

## 川芎油对氯化钴损伤 PC12 细胞保护作用及其活性成分研究

王月, 刘露丝, 刘娟, 彭成\*, 熊亮\*

成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

**摘要:**综合运用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱等方法对川芎挥发油进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定化合物结构。利用氯化钴诱导 PC12 细胞建立神经损伤模型, 通过 MTT 法、Hoechst 染色法及乳酸脱氢酶试剂盒测定川芎及其单体成分对损伤神经细胞的保护作用。结果显示: 从川芎挥发油中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为 riligustilide (1)、endo-Z, Z'-(3a, 7a', 7a, 3a')-双藁本内酯 (2)、匙叶桉油烯醇 (3)、(E)-丁烯基苯酞 (4)、7-羟基-丁烯基苯酞 (5) 和洋川芎内酯 I (6)。发现川芎挥发油及化合物 1 显著提高氯化钴损伤的 PC12 细胞的存活率, 降低细胞内乳酸脱氢酶水平, 抑制 PC12 细胞凋亡。表明川芎挥发油及化合物 1 在一定浓度范围内具有保护神经细胞的作用, 为进一步阐述川芎挥发油的药效物质基础提供科学依据。

**关键词:**川芎; 挥发油; 化学成分; PC12 细胞保护

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.021

## Protective Effects of *Ligusticum chuanxiong* Oil on PC12 Cells Injured by CoCl<sub>2</sub> and Its Active Components

WANG Yue, LIU Lu-si, LIU Juan, PENG Cheng\*, XIONG Liang\*

State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** The chemical constituents of the essential oil from *Ligusticum chuanxiong* were separated and purified by various chromatographic techniques including silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography, normal phase (NP) semi-preparative HPLC and reversed phase (RP) semi-preparative HPLC. Their structures were identified by physico-chemical properties, spectroscopic analysis, as well as comparison with the literature data. PC12 cells injured by CoCl<sub>2</sub> were used as the cell model of hypoxia. The viability and lactate dehydrogenase (LDH) release of PC12 cells were separately detected by MTT assays and LDH detecting kits, and the apoptotic cells were stained by Hoechst 33258. Six compounds were isolated from the essential oil of *L. chuanxiong* and identified as riligustilide (1), endo-Z, Z'-(3a, 7a', 7a, 3a')-diligustilide (2), spathulenol (3), (E)-3-butylidene-phthalide (4), 3-butylidene-7-hydroxyphthalide (5), and senkyunolide I (6). It was proved that the oil and compound 1 (riligustilide) protected the injury and inhibit the apoptosis induced by CoCl<sub>2</sub> in PC12 cells, and reduced the level of LDH in cells. These results demonstrated that the essential oil of *L. chuanxiong* and compound 1 (riligustilide) had protective effect for injured neurons in appropriate concentration range, and provided scientific reference for pharmacodynamic material basis of *L. chuanxiong*.

**Key words:** *Ligusticum chuanxiong*; essential oil; chemical constituents; protective effect on PC12 cells

川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 为川产道地药材, 有祛风止痛、活血行气之功效, 临床中广泛用于治疗头痛、

中风等疾病。现代研究发现川芎挥发油作为主要的有效部位在神经保护方面作用显著<sup>[1,2]</sup>; 能促进体外培养的大脑皮层神经细胞存活<sup>[3]</sup>, 对脑缺血再灌注损伤、脑缺氧损伤均有保护作用<sup>[4]</sup>。大量研究表明川芎挥发油中的苯酞类化合物具有良好的神经保护作用, 但目前主要集中于 Z-藁本内酯、正丁基苯酞的研究<sup>[5]</sup>, 而川芎油中其他大量存在的苯酞类化合物<sup>[5,6]</sup> 却鲜有报道。为进一步探索川芎挥发油中

收稿日期: 2017-06-8

接收日期: 2017-09-12

基金项目: 四川省科技支撑计划川芎整合式全产业链综合开发研究 (2015SZ0031); 科技基础性工作专项计划 (2015FY111500-140); 四川省青年科技创新研究团队专项计划 (2017TD0001)

\* 通信作者 Tel: 86-28-61800018; E-mail: pengchengchengdu@126.com

的活性成分,本实验对其进行成分分离,采用氯化钴诱导 PC12 细胞建立损伤神经元的模型,研究川芎挥发油及其单体成分对氯化钴损伤的 PC12 细胞的保护作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 实验仪器

Cometro 6000LDS 高效液相色谱仪, Kromasil silica(250 (10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; Agilent 1220 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Agilent C<sub>18</sub>(250 (9.4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; Bruker-500、600 核磁共振仪; Waters Synapt G2 Tof-HDMS 质谱仪; Series II Water Jacket CO<sub>2</sub> 孵箱(Thermo Scientific 公司); Allegra X-12R 离心机(Beckman Coulter 公司); AE 2000 电子显微镜(Motic 公司); DMI 3000 荧光显微镜(Leica Microsystems 公司); Sunrise 酶标仪(TECAN 公司)。

### 1.2 实验材料

川芎饮片由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供,经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为伞形科多年生草本植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎。高效硅胶薄层板 GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂); 硅胶 H(青岛海洋化工厂); 200~300 目层析用硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(瑞典 Amersham Pharmacia 公司); 氯化钴(Sigma 公司, CAS 号 7646-79-9); 丁苯酞氯化钠注射液(石药集团恩必普药业有限公司, 批号 618160320); 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20161215); 甲醇(色谱级, Tedia 公司); 石油醚(成都市科隆化学品有限公司); 乙酸乙酯(成都市科隆化学品有限公司)。

### 1.3 实验细胞及培养基

PC12 细胞株购自江苏凯基生物细胞库; DMEM 高糖培养基(Gibco 公司, 批号 1812193); 小牛血清(四季青公司, 20150511)。

## 2 实验方法

### 2.1 川芎挥发油的提取分离纯化

取川芎药材(40 kg), 粉碎, 加 8 倍量蒸馏水浸泡过夜, 按照常规水蒸气蒸馏法提取 10 小时, 收集挥发油, 以无水硫酸钠除水后, 得川芎挥发油 120 g。采用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯(100:0  $\rightarrow$  0:100)为洗脱剂进行梯度洗脱, 合并得到 14 个洗脱部分(F<sub>1</sub>~F<sub>14</sub>)。F<sub>5</sub> 加入二氯甲烷后析出白色沉

淀, 经反复重结晶得到化合物 5(36 mg); 母液经过硅胶 H 柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯(50:1  $\rightarrow$  3:1) 梯度洗脱, 得到 9 个洗脱部分(F<sub>5,1</sub>~F<sub>5,9</sub>)。F<sub>5,9</sub> 经凝胶柱色谱分离, 以石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1) 洗脱, 得到 6 个组分 F<sub>5,9,1</sub>~F<sub>5,9,6</sub>。F<sub>5,9,1</sub> 经制备薄层色谱(展开剂: 石油醚-乙酸乙酯 8:1) 和正相半制备高效液相色谱(流动相: 正己烷-乙醇 350:1) 分离纯化得到化合物 4(1.2 mg)。F<sub>5,9,3</sub> 加入甲醇后有白色沉淀析出, 经甲醇反复重结晶得到化合物 1(20.1 mg)。F<sub>5,9,4</sub> 经半制备薄层色谱纯化(展开剂: 二氯甲烷-甲醇 20:1)、反相半制备高效液相色谱(流动相: 甲醇-水 80:20) 得到化合物 2(3.2 mg)、3(3.2 mg)。F<sub>5,9,6</sub> 经制备薄层色谱(展开剂: 二氯甲烷-甲醇 15:1) 分离纯化得到化合物 6(12.4 mg)。

### 2.2 化合物结构鉴定

根据化合物理化性质和波谱数据(ESI-MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR) 鉴定化合物结构。

### 2.3 活性测定

#### 2.3.1 川芎油及单体化合物对氯化钴损伤的 PC12 细胞的影响

收集对数生长期的 PC12 细胞并调整密度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 以 100  $\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后弃去培养基。将细胞分为空白组、模型组、阳性对照组、药物组, 空白组加入无血清 DMEM 培养基, 模型组加入无血清 DMEM 培养基溶解的氯化钴(终浓度为 250  $\mu\text{M}$ ), 阳性对照组加入用造模溶液稀释的丁苯酞氯化钠注射液(丁苯酞终浓度 100  $\mu\text{M}$ ), 药物组分别加入用造模溶液稀释成不同浓度的川芎油(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或单体化合物(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ ), 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每组 6 个复孔。置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱中孵育 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 试剂, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 4 h。用酶标仪测定在 570 nm 处各孔吸光度值并计算细胞存活率。

#### 2.3.2 乳酸脱氢酶(LDH)活力测定

PC12 细胞种于 48 孔板, 细胞处理及培养方法同 2.3.1, 选择川芎油和活性较好单体化合物 1 进行测试。培养 24 h 后, 分别收集细胞培养上清液 300  $\mu\text{L}$ , 参照试剂盒操作说明, 以比色法测定上清液中 LDH 释放量。

#### 2.3.3 Hoechst 33258 染色

采用 Hoechst 33258 染色, 荧光倒置显微镜观察川芎油和单体化合物 1 对氯化钴损伤的 PC12 细胞

形态的影响。将 PC12 细胞接种于 96 孔板,按 2.3.1 分组给药处理,孵育 24 h 后弃去培养基,PBS 洗涤后加入 4% 的多聚甲醛室温固定 10 min,弃去多聚甲醛,PBS 清洗后加入稀释后的 Hoechst33258 染色剂 0.2 mL,避光染色 10 min,除去染色剂并用 PBS 洗涤,在荧光显微镜下观察细胞形态。

### 3 结果与分析

#### 3.1 化合物的结构鉴定

**化合物 1** 无色针晶;ESI-MS  $m/z$ :403.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.08 (1H, dt,  $J = 9.5, 2.0$  Hz, H-7'), 5.98 (1H, dt,  $J = 9.5, 4.5$  Hz, H-6'), 5.42 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-8), 3.64 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.0$  Hz, H-7), 3.16 (1H, m, H-8'), 2.78 (4H, m, H-4'a, 4'b, 5'a, 6), 2.51 (2H, m, H-4a, 5'b), 2.30 (2H, m, H<sub>2</sub>-9), 2.05 (3H, m, H-4b, 5a, 5b), 1.51 (2H, m, H<sub>2</sub>-10), 1.43 (2H, m, H<sub>2</sub>-9'), 1.12 (2H, m, H<sub>2</sub>-10'), 0.95 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H<sub>3</sub>-11), 0.85 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H<sub>3</sub>-11');<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 169.4 (C-1), 170.8 (C-1'), 150.7 (C-3), 93.0 (C-3'), 156.2 (C-3a), 162.7 (C-3'a), 124.3 (C-7'a), 124.2 (C-7a), 21.1 (C-4), 20.7 (C-4'), 22.6 (C-5), 23.8 (C-5'), 33.8 (C-6), 130.5 (C-6'), 36.3 (C-7), 118.0 (C-7'), 112.7 (C-8), 44.8 (C-8'), 29.2 (C-9), 27.8 (C-9'), 23.6 (C-10), 21.9 (C-10'), 14.7 (C-11'), 15.0 (C-11)。以上数据与文献报道<sup>[7]</sup>数据对比,鉴定化合物 1 为 riligustilide

**化合物 2** 无色油状物;ESI-MS  $m/z$ :403.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 6.19 (2H, ddd,  $J = 9.6, 5.4, 2.4$  Hz, H-6, 6'), 5.80 (2H, ddd,  $J = 9.6, 1.2, 0.6$  Hz, H-7, 7'), 4.85 (2H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-8, 8'), 2.21 (2H, m, H-9a, 9'a), 2.13 (4H, m, H-5a, 5'a, 9b, 9'b), 1.92 (4H, m, H-4a, 4'a, 5b, 5'b), 1.85 (2H, m, H-4b, 4'b), 1.42 (4H, m, H<sub>2</sub>-10, 10'), 0.92 (3H, t,  $J = 7.8$  Hz, H<sub>3</sub>-11)。以上数据与文献报道<sup>[8]</sup>数据对比,鉴定化合物 2 为 *endo-Z*, *Z'*-(3a. 7a', 7a. 3a')-双藁本内酯。

**化合物 3** 无色油状物;ESI-MS  $m/z$ :243.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 4.69 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-14a), 4.66 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-14b), 2.42 (1H, m, H-9a), 2.20 (1H, m, H-1), 2.04 (1H, m, H-9b), 1.98 (1H, m, H-8a), 1.91 (1H, m,

H-2a), 1.77 (1H, m, H-3a), 1.63 (1H, m, H-2b), 1.56 (1H, m, H-3b), 1.30 (1H, m, H-5), 1.28 (3H, s, H<sub>3</sub>-15), 1.06 (3H, s, H<sub>3</sub>-12), 1.04 (3H, s, H<sub>3</sub>-13), 1.01 (1H, m, H-8b), 0.71 (1H, m, H-7), 0.47 (1H, dd,  $J = 9.0, 1.8$  Hz, H-6)。以上数据与文献报道<sup>[9]</sup>数据对比,鉴定化合物 3 为匙叶桉油烯醇。

**化合物 4** 无色油状物;ESI-MS  $m/z$ :189.4 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 7.94 (1H, brd,  $J = 7.8$  Hz, H-7), 7.84 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.72 (1H, td,  $J = 7.2, 1.2$  Hz, H-5), 7.55 (1H, td,  $J = 7.2, 1.2$  Hz, H-6), 5.87 (1H, t,  $J = 7.8$ , H-8), 2.55 (2H, m, H<sub>2</sub>-9), 1.63 (2H, m, H<sub>2</sub>-10), 1.04 (3H, t,  $J = 7.8$  Hz, H<sub>3</sub>-11)。以上数据与文献报道<sup>[10]</sup>数据对比,鉴定化合物 4 为 (*E*)-丁烯基苯酚。

**化合物 5** 无色油状物;ESI-MS  $m/z$ :205.1 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 7.53 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-5), 7.11 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-4), 6.89 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 5.65 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-8), 2.42 (2H, m, H<sub>2</sub>-9), 1.53 (2H, m, H<sub>2</sub>-10), 0.97 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H<sub>3</sub>-11)。以上数据与文献报道<sup>[11]</sup>数据对比,鉴定化合物 5 为 7-羟基-丁烯基苯酚。

**化合物 6** 无色油状物;ESI-MS  $m/z$ :247.1 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 5.40 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-8), 4.27 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-7), 4.00 (1H, dt,  $J = 3.6, 6.0$  Hz, H-6), 2.56 (1H, m, H-9a), 2.48 (1H, m, H-9b), 2.31 (2H, m, H<sub>2</sub>-4), 1.98 (1H, m, H-5a), 1.90 (1H, m, H-5b), 1.50 (2H, m, H<sub>2</sub>-10), 0.94 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H<sub>3</sub>-11);<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 169.9 (C-1), 154.7 (C-3), 150.3 (C-3a), 127.7 (C-7a), 113.2 (C-8), 71.3 (C-7), 65.9 (C-6), 29.3 (C-9), 25.5 (C-4), 23.7 (C-5), 18.5 (C-10), 14.8 (C-11)。以上数据与文献报道<sup>[12]</sup>数据对比,鉴定化合物 6 为洋川芎内酯 I。

#### 3.2 对氯化钴损伤的 PC12 细胞的保护作用

3.2.1 川芎挥发油及其单体成分显著提高氯化钴损伤的 PC12 细胞存活率

由图 1 可知,经氯化钴诱导损伤后,PC12 的生长受到显著抑制( $P < 0.01$ ),与正常细胞相比,其存活率下降为 65.72%。浓度范围在 3.125 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的川芎挥发油处理后,细胞存活率明显上升( $P < 0.01$ ),在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量时达到最高,存活率

99.8%, 明显高于模型组 65.7%、阳性对照组 70.1% 的存活率( $P < 0.01$ )。但川芎挥发油在较高浓度(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )时,表现出明显损伤作用( $P < 0.01$ ),存活率下降至 30.2%,该结果与当归油对谷氨酸损伤 PC12 细胞的作用一致,适当浓度保护受损 PC12 细胞,过高浓度加剧损伤,这可能与挥发油的刺激性有关<sup>[13]</sup>。

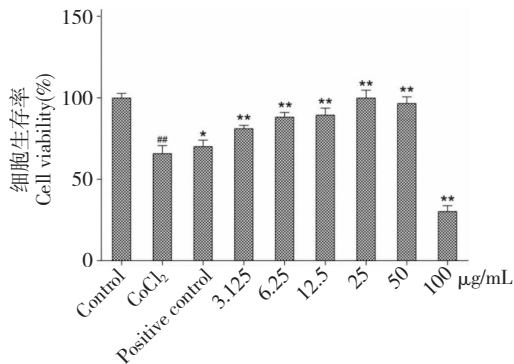


图1 川芎挥发油对氯化钴损伤的 PC12 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of *L. chuanxiong* oil on  $\text{CoCl}_2$ -induced neurotoxicity in PC12 cells

注:与空白组比较,### $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note:### $P < 0.01$  vs Control group;\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$  vs  $\text{CoCl}_2$  group

分离纯化出的单体化合物作用于氯化钴损伤的 PC12 细胞的影响见图 2。由图可知,氯化钴造模成功( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与模型组比较,化合物 1、3、4 和 6 在一定浓度下对受损的 PC12 细胞有显著的保护作用( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),化合物 1 的保护作用最为明显,在 6.25  $\mu\text{M}$  的浓度下细胞存活率可达 84.0% ( $P < 0.01$ ),高于阳性对照组的 66.22% ( $P < 0.01$ )。化合物 3、4 和 6 分别在 50  $\mu\text{M}$ 、12.5  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$  的浓度下对损伤细胞的保护作用最好( $P < 0.01$ ),存活率均大于 90%。化合物 2 和 5 的作用不明显。值得注意的是:化合物 1、3 和 4 在高浓度(200  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ 、400  $\mu\text{M}$ )时均表现出明显的加剧损伤的作用,与川芎挥发油作用效果一致。

3.2.2 川芎挥发油及化合物 1 抑制氯化钴所致的 PC12 细胞凋亡

氯化钴损伤 PC12 细胞的主要途径之一是诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。通过 MTT 发现,川芎油和化合物 1 在一定浓度条件下对氯化钴诱导损伤的 PC12 细胞有

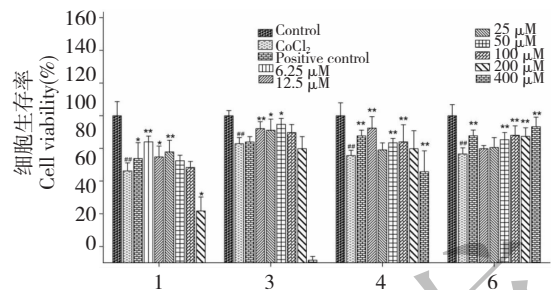


图2 单体化合物对氯化钴损伤的 PC12 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of compounds on  $\text{CoCl}_2$ -induced neurotoxicity in PC12 cells

注:与空白组比较,### $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note:### $P < 0.01$  vs Control group;\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$  vs  $\text{CoCl}_2$  group

较好的保护作用,根据实验结果选择最佳给药浓度及最低给药浓度对其进行 Hoechst 33258 染色,观察细胞凋亡情况。将川芎挥发油(3.125、12.5  $\text{mg}/\text{mL}$ )及化合物 1(6.25、25  $\mu\text{M}$ )对氯化钴诱导损伤 PC12 细胞作用后,结果见图 3。与空白组相比,模型组细胞染色质明显固缩、细胞核致密浓染呈亮蓝色,说明氯化钴作用 PC12 细胞后使其发生凋亡。与模型组相比,药物组的细胞形态完整、细胞核荧光强度较低且呈弥散状分布,说明川芎油及化合物 1 能明显抑制氯化钴诱导的细胞凋亡。

3.2.3 川芎油及单体化合物显著降低氯化钴损伤 PC12 细胞的乳酸脱氢酶水平

细胞乳酸脱氢酶是一种可溶性胞质酶,当细胞膜结构及其完整性被破坏时,大量释放到培养上清液中,因此上清液中细胞乳酸脱氢酶增加与细胞的损伤或死亡程度成正比<sup>[15]</sup>。如表 1 所示,与空白组(25.34  $\pm$  3.94 U/L)比较,模型组乳酸脱氢酶水平明显上升(82.39  $\pm$  11.35 U/L) ( $P < 0.01$ ),氯化钴造模成功。与模型组相比,经不同浓度川芎挥发油及化合物 1 预处理后,乳酸脱氢酶水平显著下降( $P < 0.01$ ),均低于 70 U/L,说明二者能降低细胞膜受损程度。当川芎挥发油浓度在 12.5  $\text{mg}/\text{mL}$  时最好,乳酸脱氢酶水平降低至 43.63  $\pm$  8.99 U/L ( $P < 0.01$ )。

## 4 讨论与结论

大量研究报道川芎挥发油具有明显的神经保护作用<sup>[2]</sup>,尤其对缺氧损伤的保护效果显著<sup>[2,4]</sup>。氯

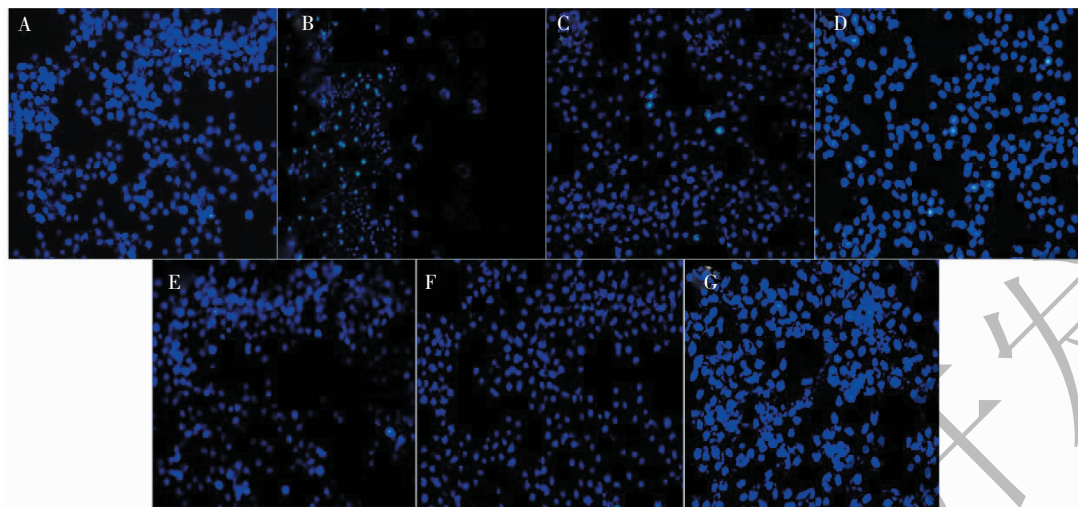


图3 Hoechst 33258 染色后的 PC12 细胞

Fig. 3 PC12 cells stained with Hoechst 33258

注: A:空白组; B:模型组; C:阳性对照组, 100  $\mu\text{M}$ ; D:川芎挥发油, 3.125 mg/mL; E:川芎挥发油, 12.5 mg/mL; F:化合物 1, 6.25  $\mu\text{M}$ ; G:化合物 1, 25  $\mu\text{M}$

Note: A: Control; B:  $\text{CoCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$ ; C: Positive Control, 100  $\mu\text{M}$ ; D: *L. chuanxiong* oil, 3.125 mg/mL; E: *L. chuanxiong* oil, 12.5 mg/mL; F: Compound 1, 6.25  $\mu\text{M}$ ; G: Compound 1, 25  $\mu\text{M}$

表1 川芎挥发油和化合物 1 给药后 PC12 细胞乳酸脱氢酶水平

Table 1 Effects of *L. chuanxiong* oil and compound 1 on LDH levels of  $\text{CoCl}_2$ -treated PC12 cells

组别 Group	剂量 Dose	LDH (U/L)
空白组 Control Group	-	25.34 $\pm$ 3.94
模型组 $\text{CoCl}_2$ Group	250 $\mu\text{M}$	82.39 $\pm$ 11.35 <sup>##</sup>
阳性药组 Butylphthalide Group	100 $\mu\text{M}$	50.41 $\pm$ 11.38 <sup>**</sup>
川芎挥发油 <i>L. chuanxiong</i> oil	3.125 mg/mL	69.32 $\pm$ 12.58 <sup>**</sup>
	12.5 mg/mL	43.63 $\pm$ 8.99 <sup>**</sup>
化合物 1 Compound 1	6.25 $\mu\text{M}$	53.52 $\pm$ 8.06 <sup>**</sup>
	25 $\mu\text{M}$	64.27 $\pm$ 14.45 <sup>**</sup>

注: 与空白组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs Control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs  $\text{CoCl}_2$  group.

化钴诱导 PC12 细胞模型是常见的体外神经细胞缺氧损伤模型, 因此选用此模型探讨川芎挥发油及其单体成分的神经细胞保护作用。丁苯酞是一常用的治疗脑部疾病的药物, 作用机理清楚, 其结构与川芎挥发油中分离得到的单体化合物相似, 故选用丁苯酞作为阳性对照药物。研究发现川芎挥发油在一定浓度范围内 (3.125 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 可提高氯化钴诱导损伤 PC12 细胞的生存率, 在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下作用最佳, 存活率达到 99.8%, 明显高于阳性药丁苯酞。通过 Hoechst 染色可以看出川芎油在一定程度上抑制了氯化钴诱导的细胞凋亡, 说明川芎挥发油对神

经细胞保护作用与抑制细胞凋亡有关, 同时还发现川芎油能明显降低 LDH 水平, 可能与维持受损细胞膜完整, 改善其通透性, 稳定细胞内环境有关。

现阶段对川芎挥发油中活性物质的研究主要集中在丁苯酞, 而挥发油中还存在大量其他苯酞类化合物及其衍生物, 进一步研究挥发油的物质基础具有重要意义。本研究对川芎挥发油中分离得到 6 个化合物, 其中化合物 1、2、4~6 是苯酞类成分, 化合物 3 是倍半萜类成分。对得到的化合物进行活性筛选, 发现化合物 1、3、4、6 均具有一定的保护作用, 除化合物 3 以外均为苯酞类成分, 进一步证实苯酞类

成分是川芎挥发油中的主要活性成分,同时也提示挥发油中的萜类成分也不容忽视。其中,化合物 **1** 活性最好,对其进一步研究发现,化合物 **1** 能够抑制氯化钴诱导的细胞凋亡,降低细胞的 LDH 水平。

藁本内酯是川芎的主要有效成分,其化学结构的不稳定性限制了它的进一步研究和临床应用<sup>[16]</sup>。化合物 **1** (riligustilide) 为藁本内酯的二聚体,分子量较大,而挥发油中主要含小分子成分,理论上化合物 **1** 不存在于挥发油中。结合房鑫等<sup>[16]</sup> 研究发现藁本内酯室温静置一个月后可转化为化学结构更稳定的二聚体(如化合物 **1**),进一步提示化合物 **1** 可能是挥发油中含量较高的藁本内酯由于加热或长期放置转化而来。本研究从川芎挥发油中发现了藁本内酯的二聚体(riligustilide),其结构较藁本内酯更稳定,同时发现其体外活性显著,为以后川芎在神经细胞保护方向的研究提供了新的选择。

#### 参考文献

- Ran X, Ma L, Peng C, et al. *Ligusticum chuanxiong* Hort: a review of chemistry and pharmacology. *Pharm Biol*, 2011, 49:1180-1189.
- Du JC (杜旌畅), Xie XF (谢晓芳), Xiong L (熊亮), et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological activities of essential oil of *Ligusticum chuanxiong*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41:4328-4333.
- Shen YM (盛艳梅), Meng XL (孟宪丽), Li CY (李春雨), et al. Effects of aetherolea from *Chuanxiong* on ischemical reperfusion injury in rats and the survival of cerebral cortex neurons *invitro*. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23:536-538.
- Liu LS (刘露丝), Yue MY (岳美颖), Li WB (李文兵), et al. Differences from chemical components and protective effect on acute cerebral injury of mice between the oils from *Angelica sinensis* and *Ligusticum Chuanxiong*. *Pharm Clin Chin Materia Med* (中药药理与临床), 2016, 32:105-108.
- Zeng Z (曾志), Xie RQ (谢润乾), Tan LX (谭丽贤), et al. GC-MS Analysis and determination of chemical components of the extracts from *Ligusticum Chuanxiong* Hort. by steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 2011, 28:956-962.
- Liu LS (刘露丝), Peng C (彭成), Xiong L (熊亮). Research progress on phthalides from *Angelica sinensis*. *World Sci Tech-Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2015, 17:958-962.
- Deng S, Chen SN, Lu J, et al. GABAergic phthalide dimers from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Phytochem Anal*, 2006, 17:398-405.
- Quiroz-García B, Figueroa R, Cogordan J A, et al. Photocyclodimers from *Z*-ligustilide experimental results and FMO analysis. *Tetrahedr Lett*, 2005, 46:3003-3006.
- Inagaki F, Abe A. Analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of spathulenol by two-dimensional methods. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1985, 11:1773-1778.
- Roscini C, Davies DME, Berry M, et al. Product selection through photon flux: laser-specific lactone synthesis. *Angew Chem*, 2008, 47:2283-2286.
- Wang P, Gao X, Wang Y, et al. Phthalides from the rhizome of *Ligusticum wallichii*. *Phytochemistry*, 1984, 23: 2033-2038.
- Naito T, Ikeya Y, Okada MH. et al. Two phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry*, 1996, 41:233-236.
- Liu L, Peng C, Zhou Q, et al. Effects of angelica oil and the isolated butylphthalides on glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Rec Nat Prod*, 2017, 11:217-222
- Jung JY, Mo HC, Yang KH, et al. Inhibition by epigallocatechin gallate of CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Life Sci*, 2007, 80:1355-1363.
- Wang G, Zhang J, Dewilde AH, et al. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology*, 2012, 299:99-111.
- Fang X (房鑫), Xiong Z (熊智), Lin X (林晓), et al. Study on the stability of ligustilide and its main transformation products. *Nat Prod Rese Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1339-1344.