

牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用及其 Th1/Th2 漂移的影响

刘磊¹, 吴一飞²

1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

摘要:目的 探讨牡荆苷(VT)对急性脑缺血(ACI)再灌注大鼠的神经保护作用及对辅助性 T 细胞 1(Th1)/Th2 漂移的影响。方法 制备 ACI 再灌注大鼠模型,分为模型组,VT 低、中、高剂量(0.94、1.88、3.76 mg/kg)组和假手术组,缺血再灌注 1 h 后,VT 各剂量组大鼠 ip 不同浓度 VT,假手术组和模型组大鼠 ip 等量生理盐水,连续 3 d。观察大鼠一般状态,评估给药前后 Longa 神经功能评分、给药后脑组织神经元细胞形态学变化;对比各组大鼠脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率;检测大鼠脑组织中 Th1、Th2 标记物 γ 干扰素(INF- γ)、白细胞介素-4(IL-4)水平,计算 INF- γ /IL-4。结果 ACI 再灌注建模成功率为 88.89%,建模大鼠均出现精神状态不佳现象,给药后 VT 各剂量组大鼠状态均有所好转。与模型组比较,VT 各剂量组大鼠给药 1、3 d 后神经功能评分均显著降低($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。HE 结果显示,模型组大鼠神经元细胞体积缩小、细胞核固缩,VT 各剂量组大鼠给药后神经元细胞损伤均有所减轻,其中高剂量组减轻最为明显。与假手术组比较,模型组大鼠 DNA 单链、双链断裂损伤率,INF- γ 水平及 INF- γ /IL-4 较显著升高($P < 0.05$),IL-4 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,VT 各剂量组大鼠 DNA 单链、双链断裂损伤率,INF- γ 水平及 INF- γ /IL-4 均显著降低($P < 0.05$),IL-4 水平显著升高($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。结论 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经功能具有保护作用,其中 VT 3.76 mg/kg 保护作用最佳,可能与调节 Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 漂移、减轻脑细胞 DNA 损伤有关。

关键词: 牡荆苷; 急性脑缺血; 神经保护; 辅助性 T 细胞 1; 辅助性 T 细胞 2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)11-2645-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.021

Neuroprotective effect of vitexin on acute cerebral ischemia reperfusion rats and its effect on Th1/Th2 drift

LIU Lei¹, WU Yi-fei²

1. College of Basic Medical Sciences, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective effect of vitexin (VT) on acute cerebral ischemia (ACI) reperfusion rats and its effect on helper T cell 1 (Th1)/Th2 drift. **Methods** Rat models of ACI reperfusion were established and divided into model group, low, medium and high doses of VT (0.94, 1.88, 3.76 mg/kg) groups and sham operated group. After 1 h of ischemia-reperfusion, rats in different doses of VT were given different concentrations of VT by ip, and rats in sham operated group and model group were given the same amount of saline by ip for three consecutive days. The general state of rats was observed. Longa neurological score before and after administration, and morphological changes of neurons in brain tissue after administration were evaluated and compared. The damage rates of single and double strands breaks of DNA in brain tissue were compared. The levels of Th1 and Th2 markers interferon- γ (INF- γ) and interleukin-4 (IL-4) in brain tissue were measured and the INF- γ /IL-4 was calculated. **Results** The success rate of ACI reperfusion model was 88.89%. The mental state of rats in the model group was not good, which was improved in the three doses of VT groups after administration. Compared with model group, the neurological function scores of rats in each dose group of VT were significantly decreased 1 d and 3 d after administration ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. The results of HE showed that the volume of neurons and nucleus of neurons in model group were reduced, and the injury of neurons in VT groups was alleviated after administration, especially in high dose group. Compared with the sham operated group, the damage rates of single and double strand

收稿日期: 2019-03-01

作者简介: 刘磊(1983—),男,陕西汉中,人,硕士研究生,讲师,研究方向为心脑血管疾病损伤及防治机制研究。

Tel: 18691018969 E-mail: liulei8308@163.com

breaks of DNA, INF- γ level and INF- γ /IL-4 in the model group were significantly higher ($P < 0.05$), while IL-4 level was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the model group, the rate of DNA single- and double-strand breakage damage, INF- γ level and INF- γ /IL-4 were significantly decreased ($P < 0.05$) and the level of IL-4 was significantly increased ($P < 0.05$) in each dose group of VT in a dose-dependent manner. **Conclusion** VT has protective effect on nerve function in ACI reperfusion rats, and with the best protective effect at dose of 3.76 mg/kg, which may be related to regulating the balance of Th1/Th2 cells to shift to Th2 and alleviating DNA damage in brain cells.

Key words: vitexin; acute cerebral ischemia; neuroprotection; helper T cell 1; helper T cell 2

急性脑缺血 (ACI) 是临床常见缺血性脑血管疾病, 是人类三大致死病因之一, 致残率、致死率极高, 给人民的生命安全造成严重威胁^[1]。目前临床中多采用溶栓治疗 ACI, 但对抢救时间窗有严格要求, 且仍有部分患者及时治疗后效果不佳^[2]。缺血再灌注损伤在 ACI 发病及治疗过程中起重要作用, 涉及氧化应激、炎症反应等多个过程, 可导致脑细胞持续损伤, 存活者多遗留神经功能障碍^[3], 生命质量严重下降, 因此寻找有效药物保护 ACI 再灌注后神经功能对患者预后具有重要意义。近年来, 中药因其低毒、高效、来源广泛, 在临床中广泛应用于心脑血管病的防治。牡荆苷 (VT) 是金莲花、红草等毛茛科植物的有效成分, 属于黄酮碳苷类化合物。研究证实^[4-5], VT 具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生物学活性, 但关于其对 ACI 再灌注后神经保护作用及其调控机制鲜有报道。为此, 本研究通过建立 ACI 再灌注大鼠模型, 以不同浓度的 VT 进行干预, 探讨 VT 对 ACI 再灌注大鼠的神经保护作用及可能调控机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 55 只, 8 周龄, 体质量 180~220 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (沪) 2016-0005。

1.2 药物、试剂和仪器

VT (批号 FY2684, 质量分数 $\geq 98.50\%$), 南通飞宇生物科技有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, Sigma 公司); 琼脂糖 (低熔点、正常熔点)、二甲基亚砜 (DMSO), 华美生物工程有限公司; γ 干扰素 (INF- γ)、白细胞介素-4 (IL-4) ELISA 检测试剂盒, 美国 Mybiosource 公司; BX60 型荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; DYY-12D 型电泳仪、水平电泳槽, 北京六一生物科技有限公司。

2 方法

2.1 模型制备

选取 55 只 Wistar 大鼠, 其中 45 只采用 Longa

线栓法建立 ACI 再灌注大鼠模型: 采用 10% 水合氯醛 ip 麻醉后, 仰卧位固定于手术台, 颈部消毒备皮, 作颈正中切口, 沿气管两侧顿性分离双侧颈总动脉 (CCA), 穿线后提起 CCA, 微动脉夹夹闭双侧 CCA 20 min, 然后取下微动脉夹灌注 1 h, 最后抽去穿线缝合切口。剩余 10 只大鼠仅穿线, 未进行夹闭操作。大鼠清醒后采用 Longa 法^[6]评估神经功能, 无神经功能缺陷症状记 0 分; 左前爪不能完全伸展记 1 分; 向左转圈记 2 分; 左侧倾倒记 3 分; 不能行走、意识昏迷记 4 分; Longa 神经功能评分 1~3 分为模型制备成功。

2.2 分组及给药

将模型制备成功的大鼠按照随机数字表法分为模型组和 VT 低、中、高剂量组, 未进行夹闭操作大鼠为假手术组。缺血再灌注 1 h 后 VT 低、中、高剂量组大鼠分别 ip 给予 0.94、1.88、3.76 mg/kg VT (VT-DMF-生理盐水 1:1:20), 模型组和假手术组大鼠 ip 等量 DMF 生理盐水溶液 (DMF-生理盐水 1:20), 每天 1 次, 连续 3 d。

2.3 神经功能评估

于给药前及给药 1、3 d 后分别应用 Longa 法评估神经功能。

2.4 脑组织神经元细胞形态学观察

神经功能指标末次评估结束后, 大鼠 ip 10 mL/kg 0.3% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 迅速开胸暴露心脏, 用生理盐水快速灌注 200 mL, 迅速断头, 冰台下取脑组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 以视交叉处为起始部位向后制作冠状切片, 切片厚度为 5 μ m, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法对切片进行染色, 石蜡树胶封片后, 于光学显微镜下观察脑组织神经元细胞形态学变化。

2.5 脑组织 DNA 链断裂损伤率测定

神经功能指标末次评估结束后, 处死大鼠, 冰台下迅速取脑组织, 将缺血半球去除额极、枕极及矢状缝内侧各 2 mm 大脑皮质及基底节, 取 100 mg

梗死区脑组织制备脑组织匀浆液,采用研磨法作单细胞悬液(细胞密度为 1×10^6 个/mL),进行中性和碱性单细胞凝胶电泳(SCGE)。^①制胶:在载玻片上制胶,下层为正常熔点琼脂,上层为含 1×10^4 个单细胞的低熔点琼脂。^②裂解:取下盖玻片,立即浸入新鲜配置的中性裂解液或碱性裂解液,4℃下裂解 2 h。^③解旋及电泳:取玻片中流水洗涤 2 次,放置于水平含中性或碱性电泳液的电泳槽中,电泳 20 min。^④溴化乙锭染色,PBS 洗涤后盖盖玻片,荧光显微镜下观察细胞图像,计数 200 个细胞,以迁移距离 $> 70 \mu\text{m}$ 的细胞判定为拖尾细胞,中性 SCGE 中拖尾细胞占总细胞数百分比即为 DNA 双链断裂损伤率,碱性 SCGE 中拖尾细胞占总细胞数百分比即为 DNA 单链断裂损伤率。

2.6 脑组织 Th1、Th2 标记物 INF- γ 、IL-4 水平检测

取部分梗死区脑组织,称质量后按照 1:9 加入预冷生理盐水,匀浆后,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,采用 ELISA 法,严格按照试剂盒说明书步骤操作,制作标准曲线,然后计算上清液中 Th1、Th2 标记物 INF- γ 、IL-4 水平,计算 INF- γ /IL-4。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析处理数据,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 描述,重复计量资料比较采用重复测量方差分析,两两样本比较采用 LSD-*t* 检验;多样本计量资料比较采用单因素方差分析,两两样本比较采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察

共 55 只大鼠,对照组 10 只正常存活,45 只大鼠制备 ACI 再灌注模型,其中手术结束 24 h 内死亡 4 只,1 只 Longa 神经功能评分为 4 分模型制备失

败,模型成功率为 88.89% (40/45)。模型大鼠均出现精神萎靡、喜卧、反应迟钝及采食量下降现象,假手术组大鼠苏醒后精神状态逐渐转好,12 h 后反应及采食量逐渐正常,给药后各组大鼠精神状态均有所好转。

3.2 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经功能评分的影响

假手术组大鼠神经功能评分均为 0 分。治疗前 4 组大鼠神经功能评分比较无显著差异。给药 1、3 d 后,与模型组比较,VT 低、中、高剂量组大鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$)。与 VT 低剂量组比较,VT 中剂量组大鼠神经功能评分在给药 3 d 后显著降低 ($P < 0.05$)。与 VT 低、中剂量组比较,VT 高剂量组大鼠神经功能评分在给药 1、3 d 后均显著降低 ($P < 0.05$)。与给药前比较,除 VT 低剂量组外,各给药组大鼠的神经功能评分在给药 1、3 d 后均显著降低 ($P < 0.05$)。与给药 1 d 比较,除 VT 低剂量组外,各给药组大鼠的神经功能评分在给药 3 d 后均显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.3 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经元细胞形态的影响

HE 结果显示,假手术组大鼠神经元细胞形态正常,模型组大鼠神经元细胞体积缩小、细胞核固缩,VT 低、中、高剂量组大鼠在给药 3 d 后细胞皱缩与细胞核深染情况均有所减轻,其中 VT 高剂量组减轻最为明显,结果见图 1。

3.4 VT 对 ACI 再灌注大鼠脑组织 DNA 链断裂损伤的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,VT 各剂量组大鼠脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率均显著降低 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。结果见表 2。

表 1 各组大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Neurological scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分		
		给药前	给药 1 d 后	给药 3 d 后
假手术	—	0	0	0
模型	—	2.50 ± 0.29	2.76 ± 0.25 [▲]	3.14 ± 0.33 ^{▲*}
VT	0.94	2.57 ± 0.27	2.41 ± 0.26 [*]	2.28 ± 0.28 ^{*▲}
	1.88	2.55 ± 0.26	2.29 ± 0.28 ^{*▲}	2.04 ± 0.21 ^{*#▲*}
	3.76	2.46 ± 0.28	2.02 ± 0.23 ^{*#Δ▲}	1.82 ± 0.17 ^{*#Δ▲*}

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 VT 低剂量组比较: # $P < 0.05$; 与 VT 中剂量组比较: Δ $P < 0.05$; 与给药前比较: ▲ $P < 0.05$; 与给药 1 d 比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs VT low dose group; Δ $P < 0.05$ vs VT medium dose group; ▲ $P < 0.05$ vs before administration; * $P < 0.05$ vs 1 d after administration

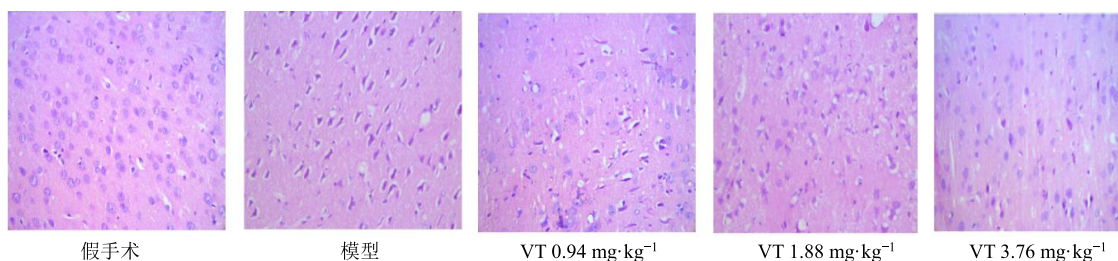


图 1 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经元细胞形态的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of VT on morphology of neuronal cells in rats with ACI reperfusion (× 200)

表 2 VT 对 ACI 再灌注大鼠脑组织 DNA 链断裂损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 2 Effect of VT on DNA strand break injury in brain tissue of rats with ACI reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	DNA 单链断裂损伤率/%	DNA 双链断裂损伤率/%
假手术	—	5.10 ± 1.11	4.17 ± 0.84
模型	—	46.17 ± 3.22 [▲]	32.59 ± 3.57 [▲]
VT	0.94	43.06 ± 3.17 ^{▲*}	29.11 ± 2.23 ^{▲*}
	1.88	39.62 ± 3.72 ^{▲##}	26.01 ± 2.06 ^{▲##}
	3.76	35.78 ± 3.10 ^{▲##Δ}	22.94 ± 1.96 ^{▲##Δ}

与假手术组比较: [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 VT 低剂量组比较: ^{##} $P < 0.05$; 与 VT 中剂量组比较: ^Δ $P < 0.05$, 下同

[▲] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; ^{##} $P < 0.05$ vs VT low dose group; ^Δ $P < 0.05$ vs VT medium dose group; same as below

表 3 VT 对 ACI 再灌注大鼠脑组织 INF- γ 、IL-4 水平、INF- γ /IL-4 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 3 Effects of VT on INF- γ , IL-4 levels and INF- γ /IL-4 of rats with ACI reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	INF- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	INF- γ /IL-4
假手术	—	420.44 ± 40.38	157.21 ± 14.28	2.67 ± 0.27
模型	—	782.90 ± 76.87 [▲]	98.71 ± 9.53 [▲]	7.93 ± 0.71 [▲]
VT	0.94	701.05 ± 68.44 ^{▲*}	112.39 ± 10.67 ^{▲*}	6.24 ± 0.60 ^{▲*}
	1.88	611.75 ± 60.28 ^{▲##}	124.03 ± 11.34 ^{▲##}	4.93 ± 0.59 ^{▲##}
	3.76	514.64 ± 45.90 ^{▲##Δ}	135.62 ± 12.20 ^{▲##Δ}	3.79 ± 0.32 ^{▲##Δ}

性氨基酸毒性作用、钙离子内流、过量氧自由基生成清除障碍等机制,可加重或持续造成脑神经元细胞损伤,影响神经功能,严重者引发机体多系统损害,甚至死亡,因此,ACI 再灌注治疗过程中的神经保护至关重要^[8-9]。近年来研究发现,Th1/Th2 漂移与脑缺血再灌注损伤关系密切^[10],可通过调节局部组织内促炎因子和抗炎因子水平而加重损伤程度,影响预后恢复,因此,寻找有效药物调节 Th1/Th2 间的平衡状态,对减少缺血再灌注损伤十分重要。

3.5 VT 对 ACI 再灌注大鼠脑组织 INF- γ 、IL-4 水平及 INF- γ /IL-4 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 INF- γ 水平显著升高,IL-4 水平显著降低,INF- γ /IL-4 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,VT 各剂量组大鼠脑组织 INF- γ 水平显著降低,IL-4 水平显著升高,INF- γ /IL-4 显著降低 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。结果见表 3。

4 讨论

随着饮食结构的调整及老龄化日益严重,ACI 已成为危害人们健康的主要疾病之一,其发病原因多样,高龄、糖尿病、高血脂症、过量运动及遗传因素等均是导致 ACI 发生的危险因素^[7]。ACI 再灌注损伤的发生涉及复杂的病理生理过程,涉及兴奋

Longa 线栓法闭塞再灌注大鼠中动脉与临床中 ACI 再灌注发病过程相似,且操作简单,模型成功率较高,已成为目前研究 ACI 再灌注的经典模型之一^[11]。本研究将 Longa 神经功能缺陷评分在 1~3 分设定为模型制备成功标准,符合临床中 ACI 发病时向脑缺血部位对侧倾倒的临床症状^[12],在 ACI 缺血再灌注后,给予不同剂量 VT 进行干预,发现各组大鼠神经功能评分均有所下降,且与给药剂量呈显著正相关,提示 VT 对 ACI 再灌注神经功能具有保护作用。VT 属于黄酮碳苷药物,临床关

于 VT 的研究主要集中于抗病毒、抗炎等方面。蒋伟等^[13]应用不同剂量 VT 对 D-半乳糖所致亚急性衰老小鼠进行干预,发现 VT 可显著改善海马区神经元细胞结构和功能,对衰老小鼠脑损伤具有保护作用。本研究 HE 染色结果显示,模型组大鼠神经元细胞损伤严重,VT 各剂量组大鼠给药 3 d 后细胞损伤情况均有所减轻,VT 高剂量组大鼠减轻最为明显,提示 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经功能具有保护作用,其中 3.76 mg/kg 保护作用最佳。

此外,本研究中,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率,INF- γ 水平及 INF- γ /IL-4 较显著升高 ($P<0.05$),IL-4 水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,VT 各剂量组大鼠脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率,INF- γ 水平及 INF- γ /IL-4 均显著降低 ($P<0.05$),IL-4 水平显著升高 ($P<0.05$),其中 VT 高剂量组大鼠给药 3 d 后上述指标变化最大,提示 VT 对 ACI 再灌注大鼠神经功能的保护作用可能与调节 Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 漂移有关。ACI 发病过程涉及的多种病理反应最终均会作用于损伤区域细胞的 DNA,使细胞的 DNA 双链和单链损伤而断裂,而缺血再灌注损伤会加重脑细胞 DNA 损伤^[14]。本研究应用 VT 对 ACI 再灌注大鼠干预后发现,脑组织 DNA 单链、双链断裂损伤率均降低,说明缺血再灌注损伤减轻,脑组织细胞损伤范围减小。研究发现,T 淋巴细胞在脑缺血再通的早期阶段可部分被激活,参与脑组织损伤过程,但具体调控机制尚未阐明,通过分析发现,可能是通过调控 Th1 细胞分泌促炎因子(INF- γ 、肿瘤坏死因子- α 等)、Th2 细胞分泌抗炎因子(IL-4、IL-10 等)发挥调控作用^[15-16]。VT 等黄酮类药物对一氧化氮(NO)等自由基具有清除作用,而 NO 属于体内信号转导气体信号分子^[17],参与调节 IL-2、TNF- γ 的合成和分泌,IL-2、TNF- γ 可诱导 Th 细胞向 Th2、Th1 亚群分化,从而间接调控 Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移。本研究应用不同浓度 VT 对 ACI 再灌注大鼠进行干预,有效降低了缺血再灌注后脑组织细胞的 DNA 链断裂损伤率,同时改善 Th1/Th2 失衡状态,证实 VT 可能通过调节 Th1/Th2 失衡、减少炎症对脑细胞的损伤而起到保护神经功能的作用。

综上所述,VT 对 ACI 再灌注大鼠神经功能具有保护作用,其中 3.76 mg/kg 保护作用最佳,可能与调节 Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 漂移有关,为临床

中 VT 相关药物的研发及应用于 ACI 再灌注神经保护的相关治疗中提供理论支持,但关于 VT 是否同时通过其他调控机制发挥神经保护作用仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Hansen C K, Christensen A, Ovesen C, *et al.* Stroke severity and incidence of acute large vessel occlusions in patients with hyper-acute cerebral ischemia: Results from a prospective cohort study based on CT-angiography (CTA) [J]. *Int J Stroke*, 2015, 10(3): 336-342.
- [2] Thorén M, Azevedo E, Dawson J, *et al.* Predictors for cerebral edema in acute ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis [J]. *Stroke*, 2017, 48(9): 2464-2471.
- [3] Lv G, Wang G Q, Xia Z X, *et al.* Influences of blood lipids on the occurrence and prognosis of hemorrhagic transformation after acute cerebral infarction: A case-control study of 732 patients [J]. *Mil Med Res*, 2019, 6(1): 2-6.
- [4] Min J W, Kong W L, Han S, *et al.* Vitexin protects against hypoxic-ischemic injury via inhibiting Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and apoptosis signaling in the neonatal mouse brain [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 25513-25524.
- [5] 颜娟,郑茂东,崔玉环,等. 牡荆苷对脑缺血再灌注损伤小鼠抗氧化酶的影响 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(33): 12-15.
- [6] 马贤德,孙宏伟,柴纪严,等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(6): 1200-1201.
- [7] Wang R, Zeng J, Chen X, *et al.* Risk factors of hemorrhagic transformation after intravenous thrombolysis with rt-PA in acute cerebral infarction [J]. *QJM-Int J Med*, 2018, 111(3): 891-895.
- [8] Hosoo H, Marushima A, Nagasaki Y, *et al.* Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticles in mice [J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2238-2247.
- [9] 安祥,阳昀,刘开祥,等. 肢体缺血后处理通过 Nrf2/ARE 通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 广西医学, 2017, 39(7): 1029-1031.
- [10] Luo Y, Zhou Y, Xiao W, *et al.* Interleukin-33 ameliorates ischemic brain injury in experimental stroke through promoting Th2 response and suppressing Th17 response [J]. *Brain Res*, 2015, 1597(1): 86-94.
- [11] Li Y, Xu Q Q, Shan C S, *et al.* Combined use of emodin and ginsenoside Rb₁ exerts synergistic neuroprotection in

- cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(1): 943-949.
- [12] Nai Y, Liu H, Bi X, *et al*. Protective effect of astaxanthin on acute cerebral infarction in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(9): 929-936.
- [13] 蒋 伟, 屈海琪, 袁丹华, 等. 金莲花中苾草苷和牡荆苷对-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1376-1380.
- [14] Ma A, Dai X. The relationship between DNA single-stranded damage response and double-stranded damage response [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(1): 73-79.
- [15] Pang X, Qian W. Changes in regulatory T-cell levels in acute cerebral ischemia [J]. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 2017, 78(4): 374-379.
- [16] 卢志刚, 刘 芸, 卢 青. 醒脑静注射液对急性脑梗死血瘀证患者外周血单个核细胞 T 淋巴细胞的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(12): 218-220.
- [17] Chen Y, Lv W, Jia J, *et al*. Evaluation of serum concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2, IL-10, and nitric oxide (NO) during the estrous cycle, early pregnancy and abortion in goats [J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 174(1): 73-79.