

## • 药理与临床 •

## 桃红四物汤通过调节乙酰肝素酶/金属基质蛋白酶-9 通路改善缺血性脑卒中 大鼠微血管内皮糖萼损伤

张家瑜, 杨寒雪, 韩 岚\*

安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

**摘要:** 目的 探究桃红四物汤通过保护脑微血管内皮糖萼完整性与功能性减轻脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 的作用机制。方法 建立大脑中动脉闭塞再灌注 (middle cerebral artery occlusion-reperfusion, MCAO/R) 模型以模拟 CIRI 损伤, 将 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组及桃红四物汤低、中、高剂量 (4.5、9.0、18.0 g/kg) 组和尼莫地平 (20 mg/kg) 组, 给予药物干预。造模 7 d 后, 采用 Longa 分级评分法进行神经功能评分, 采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色评估脑梗死体积, 通过转角实验、平衡木实验评价运动功能; 利用激光散斑、小动物超分辨率成像检测脑血流及脑血管密度, 结合伊文思蓝渗漏实验、Western blotting 实验评估血脑屏障完整性; 采用透射电镜观察糖萼形态; 采用免疫荧光、免疫组化、Western blotting 及 ELISA 检测糖萼相关指标多配体蛋白聚糖-1 (syndecan-1, SDC-1)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS)、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 及糖萼核心代谢酶乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE)、透明质酸酶 2 (hyaluronidase 2, Hyal2)、唾液酸酶 1 (neuraminidase 1, Neu1)、金属基质蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达, 并通过酶抑制剂验证 HPSE、MMP-9 的作用。结果 与模型组比较, 桃红四物汤显著降低 MCAO/R 大鼠脑梗死体积 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 改善神经功能及四肢协调能力 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 缓解体质量减轻, 改善梗死区脑血流及微血管生成, 减少血脑屏障渗漏 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 调节血管舒缩功能 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 同时桃红四物汤能显著减少糖萼核心成分 (CS、HA、HS、SDC-1) 脱落至血清 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 通过抑制 HPSE 及 MMP-9 活性, 保留糖萼完整性。结论 桃红四物汤通过抑制 HPSE 及 MMP-9 活性, 减少糖萼脱落, 维持血脑屏障完整性, 减少脑卒中损伤。

**关键词:** 桃红四物汤; 缺血性卒中; 糖萼; 血脑屏障; 乙酰肝素酶; 金属基质蛋白酶-9; 羟基红花黄色素 A; 苦杏仁苷; 芍药苷; 毛蕊花糖苷; 阿魏酸; 藁本内酯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5082-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.012

## Taohong Siwu Decoction regulates microvascular endothelial glycocalyx damage in rats with ischemic stroke by regulating heparanase/matrix metalloproteinase-9 pathway

ZHANG Jiayu, YANG Hanxue, HAN Lan

Department of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism by which Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤, THSWD) alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) through protecting the integrity and functionality of glycocalyx of brain microvascular endothelial cells. **Methods** A model of middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO/R) was established to simulate CIRI injury. SD rats were randomly divided into sham group, model group, THSWD low-, medium-, high-dose (4.5, 9.0, 18.0 g/kg) groups and nimodipine (20 mg/kg) group, and drugs were given for intervention. After 7 d of modeling, Longa grading system was used for neurological function evaluation, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to assess cerebral infarction volume. The motion

收稿日期: 2026-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074152)

作者简介: 张家瑜, 男, 硕士研究生, 研究方向为心脑血管药理。E-mail: zjy031030@163.com

\*通信作者: 韩 岚, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药复方应用等研究。E-mail: hanlan56@ahctm.edu.cn

function was evaluated through corner experiments and balance beam experiments. Laser speckle and small animal super-resolution imaging were used to detect cerebral blood flow and cerebral vascular density, Evans blue leak assay combined with Western blotting were to evaluate blood-brain barrier integrity. Glycocalyx morphology was observed using transmission electron microscopy. The expression of glycocalyx-related indicator such as syndecan-1 (SDC-1), hyaluronic acid (HA), heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate (CS) and core metabolic enzymes of glycocalyx such as heparanase (HPSE), hyaluronidase 2 (Hyal2), neuraminidase 1 (Neu1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by immunofluorescence, immunohistochemistry, Western blotting and ELISA, and the effects of HPSE and MMP-9 were verified by enzyme inhibitors. **Results** Compared with model group, THSWD significantly reduced the cerebral infarction volume in MCAO/R rats ( $P < 0.05, 0.001$ ), improved neurological function and limb coordination ability ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), alleviated weight loss, improved cerebral blood flow and microvascular generation in the infarct area, reduced blood-brain barrier leakage ( $P < 0.01, 0.001$ ), regulated vascular dilation and contraction function ( $P < 0.01, 0.001$ ). Meanwhile, THSWD could significantly reduce the shedding of core components of glycocalyx (CS, HA, HS, SDC-1) into the serum ( $P < 0.01, 0.001$ ), and maintain the integrity of glycocalyx by inhibiting the activities of HPSE and MMP-9. **Conclusion** THSWD reduces the shedding of glycocalyx by inhibiting the activity of HPSE and MMP-9, thereby maintaining the integrity of blood-brain barrier and minimizing stroke damage.

**Key words:** Taohong Siwu Decoction; ischemic stroke; glycocalyx; blood-brain barrier; heparanase; matrix metalloproteinase-9; hydroxysafflor yellow A; amygdalin; paeoniflorin; acteoside; ferulic acid; ligustilide

卒中是脑血管突发破裂或梗阻而导致脑组织缺血缺氧等一系列损伤致死的急性脑血管疾病<sup>[1-3]</sup>。截至 2021 年, 全球现存缺血性脑卒中患者数量已达到 6 994 万<sup>[4-6]</sup>。我国缺血性脑卒中发病率约占所有脑卒中的 80%以上<sup>[7-9]</sup>。目前, 临床治疗上对于缺血性脑卒中治疗金标准依旧是组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, tPA) 静脉溶栓与机械取栓, 但其严格的治疗窗口限制以及并发症限制使得多数患者错过或失去疾病最佳干预时期<sup>[10-14]</sup>, 研发新的治疗方法已成为研究热点。

糖萼是覆盖于血管内皮细胞表面的一层凝胶状糖胺聚糖-蛋白聚糖的复合物, 是血管内皮与血液成分接触的首道屏障<sup>[15-18]</sup>。糖萼作为体内直接与血液交换的第一道屏障, 是维持脑微血管循环稳态的重要因素之一<sup>[19-20]</sup>。在脑缺血再灌注时期, 糖萼大量降解、断裂, 糖萼功能性与完整性均丢失, 导致血脑屏障受损, 使患者病情恶化<sup>[21-25]</sup>。糖萼的降解与脱落主要受 2 种酶的调控, 即金属基质蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 与乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE), 二者协同作用破坏糖萼的结构与功能。因此抑制 MMP-9 与 HPSE 的活性, 减少糖萼的降解与脱落, 维持糖萼结构与功能完整性, 有望成为减轻脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)、改善缺血性脑卒中患者预后的新靶点<sup>[26-30]</sup>。

桃红四物汤是我国古代经典活血化瘀方剂, 源自清代《医宗金鉴》, 由桃仁、红花、当归、川芎、熟地黄、白芍 6 味药材配伍而成, 其中桃仁、红花

为君, 活血化瘀; 当归、川芎为臣, 养血活血、行气止痛; 熟地黄、白芍为佐, 滋阴养血, 全方配伍遵循“活血而不伤血、养血而不滞血”的原则, 是临床治疗血瘀证的经典方剂。现代临床及多学科研究评估显示, 桃红四物汤具有促进血管新生、改善微循环、抗炎、抗氧化及神经保护等多重作用<sup>[31-32]</sup>, 现临床多用于妇科及骨科疾病中, 随着对桃红四物汤药效机制的探究, 其在缺血性脑卒中中的治疗作用日益发展, 但桃红四物汤对缺血性脑卒中治疗的确切机制仍有待探索。糖萼作为血脑屏障的重要组成部分, 桃红四物汤是否能抑制 HPSE 活性, 减少糖萼硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 侧链的降解及抑制 MMP-9 的活性, 减少多配体蛋白聚糖-1 (syndecan-1, SDC-1) 锚定蛋白的剪切, 从而保护脑微血管内皮糖萼的完整性及功能性, 减轻 CIRI 损伤尚不明确。本研究旨在为中医药治疗缺血性脑卒中提供新的作用靶点与理论依据, 同时为桃红四物汤在脑血管疾病领域的临床应用提供实验支撑, 推动中医药现代化融合发展。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 198 只, 体质量 (250 ± 20) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物生产许可证 SCXK (辽) 2025-0001。大鼠适应性饲养 7 d 后开始实验, 饲养环境保持通风, 温度 (24 ± 2) °C, 相对湿度为 55%, 室内明暗周期控制为 12 h/12 h, 自由进食饮水。动物实验经安徽中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 AHUCM-rats-

2024183)。

## 1.2 药材

桃仁(批号 25021501)、红花(批号 25010310)、川芎(批号 24120702)、当归(批号 24122902)、白芍(批号 24062006)、熟地黄(批号 24090614)均购自安徽协和成药业饮片有限公司,经安徽中医药大学中药资源系杨青山教授分别鉴定为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。

## 1.3 药品与试剂

2% 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色液(批号 BL1215A) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 尼莫地平(批号 211275) 购自亚宝药业太原制药有限公司; 2%伊文思蓝(货号 BL2312A) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 硝酸镧(货号 L812372) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; HPSE 抑制剂 OGT2115(货号 853929-59-6)、MMP-9 抑制剂 MMP-9-IN-1(货号 502887-71-0) 购自美国 Selleck Chemicals LLC 公司; Occludin 抗体(批号 27260-1-AP)、ZO-1 抗体(批号 21773-1-AP)、SDC-1 抗体(批号 84069-6-RR)、透明质酸酶 2 (hyaluronidase 2, Hyal2) 抗体(批号 15115-1-AP)、MMP-9 抗体(批号 10375-2-AP)、唾液酸酶 1 (neuraminidase 1, Neu1) 抗体(批号 67032-1-Ig)、 $\beta$ -actin 抗体(批号 20536-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; Claudin5 抗体(批号 35-2500) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; HPSE 抗体(批号 ab288438)、CD31 抗体(批号 b182981) 购自英国 Abcam 公司; 内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 试剂盒(批号 MM-0560R1) 购自江苏酶免实业有限公司; 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒(批号 S0021S) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司; 透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 试剂盒(货号 LCSJZF30811)、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 试剂盒(货号 ED-36010)、SDC-1 试剂盒(货号 LCSJZF30335)、HS 试剂盒(货号 ED-30612) 购自厦门仑昌硕生物科技有限公司; WGA-FITC 抗体(批号 GTX01502) 购

自美国 GeneTex 公司。

## 1.4 仪器

RM2016 型徕卡切片机、Leica819 型 Leica 切片刀(德国 Leica 公司); RFLSI HR 型激光散斑血流成像、R583S 型异氟烷蒸发器、M1416R 型冷冻高速离心机(深圳瑞沃德生命科技有限公司); DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); AUW220D 型天平(株式会社岛津制作所); ULTIMUS 9LAB 型超分辨率小动物超声成像(飞依诺科技股份有限公司); ZT-12M 型生物组织自动脱水机(孝感市亚光医用电子技术有限公司); HT7800/HT7700 型透射电子显微镜(日本日立高新技术株式会社); 733BR6103 型化学发光凝胶成像系统(美国伯乐生命医学产品有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 桃红四物汤的制备

参照中国中医药出版社第 7 版《方剂学》,按桃仁:红花:熟地黄:当归:白芍:川芎=3:2:4:3:3:2 的比例称取各味药材并混合均匀,加入 10 倍量 75%乙醇,回流提取 2 h,滤过;滤渣加入 8 倍量 75%乙醇,继续回流提取 2 h。合并 2 次滤液,浓缩至生药量 1.8 g/mL,于 -20 °C 保存备用。本研究所使用的桃红四物汤醇提物与 Tang 等<sup>[19]</sup>所使用的醇提物为同一批次提取物,桃红四物汤中含羟基红花黄色素 A 2.227  $\mu\text{g/mL}$ 、苦杏仁苷 6.052  $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 19.657  $\mu\text{g/mL}$ 、毛蕊花糖苷 0.165  $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 0.875  $\mu\text{g/mL}$  和藜本内酯 7.550  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2 大鼠大脑中动脉闭塞再灌注 (middle cerebral artery occlusion-reperfusion, MCAO/R) 模型的建立、分组与给药

采用线栓法建立 MCAO/R 损伤模型以模拟 CIRI<sup>[19]</sup>。设置假手术组、模型组及桃红四物汤低、中、高剂量 (4.5、9.0、18.0 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1.13、2.25、4.50 倍) 组和尼莫地平 (20 mg/kg) 组, 每组 21 只, 考察桃红四物汤对 CIRI 的药效作用。桃红四物汤低、中、高剂量均以生药量计算, 药物质量浓度为 1.8 g/mL。设置假手术组、模型组、桃红四物汤 (18 g/kg) 组、OGT2115 (12.5 mg/kg) + 假手术组、OGT2115 (12.5 mg/kg) + 模型组、OGT2115 (12.5 mg/kg) + 桃红四物汤 (18 g/kg) 组, 每组 6 只, 考察 HPSE 对桃红四物汤抗 CIRI 的影响。设置假手术组、模型组、桃红四物汤 (18 g/kg) 组、MMP-9-IN-1 (0.25 mg/kg) + 假手

术组、模型组、桃红四物汤 (18 g/kg) 组、MMP-9-IN-1 (0.25 mg/kg) + 模型组、MMP-9-IN-1 (0.25 mg/kg) + 桃红四物汤 (18 g/kg) 组, 每组 6 只, 考察 MMP-9 对桃红四物汤抗 CIRI 的影响。造模后第 2 天开始给药, 桃红四物汤组和尼莫地平组 ig 给药 (10 mL/kg), 假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。MMP-9-IN-1 于造模后 3 h 后 sc 给药, 持续注射 7 d; OGT2115 于造模后 3 h 后 ip 给药, 持续注射 7 d。

### 2.3 Longa 分级评分

依据 Longa 等的评分方法<sup>[33]</sup>对各组大鼠进行神经功能缺损情况评分。具体评分标准见表 1。

表 1 Longa 5 级评分原则

Table 1 Longa five levels grading principles

分数	Longa 评分方法
0	神经功能无任何损伤, 运动功能基本无障碍
1	神经功能轻微损伤, 提起尾部时损伤对侧前肢弯曲, 不可完全伸展
2	神经功能中度损伤, 爬行时向损伤对侧弯曲
3	神经功能重度损伤, 爬行时向损伤对侧倾倒
4	神经功能几乎完全丧失, 不能自主行走, 几乎偏瘫
5	动物死亡

### 2.4 TTC 染色检测脑梗死体积

大鼠麻醉后取脑, 快速冷冻 30 min; 随后将脑组织均匀切成约 2 mm 厚的切片, 统一面朝上放置于多孔板中并编号。每孔加入适量 TTC 染液, 用锡箔纸包裹避光, 在 37 °C 恒温条件下孵育 25 min。孵育结束后吸去 TTC 染液, 加入 4% 多聚甲醛溶液完全浸没脑片固定过夜。对固定后的脑片进行拍照, 采用 Image J 软件进行图像分析。各脑切片梗死面积之和作为总梗死面积, 总梗死面积与脑片厚度的乘积即为梗死体积, 计算校正梗死体积百分比。

校正梗死体积百分比 = 梗死体积 × (对侧半球体积 / 同侧半球体积)

### 2.5 体质量指数

分别记录大鼠造模前大鼠体质量及造模后第 3、7 天大鼠体质量, 根据体质量变化判断 MCAO/R 模型的损伤及药物干预的影响。

体质量指数 = 术后 *n* 天体质量 / 术前体质量

### 2.6 平衡木实验评价运动功能

平衡木实验一般用于评价大鼠 MCAO/R 术后四肢运动协调与平衡功能。造模前 3 d 对大鼠进行走平衡木训练, 使每只大鼠均可在 1 min 内平稳通过平衡木。实验装置为自制长条形横木 (宽 2.5 cm,

长 1 m), 由 2 个高度 50 cm 的支架支撑; 实验在安静、光线较暗的环境中进行, 大鼠在横木上完成行走测试。于给药第 7 天对造模成功的 MCAO/R 大鼠实施平衡木实验, 评分标准: 0 分, 大鼠无法在横木上保持站立; 1 分, 大鼠可停留于横木但不移动; 2 分, 大鼠尝试通过但中途跌落; 3 分, 大鼠后肢足迹超过 50%; 4 分, 大鼠足迹超过 1 个但不足 50%; 5 分, 大鼠仅出现 1 次后肢打滑; 6 分, 大鼠顺利通过横木, 表现正常。

### 2.7 转角实验评价运动功能

转角实验用于评价脑缺血损伤后的综合感觉运动功能和大鼠肢体协调功能。将大鼠放入 1 个由 2 块板所形成的 30° 夹角内, 健康动物通常表现为相同数量的左转或右转, 但受损的动物优先转向病变同侧的一侧。每只大鼠测试 10 次, 间隔 30 s, 记录大鼠右转次数。

### 2.8 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察大鼠脑组织病理变化

取新鲜的脑组织, 经过固定、分级脱水处理后制成石蜡标本, 使用切片机切成厚度为 4 μm 的连续切片。切片进行 HE 染色后, 在光学显微镜下观察并拍照。

### 2.9 激光散斑血流成像 (laser speckle contrast imaging, LSCI) 评价大鼠术后脑部血流恢复情况

大鼠麻醉后, 用剪刀剪开大鼠脑部表面皮肤, 用镊子撕开黏膜组织, 暴露其上脑壳, 用棉签蘸取过氧化氢溶液腐蚀脑黏膜, 将其上脑壳清理干净后, 用颅骨钻打磨上脑壳, 打磨至肉眼可清晰观察到脑部微小血管, 上机成像。

### 2.10 超分辨率小动物超声成像 (super-resolution ultrasound imaging for small animals, SRUS) 评估大鼠术后脑血管密度

大鼠麻醉后, 剪刀剪开大鼠脑部表面皮肤, 用镊子撕开黏膜组织, 暴露其上脑壳, 用棉签蘸取过氧化氢溶液腐蚀脑黏膜, 将其上脑壳清理干净后, 用颅骨钻打磨上脑壳, 打磨至肉眼可清晰观察到脑部微小血管, 使用脑立体定位仪固定大鼠, 充分暴露大脑, 尾 iv 可视化微泡后上机检测。

### 2.11 伊文思蓝染色检测大鼠血脑屏障损伤情况

大鼠尾 iv 2% 伊文思蓝 (3 mL/kg), 让染料在体内循环 3 h; 随后用 4 °C 的 PBS 进行心内灌注, 取出大脑进行拍照, 将其浸泡在 1 mL 的 50% 三氯乙酸中。用组织研磨器将脑组织匀浆, 4 °C、14 000 × g

离心 30 min, 收集上清液, 加入 3 倍体积的无水乙醇混合, 在 630 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。

### 2.12 Western blotting 检测大鼠脑组织相关蛋白表达

取脑组织, 加入裂解液匀浆, 使用 BCA 法测定蛋白质浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶于室温封闭 2 h 后, 分别加入 Occludin、ZO-1、Claudin5、SDC-1、Hyal2、MMP-9、Neu1、HPSE、 $\beta$ -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 1 h。使用 ECL 化学发光液显影并成像后, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

### 2.13 免疫荧光检测大鼠脑组织 SDC-1 和 WGA-FITC 蛋白表达

脑组织切片经 60 °C 烤片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 进行抗原热修复; 再以 3%  $H_2O_2$  灭活内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 依次孵育一抗、二抗及 TSA 荧光染料; DAPI 复染后抗荧光淬灭封片, 于显微镜下观察并拍照。

### 2.14 免疫组化检测大鼠脑组织 SDC-1 蛋白表达

脑组织切片经脱蜡、水化、抗原修复后, 通过  $H_2O_2$  阻断内源性酶, 血清封闭, 依次孵育一抗、二抗, DAB 显色, 苏木素衬染 2 min, 水洗干净; 1% 盐酸乙醇分化数秒, 水洗干净。碳酸锂溶液蓝化 30 s, 水洗干净。常规脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

### 2.15 透射电镜检测糖萼结构

大鼠麻醉后固定, 开胸暴露心脏, 先用含肝素钠生理盐水灌注约 5 min 至流出液清亮, 再用含碳酸镧的碳酸氢钠缓冲液灌注 10 min。灌注完毕快速取脑, 冰上取皮层组织, 置于预冷的 2.5% 戊二醛中于 4 °C 保存。标本经 PBS 漂洗 6 h、1% 锇酸固定 2 h 后, 依次用 30%、50%、70% (含醋酸铀)、80%、95%、100% 乙醇及环氧丙烷梯度脱水。经环氧丙烷-环氧树脂 (1:1) 浸透 2 h、纯树脂浸泡 3 h 后包埋, 45 °C 烘 12 h、72 °C 烘 24 h。修整包埋块后进行 70 nm 超薄切片, 铜网捞片、铅染色, 采用透射电镜观察并拍照。

### 2.16 ELISA 检测血清中 ET-1、NO、SDC-1、HA、HS、CS 和脑组织 SDC-1、HA、HS、CS 水平

大鼠麻醉后腹主动脉取血, 静置 0.5 h, 于预冷的离心机中 4 000 r/min 离心 15 min 后取上清。取脑组织, 与适量预冷 PBS 溶液混合后于组织研磨机

中充分研磨, 静置 30 min 后取上清液, 在离心机中 4 °C、14 000  $\times g$  离心 30 min, 收集上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 ET-1、NO、HS、HA、CS、SDC-1 和脑组织中 HS、HA、CS、SDC-1 水平。

### 2.17 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.4.2 软件进行统计分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析进行多组比较, 然后进行最低显著性差异检验。采用独立的样本  $t$  检验进行组间的比较。

## 3 结果

### 3.1 桃红四物汤改善 MCAO/R 大鼠脑损伤

在成功建立 MCAO/R 模型后, 大鼠 ig 桃红四物汤或尼莫地平 (图 1-A), 考察桃红四物汤对 MCAO/R 大鼠脑损伤的修复效果。如图 1-B 所示, MCAO/R 导致大鼠体重质量指数降低, 给药后大鼠体重质量指数升高, 其中桃红四物汤高剂量组与尼莫地平组作用相当。HE 染色结果 (图 1-C) 显示, 假手术组大脑皮层结构完整、细胞排列整齐; 模型组可见广泛梗死、水肿、出血及炎性浸润; 桃红四物汤低、中剂量组损伤减轻, 高剂量组与尼莫地平组结构接近正常, 提示桃红四物汤可改善脑皮层病理损伤, 其中高剂量组效果最佳。TTC 染色结果 (图 1-D、E) 显示, 与模型组比较, 桃红四物汤和尼莫地平治疗后显著减少脑梗死体积 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。通过转角实验、神经功能缺损评分和平衡木实验评估 MCAO/R 大鼠肢体协调性和神经功能障碍, 结果如图 1-F~H 所示, 与模型组比较, 给药后大鼠肢体协调性和神经功能障碍均不同程度地减轻, 其中桃红四物汤高剂量组和尼莫地平组均具有统计学差异 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

### 3.2 桃红四物汤改善 MCAO/R 大鼠脑微循环灌注以及血脑屏障通透性

实验第 8 天对大鼠进行体内成像, LSCI 结果 (图 2-A) 显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血侧的血流量显著降低; 给药治疗不同程度地恢复了脑血流量。SRUS 结果 (图 2-B~E) 显示, 与模型组比较, 各给药组的血管比率、血管平均密度和血流速度均有不同程度的改善。对大鼠脑组织进行伊文思蓝染色实验, 评估血脑屏障损伤及其在治疗后的恢复情况, 如图 2-F、G 所示, 与模型组比较, 各给药组伊文思蓝染色显著减少 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。采用 Western blotting 检测脑组织紧密连接蛋白表达

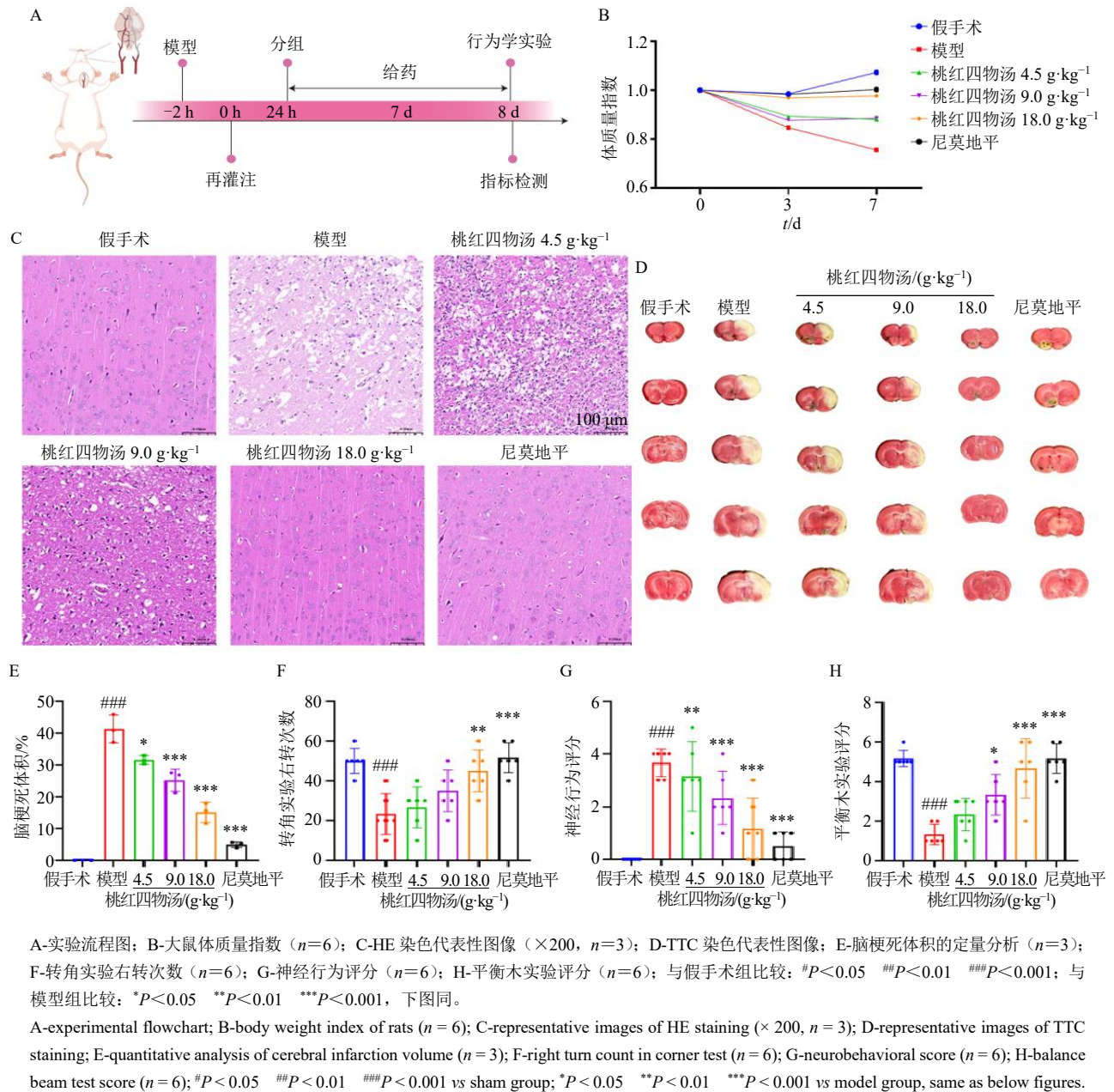


图1 桃红四物汤改善MCAO/R大鼠脑损伤 ( $\bar{x} \pm s$ )

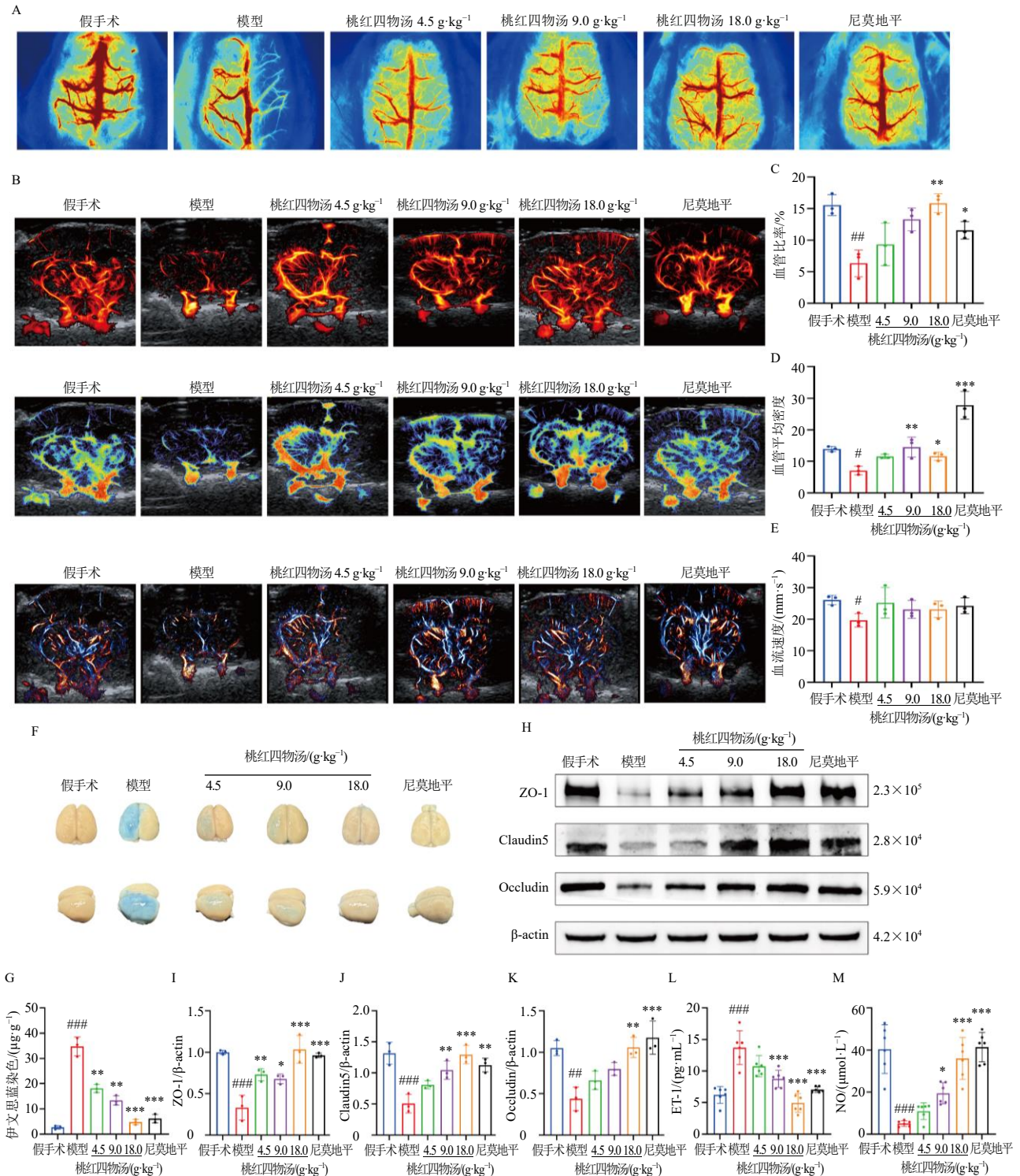
Fig. 1 Taohong Siwu Decoction alleviates brain injury in MCAO/R rats ( $\bar{x} \pm s$ )

水平, 结果如图 2-H~K 所示, 与模型组比较, 各给药组脑组织 ZO-1、Claudin5 和 Occludin 的蛋白表达水平不同程度地升高, 其中桃红四物汤高剂量组和尼莫地平组均具有统计学差异 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), 表明桃红四物汤能够改善 MCAO/R 大鼠血脑屏障损伤。通过 ELISA 测定大鼠血清中 ET-1 和 NO 的水平, 以评估桃红四物汤对血管收缩和舒张的影响, 如图 2-L、M 所示, 与模型组比较, 桃红四物汤中、高剂量组和尼莫地平组血清中 ET-1 水平显著降低 ( $P<0.001$ ), NO 水平显著升高 ( $P<$

$0.05$ 、 $0.001$ ), 表明桃红四物汤减弱了 MCAO/R 大鼠血管收缩功能, 同时增强了血管舒张功能。

### 3.3 桃红四物汤减少 MCAO/R 大鼠脑糖萼脱落

采用免疫荧光和免疫组化染色检测大鼠脑组织中 SDC-1 表达, 如图 3-A~D 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 SDC-1 表达显著降低 ( $P<0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组脑组织 SDC-1 的表达均不同程度地升高, 其中桃红四物汤高剂量组作用最为显著 ( $P<0.001$ )。通过 Western blotting 检测大鼠脑组织 SDC-1 的表达, 如图 3-E、F 所示,

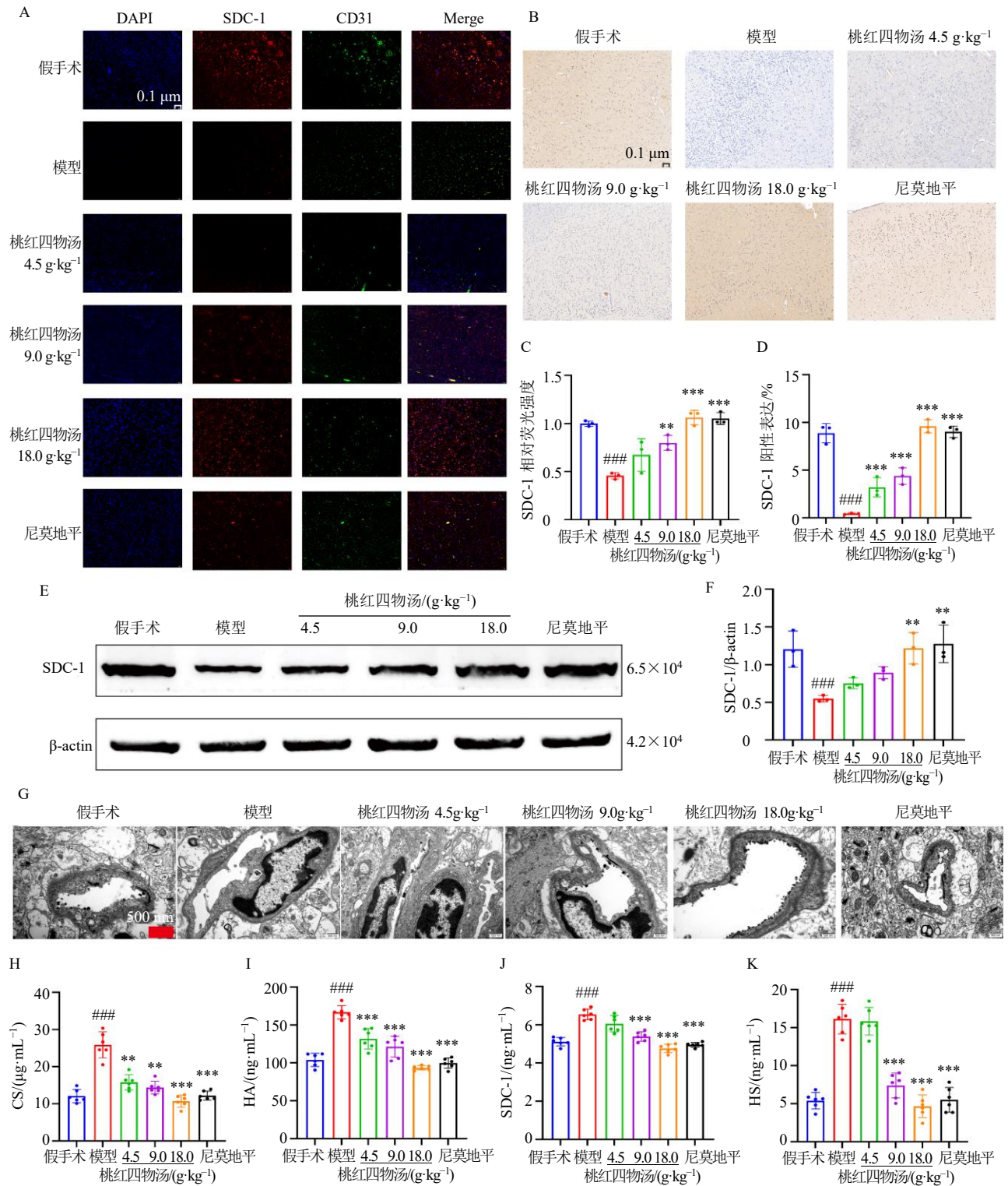


A-激光散斑成像 ( $n=3$ ); B~E-小动物超分辨率活体成像及血管比率、血管平均密度、血流速度定量分析 ( $n=3$ ); F、G-伊文思蓝染色的代表性图像和定量分析 ( $n=3$ ); H~K-Western blotting 测定大鼠脑组织中 ZO-1、Claudin5 和 Occludin 的蛋白表达水平 ( $n=3$ ); L、M-血清中 ET-1 和 NO 水平 ( $n=6$ )。

A-laser speckle imaging ( $n=3$ ); B~E-small animal super-resolution *in vivo* imaging and quantitative analysis of vessel ratio, vascular mean density, blood flow velocity ( $n=3$ ); F、G-representative images and quantitative analysis of Evans blue staining ( $n=3$ ); H~K-protein expression levels of ZO-1, Claudin5 and Occludin in brain tissue of rats detected by Western blotting ( $n=3$ ); L、M-levels of ET-1 and NO in serum ( $n=6$ ).

图2 桃红四物汤促进大鼠 MCAO/R 损伤后血管功能的恢复 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Taohong Siwu Decoction promotes recovery of vascular function after MCAO/R injury in rats ( $\bar{x} \pm s$ )



A、C-免疫荧光染色检测大鼠脑组织 SDC-1 表达 ( $\times 200$ ,  $n=3$ ); B、D-免疫组化检测大鼠脑组织 SDC-1 表达 ( $\times 200$ ,  $n=3$ ); E、F-Western blotting 测定大鼠脑组织中 SDC-1 的蛋白表达水平; G-糖萼的 TEM 图像 ( $\times 25\,000$ ,  $n=3$ ); H~K-大鼠血清中 SDC-1、CS、HA 和 HS 水平 ( $n=6$ )。

A, C-SDC-1 expression in brain tissue of rats detected by immunofluorescence staining ( $\times 200$ ,  $n=3$ ); B, D-SDC-1 expression in brain tissue of rats detected by immunohistochemistry ( $\times 200$ ,  $n=3$ ); E, F-SDC-1 protein expression level in brain tissue of rats detected by Western blotting ( $n=3$ ); G-TEM images of glycocalyx ( $\times 25\,000$ ,  $n=3$ ); H~K-levels of SDC-1, CS, HA and HS in serum of rats ( $n=6$ ).

图 3 桃红四物汤对 MCAO/R 大鼠糖萼损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 3 Protective effect of Taohong Siwu Decoction on glyocalyx injury in MCAO/R rats ( $\bar{x} \pm s$ )

与模型组比较,桃红四物汤高剂量组和尼莫地平组脑组织SDC-1的蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。通过TEM对糖萼进行表征,如图3-G所示,模型组糖萼几乎不可见,而桃红四物汤高剂量组显著减少了糖萼脱落。使用ELISA对糖萼的4个主要成分(HS、HA、CS和SDC-1)进行定量分析,如图3-H~K所示,与假手术组比较,模型组大鼠血清中HS、HA、CS和SDC-1水平显著升高( $P<0.001$ );与模型组比较,各给药组血清中CS、HA水平显著降低( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),桃红四物汤中、高剂量组和尼莫地平组血清中SDC-1、HS水平均显著降低( $P<0.001$ )。

### 3.4 桃红四物汤通过抑制HPSE、MMP-9、Hyal2和Neu1的活性维持糖萼的完整性

为了验证糖萼在脑组织中的表达情况,采用免疫荧光染色检测大鼠脑组织中WGA-FITC的表达。如图4-A、B所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织WGA-FITC的表达显著降低( $P<0.001$ );与模型组比较,桃红四物汤中、高剂量组和尼莫地平组脑组织WGA-FITC的表达显著升高( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),表明桃红四物汤可能通过抑制负责降解其核心成分的代谢酶活性来减少糖萼脱落。选择最有可能参与大鼠大脑中4种核心成分降解的代谢酶,通过Western blotting检测大鼠脑组织代谢酶的表达,如图4-C~G所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织HPSE、MMP-9、Hyal2和Neu1的蛋白表达水平显著升高( $P<0.001$ );与模型组比较,桃红四物汤高剂量组和尼莫地平组脑组织HPSE的蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),各给药组MMP-9、Hyal2和Neu1的蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),表明桃红四物汤通过抑制这4种代谢酶的活性来减少糖萼的脱落。使用ELISA对糖萼的4个主要成分(HS、HA、CS和SDC-1)进行定量分析,如图4-H~K所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中HS、HA、CS和SDC-1水平显著降低( $P<0.001$ );与模型组比较,桃红四物汤中、高剂量组和尼莫地平组脑组织中HA、SDC-1水平显著升高( $P<0.001$ ),各给药组脑组织中HS、CS水平显著升高( $P<0.001$ )。

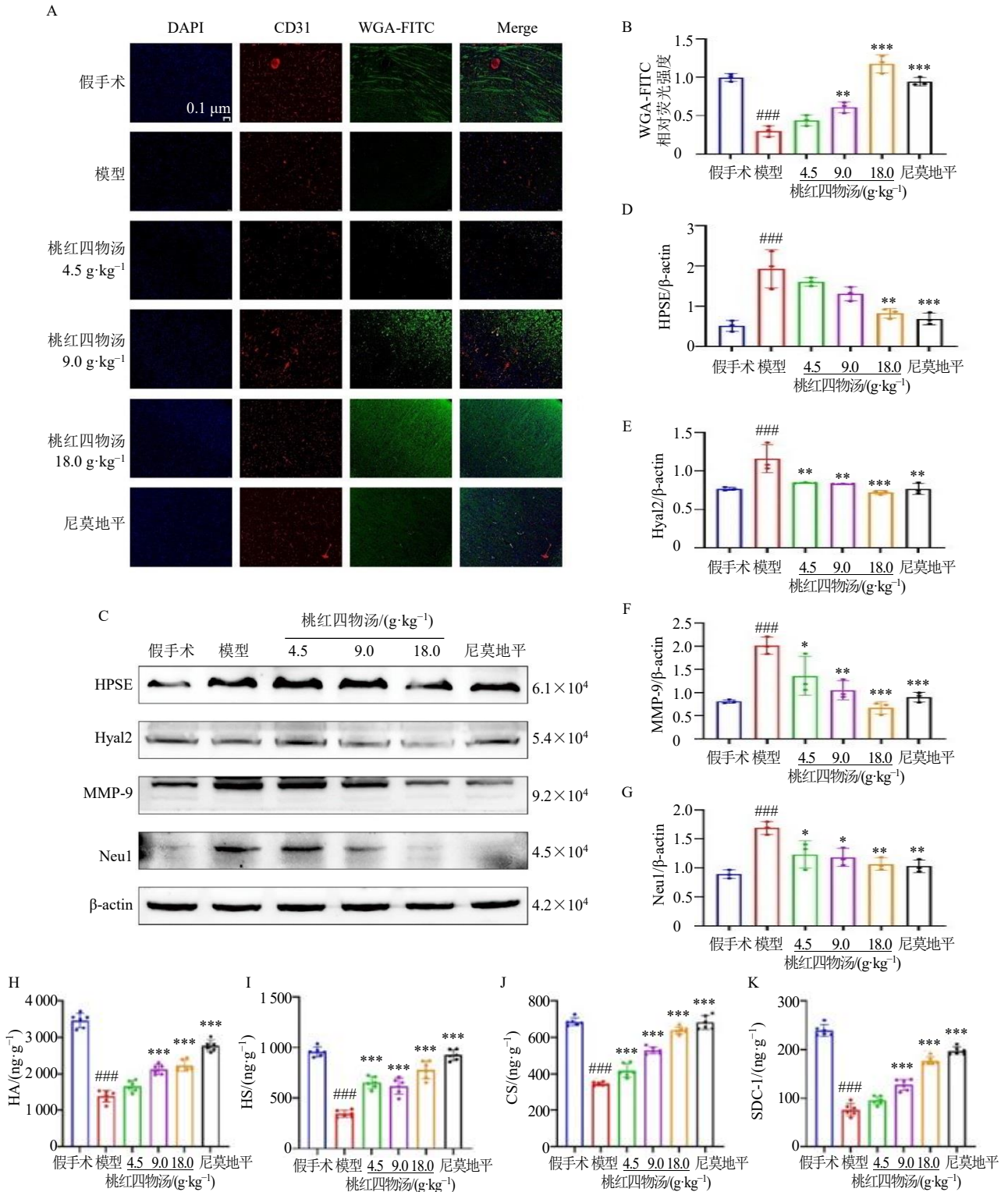
### 3.5 桃红四物汤抑制HPSE、MMP-9的活性,阻止糖萼的脱落以及功能性丧失

SDC-1锚定蛋白决定了糖萼在血管内皮上的物理附着,而糖萼的功能主要由HS侧链决定<sup>[23]</sup>;

HPSE能够剪切HS侧链,导致糖萼的功能丧失,并使SDC-1更易MMP-9分解<sup>[24]</sup>。给予大鼠HPSE抑制剂OGT2115和MMP-9抑制剂MMP-9-IN-1,以验证桃红四物汤对HPSE、HPSE的抑制作用及其对糖萼保存的影响。通过TEM和伊文思蓝染色来证实桃红四物汤介导的双重抑制能够维持糖萼的结构完整性和功能,从而减少血脑屏障泄漏并减轻脑损伤。TEM结果(图5-A、B)显示,桃红四物汤抑制MMP-9和HPSE的活性,使糖萼保留增加。伊文思蓝染色结果(图5-C~F)表明,桃红四物汤通过抑制MMP-9和HPSE的活性( $P<0.001$ ),维持了糖萼存在,并减少血脑屏障泄漏。Western blotting结果(图5-G~J)表明,桃红四物汤对MMP-9和HPSE均具有明显的抑制作用( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。

## 4 讨论

本研究证实,桃红四物汤可通过抑制HPSE/MMP-9通路减少脑微血管内皮糖萼脱落,维持血脑屏障完整性,从而减轻CIRI<sup>[33-34]</sup>。这一机制为桃红四物汤治疗缺血性脑卒中提供了新的分子靶点,并将传统中医药“活血化瘀”理论与现代血管内皮生物学有机结合。在MCAO/R模型中,桃红四物汤呈剂量相关性地改善神经功能、减少梗死体积、恢复脑血流与微血管密度,同时降低血脑屏障通透性。这些保护效应与既往桃红四物汤研究一致,后者多聚焦于抑制焦亡、调控炎症、减轻氧化应激或促进血管生成等方面。然而,本研究聚焦于糖萼这一内皮表面微观屏障。糖萼作为血管内皮与血液直接接触的第一道屏障,在CIRI早期即发生大量降解,导致负电荷屏障丧失、白细胞黏附增加、炎症放大及血脑屏障破坏,形成恶性循环<sup>[10,16-17,35]</sup>。机制上,桃红四物汤显著抑制HPSE和MMP-9的表达与活性。HPSE主要水解HS侧链,破坏糖萼的结构完整性和信号转导功能;MMP-9则剪切SDC-1等核心锚定蛋白,导致糖萼整体脱落。本研究通过OGT2115和MMP-9-IN-1干预、TEM直接观察糖萼形态、WGA-FITC荧光评价完整性,以及ELISA定量糖萼成分等多维度证据,证实桃红四物汤的双重抑制可有效保留糖萼,减少糖萼核心成分脱落至血清,并上调紧密连接蛋白表达,从而降低血脑屏障渗漏。与单纯关注下游炎症因子或神经元保护的既往研究相比,本研究从糖萼这一内皮屏障切入,揭示了桃红四物汤在维持微血管稳态方面的潜在优势,可能解释其改善微循环和血脑屏障功能的多效性<sup>[36-37]</sup>。

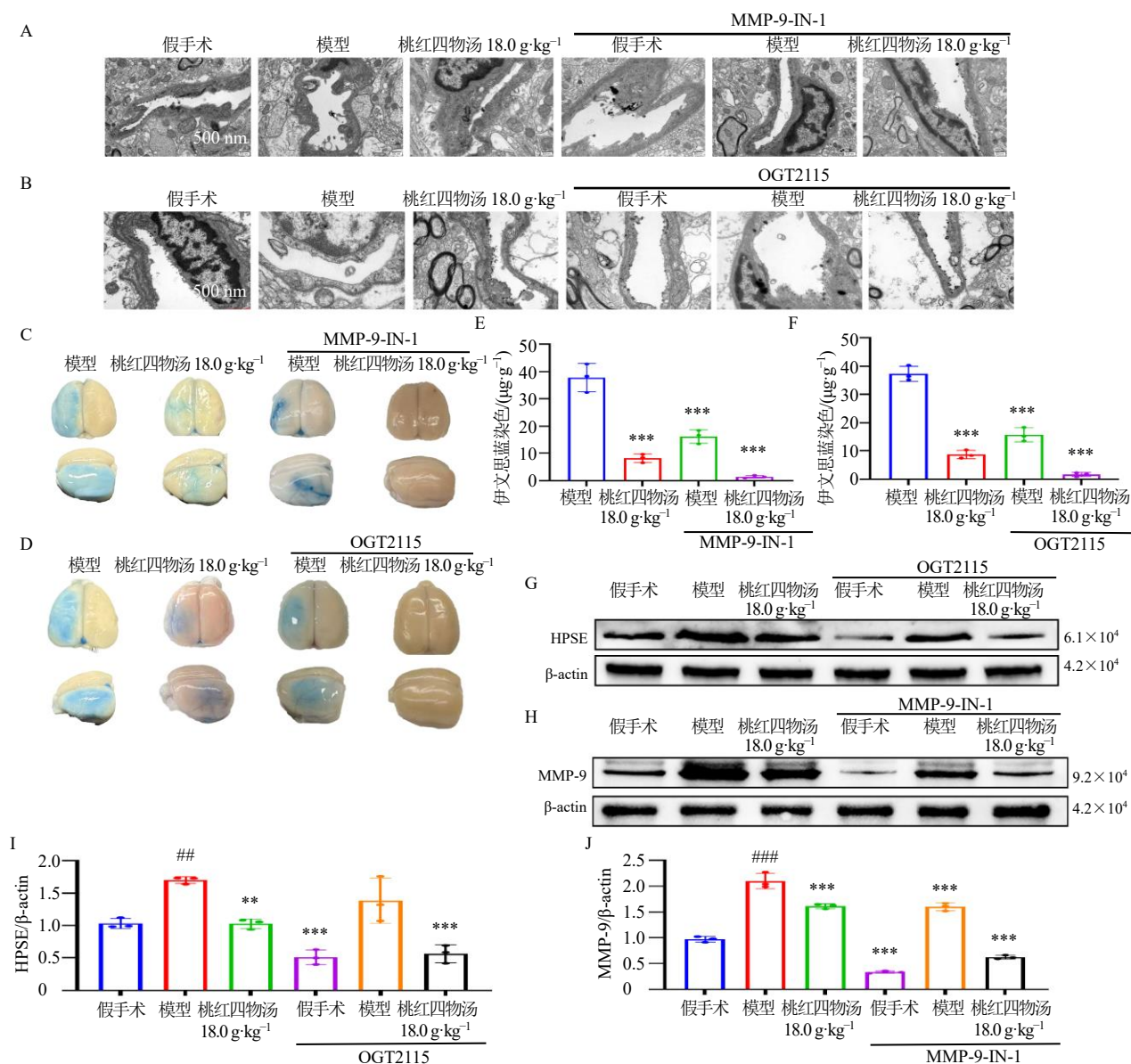


A、B-免疫荧光染色检测大鼠脑组织 WGA-FITC 的表达 (×200, n=3); C~G-Western blotting 测定大鼠脑组织中 HPSE、MMP-9、Hyal2 和 Neu1 的蛋白表达水平 (n=3); H~K-脑组织中 CS、HA、HS 和 SDC-1 水平 (n=6)。

A, B-WGA-FITC expression in brain tissue of rats detected by immunofluorescence staining (× 200, n = 3); C—G-protein expression levels of HPSE, MMP-9, Hyal2 and Neu1 in brain tissue of rats detected by Western blotting (n = 3); H—K-levels of CS, HA, HS and SDC-1 in brain tissue (n = 6).

图 4 桃红四物汤通过抑制 HPSE、MMP-9、Hyal2 和 Neu1 的活性保持糖萼的完整性 (x̄ ± s)

Fig. 4 Taohong Siwu Decoction maintains integrity of glycoalyx by inhibiting activities of HPSE, MMP-9, Hyal2 and Neu1 (x̄ ± s)



A-用 MMP-9 抑制剂处理的大鼠脑血管内皮糖萼的 TEM 图像 (×25 000, n=3); B-用 HPSE 抑制剂处理的大鼠脑血管内皮糖萼的 TEM 图像 (×25 000, n=3)。C、E-用 MMP-9 抑制剂处理的大鼠大脑中伊文思蓝外渗的代表性图像及定量分析 (n=3); D、F-用 HPSE 抑制剂处理的大鼠大脑中伊文思蓝外渗的代表性图像及定量分析 (n=3); G~J-Western blotting 测定大鼠脑组织中 HPSE 和 MMP-9 的蛋白表达水平 (n=3)。A-transmission electron microscope images of cerebral vascular endothelial glycocalyx of rats treated with MMP-9 inhibitor (× 25 000, n = 3); B-transmission electron microscope images of cerebral vascular endothelial glycocalyx of rats treated with HPSE inhibitor (× 25 000, n = 3); C, E-representative images and quantitative analysis of Evans blue staining exudation in brain of rats after treatment with MMP-9 inhibitor (n = 3); D, F-representative images and quantitative analysis of Evans blue staining exudation in brain of rats after treatment with HPSE inhibitor (n = 3); G~J-protein expression levels of HPSE and MMP-9 in brain tissue of rats detected by Western blotting (n = 3).

图 5 桃红四物汤通过抑制 HPSE 和 MMP-9 的活性减少糖萼脱落及其功能完整性的丧失 (̄x ± s)

Fig. 5 Taohong Siwu Decoction prevents shedding of glycocalyx and loss of its functional integrity by inhibiting activities of HPSE and MMP-9 (̄x ± s)

与前人研究比较,本研究在视角和机制上形成互补。多数桃红四物汤研究强调其抑制炎症通路或激活沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 等途径减轻 CIRI, 而较少涉

及糖萼调控。虽然部分文献报道桃红四物汤可降低 MMP-9 表达,但本研究首次系统地桃红四物汤与 HPSE/MMP-9-糖萼轴关联,并通过抑制剂验证其对糖萼的直接保护作用,填补了桃红四物汤在糖萼保护领域的空白。此外,与其他针对糖萼的干预相比,

桃红四物汤作为多成分复方,可能同时调控 Hyal2、Neu1 等其他糖萼代谢酶,展现出更全面的屏障保护潜力<sup>[17,38]</sup>。从中医理论看,桃红四物汤“活血化瘀、养血活血”的配伍特点与现代微血管保护理念高度契合。血瘀证候的微观表现包括微循环障碍与内皮损伤,而糖萼降解正是 CIRI 中“瘀阻”在分子水平的体现。桃红四物汤抑制 HPSE/ MMP-9 轴、稳定糖萼与血脑屏障,可视为“化瘀通络、恢复侧支循环”的科学内涵,为中医药在卒中急性期“治未病”提供实验依据。

本研究的创新性主要体现于首次提出桃红四物汤通过 HPSE/MMP-9 通路保护脑微血管糖萼的机制,提供了比行为学及梗死体积评估更精细的内皮屏障证据:整合活体成像、超微 TEM 及药理抑制剂等多模态方法,提升了结果的可靠性;将传统方剂研究拓展至血管内皮糖萼领域,与前人下游机制研究形成互补,可能为桃红四物汤长期改善预后提供新解释。然而,本研究存在一定局限性:①观察时间仅至 7d,未评估长期血管重塑与功能恢复;②桃红四物汤中发挥抑制 HPSE/MMP-9 作用的具体活性成分尚未通过网络药理学或成分分离明确;③HPSE 与 MMP-9 的精确协同机制虽被间接验证,但需敲除/过表达模型进一步证实。未来可结合临床血清糖萼生物标志物检测,或采用单细胞转录组解析桃红四物汤对神经血管单元不同细胞的差异调控,以推动转化应用。

综上,桃红四物汤通过抑制 HPSE/MMP-9 通路减少脑微血管内皮糖萼脱落,维持血脑屏障完整性,从而发挥对 CIRI 的保护作用。为桃红四物汤的临床转化及中医药治疗缺血性脑卒中提供了新的分子机制依据和干预靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016 [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(25): 2429-2437.

[2] Feigin V L, Brainin M, Norrving B, et al. World stroke organization: Global stroke fact sheet 2025 [J]. *Int J Stroke*, 2025, 20(2): 132-144.

[3] GBD 2021 Stroke Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990—2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet Neurol*, 2024, 23(10):

973-1003.

[4] Li X Y, Kong X M, Yang C H, et al. Global, regional, and national burden of ischemic stroke, 1990 — 2021: An analysis of data from the global burden of disease study 2021 [J]. *E Clin Med*, 2024, 75: 102758.

[5] Tu W J, Zhao Z, Yin P, et al. Estimated burden of stroke in china in 2020 [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(3): e231455.

[6] Tu W J, Wang L D; Special writing group of China stroke surveillance report. China stroke surveillance report 2021 [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 33.

[7] Zhu J, Li Z Q, Ji Z, et al. Glycocalyx is critical for blood-brain barrier integrity by suppressing caveolin1-dependent endothelial transcytosis following ischemic stroke [J]. *Brain Pathol*, 2022, 32(1): e13006.

[8] Okada H, Yoshida S, Hara A, et al. Vascular endothelial injury exacerbates coronavirus disease 2019: The role of endothelial glycocalyx protection [J]. *Microcirculation*, 2021, 28(3): e12654.

[9] Li S Y, Qian R, Xie W X, et al. AMPK regulates the anti-pulmonary fibrosis effects of tracheloside [J]. *Chin J Nat Med*, 2025, 23(12): 100005.

[10] Ko K, Suzuki T, Ishikawa R, et al. Ischemic stroke disrupts the endothelial glycocalyx through activation of proHPSE via acrolein exposure [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(52): 18614-18624.

[11] Balistreri C R, Di Giorgi L, Monastero R. Focus of endothelial glycocalyx dysfunction in ischemic stroke and Alzheimer's disease: Possible intervention strategies [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 99: 102362.

[12] Giannelli G, Iannone F, Marinosci F, et al. The effect of bosentan on matrix metalloproteinase-9 levels in patients with systemic sclerosis-induced pulmonary hypertension [J]. *Curr Med Res Opin*, 2005, 21(3): 327-332.

[13] Goligorsky M S, Sun D. Glycocalyx in endotoxemia and sepsis [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(4): 791-798.

[14] McKenzie E A. Heparanase: A target for drug discovery in cancer and inflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(1): 1-14.

[15] Rempe R G, Hartz A M S, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(9): 1481-1507.

[16] Wang M, Liu Z, Hu S, et al. Taohong Siwu Decoction ameliorates ischemic stroke injury via suppressing pyroptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 590453.

[17] Li J J, Zhang L J, Xue S J, et al. Exploration of the mechanism of Taohong Siwu Decoction for the treatment of ischemic stroke based on CCL2/CCR2 axis [J]. *Front*

- Pharmacol*, 2024, 15: 1428572.
- [18] Wang N, Fei C, Chu F, *et al.* Taohong Siwu Decoction regulates cell necrosis and neuroinflammation in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 732358.
- [19] Tang L F, Wang D D, Chang H, *et al.* Treating ischemic stroke by improving vascular structure and promoting angiogenesis using Taohong Siwu Decoction: An integrative pharmacology strategy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 118372.
- [20] Biose I J, Chastain W H, Wang H, *et al.* Optimizing intraluminal monofilament model of ischemic stroke in middle-aged Sprague-Dawley rats [J]. *BMC Neurosci*, 2022, 23(1): 75.
- [21] Zeng L, Hu S, Zeng L, *et al.* Animal models of ischemic stroke with different forms of middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(7): 1007.
- [22] Shi C, Wang C, Fu Z W, *et al.* Lipocalin 2 (LCN2) confers acquired resistance to almonertinib in NSCLC through LCN2-MMP-9 signaling pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 201: 107088.
- [23] Li J M, Li J P, Zhang X, *et al.* Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2012, 1433: 137-144.
- [24] Vlodavsky I, Barash U, Nguyen H M, *et al.* Biology of the heparanase-heparan sulfate axis and its role in disease pathogenesis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2021, 47(3): 240-253.
- [25] Tang L, Liu Z, Ji Z, *et al.* Promotion of mature angiogenesis in ischemic stroke by Taohong Siwu Decoction through glycolysis activation [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1395167.
- [26] Zhang L, Xue S, Fei C, *et al.* Protective effect of Taohong Siwu Decoction against inflammatory injury caused by intestinal flora disorders in an ischemic stroke mouse model [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 124.
- [27] Abassi Z, Armaly Z, Heyman S N. Glycocalyx degradation in ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(4): 752-767.
- [28] Hilkens N A, Casolla B, Leung T W, *et al.* Stroke [J]. *Lancet*, 2024, 403(10446): 2820-2836.
- [29] Tan K S, Pandian J D, Liu L, *et al.* Stroke in asia [J]. *Cerebrovasc Dis Extra*, 2024, 14(1): 58-75.
- [30] Tsivgoulis G, Katsanos A H, Sandset E C, *et al.* Thrombolysis for acute ischaemic stroke: Current status and future perspectives [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(5): 418-429.
- [31] 马川, 吴彦欣, 李敏敏, 等. 经典名方桃红四物汤抗血栓药效作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8035-8045.
- [32] 徐志红, 陈磊垚, 许立, 等. 桃红四物汤治疗骨质疏松症的药效学研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(18): 5608-5614.
- [33] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [34] Zhu J, Li X, Yin J, *et al.* Glycocalyx degradation leads to blood-brain barrier dysfunction and brain edema after asphyxia cardiac arrest in rats [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2018, 38(11): 1979-1992.
- [35] Shi S M, Suh R J, Shon D J, *et al.* Glycocalyx dysregulation impairs blood-brain barrier in ageing and disease [J]. *Nature*, 2025, 639(8056): 985-994.
- [36] Duni A, Liakopoulos V, Koutlas V, *et al.* The endothelial glycocalyx as a target of ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation-where have we gone so far [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2157.
- [37] Jacquet C, Gustafsson R, Patel A K, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 mediates endothelial glycocalyx degradation and correlates with severity of hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *iScience*, 2025, 28(9): 113262.
- [38] Noda K, Atale N, Al-Zahrani A, *et al.* Heparanase-induced endothelial glycocalyx degradation exacerbates lung ischemia/reperfusion injury in male mice [J]. *Physiol Rep*, 2024, 12(20): e70113.
- [39] Li Y M, Yu C, Xue S J, *et al.* Taohong Siwu Decoction improves cerebral ischemia-reperfusion injury through SIRT1/FOXO1 signaling pathway [J]. *J Funct Foods*, 2024, 123: 106574.

[责任编辑 李亚楠]