

基于转录组测序探讨复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤的影响

买吾兰江·买合木提江¹, 霍仕霞^{1,2,3*}, 李治建^{2,3}, 赵萍萍^{2,3}, 祖力皮卡尔·吾斯曼^{2,3}, 康雨彤^{2,3}, 叶海霞^{2,3}, 黄福献^{2*}

1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830001

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院 (新疆维吾尔自治区第二人民医院), 新疆 乌鲁木齐 830049

3. 新疆中药医院制剂循证与转化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: **目的** 探讨复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤的保护及可能机制。**方法** 将 72 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及复方高滋斑片低、中、高剂量 (135、270、540 mg/kg) 组和阿托伐他汀钙片组, 每组 12 只。采用大脑中动脉栓塞建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型; 造模后分析各组大鼠生存情况、体质量和 Zea Longa 评分, 苏木精-伊红 (HE) 染色检测脑组织形态变化, TUNEL 染色分析脑组织细胞凋亡情况, ELISA 检测血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 IL-1 β 及氧化应激指标丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD); 通过转录组测序预测复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤保护作用的相关信号通路, 并利用 RT-PCR 检测信号通路相关基因的表达。采用 Western blotting 检测缺血半暗带磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 相关蛋白和 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (Caspase-3) 凋亡相关蛋白。**结果** 与模型组相比, 复方高滋斑片可以升高大鼠生存率和体质量, 降低 Zea Longa 评分 ($P < 0.01$); 促进脑组织形态恢复正常、脑组织细胞凋亡数减少 ($P < 0.01$); TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA 降低 ($P < 0.01$), SOD 升高 ($P < 0.05, 0.01$)。通过基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 差异基因富集在受体蛋白酪氨酸激酶结合生物过程及 PI3K/Akt 信号通路, 复方高滋斑片可调控该通路基因的异常表达; Western blotting 结果显示, 复方高滋斑片可使 Bcl-2、PI3K、p-Akt/Akt 蛋白水平增加, Bax 和 Caspase-3 蛋白水平减少。**结论** 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤具有一定的改善作用, 该作用与调节受体蛋白酪氨酸激酶结合生物过程及通过激活 PI3K/Akt 信号通路减少脑缺血再灌注后的神经元凋亡相关。

关键词: 复方高滋斑片; 阿托伐他汀钙片; 脑缺血再灌注损伤; 转录组学; PI3K/Akt 信号通路; 受体蛋白酪氨酸激酶

中图分类号: R286.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)03-0629-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.009

Effect of Compound Gaoziban Tablets on cerebral ischemia-reperfusion injury based on transcriptome sequencing

MAIWULANJIANG·Maihemitijiang¹, HUO Shixia^{1,2,3}, LI Zhijian^{2,3}, ZHAO Pingping^{2,3}, ZULIPIKAER·Wusiman^{2,3}, KANG Yutong^{2,3}, YE Haixia^{2,3}, HUANG Fuxian²

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Uygur Medical Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region (the Second People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region), Urumqi 830049, China

3. Xinjiang Key Laboratory of Evidence-Based and Translation, Hospital preparation of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Compound Gaoziban Tablets on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) and the underlying mechanisms. **Methods** Seventy-two male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a sham

收稿日期: 2025-11-20

基金项目: “天山英才”医药卫生高层次人才培养计划项目 (TSYC202301B152); 天山创新团队项目 (2024D14018); 中央引导地方资金项目 (ZYYD2024JD06)

作者简介: 买吾兰江·买合木提江, 男, 研究方向为药理学。E-mail: mwlj991026@163.com

*通信作者: 霍仕霞, 研究员, 研究方向为中药民族药物物质基础及新药研发。E-mail: huoshixia1983@163.com

黄福献, 男, 脑病科主任, 研究方向为民族医药在脑缺血再灌注损伤的应用。E-mail: 1751721828@qq.com

operation group, a model group, low-, medium-, and high-dose (135, 270, 540 mg/kg) Compound Gaoziban Tablets groups, and Atorvastatin Calcium Tablets group, with 12 rats in each group. A rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury was established by middle cerebral artery occlusion. After modeling, the survival rate, body weight, and Zea Longa score of rats in each group were analyzed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect morphological changes in brain tissue, and TUNEL staining was performed to analyze apoptosis in brain tissue. Serum levels of inflammatory factors including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 β , as well as oxidative stress indicators malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), were measured by ELISA. Transcriptome sequencing was used to predict signaling pathways related to the protective effect of Compound Gaoziban Tablets against cerebral ischemia-reperfusion injury, and the expression of genes related to these pathways was detected by RT-PCR. Western blotting was used to determine the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway-related proteins and apoptosis-related proteins including B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) in the ischemic penumbra. **Results** Compared with the model group, Compound Gaoziban Tablets increased the survival rate and body weight, and decreased the Zea Longa score in rats ($P < 0.01$). It promoted the recovery of normal brain tissue morphology, and reduced the number of apoptotic brain tissue cells ($P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and MDA were decreased ($P < 0.01$), while SOD was increased ($P < 0.05, 0.01$). Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses revealed that differentially expressed genes were enriched in receptor protein tyrosine kinase binding biological processes and the PI3K/Akt signaling pathway. Compound Gaoziban Tablets could regulate the abnormal expression of genes in this pathway. Western blotting results showed that Compound Gaoziban Tablets upregulated the protein levels of Bcl-2, PI3K, and p-Akt/Akt, and downregulated the protein levels of Bax and Caspase-3. **Conclusion** Compound Gaoziban Tablets exert a marked protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury, an effect associated with modulation of receptor protein-tyrosine kinase binding and activation of the PI3K-AKT pathway, thereby reducing post-ischemic neuronal apoptosis.

Key words: Compound Gaoziban Tablets; Atorvastatin Calcium Tablets; cerebral ischemia reperfusion injury; transcriptomics; PI3K/Akt signaling pathway; receptor protein-tyrosine kinase

脑梗死是一种具有高发病率及高死亡率的疾病, 其中缺血性脑梗死占全球卒中的 80%~90%, 是脑梗死患者中常见的疾病亚型^[1]。目前治疗缺血性脑梗死的主要策略为尽快恢复缺血区血液灌注, 但是血液灌注可能会对脑组织造成严重的伤害, 即脑缺血再灌注损伤^[2]。脑缺血再灌注损伤会导致机体出现炎症反应及氧化应激, 引起脑组织形态变化、坏死、凋亡, 加重损伤^[3]。目前治疗脑缺血再灌注损伤的常规治疗药物有自由基清除剂类药物 (依达拉奉、褪黑素等)、抗炎类药物 (洛伐他汀、超低分子量肝素等)。但是脑缺血再灌注损伤发病机制较复杂, 单一靶点的药物很难达到较好的治疗效果^[4]。中医药具有多成分、多途径、多靶点等优势, 在改善脑缺血再灌注损伤患者生活治疗、临床症状、神经功能具有一定的优势^[5]。复方高滋斑片是新疆维吾尔药业公司生产已上市的中成药, 收编于 1998 部版标准, 具有强心健脑、安神、通脉、缓解头痛头晕等功效, 临床上主要用于治疗神经衰弱、失眠、高血压等疾病^[6]。研究报道, 复方高滋斑片能缓解慢性不可预测温和应激大鼠的抑郁症状和降低炎症因子水平, 并且能够抑制大鼠海马体内 NOD 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体相

关蛋白表达, 提示复方高滋斑片可能通过抑制 NLRP3 炎性小体相关蛋白表达缓解其抑郁症状^[7]。此外研究发现, 复方高滋斑片可以通过抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统的过度激活, 降低血管紧张素 II (Ang II)、血管舒张、血压降低、减少胶原蛋白积累、延缓自发性高血压大鼠肝脏纤维化进程^[8]。复方高滋斑片可通过 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核因子- κ B (TLR4/MyD88/NF- κ B) 通路减轻慢性不可预测的轻度压力诱导的抑郁症, 提示具有抗抑郁的潜力^[9]。大脑中动脉栓塞模型是目前研究脑缺血再灌注损伤最经典、应用最广泛的动物造模方法之一, 该造模方法能很好的模拟人类脑梗死的情况, 具有梗死面积大、重现性好等特点, 能更精准的控制缺血和再灌注时间^[10]。因此, 本研究选择大脑中动脉栓塞作为脑缺血再灌注损伤大鼠模型, 评价复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织的影响, 并探讨复方高滋斑片治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

无特定病原体级 (SPF) 雄性 SD 大鼠 72 只, 体质量 (240 \pm 20) g, 均由新疆医科大学动物实验中

心提供, 动物实验生产许可证号: SCXK(新) 2023-0001, 饲养环境(23±2)℃, 湿度(60±5)%。每日给予标准饲料和正常光照饲养, 观察大鼠的生活状态。本研究动物实验方案经新疆医科大学实验动物伦理委员会审查批准(伦理审批号: IACUC-JT-20240531-16), 所有动物实验操作符合实验动物 3R 原则及国内外相关的实验动物福利伦理标准要求。

1.2 药物与试剂

复方高滋斑片, 0.3 g/片, 产品批号 250308, 购自新疆维吾尔药业有限责任公司; 阿托伐他汀钙片, 规格 10 mg/片(按 C₃₃H₃₅FN₂O₅ 计), 产品批号 8190146, 购自晖致制药(大连)有限公司; 通用型组织固定液, 产品批号 BL539A, 购自 Biosharp 科技有限公司; 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)测定试剂盒, 产品批号 G1076, 购自武汉科鹿生物科技有限公司; 丙二醛(MDA)测定试剂盒, 产品批号 A003-1-2, 购自南京建成生物工程研究所; 白细胞介素-6(IL-6)测定试剂盒, 产品批号 E-BC-K031-M, 购自武汉科鹿生物科技有限公司; 白细胞介素-1β(IL-1β)测定试剂盒, 产品批号 E-BC-K020-M, 购自武汉科鹿生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒, 产品批号 A015-2-1, 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 总 RNA 小量抽提试剂盒, 产品批号 R4111-02, 购自广州美基生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 产品批号 PC0020, 购自北京索莱宝科技有限公司; TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit, 产品批号 RR017A, 购自宝生物工程(大连)有限公司; TB Green Premix Ex Taq™ II, 产品批号 RR820A, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 一步法免染 12.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速制备试剂盒, 批号 WB2303, 购自北京博泰斯生物技术有限公司; 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K, 批号 20584-1-AP)、蛋白激酶 B(Akt, 批号 10176-2-AP)、磷酸化 Akt(p-Akt, 批号 28731-1AP)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2, 批号 26593-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax, 50599-2-Ig)均购自美国 Proteintech 公司; 二抗(批号 M21002S)购自美国 Abmart 公司。

1.3 仪器

大脑中动脉栓塞线栓(长沙迈越生物科技有限公司); 脱水机(意大利 DIAPATH 公司); 酶标仪(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司); 大容量高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公

司); 正置白光拍照显微镜(Olympus); 旋涡混合仪(上海泸西分析仪器厂有限公司); 脱色摇床(北京市六一仪器厂); 基因扩增仪(TC-96/G/H/b); 实时荧光定量 PCR 仪(A51638); Western blot 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 转印仪(美国 Bio-Rad 公司); VILBER 超灵敏多功能显影仪(FX6.EDGE V.070)。

2 方法

2.1 脑缺血再灌注损伤模型的建立、分组及给药

大鼠适应性饲养 1 周后, 体质量达到(240±20)g 时可进行手术。术前 12 h 禁食, 4 h 禁水, 手术前大鼠熟悉周围环境约 1 h。72 只中随机选取 12 只为假手术组(不插入线栓, 其余操作与模型组一致), 其余的大鼠建立脑缺血再灌注模型。手术前 ip 50 mg/kg 2%戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠, 采取仰卧位的方式固定大鼠, 颈部皮肤备皮消毒后于颈正中中线处开口, 用镊子钝性分离皮下肌肉, 分离出迷走神经和血管, 包括颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎颈总动脉远端和颈外动脉近心端, 颈总动脉分叉处剪开小口, 插入线栓, 线栓头端距离分叉处约 18 mm, 感受到阻力立即停止前进。阻断大脑中动脉血流 2 h, 缺血结束拔除线栓, 缝合大鼠颈部皮肤。造模后, 将大鼠随机分为模型组及复方高滋斑片低、中、高剂量(135、270、540 mg/kg)组和阿托伐他汀钙片组, 每组 12 只。复方高滋斑片中剂量组根据成人日剂量(42.8 mg/kg)折算成大鼠日剂量为 270 mg/kg, 给药体积为 10 mL/kg; 阿托伐他汀片组根据成人日剂量(0.285 mg/kg)折算成大鼠日剂量为 1.76 mg/kg; 给药体积为 10 mL/kg。各组大鼠 ig 给药 14 d, 期间每天密切关注各大鼠生存情况以及体质量变化。

2.2 Zea Longa 评分

等待大鼠术后完全清醒, 根据 Zea Longa 评分法的标准, 将评分为 1~3 分的大鼠随机分配入组纳入实验, 其余剔除。大鼠术后缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 对其进行神经功能学评分并记录, 以判断各处理组大鼠神经功能缺损情况。0 级: 活动时正常, 无神经功能损伤现象; 1 级: 悬尾时, 病变对侧前爪不能完全伸直, 呈内旋状态; 2 级: 行走时, 无法直线行走, 向病变对侧转圈; 3 级: 行走时, 无法直线行走, 向病变对侧倾倒; 4 级: 自主活动消失, 失去意识甚至死亡。Zea Longa 评分越高, 神经功能缺损程度越严重^[11]。

2.3 HE 染色

用 2%戊巴比妥钠对大鼠全身麻醉, 腹主动脉

取血后，心脏灌注（于右心耳处剪一小口，灌注不少于 20 min，其中，生理盐水灌注 50~100 mL）后，取完整脑组织，制作蜡块做冠状切片，厚 5 μm。二甲苯及无水乙醇脱蜡，苏木精染色，1%伊红复染，使用梯度乙醇脱水，最后二甲苯透明封片。光镜下，观察各组大鼠梗死侧皮层神经细胞组织形态学特征。

2.4 TUNEL 染色

将大鼠脑组织从固定液取出，脱水并且包埋，切成 5 μm 厚度的切片；将切片依次用蛋白酶 K、破膜液、3% H₂O₂、内 TdT 酶、Biotin-dUTP 反应液、EB 平衡缓冲液孵育和 Streptavidin-HRP 反应液孵育，最后用 DAB 工作液显色，在显微镜下控制显色并观察各组大鼠脑组织缺血半暗带皮质层细胞凋亡情况，阳性为棕黄色，自来水洗终止显色。

阳性细胞面积率 = 阳性细胞面积 / 总面积

2.5 复方高滋斑片对脑缺血再灌注大鼠血清中炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 及氧化应激指标 MDA 和 SOD 的影响

给药结束后，用戊巴比妥钠全身麻醉，腹主动脉取血，4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 10 min，取上清按照试剂盒说明书，检测大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β、MDA 和 SOD 水平，比较各组间炎症因子和氧化应激水平的差异。

2.6 脑组织 RNA 提取、转录组学测序与数据分析

按照 RNA 提取试剂盒说明书对假手术组、模型组和复方高滋斑高剂量组大鼠的脑组织进行 RNA 的提取，每组 3 只。将提取的 RNA 溶液委托上海百趣生物医学科技有限公司进行转录组学测序。以 |log₂FC| > 1、P < 0.05 为条件筛选假手术组 vs 模型组和模型组 vs 复方高滋斑片组的差异表达基

因，进一步交集得到共同差异表达基因。将共同差异表达基因进行基因本体（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。

2.7 RT-qPCR 验证

取各组大鼠脑组织后，置于 -80 °C 中保存至使用。用 RT-qPCR 验证 KEGG 富集的 PI3K/Akt 信号通路和受体蛋白酪氨酸激酶结合生物过程的差异基因：Fn1、Pik3ap1、Pik3cg、Tlr2、Ntrk1、Epha7、Ror2 和 Ror1。采用 Trizol-离心柱法提取 RNA，随后逆转录为互补 DNA，以 3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）为内源性参照基因，实验中引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 1。反应条件为 95 °C 预变性 30 min，95 °C 变性 5 s，60 °C 退火 34 s，反应完成后，使用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。

2.8 Western blotting 法检测取血半暗带 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

提取各组大鼠脑组织半暗带总蛋白，使用 BCA 法检测总蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 琼胶电泳分离蛋白，再将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上，使用 5% 奶粉封闭 2 h，然后一抗 4 °C 孵育过夜；次日辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h 后，加入显影液，用多功能显影仪曝光相关蛋白。用 Image J 软件分析相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt 和 p-Akt 的表达。

2.9 统计学分析

采用 Graphprism 10.4.2 软件进行统计学处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用配对的 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向 (5'-3')	反向 (3'-5')
<i>Ntrk</i>	AACGGCTCTGTGCTCAATGA	CATGCCGCATGGTCTCATTG
<i>Ror1</i>	TAGAATCTCCTTCCGGGCCA	ACTTGTTGCCACACACTGGA
<i>Ror2</i>	AAGACCATTACCGCCACTGG	CGATCCCTCGGTAAGGTTGG
<i>Epha7</i>	TGCATGGCAGAAGGAGAGTG	ATTTGTAGAACCTGCGGCCA
<i>Fn1</i>	AAGGGGAATGGACCTGCAAG	CACCATCATCCAGCCTTGTT
<i>Tlr2</i>	ATCACCTGACCCTGCACTTG	TTCCGGAATGCCAGCTTCTT
<i>Pik3cg</i>	CCAAGTGGTGCAGACCCTAG	GTCAGTGACGTCGTAGCCAA
<i>Pik3ap1</i>	CAAGCTGGACGAGAAGGTGT	TTCCAGTGTGCCTTCCATCC
<i>GAPDH</i>	TGATGGGTGTAACCCACGAG	AGTGATGGCATGGACTGTGG

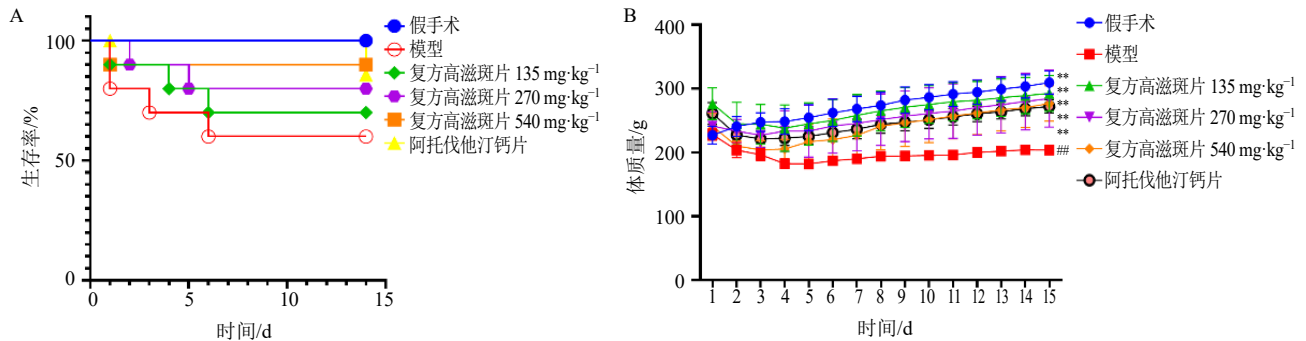
3 结果

3.1 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤大鼠生存曲线、体质量和 Zea Longa 评分的影响

如图 1A 所示,假手术组大鼠在术后没有出现死亡,模型组大鼠在术后 1、3、6 d 共死亡 4 只,复方高滋斑片低剂量组大鼠在术后 1、4、6 d 共死亡 3 只,复方高滋斑片中剂量组大鼠在术后 2、5 d 共死亡 3 只,复方高滋斑片高剂量及阿托伐他汀钙片组大鼠在术后 1 d 均死亡 1 只。如图 1B 所示,假手术组大鼠体质量在术后升高;与假手术组相比,模型组大鼠体质量在术后明显下降,术后第 3 天开始

持续在 (190±10) g;复方高滋斑片低、中、高剂量组大鼠在术后 1 d 体质量明显下降,第 4 天开始恢复术前体质量。术后 15 d,与假手术组相比,模型组大鼠体质量明显下降 ($P<0.01$);与模型组相比,复方高滋斑片低、中、高剂量组及阿托伐他汀片组大鼠体质量均明显升高 ($P<0.01$)。

如表 2 所示,与假手术组相比,模型组 ZeaLong 评分显著升高 ($P<0.01$),表明造模成功;与模型组相比,复方高滋斑片低、中、高剂量组及阿托伐他汀片组 ZeaLong 评分均显著降低,且有统计学意义 ($P<0.01$)。



与假手术组比较: $###P<0.01$; 与模型组比较: $**P<0.01$ 。

$###P<0.01$ vs sham group; $**P<0.01$ vs model group.

图 1 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤大鼠生存率 (A) 和体质量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of Compound Gaoziban Tablets on survival rate (A) and body weight (B) in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

表 2 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤大鼠 Zea Longa 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of Compound Gaoziban Tablets on Zea Longa score in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Zea Longa 神经功能学评分
假手术	—	0
模型	—	1.86±0.70 ^{##}
复方高滋斑片	135.00	1.50±0.55 ^{**}
	270.00	1.25±0.46 ^{**}
	540.00	1.22±0.44 ^{**}
阿托伐他汀钙片	1.76	1.22±0.45 ^{**}

与假手术组比较: $###P<0.01$; 与模型组比较: $**P<0.01$ 。

$###P<0.01$ vs sham group; $**P<0.01$ vs model group.

3.2 HE 染色

如图 2 所示,假手术组大鼠脑组织皮质区神经细胞圆润、排列整齐、核仁清晰、染色质分布均匀;

模型组神经细胞被破坏萎缩甚至坏死,排列紊乱、核仁模糊、染色质分布不均匀、淡染;与模型组相比,复方高滋斑片低剂量组治疗效果不明显;复方高滋斑片中、高剂量组及阿托伐他汀钙片组神经细胞松散,排列较为整齐,核仁较为清晰,偶有萎缩和坏死,染色质分布较为均匀。

3.3 TUNEL 染色

如图 3 和表 3 所示,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中细胞凋亡数显著增加 ($P<0.01$);与模型组相比,复方高滋斑片低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙片组细胞凋亡数明显下降 ($P<0.05, 0.01$)。

3.4 复方高滋斑片对脑缺血再灌注大鼠血清中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 及氧化应激指标 MDA 和 SOD 的影响

如表 4 所示,与假手术组相比,模型组血清中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达显著增加 ($P<0.01$);与模型组相比,复方高滋斑片低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙片组大鼠血清中促炎因子 TNF- α 、

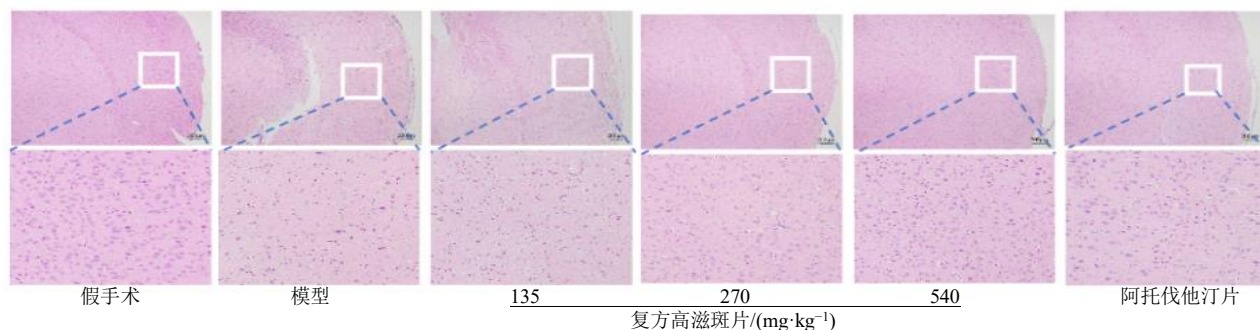


图 2 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织的影响

Fig. 2 Effects of Compound Gaoziban Tablets on brain tissues in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

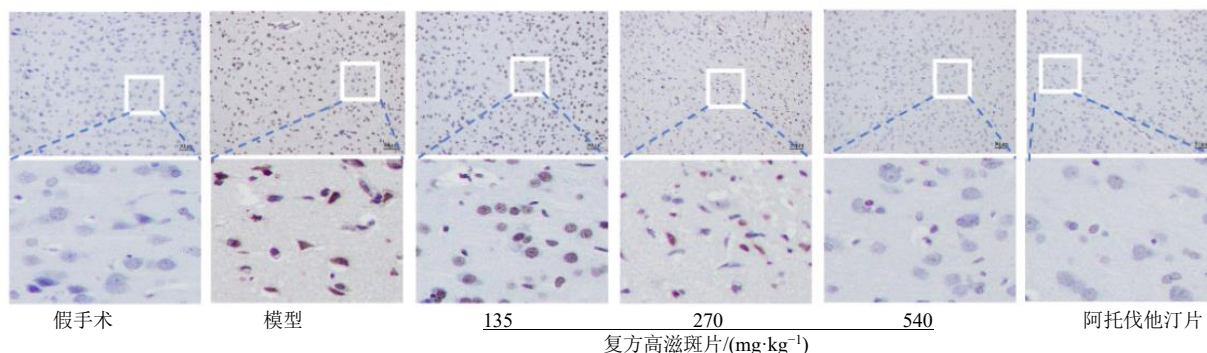


图 3 复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤脑组织细胞凋亡的情况

Fig. 3 Effects of Compound Gaoziban Tablets on brain tissue cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury

表 3 TUNEL 染色分析大鼠脑组织细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 TUNEL staining analysis of brain tissue cell apoptosis in rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡阳性染色面积百分比/%
假手术	—	0.35 ± 0.16
模型	—	5.52 ± 0.45 ^{###}
复方高滋斑片	135	4.11 ± 0.11 [*]
	270	3.73 ± 0.16 ^{**}
	540	3.22 ± 0.46 ^{**}
阿托伐他汀钙片	1.76	2.75 ± 0.38 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{###} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

IL-6 表达显著降低 ($P < 0.01$); 复方高滋斑片中、高剂量组和阿托伐他汀钙片组大鼠血清中促炎因子 IL-1 β 表达降低 ($P < 0.01$)。与假手术组相比, 模型组血清中氧化应激指标 MDA 表达明显增加 ($P < 0.01$), SOD 表达明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 复方高滋斑片低、中、高剂量组大鼠血清中 MDA 表达明显减少 ($P < 0.01$), SOD 明显增加 ($P < 0.05$)。

3.5 差异基因表达分析

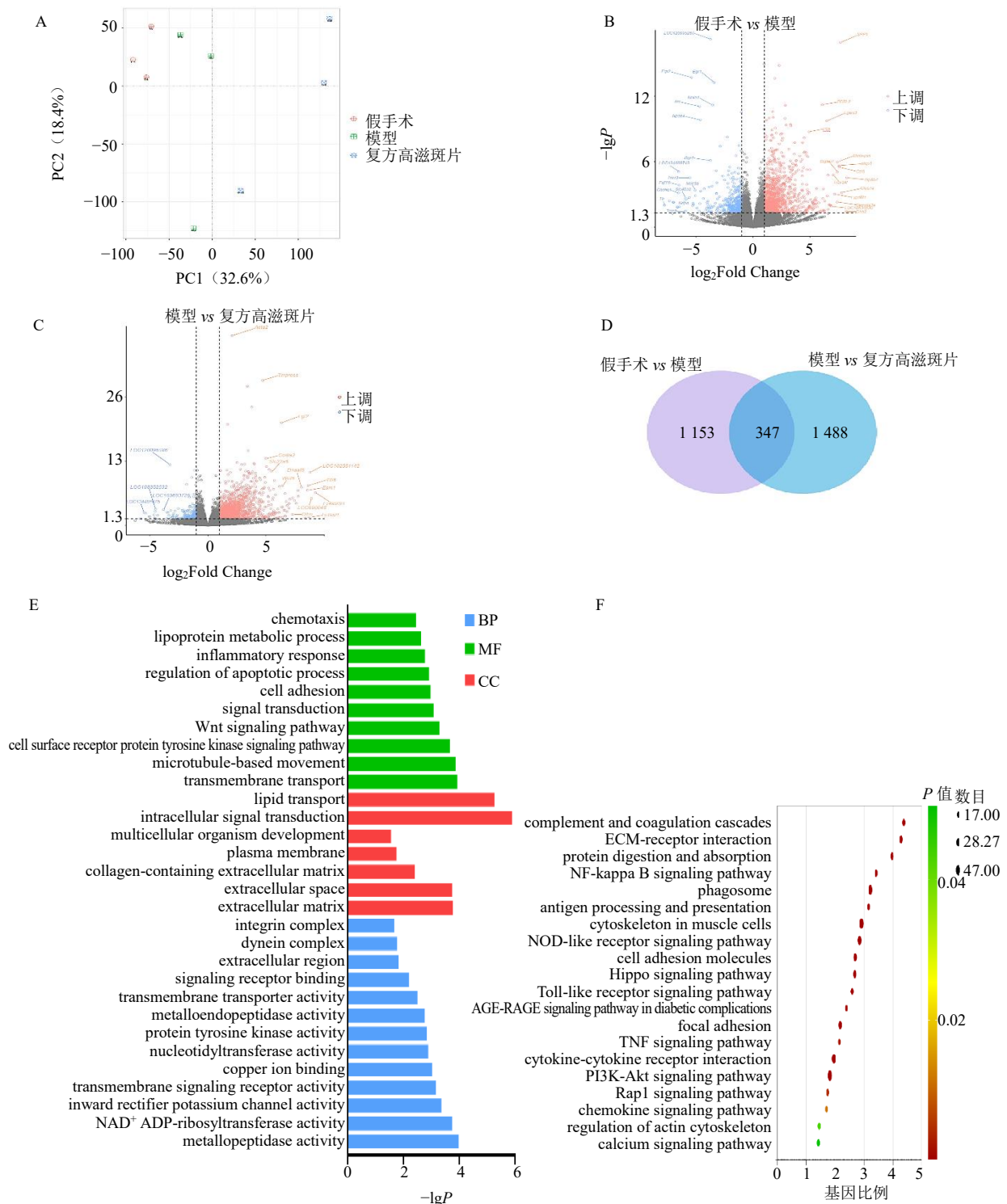
如图 4 所示, 假手术组 vs 模型组筛选后共获得 1 500 个差异表达基因, 其中显著上调的基因有 1 112 个, 显著下调的基因有 388 个; 模型组 vs 复方高滋

表 4 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA 和 SOD 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Expression levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA and SOD in serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	MDA/(U·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
假手术	—	38.39 ± 1.62	23.76 ± 2.90	53.69 ± 6.34	6.03 ± 0.20	286.83 ± 2.51
模型	—	66.44 ± 6.10 ^{###}	175.42 ± 17.37 ^{###}	117.90 ± 3.04 ^{###}	7.93 ± 0.39 ^{###}	264.53 ± 1.90 ^{###}
复方高滋斑片	135.00	45.65 ± 2.53 ^{**}	104.84 ± 6.88 ^{**}	95.71 ± 4.27	6.37 ± 0.41 ^{**}	275.01 ± 2.61 [*]
	270.00	41.65 ± 3.23 ^{**}	103.19 ± 5.49 ^{**}	83.87 ± 5.66 ^{**}	5.83 ± 0.21 ^{**}	271.42 ± 2.38 [*]
	540.00	38.44 ± 1.20 ^{**}	103.19 ± 11.81 ^{**}	83.74 ± 5.47 ^{**}	5.48 ± 0.31 ^{**}	274.71 ± 3.66 [*]
阿托伐他汀片	1.76	36.21 ± 1.98 ^{**}	75.54 ± 6.83 ^{**}	67.23 ± 3.61 ^{**}	5.63 ± 0.28 ^{**}	269.61 ± 2.46

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{###} $P < 0.01$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.



A-主成分分析; B-假手术组和模型组差异基因火山图; C-模型组和高剂量组差异基因火山图; D-不同组别差异基因 Venn 图; E-差异表达基因 GO 富集分析通路图; F-差异表达基因 KEGG 富集分析通路图。

A-the principal component analysis; B -the volcano plot of differential genes between the sham operation group and the model group; C-the volcano plot of differential genes between the model group and the high-dose group; D-the Venn diagram of differential genes; E-the GO enrichment analysis pathway diagram of differentially expressed genes; F-the KEGG enrichment analysis pathway diagram of differentially expressed genes.

图 4 复方高滋斑片调节差异性基因分析和差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 4 Analysis of differentially expressed genes regulated by Compound Gaoziban Tablets and GO and KEGG enrichment analyses of differentially expressed genes

斑片组筛选后共获得 1 835 个差异表达基因, 其中显著上调的基因有 1 624 个, 显著下调的基因有 211 个。Venn 图分析得到 347 个共同基因。为了进一步探究复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制, 对模型组 vs 复方高滋斑片组筛选出的差异基因进行 GO 富集分析, 差异基因主要富集在受体蛋白酪氨酸激酶、细胞凋亡过程的调节、炎症反应等生物过程; 在 KEGG 富集分析中, 差异基因主要富集在 PI3K/Akt 信号通路、NF-κB 信号通路、TNF 信号通路等。其中, 蛋白酪氨酸激酶作为细胞膜上的受体, 可以启动多种信号通路, PI3K/Akt 作为关键中介, 激活 PI3K, 进而激活 Akt。Akt 通过磷酸化激活

NF-κB 抑制蛋白激酶, 导致 NF-κB 抑制蛋白降解, 最终释放并激活 NF-κB。对蛋白酪氨酸激酶和 PI3K/Akt 信号通路差异基因进行筛选得到 *Fnl*、*Pik3ap1*、*Pik3cg*、*Tlr2*、*Ntrk1*、*Epha7*、*Ror2*、*Ror1* 基因。

3.6 RT-PCR 验证

如图 5 所示, 与假手术组相比, 模型组 *Fnl*、*Pik3ap1*、*Pik3cg*、*Tlr2* 和 *Epha7* 基因表达上调 ($P < 0.01$), *Ntrk1*、*Ror2* 基因表达下调 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 复方高滋斑片高剂量组 *Fnl*、*Pik3ap1*、*Pik3cg*、*Tlr2* 和 *Epha7* 基因表达下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), *Ntrk1*、*Ror2* 和 *Ror1* 基因表达上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。RT-PCR 的验证结果与转录组预测结果一致。

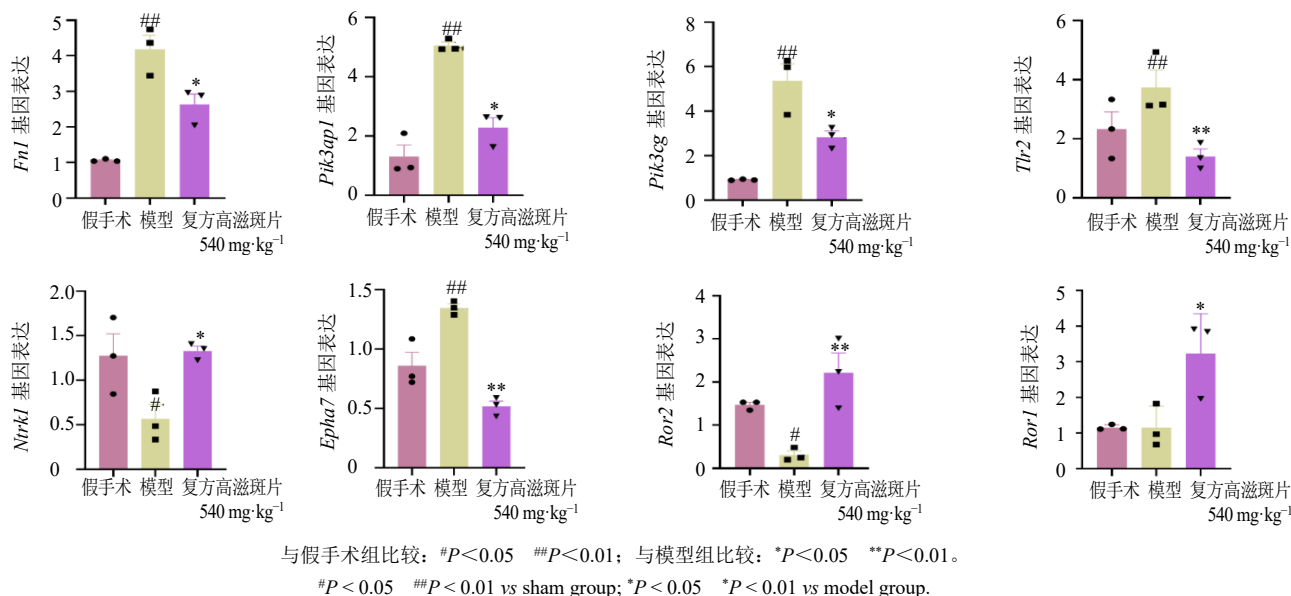


图 5 复方高滋斑片对相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of Compound Gaoziban Tablets on the expressions of related genes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 Western blotting 法检测缺血半暗带 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

如图 6 所示, 与假手术组相比, 模型组 Bax 和 Caspase-3 蛋白水平显著增加 ($P < 0.01$), Bcl-2、PI3K、p-Akt/Akt 蛋白水平显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 复方高滋斑片低、中、高剂量组 Bax 蛋白水平显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), Caspase-3 蛋白水平呈剂量相关性减少, 但差异无统计学意义。与模型组相比, 复方高滋斑片低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙片组 Bcl-2、PI3K、p-Akt/Akt 蛋白水平呈剂量相关性增加, 复方高滋斑片高剂量组和阿托伐他汀钙片组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 讨论

近年来, 中医药因其多成分、多途径、多靶点

及不良反应少等优势, 治疗脑缺血再灌注损伤的优势越来越突出。复方高滋斑片因其强心健脑、安神等作用, 具有治疗脑缺血再灌注损伤的潜力。脑梗死是指因脑部血液循环障碍导致局部组织缺血、缺氧性坏死; 患者急性脑梗死, 采取溶栓及血管内介入取栓后, 便发生脑缺血再灌注损伤; 脑缺血再灌注损伤是指缺血脑组织在血流恢复 (再灌注) 后, 反而出现加重的神经损伤和细胞死亡^[2]。其发生的机制有氧化应激、炎症反应、钙超载和血脑屏障破坏等^[3]。炎症是脑缺血再灌注损伤的核心机制, 涉及小胶质细胞、中性粒细胞、炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β) 及 NLRP3 炎症小体的激活; 加重血脑屏障破坏、神经元死亡和微循环障碍, 导致二次损伤^[4]。因此抗炎治疗可能成为脑保护的重要策略。复方高滋斑片

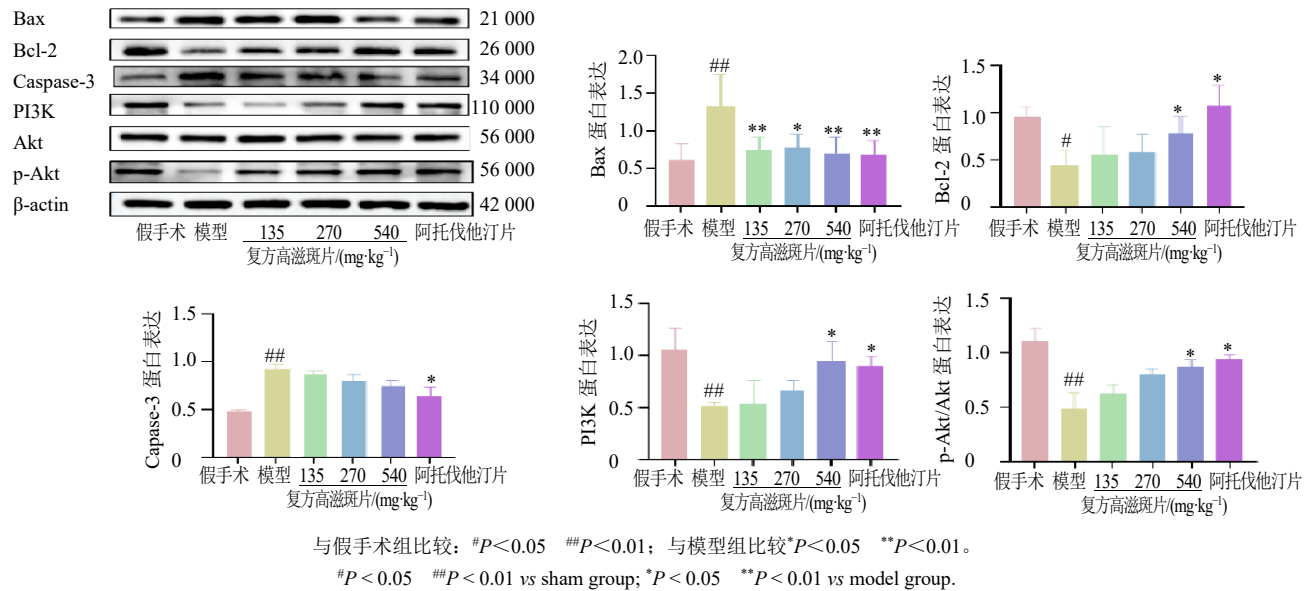


图 6 各组大鼠脑组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3, PI3K, Akt and p-Akt proteins in brain tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

基于强心健脑、安神、通脉、缓解头痛和头晕等功效，故进行了复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织保护的研究。

本研究通过大脑中动脉栓塞建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型，对大鼠血清、病理、梗死区域进行观察与检测。结果显示，与假手术组相比，模型组 Zea Longa 评分显著升高，病理变化较大，炎症因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 显著增高 MDA 明显升高，说明造模成功。给药组生存率、体质量和 Zea Longa 评分较模型组相比，有明显改善。HE 染色和 TUNEL 染色结果可见，各给药组神经细胞形态、排列、脑组织细胞凋亡情况，有明显改善。脑组织中促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 和氧化应激指标 MDA 表达明显降低，SOD 表达明显升高。并且通过对大鼠脑组织差异基因表达分析，复方高滋斑片可能通过 PI3K/Akt 信号通路改善脑组织炎症和细胞凋亡，并且通过 RT-PCR 和 Western blotting 进一步验证此结果。综上所述，本研究各给药组能改善大鼠行为、保护神经细胞、减少缺血区细胞凋亡；通过降低大鼠脑组织中炎症以及氧化，减少炎症和氧化应激对大鼠脑组织的损伤，并且复方高滋斑片对脑缺血再灌注损伤的保护作用与其调控 PI3K/Akt 信号通路进而抑制脑缺血再灌注后的神经元凋亡有关。

PI3K/Akt 在肾缺血再灌注、心肌缺血再灌注、肝缺血再灌注及脑缺血再灌注中起重要作用。PI3K 家族中异二聚体 IA 类是由 p85 和 p110 亚型构成，

其可以被受体酪氨酸激酶或 G 蛋白偶联受体激活，聚集到细胞膜上，磷脂酰肌醇二磷酸磷酸化为磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP3)。PIP3 可招募 Akt 和 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 等含血小板-白细胞 C 激酶底物蛋白同源结构域蛋白至细胞膜上，进行下游信号传导^[15]。近年来，中药干预 PI3K/Akt 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤主要是通过细胞凋亡、细胞自噬、炎症反应及氧化应激。茯苓酸还可通过 Akt/Bcl-2 途径提高大鼠脑缺血时 p-PDK1、p-Akt、p-Bad 的表达，发挥抗凋亡作用^[16]。研究发现，醒脑静可通过 PI3K/Akt/内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 通路在脑缺血再灌注损伤后调节细胞凋亡方面具有较好的潜力，可显著增加脑组织磷酸化 PI3K/Akt 的水平，通过提高 eNOS 的磷酸化，增加一氧化氮的表达^[17]。黄芪红花合剂通过 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路调节自噬；同时，黄芪红花合剂通过抑制脑缺血再灌注损伤后肠道微生物结构的改变和诱导自噬来治疗脑缺血再灌注损伤，为肠道菌群有望在中枢神经系统疾病的防治方面取得突破性进展^[18]。当归补血汤可调控 PI3K/Akt 信号通路，通过降低脑缺血再灌注损伤模型大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达水平发挥抗脑缺血再灌注损伤作用^[19]。转录组测序是一门从整体水平研究细胞转录、转录调控规律的技术，RNA 测序是二代测序技术，相对于一代测序技术，其优势在于成本低，效率高，因此具有

更为有效的应用价值,为揭示中药治疗疾病的复杂机制提供了有力工具^[20-23]。本研究中,利用转录组学对差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,发现差异基因主要富集在 PI3K/Akt 信号通路及受体蛋白酪氨酸激酶结合生物过程,进一步通过 RT-PCR 验证转录组结果。RT-PCR 结果表明与假手术组相比,模型组 *Fnl*、*Pik3ap1*、*Pik3cg*、*Tlr2* mRNA 表达升高,而给予复方高滋斑片后可改善其表达;通过 Western blotting 检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白以及脑组织细胞凋亡相关蛋白,通过蛋白水平验证复方高滋斑片可激活 PI3K/Akt 信号通路抑制脑组织神经元凋亡。

综上所述,复方高滋斑片可改善脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织形态,脑组织细胞凋亡,降低血清中炎症因子及氧化应激,通过受体蛋白酪氨酸激酶结合生物过程和激活 PI3K/Akt 信号通路减少脑缺血再灌注后神经元凋亡发挥对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 杨晓佳,刘立权,程巨萍.白芍总苷保护脑缺血再灌注损伤大鼠的作用研究[J].浙江中医杂志,2025,60(8):659-663.

[2] 黄丽丹,沈倩妮,李亚男,等.FAM134B 介导的内质网自噬对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响及其机制[J].山东医药,2024,64(29):20-24.

[3] 白永怪.L-精氨酸影响动脉内皮功能的荟萃分析及脑卒中的遗传易感性研究[D].北京:中国协和医科大学,2009.

[4] 张译丹,孙兴华,曲阳,等.中药有效成分调控 PI3K/Akt 信号通路治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2025,30(6):820-827.

[5] 张硕,崔应麟,周盼盼,等.脑缺血再灌注损伤中内质网应激-自噬的作用及中药调控机制[J].中国组织工程研究,2025,29(20):4325-4332.

[6] 王艳群,耿凤芹,徐淑娜,等.复方高滋斑片辅助治疗老年高血压合并失眠症患者的临床效果[J].中国医学创新,2024,21(13):56-59.

[7] 肖敏,韩正茹,游秋云,等.复方高滋斑片对抑郁大鼠海马 NLRP3 炎症小体的影响[J].中国医院药学杂志,2024,44(18):2115-2121.

[8] 胡甲乙,朱瑶,刘军锋,等.复方高滋斑片对自发性高血压大鼠的降压作用及对 RAAS 调控机制的研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(7):2227-2236.

[9] 邹新爽,石磊,尹海龙,等.复方高滋斑片通过 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核因子- κ B 通路改善抑郁[J].中医杂志,2022,42(6):956-964.

[10] 范琢玉,李雨轩,沈光海,等.局灶缺血性脑卒中动物模型的研究进展[J].吉林医药学院学报,2022,43(3):226-228.

[11] Chernysheva G A, Smol'yakova V I, Osipenko A N, et al. Evaluation of survival and neurological deficit in rats in the new model of global transient cerebral ischemia[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 158(2): 197-199.

[12] 张振祥,高守媛,栗延伟,等.HMGB1-TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路在腺苷预处理保护脑缺血再灌注损伤中的作用[J].中国免疫学杂志,2024,40(3):491-496.

[13] 郭海云.星形胶质细胞糖噬在脑缺血再灌注损伤中的作用及机制研究[D].西安:中国人民解放军空军军医大学,2025.

[14] 王荣,尚朝利,杨珍珍,等.刺五加现代药理学及开发利用情况研究进展[J].中国野生植物资源,2025,44(2):90-95.

[15] Ruan C L, Guo H T, Gao J Q, et al. Neuroprotective effects of metformin on cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating PI3K/Akt pathway[J]. Brain Behav, 2021, 11(10): e2335.

[16] 逢英桥.茯苓酸通过 PI₃K/Akt 信号通路对脑缺血再灌注损伤的保护作用[D].青岛:青岛大学,2022.

[17] Yu Y, Wu X Q, Pu J N, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 1187-1194.

[18] Chen Y, Lei L, Wang K, et al. Huangqi-Honghua combination prevents cerebral infarction with qi deficiency and blood stasis syndrome in rats by the autophagy pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 9496926.

[19] 石娅,刘文,刘兴德,等.基于 PI3K/Akt 信号通路探究当归补血汤干预大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的作用机制[J].中草药,2022,53(16):5052-5065.

[20] 贡磊磊,许海玉,王岚,等.基于 RNA-Seq 高通量测序分析脑心通胶囊抑制炎症反应转录组学特征[J].中国中药杂志,2020,45(1):149-156.

[21] 马克龙,韩志君,孙娟,等.基于高通量转录组测序研究三黄汤缓解白念珠菌定植下 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J].中国中药杂志,2021,46(15):3915-3925.

[22] 彭龙,张立平.16S rRNA 高通量测序研究柴芪汤对代谢综合征大鼠肠道菌群的影响[J].世界中医药,2021,16(5):758-764.

[23] 高志勇,谢恒星,李吉锋,等.RNA-seq 及其应用[J].生命的化学,2018,38(1):71-77.

【责任编辑 金玉洁】