

## 舒脑欣滴丸对大鼠脑卒中急性后期细胞凋亡及应激平衡的影响

张蕊, 郝春华, 孙双勇, 陈芙蓉, 赵专友, 王维亭\*, 汤立达\*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

**摘要:** 目的 以细胞凋亡和应激平衡损伤为切入点探讨舒脑欣滴丸(SNX)对脑缺血损伤大鼠急性后期的保护作用。方法 采用大鼠大脑中动脉电凝法制备脑卒中模型,造模成功大鼠随机分为5组,模型组、脑心通胶囊0.5 g/kg组和SNX 13、26、52 mg/kg组以及,每组10只,另设假手术组10只。脑缺血后48 h开始ig给药,每天1次,连续2 d。试剂盒法检测血清血管活性物质内皮素(ET)、一氧化氮(NO)活性,测定血清氧化应激因子超氧化物歧化酶(SOD)/丙二醛(MDA)水平;TUNEL染色测定细胞凋亡率,免疫组化法测定细胞凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax比值、以及Caspase-3蛋白表达变化。结果 与模型组比较,SNX能一定程度减少细胞凋亡率,且可不同程度降低凋亡蛋白平衡Bax/Bcl-2比值;显著降低Caspase-3促凋亡蛋白因子的表达( $P < 0.01$ 、 $0.001$ );可调节氧化/抗氧化平衡,显著提高SOD/MDA值( $P < 0.05$ ),并显著增加血管活性物质NO/ET比值( $P < 0.01$ )。结论 SNX对大鼠脑缺血急性后期损伤引起的细胞凋亡及应激平衡失衡具有一定的改善作用。

**关键词:** 舒脑欣滴丸;脑缺血急性后期;氧化应激平衡;细胞凋亡;血管活性物质应激平衡

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)05-0835-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.05.007

## Effect of Shunaixin Dripping Pills on cell-apoptosis and stress balance in acute late-stage of cerebral ischemia injury in rats

ZHANG Rui, HAO Chunhua, SUN Shuangyong, CHEN Furong, ZHAO Zhuanyou, WANG Weiting, TANG Lida

Tianjin Medicine Research Institute of New Drug Evaluation CO., LTD, Tianjin 300310, China

**Abstract:** **Objective** With apoptosis and stress balance injury as the entry point, to study the therapeutic effect of Shunaixin Dropping Pill (SNX) on acute late stage of cerebral ischemic injury in rats. **Methods** The middle cerebral artery injury model was established by the electrocoagulation to prepare acute late-stage model of stroke in rats. Rats were equally divided into five groups (i.e. model group, three SNX groups with 13, 26, and 52 mg/kg, positive control groups with NaoXinTong Capsule with 10 rats in each group. In addition, 10 rats without electrocoagulation were arranged as Sham group. The drug was administered on the 2nd day after cerebral ischemia, Each group was treated with corresponding drugs once daily for 2d. Serum NO and ET were measured by chemical method and enzyme linked immunosorbent assays. The oxidative stress cytokines involving serum SOD, MDA were measured by chemical methods. Cell apoptosis rates was determined by TUNEL staining, and the expression of apoptosis-related protein Bcl-2/Bax and the expression of Caspase-3 were observed by immunohistochemistry. **Results** Compared with model group, the cell apoptosis rates and the the expression of apoptosis-related protein Bax/Bcl-2 and Caspase-3 were decreased in different degree treated with SNX. The oxidation/anti-oxidation balance can be adjusted by SNX administration, serum SOD/MDA and NO/ET were increased than the model group ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). **Conclusion** SNX showed therapeutic benefits on rats in acute late-stage of cerebral ischemia injury. The potential mechanism of may be related to balance status of oxidation and anti-oxidation, Vasoactive substance, Bax/Bcl-2 ratio, and alleviating the expression Caspase-3, ultimately inhibit cell apoptosis.

**Key words:** Shunaixin dripping pills; acute late stage of cerebral ischemia; oxidative stress balance; apoptosis; vasoactive substance stress

收稿日期: 2019-11-05

基金项目: 天津市第二批特支计划青年拔尖人才基金(TJZJHQNBJRC-2-7)

第一作者: 张蕊(1985—),女,助理研究员,研究方向心脑血管药理学。Tel: (022)84845240 E-mail: zhangr8@tjipr.com

\*通信作者: 王维亭(1974—),男,研究员,主要从事心脑血管药理学研究。Tel: (022)84845240 E-mail: wangwt@tjipr.com

汤立达(1963—),男,研究员,主要从事新药药理、新靶点药物分子设计及新药发现研究。Tel: (022)23006908

E-mail: tangld@tjipr.com

急性缺血性脑卒中占脑卒中的60%~80%,是最常见的脑卒中类型<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中是全球范围内3大死亡疾病之一,发病率极高,是导致中老年人致残致死的主要原因<sup>[2-3]</sup>。近几年随着我国老龄化社会进程的加快,脑卒中的发病率逐年上升,严重威胁着中老年人的生命安全。

急性脑缺血损伤所致的迟发型神经元死亡是卒中后神经功能丧失的主要原因<sup>[4]</sup>。急性后期神经细胞的延迟性死亡的发生发展是一个多环节、多因素、多途径损伤复杂的病理生理过程。其中包括氧自由基损伤、兴奋性氨基酸的毒性作用、炎症反应和细胞凋亡等多种因素<sup>[5]</sup>。因此挽救急性后期迟发型神经元死亡对卒中后期神经功能恢复具有重要的治疗意义。

中药具有多组分、多靶点的治疗优势和防治结合的临床意义。舒脑欣滴丸(Shunaoxin dropping pill, SNX)是根据古方《太平惠民合剂局方》所载的益智方剂“芎归汤”研制的新药,主要由川芎和当归两味药组成。2005年经天津第六中药厂推广上市(批准文号Z20050041)<sup>[6]</sup>,因其具有理气活血,化瘀止痛的功效,临床可用于治疗多种心脑血管和神经系统疾病<sup>[7]</sup>。

以往临床研究已经证实了SNX对缺血性卒中患者具有良好的治疗效果,能够有效的改善脑梗死病人神经体征与生活质量<sup>[8-12]</sup>。目前关于SNX治疗急性缺血性卒中的研究多见于临床疗效观察方面,在实验动物方面的研究报道比较匮乏。基于此,本实验通过观察大鼠脑缺血损伤急性后期血浆中氧化应激平衡、血管活性物质平衡以及脑组织神经细胞凋亡的变化,探讨SNX对脑缺血损伤的保护作用及机制,为SNX抗脑卒中的临床应用提供理论和实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SD大鼠,SPF级,雄性,体质量243~295 g,由斯贝福(北京)技术有限公司提供,动物生产许可证号SCXK(京)2016-0002。

### 1.2 主要药品、试剂

SNX,天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂提供,批号678045,为浅褐色至棕褐色滴丸,临用时以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC)配制所需浓度药液,供动物给药用,文中剂量以滴丸质量计。阳性对照药:脑心通胶囊(简称脑心通),陕西步长制药有限公司生产,批号170748,每粒胶囊装有棕

褐色药粉0.4 g,临用时将胶囊内药粉倒出,以0.5%CMC配制所需浓度药液,供动物给药用,文中剂量以药粉质量计。

大鼠内皮素(ET-1)试剂盒,Bio-Swamp产品,批号201812;一氧化氮(NO)测试盒,批号20181224,总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒,批号20181226,丙二醛(MDA)测试盒,批号20190102,均购自南京建成生物工程研究所;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色试剂盒,购自Roche Diagnostics GmbH;Bax、Bcl-2、以及Caspase-3一抗均为abcam公司产品,货号分别为ab59348、ab32503和ab13847;山羊抗兔IgG H&L (HRP)二抗也为abcam公司产品,货号ab205718;DAB显色试剂盒,北京中杉金桥生物科技有限公司产品,货号ZLI-9017。

### 1.3 主要仪器

Stong90微电动钻,韩国Saeshin Precision Ind公司产品;Rayto RT-6100全自动酶标仪,雷杜生命科学股份有限公司产品;B320A型医用低速离心机,白洋离心机厂产品;TS100显微镜成像系统,日本Nikon公司产品。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

按照Tamura等<sup>[13]</sup>前期建立的实验方法进行改进制备模型。大鼠ip 3%戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉,于右侧外耳道与眼眦连线中点切开皮肤,逐层分离肌肉,暴露颞弓和颞骨鳞部,较断颞弓,在手术显微镜下,于颞弓和颞骨鳞部前连接处的前下方约2 mm处,用牙科钻开直径为2 mm的小颅窗,暴露大脑中动脉。于嗅束至大脑下静脉的大脑中动脉处,电凝阻断,制备脑卒中模型。逐层缝合肌层、皮肤,回笼饲养。假手术组除不电凝大脑中动脉外,其余操作与模型动物相同。im青霉素 $1.6 \times 10^5$  U/只,1次/d,连续4 d。大鼠脑缺血后第2天,根据表1评分标准,采用盲法对动物进行神经功能缺陷评分测定,用于评价神经功能损害程度,总分为16分,分数越高,表明动物神经功能损害程度越严重。评分分值 $\geq 8$ 分者为造模成功,不满足上述缺血的动物表明造模不成功,从实验中剔除。

### 2.2 分组与给药

选取造模成功大鼠50只,随机分为5组:模型组、脑心通(阳性药,0.5 g/kg,相当于临床等效剂量)组和SNX低、中、高剂量(13、26、52 mg/kg,52 mg/kg为临床等效剂量)组,每组10只。手术后48 h时开

表1 大鼠神经功能损害程度评分标准

Table 1 Scoring standard of neurological damage in rats

| 项目   | 表现                                     | 评分 |
|------|----------------------------------------|----|
| 运动测试 | 1)提起鼠尾                                 |    |
|      | 前肢弯曲                                   | 1  |
|      | 后肢弯曲                                   | 1  |
|      | 30 s内抬头>10°(与垂直轴)                      | 1  |
|      | 2)将鼠置于地板行走(正常=0;最高值=3)                 |    |
|      | 正常行走                                   | 0  |
|      | 不能直行                                   | 1  |
|      | 向偏瘫侧转圈                                 | 2  |
|      | 倒向偏瘫侧                                  | 3  |
| 横杆平衡 | 能平衡,并且姿势稳定                             | 0  |
| 测试   | 抓住横杆侧面                                 | 1  |
|      | 能抱住横杆,但有一只肢体从横杆上脱落                     | 2  |
|      | 能抱住横杆,但有两只肢体从横杆上脱落,或在横杆上打转,且持续时间超过60 s | 3  |
|      | 试图在横杆上平衡(>40s),但脱落                     | 4  |
|      | 试图在横杆上平衡(>20s),但脱落                     | 5  |
|      | 脱落,不能平衡,或不想挣扎悬挂在横杆上                    | 6  |
| 反射缺失 | 耳廓反射(接触到耳道口时摇头)                        | 1  |
|      | 或异常 角膜反射(用棉花轻触角膜时眨眼)                   | 1  |
| 运动   | 惊恐反射(撕裂纸张的短暂声响产生运动反应)                  | 1  |
|      | 痫发作,肌阵挛,肌张力障碍                          | 1  |
| 总计   |                                        | 16 |

始ig SNX进行药物治疗,1次/d,连续2 d,给药体积均为10 mL/kg,假手术组和模型组均ig给予0.5%CMC。

## 2.3 检测指标

**2.3.1 血管活性物质测定** 实验结束后,大鼠经腹主动脉取血,4℃、3 000 r/min离心10 min,取上层血清,ELISA法测定ET,化学法测定NO。

**2.3.2 氧化应激因子测定** 实验结束后,大鼠经腹主动脉取血,4℃、3 000 r/min离心10 min,取上层血清,化学法测定MDA、SOD。

**2.3.3 组织病理学观察** 实验结束后,每组取4只

大鼠大脑组织,用生理盐水冲洗后,固定于10%甲醛中。石蜡包埋,制作石蜡切片,每只大鼠脑于视交叉后沿冠状面切片,厚度5 μm。石蜡切片后采用免疫组化法,参照文献<sup>[14]</sup>进行TUNEL细胞凋亡核染色,封片后,使用光学显微镜观察并分析,计算神经细胞凋亡率。对各组的脑组织切片分别用兔抗Bcl-2多克隆抗体、兔抗Bax单克隆抗体以及兔抗Caspase-3多克隆抗体作为一抗,二抗均为生物素化山羊抗兔IgG,阳性对照采用PBS代替一抗,DAB染色。判断标准:以神经元胞浆出现棕黄色颗粒或胞质、胞核均呈弥漫性棕黄色颗粒为阳性。在10×20倍镜下,每张切片随机采集梗死侧皮层运动区(中央前回3~5层细胞区)部位,分别选取视野计数完整的神经细胞数,同一光强度下,分别计数Bcl-2、Bax以及Caspase-3蛋白的阳性细胞数,取平均值并计算凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax比值。

## 2.4 统计方法

采用SPSS 21软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较组间差异性,两组间比较采用LSD法。

## 3 结果

### 3.1 对脑组织细胞凋亡的影响

TUNEL染色阳性产物为细胞核中有棕黄色颗粒,各组脑组织凋亡率比较,光学显微镜下观察,正常脑组织皮层神经元细胞核显蓝色,凋亡细胞核呈深浅不一的棕褐色。假手术组少见阳性凋亡细胞,模型组凋亡细胞较多。SNX 13、26、52 mg/kg对细胞凋亡有一定减轻趋势作用,可使模型对照增加的凋亡率分别减少12.4%、46.1%、43.8%。SNX临床等效剂量减轻细胞凋亡程度与临床等效剂量的脑心通相当(43.8% vs 43.8%)。结果见图1和图2。

Caspase-3染色阳性产物为细胞浆中呈弥漫性棕黄色颗粒,与假手术组比较,模型组中梗死侧皮层区Caspase-3阳性染色显著升高;SNX 3个剂量给药组与模型组比较,Caspase-3阳性染色明显下降,其中26、52 mg/kg组差异显著( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ),结果见图2和图3。

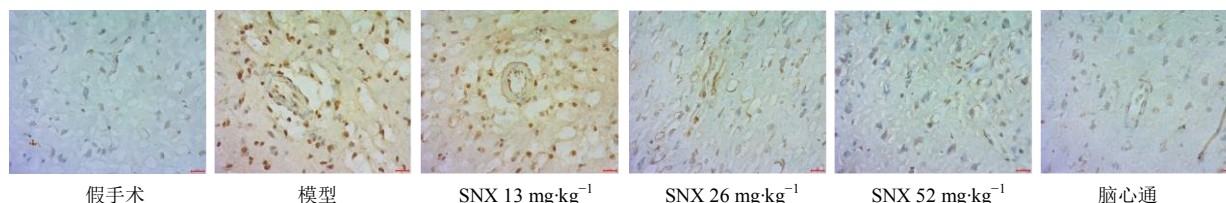
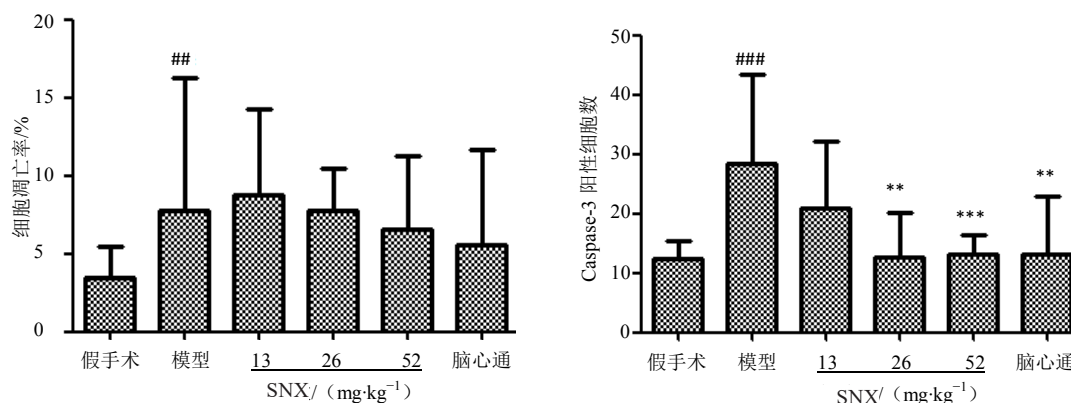


图1 SNX对脑卒中急性后期TUNEL染色细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of SNX on TUNEL staining cells in acute stage of stroke in rats





与假手术组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group

图2 SNX对脑卒中急性后期细胞凋亡率与Caspase-3蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of SNX on cell apoptosis and Caspase-3 protein in acute stage of stroke in rats

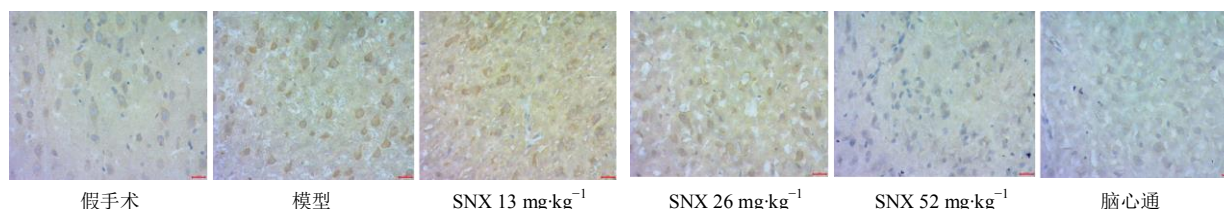


图3 SNX对脑卒中急性后期细胞凋亡蛋白Caspase-3表达的影响

Fig. 3 Effect of SNX on expression of apoptosis protein Caspase-3 in acute stage of stroke in rats

### 3.2 对氧化应激因子平衡、血管活性物质平衡以及凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax比值的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中SOD含量显著降低,而MDA含量明显升高,大鼠氧化应激平衡失衡,表现为SOD/MDA比值显著下降( $P < 0.05$ );SNX 26、52 mg/kg对氧化应激平衡有一定调节作用,与模型组比较,SOD/MDA比值显著升高( $P < 0.05$ )。结果见表2。

与假手术组比较,模型组大鼠血清中NO含量显著降低,而ET含量明显升高,大鼠血管活性物质平衡失衡,表现为NO/ET比值显著下降( $P < 0.001$ );SNX 52 mg/kg对血管活性物质平衡有一定

调节作用,与模型组比较,NO/ET比值显著升高( $P < 0.01$ )。结果见表2。

与假手术组比较,模型组中梗死侧皮层区Bax/Bcl-2比值明显升高;SNX 3个剂量给药组可不同程度的降低Bax/Bcl-2比值,结果见表2。

### 4 讨论

脑卒中患者急性期在临床上主要是指发病后6~72 h内,这个阶段主要以改善微循环及营养代谢的脑保护剂进行治疗<sup>[15-16]</sup>。缺血性脑卒中急性期的治疗对卒中患者预后以及功能恢复有着重要而直接的影响,历来受到医学界的普遍关注<sup>[17]</sup>。

中医认为急性缺血性脑卒中多责之于气血失

表2 SNX对脑卒中急性后期应激平衡及Bax/Bcl-2比值的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of SNX on stress balance and Bax/Bcl-2 in acute stage of stroke in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | SOD/MDA                | NO/ET                     | Bax/Bcl-2 |
|-----|---------------------------|------------------------|---------------------------|-----------|
| 假手术 | —                         | 64.4±20.0              | 19.62±6.17                | 2.07±1.79 |
| 模型  | —                         | 40.9±11.7 <sup>#</sup> | 8.40±5.95 <sup>###</sup>  | 3.56±2.10 |
| SNX | 13                        | 37.9±11.4              | 7.90±3.17                 | 1.08±0.53 |
|     | 26                        | 61.8±32.9 <sup>*</sup> | 8.70±5.42                 | 0.72±0.35 |
|     | 52                        | 61.5±20.1 <sup>*</sup> | 14.84±5.67 <sup>**</sup>  | 0.96±0.37 |
| 脑心通 | 500                       | 49.4±14.1              | 15.86±10.37 <sup>**</sup> | 2.33±2.30 |

与假手术组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

调、痰瘀作祟,属于“中风”范畴。SNX由当归和川芎两味药组成,方中川芎辛温升散,为血中气药,具有行气活血的作用;当归性柔而润,具有补血、祛瘀、止痛的作用;二者配伍互制其短而展其长,气血兼顾,消瘀止痛、理气活血之功效增强<sup>[18]</sup>。

局灶性脑缺血疾病实验动物模型的建立,对于缺血性脑血管病的基础研究和药物治疗具有重要意义。Tamura等<sup>[13]</sup>和Bederson等<sup>[19]</sup>建立的颞下部开颅,闭塞近端大脑中动脉,导致大脑皮质和尾壳核梗死,被公认为最接近人类脑卒中的标准动物模型。

本研究参比脑卒中的临床分期状况及病理演变过程,采用经典的开颅电凝法建立大鼠大脑中动脉缺血损伤模型,在脑梗死急性后期48 h时开始ig SNX进行药物治疗,每天1次,连续给药2 d后,观察SNX对脑缺血急性后期血浆中血管活性物质平衡、氧化应激平衡以及脑组织神经细胞凋亡的变化,探讨SNX对脑缺血损伤的保护作用机制。

ET和NO是内皮细胞分泌的血管活性因子,ET-1是最强烈的血管收缩物质,对脑动脉作用较一般器官的血管作用强<sup>[20]</sup>。急性脑缺血可造成组织缺血缺氧,脑组织中ET水平会迅速升高,引起血管的强烈收缩,使脑血管痉挛,脑血流量急剧下降而加重脑组织的缺血缺氧;另一方面神经细胞内ET浓度的增加,会导致细胞内钙超载以及刺激释放兴奋性氨基酸,直接损伤神经元及胶质细胞,最终导致脑血管功能紊乱<sup>[21]</sup>。文献报道显示,临床病人脑组织损害越严重,血浆ET含量越高,二者有呈正相关的趋势<sup>[22]</sup>。NO是由左旋精氨酸末端胍基的氮原子在NOS催化下转化而来,可抑制ET的表达与释放,对血管有较强的舒张作用<sup>[23]</sup>。正常情况下,ET、NO处在一种动态平衡状态,脑梗死可造成组织缺血缺氧,一些血管活性物质和细胞因子,如儿茶酚胺、血管紧张素II等,能够通过促进ET的基因表达,使ET的释放和合成增加,而这种增加不能有效刺激NO的释放,NO分泌减少,这些都会导致NO/ET血管活性物质平衡被破坏,最终加重梗塞脑组织的缺血缺氧与神经元的损伤。由此可见。ET浓度增高,NO浓度减少,指示脑组织损伤严重;本研究结果显示,与假手术组比较,模型大鼠NO/ET比值显著降低,SNX 52 mg/kg可显著提高NO/ET比值,对血管活性物质平衡有一定调节作用。

已有研究证实,自由基连锁反应是脑缺血的核心病理环节,可引发迟发性神经功能损害。脑缺血

后脑组织中活性氧(ROS)的形成会增强<sup>[24]</sup>。SOD能够清除氧阴离子自由基,保护细胞,间接反映了机体清除氧自由基的能力;MDA是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸形成脂质过氧反应的代谢产物,其量的变化能间接地反映细胞损伤的程度,通过测定MDA的含量可估计体内氧自由基的含量;MDA的测定常常与SOD的测定相互配合。本研究选择这两个指标反映体内自由基的氧化和抗自由基氧化的水平。实验研究发现,脑缺血梗死模型大鼠血清SOD显著下降,MDA明显升高,模型组大鼠SOD/MDA比值明显下降,氧化应激平衡失衡。SNX 26、52 mg/kg能够阻止SOD的活性的下降,使清除体内自由基的能力相对明显提高,降低MDA的水平,可显著提高SOD/MDA比值,对氧化应激平衡有一定的调节作用。SNX临床等效剂量增加SOD/MDA比值程度较的脑心通稍优。

脑缺血发生后,缺血区脑组织在短时间内遭受不可逆损伤,并发展为梗死灶。急性后期缺血半暗带神经细胞主要发生迟发性神经元凋亡<sup>[25]</sup>,这是导致运动功能障碍和神经功能损害的关键因素。抑制迟发性神经细胞的凋亡,对脑缺血后神经功能恢复和预后起到很好的改善作用<sup>[26]</sup>。脑缺血后细胞凋亡受许多基因编码调控,Bcl-2家族是与细胞凋亡关系最密切的凋亡调控基因,其中Bcl-2、Bax基因是目前研究较明确的一对在功能上相互对立的凋亡调控基因。Bcl-2通过阻断细胞凋亡而促进细胞存活,而Bax与Bcl-2功能相反,诱导细胞凋亡。Bcl-2和Bax的表达强度决定细胞命运<sup>[27-28]</sup>。抗凋亡因子(如Bcl-2)和促凋亡因子(如Bax)成员之间的失衡可引发神经元损伤。Caspase-3是凋亡中必不可少的启动子和执行者<sup>[29]</sup>。据报道,Bcl-2作为线粒体膜相关蛋白,通过抑制Bax表达,抑制线粒体释放的细胞色素C,激活Caspase执行子procaspase-3,发挥抗凋亡作用<sup>[30]</sup>。Bcl-2/Bax表达比值增高时促进细胞存活,降低时则促进细胞死亡。

与之前的一些研究报道一致<sup>[31-32]</sup>,促凋亡因子Bax和Caspase-3在大鼠缺血皮质组的表达明显上调,而假手术组中Bcl-2、Bax和Caspase-3的免疫阳性反应较弱。本研究结果显示,模型组大鼠缺血侧脑皮层可见大量凋亡神经细胞,同时该区Bax表达明显增加,而Bcl-2表达较少,表明脑缺血损伤后存在神经元凋亡,同时启动了内源性凋亡调控系统,而Bax的表达上调改变了凋亡抑制基因和促凋亡基因之间的平衡,并可能增加caspase-3的活性,诱导

或加速缺血侧神经元凋亡。SNX处理组中Bax/Bcl-2比值表达有一定程度降低,且呈剂量相关性,Caspase-3表达也显著下降。结果提示,SNX可能抑制线粒体相关Caspase-3凋亡信号通路。后者可能是SNX神经保护的作用机制之一。

SNX为复方制剂,其主要活性成分为阿魏酸和藁本内酯。已有研究表明,口服SNX后,阿魏酸和藁本内酯都可快速透过血脑屏障,被迅速吸收分布于脑组织中<sup>[33]</sup>;并且阿魏酸和藁本内酯对脑缺血损伤均显示了良好的神经保护作用<sup>[34-38]</sup>。研究结果表明,SNX对大鼠脑缺血损伤急性后期氧化应激、血管物质平衡失衡以及细胞凋亡均有明显的改善作用,这可能是其多组分相互作用的结果,但具体的作用机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 马本仲. 川芎嗪与血塞通联合治疗缺血性脑卒中临床疗效分析[J]. 中国医学创新, 2013, 10(9): 32-33.
- [2] Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2016, 133(4): 38-360.
- [3] Stanford S N, Sabra A, D'Silva L, et al. The changes in clot microstructure in patients with ischaemic stroke and the effects of therapeutic intervention: a prospective observational study [J]. BMC Neurol, 2015, 15: 35.
- [4] 谢惠芳. 迟发性神经元死亡的研究进展 [J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 1996, 4(6): 328-332.
- [5] 陈修, 陈维洲, 曾贵云. «心血管药理学»第二版简介 [J]. 医学研究通讯, 2000, 29(12): 18, 40.
- [6] 阎妍. 芎归滴丸药理作用和临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 311-314.
- [7] 周鸿, 霍利琴, 张静泽, 等. UPLC-Q-TOF-MS法分析舒脑欣滴丸的入血及入脑成分 [J]. 中成药, 2016, 38(12): 2720-2722.
- [8] 张军平, 徐媛媛, 徐士欣, 等. 舒脑欣滴丸治疗急性缺血性中风73例临床观察 [J]. 中医杂志, 2013, 54(9): 758-761.
- [9] 闫晓洁, 吉媛红, 马玉萍, 等. 舒脑欣滴丸辅助治疗缺血性脑卒中康复患者的临床观察 [J]. 中国药房, 2015, 26(12): 1629-1631.
- [10] 康建策, 钱海燕, 蔡文. 舒脑欣滴丸治疗椎-基底动脉供血不足的临床观察 [J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2008, 15(3): 15-16.
- [11] 陈静, 林彦琛, 单娜娜, 等. SNX对脑梗死病人肢体功能恢复的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(9): 1027-1029.
- [12] 李立凤, 刘津翠, 熊湘明, 等. 舒脑欣滴丸治疗血虚瘀血型慢性脑供血不足的临床观察 [J]. 天津中医药, 2015, 32(4): 201-204.
- [13] Tamura A, Graham D I, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1(1): 53-60.
- [14] Zhang G, Lei F, Zhou Q Z, et al. Combined application of Rho-ROCK II and GSK-3 $\beta$  inhibitors exerts an improved protective effect on axonal regeneration in rats with spinal cord injury [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 5180-5188.
- [15] 钱兵. 脑梗塞分期论治 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2006, 8(5): 31.
- [16] 郝春华, 李亚丽, 孙双勇, 等. 缺血性脑中风急性期溶栓药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(23): 2687-2691.
- [17] 张根明, 孙塑伦, 高颖. 扶正护脑法在缺血性中风急性期治疗中的应用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(6): 8-10.
- [18] 唐于平, 李伟霞, 郭建明, 等. 当归-川芎药对及其组成药味对三种血虚模型补血作用的比较研究 [A]//全国第3届临床中药学学术研讨会论文集 [C]. 南京, 2010: 217-225.
- [19] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [20] Bogaert L, Scheller D, Moonen J, et al. Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2000, 887(2): 266-275.
- [21] Barone F C, Globus M Y, Price W J, et al. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(2): 337-342.
- [22] 江京宁, 王文, 陈若霞. ET、NO、ET/NO在脑血管疾病中的观察 [J]. 放射免疫学杂志, 2000, 13(2): 92-93.
- [23] Chan P H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(1): 2-14.
- [24] Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2009, 10(7): 644-654.
- [25] Liu G Y, Wang T, Wang T, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats [J]. Biomed Rep, 2013, 1(6): 861-867.
- [26] Isenmann S, Stoll G, Schroeter M, et al. Differential

- regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat [J]. Brain Pathol, 1998, 8(1): 49-62; discussion 62-3.
- [27] Haddad J J. The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK(ERK): discordant proteomic effect of MAPK (p38) [J]. Protein Pept Lett, 2007, 14(4): 361-371.
- [28] Laulier C, Lopez B S. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members [J]. Mutat Res, 2012, 751(2): 247-257.
- [29] Li W Y, Yang Y, Hu Z Y, et al. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. Front Neuroanat, 2015, 9: 48.
- [30] Prakasa Babu P, Yoshida Y, Su M, et al. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bax and cytochrome c following focal cerebral ischemia and effect of hypothermia in rat [J]. Neurosci Lett, 2000, 291(3): 196-200.
- [31] Ay I, Sugimori H, Finklestein S P. Intravenous basic fibroblast growth factor (BFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 87(1): 71-80.
- [32] Zhang Z, Sobel R A, Cheng D, et al. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 95 (1/2): 75-85.
- [33] Wu K, Wang Z Z, Liu D, et al. Pharmacokinetics, brain distribution, release and blood-brain barrier transport of Shunaoxin pills [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3): 1133-1140.
- [34] Kuang X, Yao Y, Du J R, et al. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice [J]. Brain Res, 2006, 1102(1): 145-153.
- [35] Zhu L. Ligustilide alleviates learning dysfunction and brain damage in rats of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Alzheimers Dementia, 2011, 7(4): S504.
- [36] 王成牛, 冯展波, 彭彬, 等. 藁本内酯对低灌注大鼠大脑皮质的神经保护作用 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(2): 251-255.
- [37] Cheng C Y, Kao S T, Lee Y. Ferulic acid ameliorates cerebral infarction by activating Akt/mTOR/4E-BP1/Bcl-2 anti-apoptotic signaling in the penumbral cortex following permanent cerebral ischemia in rats [J]. Mol Med Rep, 2018, 19(2): 792-804.
- [38] Ren Z K, Zhang R P, Li Y Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5): 1444-1456.