

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

陈璐¹, 姚宇晴¹, 李德坤^{2,3}, 张燕欣^{2,3}, 万梅绪^{2,3}, 聂永伟^{4*}, 鞠爱春^{2,3*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

4. 南开大学 医学院, 天津 300071

摘要: 目的 考察注射用丹参多酚酸(SAFI)对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用。方法 线栓法构建大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)大鼠模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组、丁苯酞氯化钠注射液(阳性药,9 mL·kg⁻¹)组和SAFI低、中、高剂量(5.85、11.71、23.42 mg·kg⁻¹,11.71 mg·kg⁻¹为临床等效剂量)组,每组12只。假手术组和模型组给予0.9%氯化钠注射液,SAFI每天给药1次,丁苯酞氯化钠注射液每天给药2次,尾iv连续给药14 d。给药期间称大鼠体质量;给药前后对各组大鼠进行神经功能评分;给药后采用TTC染色法检测脑梗死体积;酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清中γ干扰素(IFN-γ)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和超氧化物歧化酶(SOD)的水平;HE染色观察脑组织病理形态;尼氏染色观察海马区尼氏小体形态变化情况。结果 给药14 d后,与模型组比较,SAFI 5.85、11.71、23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组大鼠体质量显著增加($P < 0.001$),脑组织梗死体积显著缩小($P < 0.001$);SAFI 11.71、23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组神经功能评分显著降低($P < 0.05、0.01$),IFN-γ、IL-1β和TNF-α水平均显著降低($P < 0.01、0.001$),SOD水平显著升高($P < 0.01、0.001$);SAFI 23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组IL-6水平显著降低($P < 0.05、0.01$);SAFI可明显改善MCAO/R大鼠脑组织缺血半暗带区病理损伤,抑制尼氏小体数的减少。结论 SAFI对脑缺血再灌注大鼠脑损伤具有明显的保护作用。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 脑缺血再灌注; 脑损伤; γ干扰素、肿瘤坏死因子-α; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)03-0559-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.012

Protective effect of Salvianolic Acid for Injection on brain injury in rats with cerebral ischemia and reperfusion

CHEN Lu¹, YAO Yuqing¹, LI Dekun^{2,3}, ZHANG Yanxin^{2,3}, WAN Meixu^{2,3}, NIE Yongwei⁴, JU Aichun^{2,3}

1. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

4. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Salvianolic Acid for Injection (SAFI) on brain injury after cerebral ischemia reperfusion in rats. **Methods** The rat model of middle cerebral artery ischemia reperfusion (MCAO/R) was established by the method of tethering. The rats with successful modeling were randomly divided into model group, Butylphthalide Sodium Chloride Injection (BSCI, positive drug, 9 mL·kg⁻¹) group and SAFI low, medium and high dose (5.85, 11.71, 23.42 mg·kg⁻¹, 11.71 mg·kg⁻¹ was the clinical equivalent dose) group, with 12 rats in each group. The sham-operation group and model group were given 0.9% sodium chloride injection, the SAFI group was given once a day, and the BSCI was given twice a day, and the tail iv was given continuously for 14 days. Weigh the weight of rats during administration. After 14 days, the changes of neurological function scores before and after administration were compared. The volume of cerebral infarction was detected by TTC staining. The contents of interferon-γ (IFN-γ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and superoxide dismutase

收稿日期: 2022-11-07

第一作者: 陈璐,女,硕士,研究方向为中药生产与质量控制。E-mail:13624832432@163.com

*共同通信作者: 聂永伟,男,实验师,从事实验动物和中药药理研究。E-mail:yongweinie@nankai.edu.com

鞠爱春,男,正高级工程师,从事中药注射剂工艺及质量控制研究。E-mail:juach@tasly.com

(SOD) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. HE staining was used to observe the pathological morphology of brain tissue. Morphological changes of Nissl bodies in hippocampus were observed by Nissl staining. **Results** After 14 days of administration, compared with model group, the body mass of rats in SAFI 5.85, 11.71, 23.42 mg·kg⁻¹ group and BSCI group increased significantly ($P < 0.001$), and the infarct volume of brain tissue decreased significantly ($P < 0.001$). Compared with model group, SAFI 11.71, 23.42 mg·kg⁻¹ group and BSCI group had significantly lower neurological function scores ($P < 0.05, 0.01$), the level of SOD in serum was significantly increased, and the levels of INF- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α were decreased ($P < 0.01, 0.001$). The level of IL-6 in SAFI 23.42 mg·kg⁻¹ group and BSCI group decreased significantly compared with model group ($P < 0.05, 0.01$). SAFI could significantly improve the pathological damage of ischemic penumbra in MCAO/R rats and inhibit the reduction of Nissl corpuscles compared with model group. **Conclusion** SAFI has a significant protective effect on brain injury of cerebral ischemia-reperfusion rats.

Key words: Salvianolic Acid for Injection; cerebral ischemia-reperfusion; brain damage; interferon- γ ; tumor necrosis factor- α ; superoxide dismutase

卒中俗称“中风”，是由于脑血管破裂或动脉栓塞致使血液循环障碍引起的脑组织损伤，包括缺血性和出血性卒中，临床患者主要以缺血性卒中为主，约占卒中总数的80%，发病率和致残率逐年增高，严重威胁居民生命和健康，也是全球需要共同面对的重大公共卫生问题^[1]。尽早疏通闭塞是治疗的关键，目前最有效的方式是通过药物溶栓或手术取栓，但临床应用受狭窄的时间窗限制^[2-3]，超出此时间恢复缺血区血流供应后会进一步发生再灌注损伤，引起脑水肿、脑出血等，致使神经损伤加重^[4-5]。

注射用丹参多酚酸(SAFI)是提纯丹参中水溶性酚酸类有效成分制成的冻干粉针剂，临床上主要用于治疗轻、中度脑梗死恢复期瘀血阻络证，目前也已逐步用于急性期的治疗，疗效确切且安全性高^[6]。本实验通过构建大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)大鼠模型，探讨SAFI对脑缺血再灌注损伤(CIRI)的保护作用，为临床应用提供更充实的理论依据，并为后续进行深入的机制研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

T2000 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); FSH-2 可调高速匀浆机(常州荣华仪器有限公司); ST16R 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司); ASP300 全自动脱水机、EG1150H 包埋机、RM2235 轮转式切片机、HI1220 烤片机(德国 Leica 公司); Infinite M200 酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 药品及主要试剂

SAFI(天津天士力之骄药业有限公司, 每只装 130 mg, 含丹酚酸 100 mg, 批号 20200609); 丁苯酞氯化钠注射液(石药集团恩必普药业有限公司, 批

号 6182008130); 异氟烷(EZVET 公司, 批号 045742); 0.9% 氯化钠注射液(石家庄四药有限公司, 批号 2201050902); 大鼠 γ -干扰素(IFN- γ , 批号 20220901-30173B)、大鼠白细胞介素-6(IL-6, 批号 20220901-30168B)、大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β , 批号 20220901-30206B)、大鼠超氧化物歧化酶(SOD, 批号 20220901-34817B)、大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号 20220901-31063B)均购于上海酶联生物科技有限公司; 尼氏染色试剂盒(甲基紫法, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 20221012)。

1.3 实验动物

120 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2021-0011, 饲养于屏障系统, 环境条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》(GB14925-2001), 实验严格按照天士力动物管理及福利伦理委员会标准执行(批准文号 TSL-IACUC-2022-26)。

2 方法

2.1 MCAO/R 模型构建

大鼠适应性喂养 1 周, 体质量控制 220~240 g, 术前禁食 12 h。实验前用碘伏将手术器械、线栓等相关实验用品进行消毒, 采用异氟烷气体进行麻醉, 参照 Zea Longa 等建立的 MCAO/R 模型制备方法^[7]进行操作, 线栓插入 1 h 后拔出实现再灌注, 假手术组大鼠仅做血管分离, 不插入线栓。每只大鼠手术完成后按照每只 60 万 U im 青霉素钠溶液, 连续注射 3 d, 防止术后感染。

2.2 动物入组及给药

术后 24 h 对大鼠进行神经功能评分, 评分 ≥ 1 判定造模成功即可入组, 并立即给药, 评分标准见表 1。

表1 神经功能评分

Table 1 Neurological function scores

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

将造模成功的大鼠随机分为模型组、丁苯酞氯化钠注射液(阳性药, 9 mL·kg⁻¹)组和SAFI低、中、高剂量(5.85、11.71、23.42 mg·kg⁻¹, 11.71 mg·kg⁻¹为临床等效剂量)组, 每组12只。假手术组和模型组不进行药物干预, 给予0.9%氯化钠注射液, SAFI组用0.9%氯化钠注射液稀释SAFI, 配成相应浓度药液, 给药体积均为3 mL·kg⁻¹, 每天1次; 丁苯酞氯化钠注射液每天给药2次, 尾iv连续给药14 d。

2.3 体质量及神经功能评分

给药14 d后再次对各组大鼠进行神经功能评分并称体质量, 对比给药前后评分及体质量的变化。

2.4 生化指标检测

各组大鼠气体麻醉后, 腹主动脉取血, 血液静置2 h后, 3 500×g离心20 min, 收集血清于-80 °C储存待用, 按照ELISA试剂盒说明书检测IFN-γ、IL-6、IL-1β、SOD和TNF-α水平。

表2 各组大鼠给药前后体质量变化比较($\bar{x}\pm s, n=12$)Table 2 Comparison of body weight changes of rats in each group before and after administration ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g		
		给药前	给药后7 d	给药后14 d
假手术	—	233.21±14.73	249.26±15.76	265.00±20.22
模型	—	204.16±43.57	209.44±59.17 ^{###}	215.36±48.16 ^{###}
SAFI	5.85	210.40±16.75	230.80±36.65 ^{***}	267.76±44.59 ^{***}
	11.71	204.13±23.10	239.25±31.94 ^{***}	274.42±34.65 ^{***}
	23.42	211.28±17.77	232.28±44.84 ^{***}	267.80±41.68 ^{***}
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	209.52±20.06	233.51±38.47 ^{***}	262.59±42.43 ^{***}

与假手术组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P<0.001$

^{###} $P<0.001$ vs sham operation group; ^{***} $P<0.001$ vs model group

3.2 神经功能评分

神经功能缺损评分结果显示, 各组给药前神经功能评分无显著性差异; 给药14 d后, 各组神经功能缺损评分均低于模型组, 其中SAFI 11.71、23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组与模型组比较有显著性差异($P<0.05, 0.01$)。结果表明不同剂量的SAFI可改善MCAO/R大鼠神经功能

2.5 脑梗死体积

每组随机取6只大鼠安乐死并断头取脑, 将完整的脑组织放入-20 °C冰箱速冻, 取出后用刀片从额极至枕叶依次行2 mm厚冠状切片, 切好的脑片浸入2% TTC溶液中染色, 37 °C恒温避光孵育15 min, 翻面继续孵育15 min, 使得组织非梗死区呈玫红色, 梗死区则呈白色即可。回收染液, 加入4%多聚甲醛溶液固定并拍照, Image J图像分析软件测定脑梗死体积。

2.6 脑组织病理形态学观察

每组随机取6只大鼠安乐死并断头取脑, 将完整的脑组织放入10%甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片, 常规步骤脱水, 进行HE和尼氏染色, 显微镜下观察并拍照进行形态学分析。

2.7 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并做图。

3 结果

3.1 体质量变化

如表2所示, 各组大鼠给药前体质量无明显变化; 给药后7、14 d, 与假手术组比较, 模型组大鼠体质量显著降低($P<0.001$); 与模型组比较, SAFI 5.85、11.71、23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组大鼠体质量显著增加($P<0.001$)。结果表明给予SAFI后有助于MCAO/R大鼠饮食及体质量恢复。

缺损程度, 促进神经功能恢复, 结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

结果见表3。

3.3 脑梗死体积

TTC染色结果显示, 模型组大鼠脑梗死体积较大; 与模型组比较, SAFI 5.85、11.71、23.42 mg·kg⁻¹组和丁苯酞氯化钠注射液组MCAO/R大鼠脑梗死体积显著缩小($P<0.001$), 且SAFI作用呈剂量相关性。结果见图1。

表3 各组大鼠给药前后神经功能评分比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Comparison of neurological function scores before and after administration in rats of each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	神经功能评分	
		给药前	给药后
模型	—	2.94±0.89	2.66±1.04
SAFI	5.85	2.84±0.86	2.19±0.89
	11.71	2.90±0.87	2.13±0.99*
	23.42	2.85±0.93	1.80±1.03**
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	2.76±0.78	2.27±0.83*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

3.4 生化指标

与假手术组比较,模型组大鼠血清中IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均显著升高,SOD水平显著降低($P<0.001$);与模型组比较,SAFI 11.71、23.42 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和丁苯酞氯化钠注射液组IFN- γ 、IL-1 β 和TNF- α 水平均显著降低,SOD水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 、0.01、0.001),SAFI 5.85 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组IFN- γ 水平显著降

低($P<0.01$),SAFI 23.42 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和丁苯酞氯化钠注射液组IL-6水平显著降低($P<0.05$ 、0.01)。结果表明SAFI可通过抑制炎症和抗氧化发挥对MCAO/R大鼠神经保护的作用,结果见表4。

3.5 脑组织病理形态

3.5.1 HE染色 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织缺血半暗带区神经细胞肿胀、间距增宽、空泡增多、炎细胞浸润、组织疏松等现象明显;与模型组相比,SAFI 5.85、11.71、23.42 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和丁苯酞氯化钠注射液组神经细胞肿大和空泡变性均有明显改善,细胞排列较为整齐,提示SAFI可明显改善MCAO/R大鼠脑组织缺血半暗带区病理损伤,结果见图2。

3.5.2 尼氏染色 假手术组大鼠海马锥体细胞区神经元胞浆内尼氏小体丰富,分布均匀,形态完整;模型组尼氏小体数量减少且破碎;与模型组相比,SAFI 5.85、11.71、23.42 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和丁苯酞氯化钠注射液组尼氏小体破损程度较轻,排列较为整齐,数量明显增加,说明SAFI可明显抑制MCAO/R大鼠脑组织海马锥体细胞区内尼氏小体数量减少,结果见图3。

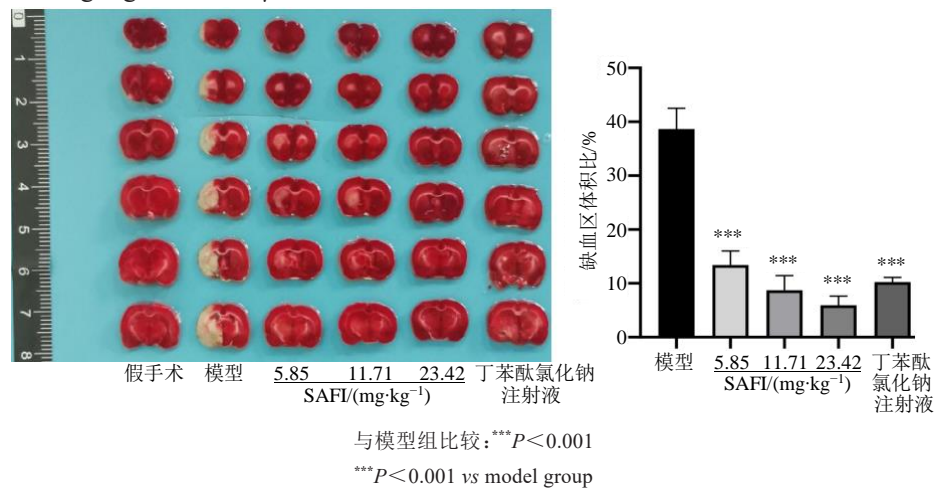


图1 各组大鼠TTC染色结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 TTC staining results of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表4 各组大鼠给药后血清中相关生化指标的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Changes of related biochemical indexes in serum of rats after administration ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	IFN- γ /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
假手术	—	1 095.69±199.30	18.41±3.80	96.31±8.27	206.31±47.92	7.94±1.28
模型	—	2 005.52±96.93###	31.59±2.91###	134.90±10.90###	313.90±36.03###	5.41±0.61###
SAFI	5.85	1 506.71±138.50**	29.45±4.72	136.54±20.16	285.44±43.73	5.66±0.78
	11.71	1 624.03±232.20***	23.38±3.87***	115.63±19.15	245.81±39.87**	7.12±0.69**
	23.42	1 883.63±281.30***	22.24±4.71***	111.92±8.45*	219.58±34.29***	7.95±0.72***
丁苯酞氯化钠注射液	9 mL·kg ⁻¹	1 737.01±194.80***	19.15±1.48***	101.53±8.62**	250.86±25.74*	7.60±0.72***

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

$P<0.001$ vs sham operation group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

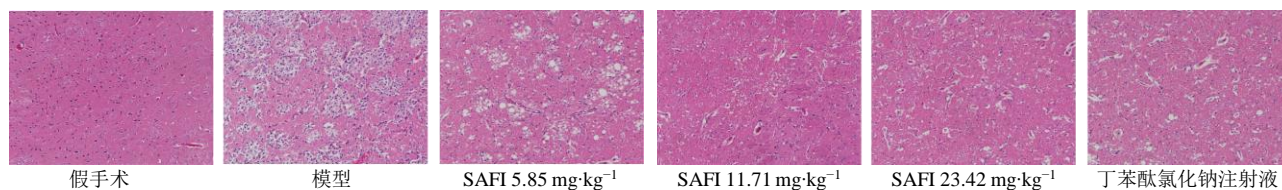


图2 各组大鼠脑组织HE染色结果(×100)

Fig. 2 HE staining results of brain tissue in each group (×100)

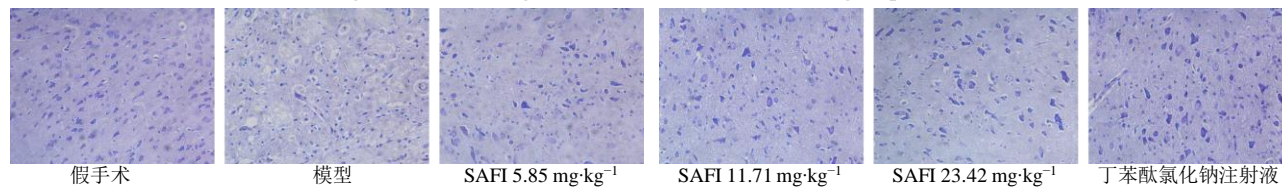


图3 各组大鼠脑组织尼氏染色结果(×200)

Fig. 3 Nissl staining results of brain tissue in each group (×200)

4 讨论

目前脑血管疾病是我国人口死亡的主要原因,发病率仍处于高增长的态势,科研人员对其预防和治疗进行了长期艰难的研究和探索。中医药在疾病治疗方面具有从整体出发、系统调节机体的特点,优势明显,发展潜力巨大^[8]。

大脑缺血状态下会大量释放各种炎症细胞因子产生炎症反应,引起脑水肿并破坏血脑屏障,进一步加重氧化应激损伤。IL-1 β 是脑缺血早期产生的细胞因子,可诱导免疫活性细胞产生其他炎症介质,导致继发性损伤。在细胞缺血时,IL-6可由多种因子诱导产生,并吸引T淋巴细胞进入脑组织加重炎症反应。TNF- α 则具有多效促炎性及神经毒性作用,可通过刺激内皮细胞凋亡、促进炎症介质合成和使星形细胞胶质化等作用加重脑损伤。IFN- γ 只在脑组织受损时表达,增强神经毒性作用诱导细胞凋亡^[9-10]。本实验结果表明给予SAFI能明显地降低MCAO/R大鼠神经功能评分,改善神经功能缺损症状,减轻脑组织梗死程度。通过ELASA法检测血清中相关生化指标发现,SAFI可显著降低IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平,提高血清中SOD水平,通过抑制炎症反应和抗氧化应激发挥神经保护作用。

神经细胞是构成脑组织结构和功能的基本单位,在脑血管结构维护和修复中发挥着重要作用。脑缺血造成神经细胞受损减少,组织出现间隔增宽、水肿明显等形态变化,SAFI给药后可明显减轻病理损伤变化程度,改善缺血区神经细胞生存状态。尼氏小体分布于神经细胞胞质内,由糙面内质网和游离核糖体中的核蛋白与甲苯胺蓝、硫堇、苏木精等碱性染料结合,染成蓝色的细颗粒或团状。神经元受损时尼氏小体颗粒数量及位置会发生变

化,呈明显的溶解或消失,其结构变化可作为神经元受损的标志^[11]。脑缺血后大鼠脑组织内神经细胞胞浆内尼氏小体的数目明显缺失,而SAFI给药后可抑制脑梗死后尼氏小体的减少,因此认为SAFI通过改善神经细胞受损程度发挥对脑缺血的保护作用,促进脑梗死后的神经功能恢复。

SAFI是提纯丹参中水溶性酚酸类成分混合制成的现代中药注射剂,其改善CIRI,促进神经功能恢复的机制可能是各单体成分同时干预疾病中多个环节,多靶点协同起效,减轻脑缺血后的神经功能缺损可能与改善脑部循环、抗凋亡、保护血脑屏障、抑制炎症因子分泌和血小板聚集等方面有关^[12-16]。本研究通过构建经典大鼠MCAO/R模型,在既往研究的基础上对SAFI的整体药效作用和局部组织病理形态变化进行探索,弥补了SAFI对CIRI大鼠海马区神经元保护作用药理依据的不足,为开展SAFI促进神经功能恢复的病理机制研究奠定基础。相关研究显示SAFI发挥神经功能恢复的机制可能与对核因子- κ B(NF- κ B)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Janus酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)等多种信号通路^[17-18]的调节相关,但其单体成分协同起效的药理机制和信号通路的网络关系仍需进一步探索,从而为SAFI的临床精准定位提供更好的依据和支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Randolph S A. Ischemic stroke [J]. Workplace Health Saf, 2016, 64(9): 444.
- [2] Simão F, Ustunkaya T, Clermont A C, et al. Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused

- by tissue plasminogen activator therapy in mice after stroke [J]. *Blood*, 2017, 129(16): 2280-2290.
- [3] 许燕艳, 陈珊莉, 陈丹, 等. 缺血性脑卒中溶栓药物研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36(10): 2029-2039.
- Xu Y Y, Chen S L, Chen D, et al. Recent progress in developing of thrombolytic agents for ischemic stroke [J]. *Chin J Biotechnol*, 2020, 36(10): 2029-2039.
- [4] Moretti A, Ferrari F, Villa R F. Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146: 23-34.
- [5] Simiao, Wu, PhD, et al. Stroke in China: Advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 394-405.
- [6] Li X Q, Guo K M, Zhang R L, et al. Exploration of the mechanism of salvianolic acid for injection against ischemic stroke: A research based on computational prediction and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 894427.
- [7] 赵正梅. 线栓法制作大鼠MCAO模型的技术改进与评价 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2014, 35(10): 1407-1408.
- Zhao Z M. Technical improvement and evaluation of MCAO model rats induced by monofilament [J]. *J Qiqihar Univ Med*, 2014, 35(10): 1407-1408.
- [8] Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [9] 杨小钰, 黄海红, 谌泽芳, 等. 脑缺血再灌注后炎症反应研究进展及中西医结合防治思路 [J]. *中国现代医药杂志*, 2019, 21(12): 95-99.
- Yang X Y, Huang H H, Chen Z F, et al. Research progress of inflammatory reaction after cerebral ischemia-reperfusion and prevention and treatment of integrated traditional Chinese and western medicine [J]. *Mod Med J China*, 2019, 21(12): 95-99.
- [10] 王萍, 张密霞, 庄朋伟, 等. 脑缺血再灌注损伤的炎症反应机制研究进展 [J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(5): 317-320.
- Wang P, Zhang M X, Zhuang P W, et al. Research progress on inflammatory response mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2014, 33(5): 317-320.
- [11] 王斌华, 吴新贵, 刘学谦, 等. 电针"内关"、"足三里"对脑梗死大鼠梗死体积及尼氏小体的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(8): 1199-1205.
- Wang B H, Wu X G, Liu X Q, et al. Effects of electroacupuncture at "Neiguan" and "Zusanli" on the infarct volume and Nissl bodies in rats with cerebral infarction [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2022, 39(8): 1199-1205.
- [12] Li X Q, Guo K M, Zhang R L, et al. Exploration of the mechanism of Salvianolic Acid for Injection against ischemic stroke: A research based on computational prediction and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 894427.
- [13] 雷梦南, 李玉胡, 建鹏. 脑缺血再灌注损伤分子生物学机制及现代中医药治疗进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35: 991-994.
- Lei M N, Li Y, Hu J P. Advances in pathogenesis of cerebral ischemia reperfusion injury and the treatment of modern traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Changchun Univ Trad Chin Med*, 2019, 35: 991-994.
- [14] Zhuang P W, Wan Y J, Geng S H, et al. Salvianolic Acids for Injection (SAFI) suppresses inflammatory responses in activated microglia to attenuate brain damage in focal cerebral ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 194-204.
- [15] 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.
- Zhang W Q, Li D N, Ma M M, et al. Salvianolate Lyophilized Injection induced autophagy against neuronal apoptosis through Akt/mTOR pathway in Neuro-2a cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(9): 2706-2714.
- [16] 王芳, 金博文, 王玉, 等. 注射用丹参多酚酸恢复脑缺血早期血流改善远期运动功能的作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(9): 1770-1778.
- Wang F, Jin B W, Wang Y, et al. Effect of Salvianolic Acid for Injection on improving long-term motor function by restoring early cerebral ischemia blood flow [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(9): 1770-1778.
- [17] 杨柳, 陈蓓蕾, 于海龙, 等. JAK2/STAT3信号通路与脑缺血-再灌注损伤相关性的研究进展 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2018, 37(1): 169-173.
- Yang L, Chen B L, Yu H L, et al. Research progress of JAK2/STAT3 signal pathway and cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed*, 2018, 37(1): 169-173.
- [18] Wang W, Hu W L. Salvianolic acid B recovers cognitive deficits and angiogenesis in a cerebral small vessel disease rat model via the STAT3/VEGF signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3146-3151.