

## 注射用丹参多酚酸和血栓通注射液联合应用对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制研究

王富江, 李芮琳, 贾壮壮, 胡利民\*, 王少峡, 柴丽娟, 郭虹

天津中医药大学中医药研究院 天津市中药药理学重点实验室 方剂学教育部重点实验室, 天津 300193

**摘要:** **目的** 研究注射用丹参多酚酸(SLI)和血栓通注射液(XST)合用对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制。**方法** 250~300 g 雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、依达拉奉(EDI, 6 mg/kg)组、SLI (21 mg/kg)组、XST (100 mg/kg)组、SLI+XST 组(1X1S, 21 mg/kg+100 mg/kg), 采用 Longa 法建立大鼠中动脉栓塞脑缺血再灌注(MCAO/R)模型, 缺血 1.5 h、再灌注 24 h 后, 尾 iv 给药, 每天 1 次, 连续给药 3 d, 检测体质量、神经功能评分及死亡率; 免疫荧光法检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和离子钙接头蛋白抗体(IBA-1)的变化; 生物反应路径分析(IPA)构建和分析 SLI 和 XST “成分-靶点-脑卒中”复杂网络。**结果** 与模型组相比, 1X1S 能明显改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能障碍, 增加大鼠体质量, 显著抑制缺血半暗带区域 GFAP 和 IBA-1 的表达( $P<0.01$ ); IPA 揭示了 SLI 和 XST 治疗脑卒中的相关作用机制。**结论** SLI 和 XST 合用对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显保护作用, 其机制可能与抑制 GFAP 和 IBA-1 的表达及高迁移率族蛋白通路和白细胞介素-8(IL-8)信号通路等有关。

**关键词:** 注射用丹参多酚酸; 血栓通注射液; 缺血再灌注损伤; 脑卒中; 生物反应路径分析

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)19-4029-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.020

## Effect and mechanism of Salvianolate Lyophilized Injection combined with Xueshuantong Injection on expression of astrocytes and microglia on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Fu-jiang, LI Rui-lin, JIA Zhuang-zhuang, HU Li-min, WANG Shao-xia, CHAI Li-juan, GUO Hong

Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of TCM Pharmacology, Key Laboratory of Pharmacology of TCM Formulae, Ministry of Education, Tianjin 300193, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of Salvianolate Lyophilized Injection (SLI) combined with Xueshuantong Injection (XST) on expression of astrocytes and microglia in cerebral ischemia-reperfusion injury rats. **Methods** The Wistar rats (250—300 g, male) were randomly divided into six groups: control group, model group, Edaravone group (6 mg/kg, EDI), SLI group (21 mg/kg), XST group (100 mg/kg), and SLI+XST group (1X1S, 21 mg/kg and 100 mg/kg). Rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury was created by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) by longa method. Drugs were administered tail intravenous injection once a day for 3 d starting from 24 h after reperfusion. The body weight, neurological deficit scores and survival percentage were observed in 3 d after the cerebral ischemia. The expression of GFAP and IBA-1 was determined at 3 d by immunofluorescence. The complicated compound-target-stroke network of SLI and XST was constructed and analyzed by IPA. **Results** Compared with the model group, 1X1S could significantly improve the neurological dysfunction, increase the body weight, and inhibit the expression of GFAP and IBA-1 in ischemic penumbra ( $P<0.01$ ), IPA reveals the molecular mechanism of SLI and XST in the active ingredient and related targets. **Conclusion** 1X1S has significant protection on cerebral ischemia reperfusion injury in rats, which may be related to the inhibition of the expression of GFAP and IBA-1 and high mobility group box-1 signaling and Interleukine-8 signaling.

**Key words:** Salvianolate Lyophilized Injection; Xueshuantong Injection; ischemia reperfusion injury; stroke; ingenuity pathway analysis

收稿日期: 2017-02-22

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(8157140605, 815740052); 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101201); 天津市应用基础与前沿技术研究计划基金资助项目(14JCYBJC28900)

**作者简介:** 王富江(1987—), 男, 在读博士, 研究方向为中药脑血管药理研究。Tel: 18322695784 E-mail: wangfujiang913@163.com

**\*通信作者** 胡利民(1966—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药脑血管药理研究。E-mail: huliminh@126.com

脑卒中是目前全世界第二大致死性疾病,其中缺血型脑卒中占85%<sup>[1-2]</sup>,而大脑缺血一段时间后再灌注,将会使大脑受到严重破坏,导致大脑微血管紊乱,甚至引起神经损伤<sup>[3-5]</sup>。组织纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA)干预性治疗仍然是比较有效的治疗脑卒中的方法<sup>[6]</sup>。

注射用丹参多酚酸(SLI)由丹参的主要水溶性成分制备而成,主要用于轻中度脑梗死的治疗;血栓通注射液(XST)主要成分为三七总皂苷,主要用于脑血管疾病的治疗。研究表明,2种药单独使用均对脑卒中损伤大脑具有很好的保护作用<sup>[7-9]</sup>。SLI和XST都被用于治疗脑梗死,其临床疗效已被证实。但二药联合应用治疗脑卒中的效果尚未见报道。网络药理学是从药物成分、靶点和疾病相互作用的整体性和系统性出发,采用复杂网络模型表达和分析研究对象的药理学性质,特别适宜研究中药多成分-多靶点的作用关系,有利于揭示中药复杂成分的作用机制<sup>[10]</sup>。

本实验以SLI和XST为研究对象,观察缺血损伤大鼠脑组织不同部位星形胶质细胞特异性蛋白胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)和小胶质细胞特异性蛋白离子钙接头蛋白抗体(ionized calcium-binding adaptor molecule 1, IBA-1)的表达,利用生物反应路径分析(IPA)软件建立SLI和XST成分-靶点-疾病相互作用网络图,对SLI和XST化学成分进行靶点预测,构建SLI和XST合用治疗脑卒中的“成分-靶点-脑卒中”复杂网络,从网络药理学角度预测SLI和XST合用治疗脑卒中的有效成分及其潜在靶点,探讨两药的协同作用机制。

## 1 材料

### 1.1 药品、试剂及仪器

SLI(天津天士力之骄药业有限公司,批号20130501);依达拉奉(EDI,南京先声东元制药有限公司,批号80-140403);XST(冻干,广西梧州制药集团股份有限公司,批号Z200025652)。

线栓(北京西弄生物技术有限公司);异氟烷(批号130302,质量分数 $\geq 99\%$ ,河北一品制药有限公司);水合氯醛(批号Q/12HB 4218-2009,质量分数 $> 99\%$ ,天津科密欧化学试剂有限公司);兔抗大鼠GFAP抗体和羊抗大鼠IBA-1抗体(美国Abcam公司);FITC标记山羊抗兔及TRITC标记小鼠抗羊二抗(美国Proteintech公司);HE染色试剂盒、封

闭液及抗荧光淬灭剂均购自碧云天生物有限公司;MoorVMS脑血流检测仪(英国Moor Instruments公司);DM750M Leica显微镜(德国Leica公司);LSM710激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)。

### 1.2 实验动物

雄性Wistar大鼠,SPF级,体质量250~300 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2012-0001,实验动物所有操作均严格按照天津中医药大学动物伦理委员会标准执行(TCM-LAEC2015028)。

## 2 方法

### 2.1 大脑中动脉栓塞脑缺血再灌注(MCAO/R)模型的制备

参照Longa等<sup>[11]</sup>建立的Wistar大鼠脑缺血再灌注损伤模型,将大鼠用3%异氟烷伴随95%氧气和5%二氧化碳的混合气麻醉固定,然后用面罩持续给予2%异氟烷伴随95%氧气和5%二氧化碳混合气体使大鼠处于持续麻醉状态。于大鼠两耳连线头顶正中垂直切开皮肤,充分暴露颅骨,刮除颅骨骨膜,暴露前囟,在前囟后2 mm、矢状缝旁5 mm处用牙科钻将颅骨打薄(不能钻穿颅骨),再用强力生物胶固定光纤探头,打开激光多普勒监测软件测脑血流变化。仰位固定大鼠,碘酒消毒颈部,行长约2 cm颈正中切口,钝性分离,暴露右侧颈总动脉(CCA)和分叉部,分离分叉处的颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在ECA穿2根4.0号外科缝合线备用(一根用于结扎ECA的远心端,一根用于结扎ECA的近心端)。用显微剪将2根结扎好的缝合线中间的动脉血管剪断,采用动脉夹将CCA和ICA夹闭备用。在ECA近心端离分叉处约3 mm处向近心端方向剪一“V”口,将备好的线栓轻轻插入,慢慢推进至ICA夹闭处,用缝合线固定好线栓后,松开动脉夹,缓缓将线栓插入大脑中动脉,观察激光多普勒监测脑血流变化。线栓插入约 $(18.5 \pm 0.5)$  mm,可感到阻力而无法向前推进时停止。将线栓固定在ICA上,线栓尾部伸出皮下1 cm左右便于拔线栓,实时监测脑血流至稳定1.5 h后,缓缓拔出线栓至ECA切口处,在拔出线栓的同时脑血流迅速上升,直至其恢复至接近初始血流值。缝合皮肤,消毒,将各组完成手术的大鼠放在电热恒温板 $(37.0 \pm 0.5)$  °C上保温,观察生命体征,待动物清醒后放入饲养笼中,在20~25 °C恒温条件下饲养,自由进食进水。对照组不做任何处理。

符合以下全部标准的大鼠才能进行后续给药及取材:①插入线栓之后,血流迅速下降至初始血流的30%以下;②在全程监测脑血流的过程中,血流值上下波动不大,稳定的血流值不超过初始血流值的30%;③拔出线栓的同时,血流迅速恢复至接近初始血流值;④取材时,未发现颅底出血的情况。

## 2.2 实验分组

将符合标准的大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、EDI组(6 mg/kg)、SLI组(21 mg/kg)、XST组(100 mg/kg)、SLI和XST 1:1联合给药组(1X1S, 21 mg/kg+100 mg/kg),每组20只。缺血1.5 h、再灌注24 h后各给药组iv给药,每天1次,连续3 d,对照组和模型组iv等量生理盐水。第3天给药30 min后取材。大鼠每5只一笼,自由饮水,处于温度为22~25℃,相对湿度40%~60%,光照12 h、黑暗12 h环境下,每周更换垫料2次。

## 2.3 大鼠体质量、神经功能缺失症状及存活率评价

各组大鼠在给药第1天称质量,为第1天体质量;取材前称质量,为第3天体质量。体质量差值=第3天体质量-第1天体质量。每天记录正常死亡大鼠,第3天取材前,进行神经功能评分(18分): (1)运动测试:提尾实验(平衡悬浮,0分;不能悬浮对侧前肢屈曲,1分;不能悬浮,对侧后肢屈曲,2分;头在30 s内转离纵轴大于10°,3分);行走实验(直走,0分;不能直走,1分;向轻瘫同侧转圈,2分;向轻瘫同侧跌倒,3分);(2)感觉测试:放置实验(前肢放在桌上,0分;没有前肢放在桌上,1分);本体感觉实验(对侧前肢抵抗,0分;不抵抗,1分);(3)平衡测试:将大鼠放于2.5 cm宽的木条上,静态体位平衡大于60 s,0分;抓住木条边缘,1分;抱住木条1个肢体滑下,2分;抱住木条2个肢体滑下,3分;保持40~59 s后掉下,4分;保持20~39 s后掉下,5分;掉下没有试图保持平衡,6分;(4)反射测试:耳廓反射(摇头,0分;无摇头,1分);角膜反射(眨眼,0分;无眨眼,1分);惊跳反射(跳跃,0分;无跳跃,1分);(5)异常运动:癫痫、肌阵挛后肌张力障碍,1分。5项评分加和为神经功能评价得分,得分越高说明神经功能缺失症状越严重。

## 2.4 HE染色

大鼠末次给药30 min后,ip水合氯醛麻醉,仰卧位固定,打开胸腔暴露心脏。用平头灌流针从左心尖部位插入,右心耳处剪口,缓慢灌注生理盐水

至肝脏、四肢及眼睛变为白色后,再灌注4%多聚甲醛至身体僵直。断头取脑,置于10%福尔马林中固定过夜,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,缺血侧脑组织冠状切片(片厚约5 μm)。石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,苏木素染色5 min,流水冲洗,1%的盐酸酒精溶液分化10 s,冲洗,伊红染色5 min,水洗4次,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,Leica显微镜下观察。

## 2.5 脑组织GFAP和IBA-1免疫荧光双染

石蜡切片脱蜡、再水化,0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液中进行微波抗原修复,山羊血清封闭非特异性抗原,将一抗GFAP(1:200)和IBA-1(1:100)混合加入,4℃冰箱孵育过夜。磷酸盐缓冲液冲洗,滴加FITC标记的山羊抗兔IgG(1:500),37℃避光孵育1 h。冲洗后,滴加TRITC标记的山羊抗兔IgG(1:400),37℃避光孵育1 h。冲洗后,滴加Hoechst33342一滴,室温孵育10 min,冲洗,抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦扫描显微镜观察,并用计算机图像分析软件Image-Pro plus 6.0(Media Cybernetics, USA)分析GFAP和IBA-1荧光强度。

## 2.6 网络药理学方法分析SLI和XST治疗脑卒中相关靶点

通过查阅文献可得SLI主要是由丹参的水溶性成分如丹参素B(62.1%)、紫草酸(3.7%)、迷迭香酸(4.5%)、丹参素E(1.8%)及辅料甘露醇等组成<sup>[12,7]</sup>。XST<sup>[13,9]</sup>主要含有三七总皂苷类如人参皂苷Rg<sub>1</sub>(48.1%)、人参皂苷Rb<sub>1</sub>(27.8%)、三七皂苷R<sub>1</sub>(11.1%)、人参皂苷Re(5.5%)、人参皂苷Rd(1.3%)等。采用Ingenuity Pathway Analysis(IPA)信号通路分析软件对SLI和XST中的单体成分与脑卒中中进行网络药理学分析。

## 2.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据采用SPSS 19.0进行分析,组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 SLI和XST合用对脑缺血再灌注损伤大鼠体质量、神经功能缺失症状评分及存活率的影响

图1结果显示,与对照组相比,模型组大鼠体质量显著降低,神经功能缺失症状评分明显增加( $P < 0.01$ )。各给药组与模型组相比,大鼠体质量有所增加,神经功能缺失症状评分显著降低( $P < 0.01$ )。结果表明,各给药组大鼠体质量及神经功能均得到不同程度的保护。1X1S组与SLI、XST组相

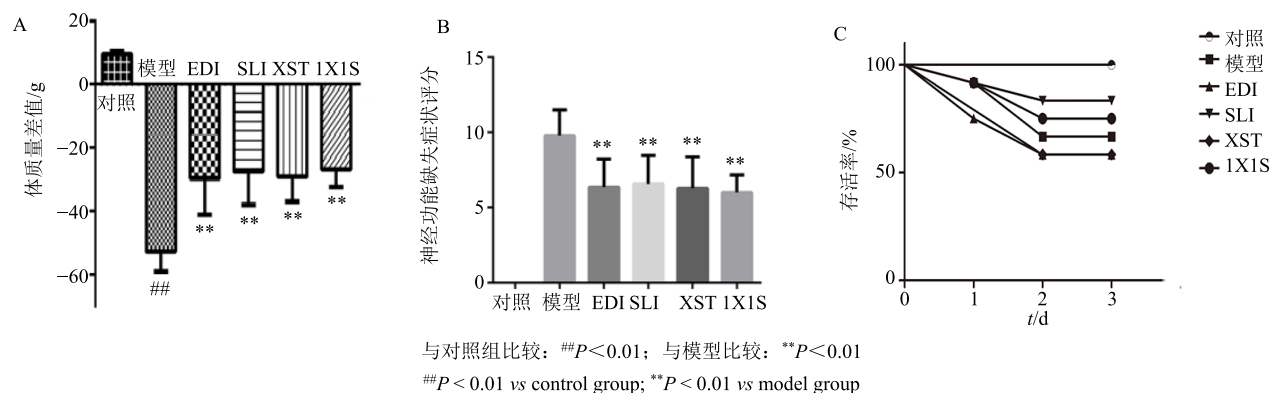


图1 1X1S对脑缺血再灌注损伤大鼠体质量(A)、神经功能缺失症状评分(B)和存活率(C)的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Fig. 1 Effect of 1X1S on body weight (A), neurological function deficit symptom scores (B), and survival percentage (C) of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

比,体质量和神经功能缺失症状评分均有改善趋势,但无显著性差异,这可能与样本量较少及给药时间较短有关。大鼠存活率统计结果可以看出,给药3 d后各给药组与模型组间均无显著性差异。

### 3.2 SLI和XST合用对脑缺血再灌注损伤大鼠脑部病理变化的影响

光镜下可见对照组大鼠脑组织结构正常,神经细胞形态规则,胞质丰富,呈嗜碱性,核圆形,核仁清晰可见(图2)。模型组大鼠脑缺血区域神经细胞构型紊乱,部分结构松散,胞体明显缩小。与模型组相比,各给药组大鼠脑组织结构改变有所减轻。与SLI和XST组相比,1X1S组大鼠脑组织结构有明显改善,神经细胞损伤明显减轻,说明两药合用在改善脑组织损伤方面明显优于单独给药。

### 3.3 SLI和XST合用对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织不同部位GFAP和IBA-1蛋白表达的影响

结果如图3,表1、2所示,与模型组相比,EDI、

SLI、XST和1X1S能够显著降低大鼠脑组织缺血半暗带1、4、5号区域GFAP、IBA-1蛋白的表达;与SLI和XST相比,1X1S能显著降低1、4、5区域GFAP、IBA-1蛋白的表达,而在其他区域并没有显著性差异;在2号区域,与对照组相比,模型组GFAP、IBA-1蛋白的表达没有显著性差异,说明缺血损伤对缺血对侧大脑并没有显著影响。在3号区域,与模型组相比,各给药组GFAP、IBA-1蛋白的表达均没有显著差异,说明缺血区脑损伤对GFAP、IBA-1蛋白表达的影响是不可逆的。

### 3.4 SLI和XST治疗脑卒中相关靶点网络分析

利用IPA的“grow”功能找出与脑卒中相关的信号网络,用“canonical pathways”对相关的因子进行经典通路分析,结果见图4。用“Trim”对所有相关因子进行筛选,发现有5个相关信号通路及相关靶标蛋白。

由图4可知,通过IPA分析发现了与缺血性脑卒中疾病最相关的一些因子如白细胞介素-1(IL-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等及5条经典通路如高迁移率族蛋白(HMGB)信号通路和IL-8信号通路等。同时发现,SLI治疗脑卒中可能与二相解毒酶NADP(H)醌氧化还原酶(NQO-1)和Bax有关,而XST可能不作用于这2个因子,而是通过影响IL-1和ICAM-1而起到治疗作用。

## 4 讨论

脑卒中是临床常见危重疾病,是目前人类致死和长期致残的主要原因,其中大约87%的脑卒中为脑梗死,在我国脑卒中已成为第1大死因<sup>[14]</sup>。早期诊断和治疗是减少神经功能损伤的关键。目前公认的缺血性脑卒中的机制一般包括能量耗竭、兴奋

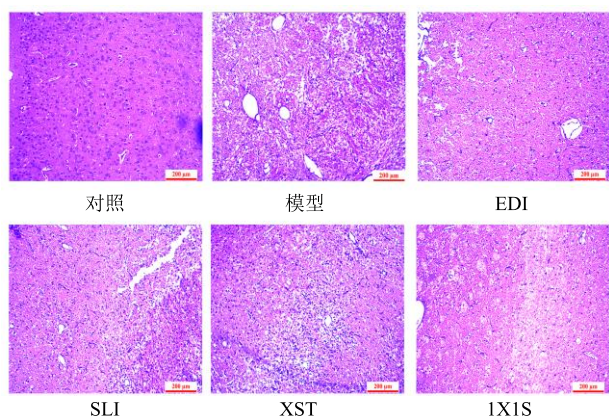


图2 1X1S对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理变化的影响

Fig. 2 Effect of 1X1S on pathological changes in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

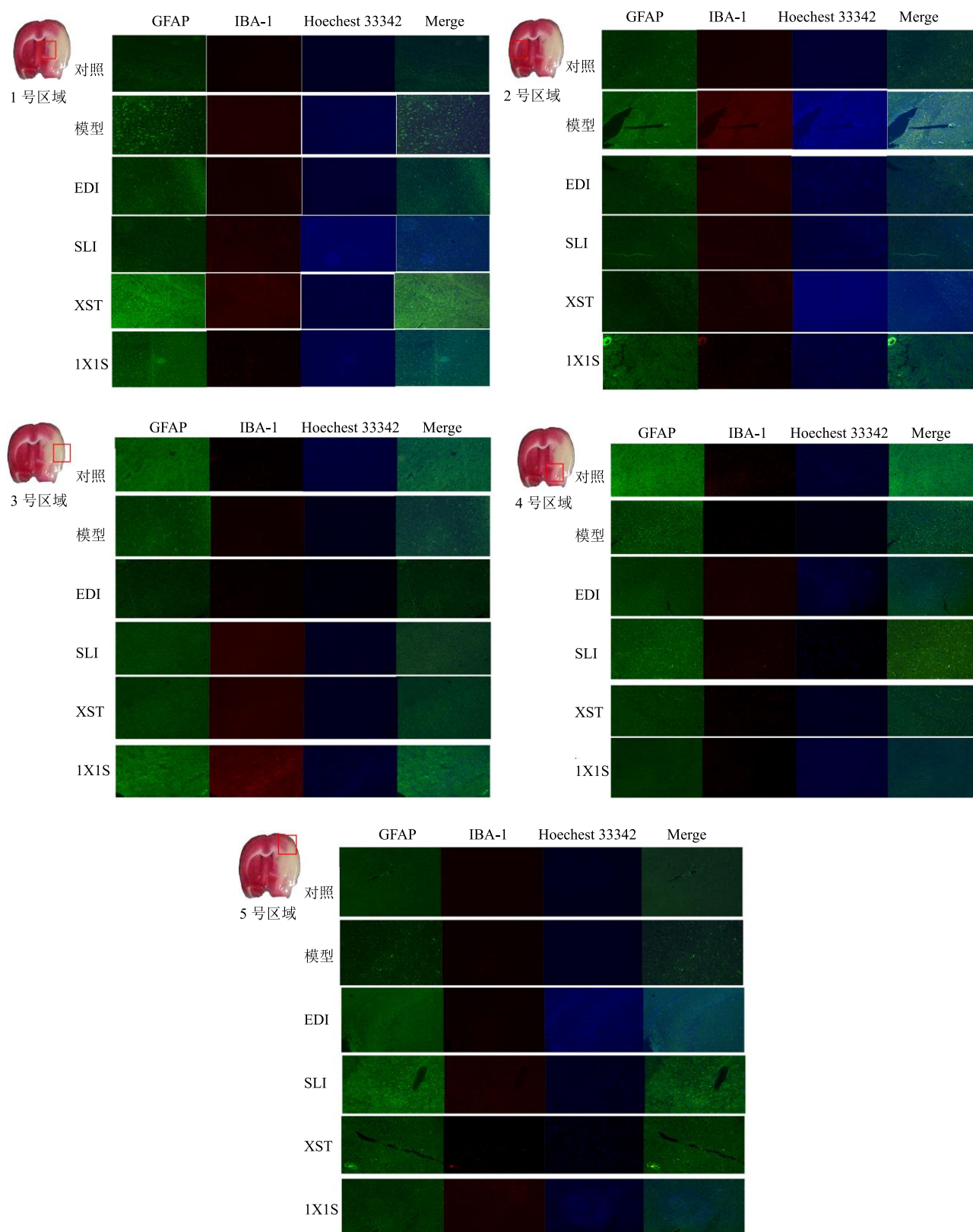


图 3 1X1S 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织不同部位 GFAP 和 IBA-1 蛋白表达的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 3 Effect of 1X1S on expression of GFAP and IBA-1 protein in brain difference parts of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ( $\times 100$ )

表 1 1X1S 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织不同部位 GFAP 蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )Table 1 Effect of 1X1S on expression of GFAP protein in brain difference parts of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

| 组别   | GFAP 蛋白表达量                         |              |                              |                                    |                                    |
|------|------------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|      | 1 号区域                              | 2 号区域        | 3 号区域                        | 4 号区域                              | 5 号区域                              |
| 对照   | 981.32±7.78                        | 980.76±7.78  | 981.12±7.78                  | 980.67±7.78                        | 981.65±7.78                        |
| 模型   | 1 899.43±31.11 <sup>##</sup>       | 981.45±6.36  | 1 376.43±78.49 <sup>##</sup> | 1 955.21±48.80 <sup>##</sup>       | 1 955.41±48.80 <sup>##</sup>       |
| EDI  | 1 149.46±49.50 <sup>**</sup>       | 990.12±5.66  | 1 249.49±49.49               | 1 056.36±59.40 <sup>**</sup>       | 1 056.45±59.40 <sup>**</sup>       |
| SLI  | 1 372.67±44.54 <sup>**</sup>       | 962.66±6.36  | 1 272.87±44.54               | 1 355.66±78.49 <sup>**</sup>       | 1 362.68±59.39 <sup>**</sup>       |
| XST  | 1 317.26±33.94 <sup>**</sup>       | 992.68±6.36  | 1 317.12±33.94               | 1 302.98±28.99 <sup>**</sup>       | 1 323.35±43.13 <sup>**</sup>       |
| 1X1S | 1 136.47±41.01 <sup>**S&amp;</sup> | 976.98±13.40 | 1 235.67±41.02               | 1 154.28±64.35 <sup>**S&amp;</sup> | 1 149.12±57.28 <sup>**S&amp;</sup> |

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与 SLI 组比较: <sup>S</sup> $P < 0.05$ ; 与 XST 组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$ , 表 2 同<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>S</sup> $P < 0.05$  vs SLI group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs XST group, same as table 2表 2 1X1S 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织不同部位 IBA-1 蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )Table 2 Effect of 1X1S on expression of IBA-1 protein in brain difference parts of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

| 组别   | IBA-1 蛋白表达量                     |              |                              |                                 |                                 |
|------|---------------------------------|--------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|      | 1 号区域                           | 2 号区域        | 3 号区域                        | 4 号区域                           | 5 号区域                           |
| 对照   | 538.12±6.36                     | 537.89±6.37  | 537.68±6.36                  | 538.25±6.36                     | 537.92±6.36                     |
| 模型   | 1 323.32±41.71 <sup>##</sup>    | 548.76±7.79  | 1 323.23±41.72 <sup>##</sup> | 1 332.31±15.56 <sup>##</sup>    | 1 332.42±15.56 <sup>##</sup>    |
| EDI  | 860.45±30.41 <sup>**</sup>      | 546.35±6.36  | 1 059.78±30.41               | 750.97±42.43 <sup>**</sup>      | 800.87±42.43 <sup>**</sup>      |
| SLI  | 1 082.78±49.50 <sup>**</sup>    | 541.67±8.49  | 1 083.44±49.50               | 1 001.15±10.61 <sup>**</sup>    | 998.67±1.41 <sup>**</sup>       |
| XST  | 1 190.21±63.64 <sup>**</sup>    | 559.23±10.60 | 1 190.16±63.64               | 1 201.33±15.56 <sup>**</sup>    | 1 153.45±62.93 <sup>**</sup>    |
| 1X1S | 748.54±6.99 <sup>**S&amp;</sup> | 537.43±7.78  | 1 149.42±61.99               | 761.68±7.78 <sup>**S&amp;</sup> | 792.31±7.76 <sup>**S&amp;</sup> |

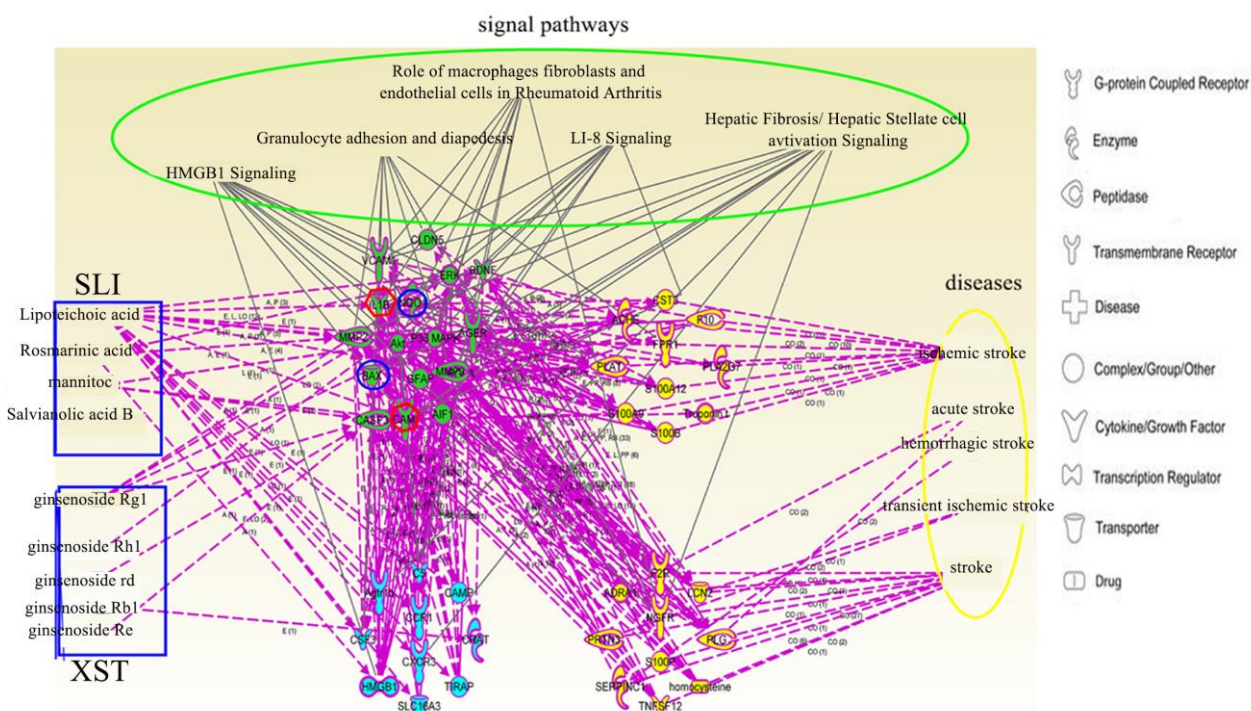


图 4 IPA 网络分析

Fig. 4 Network analyses by IPA

性氨基酸毒性作用、炎症反应、离子稳态破坏、梗死周边去极化、氧自由基损伤、血脑屏障破坏及细胞凋亡等,这些病理机制变化为随着时间、空间动态改变的过程。

SLI 为丹参的一种水溶性有效成分,具有多种药理作用,如抗动脉粥样硬化、清除自由基、改善血液循环等。在缺血性脑血管疾病中,SLI 对脑损伤具有保护作用,可以减少脑梗死体积,改善神经功能损伤,增加具有抗氧化作用的热休克蛋白的表达水平<sup>[7,15]</sup>。XST 主要含有三七的有效成分三七总皂苷,临床上用于治疗栓塞性脑血管疾病,常用于脑梗死治疗,具有扩张血管、改善微循环、抑制血栓形成和延长凝血时间等作用。本研究基于局灶性 MCAO/R 大鼠模型研究两药合用与单独使用对脑损伤的影响。实验结果表明,SLI 和 XST 无论单独使用还是合用都能显著增加脑卒中大鼠体质量,改善神经功能缺损,减轻病理变化。在脑组织损伤方面,两药合用明显优于单独给药,但在体质量和行为学方面,两药合用与单独使用并没有显著差异,这可能与样本量少、给药时间短及活性成分量低等原因有关,为此,本课题组将通过加大样本量、延长给药时间等观察两药合用与单独使用在治疗脑卒中疾病中的药效学变化。

胶质细胞主要分为小胶质细胞和大胶质细胞,在中枢神经系统中,大胶质细胞主要包括星形胶质细胞和少突胶质细胞,其中星形胶质细胞约占大脑体积的一半,是神经元的 5~10 倍。正常情况下,星形胶质细胞不仅为神经元提供营养,而且还具有调节突触功能、保护神经元存活以及神经再生和神经修复的作用<sup>[16]</sup>。然而,脑缺血损伤后,由于脑缺血能量衰竭引起星形胶质细胞摄取谷氨酸功能减弱,细胞间谷氨酸浓度增加,引起神经元死亡<sup>[17]</sup>;随着缺血时间延长,脑损伤也进一步加重,梗死周围因去极化使细胞外钾离子浓度迅速升高、细胞酸化与缺氧。星形胶质细胞逐渐失去活力,抵抗能量衰竭能力减弱,进一步加重了神经元的损伤<sup>[18]</sup>,因此调节星形胶质细胞的活化,对脑缺血/再灌注损伤具有重要的意义。

中枢神经系统的小胶质细胞被认为是大脑主要的免疫细胞,缺血损伤后,小胶质细胞产生转化生长因子- $\beta$ 、胶质细胞源性神经营养因子等<sup>[19]</sup>。然而活化的小胶质细胞可以通过分泌和释放基质金属蛋白酶、氧自由基、白细胞介素和肿瘤坏死因子等一

系列潜在神经毒性物质和炎症因子,破坏血脑屏障,进一步加重脑损伤。因此,跟星形胶质细胞一样,调节小胶质细胞的活化,对缺血性脑损伤具有重要的作用。已有研究显示脑梗死发生后,在损伤脑组织会出现很多细胞因子的异常表达,但不同组织部位的基因表达存在一些差异<sup>[20]</sup>,缺血对侧由于受缺血影响较轻,在各因子表达上与脑组织没有差异,而梗死区域由于受缺血影响严重,许多神经细胞已死亡,所以各因子相比也没有差异,因此缺血半暗带成了目前大家研究脑缺血后各因子变化的重点区域,同时也为急性缺血性脑梗死溶栓治疗提供了理论依据<sup>[21]</sup>。本研究发现,SLI 和 XST 无论单独使用还是合用均能够明显抑制缺血半暗带 GFAP 和 IBA-1 的表达,而对梗死区域 GFAP 和 IBA-1 的表达无显著影响。两药合用明显优于单独给药。

本研究首次应用网络药理学的方法研究 SLI 和 XST 中的活性化合物对脑卒中的作用机制,从理论预测、分析角度,阐明了 SLI 和 XST 治疗脑卒中的作用机制可能与 IL-1 和 ICAM-1 等及高迁移率族蛋白通路和 IL-8 信号通路等有关。然而,仍然需要进一步的实验及临床研究对其进行验证及完善。

#### 参考文献

- [1] Gouriou Y, Demaurex N, Bijlenga P, *et al.* Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons [J]. *Biochimie*, 2011, 93(12): 2060-2067.
- [2] Lu Y, Zhang J, Ma B, *et al.* Glycine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice [J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(5): 649-658.
- [3] Ma X H, Gao Q, Jia Z, *et al.* Neuroprotective capabilities of TSA against cerebral ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt signaling pathway in rats [J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(2): 140-146.
- [4] Sun K, Hu Q, Zhou C M, *et al.* Cerebralcare Granule, a Chinese herb compound preparation, improves cerebral microcirculatory disorder and hippocampal CA1 neuron injury in gerbils after ischemia-reperfusion [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(2): 398-406.
- [5] Wang J, Wang P, Li S, *et al.* Mdivi-1 prevents apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in primary hippocampal cells via inhibition of reactive oxygen species-activated mitochondrial pathway [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(6): 1491-1499.
- [6] Adams H P, del Zoppo G, Alberts M J, *et al.* Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: A guideline from the American Heart Association/

- American Stroke Association Stroke Council, clinical cardiology council, cardiovascular radiology and intervention council, and the atherosclerotic peripheral vascular disease and quality of care outcomes in research interdisciplinary working groups: The American academy of neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists [J]. *Circulation*, 2007, 115(20): 478-534.
- [7] He Q, Wang S, Liu X, *et al.* Salvianolate lyophilized injection promotes post-stroke functional recovery via the activation of VEGF and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 108-122.
- [8] 贺亚龙, 高 焱, 郭晓贤. 丹参多酚酸治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(9): 1354-1359.
- [9] Wang X, Wang S, Wang J, *et al.* Neuroprotective effect of Xueshuantong for injection (lyophilized) in transient and permanent rat cerebral ischemia model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/134685.
- [10] Yamanishi Y, Kotera M, Kanehisa M, *et al.* Drug-target interaction prediction from chemical, genomic and pharmacological data in an integrated framework [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(12): 246-254.
- [11] 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.
- [12] Chen X, Guo Y, Hu Y, *et al.* Quantitative analysis of highly similar salvianolic acids with  $^1\text{H}$  qNMR for quality control of traditional Chinese medicinal preparation Salvianolate Lyophilized Injection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.02.016.
- [13] Li S P, Qiao C F, Chen Y W, *et al.* A novel strategy with standardized reference extract qualification and single compound quantitative evaluation for quality control of Panax notoginseng used as a functional food [J]. *J Chromatogr A*, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.025.
- [14] Liu L, Wang D, Wong K S, *et al.* Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3651-3654.
- [15] Zhang J, Lu W, Lei Q, *et al.* Salvianolate increases heat shock protein expression in a cerebral ischemia-reperfusion injury model [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(25): 2327-2335.
- [16] Aschner M, Sonnewald U, Tan K H. Astrocyte modulation of neurotoxic injury [J]. *Brain Pathol*, 2002, 12(4): 475-481.
- [17] Anderson C M, Swanson R A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions [J]. *Glia*, 2000, 32(1): 1-14.
- [18] Rose C R, Waxman S G, Ransom B R. Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on  $\text{Na}^+$  homeostasis in rat spinal cord astrocytes [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(10): 3554-3562.
- [19] 宋玉成, 刘永海. 小胶质细胞与脑缺血 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2006, 14(6): 456-458.
- [20] 于炳新, 吕传真. 脑缺血半暗带研究进展 [J]. *中国临床神经科学*, 2002, 10(1): 96-99.
- [21] 张加英, 倪光夏. 缺血半暗带的研究概况 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(6): 1312-1315.