

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.02.03

❖ 论著 ❖

# 自拟活血利水汤对老龄大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制分析

宋鹏飞<sup>1</sup>, 芮锦伟<sup>2</sup>, 李永新<sup>3</sup>

(1. 庆阳市第二人民医院老年病科; 2. 庆阳市人民医院中医科, 甘肃 庆阳 745000; 3. 西安医学院全科医学院, 陕西 西安 710021)

**【摘要】目的:** 分析自拟活血利水汤对老龄大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法:** 采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 将建模成功的大鼠随机分成正常对照组 (NC 组)、缺血再灌注组 (I/R 组) 和活血利水汤组 (HD 组), 每组 12 只, 各组于术后 1 h、1 d、2 d 灌胃给药 (2 次/d)。其中, NC 组和 I/R 组分别灌胃生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , HD 组灌胃自拟活血利水汤  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。再灌注 3 d 后, 通过检测分析自拟活血利水汤对大鼠的神经功能损伤、脑梗塞体积、脑指数、脑含水量、丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、氧化氮合成酶 (NOS) 活性、脑组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6) 和白介素-8 (IL-8) 含量及 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达量。**结果:** 自拟活血利水汤可明显降低大鼠的神经功能损伤、脑梗塞体积、脑指数、脑含水量及 NOS 活性, 提高 SOD 和 GSH-Px 活力, 减少 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ mRNA、IL-6mRNA 和 IL-8 mRNA 表达量 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 自拟活血利水汤对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能与增加脑组织内 SOD 和 GSH-Px 活性, 减少 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ mRNA、IL-6mRNA 和 IL-8 mRNA 量, 降低 NOS 活性有关。

**【关键词】** 自拟活血利水汤; 脑缺血再灌注损伤; 保护作用; 机制分析

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标志码】** A

## Protective effect and mechanism of Huoxue Lishui decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in aged rats

SONG Peng-fei<sup>1</sup>, RUI Jin-wei<sup>2</sup>, LI Yong-xin<sup>3</sup>

(1. Department of Geriatrics, Qingyang Second People's Hospital; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Qingyang People's Hospital, Qingyang 745000, Gansu; 3. General Medical College, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China)

**【Abstract】Objective:** To analyze the protective effect and mechanism of Huoxue Lishui decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in aged rats. **Methods:** The animal model was established by middle cerebral artery occlusion. The rats were randomly divided into normal control group (NC group), ischemia-reperfusion group (I/R group) and Huoxue Lishui decoction group (HD group), 12 rats in each group. Each group was administrated by intragastric 1 h, 1 d and 2 d after operation (twice a day). The NC group and I/R group were administrated by intragastric with  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  normal saline respectively, and HD group with  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Huoxue Lishui decoction. After 3 days of reperfusion, neurological impairment, infarct volume, brain index, brain water content, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-pX), nitric oxide synthetase (NOS), levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8), and the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 mRNA were analysed. **Results:** Huoxue Lishui decoction could significantly reduce the neurological impairment, cerebral infarction volume, brain index, brain water content and NOS activity, increase the activity of SOD and GSH-Px, and reduce the expression of MDA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ mRNA, IL-6mRNA and IL-8 mRNA. **Conclusion:** Huoxue Lishui decoction has a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury by increasing SOD and GSH-Px activity, reducing the expression of MDA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ mRNA, IL-6mRNA and IL-8 mRNA, reducing the activity of NOS.

**【Key words】** Huoxue Lishui decoction; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Protective effect; Mechanism

脑梗死是由各种原因导致的脑动脉供血不足, 局部脑组织缺血、缺氧性坏死而出现的相应神经功

能缺损的临床疾病,为临床常见的急性缺血性脑血管疾病<sup>[1]</sup>。近年来,随着人们生活水平的不断提高、饮食结构和生活方式的不断变化,脑梗死的发病率不断上升,给中老年人的健康及家庭带来了很大危害及经济负担。临床上,尽早恢复脑缺血、及时挽救濒死的神经细胞是治疗脑梗死的关键<sup>[2]</sup>。局部组织器官缺血将会导致实质器官的损害,虽然恢复血供可使缺血器官和组织重新得到氧气供应,提供代谢所必需的营养物质并清除代谢产物,但缺血后再灌注在某些情况下可导致组织进一步损伤和功能障碍,这种恢复血流灌注后反常的有害情况称为再灌注损伤。近年的研究证实,许多中药和西药均对脑缺血再灌注损伤有保护作用,主要体现在自由基清除、减轻细胞内钙超载、抑制细胞凋亡、减轻或阻止炎症反应等。临床研究发现,与西药相比,中药在防治缺血性脑血管病中疗效显著且副作用小,应用前景广阔。本研究采用自拟的活血利水汤(红花 10 g、桃仁 10 g、川芎 9 g、地龙 15 g、当归 20 g、黄芪 30 g、水蛭 6 g、泽兰 20 g、泽泻 15 g、白术 12 g、茵陈 20 g、石菖蒲 15 g、胆南星 15 g)是根据多年临床经验和研究总结出的治疗脑梗塞的经验方,是一种活血化瘀方,具有清热养阴、活血化瘀的功效,对脑梗塞治疗效果显著,无不良反应。为进一步研究本方的作用机制,本研究采用大鼠脑缺血再灌注损伤模型,观察自拟活血利水汤对老年大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制,为进一步临床推广应用提供实验数据,现将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 自拟活血利水汤:红花 10 g、桃仁 10 g、川芎 9 g、地龙 15 g、当归 20 g、黄芪 30 g、水蛭 6 g、泽兰 20 g、泽泻 15 g、白术 12 g、茵陈 20 g、石菖蒲 15 g、胆南星 15 g,加水煎煮 40 min,过滤后,密封放置冰箱备用。南京建成生物工程研究所生产的 SOD、MDA 和 NOS 检测试剂盒;天津福晨化学试剂厂生产的水合氯醛;成都化学试剂厂生产的无水乙醇;北京化学试剂公司生产的氯化氮苯基四氮唑(TTC);武汉华美生物工程有限公司生产的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 试剂盒;济南赛福生物科技有限公司制造的酶标仪;广州科龙公司制造的冰箱;浙江海宁医药器材厂制造的恒温水浴锅;德国 Sigma 制造的高速冷冻离心机;赛默飞世尔科技有限公司制造的荧光定量 PCR 仪。

1.1.2 实验动物选择和分组 选取成年雄性 SD 大鼠 36 只,20 ~ 22 月龄,体重 300 ~ 400 g (SPF

级),由第四军医大学动物实验中心提供。分笼饲养,保持环境干燥,室温控制在 20 ~ 25 °C,相对湿度控制在 55% ~ 65%,实验大鼠由其自由饮食及饮水,器具和垫料每天更换。随机将 36 只大鼠分为 3 组,分别为正常对照组(NC 组)、缺血再灌注组(I/R 组)和自拟活血利水汤组(HD 组),每组 12 只,各组于术后 1 h、1 d、2 d 灌胃给药(2 次/d),其中,NC 组和 I/R 组均灌胃生理盐水 10 mL · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,HD 组灌胃自拟活血利水汤 10 mL · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 建立大鼠缺血再灌注模型 采用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于手术台上,颈部备皮常规消毒,于颈部正中切口皮肤,仔细分离暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),于枕动脉以上结扎 ECA, ECA 靠近分叉处放置一备用线,以动脉夹夹闭 ICA 和 CCA。电凝刀离断枕动脉及 ECA 远心端,用眼科剪在 ECA 上剪一缺口,将备好的栓线经 ECA 插入 ICA 至栓线头部达到 ECA 起始处,备用线打结固定栓线。松开 ICA、CCA 动脉夹,清理创口并缝合,伤口局部使用抗生素消毒预防感染<sup>[3]</sup>。缺血 2 h 后拔出栓线形成再灌注,在缺血期间及再灌注后 2 h 保持体温在(37 ± 0.5) °C。

1.2.2 观察指标及评价方法 (1)神经功能缺损评分:大鼠再灌注 3 d 后,按照 Zea-Longa 评分标准<sup>[4]</sup>在大鼠清醒后 6 h 内进行评分(表 1)。(2)脑梗死体积的测定:神经功能评分结束后,各组大鼠断头取脑,去除嗅球、小脑和脑干。置 -20 °C 冰箱中冷冻 30 min,切成 2 mm 厚的冠状切片,放入 0.5% TTC 溶液中,于 37 °C 孵育 30 min 后,再放入 10.0% 甲醛溶液中避光固定 24 h,用计算机图像解析程序,分别将所有脑切片图像扫描,测定脑梗死区的体积<sup>[4]</sup>。(3)脑指数及脑含水量的测定:大鼠再灌注 3 d 后,断头取脑,称湿重;于 106 °C 烘箱内烘干至恒重,即获得干重<sup>[5]</sup>。脑指数 = 脑湿重(g)/体重(100g);脑含水量(%) = [脑湿重(g) - 脑干重(g)]/脑湿重(g) × 100%。(4)脑匀浆指标的测定:取约 10% 的脑组织研碎后加入 4 °C 预冷的裂解液匀浆,3 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,分别按照试剂盒操作说明书测定 MDA 含量和 NOS、SOD 和 GSH-Px 活性。(5)MDA 含量的测定:按照表 2 取样,于涡旋混匀器混匀后,于恒温水浴箱中 95 °C 水浴 40 min,取出后流水冷却,然后 3 500 rpm,离心 10 min。取 200  $\mu$ L 上清液加入到 96 孔板中,用酶标仪在 532 nm 测定吸光度,计算每毫克蛋白中

MDA 含量<sup>[4-5]</sup>。(6) NOS 活性的测定:按说明操作加入样本 R1、R2、R3, 37 °C 反应 15 min, 再加入 R4、R5, 混匀;最后,用分光光度计在 530 nm 波长 1 cm 光径,比色<sup>[6-8]</sup>。(7) SOD 活性的测定:SOD 的活性测定按照 SOD 测定试剂盒说明进行。首先,于酶标板孔中加入 500  $\mu$ L 样品,封板摸封板后置 37 °C 温育 30 min。然后,小心撕掉封板膜,弃掉液体,甩干后每孔加 200  $\mu$ L 洗涤液,静置 30 s 后弃掉,如此重复 5 次,甩干。除空白孔外,每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ L, 37 °C 温育 15 min 并洗涤。每孔先后加入显色剂 A 50  $\mu$ L 和显色剂 B 50  $\mu$ L, 轻轻震荡混匀, 37 °C 避光温育 15 min, 最后每孔加终止液 50  $\mu$ L, 终止反应。以空白孔调零后,用酶标仪在 450 nm 波长测吸光度<sup>[9-11]</sup>。(8) GSH-Px 含量的测定:按照 GSH-Px 测定试剂盒的使用步骤进行。依次加入缓冲液、待测样品和检测工作液,混匀。加入 4  $\mu$ L 15 mmol/L 过氧化物试剂溶液后,反应开始。25 °C 条件下,使用培养板振荡器混匀。用酶标仪在 340 nm 测定吸光度计算每克蛋白中 GSH-Px 含量<sup>[12-13]</sup>。(9) 脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的测定:取(4)中上清液,分别按照肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6) 和白介素-8 (IL-8) 试剂盒说明书方法进行检测。(10) 脑组织中 IL-6 和 IL-1 $\beta$ mRNA 表达量的测定:取适量脑组织按 Trizol 试剂说明书抽提总 RNA, DEPC 处理水溶解 RNA 后用核酸蛋白测定仪测定其吸光度 A260/A280, 确定 RNA 溶液浓度和纯度。以 GAPDH 为内参,采用 RT-PCR 法检测脑组织中 IL-6 和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA 表达。

表 1 Zea-Longa 评分标准

评级	评分	症状
0	0	无神经功能缺损症状
1	1	轻度神经功能缺损,即提尾悬空是,对侧前爪不能完全伸直
2	2	中度神经功能缺损,即行走时,向偏瘫侧旋转
3	3	重度神经功能缺损,即行走困难,向偏瘫侧倾斜
4	4	不能自己行走,意识丧失

表 2 MDA 含量测定加样量 (mL)

	标准管	空白管	测定管
10 nmol/L 标准品	0.1		
无水乙醇		0.1	
测定样品			0.1
MDA 1 号	0.1	0.1	0.1
MDA 2 号	3.0	3.0	3.0
MDA 3 号	1.0	1.0	1.0

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 one-way ANO-

VA 和 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 自拟活血利水汤对大鼠神经功能缺损评分及脑梗死体积的影响

缺血 2 h 再灌注 3 d 后,NC 组大鼠未发生神经功能缺损及脑梗死,与 I/R 组相比,HD 组神经功能缺损评分 ( $P < 0.001$ ) 和脑梗死体积 ( $P < 0.001$ ) 显著降低,表明自拟活血利水汤可以明显降低大鼠的神经功能缺损评分及脑梗死体积。见表 3。

表 3 自拟活血利水汤对大鼠神经功能缺损评分及脑梗死体积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	神经功能缺损评分(分, $n = 12$ )	脑梗死体积( $\text{mm}^3$ , $n = 6$ )
NC 组	0	0
I/R 组	2.92 $\pm$ 0.28	282.62 $\pm$ 17.82
HD 组	2.08 $\pm$ 0.28 *	202.20 $\pm$ 15.04 *

\*  $P < 0.001$ , 与 I/R 组相比。

### 2.2 自拟活血利水汤对缺血再灌注大鼠脑指数及脑含水量的影响

缺血 2 h 再灌注 3 d 后,与 NC 组相比,I/R 组大鼠的脑指数 ( $P < 0.001$ ) 和脑含水量 ( $P < 0.001$ ) 均显著升高。与 I/R 组相比,HD 组大鼠的脑指数 ( $P < 0.001$ ) 和脑含水量 ( $P < 0.05$ ) 显著降低,即证明自拟活血利水汤可有效降低大鼠的脑指数及脑含水量。见表 4。

表 4 自拟活血利水汤对缺血再灌注大鼠脑指数及脑含水量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	脑指数(g/100 g)	脑含水量 (%)
NC 组	0.50 $\pm$ 0.01	68.87 $\pm$ 3.95
I/R 组	0.61 $\pm$ 0.03 #	81.95 $\pm$ 2.27 #
HD 组	0.49 $\pm$ 0.02 **	74.16 $\pm$ 2.95 **

\*  $P < 0.001$ , I/R 组相比; #  $P < 0.001$ , 与 NC 组相比。

### 2.3 自拟活血利水汤对脑匀浆 MDA 含量、SOD、GSH-Px 及 NOS 活性的影响

缺血 2 h 再灌注 3 d 后,I/R 组大鼠 SOD 的活性及 GSH-Px 含量明显降低,使用自拟活血利水汤后,两者含量均显著升高 ( $P < 0.05$ )。MDA 是脂质过氧化的产物,是氧化应激标记物,MDA 含量间接反映了组织受自由基损伤的程度。与 NC 组相比,I/R 组大鼠 MDA 含量明显升高,使用自拟活血利水汤后,MDA 含量显著下降 ( $P < 0.05$ ),即说明自拟活血利水汤可降低脑组织中 MDA 的表达。与 NC 组相比,I/R 组大鼠 NOS 活性明显升高,使用自拟活血利水汤后,NOS 活性显著下降 ( $P < 0.05$ ),即说

明自拟活血利水汤可通过降低 NOS 的表达,降低 NO 的产生。见表 5。

表 5 自拟活血利水汤对脑匀浆 MDA 含量、SOD、GSH-Px 及 NOS 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)	NOS(U/mg)
NC 组	13.32 ± 1.21	184.53 ± 9.90	5.62 ± 1.13	1.02 ± 0.09
I/R 组	21.20 ± 2.66 <sup>#</sup>	114.73 ± 12.95 <sup>#</sup>	3.04 ± 0.12 <sup>#</sup>	1.46 ± 0.15 <sup>#</sup>
HD 组	15.49 ± 1.88 <sup>*#</sup>	259.94 ± 4.19 <sup>*#</sup>	13.81 ± 1.56 <sup>*#</sup>	1.19 ± 0.07 <sup>*#</sup>

\* P < 0.05, 与 I/R 组相比; #P < 0.05, 与 NC 组相比。

### 2.4 自拟活血利水汤对脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达的影响

与 NC 组相比,缺血 2 h 再灌注 3 d 后,I/R 组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 (P < 0.05) 含量均显著升高。与 I/R 组相比,使用自拟活血利水汤后,HD 组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 (P < 0.05) 含量均显著降低,即说明自拟活血利水汤可通过降低脑组织炎症因子表达,减轻脑组织损伤。见表 6。

表 6 自拟活血利水汤对脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/mg)

组别	TNF-α	IL-6	IL-8
NC 组	4.45 ± 0.47	5.93 ± 0.31	9.63 ± 0.60
I/R 组	7.63 ± 0.78 <sup>#</sup>	12.78 ± 0.64 <sup>#</sup>	16.24 ± 0.37 <sup>#</sup>
HD 组	6.02 ± 0.17 <sup>*#</sup>	6.96 ± 0.29 <sup>*#</sup>	11.65 ± 0.51 <sup>*#</sup>

\* P < 0.05, 与 I/R 组相比; #P < 0.05, 与 NC 组相比。

### 2.5 自拟活血利水汤对脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达的影响

与 NC 组相比,缺血 2 h 再灌注 3 d 后,I/R 组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达量均显著升高 (P < 0.05)。与 I/R 组相比,使用自拟活血利水汤后,HD 组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达均显著降低 (P < 0.05),说明自拟活血利水汤可通过降低脑组织炎症因子 mRNA 表达降低炎症因子在脑组织中的表达。见表 7。

表 7 自拟活血利水汤对脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA	IL-8 mRNA
NC 组	0.47 ± 0.06	0.41 ± 0.03	0.71 ± 0.04
I/R 组	1.05 ± 0.09 <sup>#</sup>	1.14 ± 0.11 <sup>#</sup>	1.26 ± 0.05 <sup>#</sup>
HD 组	0.58 ± 0.04 <sup>*#</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>*#</sup>	0.91 ± 0.02 <sup>*#</sup>

\* P < 0.05, 与 I/R 组相比; #P < 0.05, 与 NC 组相比。

## 3 讨论

脑梗死又称缺血性卒中,中医称之为卒中或中风,具有“三高一低”(发病率高、致残率高、病死率

高、治愈率低)的特点,常发生于中老年人中。脑梗死严重威胁着人类的健康,大部分脑梗死患者因存在智力、肢体功能障碍等后遗症而需要护理,此类患者不断增加,已成为一个非常重要的医疗和社会问题。缺血性卒中发病部位在大脑中,其特点是脑供血障碍、组织缺氧、缺血性坏死,主要因虚而致淤,又因淤而致虚,呈现本虚标实,虚实夹杂的复杂病例过程。结合相关临床和实验研究,本病应从“气阴两虚致血瘀”的病机入手,当采用益气活血通脉法进行治疗,即以祛淤为核心,辅以养血、调血、行气、化瘀的功效<sup>[14-15]</sup>。

本研究结果显示,自拟活血利水汤对老年大鼠缺血在灌注后的神经功能损伤、脑梗死体积、脑指数和脑含水量均有显著的改善作用,即说明该方对脑缺血有良好的保护作用。本方以活血化瘀为主,辅以养阴益气,方中红花、桃仁、当归、水蛭、泽兰具有强劲的破血功效;川芎、白术、石菖蒲具有活血行气、调理气血,以助活血之功效;地龙、黄芪、泽泻、茵陈、胆南星具有清热解毒、通络、利水渗湿的作用,即通过消散之法,使积聚于之水、痰饮、淤实邪逐渐消散以排出体外,协同加强祛淤功能,从而达到脑络通畅、气血周流的目的<sup>[16]</sup>。

脑梗死后发生一系列病理生理变化,如自由基大量生成、细胞内钙超载、细胞凋亡等,均导致脑梗死患者功能损伤加重。其中,自由基所造成的脂质过氧化是缺血性脑组织损伤的重要发病机制。自由基是机体氧化反应中产生的有害物质,ROS<sup>[17-18]</sup>和 NO<sup>[19]</sup>是其中最主要的自由基。在氧化应激条件下,脑组织受到抗氧化酶(如 SOD<sup>[4,11]</sup>、GSH<sup>[12-13]</sup>)和抗氧化物质(如维生素 C、维生素 E)的保护,可以清除有害自由基。在缺血缺氧的情况下,体内自由基的产生会急剧增加,当自由基产生速度超过机体的清除速度时就会导致氧化应激损伤。SOD 酶是体内超氧阴离子自由基主要清除剂,保护机体免受自由基的攻击。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物,是氧化应激标记物,MDA 含量间接反映了组织受自由基损伤的程度。本研究结果显示大鼠在脑缺血再灌注后,脑组织中 MDA 含量增加,SOD 活性下降,试验组自拟活血利水汤可显著降低脑组织中 MDA 的表达,提高 SOD 的活性<sup>[4-5]</sup>。

一氧化氮合酶(NOS)是合成 NO 的关键酶,在缺血再灌注过程中,NOS 的活力升高会导致 NO 合成增加,从而对神经功能造成损伤。在脑缺血过程中,NO 在脑缺损损伤中具有双重性,既有神经保护作用,又有加重神经毒性的作用。NOS 至少有 3 种亚型,即神经元表达神经型(nNOS)、神经胶质表

达诱导型(iNOS)和内皮细胞表达内皮型(eNOS)。研究发现,脑缺血时,eNOS表达上调,短暂释放少量NO,扩张脑血管,增加脑血流,抑制血小板和白细胞的聚集、粘附,从而对抗缺血性脑算上,起着神经保护作用。中、晚期梗死灶内的炎性细胞、吞噬细胞诱导产生大量的NOS,但在高浓度下,NO对细胞有损伤作用,NO可与超氧自由基反应生成超氧亚硝酸根离子,起细胞毒作用。本实验显示,脑缺血再灌注后,大鼠脑组织中NOS活力升高,自拟活血利水汤治疗能有效阻止大鼠脑缺血再灌注后脑组织中NOS活力的升高。

大量证据表明,炎症反应介导了脑缺血再灌注后继发性脑损伤。局部缺血后炎症反应是由许多炎性因子介导的,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)、IL-8和IL-10等,其中TNF- $\alpha$ 在脑缺血再灌注损伤中尤为重要。本实验主要对TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-8及其mRNA的表达水平进行检测,结果显示,自拟活血利水汤在脑缺血再灌注损伤可有效降低TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-8炎性因子及其mRNA的表达,减轻炎性反应对脑组织再灌注后带来的损伤。

由此可见,自拟活血利水汤对脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与增加脑组织内SOD和GSH-Px活性,减少MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ mRNA、IL-6mRNA和IL-8mRNA量,降低NOS活性有关。

#### 参考文献

[1] Kobayashi A, Tamura A, Ichihara T, et al. Factors associated with changes over time in medication-taking behavior up to 12 months after initial mild cerebral infarction onset[J]. J Med Invest, 2017, 64(1-2): 85-95.

[2] 梁庆. 脑梗死缺血/再灌注损伤机制的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(24): 3263-3266.

[3] 陈吉祥, 林浴坤, 吴羽楠, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及海马组织 Nogo-A/NgR 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(3): 219-223.

[4] Chen NN, Wang JP, Liu HF, et al. The bone marrow mononuclear cells reduce the oxidative stress of cerebral infarction through

PI3K/AKT/NRF2 signaling pathway. [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(24): 5729-5735.

[5] 胡文, 尹艳艳, 王玉婵, 等. 麝香醒脑滴丸对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医药, 2015, 33(1): 39-42.

[6] 阚亮, 张萌, 何平.  $\alpha$ -硫辛酸对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激影响[J]. 临床军医杂志, 2016, 44(6): 597-600.

[7] 方浩威, 肖圣华. 左卡尼汀对老年大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 19(4): 5-7.

[8] 刘海婷, 母得志. 诱导型一氧化氮合酶和缺氧缺血脑损伤[J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 962-967.

[9] 沈菁, 王超, 张佳丽, 等. 电针内关穴对心肌缺血再灌注损伤家兔SOD与线粒体膜电位的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(7): 47-49.

[10] 金锡姣, 欧阳洁, 郭莹, 等. 葛根黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织NO及NOS的影响[J]. 中国中医急症, 2013, 22(8): 1360-1370.

[11] 王富明, 张亚敏, 孙华, 等. 针刺对大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间点血清SOD和MDA表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(2): 62-65.

[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] 葛建彬, 卢建红, 宋新建, 等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抗氧化应激的机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(9): 790-794.

[14] 程兰, 万浩芳, 方雨晨, 等. 养阴益气活血法治疗缺血性中风机理探讨[J]. 中国中医急症, 2018, 27(1): 94-96.

[15] 孟繁玲. 养阴益气活血方治疗缺血性中风的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2017, 15(36): 195.

[16] 陈志伟. 浅谈中医辨证治疗脑梗塞的临床效果观察[J]. 中国保健营养, 2019, 29(21): 348.

[17] Pan N, Lu LY, Li M, et al. Xylometal B alleviates cerebral infarction and neurologic deficits in a mouse stroke model by suppressing the ROS/TLR4/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling pathway [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2017, 38(9): 1-12.

[18] Zhang GY, Lu D, Duan SF, et al. Hydrogen Sulfide Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Diaphragm Dysfunction in Rats by Reducing Apoptosis and Inflammation through ROS/MAPK and TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018(1): 1-15.

[19] 王四海, 梁春利, 张海红, 等. 大黄酚对脑缺血/再灌注小鼠脑组织NO的影响和断头抗缺氧作用[J]. 天津医药, 2017, 45(6): 593-595.

(收稿日期:2019-12-09)

学术编辑:王晓明)