwh@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.08.0981

creased after administered with HJD, HJDFE30, HJDFE50, and HJDFE75 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Geniposide, baicalin, baicalein, palmatine, wogonside, and wogonin could increase the cortical neuron viability ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions HJDFE30, HJDFE50, and HJDFE75, as active fractions of HJD, had protective effect on primary cortical neuron injury after OGD/R. Furthermore, geniposide, baicalin, and baicalein were main active components of HJD.

KEYWORDS Huanglian Jiedu Decoction; primary cortical neuron; oxygen-glucose deprivation; active fraction

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 源自王焘的《外台秘要》, 早期研究表明, 其具有清热、解毒、抗炎、抗风湿、抗氧化等作用, 近年来发现其具有良好的抗脑缺血作用^[1-3]。国内外研究表明, HJD 对于体内和体外的脑缺血模型均具有良好的保护作用^[4,5], HJD 的主要指标性成分——栀子苷、黄芩苷、小檗碱等也对动物脑缺血有治疗作用^[6], 但目前缺乏对于 HJD 抗脑缺血的活性部位的系统研究。本研究采用大孔吸附树脂法分离制备得到 HJD 的 4 个部位, 应用反向高效液相色谱 (reverse phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC) 对 HJD 各部位的指标性成分进行定量分析。本研究制备了连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 诱导的大鼠原代皮层神经元缺氧缺糖 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 再灌注损伤 (ischemia-reperfusion, I/R) 模型, 采用 HJD 干预, 筛选出 HJD 活性部位和有效成分, 为该方效应物质的阐明奠定基础。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级新生 SD 大鼠 (24 h 内), 雌雄不拘, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验动物合格证: SCXK (沪) 2012-0002。

2 主要药物、试剂及仪器 黄连、黄芩、黄柏和栀子购自华东医药股份有限公司, 经浙江大学动物科学院孙红祥教授鉴定。栀子苷、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品购自中国药品生物制品鉴定所; 汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对照品购自上海泽衡生物技术有限公司; 依达拉奉针剂 (20 mL: 30 mg/支, 批号: 130803) 购自昆明积大制药股份有限公司; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (批号: MKBH9001V)、四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 批号: MKBG9627V)、多聚赖氨酸 (批号: SLBJ7621V)、阿糖胞苷 (批号: 060M5051V) 购自美国 Sigma 公司; DMEM-HG (批号: 316151)、马血清 (horse serum, HS, 批号: 8174544)、神经基础培养基 (neurobasal medium, NB, 批号: 1441802)、B-27 添加剂 (批号: 1607521)

均购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号: 110404) 购自杭州四季青生物工程有限公司; 乙腈和甲醇均为色谱纯, 购自德国 MERCK 公司。CO₂ 培养箱 (HF151, 香港力康发展有限公司); 倒置相差显微镜 (XDS-1B, 重庆光电仪器有限公司); 酶标仪 (Multiskan MK3, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 旋转蒸发仪 (RE-5210A, 上海亚荣生化仪器厂); 高效液相色谱仪 (K501 双泵)、紫外可变波长检测器 (K2501) 和绿绵分析处理软件均购自德国 Lemtech 公司。

3 药物制备 将黄连、黄芩、黄柏、栀子按 3:3:2:3 组方, 取药材用蒸馏水浸没, 浸泡 2 h, 加热煮沸, 文火回流煎煮 2 h, 趁热过滤; 用 50% 乙醇回流煎煮 1.5 h, 趁热过滤; 80% 乙醇同法煎煮 1.5 h, 趁热过滤。合并 3 次滤液, 减压浓缩至生药含量为 1.0 g/mL, 即为黄连解毒汤浸膏。

取黄连解毒汤浸膏用蒸馏水稀释一倍, 上 D101 型大孔树脂柱, 用水冲洗后, 依次用 30%、50%、75%、95% 的乙醇洗脱, 分别为 30% 乙醇洗脱物 (HJDFE30)、50% 乙醇洗脱物 (HJDFE50)、75% 乙醇洗脱物 (HJDFE75) 和 95% 乙醇洗脱物 (HJDFE95), 减压浓缩干燥得到粉末。实验药物均用培养基溶解, 加入终浓度为 0.1% (V/V) 的 DMSO 助溶。

4 RP-HPLC 测定指标性成分含量 采用本实验室建立的 RP-HPLC 法^[7], 测定 HJDFE30、HJDFE50、HJDFE75、HJDFE95 中 7 个指标性成分的含量, 具体色谱条件如下。色谱柱: 迪马 Diamonsil C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 保护柱: Diamonsil Easy-Guard II C18; 流动相: 乙腈 (A) - 0.05% 磷酸二氢钾和 0.05% 三乙醇胺 (用磷酸调 pH 到 3.0, B); 线性梯度洗脱程序: 0 ~ 9 min, 84% B; 9 ~ 27 min, 84% → 73% B; 27 ~ 35 min, 73% → 70% B; 35 ~ 39 min, 70% → 68% B; 39 ~ 42 min, 68% → 60% B; 42 ~ 46 min, 60% → 52% B; 46 ~ 53 min, 52% → 45% B; 53 ~ 60 min, 45% → 84% B; 流速:

0.8 mL/min,检测波长:254 nm,柱温:35 ℃,进样量:20 μL。

5 原代皮层神经元 OGD I/R 模型制备及分组
取大鼠($n=10$)大脑皮层,置于 4 ℃ 预冷的解剖液中,分离脑膜、血管,将组织剪碎至 1 mm³,0.027%胰蛋白酶消化,37 ℃ 水浴 20 min,15% FBS 终止消化,200 目筛网过滤,离心后用种植液(MDEM-HG + 10% FBS + 10% HS)重悬,以 1×10^6 个/mL 接种于用 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸包被的 96 孔板内。24 h 后换成维持培养液(NB + 2% B-27 + 1% L-Glutamine),第 3 天加入 5 μg/mL 阿糖胞苷。每隔 2~3 天换液,培养至 7~9 天后随机分为正常对照组、OGD 模型组及各药物处理组。

正常对照组神经元用 DMEM-HG 孵育。OGD 模型组参照文献[8]构建原代神经元 OGD I/R 模型,将神经元用无糖 DMEM-HG + 10 mmol/L Na₂S₂O₄ 孵育 20 min,再灌注 1 h,神经元细胞存活率降至正常对照组的 60%~65%,成功率达 95% 以上。依达拉奉组(10 μmol/L),HJD 及其各部位处理组(1、10、100 mg/L 的 HJD、HJD FE30、HJD FE50、HJD FE75 和 HJD FE95 处理),各指标性成分处理组(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L 的 梔子苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素处理),分别于神经元 OGD 损伤前 30 min 给予相应药物,并维持在 OGD 及整个再灌注过程。

6 原代皮层神经元形态观察和活性检测
先用倒置显微镜观察各组神经元 OGD I/R 前后的细胞形态,再采用 MTT 比色法测定各组细胞的活性。弃去孔板中培养液,加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,每孔 100 μL,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱孵育 4 h,弃去上液,每孔加入 150 μL DMSO 振荡 10 min,使充分溶解。用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(OD 值),并且测定不加细胞的空白孔的 OD 值,用于调零。计算神经元存活率,神经元存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (正常对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

7 统计学方法
采用 SPSS 19.0 统计软件包进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用 one-way ANOVA 分析,并以 Tukey 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HJD 各部位指标性成分含量测定结果(表 1)
HJD 含有全部 7 种指标性成分,总含量为 15.80%;HJD FE30 仅含有 梔子苷,含量为 14.05%;HJD FE50 含有黄芩苷、巴马汀、小檗碱和汉黄芩苷,总含量为 55.24%;HJD FE75 含有黄芩苷、小檗碱、黄芩素和汉黄芩素,总含量为 57.38%;HJD FE95 含有小檗碱和汉黄芩素,含量为 5.98%。

2 HJD 各部位处理组神经元细胞存活率比较(图 1、2)
正常对照组神经元分布均匀,突起密集,连接成网状结构且胞体饱满,折光性较好。OGD 处理后,细胞稀疏、碎片增多,突起大部分缩短或消失,胞体皱缩,折光性较差,细胞活性下降($P < 0.01$)。依达拉奉组(10 μmol/L)及 HJD 各部位处理组神经元胞体皱缩减轻,突起伸长,形态改善,神经元活性有不同程度的增加。HJD 组和 4 个部位组的神经元细胞存活率总体差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 OGD 模型组比较,HJD FE50(1、10、100 mg/L)组神经元细胞存活率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),有效剂量范围最广($P < 0.05$);HJD FE30(10、100 mg/L)组神经元细胞存活率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),有效剂量范围较广($P < 0.01$);HJD(10 mg/L)和 HJD FE75(10 mg/L)神经元细胞存活率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);HJD FE95 组神经元细胞存活率无改善($P > 0.05$)。与依达拉奉组比较,HJD、HJD FE30、HJD FE50(100 mg/L)、HJD FE75(1、100 mg/L)和 HJD FE95 组神经元细胞存活率降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各指标性成分组神经元存活率比较(图 3)
与正常对照组比较,OGD 模型组神经元存活率降低($P < 0.01$)。与 OGD 模型组比较,梔子苷和黄芩苷(0.1、1、10 μmol/L)、黄芩素(1、10、100 μmol/L)组神经元存活

表 1 HJD 各部位 7 种指标性成分含量 (%, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

部位	梔子苷	黄芩苷	巴马汀	小檗碱	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
HJD	1.46 ± 0.02	5.57 ± 0.05	0.80 ± 0.01	5.18 ± 0.04	0.98 ± 0.01	1.36 ± 0.02	0.45 ± 0.02
HJD FE30	14.05 ± 0.23	—	—	—	—	—	—
HJD FE50	—	23.99 ± 0.38	3.93 ± 0.00	22.13 ± 0.37	5.19 ± 0.03	—	—
HJD FE75	—	12.82 ± 0.13	—	16.87 ± 0.03	—	24.80 ± 0.21	2.89 ± 0.04
HJD FE95	—	—	—	2.70 ± 0.04	—	—	3.28 ± 0.06

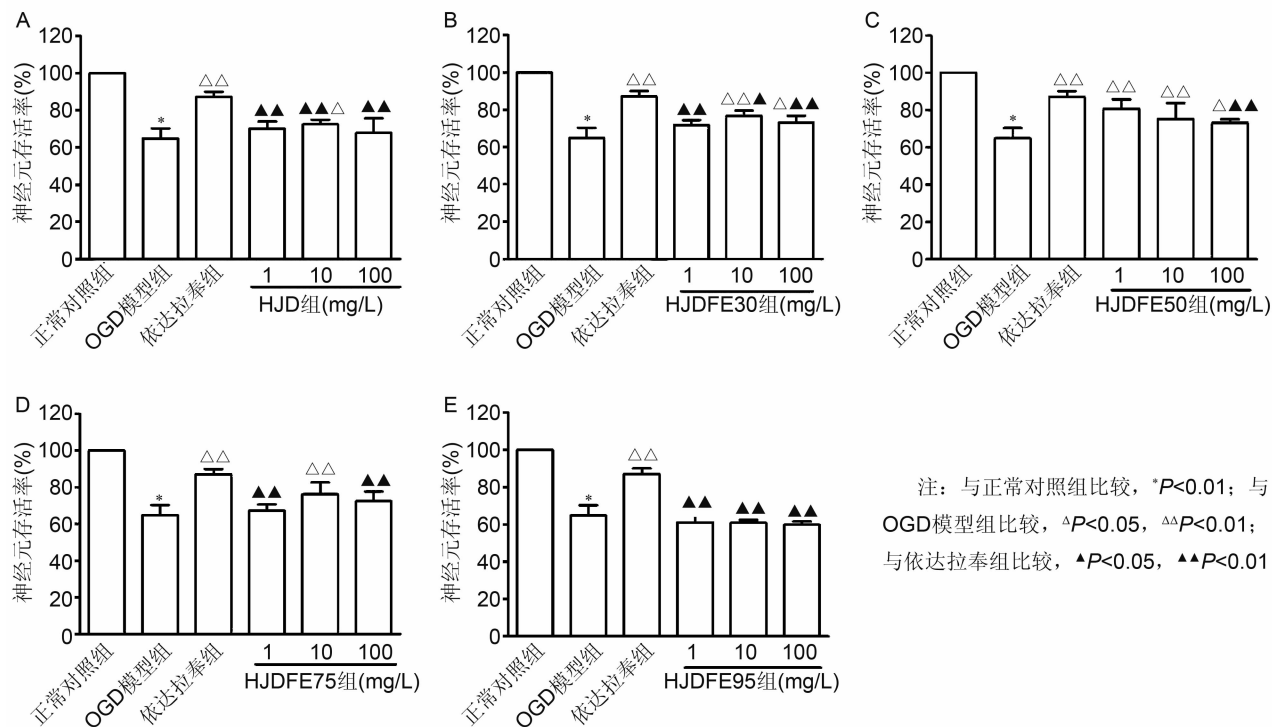
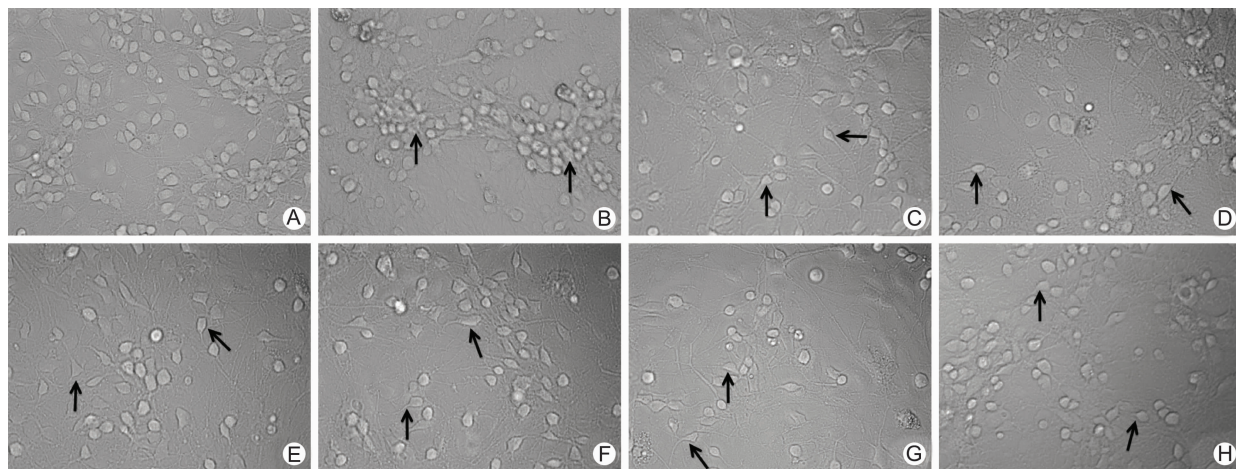


图1 HJD 及各部位处理组 OGD 损伤的神经元存活率比较 ($n=8$)



注:A 为正常对照组;B 为 OGD 模型组;C 为依达拉奉(10 $\mu\text{mol/L}$)组;D 为 HJD(10 mg/L)组;E 为 HJDFE30(10 mg/L)组;F 为 HJDFE50(1 mg/L)组;G 为 HJDFE75(10 mg/L)组;H 为 HJDFE95(1 mg/L)组;箭头所示为 OGD 损伤后及药物作用后细胞的形态特征

图2 HJD 及各部位处理组 OGD 损伤的神经元形态 ($\times 200$)

率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),有效剂量范围广,呈钟形量效关系($P < 0.01$);黄芩苷在1 $\mu\text{mol/L}$ 达到峰效应;栀子苷和黄芩素在10 $\mu\text{mol/L}$ 达到峰效应;巴马汀(0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$)、汉黄芩苷(0.1、10 $\mu\text{mol/L}$)组神经元存活率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),有一定的剂量依赖性,但有效剂量范围相对较窄($P < 0.05$, $P < 0.01$);汉黄芩素(1 $\mu\text{mol/L}$)组神经元存活率升高

($P < 0.01$);小檗碱(0.01~100 $\mu\text{mol/L}$)组神经元存活率无改善,而且10、100 $\mu\text{mol/L}$ 组神经元存活率降低($P < 0.01$)。与依达拉奉组比较,栀子苷组(0.01、0.1、100 $\mu\text{mol/L}$)、黄芩苷组(0.01、0.1、10、100 $\mu\text{mol/L}$)、巴马汀组(1~100 $\mu\text{mol/L}$)、黄芩素组(0.01~1 $\mu\text{mol/L}$)、小檗碱组、汉黄芩苷组和汉黄芩素组神经元细胞存活率降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

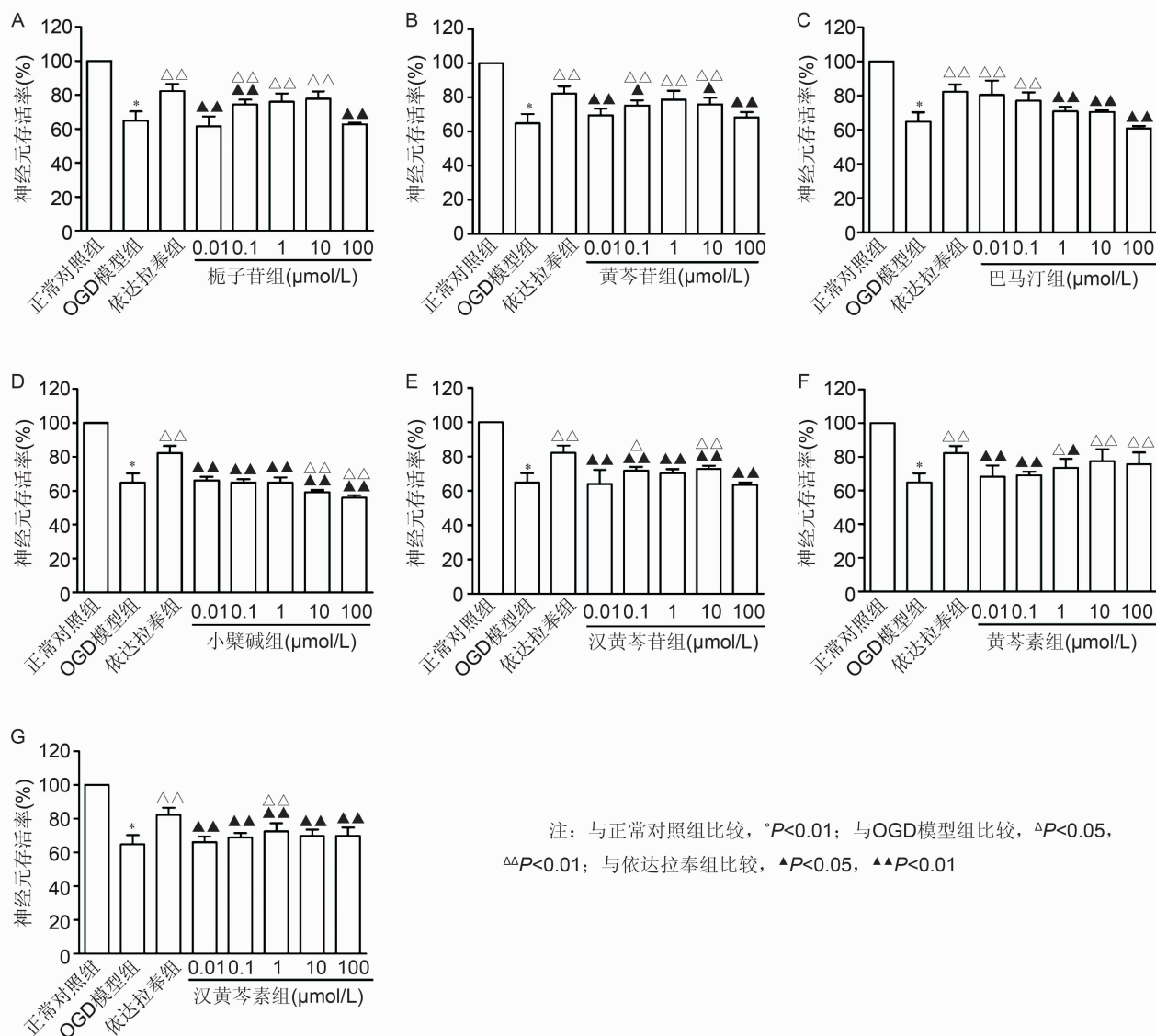


图 3 各指标性成分组神经元存活率比较 ($n = 8$)

讨 论

本实验通过 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导原代皮层神经元 OGD I/R 模型,发现 HJD 及其 3 个活性部位对神经元 OGD I/R 具有保护作用,其中 HJDFE50 有效剂量范围最广、作用最佳。通过对 7 个指标性成分的研究发现,多个成分具有抗神经元 OGD 损伤的作用,其中以栀子苷、黄芩苷和黄芩素作用最佳。

OGD 模型可从细胞水平研究脑缺血损伤病理过程、相关药物的药效与机制,是体外模拟脑缺血最常用的经典模型^[9]。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 是一种氧清除剂,研究发现 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 在 1 h 内都可以保持缺氧状态,结合无糖培养基共同诱导神经元缺氧缺糖是一种简单有效且稳定的 OGD 模型^[8,10]。OGD 20 min 再灌注

1 h 时神经元存活率为 64.80%,作为神经元 OGD 损伤模型的条件较为合适。依达拉奉作为一种自由基清除剂,可清除因神经细胞损伤而产生的大量自由基,抑制脂质过氧化损伤,临床上广泛用于急性脑梗死的治疗。研究表明,在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的原代皮层神经元 OGD 损伤模型中,依达拉奉可以显著提高受损神经元的活性,10 $\mu\text{mol/L}$ 时可使神经元存活率提高到 82.26%,与在其他类型 OGD 模型中的作用一致^[11]。

在当今中药现代化的研究中,一个经典的研究方法就是从有效单方或者复方出发,进行提取、分离、纯化、筛选活性部位或者活性流份,甚至有效单体。本研究采用大孔树脂法制备得到 HJD 的 4 个部位,结果显示 HJDFE30、HJDFE50 和 HJDFE75 具有较好的抗原代皮层神经元 OGD 损伤的作用,是 HJD 的活性部

位。HJDFE50 主要含有黄芩苷、巴马汀、小檗碱和汉黄芩苷 4 种成分,有效剂量范围最广(1~100 mg/L); HJDFE30 的成分较为单一,主要含有栀子苷,有效剂量范围较广(10~100 mg/L)。HJDFE75 主要含有黄芩苷、小檗碱、黄芩素和汉黄芩素 4 种成分,与 HJDT 相似,仅在 10 mg/L 有作用。其中,HJDFE50 和 HJDFE75 中标记性成分含量均大于 55%,有进一步研制开发新药的潜力。

为明确产生效应的有效成分,选择 HJD 的 7 个标记性成分,分别进行了神经元 OGD 损伤实验。结果表明,栀子苷、黄芩苷和黄芩素对神经元 OGD 损伤有良好的保护作用,与以往的同类研究结果相一致^[12-14]。有研究报道,栀子苷可以抑制小胶质细胞的活化,降低其活性,抑制炎症反应发生^[15]。此外,可通过激活胰高血糖素样肽-1 受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)保护神经元,对皮层神经元起到营养作用^[16]。黄芩苷具有较好的抗脑缺血作用,可以消除过氧化物,抑制环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、5-脂氧化酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)介导的促炎因子的产生^[17],改善内源性过氧亚硝酸盐的神经毒性^[13]。黄芩素是一种 12/15 脂氧酶抑制剂,能抑制过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators activated receptor gamma, PPAR γ)表达和自由基产生,有效抑制缺血再灌注损伤^[18,19]。有关汉黄芩苷、汉黄芩素和巴马汀的研究相对较少。其中,汉黄芩苷和汉黄芩素有报道具有一定的抗炎、抗病毒、抗肿瘤与抗氧化活性^[20,21],巴马汀具有抗癌、抗心肌缺血再灌注损伤作用^[22,23],但均未见抗脑缺血作用的研究。本研究结果显示,巴马汀、汉黄芩苷和汉黄芩素对神经元 OGD 损伤也具有一定的保护作用,提示可成为潜在的神经保护药。上述 6 个成分均具有良好抗神经元 OGD 损伤作用,提示 HJD 是一个多成分多靶点共同作用的中药方剂,其抗脑缺血作用与多个有效成分的协同作用有关。

众多研究表明,小檗碱具有良好的抗脑缺血作用^[24,25]。本研究中小檗碱对原代皮层神经元的 OGD 损伤无保护作用,并且在较高浓度时由于其较强的碱性反而进一步加重神经元的损伤,提示体内外药效存在差异,原因可能与离体细胞不具有完整的中枢网络结构等有关^[26]。最新研究表明,栀子苷可促进小檗碱的吸收,黄芩苷抑制小檗碱吸收,在复方制剂中栀子苷的作用大于黄芩苷^[27],因此小檗碱的抗脑缺血作用可能是通过与其他药物如栀子苷相互作用而发挥的。

总之,通过本研究筛选出 HJD 抗神经元 OGD 损伤的活性部位和有效成分,为该方治疗脑缺血的效应物质的阐明奠定了实验基础。如何在有效成分基础上,通过配伍找到合理的剂量配比,对 HJD 经典方实施二次开发,将有待后续的进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fang H, Wang Y, Yang T, et al. Bioinformatics analysis for the antirheumatic effects of Huanglian Jiedu Tang from a network perspective[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 245357.
- [2] Wu YH, Chuang SY, Hong WC, et al. *In vivo* and *in vitro* inhibitory effects of a traditional Chinese formulation on LPS-stimulated leukocyte-endothelial cell adhesion and VCAM-1 gene expression[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(1): 55-63.
- [3] Lu J, Wang JS, Kong LY. Anti-inflammatory effects of Huanglian Jiedu Decoction, its two fractions and four typical compounds[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 911-918.
- [4] Ye YL, Huang CY, Jiang L, et al. Huanglian Jiedu Tang extract protects against chronic brain injury after focal cerebral ischemia via hypoxia-inducible factor-1 α -regulated vascular endothelial growth factor signaling in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(3): 355-361.
- [5] Hwang YS, Shin CY, Huh Y, et al. Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian Jiedu Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats[J]. Life Sci, 2002, 71(18): 2105-2117.
- [6] 杨阳, 赵海誉, 宋建方, 等. 黄连解毒汤化学成分及其神经保护作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1599-1603.
- [7] 黄春燕, 姜莉莉, 王伟, 等. RP-HPLC 同时测定黄连解毒汤 7 种活性成分[J]. 浙江预防医学, 2011, 23(11): 15-19.
- [8] 石瑞丽, 胡金凤, 孔令雷, 等. 瓜子金皂苷已对连二亚硫酸钠致氧糖剥夺/复供诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 333-336.
- [9] Tabakman R, Jiang H, Levine RA, et al. Apoptotic characteristics of cell death and the neuroprotective effect of homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(4): 499-507.
- [10] 王亚琴, 谭志巍, 官鹏, 等. 大鼠皮层神经细胞糖氧剥夺体外模型的建立及细胞形态学观察[J]. 四川解剖学杂志, 2007, 15(1): 2-4.

- [11] Li W, Xu H, Hu Y, et al. Edaravone protected human brain microvascular endothelial cells from methylglyoxal-induced injury by inhibiting AGEs/RAGE/oxidative stress [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e76025.
- [12] Jing ZW, Yan ZL, Zhou CX, et al. Comparison of the network structural characteristics of calcium signaling pathway in cerebral ischemia after intervention by different components of Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(3): 251–255.
- [13] Xu M, Chen X, Gu Y, et al. Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(1): 116–124.
- [14] Lee JH, Lee SR. The effect of baicalein on hippocampal neuronal damage and metalloproteinase activity following transient global cerebral ischemia [J]. Phytother Res, 2012, 26(11): 1614–1619.
- [15] Wang J, Hou J, Zhang P, et al. Geniposide reduces inflammatory responses of oxygen-glucose deprived rat microglial cells via inhibition of the TLR4 signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2012, 37(10): 2235–2248.
- [16] Yin F, Zhang Y, Guo L, et al. Geniposide regulates insulin-degrading enzyme expression to inhibit the cytotoxicity of $A\beta_{1-42}$ in cortical neurons [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(8): 1045–1051.
- [17] Cheng O, Li Z, Han Y, et al. Baicalin improved the spatial learning ability of global ischemia/reperfusion rats by reducing hippocampal apoptosis [J]. Brain Res, 2012, 1470: 111–118.
- [18] Xu YW, Sun L, Liang H, et al. 12/15-lipoxygenase inhibitor baicalein suppresses PPAR γ expression and nuclear translocation induced by cerebral ischemia/reperfusion [J]. Brain Res, 2010, 1307: 149–157.
- [19] Shieh DE, Liu LT, Lin CC. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin [J]. Anticancer Res, 2000, 20(5A): 2861–2865.
- [20] Lee YM, Cheng PY, Chen SY, et al. Wogonin suppresses arrhythmias, inflammatory responses, and apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 58(2): 133–142.
- [21] Li C, Lin G, Zuo Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones [J]. Biopharm Drug Dispos, 2011, 32(8): 427–445.
- [22] Ali H, Dixit S. Extraction optimization of *Tinospora Cordifolia* and assessment of the anticancer activity of its alkaloid palmatine [J]. Sci World J, 2013: 376216.
- [23] Kin YM, Ha YM, Jin YC, et al. Palmatine from *Coptidis Rhizome* reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 2097–2102.
- [24] Cui HS, Matsumoto K, Murakami Y, et al. Berberine exert neuroprotective actions against *in vitro* ischemia-induced neuronal cell damage in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of B-cell lymphoma 2 phosphorylation suppression [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(1): 79–85.
- [25] Kulkarni SK, Dhir A. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for nervous system disorders [J]. Phytother Res, 2010, 24(3): 317–324.
- [26] Song B, Tang X, Huang X, et al. Berberine induces peripheral lymphocytes immune regulations to realize its neuroprotective effect in the cerebral ischemia/reperfusion mice [J]. Cell Immunol, 2012, 276(1–2): 91–100.
- [27] 王文哲, 周静, 郭立玮, 等. 黄连解毒汤中小檗碱及其他成分模拟组合在脑缺血大鼠体内药动学比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 64–68.

(收稿:2014-08-18 修回:2015-04-05)