

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20231104

实验研究

化痰通络汤改善脑缺血再灌注小鼠 神经功能作用的研究

刘甜甜¹, 马春雷², 刘付红³, 郭平¹✉

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014; 2. 山东第一医科大学, 山东 济南 250014;
3. 山东第一医科大学附属第一医院, 山东 济南 250014)

【摘要】目的:探究化痰通络汤对大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型小鼠神经功能的作用及分子机制。方法:85只SPF级C57BL/6J雄性小鼠随机分为假手术组(Control)、模型组(Model)、化痰通络汤高剂量组(HTTLD-H)、化痰通络汤中剂量组(HTTLD-M)、化痰通络汤低剂量组(HTTLD-L)和阿司匹林肠溶片组(AECT)。小鼠MCAO/R模型复制成功30 min后,分别给予相应药物灌胃给药,连续干预7 d。采用神经功能缺损评分评估小鼠神经功能缺损程度;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测脑组织梗死体积;苏木素/伊红(HE)染色法检测脑组织形态学改变;免疫蛋白印记(Western blot)检测脑组织中血管性血友病因子(vWF)、纤维蛋白原(Fibrinogen)、血脑屏障密封蛋白(Claudin-5)和闭合蛋白(Occludin)蛋白表达水平;免疫荧光法检测脑组织中vWF、血小板膜糖蛋白IX(GP IX,标记血小板)、Fibrinogen、Claudin-5和Occludin表达。结果:与模型组比较,化痰通络汤能减少MCAO/R小鼠脑组织梗死体积($P < 0.01$),改善神经功能($P < 0.01$),以化痰通络汤中剂量组效果最佳;化痰通络汤能在一定程度上维持MCAO/R小鼠脑组织中血管壁完整性,改善血液循环;化痰通络汤能减少脑组织中vWF表达($P < 0.01$);减少血小板黏附和聚集($P < 0.01$);减少Fibrinogen沉积,以化痰通络汤高、中剂量组效果最显著($P < 0.01$);化痰通络汤能升高脑组织中Claudin-5和Occludin蛋白表达($P < 0.05$),维护血脑屏障。结论:化痰通络汤能减少MCAO/R模型小鼠脑组织梗死体积,改善神经功能,这可能与化痰通络汤降低MCAO/R模型小鼠脑组织中vWF的表达,减少血小板黏附和聚集,减少Fibrinogen沉积,并在一定程度上维持Claudin-5和Occludin蛋白表达、维护血脑屏障有关。

【关键词】脑缺血再灌注;化痰通络汤;血管性血友病因子;血小板;血脑屏障

【引用格式】

刘甜甜,马春雷,刘付红,等.化痰通络汤改善脑缺血再灌注小鼠神经功能作用的研究[J].中医药信息,2023,40(11):23-31.

LIU T T, MA C L, LIU F H, et al. Research on the effect of Huatan Tongluo Decoction on improving neural function of cerebral ischemia-reperfusion mice[J]. Information on TCM, 2023, 40(11):23-31.

缺血性脑卒中又称脑梗死,是目前中老年人群常见病、多发病,其发病率、致残率、致死率居高不下,严重威胁人类生命和健康^[1-2]。目前临床治疗缺血性脑卒中中以溶栓、抗凝、抗血小板、降纤和血栓切除术等为主,

从而恢复脑组织血流再灌注^[3-4]。然而,由于脑部毛细血管致密,微血管内细胞附壁及微血栓形成,与免疫炎症反应密切相关造成再灌注无复流现象,反而加剧了缺血性脑损伤^[5-7]。再灌注后无复流是指通过多

基金项目:山东第一医科大学附属第一医院培育基金(QYPY2021NSFC0613)

第一作者简介:刘甜甜(1987-),女,2019级中西医结合基础专业硕士研究生,主要研究方向:中医方剂防治疾病现代研究。

✉通信作者简介:郭平(1960-),女,博士,教授,主要研究方向:中医方剂防治疾病现代研究。

种方式实现大动脉再通后,局部组织仍得不到充分血液灌注的现象,这成为外科治疗脑梗死,减轻中风后遗症的重要障碍,重视改善再灌注后无复流现象是提高再灌注疗效的重要方式^[8]。

脑梗死属中风病的范畴,缺血性中风病是由正气亏虚、饮食不节、起居劳倦、情志内伤等多种因素,产生风、火、痰、瘀等引起脑脉痹阻,临床以猝然昏仆、不省人事、口歪言謇、半身不遂等为主要表现的病症。其中,风、痰、瘀是影响缺血性中风的关键因素,治疗宜以祛风化痰、活血通络为基本治法。痰瘀互结因于津血同源,与血管内皮损伤、血液黏度增加、过度凝血、神经免疫炎症反应关系密切^[9-10]。化痰通络汤(Huatan Tongluo Decoction, HTTL)具有熄风化痰、活血通络的功效。本研究通过建立小鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型,探讨化痰通络汤对脑缺血再灌注损伤的治疗作用及机制,以期化痰通络汤临床应用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF级小鼠购自北京维通利华实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2021-0006,品系C57BL/6J,雄性,8~12周龄,体质量22~25 g。实验单位使用许可证编号:SYXK(鲁)20180009,小鼠在千佛山医院动物研究中心 SPF级条件饲养,室温21~25℃,相对湿度40%~60%,自由进食饮水,自动光照系统模拟昼夜循环光照12 h/d。实验中涉及动物处置的内容均经动物实验伦理委员会审核并通过。

1.2 主要仪器

解剖显微镜(日本OLYMPUS,型号:SZX2-TR30);MCAO/R线栓(深圳RWD);全自动真空脱水机(德国徕卡,型号:APS200S);生物组织包埋机(浙江科迪,型号:KD-BM/BL);石蜡切片机(德国徕卡,型号:RM2235);摊片烤片机(浙江科迪,型号:KD-P);显微镜(日本OLYMPUS,型号:BX51T);高速低温组织研磨仪(武汉Servicebio);高速冷冻离心机(德国Eppendorf,型号:5424R);酶标仪(美国ThermoFisher Multiska);蛋白电泳印记系统(美国伯乐,MINI);冰冻切片机(德国徕卡,型号:CM1950);倒置荧光显微镜(德国徕卡,型号:DMi8)。

1.3 主要试剂与药物

2% TTC 染液(Solarbio,批号:20220113);苏木素-伊红染液(Servicebio,批号分别是ZH190905、ZH202812);vWF多抗、Fibrinogen α 链多抗、GP IX多抗、 β -actin单抗(Proteintech,批号分别为27186-1-AP、20645-1-AP、14564-1-AP、66009-1-1 g);

Claudin-5多抗(Abcam,批号:ab15106);HRP标记山羊抗兔IgG二抗(Jackson,批号:111-036-003);HRP标记抗小鼠IgG二抗(Cell Signaling Technology,批号:7076P2);488山羊抗兔荧光二抗、546猴抗兔荧光二抗(Invitrogen,批号:A11034、A10040);DAPI溶液(Solarbio,批号:C0065);BCA蛋白检测试剂盒(Thermo,批号:UJ290653);WB-HRP发光液(美国Millipore,批号:2205202);中药饮片(由山东中医药大学附属医院提供);阿司匹林肠溶片(沈阳奥吉娜药业有限公司,国药准字H20065051)。

2 实验方法

2.1 药物组成及制备

化痰通络汤组成:白术9 g,茯苓9 g,半夏9 g,天麻12 g,胆南星6 g,天竺黄6 g,制香附9 g,赤芍9 g,红花9 g,炒桃仁9 g,紫丹参15 g,大黄6 g及三七(冲服)6 g。将中药饮片加入8倍量水浸泡,煎煮45 min,过滤,水煎液浓缩至含生药量2 g/mL,加入三七粉0.11 g/mL,混匀,药液含生药量为2.11 g/mL为高剂量组给药液;中、低剂量组分别加1倍、3倍生理盐水稀释。

阿司匹林肠溶片(Aspirin Enteric-coated Tablets, AECT)研磨成极细粉末,加生理盐水成0.93 mg/mL药液。

2.2 动物分组及给药

85只小鼠随机分为假手术组(Control)10只和造模组75只;模型制作成功小鼠随机分为模型组(Model)、化痰通络汤高剂量组(HTTL-H)、化痰通络汤中剂量组(HTTL-M)、化痰通络汤低剂量组(HTTL-L)和阿司匹林肠溶片组(AECT),每组15只。

化痰通络汤高、中、低剂量组每日给药剂量分别为29.64、14.82、7.41 g/kg;阿司匹林肠溶片组每日给药剂量为13 mg/kg;假手术组和模型组给予等体积生理盐水。于再灌注后30 min分别灌胃给予相应药物,连续给药7 d。

2.3 小鼠MCAO/R模型制备及神经功能缺损评分

运用Longa法^[11],参照Uluc大鼠MCAO/R模型制作方法^[12],并根据小鼠解剖特点进行改良复制小鼠MCAO/R模型。小鼠术前自由进食饮水,整个造模过程需在解剖显微镜下操作。小鼠经麻醉消毒后,逐步分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,自左侧颈外动脉进栓,经颈内动脉至左侧MCA分叉处,手下会感到轻微阻力,镜下会看到线栓有轻微回弹,轻弹几次刺激血管收缩利于阻塞成功,进栓深度约0.9~1 cm,缺血90 min后拔出线栓再灌注,并缝合伤口。假手术组仅暴露血管不插入线栓。具体流程图见图1。

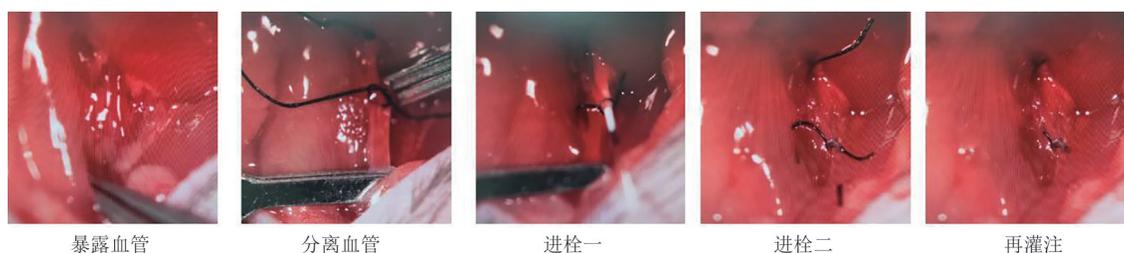


图1 小鼠MCAO/R模型制作流程图

神经功能缺损评分标准:0分,无神经功能缺损症状;1分,提尾时右前肢不能完全伸展;2分,爬行时转圈;3分,右侧前、后肢均不能完全伸展,爬行时身体向右侧倾倒;4分,右侧瘫痪,无自发活动或有意识障碍。评分1~3分为模型制作成功。

2.4 TTC染色法检测脑组织梗死体积

于术后第8天麻醉小鼠并断头取脑组织, -20°C 速冻20 min,在冰盒上自额叶前极起切出平均厚度约1 mm的5片冠状切片,放入2% TTC染液中, 37°C 避光水浴20 min,4%多聚甲醛固定,将固定好的脑片按顺序排列,并拍照。用ImageJ软件计算每片脑组织面积及缺血部位脑组织面积。

缺血区体积比(%) = 各切片白色缺血区域面积之和/各脑片面积之和 $\times 100\%$

2.5 HE染色法进行病理组织形态检测

用PBS缓冲液20 mL,4%多聚甲醛20 mL进行组织灌注后取脑组织,放入4%多聚甲醛溶液中固定24~48 h。脑组织经脱水机固定程序脱水,经包蜡、切片、脱蜡、HE染色、脱水、封片后,显微镜观察并拍照。

2.6 Western blot检测脑组织中vWF、Fibrinogen、Claudin-5和Occludin蛋白表达

选择左侧半暗带部位脑组织,经裂解液(RIPA:PMSF = 100:1)裂解15 min;研磨、离心后取上清;用BCA法测定蛋白质浓度,按蛋白样品: $5 \times \text{Bufer} = 4:1$ 比例向蛋白质样品中加入 $5 \times \text{Bufer}$, 95°C 加热15 min使蛋白质变性。取蛋白样品50 μg 进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%牛奶封闭2 h,加入一抗(vWF、Fibrinogen、Claudin-5、Occludin抗体:一抗稀释液 = 1:1 000; β -actin抗体:一抗稀释液 = 1:5 000) 4°C 孵育过夜。次日经TBST洗,加入相应二抗(1:8 000)孵育2 h, TBST洗膜后显影。用ImageJ软件进行灰度值分析。

2.7 免疫荧光检测脑组织vWF、GP IX、Fibrinogen、Claudin-5和Occludin表达

脑组织OCT包埋,切取7 μm 冰冻切片,PBS清洗,

按Triton:PBS = 1:1 000比例透膜10 min,PBS清洗,5%胎牛血清封闭液封闭30 min,加一抗(vWF、GP IX、Fibrinogen、Claudin-5、Occludin抗体:PBS=1:1 000) 4°C 孵育过夜。次日,PBS洗去一抗。加入二抗(vWF、GP IX、Fibrinogen用488羊抗兔荧光二抗,Claudin-5、Occludin用546猴抗兔荧光二抗,二抗:PBS = 1:300)避光孵育2 h,PBS洗后加DAPI 10 min,PBS洗后用抗荧光衰减封片剂封片,于荧光显微镜下拍照。用ImageJ软件进行灰度值分析。

2.8 统计学方法

实验数据采用SPSS 25.0软件,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较,数据服从正态分布,满足方差齐性,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较用最小显著性差异法(LSD post hoc)检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,所有实验重复次数均 ≥ 3 次。

3 结果

3.1 小鼠死亡情况

术后7 d内,假手术组小鼠没有死亡,模型组死2只,化痰通络汤高、中剂量组各死亡1只,化痰通络汤低剂量组死亡2只,阿司匹林肠溶片组死亡4只。

3.2 神经功能缺损评分

于术后第8天进行神经功能缺损评分。结果与假手术组比较,模型组小鼠出现显著神经功能缺损($P < 0.01$);与模型组比较,化痰通络汤高、中、低剂量组和阿司匹林肠溶片组小鼠神经功能缺损评分显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);其中化痰通络汤中剂量组小鼠神经功能缺损评分最低,但各给药组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

3.3 TTC染色结果

假手术组小鼠脑组织无明显白色梗死灶,模型组与各模型加药物组小鼠脑组织均有明显白色梗死灶。与假手术组比较,模型组小鼠脑组织梗死体积显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,化痰通络汤高、中、低剂量组和阿司匹林肠溶片组小鼠脑组织梗死体积均显著减小($P < 0.01$)。见图2。

表1 各组小鼠神经功能缺损评分、脑组织梗死体积比较($\bar{x} \pm s$)

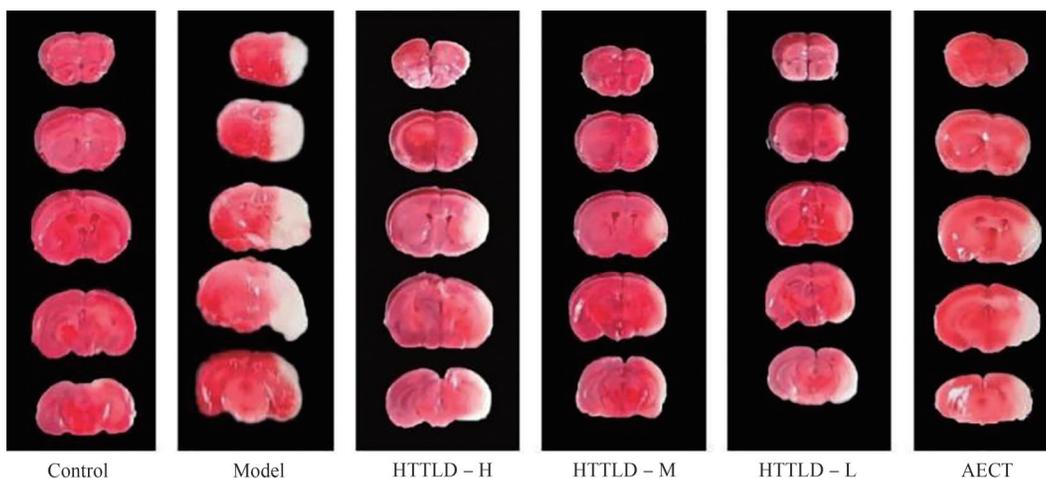
组别	n	神经功能缺损评分/分	梗死体积比/%
Control	3	0	0
Model	3	1.77 ± 0.17**	29.10 ± 0.51**
HTTLD-H	3	1.29 ± 0.13***	16.35 ± 1.29***
HTTLD-M	3	1.21 ± 0.11***	13.11 ± 0.93***
HTTLD-L	3	1.38 ± 0.14*	15.85 ± 1.05***
AECT	3	1.30 ± 0.15*	15.61 ± 1.34***

注:与Control比较,** $P < 0.01$;与Model比较,*** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

3.4 HE染色结果

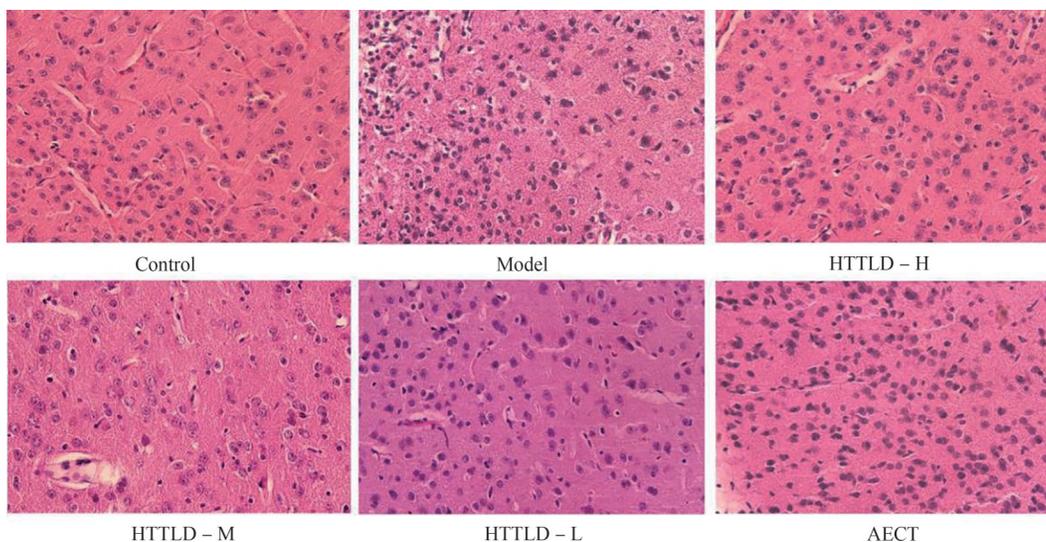
假手术组小鼠脑组织可见密布血管网,且血管清

晰、分布均匀;细胞完整,排列整齐有序,胞质均匀,核仁清晰可见。模型组小鼠脑组织鲜有完整血管存在、管腔内斑块阻塞微血管;细胞排列紊乱、胞膜碎裂,胞核固缩、变形,呈现出明显坏死改变。各给药组小鼠脑组织均有血管网分布,其中化痰通络汤高、中剂量组血管网较为清晰,管内有少量细胞沉积;多数细胞排列整齐,胞质均匀,胞体完整,核仁清晰。化痰通络汤低剂量组和阿司匹林肠溶片相较于模型组,血管相对清晰,但仍有明显斑块沉积,血管闭塞情况有所改善。见图3。



注:Control为假手术组;Model为模型组;HTTLD-H为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L为化痰通络汤低剂量组;AECT为阿司匹林肠溶片组。

图2 脑组织TTC染色图



注:Control为假手术组;Model为模型组;HTTLD-H为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L为化痰通络汤低剂量组;AECT为阿司匹林肠溶片组。

图3 脑组织HE染色图($\times 400$)

3.5 Western blot结果

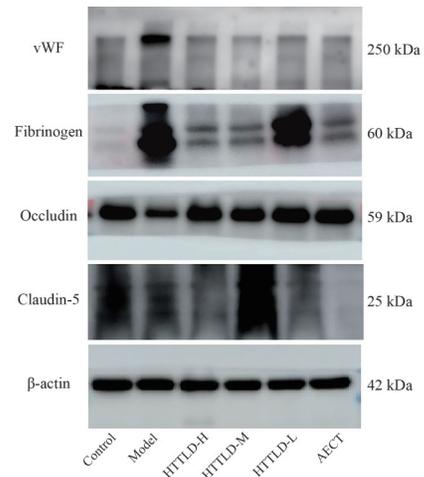
与假手术组比较,模型组小鼠脑组织中vWF、Fibrinogen蛋白表达显著升高($P < 0.01$),Claudin-5、Occludin蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。与模型组比

较,化痰通络汤高、中剂量组与阿司匹林肠溶片组vWF和Fibrinogen表达显著降低($P < 0.01$);化痰通络汤低剂量组vWF表达显著降低($P < 0.01$),Fibrinogen表达降低不显著($P > 0.05$);化痰通络汤中剂量组Claudin-5

蛋白表达显著升高($P < 0.01$),化痰通络汤高、低剂量组 Claudin-5 蛋白表达虽有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);化痰通络汤高、低剂量组 Occludin 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),化痰通络汤中剂量组与阿司匹林肠溶片组 Occludin 蛋白表达虽有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图4和表2。

3.6 免疫荧光结果

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织中 vWF、GP IX、Fibrinogen 表达显著增加($P < 0.01$), Claudin-5 和 Occludin 表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,化痰通络汤高、中、低剂量组和阿司匹林肠溶片组 vWF、GP IX、Fibrinogen 表达显著降低($P < 0.01$), Claudin-5 表达显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);化痰通络汤高、中、低剂量组 Occludin 表达显著升高($P < 0.01$)。见图5~9和表3。



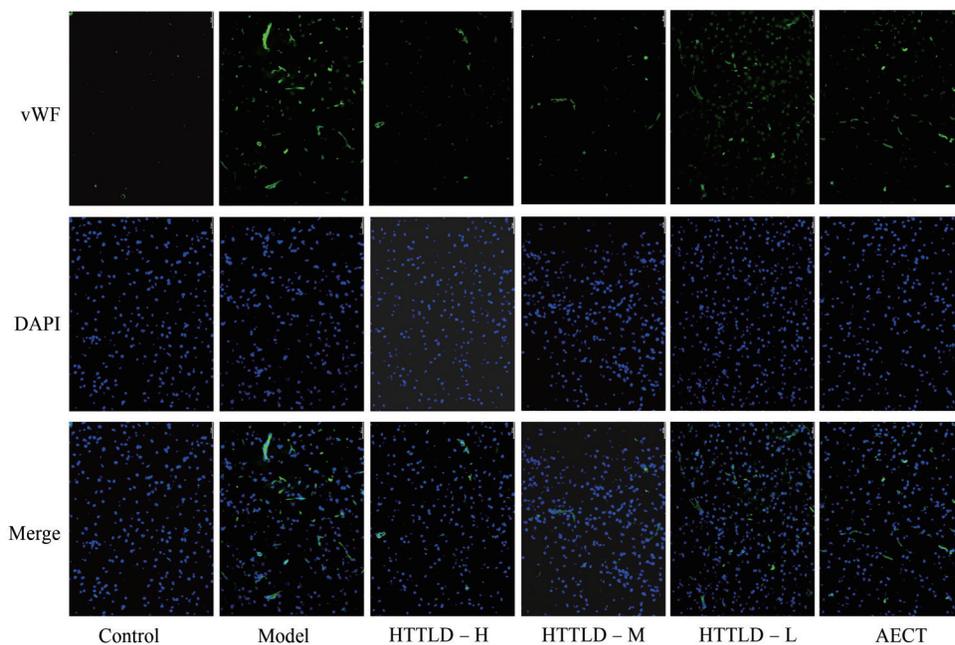
注:Control为假手术组;Model为模型组;HTTLD-H为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L为化痰通络汤低剂量组;AECT为阿司匹林肠溶片组。

图4 Western blot结果

表2 各组小鼠脑组织 Western blot 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

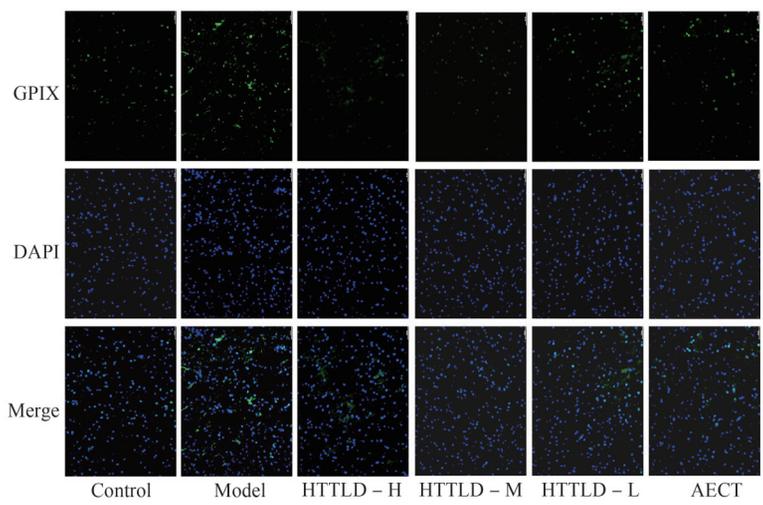
组别	n	vWF/ β -actin	Fibrinogen/ β -actin	Claudin-5/ β -actin	Occludin/ β -actin
Control	3	0.49 ± 0.07	0.27 ± 0.02	1.53 ± 0.11	1.12 ± 0.01
Model	3	0.87 ± 0.05**	1.01 ± 0.05**	0.69 ± 0.05**	0.59 ± 0.00**
HTTLD-H	3	0.53 ± 0.05##	0.49 ± 0.11##	0.88 ± 0.05	1.08 ± 0.03#
HTTLD-M	3	0.39 ± 0.05##	0.59 ± 0.11##	1.25 ± 0.12##▲	1.03 ± 0.07
HTTLD-L	3	0.38 ± 0.07##	0.96 ± 0.04▲▲	0.86 ± 0.13	1.20 ± 0.27#
AECT	3	0.42 ± 0.1##	0.44 ± 0.07##	0.53 ± 0.19	0.97 ± 0.24

注:与Control比较,** $P < 0.01$;与Model比较,## $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与AECT比较,▲▲ $P < 0.01$ 。



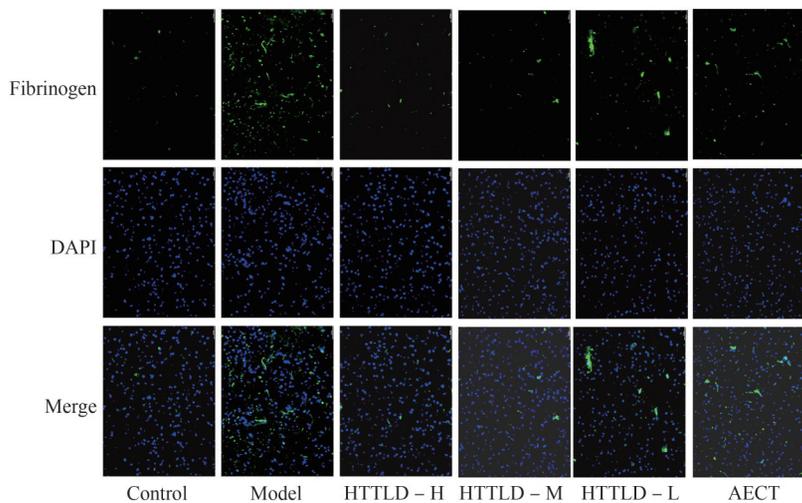
注:Control为假手术组;Model为模型组;HTTLD-H为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L为化痰通络汤低剂量组;AECT为阿司匹林肠溶片组。

图5 vWF免疫荧光结果($\times 200$)



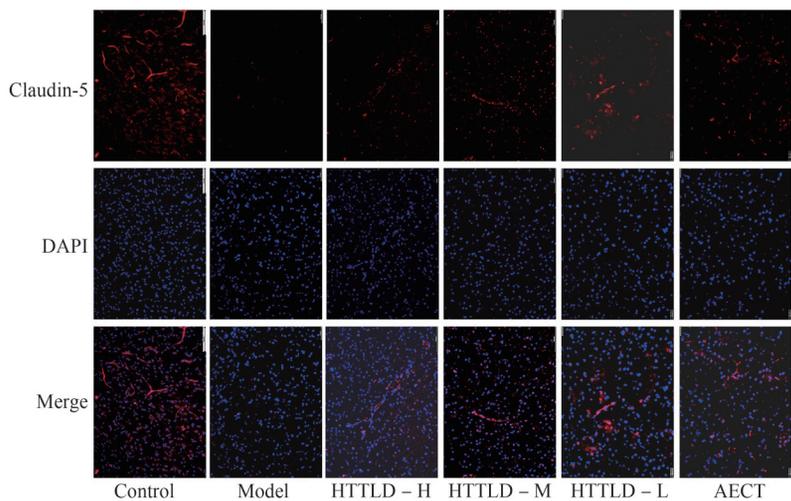
注:Control 为假手术组;Model 为模型组;HTTLD-H 为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M 为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L 为化痰通络汤低剂量组;AECT 为阿司匹林肠溶片组。

图 6 GPIX 免疫荧光结果(×200)



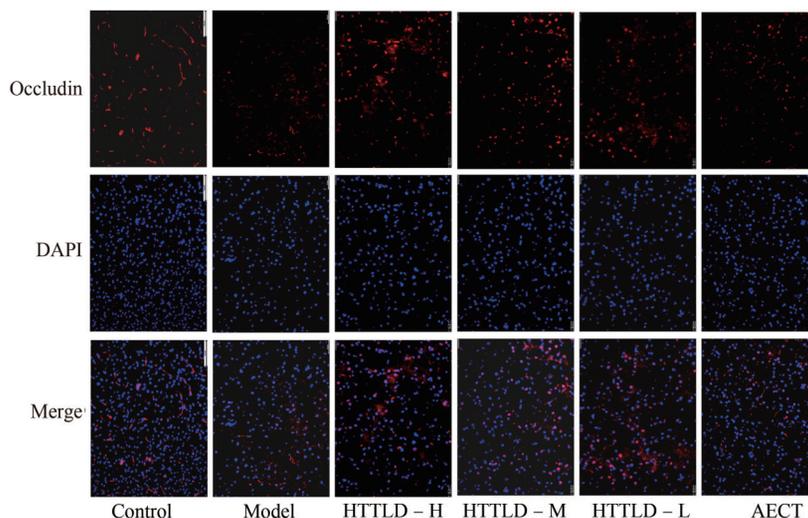
注:Control 为假手术组;Model 为模型组;HTTLD-H 为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M 为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L 为化痰通络汤低剂量组;AECT 为阿司匹林肠溶片组。

图 7 Fibrinogen 免疫荧光结果(×200)



注:Control 为假手术组;Model 为模型组;HTTLD-H 为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M 为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L 为化痰通络汤低剂量组;AECT 为阿司匹林肠溶片组。

图 8 Claudin-5 免疫荧光结果(×200)



注:Control为假手术组;Model为模型组;HTTLD-H为化痰通络汤高剂量组;HTTLD-M为化痰通络汤中剂量组;HTTLD-L为化痰通络汤低剂量组;AECT为阿司匹林肠溶片组。

图9 Occludin免疫荧光结果($\times 200$)

表3 各组小鼠脑组织荧光表达量比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	vWF	GP9	Fibrinogen	Claudin-5	Occludin
Control	4	0.27 ± 0.02	1.33 ± 0.10	0.34 ± 0.03	3.25 ± 0.49	2.60 ± 0.17
Model	4	5.56 ± 0.36**	2.79 ± 0.22**	5.54 ± 0.61**	0.21 ± 0.05**	0.63 ± 0.07**
HTTLD-H	4	0.43 ± 0.05##▲▲	0.29 ± 0.04##▲▲	0.42 ± 0.04##	1.08 ± 0.07#	2.51 ± 0.13##▲▲
HTTLD-M	4	0.82 ± 0.22##▲▲	0.29 ± 0.03##▲▲	0.62 ± 0.12##	1.44 ± 0.13##	2.24 ± 0.13##▲▲
HTTLD-L	4	3.21 ± 0.16##	1.25 ± 0.06##	1.76 ± 0.23##	1.37 ± 0.15##	2.05 ± 0.12##▲▲
AECT	4	2.77 ± 0.25##	1.28 ± 0.27##	1.09 ± 0.09##	1.68 ± 0.10##	0.97 ± 0.09

注:与Control比较,** $P < 0.01$;与Model比较,## $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与AECT比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

4 讨论

研究发现,vWF和GP I b-IX-V复合物介导的血小板早期黏附在缺血性脑卒中血栓炎症反应和再灌注无复流现象中发挥关键性作用^[7]。vWF是一种大的多聚体糖蛋白,主要在内皮细胞和巨核细胞内合成,然后被分泌到血液或存储到内皮细胞Weibel-Palade小体和血小板 α 颗粒。血小板膜糖蛋白GP I b-IX-V复合物是血小板表面黏附受体,在缺血性脑卒中的病理过程中,vWF通过与血小板膜糖蛋白GP I b-IX-V复合物结合,刺激血小板黏附和下游活化信号激活血小板,并结合激活整合素GP II b/III a,刺激血小板聚集^[13-16];vWF与结合活化的血小板在缺血性脑卒中病理过程中通过各种黏附分子的相互作用,募集白细胞、单核细胞、T淋巴细胞等并进一步刺激微血栓形成阻塞微血管^[7, 17]。研究指出,抑制vWF聚集^[17-18],或抑制血小板膜糖蛋白I b(glycoprotein I b, GP I b)^[19],或阻断vWF与GP I b-IX-V复合物相互作用^[20],减少血小板早期黏附可明显减少中性粒细胞、T细胞等免疫细胞募集,维护血脑屏障^[21-24],减少微血栓的形成和纤维蛋白原沉积,改善微循环阻塞,发挥抗血栓形成、减轻炎症反应,进而减轻脑缺血再

灌注损伤。

血脑屏障是介于血液与脑组织之间的重要屏障,能够限制有潜在毒性的血浆成分、血细胞和病原体等进入脑组织,发挥维护神经系统稳态的作用。血脑屏障主要由两部分组成,一是由脑毛细血管壁与神经胶质细胞形成的血浆与脑细胞之间的屏障;二是由脉络丛形成的血浆与脑脊液之间的屏障。脑毛细血管内皮细胞之间通过紧密连接、黏附连接和间隙连接蛋白连接,在紧密连接中Occludin、Claudins和黏附分子形成对液体不可渗透的屏障^[25]。Occludin和Claudin-5是最具代表性的紧密连接蛋白,在脑毛细血管高表达,通过调节内皮通透性发挥维持血管稳态的作用^[26]。脑缺血诱导Occludin降解和Claudin-5表达减少,促使内皮细胞凋亡从而增加再灌注后出血的可能^[27-28]。因此,维持Occludin和Claudin-5表达,维护血脑屏障完整性对减少再灌注后脑出血至关重要。因本研究所用化痰通络汤活血化瘀之力较强,恐有损伤血脉之弊,故而同时研究其对血脑屏障紧密连接蛋白Claudin-5和Occludin的调节作用。

化痰通络汤适用于缺血性中风中经络之风痰阻络证,主方由半夏、生白术、天麻、茯苓、胆南星、天竺黄、

紫丹参、香附、酒大黄、三七组成,本实验所用化痰通络汤参照临床应用原方基础上加用桃仁、红花、赤芍以增强活血化瘀之力^[29]。方中半夏燥湿化痰,天麻平肝潜阳、祛风通络为君药;丹参、桃仁、红花、赤芍凉血化瘀,活血而不致血热妄行为臣药;白术、茯苓健脾利湿,胆南星、天竺黄有清热化痰之效,共奏理气健脾、燥湿化痰、熄风止痉之功,香附理气和中,兼三七止血活血共为佐药;酒大黄通腑泄浊,荡涤肠胃,使腑气通而痰浊得化。综观全方,温凉并用,活血与化痰兼顾,共奏活血祛瘀、化痰通络之功。

降低病死率和致残率是中风病治疗的首要目标,本研究结果显示,小鼠MCAO/R后,脑组织梗死灶明显,神经功能出现明显缺损。化痰通络汤高、中剂量能够减少MCAO/R小鼠病死率,高、中、低剂量均可减少脑组织梗死体积,改善神经功能,以中剂量组效果最佳。HE染色结果显示,化痰通络汤中剂量组较好地维持了血管壁的完整性,血管中细胞沉积较少。Western blot和免疫荧光检测结果表明,化痰通络汤可减少MCAO/R小鼠脑组织中vWF、GP IX和Fibrinogen蛋白表达,同时升高Claudin-5和Occludin蛋白表达,在抗血小板、降聚、降纤的同时,在一定程度上维护血脑屏障。

综上所述,化痰通络汤可减少脑缺血再灌注小鼠脑组织梗死体积,改善神经功能,其作用可能与化痰通络汤能降低缺血再灌注后脑组织中vWF表达,减少血小板黏附和聚集,减少纤维蛋白原沉积,同时升高Claudin-5和Occludin蛋白表达,维护血脑屏障有关。

【参考文献】

[1] CAMPBELL B, KHATRI P. Stroke[J]. Lancet, 2020, 396(10244): 129-142.

[2] FEIGIN V L, BRAININ M, NORRVING B, et al. World Stroke Organization (WSO): global stroke fact sheet 2022[J]. Int J Stroke, 2022, 17(1): 18-29.

[3] 刘林娜, 田寿春. 急性及进展性脑梗死急诊治疗现状与趋势[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(13): 2096-2097.

[4] 王族, 宋海庆. 急性缺血性卒中血管内治疗研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2021, 18(1): 65-67.

[5] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion: from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.

[6] DE MEYER S F, DENORME F, LANGHAUSER F, et al. Thromboinflammation in stroke brain damage[J]. Stroke, 2016, 47(4): 1165-1172.

[7] DE MEYER S F, LANGHAUSER F, HAUPELTSHOFER S, et al. Thromboinflammation in brain ischemia: recent updates and future perspectives[J]. Stroke, 2022, 53(5): 1487-1499.

[8] 陈康宁, 缪中荣. 急性缺血性卒中血运重建后无复流: 神经介入医师的阿喀琉斯之踵[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(1): 50-59.

[9] 傅梦薇, 李洪峥, 王阶. 痰瘀互结证之理论与研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 2977-2980.

[10] 李雨, 罗小英, 闫咏梅. 闫咏梅教授从痰瘀论治中风经验[J/OL]. 辽宁中医杂志: 1-7(2022-06-15)[2023-02-08]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20220614.1426.102.html.

[11] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[12] ULUC K, MIRANPURI A, KUJOTH G C, et al. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. J Vis Exp, 2011, 48: 1-4.

[13] 刘旭, 吴宿慧, 陈小菲, 等. 基于vWF/GPIb-IX-V信号通路的丹红注射液对急性血瘀大鼠模型活血化瘀作用及机制研究[J]. 中草药, 2023, 54(4): 1173-1183.

[14] ESTEVEZ B, DU X. New Concepts and mechanisms of platelet activation signaling [J]. Physiology (Bethesda), 2017, 32(2): 162-177.

[15] 胡萍, 谢如锋, 王志成. 血小板黏附受体 GPIb-IX-V介导的信号通路研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(3): 419-423.

[16] 章凡, 王哲, 胡琨, 等. 血小板在炎症中的作用: 促血栓形成与免疫功能[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2089-2093.

[17] DENORME F, MARTINOD K, VANDENBULCKE A, et al. The von willebrand factor A1 domain mediates thromboinflammation, aggravating ischemic stroke outcome in mice [J]. Haematologica, 2021, 106(3): 819-828.

[18] SOUTH K, SALEH O, LEMARCHAND E, et al. Robust thrombolytic and anti-inflammatory action of a constitutively active ADAMTS13 variant in murine stroke models [J]. Blood, 2022, 139(10): 1575-1587.

[19] CHEN C, LI T, ZHAO Y, et al. Platelet glycoprotein receptor Ib blockade ameliorates experimental cerebral ischemia-reperfusion injury by strengthening the blood-brain barrier function and anti-thrombo-inflammatory property [J]. Brain Behav Immun, 2018, 69: 255-263.

[20] DENORME F, VANHOORELBEKE K, DE MEYER S F. Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib: a thromboinflammatory axis in stroke [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2884.

[21] ANSARI J, GAVINS F. Neutrophils and platelets: immune soldiers fighting together in stroke pathophysiology [J]. Biomedicines, 2021, 9(12): 1-13.

[22] SCHUHMAN M K, BIEBER M, FRANKE M, et al. Platelets and lymphocytes drive progressive penumbral tissue loss during middle cerebral artery occlusion in mice [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 46.

[23] SCHUHMAN M K, STOLL G, BIEBER M, et al. CD84 links t cell and platelet activity in cerebral thrombo-inflammation in acute stroke [J]. Circ Res, 2020, 127(8): 1023-1035.

[24] CHU W, SUN X, ZHU X, et al. Blockade of platelet glycoprotein receptor Ib ameliorates blood-brain barrier disruption following ischemic stroke via EPAC pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111698.

[25] ZHAO Z, NELSON A R, BETSHOLTZ C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. Cell, 2015, 163(5):

- 1064–1078.
- [26] 段艳茹, 杜芸辉, 刘慧荣. 闭合蛋白(occludin)在血管内皮损伤中的研究进展[J]. 生理学报, 2021, 73(6): 931–939.
- [27] ZHANG Y, LI X, QIAO S, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury in vitro[J]. J Neurochem, 2021, 156(3): 352–366.
- [28] SUGIYAMA S, SASAKI T, TANAKA H, et al. The tight junction protein occludin modulates blood–brain barrier integrity and neurological function after ischemic stroke in mice [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 2892.
- [29] 于海峰, 胡金莲. 加味化痰通络汤治疗风痰瘀阻型中风的临床效果及对患者神经功能的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(8): 137–140.
- (收稿日期: 2023–03–15)

Research on the Effect of Huatan Tongluo Decoction on Improving Neural Function of Cerebral Ischemia – Reperfusion Mice

LIU Tiantian¹, MA Chunlei², LIU Fuhong³, GUO Ping^{1✉}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Shandong First Medical University, Jinan 250014, China; 3. Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250014, China)

【Abstract】 Objective: To explore the effects and molecular mechanism of Huatan Tongluo Decoction on the neural function of middle cerebral artery ischemia and reperfusion (MCAI/R) model mice. Method: 85 SPF C57BL/6J male mice were randomly divided into sham operation group (Control), model group (Model), Huatan Tongluo Decoction high-dose group (HTTLD-H), Huatan Tongluo Decoction medium-dose group (HTTLD-M), Huatan Tongluo Decoction low-dose group (HTTLD-L), and aspirin enteric-coated tablet group (AECT). 30 min after successful replication of MCAI/R model mice, corresponding drugs were administered to the mice by gavage for 7 consecutive days. Neurological impairment scores were used to evaluate the degree of neurological impairment of the mice. The infarct volume of brain tissue was detected by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect morphological changes in the brain tissue. Western blot was used to detect the expression levels of Von Willebrand factor (vWF), fibrinogen, claudin-5 and occludin of the brain tissue; the expression of vWF, platelet membrane glycoprotein IX (GP IX, labeled platelets), fibrinogen, claudin-5 and occludin in the brain tissue were detected by immunofluorescence. Results: Compared with the treatment of model group, Huatan Tongluo Decoction can reduce the infarct volume of brain tissue in MCAI/R mice ($P < 0.01$) and improve the neurological function ($P < 0.01$), and the medium dose group had the best effect. The decoction can maintain the integrity of blood vessel wall and improve blood circulation in brain tissue of MCAI/R mice to a certain extent. It can decrease the expression of vWF in brain tissue ($P < 0.01$) and reduce platelet adhesion and aggregation ($P < 0.01$), and the decrease of fibrinogen deposition has the most significant difference between the high dose and medium dose ($P < 0.01$). The decoction can increase the expression of claudin-5 ($P < 0.05$) and occludin ($P < 0.05$) in brain tissue to maintain the blood-brain barrier. Conclusion: Huatan Tongluo Decoction can reduce cerebral infarction volume and improve nerve function in MCAI/R model mice, which may be related to the fact that Huatan Tongluo Decoction reduces vWF expression in brain tissue of MCAI/R model mice, reduces platelet adhesion and aggregation, and reduces fibrinogen deposition. To a certain extent, the decoction can maintain claudin-5 and occludin expressions, and maintain blood-brain barrier.

【Key words】 Cerebral ischemia reperfusion; Huatan Tongluo Decoction; Von Willebrand factor; Platelets; Blood-brain barrier