

丹参多酚酸对脑梗死小鼠血管微循环的影响

陈宗军¹, 陈政雄², 蔡杨靖¹

1. 海南医学院第二附属医院 药学部, 海南 海口 570311

2. 三亚中心医院 药学部, 海南 三亚 572000

摘要: **目的** 探究丹参多酚酸对脑梗死大鼠神经血管微循环及缺血侧血流的影响。**方法** 将大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平 10 mg/kg 组和丹参多酚酸低、高剂量组 (10、25 mg/kg)。制备大鼠中动脉缺血模型, 通过神经功能评分、2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑染色以及采用激光散斑血流成像检测脑血流量, 鉴定模型构建是否成功。各组大鼠按照分组进行给药, 尼莫地平组 ig 尼莫地平 10 mg/kg, 丹参多酚酸组 ip 10、25 mg/kg 注射用丹参多酚酸, 连续治疗 7 d, 1 次/d。取脑组织分别进行 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色染色评估脑梗死体积, 伊文思蓝含量测定评估血、脑、脊液屏障结构完整性, 免疫荧光染色测量血小板内皮细胞黏附分子 (CD31) 表达。采用 Western blotting 实验检测血管内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素-1 (Ang-1)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 丹参多酚酸 25 mg/kg 组神经功能评分、脑梗死体积占比明显减低, 脑血流量明显增加 ($P < 0.05$); 且缺血侧 CD31 相对表达明显减少; 伊文思蓝含量以及 VEGF 与 Ang1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参多酚酸能够明显促进神经血管微循环重构, 加速缺血区血流恢复, 最终减轻缺血性卒中损伤作用, 其机制可能与 VEGF 与 Ang1 蛋白表达增加相关。

关键词: 丹参多酚酸; 脑梗死; 血管新生; 脑血流量; 血小板内皮细胞黏附分子; 血管内皮生长因子; 血管生成素-1

中图分类号: R971 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)04-0761-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.003

Effect of salvianolic acid on vascular microcirculation in cerebral infarction mice

CHEN Zong-jun¹, CHEN Zheng-xiong², CAI Yang-jing¹

1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China

2. Department of Pharmacy, Sanya Central Hospital, Sanya 572000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of salvianolic acids on neural angiogenesis and cerebral blood flow in rats with ischemic stroke. **Methods** Rats were randomly divided into sham operation group, model group, nimodipine 10 mg/kg group, and salvianolic acid low and high-dose groups (10 and 25 mg/kg). The rat model of middle artery ischemia was prepared, and the cerebral blood flow was detected by nerve function score, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining and laser speckle flow imaging to determine whether the model was successfully constructed. The rats in each group were given medication according to the groups, nimodipine group ig Nimodipine Tablets 10 mg/kg, salvianolic acid group ip 10, 25 mg/kg Salvianolic acid for injection, continuous treatment for 7 d, once daily. 2,3,5-triphenyltetrazole chloride staining was performed on the brain tissues to evaluate the infarct volume, Evans blue content was determined to evaluate the structural integrity of the blood, brain, and spinal fluid barrier, and the expression of platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) was measured by immunofluorescence staining. The protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), Ang-1, and phosphoglyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with model group, 25 mg/kg salvianolic acid group significantly decreased the neurological function score and cerebral infarction volume ratio, and significantly increased cerebral blood flow ($P < 0.05$). The relative expression of CD31 in ischemic side was significantly decreased, Evans blue content and the expression of VEGF and Ang1 protein were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolic acids can significantly promote neurovascular microcirculation remodeling, accelerate the recovery of blood flow in the ischemic area, and ultimately reduce the injury of ischemic stroke. The mechanism may be related to the increase of VEGF and Ang1 protein expression.

Key words: salvianolic acids; ischemic stroke; angiogenesis; cerebral blood flow; CD31; VEGF; Ang-1

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目 (22A200042)

作者简介: 陈宗军, 男, 本科。E-mail: p13957751378@163.com

卒中是目前排名前列的致死性疾病,脑梗死约占 85%^[1]。虽然急性溶栓治疗、介入治疗获得了快速发展,能够迅速恢复血流,但对于栓塞时间超治疗窗患者难以普及^[2]。脑梗死发生会造成神经血管微循环结构破坏,神经元坏死、血脑屏障通透性改变等病理性变化^[3-4]。脑梗死恢复期通常指发病期半年内,神经血管微循环重构直接关系到远期突触可塑性恢复、轴突发芽、中枢神经对运动支配性发展等^[5]。然而,目前对于有效促进神经血管微循环重构药物鲜有研究探索。因此,寻找促进脑梗死血管微循环重构,增加缺血区血流药物,具有非常重要的社会价值。

注射用丹参多酚酸是丹参中提取出的多种水溶性酚酸混合物,具有活血、化瘀、通络的功效,主要用于冠心病、心绞痛、脑卒中等心脑血管系统疾病^[6]。已有不少研究发现丹参多酚酸盐能够明显减轻脑梗死神经细胞凋亡,改善神经元新生,发挥提高神经功能与认知能力的作用^[7-10]。因此,本研究通过制备大鼠中动脉栓塞模型,探究丹参多酚酸对脑梗死大鼠神经血管微循环重构的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

注射用丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司,规格 0.13 g/只,批号 20210901);尼莫地平片(天津市中央药业有限公司,规格 30 mg/片,批号 20220315);伊文思蓝(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 1098-1005);2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 s28723);Anti-血小板内皮细胞黏附分子(CD31)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab8372);Anti- α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab2632);Anti-血管内皮生长因子(VEGF)抗体(北京博奥森生物科技有限公司,批号 bs872362);Anti-血管生成素-1(Ang-1)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab6351);Anti-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(北京博奥森生物科技有限公司,批号 bs798227)。

激光散斑血流仪(英国 Moor 公司);脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);IX73 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);蛋白免疫印迹电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 动物

90 只雄性 SD 大鼠,由海南药物研究所有限责任公司提供,SPF 级,7 周龄。实验动物生产批号

HNPR20220910125。动物饲养过程中,保证温度为(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度为(60 ± 10)%,自由饮食饮水。本研究所有动物实验已由海南医学院动物伦理中心批准,批号 HNMU2201090105。

1.3 分组和给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平 10 mg/kg 组和丹参多酚酸低、高剂量(10、25 mg/kg)组,每组 16 只。除假手术组外,其余组大鼠制备中动脉缺血模型,模型构建 24 h 后,随机取大鼠开展激光散斑血流成像检测脑血流量,鉴定模型构建是否成功。取模型构建完成大鼠进行 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色与神经功能评分,将大鼠按神经功能评分进行随机分组。各组大鼠按照分组进行给药,尼莫地平组 ig 尼莫地平片 10 mg/kg,丹参多酚酸组 ip 注射用丹参多酚酸 10、25 mg/kg,连续治疗 7 d,每日 9:00~10:00 时给药,1 次/d。

1.4 中动脉缺血模型制备与神经功能评估

取大鼠麻醉,仰卧位固定在恒温手术台上。将大鼠颈部皮肤脱毛,酒精消毒,正中偏左侧纵向切开一小口,分离出左侧颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉,结扎颈总动脉近心端,动脉夹分别夹闭颈外动脉与颈内动脉。在颈总动脉结扎位置上端开孔,将注射软管插入,前进至中动脉,微量注射器打入预制备的血凝块堵塞血管(约 100 μL),血栓粒径约为 0.5 mm,长度约为 1 cm。假手术组大鼠仅打开血管,不注射血凝块。

模型构建后,连续给药 14 d 后,通过改良神经功能缺损程度评分法(mNSS)分别评估大鼠运动功能、感觉功能、平衡功能、反射功能及异常运动,总分 18 分,得分越高表示神经功能损伤越重^[11]。每天记录各组大鼠瘫痪、死亡情况,发现大鼠瘫痪时,处死取材,记录神经功能评分为 18 分。

1.5 激光散斑血流成像

将大鼠麻醉,固定在立体定位仪上,消毒后切开头皮,充分暴露颅骨,分离骨膜,颅骨表面滴加生理盐水保持湿润,用棉签清除颅骨表面的细小杂质。将大鼠置于激光散斑成像系统下扫描测量 2 个半球,记录整个脑区的平均血流灌注量。模型构建后 24 h 检测以确定模型构建成功率,连续给药 14 d 后检测以确定脑血流量恢复情况。

1.6 3,5-三苯基氯化四氮唑染色

将大鼠以 CO_2 处死,断头取脑组织,从前额开始连续切取 5 个冠状脑片,置于 2%的 3,5-三苯基

氯化四氮唑染色液中, 37 °C 水浴中, 避光孵育 30 min, 期间 5 min 翻动脑片 1 次。将脑片取出后放入 4% 多聚甲醛溶液中, 4 °C 固定 24 h。将脑片按顺序排列后拍照, 采用软件分析, 计算各组大鼠脑梗死体积比。

1.7 伊文思蓝含量测定

取大鼠皮下注射 2% 伊文思蓝溶液, 1 mL/只。2 h 后, 将大鼠以 CO₂ 处死, 迅速取出脑组织。截取缺血半球脑组织, 称取质量, 按质量与体积比 1:4 (mg/ μ L) 加入 50% 三氯乙酸匀浆。收集离心后上清液, 用分光光度计检测 620 nm 处吸光度 (A) 值。以不同浓度伊文思蓝溶液作标准曲线, 确定各待测样品中伊文思蓝含量。

1.8 免疫荧光染色

将大鼠以 CO₂ 处死, 使用生理盐水, 经心脏灌注。取完整脑组织, 经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 置于 30% 蔗糖溶液脱水。将脱水后脑组织使用冰冻液包埋后切片, 将选定的切片放入 PBS 中水化 20 min, PBST 漂洗 3 遍后, 用 10% 山羊血清封闭 2 h。脑片上滴加兔抗大鼠 CD31 抗体和大鼠抗大鼠 α -SMA 抗体 (1:100), 4 °C 孵育过夜。PBST 洗去一抗, 滴加二抗羊抗兔 IgG-FITC (1:200) 和山羊抗大鼠 IgG-Dylight 594 (1:200), 室温孵育 1 h。PBST 洗去二抗, 分别滴加 DAPI 溶液与抗荧光猝灭剂, 中性树脂封片。在荧光显微镜下, 最大吸收波长 490~495 nm, 最大发射光波长 520~530 nm 处观察 CD31 表达, 最大吸收波长 480~565 nm, 最大发射波长 570~580 nm 处观察 α -SMA 表达, 拍照后用 Image J 软件定量分析。

1.9 Western blotting 法检测 Ang-1 和 VEGF 蛋白相对表达

取将大鼠以 CO₂ 处死, 取缺血侧脑组织, 加入裂解液提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 沸水中加热 10 min 制备成样品。取 30 μ g 蛋白样品开展 SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干转法转膜, 4% 脱脂牛奶封闭。加入目的蛋白一抗 (Anti-VEGF、Anti-Ang-1、Anti-GAPDH) 稀释液 (1:1000), 4 °C 条件下孵育 12 h。取出蛋白膜带, PBST 洗去一抗, 加入二抗稀释液 (1:5000), 室温孵育 2 h。滴加超敏发光液在蛋白膜上显色, 以 GAPDH 蛋白为内参, 将目标蛋白灰度值与 GAPDH 进行对比, 得出目标蛋白相对表达水平。

1.10 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件进行分析和统计, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 丹参多酚酸盐对大鼠 mNSS 评分的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能评分明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 尼莫地平组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组大鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠 mNSS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

Table 1 Comparison of mNSS scores in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mNSS 评分
假手术	—	0
模型	—	10.87 ± 4.17*
尼莫地平	10	5.13 ± 2.10 [#]
丹参多酚酸	10	8.13 ± 1.73
	25	4.47 ± 1.88 [#]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.2 丹参多酚酸盐对大鼠缺血侧脑血流量的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠缺血侧脑组织几乎没有血流灌注, 且整个脑区血流灌注较低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 尼莫地平组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组大鼠血流灌注明显增加 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

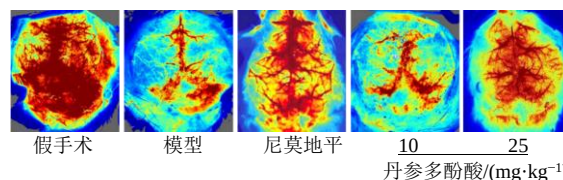


图 1 各组大鼠脑组织血流成像

Fig. 1 Brain tissue blood flow imaging of rats in each group

表 2 大鼠脑组织中血流灌注量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Blood perfusion volume in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑组织血流量/PU
假手术	—	296.47 ± 15.52
模型	—	68.88 ± 12.46*
尼莫地平	10	183.60 ± 33.57 [#]
丹参多酚酸	10	91.21 ± 14.18
	25	147.40 ± 23.48 [#]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.3 丹参多酚酸盐对大鼠脑梗死体积的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积比显著增加 ($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组的脑梗死体积比显著减少 ($P<0.05$),见图 2、表 3。

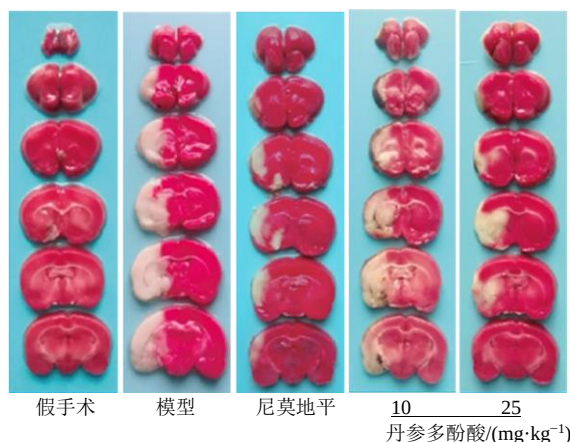


图 2 各组大鼠脑梗死区域

Fig. 2 Cerebral infarction area of rats in each group

表 3 各组大鼠脑梗死区域体积比量化统计 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Quantitative statistics of volume proportion of cerebral infarction area in rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑梗死区域体积比/%
假手术	—	0
模型	—	35.11 ± 5.78*
尼莫地平	10	5.31 ± 1.48#
丹参多酚酸	10	31.20 ± 5.47
	25	11.23 ± 3.98#

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group

2.4 丹参多酚酸盐对大鼠血脑屏障结构完整性的影响

与假手术组相比,模型组缺血侧伊文思蓝质量分数明显增加 ($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组大鼠缺血侧伊文思蓝质量分数明显减少 ($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠脑组织中伊文思蓝含量统计 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 4 Evans blue content statistics in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	伊文思蓝/(μg·g ⁻¹)
假手术	—	7.58 ± 2.17
模型	—	71.21 ± 12.64*
尼莫地平	10	47.22 ± 11.76#
丹参多酚酸	10	64.57 ± 11.92
	25	44.24 ± 10.73#

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group

2.5 丹参多酚酸盐对大鼠脑组织 CD31 与 α-SMA 荧光染色的影响

与假手术组相比,模型组大鼠 CD31 相对表达明显减少 ($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平 10 mg/kg 组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组大鼠缺血区 CD31 蛋白相对表达明显增加 ($P<0.05$),见图 3、表 5。

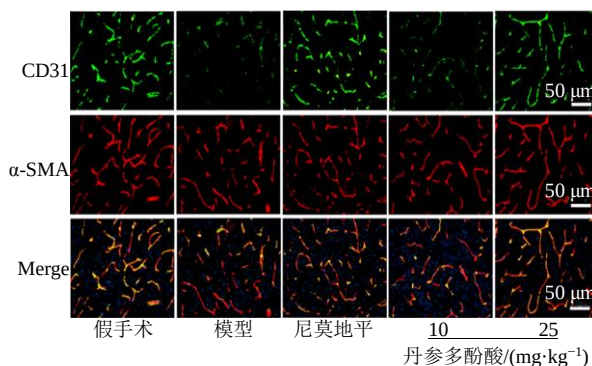


图 3 各组大鼠脑组织缺血区 CD31 与 α-SMA 荧光染色结果

Fig. 3 Results of CD31 and α-SMA fluorescence staining in ischemic brain of rats in each group

表 5 各组大鼠脑组织缺血区 CD31 与 α-SMA 荧光染色量化统计 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 5 Quantitative statistics of CD31 and α-SMA fluorescence staining in ischemic brain of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CD31/α-SMA
假手术	—	0.87 ± 0.05
模型	—	0.18 ± 0.03*
尼莫地平	10	0.69 ± 0.11#
丹参多酚酸	10	0.27 ± 0.05
	25	0.65 ± 0.13#

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group

2.6 丹参多酚酸盐对大鼠缺血侧 VEGF、Ang-1 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组 VEGF、Ang1 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平组与丹参多酚酸 25 mg/kg 组 VEGF、Ang1 蛋白表达进一步升高 ($P<0.05$),见图 4、表 6。

3 讨论

脑梗死发生后,脑组织会发生一系列病理变化,中动脉缺血首先会造成组织缺氧,各类免疫细胞应激条件活化并释放细胞因子,从而诱发炎症反

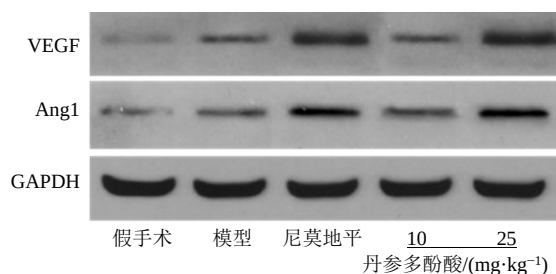


图 4 各组大鼠脑组织缺血区 VEGF、Ang-1 蛋白条带

Fig. 4 Bands of VEGF and Ang-1 protein in ischemic brain tissue of rats in each group

表 6 各组大鼠脑组织缺血区 VEGF、Ang-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)Table 6 Brain tissue ischemia area protein expression of VEGF, Ang-1 of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	VEGF/GAPDH	Ang-1/GAPDH
假手术	—	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03
模型	—	0.16 ± 0.07*	0.18 ± 0.04*
尼莫地平	10	0.73 ± 0.07#	0.59 ± 0.11#
丹参多酚酸	10	0.15 ± 0.06	0.18 ± 0.04
	25	0.68 ± 0.11#	0.56 ± 0.08#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group

应^[12]。脑组织中各类神经元出现死亡, 线粒体破裂造成活性氧释放, 导致氧化应激反应。此时, 血脑屏障也会遭受破坏, 导致各类神经毒性物质进入中枢神经系统, 进一步加剧神经凋亡, 引发局灶性梗死、神经元损伤及神经功能障碍^[13]。本研究结果也显示, 脑梗死造成大鼠出现不同程度的局灶性梗死区域, 脑组织中伊文思蓝含量明显增加, 血流量明显减少, 且脑梗死中大鼠也有出现与临床卒中患者类似的四肢无法完全伸展, 运动不协调的情况。

中医基础理论认为, 脑梗死的病理因素是血瘀气滞, 络损神伤, 形败体坏。其针对性治疗包括活血化瘀、清神通窍、祛痰散毒。中药存在多成分、多靶点、协同发挥的优势, 在抗卒中治疗中越来越受到重视。丹参药性味苦微汗, 主心腹邪气, 具有破症除瘕、止腹满、益气的作用, 能够活血、化瘀、通脉。注射用丹参多酚酸是以现代工艺制备而成的中药粉针注射剂, 以丹参中水溶性多酚酸为主要成分。现代生理研究显示, 丹参多酚酸能够抗血小板聚集和抗血栓作用^[14]。此外, 丹参多酚酸被发现能够明显抑制基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达, 阻

止紧密连接蛋白 1 (ZO-1), 紧密连接蛋白 5 抗体 (Claudin-5) 与闭合蛋白 (Occludin) 蛋白降解, 从而避免血脑屏障结构损伤^[15]。与此同时, 对于神经血管内皮细胞, Mahmood 等^[16]研究显示, 丹参多酚酸通过减弱光谱蛋白和钙调磷酸酶分解, 抑制内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 解偶联, 降低过氧硝酸盐形成, 发挥神经血管内皮细胞保护作用。因此, 丹参多酚酸可以改善脑梗死症状。本研究结果也显示, 丹参多酚酸对脑梗死具有明显治疗作用。经丹参多酚酸治疗的大鼠缺血侧脑组织中局灶梗死区域面积减少, 伊文思蓝含量降低, 且神经功能评分减少。

尼莫地平是一款现阶段常用的脑梗死治疗药物, 是一种钙离子阻滞剂, 具有扩张脑血管、解除脑血管痉挛、增加脑血流量的作用。尼莫地平在促神经血管新生方面也有研究^[17], 与本研究结果一致, 尼莫地平可以通过提高 VEGF、Ang-1 受体表达, 提高血脑屏障完整性, 促进神经血管微循环新生。VEGF 是一类血管生长营养因子, 主要负责早期神经血管微循环网络的形成。Ang-1 是血管新生的重要调节剂, 可以保护周围血管避免渗漏, 与 VEGF 共同介导神经血管微循环新生作用^[18]。虽然, 有研究认为脑梗死损伤发生后, 模型组中升高的 VEGF 表达可能是造成血管通透性增加, 加剧脑水肿形成的重要原因, 但不可否认的是, 靶向提高 VEGF 表达有利于神经血管微循环重构, 恢复缺血区血流。Kong 等^[19]研究显示, 将内皮祖细胞通过尾静脉注射入脑梗死大鼠体内, 由于血脑屏障破坏会进入中枢系统, 且 VEGF 表达会伴随内皮祖细胞诱发的神经血管微循环重构不断增加, 达到改善脑梗死大鼠神经功能作用。本研究结果显示, 丹参多酚酸能够明显提高脑梗死大鼠 VEGF 与 Ang-1 蛋白表达, 促进脑组织中神经血管标记蛋白 CD31 表达增加, 与此同时, 大鼠脑组织中血流量也明显增加。本研究中也显示, 丹参多酚酸在 10 mg/kg 剂量条件下, 对脑梗死大鼠 VEGF 与 Ang-1 蛋白表达并没有明显影响, 且 CD31 表达与血流量并没有明显增加, 提示丹参多酚酸促血管新生作用存在剂量相关性。

综上所述, 丹参多酚酸能够明显促进神经血管微循环重构, 加速缺血区血流恢复, 最终到达恢复血脑屏障结构与功能完整性, 减轻脑卒中大鼠局灶性缺血损伤, 改善神经功能的作用, 其机制可能与提高 VEGF 与 Ang-1 蛋白表达相关。然而, 本研究

也存在一定局限性,由于丹参多酚酸A、B、C等单体都有报道能够减轻脑梗死缺血侧梗死^[20-21]。因此,假设本研究中设置其他丹参多酚酸单体对照组进行药效对比,对于证实丹参多酚酸中存在多环节、多靶点的协同作用,帮助丹参多酚酸在临床脑梗死患者中的应用存在更多方面的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Y C, Zhong W, Jiang Z, et al. New progress in the approaches for blood-brain barrier protection in acute ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 144: 46-57.
- [2] 孟苗苗, 倪小佳, 林浩, 等. 脑卒中临床实践指南推荐意见的系统评价 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2022, 14(7): 780-784.
- [3] Lü Z K, Chan Y J, Li Q, et al. Destructive effects of pyroptosis on homeostasis of neuron survival associated with the dysfunctional BBB-glymphatic system and amyloid-beta accumulation after cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 4504363.
- [4] Zhou Z, Xu N, Matei N, et al. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(2): 267-281.
- [5] Xie G L, Song C M, Lin X M, et al. Electroacupuncture regulates hippocampal synaptic plasticity via inhibiting Janus-activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling in cerebral ischemic rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(3): 792-799.
- [6] Ho J H, Hong C Y. Salvianolic acids: Small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 30.
- [7] 金钰铎. 注射用丹参多酚对脑梗死的治疗效果 [J]. *内蒙古中医药*, 2022, 41(8): 126-128.
- [8] Ma D C, Zhang N N, Zhang Y N, et al. Salvianolic acids for injection alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by switching M₁/M₂ phenotypes and inhibiting NLRP3 inflammasome/pyroptosis axis in microglia *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113776.
- [9] 张雯琪, 李东娜, 马萌萌, 等. 注射用丹参多酚酸通过调节 Akt/mTOR 通路介导的自噬对氧糖剥夺/再灌注 Neuro-2a 细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2706-2714.
- [10] 陈璐, 姚宇晴, 李德坤, 等. 注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 559-564.
- [11] 朱东亚. 卒中治疗药物或治疗方法临床前评价的动物模型 [J]. *中国卒中杂志*, 2017, 12(8): 735-741.
- [12] Du K, Zhao C, Wang L, et al. MiR-191 inhibit angiogenesis after acute ischemic stroke targeting VEZF1 [J]. *Aging*, 2019, 11(9): 2762-2786.
- [13] Du J, Yin G, Hu Y, et al. Coicis semen protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting angiogenesis via the TGFβ/ALK1/Smad1/5 signaling pathway [J]. *Aging*, 2020, 13(1): 877-893.
- [14] Tang M K, Ren D C, Zhang J T, et al. Effect of salvianolic acids from *Radix Salviae Miltiorrhizae* on regional cerebral blood flow and platelet aggregation in rats [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(5): 405-409.
- [15] Zhang W, Song J K, Zhang X, et al. Salvianolic acid A attenuates ischemia reperfusion induced rat brain damage by protecting the blood brain barrier through MMP-9 inhibition and anti-inflammation [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(3): 184-193.
- [16] Mahmood Q, Wang G F, Wu G, et al. Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytomedicine*, 2017, 25: 8-14.
- [17] Mu Y, Xu Z, Zhou X, et al. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside attenuates ischemia/reperfusion-induced brain injury in rats by promoting angiogenesis [J]. *Planta Med*, 2017, 83(8): 676-683.
- [18] Toyama K, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2009, 216(1): 47-55.
- [19] Kong Z H, Hong Y, Zhu J, et al. Endothelial progenitor cells improve functional recovery in focal cerebral ischemia of rat by promoting angiogenesis via VEGF [J]. *J Clin Neurosci*, 2018, 55: 116-121.
- [20] Ling Y, Jin L, Ma Q, et al. Salvianolic acid A alleviated inflammatory response mediated by microglia through inhibiting the activation of TLR2/4 in acute cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153569.
- [21] Zhang S, Li R, Zheng Y, et al. Erythrocyte membrane-enveloped salvianolic acid B nanoparticles attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 3561-3577.

[责任编辑 高源]