

化痰通络汤对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠的脑神经保护作用

彭慧渊, 胡莹, 杨楠, 王本国, 王秉道, 汪峰, 林铎

(广东省中山市中医院, 广东中山 528400)

摘要:【目的】探讨化痰通络汤对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠的脑神经保护作用。【方法】将100只SD大鼠随机分为假手术组(蒸馏水灌胃), 模型组(蒸馏水灌胃), 化痰通络汤低、中、高剂量组(7.65、15.30、30.60 g/kg对应灌胃), 脑心通组(步长脑心通溶液0.864 g/kg灌胃)。各组大鼠连续灌胃7 d后, 除假手术组, 其余各组大鼠采用改良线栓法制备大鼠中动脉栓塞模型。于造模后24 h采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估神经功能。处死大鼠后, 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定脑梗死范围, 苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠脑组织病理损伤变化, 甲苯胺蓝染色法观察大鼠脑组织神经细胞形态及受损情况, 原位末端转移酶标记(TUNEL)染色法观察大鼠神经元细胞凋亡情况, 免疫组织化学法观察大鼠脑组织碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白表达, 酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测大鼠血清炎性因子白细胞介素6(IL-6)表达水平。【结果】与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分升高($P < 0.05$), 脑梗死体积增大($P < 0.05$), 大脑组织出现明显病理损伤, 神经细胞凋亡率增加($P < 0.05$), 梗死区域bFGF蛋白表达水平降低($P < 0.05$), 血清中IL-6表达水平升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 化痰通络汤各剂量组上述指标得到明显改善, 效果与脑心通组相当。【结论】化痰通络汤对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠有神经保护作用。

关键词:化痰通络汤; 局灶性脑缺血-再灌注损伤; 神经保护; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1941-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.027

Neuroprotective Effect of Stasis-Activating and Collaterals-Dredging Decoction on Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

PENG Hui-Yuan, HU Ying, YANG Nan, WANG Ben-Guo,
WANG Bing-Dao, WANG Feng, LIN Duo

(Zhongshan Hospital of Chinese Medicine, Zhongshan 528400 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the neuroprotective effect of Stasis-Activating and Collaterals-Dredging Decoction (SCD) on the focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** One-hundred rats were randomly divided into sham-operation group (distilled water by gavage), model group (distilled water by gavage), low-, middle- and high-dose SCD groups (7.65, 15.30, 30.60 g·kg⁻¹·d⁻¹ of SCD by gavage, respectively), *Naoxintong* group (0.864 g·kg⁻¹·d⁻¹ of *Buchang Naoxintong* solution by gavage). After intragastric administration for 7 continuous days, the rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by modified thread-occlusion method. Twenty-four hours after modeling, the neurological function was assessed by modified neurological severity score (mNSS). After cervical luxation of rats, the infarct area of brain was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, the pathological changes of brain tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the morphological characteristics of nerve cells were observed by toluidine blue staining, the cell apoptosis was observed by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining, the protein expression level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in brain tissue was detected by immunohistochemistry, and the level of inflammatory factor interleukin 6 (IL-6) in serum was detected by enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the sham-operation

收稿日期: 2021-01-27

作者简介: 彭慧渊(1978-), 男, 硕士, 主任中医师, 教授; E-mail: huiyuan01@163.com

通讯作者: 杨楠, 女, 主任中医师, 教授, 博士研究生导师; E-mail: srsyang@126.com

基金项目: 中山市科技计划医疗卫生重大专项(编号: 2014A1FC007); 国家中医药管理局中医临床研究基地科研立项(编号: JDZX2015296)

group, the mNSS was increased in the model group ($P < 0.05$), and the cerebral infarction volume was enhanced ($P < 0.05$), the obvious pathological injury in rat brain tissue was seen, the rate of neuronal apoptosis was raised ($P < 0.05$), the expression level of bFGF in the infarct area was lowered ($P < 0.05$), and the level of IL-6 in serum was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the above indexes were improve in the various dose SCD groups, the effect being equivalent to that of the *Naoxintong* group. **Conclusion** SCD has neuroprotective effects on the focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.

Keywords: Stasis-Activating and Collaterals-Dredging Decoction; focal cerebral ischemia-reperfusion injury; neuroprotection; rats

脑血管疾病是严重威胁人类健康的疾病之一。目前,由于我国老龄化程度加剧,脑卒中的发病率呈逐年增高的趋势,其中,以缺血性脑卒中发病率最高,约占脑血管疾病的80%。缺血性脑卒中有较高的致死率和致残率,其存活后致残率高达75%^[1-2]。因此,脑缺血发生后及时给予患者神经保护治疗对患者预后及康复具有重要的临床意义。化瘀通络汤为中山市中医院杨楠教授自拟经验方,由当归、毛冬青等7味中药组成,临床用于缺血性脑卒中的辅助治疗^[3],对卒中后患者有神经保护作用,且疗效稳定,预后佳^[4-7]。但化瘀通络汤治疗缺血性脑卒中的作用机制尚不明确,因此,本研究以大脑中动脉栓塞大鼠模型为实验对象,探讨化瘀通络汤对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,以期为化瘀通络汤临床治疗缺血性脑卒中进一步提供依据,现将研究结果报道如下。

1 材料与方

1.1 动物及饲养 SPF级雄性SD大鼠100只,6~7周龄,体质量200~250 g,购于广东省医学实验动物中心,动物质量合格证号:44007200046507。饲养于中山市中医院屏障级实验室,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2015-0109。室内保持通风,恒温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度40%~70%,12 h昼夜交替间隔,所有实验大鼠均适应性饲养7 d,期间自由摄食与饮水。

1.2 药物与试剂 化瘀通络汤(由中山市中医院制剂室制备,批号:20171201);步长脑心通胶囊(咸阳步长制药有限公司生产,批号:170917)。白细胞介素6(IL-6)酶联免疫吸附分析试剂盒(武汉华美公司,批号:R09013408);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)粉末(MP Biomedicals LLC,批

号:Q1130);水合氯醛(上海展云化工有限公司,批号:141115);原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒(美国Roche公司,批号:17839000);3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司,批号:11K11B22);SA1022兔免疫球蛋白G(IgG)试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司,批号:12E27C);抗碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)抗体(美国Abcam公司,批号:GR279560)。

1.3 仪器 HGPN隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);2-16R高速冷冻离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);Multiskan Mk3酶标仪(美国Thermo Scientific公司);Unique系列超纯水机(广州誉维生物科技仪器有限公司);Eclipse Ci显微镜、DS-FI2成像系统(日本Nikon公司);TS-8型转移脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);CU420型电热恒温水箱(上海一恒科技有限公司);微量有机分析专用超纯水机(颐洋企业发展有限公司)。

1.4 分组及给药 将100只大鼠随机分为假手术组,模型组,脑心痛组,化瘀通络汤低、中、高剂量组,除假手术组10只大鼠以外,其余每组各18只大鼠。根据《中药药理实验方法学》^[8]中大鼠与人给药剂量换算公式,大鼠给药剂量=人 \times 6.3/70 kg(人的体质量),得到大鼠等同于人的临床给药剂量,按方药学实验设计以临床给药剂量的2、4、8倍确定灌胃大鼠的化瘀通络汤的低、中、高剂量。按10 mL/kg给药体积,假手术组和模型组大鼠每日灌胃蒸馏水,脑心痛组大鼠每日灌胃步长脑心痛溶液0.864 g/kg,化瘀通络汤低(7.65 g/kg)、中(15.3 g/kg)、高(30.6 g/kg)剂量组大鼠每日分别给予对应剂量灌胃,连续灌胃给药7 d。

1.5 复制大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型 连续灌胃给药7 d后,所有大鼠于术前12 h禁食,末次灌胃给药后1 h,采用Zea Longa改良栓线法^[8]制备MCAO模型。方法:造模大鼠用体积分数10%水合氯醛(3.5 mL/kg体质量)腹腔注射麻醉,待麻药起效后将大鼠仰卧固定,于颈部正中作矢状切口,仔细分离暴露出右侧颈内动脉、颈外动脉及颈总动脉。在颈外动脉及颈总动脉近心端处作永久结扎,用动脉夹夹闭颈内动脉。自颈总动脉远心端距颈内动脉、颈外动脉分叉处1 cm左右用剪刀剪一小口,插入事先准备好的鱼线(用蜡包埋尖端,直径为0.26 mm,于18~22 mm处做好标记)经颈总动脉插入颈内动脉,进入颅内。鱼线插入至有阻力时停止,即从分叉处算起大约插入18~20 mm,将鱼线连同颈总动脉一起结扎,缝合皮肤。用生理盐水湿润的纱布覆盖上伤口,使大鼠俯卧。手术大鼠缺血2 h后,将鱼线由血管内抽出,再让血流灌注24 h。在此期间注意给大鼠保暖以及补充水分。以大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪,站立不稳,无法直线行走,提尾时向一侧转圈,左前肢屈曲,不能伸直为判断造模成功的标准^[9]。假手术组仅剪开颈部皮肤,不插入线栓,其余步骤同造模步骤。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 神经功能评分 各组大鼠于脑缺血再灌注24 h后进行神经功能评分,参考Zea Longa^[9]的5级4分法标准进行评定。0分:无神经功能缺损,活动正常;1分:轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2分:中度局灶性神经功能缺损,爬行时出现左侧转圈(追尾征);3分:重度局灶性神经功能缺损,行走时身体向左侧倒;4分:不能行走,意识丧失。评分越高,神经功能缺陷越重,1~4分为模型成功。剔除造模失败及死亡例数,最终每组选取8只成功大鼠模型进行统计分析。

1.6.2 TTC染色法测定脑梗死面积 每组选取8只大鼠以100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉后,断头处死。取出脑组织,放置于-20℃冰箱30 min,待大脑至半硬状态从额极到枕极冠状切片,共5片,厚度约为2 μm。将脑切片置于磷酸盐缓冲液(PBS)配制的2%(w/v) TTC溶液中染色,先于37℃温箱避光孵育15 min,后将脑切片翻过另一面再孵育15 min,总时长30 min,以确保脑切片染

色均匀。最后将取出大脑切片用滤纸吸干多余液体,观察并拍照。正常脑组织染色后呈现深红色,缺血大脑组织为白色。用Image-Pro Plus图像分析软件分析计算脑梗死灶体积百分比,脑梗死体积百分比(%)=(S1+S2+S3+……)/(S'1+S'2+S'3+……)×100%,S1、S2、S3……表示每片梗死脑组织面积,S'1、S'2、S'3……表示每片脑组织总面积。

1.6.3 苏木素-伊红(HE)染色法观察大脑组织形态学变化 以100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,待大鼠深度麻醉后迅速打开胸腔,暴露心脏。将针尖插入右心室,剪开左心耳,先使用PBS经右心室一次性灌注250 mL,待大鼠眼球及四肢变白改灌注100 g/L多聚甲醛溶液直至大鼠身体发僵后迅速断头、开颅取出脑组织,放入100 g/L多聚甲醛溶液中于4℃保存。24 h后将脑组织依次进行脱水,石蜡包埋,连续切片,再脱蜡,HE染色,最后于显微镜下随机选取5个视野观察脑组织病理形态学变化。

1.6.4 甲苯胺蓝染色法观察脑神经细胞的形态学变化 将大鼠脑组织置于-20℃冰箱,30 min后取出,切片。用去离子水冲洗2次,甲苯胺蓝染色,室温显色20 min,再使用去离子水将脑切片洗涤2次,滴加体积分数95%乙醇分化5 s,然后依次用体积分数70%、95%乙醇梯度脱水2次,每次2 min。最后用二甲苯透明处理,树脂封片。每张切片随机选取5个不同视野,于光镜下观察。

1.6.5 TUNEL法观察脑神经细胞凋亡情况 将大脑冰冻切片置于二甲苯溶液中浸泡10 min,更换二甲苯溶液后再浸泡10 min。依次于无水乙醇、95%、90%、80%、70%乙醇及蒸馏水中浸泡5 min。将0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲溶液(pH=6.0)在微波炉内用中高火加热5 min至沸腾后放入切片,冷却至室温。用PBS冲洗3次,每次5 min。再用去离子水配制体积分数3% H₂O₂,于室温处理10 min。再用PBS洗3次,每次5 min。然后按照TUNEL试剂盒说明书操作,DAB显色,去离子水冲洗,苏木素复染1 min,脱水,二甲苯透明,树脂封片,于光镜下观察。细胞核中出现棕黄色颗粒为凋亡细胞。每张切片随机选取5个不同视野,于镜下计数凋亡细胞,细胞凋亡程度(apoptotic cell index, ACI)=凋亡细胞数/总细胞数。

1.6.6 免疫组织化学法检测脑组织碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)蛋白表达 将大鼠脑组织切片常规脱蜡水化后滴加一抗(1:800稀释)4℃孵育过夜, PBS洗3次, 每次5 min。然后加入二抗于37℃孵育30 min, PBS冲洗3次, 每次5 min。再滴加试剂SABC于37℃孵育30 min, PBS冲洗4次, 每次5 min。DAB显色, 蒸馏水冲洗, 苏木素轻度复染, 饱和磷酸氢二钠分化, 脱水, 二甲苯透明, 树脂封片, 于光镜下观察。每张切片随机选取6个不同视野, bFGF阳性表达呈棕黄色, 采用Imaga-ProPlus 6.0软件进行分析, 结果以单个视野的平均光密度(OD)表示。

1.6.7 ELISA法检测血清中IL-6含量 将各组大鼠麻醉后迅速打开腹腔, 经腹主动脉采血, 将采血管静置于4℃冰箱2 h后, 以3 500 r/min(离心半径为8.7 cm)离心10 min, 取上清液待测, 具体检测步骤严格按照IL-6试剂盒说明书操作。

1.7 统计方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据比较, 方差齐采用单因素方差分析, 方差不齐则采用Dunnett T3检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分比较 结果见表1。与假手术组比较, 模型组大鼠表现出转圈追尾, 不能直线行走, 单侧倾倒等神经行为障碍, 神经功能缺损评分增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 脑心通组大鼠神经功能缺损评分降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 化痰通络

表1 各组大鼠大鼠神经功能缺损评分比较

Table 1 Comparison of the neurological severity scores for rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	鼠数(只)	评分
假手术组	8	—
模型组	8	3.24 ± 0.97 ^①
脑心通组	8	1.65 ± 0.70 ^②
化痰通络汤低剂量组	8	2.33 ± 0.97 ^②
化痰通络汤中剂量组	8	1.35 ± 0.61 ^②
化痰通络汤高剂量组	8	0.83 ± 0.92 ^②

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

汤各剂量组神经功能缺损评分明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且随药物浓度增高, 神经功能缺损评分下降越明显, 存在一定的量效关系。

2.2 各组大鼠脑梗死范围比较 结果见表2、图1。与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织出现大范围白色梗死区, 脑梗死体积增大, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 脑心通组及化痰通络汤低、中、高剂量组脑梗死范围明显缩小, 脑梗死体积减小, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。化痰通络汤低、中、高剂量组随着药物浓度的增加脑梗死面积减小, 存在一定的量效关系。

表2 各组大鼠脑梗死体积比较

Table 2 Comparison of the cerebral infarction volume of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	梗死百分比(%)
假手术组	8	—
模型组	8	40.23 ± 4.89 ^①
脑心通组	8	6.16 ± 8.16 ^②
化痰通络汤低剂量组	8	25.86 ± 20.01
化痰通络汤中剂量组	8	18.22 ± 15.01 ^②
化痰通络汤高剂量组	8	8.32 ± 7.35 ^②

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

2.3 各组大鼠脑组织形态学表现比较 结果见图2。假手术组脑组织呈现正常形态; 模型组脑组织皮层软化, 重度疏松, 呈网格状, 可见大量小空洞, 神经元大量减少, 残存的少量神经元紧缩深染, 且细胞周围间隙较大; 脑心通组神经元丰富, 大多数神经元形态正常, 仅有少量神经元轻度紧缩深染; 化痰通络汤低、中剂量组大脑神经元数量虽增多, 但大部分神经元仍呈现紧缩深染的状态, 且细胞周围间隙较大; 化痰通络汤高剂量组大脑皮层病变明显减轻, 结构更加紧密, 神经元分布均匀, 数量正常, 但存在少量神经元紧缩深染及细胞间隙。

2.4 各组大鼠脑神经细胞形态比较 结果见图3。与假手术组比较, 模型组皮层结构疏松, 神经元大量减少, 紧缩深染。与模型组比较, 脑心通组神经元数量丰富, 仅少量神经元紧缩深染, 化痰通络汤低剂量组神经元数量增多, 皮层结构仍疏松, 中剂量组皮层结构较紧密, 较多神经元紧缩

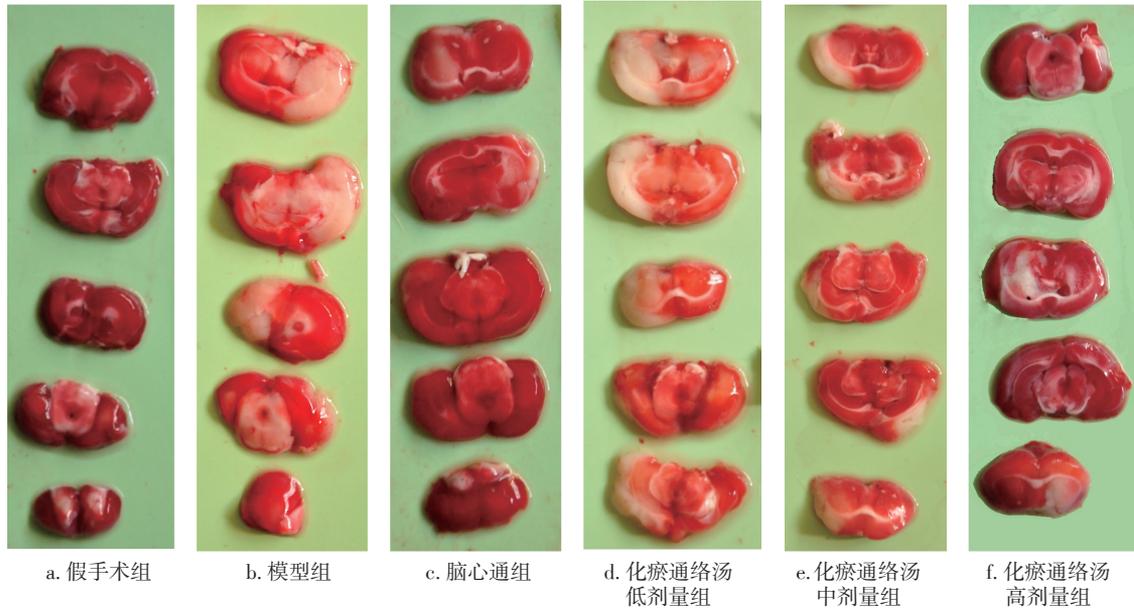


图1 各组大鼠脑梗死体积大体比较(TTC染色)

Figure 1 Comparison of the megascopic volume of cerebral infarction of rats in various groups (by TTC staining)

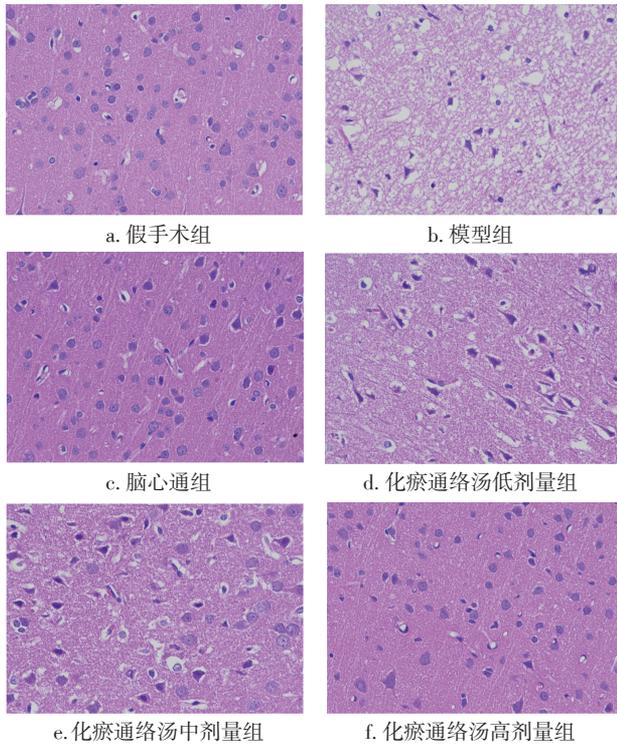


图2 各组大鼠脑组织形态学表现比较(HE染色, ×400)

Figure 2 Comparison of the morphological characteristics of rat brain tissue in various groups (by HE staining, ×400)

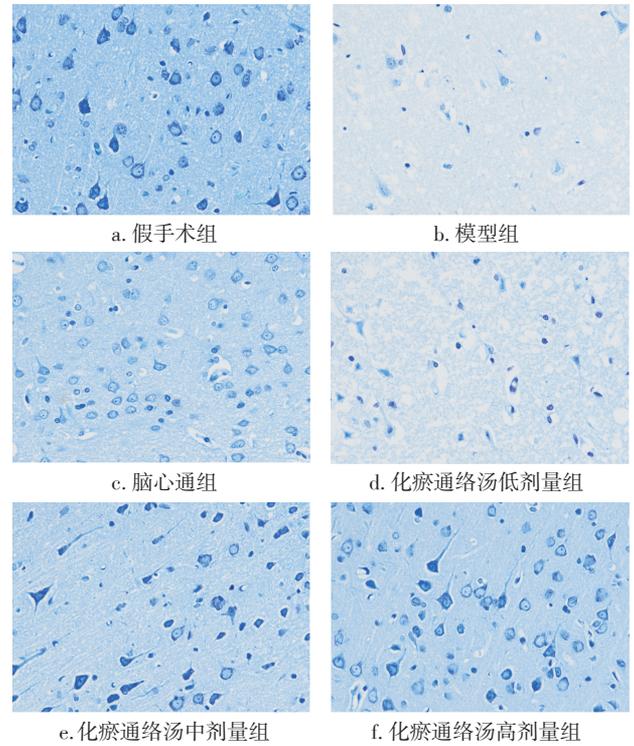


图3 各组大鼠脑神经细胞形态比较(甲苯胺蓝染色, ×400)

Figure 3 Comparison of the morphological characteristics of rat cerebral neurons in various groups (by toluidine blue staining, ×400)

深染, 高剂量组神经元数量丰富, 皮层结构更紧密, 仅少量神经元紧缩深染。

2.5 各组大鼠脑神经细胞凋亡情况比较 结果见

表3、图4。与假手术组比较, 模型组脑组织呈现大量TUNEL阳性细胞表达, 呈棕黄色染色, 同时

表3 各组大鼠神经细胞凋亡率比较

Table 3 Comparison of the rate of neuroapoptosis for rats in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	神经细胞凋亡率(%)
假手术组	8	24.00 ± 7.78
模型组	8	62.31 ± 13.43 ^①
脑心通组	8	36.69 ± 10.66 ^②
化癍通络汤低剂量组	8	38.38 ± 18.77 ^②
化癍通络汤中剂量组	8	32.95 ± 16.16 ^②
化癍通络汤高剂量组	8	37.97 ± 22.66 ^②

①P < 0.05, 与假手术组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

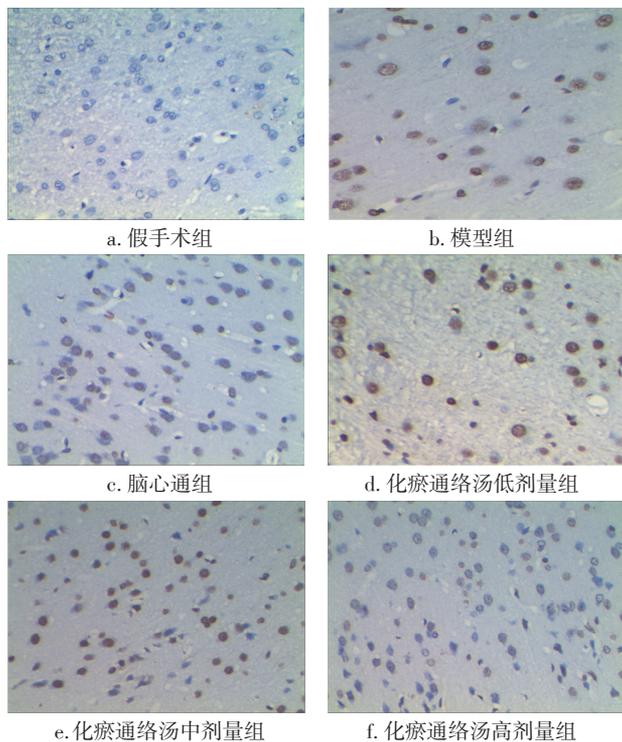


图4 各组大鼠脑梗死皮质凋亡神经细胞分布情况比较 (TUNEL染色, ×400)

Figure 4 Comparison of the distribution of apoptotic neurons in rat cerebral infarction cortex in various groups (by TUNEL staining, ×400)

细胞变形, 细胞质浓缩, 细胞体积变小, 神经细胞凋亡率上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 脑心通组神经细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 化癍通络汤各剂量组神经细胞凋亡率亦降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 中剂量组效果最好。

2.6 各组大鼠脑组织bFGF蛋白表达比较 结果见表4、图5。与假手术组比较, 模型组大脑梗死

表4 各组大鼠脑组织bFGF蛋白表达水平比较

Table 4 Comparison of the expression level of bFGF in rat brain tissue in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	bFGF(IOD)
假手术组	8	65.33 ± 22.36
模型组	8	123.55 ± 30.64 ^①
脑心通组	8	186.48 ± 47.10 ^②
化癍通络汤低剂量组	8	160.24 ± 50.47 ^②
化癍通络汤中剂量组	8	160.75 ± 24.11 ^②
化癍通络汤高剂量组	8	208.27 ± 54.34 ^②

①P < 0.05, 与假手术组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

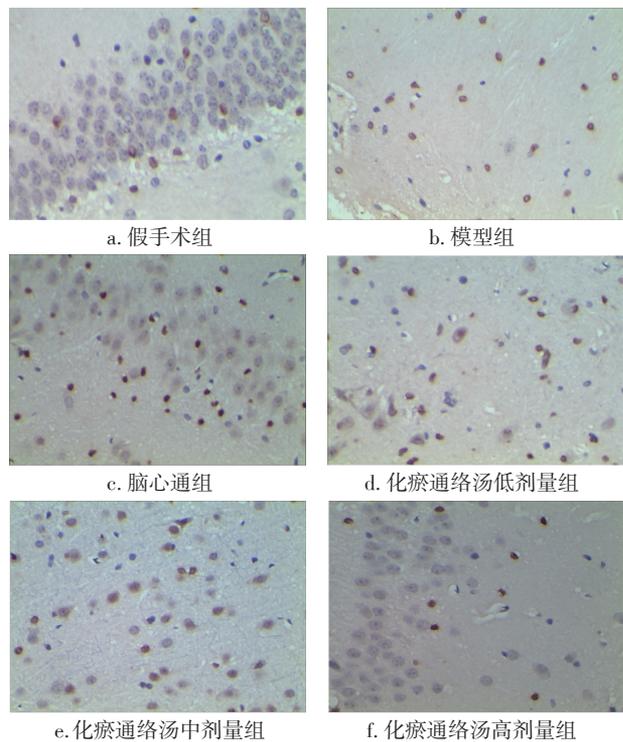


图5 各组大鼠脑梗死皮质bFGF阳性细胞分布情况比较 (免疫组织化学法, ×400)

Figure 5 Comparison of the distribution of bFGF-positive neurons in rat cerebral infarction cortex in various groups (by immunohistochemistry, ×400)

灶周围bFGF表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 脑心通组及化癍通络汤低、中、高剂量组bFGF表达水平显著下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 各组大鼠血清IL-6含量比较 结果见表5。与假手术组比较, 模型组血清中IL-6含量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 脑心通组及化癍通络汤低、中、高剂量组血清中IL-6

含量显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且化痰通络汤各剂量组呈剂量依赖性。

表5 各组大鼠血清中IL-6含量比较

Table 5 Comparison of the serum content of IL-6 for rats in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	IL-6含量($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
假手术组	8	24.65 ± 4.77
模型组	8	51.10 ± 8.42 ^①
脑心通组	8	32.44 ± 7.84 ^②
化痰通络汤低剂量组	8	31.63 ± 10.48 ^②
化痰通络汤中剂量组	8	26.75 ± 11.25 ^②
化痰通络汤高剂量组	8	24.23 ± 5.75 ^②

① $P < 0.05$,与假手术组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较

3 讨论

缺血性脑卒中临床发病率高且有逐年增加的趋势,临床预后差,致残率高。大脑缺血会导致脑组织及神经细胞受损,虽然早期溶栓治疗对缺血性脑卒中具有一定的效果,但脑组织在恢复血流供应后反而会使原缺血脑组织损伤加重^[10-11]。大脑组织水肿使颅内压升高,同时引起大脑继发性神经元凋亡及坏死,造成脑功能障碍,因此,血液再灌注引起的损伤程度远远大于脑缺血损伤本身。脑缺血再灌注损伤的机制十分复杂,有研究认为,脑组织继发性神经细胞凋亡是导致再灌注脑损伤的主要病理机制之一^[12-15]。

bFGF,是一种神经营养因子^[16],广泛分布于中枢神经,对缺血性脑损伤有神经保护作用,可促进神经元修复和再生^[17],同时,可促进受损脑组织的血管新生,其在受损脑组织中的表达强度与毛细血管数目呈正相关。一般情况下,机体bFGF不能通过血脑屏障,但由于脑缺血造成局部脑组织损伤导致血脑屏障通透性增加,bFGF可通过损伤部位进入外周血,从而造成缺血损伤脑组织中bFGF表达下降。同时,当脑缺血发生时体内大量炎症因子如IL-6等亦会被激活^[18-19],参与机体免疫应答和脑梗死后炎症反应,因此促炎症因子IL-6被认为是脑梗塞急性期的重要标志物^[20],可用于评估脑梗死的严重程度及预后。有研究表明,血清IL-6水平与脑缺血损伤的严重程度呈正相关^[21],血清中IL-6含量升高可进一步加重脑受损部位神经

细胞凋亡。

化痰通络汤全方以叶天士“佐以辛香是络病大旨”之说为理论基础。以岭南特色草药毛冬青为君,活血化瘀通络,兼清热解毒。当归相伍养血活血,使瘀血去而正不伤,另配赤芍、川芎活血化瘀兼走气分,三药合用共助毛冬青活血化瘀通络,为臣药。佐用地龙、水蛭、全蝎,以通络。全方通补并用,共奏化痰通络之效。前期临床研究^[4]表明,化痰通络汤可有效改善急性脑梗死患者神经功能缺损症状,使梗塞中心及其周围区域组织灌注改善,且对梗死周围组织的作用强于梗死中心。本研究结果显示,化痰通络汤可降低MCAO大鼠神经功能缺损评分,缩小脑梗死灶,减少脑梗死体积,保护脑组织病理结构及神经细胞形态,改善梗死脑组织病理损害,改善梗死脑组织的异常神经元结构,有效降低MCAO大鼠神经细胞凋亡数,使梗死区域bFGF蛋白表达上升,降低血清中IL-6含量,起到抑制缺血再灌注后继发性炎症反应,改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的作用。

综上所述,化痰通络汤对缺血脑组织的神经保护作用可能是通过上调脑梗死区域bFGF蛋白表达,抑制神经细胞凋亡,抑制缺血后继发性炎症反应等来实现的,但具体是通过哪条通路机制发挥保护作用还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] FENG J, CHEN X, GUAN B, et al. Inhibition of peroxynitrite-induced mitophagy activation attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6369-6386.
- [2] CHANG C, ZHAO Y, SONG G, et al. Resveratrol protects hippocampal neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulating JAK/ERK/STAT signaling pathway in rats [J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 315(2): 9-14.
- [3] 王秉道. 化痰通络汤治疗缺血性卒中患者的生存质量分析[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [4] 彭慧渊, 刘锦灿, 杨楠, 等. 化痰通络汤改善急性脑梗死中心及其周围区域组织灌注的临床研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(1): 201-203.
- [5] 陈斯娜, 李建婷, 杨楠. 化痰通络汤对脑小血管病致认知功能障碍患者执行功能的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(4): 466-470.
- [6] 黄润超, 李建婷, 杨楠. 化痰通络汤治疗脑小血管病致认知功能障碍的近远期疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017,

- 26(3): 259-261, 276.
- [7] 肖愉愉, 杨楠, 郑利群. 化瘀通络汤联合低分子肝素钙治疗进展性脑梗死临床研究[J]. 中医学报, 2017, 32(5): 832-834.
- [8] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1103.
- [9] 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.
- [10] SHI P, SUN L L, LEE Y S, et al. Electroacupuncture regulates the stress-injury-repair chain of events after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regener Res*, 2017, 12(6): 925-930.
- [11] OU B, TAO W, YANG S, et al. The antiapoptosis effect of geum japonicum Thunb. var. chinense extracts on cerebral ischemia reperfusion injury via PI3K/Akt pathway [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018(1): 1-13.
- [12] ZHANG Y P, LI Y M. Effect of total flavonoids of *Scutellaria barbata* on cognitive function and nogo-a expression in the hippocampus in cerebral ischemia model in gerbils [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2016, 29(6): 2373-2376.
- [13] XING Z J, ZHANG Q, WANG D X, et al. Overexpression of TUG1 promotes neuronal death after cerebral infarction by regulating microRNA-9 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7393-7400.
- [14] WANG Y, ZHEN Y, WU X, et al. Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(3): 379-384.
- [15] YANG X S, YI T L, ZHANG S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5818-5822.
- [16] 王国峰, 刘伯芹, 赵玉芳, 等. 局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织bFGF和PDGF-B mRNA表达及其与血管新生关系[J]. 青岛大学医学院学报, 2016, 52(5): 566-569.
- [17] 杨势赫. bFGF对大鼠脑局灶性缺血/再灌注损伤的治疗效果及缺血半暗带 microRNAs 表达的影响[D]. 南京: 东南大学, 2017.
- [18] 王喜丰, 汪敏, 李刚, 等. 中性鞘磷脂酶-2 (Neutral sphingomyelin-2 N-SMase2)对大鼠脑缺血再灌注损伤中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 炎性因子的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(4): 310-313.
- [19] 常红恩, 郑娜, 安红伟, 等. 通窍活血汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血清中TNF- α 及IL-6水平的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(3): 18-20, 103.
- [20] CLARK W M, RINKER L G, LESSOV N S, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia [J]. *Stroke*, 2000, 31: 1715-1720.
- [21] WANG P, MU Y Y, CHENG J, et al. Electroacupuncture on serum interleukin level in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2015, 13(1): 9-14.

【责任编辑：侯丽颖】