

5种活血化瘀类中药注射液对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用研究

王志强*, 李 斌, 穆珊珊, 张秀清, 王 洋, 庄 伟, 王正杰

唐山市人民医院, 河北 唐山 063001

摘要: 目的 研究5种活血化瘀类中药注射剂对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用。方法 制备大鼠暂时性左侧中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型,造模成功后实验动物随机分成7组,分别为模型组、注射用丹参多酚酸(11.71 mg/kg)组、注射用丹参多酚酸盐(17.86 mg/kg)组、银杏内酯注射液(0.91 mL/kg)组、银杏二萜内酯葡胺注射液(0.45 mL/kg)组、注射用血塞通(冻干)(18.02 mg/kg)组和丁苯酞氯化钠注射液(阳性药, 9 mL/kg)组。假手术组同法造模,不栓塞大脑中动脉。各组大鼠尾iv给药14 d后,评估神经功能评分;干湿比质量法测定脑含水量;TTC染色法评价脑梗死面积;伊文思蓝法测定血脑屏障通透性;酶联免疫吸附试剂盒检测组织匀浆中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;生化分析法测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性;HE染色法检测组织病理学变化;末端标记法(TUNEL)观察神经细胞及神经元凋亡情况。结果 给药后,与模型组比较,各给药组神经功能评分均降低,其中注射用丹参多酚酸组和注射用丹参多酚酸盐组差异显著($P < 0.01$);各给药组脑含水量均不同程度的降低,除注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组外,其他各给药组均差异显著($P < 0.01$);各给药组脑梗死面积均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);各给药组给药后伊文思蓝渗出量均有不同程度的降低,其中注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组差异显著($P < 0.05, 0.01$);各给药组IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05, 0.01$);各给药组均能不同程度抑制SOD的降低,其中注射用丹参多酚酸和注射用银杏内酯注射液组差异有统计学意义($P < 0.01$);各给药组均能不同程度抑制MDA的升高,其中注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐和银杏内酯注射液组差异均有统计学意义($P < 0.01$);5种中药注射剂均能在不同程度抑制脑组织神经细胞和神经元病理形态的改变以及神经细胞的凋亡。结论 5种活血化瘀类中药注射剂对MCAO大鼠的损伤均具有较好的保护作用,但其改善各指标的程度不同。

关键词: 中药注射剂;注射用丹参多酚酸;注射用丹参多酚酸盐;银杏内酯注射液;银杏二萜内酯葡胺注射液;注射用血塞通(冻干);局灶性脑缺血;神经功能评分;脑梗死面积;生化指标;病理改变

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2356-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.009

Protective effect of five traditional Chinese medicine injections for activating blood and removing blood stasis on focal cerebral ischemia injury in rats

WANG Zhiqiang, LI Bin, MU Shanshan, ZHANG Xiuqing, WANG Yang, ZHUANG Wei, WANG Zhengjie

Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, China

Abstract: Objective To study the protective effect of five traditional Chinese medicine injections for promoting blood circulation and removing blood stasis on focal cerebral ischemic injury in rats. **Method** Preparation the left side of the artery embolism in rats (Middle cerebral artery occlusion, MCAO). After successful modeling, the experimental animals were randomly divided into eight groups: model group, Salvianolic Acids for Injection (11.71 mg/kg) group, Salvianolate for Injection (17.86 mg/kg) group, Ginkgolide Injection (0.91 mL/kg) group, Ginkgo Diterpene Lactone Meglumine Injection (0.45 mL/kg) group, Xuesetong for Injection (freeze-dried, 18.02 mg/kg) group, and Butylphthalide Sodium Chloride for Injection (positive drug, 9 mL/kg) group. After 14 days of caudal vein administration, neurological function score was evaluated in each group. The moisture content of brain was determined by dry and wet specific gravity method. The area of cerebral infarction was evaluated by TTC staining. The blood-brain barrier permeability was determined by Evensland method. The levels of IL-6, IL-1, IFN- and TNF- α in tissue homogenizer were detected by ELISA kit. The activity of MDA and SOD was measured by biochemical analysis. HE staining was used to detect

收稿日期: 2021-08-13

*通信作者: 王志强,男,主管药师。E-mail:447021337@qq.com

histopathological changes. Apoptosis of neuronal cells and neurons was observed by Tunel. **Results** After administration, compared with the model group, the neurological function scores of each administration group decreased, and there was significant difference between Salvianolic Acids for Injection and Salvianolate for injection group ($P < 0.01$). Except Xuesetong for Injection (freeze-dried) group and Butylphthalide Sodium Chloride for Injection group, the brain water content of each treatment group decreased significantly ($P < 0.01$). The area of cerebral infarction in each treatment group decreased significantly ($P < 0.01$). Evans blue exudation decreased in different degrees in each treatment group, and there were significant differences in Salvianolic Acids for Injection group, Salvianolate for Injection group, Xuesetong for Injection (freeze-dried) group and Butylphthalide Sodium Chloride for Injection group ($P < 0.05, 0.01$). The contents of IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in each administration group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Each administration group could inhibit the decrease of SOD in varying degrees, and there was significant difference between Salvianolic Acids for Injection group and Ginkgolide Injection group ($P < 0.01$). Each administration group could inhibit the increase of MDA in varying degrees, and there were significant differences among Salvianolic Acids for Injection group, Salvianolate for Injection group and Ginkgolide Injection group ($P < 0.01$). The five traditional Chinese medicine injections can inhibit the pathological changes of nerve cells and neurons and the apoptosis of nerve cells in brain tissue to varying degrees. **Conclusion** Five kinds traditional Chinese medicine injection of promoting blood circulation and removing blood stasis have good protective effect on the injury of MCAO rats. However, the degree of improvement of each index is different.

Key words: traditional Chinese medicine injection; Salvianolic Acids for Injection; Salvianolate for Injection; Ginkgolide Injection; Ginkgo diterpene lactone meglumine injection; Xuesetong for Injection (freeze-dried); focal cerebral ischemia; neurological function score; cerebral infarction area; biochemical indexes; pathological changes

脑梗死, 又称缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke), 是指因脑部血液供应障碍, 缺血、缺氧所导致的局限性脑组织的缺血性坏死或软化^[1]。脑梗死具有发病率高、致残率高、病死率高、复发率高和并发症高等特征, 是临床常见的脑血管疾病之一^[2]。目前, 缺血性脑卒中的治疗主要是以溶栓、降纤、抗凝、抗血小板、扩容、神经保护为主^[3], 其中以活血化瘀为主的中药注射剂因其具有多靶点及多种作用机制的特点, 在脑梗死治疗中具有明显的优势^[4]。

丹参、银杏和三七具有“活血化瘀、通脉活络”的作用, 因此被广泛应用于脑缺血相关疾病的治疗^[5-8]。注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液和注射用血塞通(冻干)是以丹参、银杏和三七入药治疗脑梗死的常见活血化瘀类中药注射剂^[4,9]。本研究通过构建大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型, 探讨几种活血化瘀类中药注射剂对脑缺血的保护作用。

1 材料

1.1 主要仪器

Matrx VME2TM 小动物麻醉机(上海创萌生物科技有限公司); ME104 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; DGG-101-2BS 鼓风干燥箱(天津市天宇实验仪器有限公司); ST 16R 离心机(Thermo Scientific); Infinite M200 酶标仪(瑞士 TECAN); ASP300S 全自动脱水机、EG1150H 包埋机、RM2235 切片机、HI1210 展片机、HI1220 烤片机(LEICA); NIU 显微镜(NIKON)。

1.2 药物及主要试剂

注射用丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司, 每支装 0.13 g, 含丹参多酚酸 100 mg, 批号 20200101); 注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司, 每瓶装 50 mg, 含丹参乙酸镁 40 mg, 批号 18120624); 银杏内酯注射液(成都百裕制药有限公司, 每支装 2 mL, 含萜类内酯 10 mg, 批号 021906101); 银杏二萜内酯葡胺注射液(江苏康缘药业有限公司, 每支装 5 mL, 含银杏二萜内酯 25 mg, 批号 190802); 注射用血塞通(冻干)(哈尔滨珍宝制药有限公司, 每支装 400 mg, 批号 F909001b3); 丁苯酞氯化钠注射液(石药集团恩必普药业有限公司, 100 mL/瓶, 含丁苯酞 25 mg, 批号 6181912009)。

异氟烷(EZVET, 批号 045742); 鼠白细胞介素 -6 (interleukin 6, IL-6) ELISA Kit (批号 U24018709)、鼠白细胞介素 -1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) ELISA Kit (批号 U23018708)、鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA Kit (批号 U25018710)、鼠 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) ELISA Kit (批号 U21018706), 武汉华美生物工程有限公司; TTC Stain Kit (批号 20200623)、0.5% 伊文思蓝染色液(批号 TF2609)、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1 法)(批号 20200603)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)(批号 20200622)、HE 染色试剂盒(批号 20200724), 南京建成科技有限公司; 无水乙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司,

20200522);TUNEL 染色试剂盒(碧云天生物技术公司,批号 011420200717)

1.3 实验动物

340 只雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(250±20)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0006,动物饲养严格按照华北理工大学动物伦理委员会标准(HBLG20200408)执行。

2 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型的制备

SD 大鼠实验前 12 h 禁食,称体质量,按 0.3 mL/kg ip 10% 水合氯醛麻醉,采用暂时性大脑中动脉栓塞(tMCAO)法制备局灶性脑缺血再灌注模型,模型制作方法见参考文献方法^[10]。缺血 45 min 后进行再灌注,再灌注 24 h 后进行第 1 次给药。假手术组同法操作,不栓塞大脑中动脉。

2.2 体质量及神经功能缺损评分

神经功能缺损评分参考 Zea-Longa 法^[11]进行,评分标准见表 1。造模 24 h 即入组前,对每只大鼠进行评分,评分≥1 分判定为造模成功,可进行入组。给药 14 d 后对每组大鼠进行评分,评分后安乐死,取材待用。

表 1 神经功能评分

Table 1 Neurological function rating scale

观察指标	评分
无神经功能缺损症状,肢体功能无明显异常症状	0 分
轻微神经功能缺损,眯眼,提尾时可见病灶对侧前肢不能完全伸直	1 分
中度神经功能缺损,提尾时可见病灶对侧前肢屈曲	2 分
重度神经功能缺损,行走时轻度向偏瘫侧转大圈	3 分
转小圈不能自发行走,或向对侧跌倒,或意识水平下降	4 分

2.3 动物分组及给药

造模成功后实验动物随机分成 8 组,分别为假手术组、模型组、注射用丹参多酚酸组、注射用丹参多酚酸盐组、银杏内酯注射液组、银杏二萜内酯葡胺注射液组、注射用血塞通(冻干)组、丁苯酞氯化钠注射液(阳性药)组,每组 30 只。

假手术组和模型组:不进行药物干预,尾 iv 2 mL/kg 生理盐水,每天 1 次。各给药组均为临床等效剂量,连续给药 14 d。注射用丹参多酚酸(11.71 mg/kg)组:每支装 0.13 g,溶于 22.2 mL 生理盐水,以 2 mL/kg 进行尾 iv 给药,每天 1 次;注射用丹参多酚酸盐(17.86 mg/kg)组:每瓶 50 mg,溶于

5.6 mL 生理盐水,以 2 mL/kg 剂量进行尾 iv 给药,每天 1 次;银杏内酯注射液(0.91 mL/kg)组:每支装 2 mL,用 4.4 mL 生理盐水进行稀释,以 2 mL/kg 剂量进行尾 iv 给药,每天 1 次;银杏二萜内酯葡胺(0.45 mL/kg)组:每支装 5 mL,用 22 mL 生理盐水进行稀释,以 2 mL/kg 剂量进行尾 iv 给药,每天 1 次;注射用血塞通(冻干)(18.02 mg/kg)组:每支装 400 mg,用 44.4 mL 生理盐水进行稀释,以 2 mL/kg 剂量进行尾 iv 给药,每天 1 次;丁苯酞氯化钠注射液:直接取原药液,注射剂量为 9 mL/kg,每天给药 2 次。

2.4 脑含水量检测

每组随机取 6 只大鼠,采用干湿比质量法计算脑组织含水量。实施麻醉后,断头取脑,0.9% 氯化钠溶液洗涤并擦拭干净后称湿质量,110 °C 烘烤 24 h 至恒质量后称干质量。

$$\text{脑含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量}$$

2.5 脑梗死面积的测定

每组随机取 6 只大鼠,打开大鼠的颅骨,取出完整的大脑组织放入-20 °C 冰箱速冻,用于 TTC 染色。用刀片将速冻后的大鼠脑组织放在脑槽中,从额极至枕叶连续冠状切成 5~7 片,每片厚约 2 mm。

将脑片浸入 2% TTC 溶液中染色,37 °C 避光孵育 15 min,边孵育边观察样本颜色变化,至动物组织切片非梗死区呈玫瑰红色,梗死区组织发白即可,吸取已配好的组织冲洗应用液将组织表面多余的染色液冲洗掉,加入 4% 多聚甲醛溶液固定,拍照。用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测量每片脑片的梗死面积,计算每组中每片脑片正反面梗死面积的平均值。

2.6 血脑屏障通透性检测

每组随机取 6 只大鼠,采用 0.5% 伊文思蓝染色液检测 BBB 通透性。iv 伊文思蓝 1 h 后处死大鼠,取目的脑组织。脑组织置于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL PBS,迅速用组织匀浆机将脑组织制成匀浆,1 000×g 离心 15 min。取上清,按上清:丙酮 3:7 比例加入丙酮,室温孵育 24 h。2 000×g 离心 15 min,取上清 100 μL,用分光光度计测 620 nm 处吸光度(A)值。同时测定已知不同梯度的标准伊文思蓝的 A 值,绘制标准曲线。根据标准曲线计算出待测样品的伊文思蓝含量。

2.7 组织匀浆的制备及生化指标检测

各实验组的大鼠给药 14 d 后,断头取脑,将缺血侧半脑称质量,按 1:10 的比例加入生理盐水,在匀浆机上进行冰浴匀浆 5 次,每次 2 min,将匀浆液

在低温高速离心机3 000 r/min离心15 min,取上清,存储于-80℃冰箱,分别用IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 、SOD和MDA试剂盒按照说明书步骤检测相应指标。

2.8 脑组织病理形态学检测

每组随机取6只大鼠,末次神经功能评分后,断头处死大鼠,打开大鼠的颅骨,取出完整的大脑组织置于10%甲醛中固定。常规步骤进行脱水,石蜡切片,HE染色,显微镜下拍照镜检。

2.9 TUNEL细胞凋亡检测

取“2.8”项制备的脑组织石蜡切片,按照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)说明书步骤操作,然后置于显微镜下观察(凋亡细胞为棕色,正常细胞为蓝紫色)。

2.10 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学软件Graphpad prism 8.0进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 神经功能缺损评分

神经功能评分结果显示,给药前,注射用丹参多酚酸组、注射用丹参多酚酸盐组、银杏内酯注射液组、银杏二萜内酯葡胺注射液组、注射用血塞通(冻干)组和丁苯酞氯化钠注射液组与模型组比较差异无统计学意义。给药后,各组神经功能评分均低于模型组,其中注射用丹参多酚酸组和注射用丹参多酚酸盐组与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),且与本组给药前比较神经功能评分显著降低($P < 0.01$),结果见表2。

3.2 脑含水量

脑水肿检测结果显示,与假手术组比较,模型组脑含水量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给

表2 各给药组给药前后神经功能评分比较($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 2 Comparison of neurological function scores before and after treatment in each group ($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	剂量	神经功能评分	
		给药前	给药后
模型	—	2.80 $\pm$ 0.80	2.61 $\pm$ 0.74
注射用丹参多酚酸	11.71 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	2.72 $\pm$ 0.80	2.09 $\pm$ 0.57**
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	2.71 $\pm$ 0.76	1.97 $\pm$ 0.59**
银杏内酯注射液	0.91 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	2.66 $\pm$ 0.84	2.36 $\pm$ 0.65
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	2.67 $\pm$ 0.90	2.35 $\pm$ 0.69
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	2.65 $\pm$ 0.92	2.58 $\pm$ 0.67
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	2.81 $\pm$ 0.86	2.56 $\pm$ 0.72

与模型组比较:** $P < 0.01$;与本组给药前比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group; ** $P < 0.01$ vs same group before treatment

药后各给药组脑含水量均不同程度的降低,除注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组外,其他各给药组均差异显著($P < 0.01$)。结果见表3。

表3 各给药组给药后脑含水量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of brain index and brain water content in each administration group after administration

($\bar{x} \pm s, n=6$)		
组别	剂量	脑含水量/%
假手术	—	0.71 $\pm$ 0.01
模型	—	0.74 $\pm$ 0.01 ^{##}
注射用丹参多酚酸	11.71 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	0.71 $\pm$ 0.01**
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	0.73 $\pm$ 0.01**
银杏内酯注射液	0.91 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	0.72 $\pm$ 0.00**
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	0.72 $\pm$ 0.01**
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg $\cdot$ kg $^{-1}$	0.74 $\pm$ 0.01
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL $\cdot$ kg $^{-1}$	0.73 $\pm$ 0.01

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

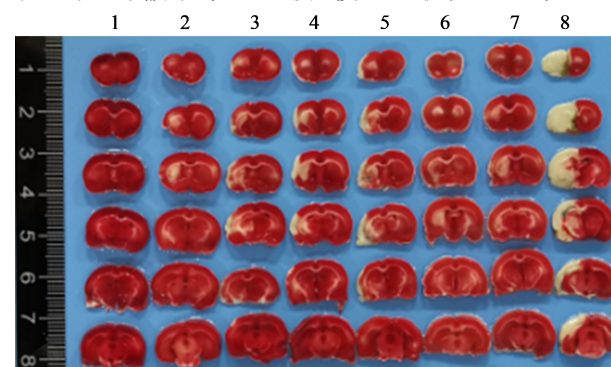
^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ** $P < 0.01$ vs model group

3.3 脑梗死面积检测结果

TTC染色结果显示,模型组脑梗死面积较大;与模型组比较,注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液给药后脑梗死面积均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图1和表4。

3.4 血脑屏障通透性检测结果

伊文思蓝渗出量评价血脑屏障通透性,检测结果显示,与假手术组比较,模型组伊文思蓝渗出量



1-假手术组;2-注射用丹参多酚酸组;3-注射用丹参多酚酸盐组;4-银杏内酯注射液组;5-银杏二萜内酯葡胺注射液组;6-注射用血塞通(冻干)组;7-丁苯酞氯化钠注射液组;8-模型组

1-sham operation group; 2-Salvianolic Acid for Injection group; 3-Salvianolate for Injection group; 4-Ginkgo Biloba Injection group; 5-Ginkgo Biloba Diterpene Endoperoxide Injection group; 6-Blood Plug for Injection (lyophilization) group; 7-Butylphthalide Sodium Chloride Injection group; 8-model group

图1 各给药组给药后TTC染色结果

Fig. 1 TTC staining results of each administration group after administration

表4 各给药组给药后脑梗死面积($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Cerebral infarct area after administration

in each administration group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	脑梗死面积/mm ²
模型	—	60.18±2.44
注射用丹参多酚酸	11.71 mg·kg ⁻¹	7.14±2.37**
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg·kg ⁻¹	9.21±1.43**
银杏内酯注射液	0.91 mL·kg ⁻¹	15.17±1.76**
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL·kg ⁻¹	15.26±5.17**
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg·kg ⁻¹	5.48±2.29**
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	7.83±4.01**

与模型组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs model group

显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组给药后伊文思蓝渗出量均有不同程度的降低,其中注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组差异显著($P<0.05, 0.01$)。结果见表5。

3.5 组织匀浆因子检测结果

3.5.1 相关炎症因子检测结果 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液显著降低IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,差异均有统计学意义($P<0.05, 0.01$)。结果见表6。

3.5.2 抗氧化指标检测结果 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织SOD含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均能不同程度抑制SOD的降低,其中注射用丹参多酚酸和注射用银杏内酯注射

表5 各给药组给药后伊文思蓝渗出量($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Exudation amount of Evanslan after

administration in each administration group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	伊文思蓝渗出量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
假手术	—	0.70±0.10
模型	—	1.31±0.25 ^{##}
注射用丹参多酚酸	11.71 mg·kg ⁻¹	0.95±0.13*
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg·kg ⁻¹	0.92±0.10*
银杏内酯注射液	0.91 mL·kg ⁻¹	1.11±0.37
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL·kg ⁻¹	0.96±0.19
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg·kg ⁻¹	0.95±0.26*
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	0.86±0.29**

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 operation group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

液组差异有统计学意义($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织MDA含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均能不同程度抑制MDA的升高,其中注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐和银杏内酯注射液组差异均有统计学意义($P<0.01$)。结果见表7。

3.6 病理组织学结果

HE染色结果显示,假手术组脑组织形态规则,细胞整齐;模型组有毛细血管扩张,水肿,炎细胞浸润,神经细胞溶解、固缩、坏死等现象;注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组的组织和细胞形态均趋于正常,与模型组比较组织和细胞坏死的现象减弱,见图2。

表6 各给药组给药后相关炎症因子的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 6 Changes of related inflammatory factors in each administration group after administration ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	5.79±1.49	2 859.62±770.20	2.48±0.65	46.33±12.47
模型	—	16.61±1.07 ^{##}	6 456.32±454.53 ^{##}	8.47±1.79 ^{##}	171.72±9.12 ^{##}
注射用丹参多酚酸	11.71 mg·kg ⁻¹	10.08±1.90**	4 379.12±738.34**	3.88±0.82**	94.83±17.34**
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg·kg ⁻¹	11.31±1.82**	5 506.16±754.21*	5.32±1.15**	114.16±18.84**
银杏内酯注射液	0.91 mL·kg ⁻¹	12.64±1.23**	5 759.34±801.59*	5.43±0.77**	117.59±16.81**
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL·kg ⁻¹	11.91±2.01**	4 641.52±567.06**	5.94±1.18**	113.72±20.08**
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg·kg ⁻¹	11.02±2.27**	4 819.03±773.55**	5.47±1.37**	115.47±18.30**
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	9.55±1.78**	5 304.58±869.53*	3.48±1.01**	87.67±16.18**

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

表7 各给药组给药后抗氧化指标的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 7 Changes of antioxidant indexes in each administration group after administration ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	SOD/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)
假手术	—	2.86±0.38	0.55±0.11
模型	—	1.76±0.50 ^{##}	0.82±0.09 ^{##}
注射用丹参多酚酸	11.71 mg·kg ⁻¹	2.59±0.44 ^{**}	0.60±0.06 ^{**}
注射用丹参多酚酸盐	17.86 mg·kg ⁻¹	2.24±0.15	0.57±0.12 ^{**}
银杏内酯注射液	0.91 mL·kg ⁻¹	2.40±0.15 ^{**}	0.57±0.20 ^{**}
银杏二萜内酯葡胺注射液	0.45 mL·kg ⁻¹	2.10±0.49	0.73±0.15
注射用血塞通(冻干)	18.02 mg·kg ⁻¹	1.91±0.29	0.70±0.16
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	2.19±0.39	0.74±0.10

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

3.7 TUNEL细胞凋亡染色结果

TUNEL细胞凋亡染色结果显示,假手术组脑组

织未出现细胞凋亡现象;模型组细胞凋亡明显;注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液、注射用血塞通(冻干)和丁苯酞氯化钠注射液组的细胞形态基本趋于正常或有少量细胞凋亡,细胞凋亡明显降低,见图3。

4 讨论

脑梗死是一种常见的神经系统疾病,相关流行病学数据显示,脑血管病的病死率占世界第二,其中脑梗死占其60%~80%之间^[12]。中医理论中,“瘀血阻络”是脑梗死发生的重要病机,也是脑梗死发生和发展的关键因素^[13]。因此,在治疗脑梗死过程中,中药以“化瘀”“清瘀”理论为指导,配合其他化瘀之法,发挥增强化瘀疗效,提高临床治疗脑梗死疗效的目的^[14]。

注射丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏

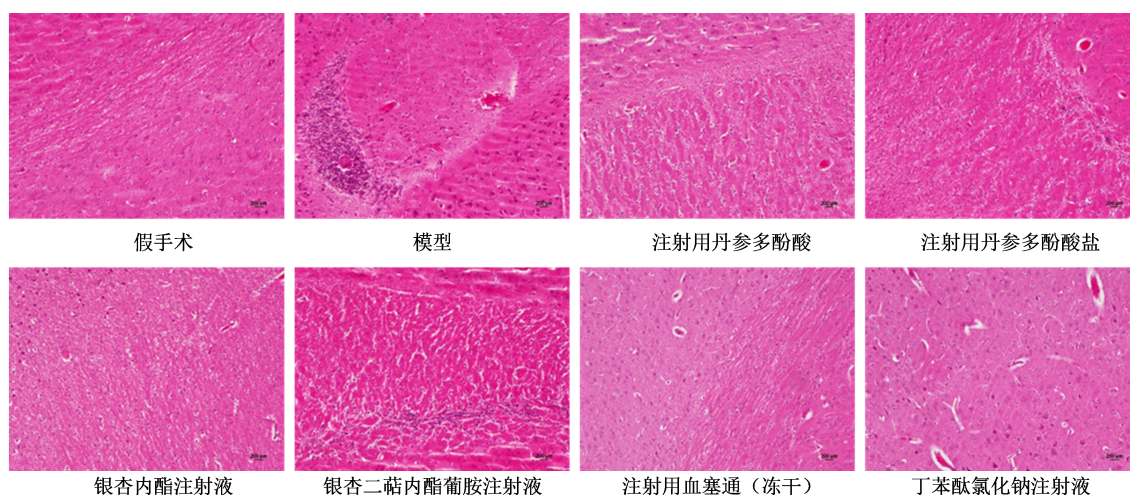


图2 各组给药后病理组织学变化

Fig. 2 Histopathological changes of each administration group after administration

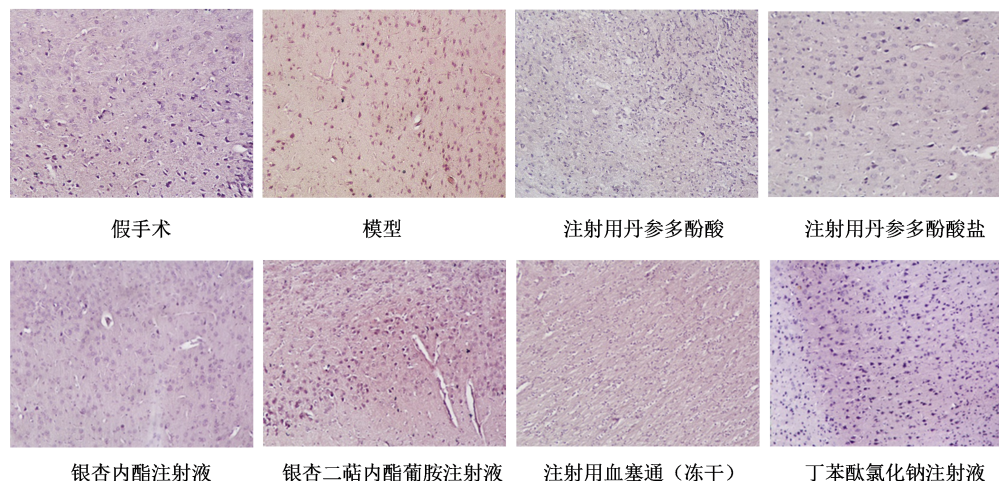


图3 各组给药后TUNEL细胞凋亡检测结果

Fig. 3 Apoptosis detection results of TUNEL cells in each administration group

内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液和注射用血塞通(冻干)是治疗脑梗死的活血化瘀类中药注射剂,均具有改善神经功能、改善脑水肿、抗炎和抗氧化等方面的作用^[15-19]。大脑中动脉(MCA)是人群中脑梗死的多发部位,MCAO模型被认为是局灶性脑缺血的标准动物模型^[10],本研究通过构建大鼠MCAO模型,探讨上述5种活血化瘀类中药注射剂对MCAO大鼠脑缺血的保护作用,结果显示注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液、注射液用血塞通(冻干)对神经功能评分、脑指数、脑含水量、脑梗死面积、伊文思蓝渗出量、相关抗炎和抗氧化因子、组织形态学等指标较模型组均有不同程度的改善,说明5种活血化瘀类中药注射剂对局灶性脑缺血损伤大鼠均具有较好的保护作用,与活血化瘀类中药注射剂治疗脑梗疗效显著的相关临床研究结果一致^[20-21]。

本研究结果显示,5种活血化瘀类中药注射剂对改善MCAO大鼠各指标程度不同,可能主要与丹参、银杏和三七3种中药材作用机制及其相关靶点通路相关^[5,22]。给药后5种活血化瘀类中药注射剂均具有减小脑梗死面积及抑制IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量升高的作用且作用强度基本一致,相关研究表明丹参、银杏和三七总皂苷均具有抑制炎症的作用,但部分机制存在差异^[23-25]。在抗氧化方面,注射用丹参多酚酸和银杏内酯注射液的抗氧化能力显著优于注射用血塞通(冻干),可能为丹参、银杏叶提取物中的多种有效成分具有清除自由基的能力且可直接清除超氧化物自由基,而三七总皂苷缺乏直接作用于自由基的物质基础所致^[26-28]。在保护血脑通透性方面,三七总皂苷可直接对血脑屏障发挥作用^[29],而银杏主要通过抑制炎症和抗氧化应激过程,发挥降低血脑屏障的通透性的作用^[30];同时三七皂苷和2种丹参类制剂在增加血管修复作用,血管再生方面均有相关文献^[31-32],而银杏未发现相关报道,因此注射用血塞通(冻干)、注射用丹参注射液和注射用丹参多酚酸盐保护血脑屏障通透性优于银杏内酯注射液和银杏二萜内酯葡胺注射液。

注射用丹参多酚酸、注射用丹参多酚酸盐、银杏内酯注射液、银杏二萜内酯葡胺注射液和注射用血塞通(冻干)5种活血化瘀类中药注射剂对局灶性脑缺血损伤大鼠均具有较好的改善作用,但其改善各指标的程度不同,可能与丹参、银杏和三七3种中

药材作用机制及其相关靶点通路不同相关,相关作用机制有待进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 姚东陂, 张锦丽, 王红欣. 脑梗死的治疗现状及研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2012, 24(12): 55-59.
Yao D P, Zhang J L, Wang H X. Current status and research progress of treatment of cerebral infarction [J]. Med J Chin PLA, 2012, 24(12): 55-59.
- [2] 陈杰, 李庚富, 晔艳丽, 等. 脑梗死的病理生理改变及治疗现状[J]. 西南国防医药, 2011, 21(6): 681-683.
Chen J, Li G F, Zi Y L, et al. Pathophysiological changes and treatment status of cerebral infarction [J]. Med J Southwest Natl Def, 2011, 21(6): 681-683.
- [3] 钟迪, 张舒婷, 吴波. «中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018»解读[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(11): 897-901.
Zhong D, Zhang S T, Wu B. Interpretation of "Chinese Acute Ischemic Stroke Diagnosis and Treatment Guidelines 2018" [J]. Chin J Contemp Neurol Neuro-surg, 2019, 19(11): 897-901.
- [4] 刘晓, 张永莉, 师少宇. 活血化瘀类中药注射剂辨证应用研究进展[J]. 海峡药学, 2020, 32(2): 131-134.
Liu X, Zhang Y L, Shi S Y. Research progress in the application of traditional Chinese medicine injections for promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. Strait Pharm J, 2020, 32(2): 131-134.
- [5] 吴旦, 郑亚纯, 丁楠, 等. 银杏与三七制剂在治疗缺血性脑血管疾病中的异同[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3063-3072.
Wu D, Zheng Y C, Ding N, et al. The similarities and differences of ginkgo and notoginseng preparations in the treatment of ischemic cerebrovascular diseases [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(13): 3063-3072.
- [6] 乔丽琴. 丹参的药理作用及临床应用探讨[J]. 人人健康, 2018(24): 201, 226.
Qiao L Q. The pharmacological effects and clinical application of Salvia miltiorrhiza [J]. Health Everybody, 2018(24): 201, 226.
- [7] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
Wan X H, Wang Y L, Zhou C Z, et al. Effects of Salvianolic Acids for Injection combined with aspirin on oxidative products and inflammatory factors in patients with cerebral infarction [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(3): 788-798.
- [8] 武琦, 林娟, 刘耀晨, 等. 基于网络药理学的三七传统

- 功效作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3717-3727.
- Wu Q, Lin J, Liu Y C, et al. Study on traditional effect of *Panax notoginseng* based on network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(14): 3717-3727.
- [9] 冯荣伟, 王文习, 马 影, 等. 活血化癥类中药注射剂治疗缺血性中风的临床效果及不良反应评价 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(10): 80-84.
- Feng R W, Wang W X, Ma Y, et al. Evaluation of clinical effects and adverse reactions of Chinese medicine injections for promoting blood circulation and removing blood stasis in the treatment of ischemic stroke [J]. *Med J Chin PLA*, 2019, 31(10): 80-84.
- [10] 马雁鸿, 蒋 佳, 刘 蕾, 等. 线栓法制备MCAO大鼠模型过程中相关影响因素探析 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(4): 186-188.
- Ma Y H, Jiang J, Liu L, et al. Analysis of related factors in the preparation of MCAO rat model by suture method [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2020, 47(4): 186-188.
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke J Cereb Circul*, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] Consoli D, Paciaroni M, Aguggia M, et al. Prevalence of patent foramen ovale in ischemic stroke in Italy: the SISIFO study [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2014, 35(6): 867-73.
- [13] 彭玉芝, 彭玉霞, 闫咏梅. "化癥"法治疗脑梗死研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(11): 68-71.
- Peng Y Z, Peng Y X, Yan Y M. Research progress in the treatment of cerebral infarction with "removing blood stasis" method [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2020, 22(11): 68-71.
- [14] Hsu W H, Shen Y C, Shiao Y J, et al. Combined proteomic and metabolomic analyses of cerebrospinal fluid from mice with ischemic stroke reveals the effects of a Buyang Huanwu decoction in neurodegenerative disease [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): 1-20.
- [15] 张燕欣, 梁佳威, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中的药理作用及机制研究概述 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1469-1479.
- Zhang Y X, Liang J W, Wan M X, et al. Overview of the research on the pharmacological effects and mechanism of Danshen Polyphenolic Acid for Injection in the treatment of ischemic stroke [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(8): 1469-1479.
- [16] 王媛媛. 丹参多酚酸盐对脑梗死保护作用的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(21): 33-36.
- Wang Y Y. Research progress on the protective effects of *salvia miltiorrhiza* polyphenolate on cerebral infarction [J]. *Clin Res Chin Med*, 2020, 12(21): 33-36.
- [17] 李卓琼, 曹泽斌, 曹 亮, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液的脑血管保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4738-4743.
- Li Z Q, Cao Z Y, Cao L, et al. Cerebrovascular protection of Ginkgo diterpene lactone meglumine injection [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(24): 4738-4743.
- [18] 刘建辉, 冀凤云, 王 婷, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(1): 90.
- Liu J H, Ji F Y, Wang T, et al. Experimental study on the protective effect of *panax notoginseng* saponins on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Clin Neurosci*, 2002, 10(1): 90.
- [19] 蒋文潇, 王保和. 银杏内酯对缺血性脑血管疾病的药理研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(2): 441-444.
- Jiang W X, Wang B H. Progress in pharmacological research of ginkgolide on ischemic cerebrovascular disease [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2015, 42(2): 441-444.
- [20] 于丹丹. 基于复杂网络方法评价活血化癥中药注射剂治疗急性脑梗死的疗效 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020: 1-101.
- Yu D D. Evaluation of the efficacy of activating blood circulation and removing blood stasis traditional Chinese medicine injection in the treatment of acute cerebral infarction based on complex network method [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2020: 1-101.
- [21] 李 冀, 赵一点, 胡晓阳, 等. 9种活血化癥类中药注射剂治疗缺血性脑卒中的网状Meta分析 [J]. 云南中医学院学报, 2020, 43(4): 24-33.
- Li J, Zhao Y D, Hu X Y, et al. Net Meta-analysis of 9 Chinese medicine injections for promoting blood circulation and removing blood stasis in the treatment of ischemic stroke [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med*, 2020, 43(4): 24-33.
- [22] 谢志茹. 丹参活血化癥的生物学机制及基于Q-marker的质量控制研究 [D]. 湛江: 广东药科大学, 2019: 1-100.
- Xie Z R. The biological mechanism of activating blood circulation and removing blood stasis of Danshen and the quality control research based on Q-marker [D]. Zhanjiang: Guangdong Pharmaceutical University, 2019: 1-100.
- [23] Kaur S, Sharma N, Nehru B. Anti-inflammatory effects of *Ginkgo biloba* extract against trimethyltin-induced hippocampal neuronal injury [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(1): 87-104.
- [24] Son H Y, Han H S, Jung H W, et al. *Panax notoginseng* attenuates the infarct volume in rat ischemic brain and the

- inflammatory response of microglia [J]. J Pharm Sci, 2009, 109(3): 368.
- [25] 李园园. 丹参水溶性成分的分离及其抗炎作用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 1-54.
- Li Y Y. Isolation of water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* and its anti-inflammatory effects [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2019: 1-54.
- [26] Xiao G X, Lyu M, Wang Y L, et al. *Ginkgo* flavonol glycosides or ginkgolides tend to differentially protect myocardial or cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of TWEAK-Fn14 signaling in heart and brain [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 735.
- [27] Ma L, Liu X, Zhao Y, et al. Ginkgolide B reduces LOX-1 expression by inhibiting akt phosphorylation and increasing Sirt1 expression in oxidized LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74769.
- [28] 韦金亮. 不同中药提取物对小鼠抗氧化清除自由基及作用机制的比较研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2006.
- Wei J L. Comparative study on the antioxidant scavenging of free radicals and mechanisms of different traditional chinese medicine extracts in mice [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2006.
- [29] Wu T, Jia Z H, Dong S F, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorate leukocyte adherence and cerebrovascular endothelial barrier breakdown upon ischemia-reperfusion in mice [J]. J Vasc Res, 2019, 56(1): 1-10.
- [30] 巩沅鑫, 周其全. 银杏叶提取物对血脑屏障通透性保护作用的分子机制 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1474-1477, 1481.
- Gong Y X, Zhou Q Q. Molecular mechanism of *Ginkgo biloba* extract on blood-brain barrier permeability protection [J]. Chin New Drugs J, 2008, 17(17): 1474-1477, 1481.
- [31] Hui Z, Sha D J, Wang S L, et al. *Panax* atriol saponins promotes angiogenesis and enhances cerebral perfusion after ischemic stroke in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 1-10.
- [32] 孙环宇, 许 晴, 张燕欣, 等. 丹参类制剂及丹参活性成分改善脑循环作用机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1496-1500.
- Sun H Y, Xu Q, Zhang Y X, et al. Research progress on the mechanism of *Salvia miltiorrhiza* preparations and its active ingredients in improving cerebral circulation [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1496-1500.

[责任编辑 兰新新]