

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230253

· 论 著 ·

杜蛭丸对缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用及其机制

王挥豪, 刘 青, 谢 炜, 刘 莉*, 王志勇*

中国医药工业研究总院先导物成药性研究全国重点实验室, 上海 200437

[摘要] **目的** 观察杜蛭丸对缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用并探究其机制。**方法** 将健康雄性 SD 大鼠分为 5 组: 假手术组、模型组、杜蛭丸低剂量组 (每天 1.0 g/kg)、杜蛭丸高剂量组 (每天 2.0 g/kg)、阿加曲班组 (阳性对照)。杜蛭丸低、高剂量组每日灌胃给药 1 次, 其他组灌胃给予等量生理盐水, 连续 8 d。除假手术组外, 其他组大鼠均于第 8 天灌胃后 0.5 h 采用线栓法建立大脑中动脉闭塞 (MCAO) 脑缺血再灌注模型, 缺血时间为 90 min。阿加曲班组在再灌注同时经尾静脉单次给予阿加曲班 (3.0 mg/kg)。脑缺血 24 h 后, 采用 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色、尼氏染色和神经行为学评分分别对大鼠的脑梗死面积、脑梗死程度和神经功能损伤情况进行评估, 采用 ELISA 法检测脑缺血后脑内炎症因子 TGF- β 1、IL-1 β 水平, 应用全自动凝血分析仪测定凝血指标。应用 2,2- 二苯基 -1- 苦基肼 (DPPH) 清除实验分析杜蛭丸对自由基的清除能力。**结果** 高剂量杜蛭丸可减少 MCAO 大鼠脑梗死面积、改善神经行为缺损症状 (与模型组比较, 均 $P < 0.01$), 并降低神经元尼氏染色评分。模型组大鼠缺血脑组织炎症因子 IL-1 β 、TGF- β 1 水平升高 (与假手术组比较, 均 $P < 0.01$), 而给予低剂量和高剂量杜蛭丸后大鼠脑组织 IL-1 β 、TGF- β 1 水平均降低 (与模型组比较, 均 $P < 0.01$)。模型组大鼠凝血指标纤维蛋白原水平高于假手术组 ($P < 0.01$), 低剂量和高剂量杜蛭丸均可抑制纤维蛋白原的产生 (与模型组比较, 均 $P < 0.01$)。DPPH 清除实验结果显示, 杜蛭丸具有一定的自由基清除能力, IC_{50} 为 (1.33 ± 1.11) mg/mL, 曲线坡度为 1.378 ± 0.145 。**结论** 杜蛭丸对缺血性脑卒中大鼠有脑保护作用, 其机制可能与其抑制纤维蛋白原产生、降低脑内炎症因子 TGF- β 1 和 IL-1 β 水平及抗氧化作用有关。

[关键词] 杜蛭丸; 缺血性脑卒中; 炎症因子; 纤维蛋白原; 抗氧化

[引用本文] 王挥豪, 刘青, 谢炜, 等. 杜蛭丸对缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用及其机制 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(5): 602-608. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230253.

Cerebral protective effect of *Duzhi* pills on ischemic stroke rats and its mechanisms

WANG Huihao, LIU Qing, XIE Wei, LIU Li*, WANG Zhiyong*

National Key Laboratory of Lead Druggability Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China

[Abstract] **Objective** To investigate the cerebral protective role of *Duzhi* pills on ischemic stroke rats and its mechanisms. **Methods** The healthy male SD rats were assigned to 5 groups: sham group, model group, *Duzhi* pill low-dose group (1.0 g/kg a day), *Duzhi* pill high-dose group (2.0 g/kg a day), or argatroban group (positive control). The low-dose and high-dose groups of *Duzhi* pills were intragastrically administered once a day for 8 d, while the other groups were intragastrically administered with the same amount of normal saline. Except the sham group, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) cerebral ischemia-reperfusion model was established by suture method at 0.5 h after intragastric administration on the 8th day in other groups, and the ischemia duration was 90 min. Argatroban group was given a single dose (3.0 mg/kg) of argatroban via caudal vein at the same time of reperfusion. After 24 h of cerebral ischemia, the area of cerebral infarction, degree of cerebral infarction and neurological function injury were evaluated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, Nissl staining and neurobehavioral score, respectively. The levels of inflammatory factors (transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1] and interleukin-1 β [IL-1 β]) in the brain after cerebral ischemia were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the coagulation indexes were detected by an automatic coagulation analyzer.

[收稿日期] 2023-05-06

[接受日期] 2024-05-07

[基金项目] 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台项目 (18DZ2290900). Supported by Shanghai Professional Technical Service Platform for the Evaluation of Druggability of Biological Substances (18DZ2290900).

[作者简介] 王挥豪, 硕士生. E-mail: hhwang0910@163.com

*通信作者 (Corresponding authors). E-mail: liulisipi@foxmail.com, 123039019@qq.com

The scavenging ability of *Duzhi* pills on free radicals was analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging experiment. **Results** High-dose *Duzhi* pills reduced the cerebral infarction area, decreased the deep Nissl staining score of neural cells, and improved the symptoms of neurobehavioral defects in MCAO rats (compared with the model group, all $P < 0.01$). The levels of IL-1 β and TGF- β 1 in the ischemic brain tissue of the model group were significantly increased (compared with the sham group, both $P < 0.01$), while the levels of IL-1 β and TGF- β 1 in the brain tissue of the rats treated with low-dose and high-dose *Duzhi* pills were significantly decreased (compared with the model group, all $P < 0.01$). The coagulation index fibrinogen level in the model group was significantly higher than that in the sham group ($P < 0.01$), and both low-dose and high-dose *Duzhi* pills could inhibit the production of fibrinogen (compared with the model group, both $P < 0.01$). DPPH scavenging test results showed that *Duzhi* pills could scavenge free radical, the half inhibitory concentration was (1.33 ± 1.11) mg/mL, and the slope of the curve was 1.378 ± 0.145 . **Conclusion** *Duzhi* pills play a cerebral protective role in ischemic stroke rats. The mechanism may be related to the inhibition of fibrinogen production, the reduction of inflammatory factors (TGF- β 1 and IL-1 β), and the antioxidant effects.

[**Key words**] *Duzhi* pills; ischemic stroke; inflammatory cytokines; fibrinogen; antioxidation

[**Citation**] WANG H, LIU Q, XIE W, et al. Cerebral protective effect of *Duzhi* pills on ischemic stroke rats and its mechanisms[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(5): 602-608. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230253.

缺血性脑卒中是一种急性血液循环障碍性疾病,具有高发病率、高死亡率、高致残率、高疾病负担的特点^[1-2]。缺血性脑卒中的发生、发展与血栓形成通路的激活密切相关。血管内皮损伤释放的炎症因子和血管活性因子通过正反馈激活内源性凝血级联通路促进血小板黏附/聚集在损伤部位,导致血栓形成^[3-4]。局部的血栓进一步促进缓激肽等血管活性物质的生成,并通过增加血脑屏障通透性、诱发水肿以及炎症细胞浸润/炎症因子释放,加剧脑缺血及再灌注所导致的脑损伤,引起脑梗死^[5-6]。

针对缺血性脑卒中的病理机制,药物治疗主要以溶栓、降纤抗凝、抗血小板聚集、神经保护、扩张脑血管等为主。以阿替普酶为代表的纤维蛋白原激活剂可选择性地激活血凝块中的纤溶酶原,具有局部溶栓抗凝的作用,已在临床上广泛应用于急性缺血性脑卒中患者的治疗,但其仍存在再通率低、颅内出血风险及半衰期短等缺点^[3]。因而开发新型的溶栓抗凝药物是当前抗缺血性脑卒中药物研究的一个关键切入点。

杜蛭丸是由杜仲(制)、巴戟天、淫羊藿、黄芪、当归、水蛭、赤芍、益母草、地黄、白薇、石菖蒲及伸筋草制成的中成药,为黑色水蜜丸剂,具有补肾、益气、活血之效,在临床上常用于治疗缺血性脑卒中及预防卒中再发生。本课题组前期研究发现,杜蛭丸灌胃给药对缺血性脑卒中模型大鼠具有神经保护作用,且这一作用可能与其抑制血

小板聚集、改善外周血液流变学、抑制血栓形成有关^[7]。在此基础上,本研究通过预先给药进一步探究杜蛭丸对缺血性脑卒中模型大鼠脑损伤的作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级健康雄性SD大鼠,体重250~280 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2012-2002;实验动物使用许可证号为SYXK(沪)2014-0018]。饲养条件:(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 10)%,基础饲料喂养,自由进食、饮水。

1.2 药物、试剂与仪器 杜蛭丸(吉林敖东延边药业股份有限公司,批号:2010001);阿加曲班注射液(天津药物研究院药业有限责任公司,批号:2004038);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)(美国Sigma公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);依达拉奉(美国Sigma公司);IL-1 β ELISA检测试剂盒[爱必信(上海)生物科技有限公司];TGF- β 1 ELISA检测试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司)。Varioskan Flash多功能酶标仪(美国ThermoFisher Scientific公司);TS100倒置显微镜(日本Nikon Eclipse Ti公司);LG-R-80(A型)血液流变分析仪(北京世帝科学仪器有限

公司)。

1.3 实验分组 杜蛭丸无法静脉给药,而缺血性脑卒中造模术后大鼠难以灌胃给药,因此采用预先连续灌胃给药使药物达到稳态后,再进行缺血性脑卒中造模的方式来研究杜蛭丸的脑保护作用。将健康雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、杜蛭丸低剂量组(每天1.0 g/kg)、杜蛭丸高剂量组(每天2.0 g/kg)、阿加曲班组(阳性对照)。杜蛭丸低、高剂量组大鼠每日灌胃给药1次,其他组则灌胃给予等量生理盐水,连续8 d。除假手术组外,其他组大鼠均于第8天灌胃30 min后采用线栓法建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑缺血再灌注模型,缺血时间为90 min。阿加曲班组在再灌注的同时经尾静脉单次给予阿加曲班(3.0 mg/kg)。

剔除MCAO手术后死亡及蛛网膜下腔出血的实验动物,最终用于神经行为学评分和脑梗死面积测量的各组动物样本量为假手术组9只、模型组8只、杜蛭丸低剂量组7只、杜蛭丸高剂量组9只、阿加曲班组8只,用于脑组织尼氏染色、ELISA检测的各组动物样本量为假手术组7只、模型组8只、杜蛭丸低剂量组7只、杜蛭丸高剂量组9只、阿加曲班组8只,用于血液流变学和凝血四项检测的各组动物样本量均为6只。

1.4 MCAO模型的制备^[8] 用12%水合氯醛(360 mg/kg)腹腔麻醉大鼠,仰卧位固定于鼠板,剃毛,用75%乙醇消毒手术区域。于大鼠颈部中间靠右侧区域剪口,钝性分离肌肉,将迷走神经和颈总动脉剥离,游离右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。近心端结扎颈总动脉。在颈总动脉和颈外动脉下方穿入备线,用动脉夹暂时夹闭颈总动脉,备线打活结备用。向上提拉颈外动脉备线,在距离颈总动脉分叉处剪一小口,插入直径为0.26 mm的尼龙线,尼龙线从颈外动脉经颈内动脉至大脑中动脉,阻塞大脑中动脉血流,扎紧备线。90 min后拔出线栓,将备线结扎系死结,缝合皮肤,将大鼠放回笼中饲养。对假手术组动物,仅分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,不进行结扎,分离完毕后缝合皮肤,放回笼中饲养。

1.5 动物实验检测指标和方法

1.5.1 神经行为学评分 脑缺血后24 h,对各组动物神经缺损症状进行行为学评分:(1)提起鼠尾,观

察前肢伸展情况。正常大鼠两前肢对称地伸向地面,有左肩内旋、左前肢内收现象发生者评分为4分,否则为0分。(2)将动物置于平滑地板上分别推左(或右)肩向对侧移动,检查抵抗推动的阻力。正常大鼠双侧阻力明显且对称,推右肩向左侧移动时发现阻力下降者,根据下降程度的不同评分为1~3分。

(3)将动物两前肢置一金属网上,观察两前肢的肌张力。正常大鼠两前肢张力明显且对称,左前肢张力下降者根据下降程度的轻重评为0~3分。

(4)将动物置于平滑地板上,若出现向一侧转圈评分为1分。动物根据以上标准评分,满分为11分。

1.5.2 脑梗死面积测量 各组大鼠进行神经行为学评分后麻醉,用真空采血管经腹主动脉采血备用;然后进行安乐死,快速分离大鼠脑组织,用预冷的PBS清洗,于-20℃冰冻。沿冠状面将大脑切成2 mm厚的切片,用2% TTC溶液在37℃染色30 min。未受损的脑组织呈现暗红色,而梗死区域呈现淡白色。梗死面积用ImageJ软件进行量化,计算公式如下:脑梗死面积(%)=(正面梗死面积/正面梗死半脑面积+背面梗死面积/背面梗死半脑面积)×0.5×100%。

1.5.3 脑组织尼氏染色 将脑组织自视交叉部位切开,取嘴侧端鼠脑置于-80℃冰箱保存备用;尾侧端鼠脑行甲醛固定、石蜡包埋与切片,经脱蜡处理后行尼氏染色。在光学显微镜下观察缺血脑区染色情况,采用ImageJ软件测定灰度值,进行染色强度评分。

1.5.4 ELISA法检测IL-1β、TGF-β1 将冻存脑组织剪碎,加入PBS匀浆,13 000×g离心20 min,取上清液。按照ELISA试剂盒说明书进行操作。应用Bradford法检测总蛋白质水平,用于校正IL-1β、TGF-β1的水平。

1.5.5 血液流变学及凝血指标检测 将大鼠麻醉后用真空采血管经腹主动脉采血,部分血液以肝素(1:9)抗凝,经全自动血液流变分析仪检测大鼠血液流变学指标;另一部分血液以柠檬酸钠(1:9)抗凝,4 000×g离心10 min,分离血浆,经全自动凝血分析仪测定活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB),其中APTT和TT的上限设置为60 s。

1.6 杜蛭丸的自由基清除能力检测 配制杜蛭丸水溶液,其工作浓度依次为 0.002、0.006、0.020、0.060、0.200、0.600、2.00、6.00、20.0 mg/mL,加样体系如下:对照孔为 DPPH 乙醇溶液 180 μ L+乙醇 20 μ L,空白孔为乙醇 200 μ L,样本 1 孔为各浓度杜蛭丸水溶液 20 μ L+DPPH 乙醇溶液 180 μ L,样本 2 孔为各浓度杜蛭丸水溶液 20 μ L+乙醇 180 μ L。每个浓度设 3 个复孔。避光反应 30 min 后用酶标仪于波长 517 nm 处测定光密度 (D 值)。受试物的 DPPH 清除能力计算公式: DPPH 自由基清除活性 (%) = [(对照孔 D 值-空白孔 D 值)-(样本 1 孔 D 值-样本 2 孔 D 值)]/(对照孔 D 值-空白孔 D 值) $\times$ 100%。以依达拉奉作为阳性对照。

1.7 统计学处理 采用 SigmaStat 2.03 软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s_x$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠神经行为学评分比较 假手术组大鼠神经行为学表现正常。模型组大鼠存在神经行为缺损症状,神经行为学评分为 (5.750 ± 0.590)

分。给予杜蛭丸或阿加曲班均可改善神经行为缺损症状,杜蛭丸低剂量组、杜蛭丸高剂量组、阿加曲班组神经行为学评分分别为 (4.000 ± 0.309)、(2.778 ± 0.222)、(3.375 ± 0.460) 分,其中杜蛭丸高剂量组、阿加曲班组神经行为学评分低于模型组 (均 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠脑梗死面积比较 各组大鼠脑组织切片 TTC 染色结果如图 1 所示。假手术组术侧脑区脑组织呈深红色,与对侧脑区比较几乎无淡白色区,梗死面积为 (0.508 ± 0.133) %;模型组大鼠缺血侧脑区有大量淡白色区,与对侧脑区比较深红色区域显著减少,梗死面积为 (31.140 ± 2.790) %,与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);杜蛭丸低剂量组和高剂量组大鼠缺血侧脑区淡白色区有不同程度减少,深红色区域增加,梗死面积分别为 (27.080 ± 2.416) % 和 (18.822 ± 1.718) %,与模型组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$);阿加曲班组大鼠缺血侧脑区淡白色区显著减少,而深红色区域增加,梗死面积为 (14.690 ± 2.215) %,与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果提示,杜蛭丸和阿加曲班可显著减少 MCAO 大鼠脑梗死面积。

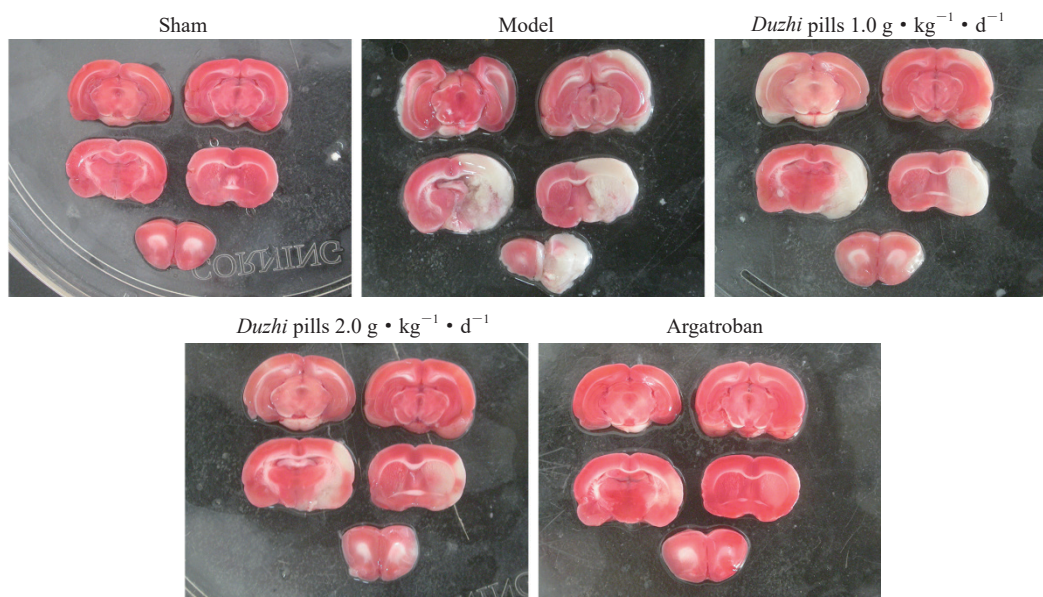


图 1 杜蛭丸对 MCAO 大鼠脑梗死面积的影响

Fig 1 Effect of *Duzhi* pills on cerebral infarction area in MCAO rats

The representative TTC-stained images of rat brain. MCAO: Middle cerebral artery occlusion; TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

2.3 各组大鼠缺血脑区尼氏染色结果 缺血脑片尼氏染色结果如图 2 所示。假手术组大鼠双侧脑区神经元深染,染色强度评分为 (10.976 ± 1.357)

分;模型组大鼠缺血侧脑区神经元着色浅淡,染色强度降低,评分为 (2.504 ± 0.512) 分;杜蛭丸低剂量组缺血侧脑区神经元着色浅淡,评分

为 (3.274±0.635) 分; 杜蛭丸高剂量组及阿加曲班组缺血侧脑区神经元着色变深, 评分分别为 (6.161±0.701) 和 (6.183±1.102) 分。结果提示, 高剂量杜蛭丸和阿加曲班有缓解大鼠脑缺血所致脑神经元损伤的作用。

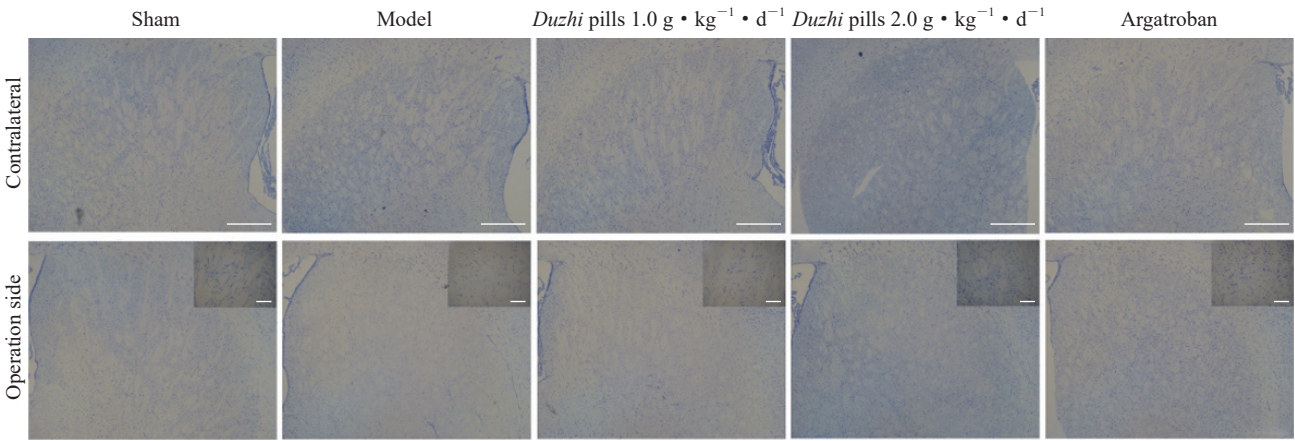


图 2 杜蛭丸对 MCAO 大鼠脑组织损伤的影响
Fig 2 Effect of *Duzhi* pills on brain injury in MCAO rats

The representative images of rat brain (Nissl staining). The inserts were the amplifications of ischemic region. Scale bar=50 μm. MCAO: Middle cerebral artery occlusion.

2.4 各组大鼠脑内 IL-1β、TGF-β1 水平比较 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中 IL-1β 和 TGF-β1 水平升高 (均 $P<0.01$)。与模型组相比, 杜蛭丸低剂量组、杜蛭丸高剂量组和阿加曲班组大鼠脑组织中 IL-1β 和 TGF-β1 水平均降低 (均 $P<0.01$)。见表 1。

表 1 杜蛭丸对 MCAO 大鼠脑组织炎症因子的影响
Tab 1 Effect of *Duzhi* pills on brain inflammatory factors of MCAO rats

Index	Sham $n=7$	Model $n=8$	(pg • mg ⁻¹), $\bar{x} \pm s_x$		
			<i>Duzhi</i> pills 1.0 g • kg ⁻¹ • d ⁻¹ $n=7$	<i>Duzhi</i> pills 2.0 g • kg ⁻¹ • d ⁻¹ $n=9$	Argatroban $n=8$
IL-1β	237.155±26.635	388.708±44.701**	287.043±30.934 ^{△△}	225.102±14.658 ^{△△}	250.926±22.807 ^{△△}
TGF-β1	173.205±16.225	312.243±32.528**	220.048±23.185 ^{△△}	147.628±13.594 ^{△△}	137.367±12.867 ^{△△}

** $P<0.01$ vs sham group; ^{△△} $P<0.01$ vs model group. MCAO: Middle cerebral artery occlusion; IL-1β: Interleukin-1β; TGF-β1: Transforming growth factor-β1.

2.5 各组大鼠血液流变学及凝血功能比较 与假手术组大鼠相比, 模型组大鼠全血低切黏度增高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 杜蛭丸低剂量及高剂量组大鼠全血低切黏度降低 (均 $P<0.05$) , 可见杜蛭丸能改善 MCAO 大鼠的血液黏滞状态, 但低剂量组和高剂量组的全血低切黏度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

模型组大鼠凝血指标 APTT、PT、TT 与假手术组大鼠相比无明显变化, 但 FIB 升高 ($P<0.01$) ; 与模型组相比, 杜蛭丸低剂量组和高剂量组大鼠

FIB 降低 (均 $P<0.01$) , 杜蛭丸低剂量组和高剂量组的 FIB 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.6 杜蛭丸 DPPH 清除能力 如图 3 所示, 杜蛭丸水溶液清除 DPPH 的 IC₅₀ 为 (1.33±1.11) mg/mL, 曲线坡度为 1.378±0.145; 依达拉奉作为已知抗氧化剂, 其清除 DPPH 的 IC₅₀ 为 (0.008±1.084) mg/mL, 曲线坡度为 1.682±0.191。结果显示, 杜蛭丸水溶液具有一定的自由基清除能力, 但弱于阳性对照依达拉奉。

表 2 杜蛭丸对 MCAO 大鼠血液流变学指标和凝血功能的影响

Tab 2 Effect of *Duzhi* pills on hemorheological indexes and coagulation function of MCAO rats

Index	Sham	Model	<i>n</i> =6, $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$		
			<i>Duzhi</i> pills 1.0 g•kg ⁻¹ •d ⁻¹	<i>Duzhi</i> pills 2.0 g•kg ⁻¹ •d ⁻¹	Argatroban
WBV at 11.5 s ⁻¹ /(mPa•s)	13.917±0.358	19.477±0.774 [*]	15.822±0.394 [△]	15.137±0.634 [△]	13.783±0.683 ^{△△}
WBV at 57.5 s ⁻¹ /(mPa•s)	7.197±0.237	7.410±0.407	7.347±0.225	7.990±0.273	6.700±0.310
WBV at 115 s ⁻¹ /(mPa•s)	5.748±0.348	6.038±0.310	5.633±0.171	5.833±0.301	5.110±0.274
APTT/s	18.750±0.511	19.533±0.402	17.567±0.095	17.600±0.124	60.000±0.000 ^{△△}
PT/s	14.917±0.282	15.933±0.311	15.033±0.216	15.567±0.472	23.767±0.782 ^{△△}
TT/s	34.217±0.149	33.850±0.570	34.633±0.154	34.717±0.239	60.000±0.000 ^{△△}
FIB/(g•L ⁻¹)	1.965±0.115	5.073±0.300 ^{**}	2.203±0.070 ^{△△}	2.353±0.229 ^{△△}	2.147±0.051 ^{△△}

^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 vs sham group; [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01 vs model group. MCAO: Middle cerebral artery occlusion; WBV: Whole-blood viscosity; APTT: Activated partial thromboplastin time; PT: Prothrombin time; TT: Thrombin time; FIB: Fibrinogen.

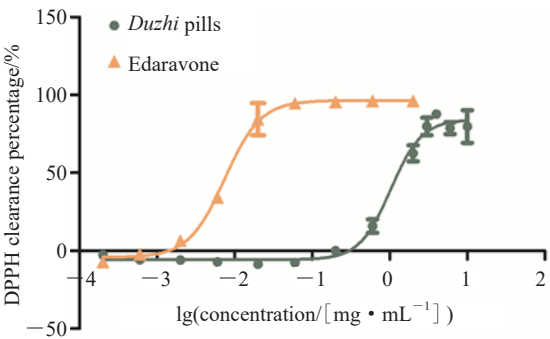


图 3 杜蛭丸水溶液的 DPPH 清除能力检测

Fig 3 Determination of DPPH scavenging ability of *Duzhi* pill-water solution

n=3, $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

3 讨论

血栓形成和炎症反应是缺血性脑卒中发生、发展的重要因素^[4-6]。脑血栓形成可造成脑局部缺血缺氧,导致血管内皮细胞损伤,暴露内皮下胶原,促进血小板在损伤处聚集和可逆性结合,诱导血栓进一步形成^[4]。同时,活化的血小板还会激活高分子量激肽原裂解,释放缓激肽。缓激肽促进水肿形成和炎症细胞活化,而炎症细胞释放的 IL-1 β 、TGF- β 1 等炎症因子会进一步破坏血管内皮细胞,促进血小板聚集和血栓形成,加重神经损伤^[5-6]。既往研究表明,脑缺血后脑内微血栓形成与炎症水平有很高的关联性^[4]。脑缺血后,缺血脑区促炎因子如 IL-1 β 及 TGF- β 1 等水平增高,加重神经损伤^[5]。同时, TGF- β 1 可诱导纤溶酶原激活物抑制物 1 的表达,促进基质金属蛋白酶的产生,进而影响血管屏障功能^[9-10]。因而,抑制血栓形

成、缓解缺血脑区炎症反应是缺血性脑卒中治疗的关键。

杜蛭丸是一种临床常用的抗脑卒中中成药,可通过抑制血小板聚集、改善血液流变学发挥抗缺血性脑卒中的作用^[7]。在本研究中,杜蛭丸能降低缺血性脑卒中模型大鼠脑内 IL-1 β 、TGF- β 1 的水平,提示其脑保护作用可能是通过抗炎作用产生的。此外,杜蛭丸水溶液对 DPPH 自由基的清除具有一定作用,这一作用可能也与其抗炎、抗缺血性脑卒中作用相关。

在构成杜蛭丸的 12 味药材中,白薇可下调 IL-6、IL-1 β 等炎症因子水平,发挥抗炎作用^[11];伸筋草的化学成分对 DPPH 自由基有较强的清除作用,提示其具有抗氧化作用和抗炎活性^[12];水蛭有抗血小板聚集、抗血栓形成、清除自由基、抗炎等作用^[13],作为凝血酶特异性抑制剂有抗凝的作用^[14];杜仲^[15]、黄芪^[16]、巴戟天^[17]、淫羊藿^[18]具有抗炎抗氧化的作用;益母草具有活血化瘀、抗血栓形成的功效^[19];当归、赤芍均有抑制血小板聚集的功效^[20-21]。地黄具有抗炎^[22]、维持脑缺血后抗炎因子和促炎因子平衡^[23]的作用。未来可根据杜蛭丸中各成分进一步分析其药理作用,阐明其脑保护作用的物质基础。

综上所述,杜蛭丸对缺血性脑卒中大鼠有脑保护作用,这一作用可能与其降低血液 FIB、抑制氧化应激、降低脑内炎症水平有关。

[参 考 文 献]

[1] KRISHNAMURTHI R V, IKEDA T, FEIGIN V L.

- Global, regional and country-specific burden of ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017 [J]. *Neuroepidemiology*, 2020, 54(2): 171-179. DOI: 10.1159/000506396.
- [2] 王陇德,彭斌,张鸿祺,等.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2022, 19(2): 136-144. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5921.2022.02.011.
- [3] BANSAL S, SANGHA K S, KHATRI P. Drug treatment of acute ischemic stroke[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2013, 13(1): 57-69. DOI: 10.1007/s40256-013-0007-6.
- [4] DE MEYER S F, DENORME F, LANGHAUSER F, et al. Thromboinflammation in stroke brain damage[J]. *Stroke*, 2016, 47(4): 1165-1172. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.011238.
- [5] GÖB E, REYMANN S, LANGHAUSER F, et al. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation[J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(5): 784-803. DOI: 10.1002/ana.24380.
- [6] KLEINSCHNITZ C, STOLL G, BENDSZUS M, et al. Targeting coagulation factor XIII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(3): 513-518. DOI: 10.1084/jem.20052458.
- [7] 王瑞雪,张敬,赵珍,等.杜蛭丸灌胃对缺血性脑卒中大鼠的保护作用及其机制探讨[J]. *医学综述*, 2019, 25(15): 3090-3095. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.15.034.
- [8] 贾淑伟,夏青.线栓法建立局灶性脑缺血模型的方法与探讨[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(24): 33-35. DOI: CNKI:SUN:YYCY.0.2014-24-009.
- [9] ZHANG L, CHOPP M, TENG H, et al. Combination treatment with N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline and tissue plasminogen activator provides potent neuroprotection in rats after stroke[J]. *Stroke*, 2014, 45(4): 1108-1114. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004399.
- [10] DATTA P K, BLAKE M C, MOSES H L. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta-induced physical and functional interactions between smads and Sp1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40014-40019. DOI: 10.1074/jbc.C000508200.
- [11] 舒朋华,喻梦竹,李亚敏,等.白薇化学成分与药理作用的研究进展[J]. *中国药房*, 2021, 32(2): 253-256. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.22.
- [12] 王继坤,宋长红,关秀锋.伸筋草的化学成分及药理作用研究进展[J]. *化学工程师*, 2021, 35(7): 55-57. DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20210755.
- [13] 刘抒雯,刘敬霞,虎喜成,等.水蛭治疗缺血性脑卒中作用机制研究进展[J]. *新中医*, 2015, 47(6): 284-286. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.131.
- [14] 刘璇,高美凤,孔毅.水蛭化学成分及药理作用的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2017, 24(1): 76-80. DOI: 10.19526/j.cnki.1005-8915.20170117.
- [15] 高宏伟,李玉萍,李守超.杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2021, 38(6): 73-81. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.210615.
- [16] 胡妮娜,张晓娟.黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2021, 38(1): 76-82. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.210118.
- [17] 郑素玉,陈健.巴戟天有效成分及其药理作用实验研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(9): 823-825, 828. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.2012.09.028.
- [18] 龚华乾,高敏,柴艺汇,等.淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. *湖北民族大学学报(医学版)*, 2021, 38(4): 75-78. DOI: 10.13501/j.cnki.42-1590/r.2021.04.018.
- [19] 韦海红,潘小姣.益母草抗血栓作用及临床应用进展[J]. *广西中医药大学学报*, 2015, 18(1): 80-84. DOI: CNKI:SUN:GSZB.0.2015-01-039.
- [20] 马艳春,吴文轩,胡建辉,等.当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医药学报*, 2022, 50(1): 111-114. DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.220024.
- [21] 张石凯,曹永兵.赤芍的药理作用研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2021, 39(2): 97-101. DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202006087.
- [22] 付国辉,杜鑫.地黄化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国医药科学*, 2015, 5(15): 39-41. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.022.
- [23] 李丽娅,刘昊,王超云,等.地黄饮子对大鼠脑缺血再灌注后炎症反应的抑制作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(1): 23-28. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.003.

[本文编辑] 尹 茶