

## 黄芪赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织 ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1蛋白表达的影响

刘舒毓, 王秋月, 刘树民\*

(黑龙江中医药大学中药研究院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:探究黄芪赤风汤对大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠模型的治疗作用及机制。方法:将90只SPF级雄性大鼠随机分为假手术组,模型组,黄芪赤风汤高、中、低剂量组(中药低、中、高剂量组)(8.10、4.05、2.025 g·kg<sup>-1</sup>),脑心通组(脑心通, 0.32 g·kg<sup>-1</sup>),建立MCAO大鼠模型,给予黄芪赤风汤药液进行干预,对各组大鼠进行神经功能学评分;大鼠脑组织采用2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色,计算脑梗死面积;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)含量;采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠脑组织病理变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑组织闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、紧密连接蛋白-5(Claudin-5)、P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药蛋白1(MRP1)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分、脑梗死率显著增加( $P<0.01$ ),血清IL-6、IL-1 $\beta$ 和MMP-9含量显著升高( $P<0.01$ ),脑组织ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),P-gp、MRP1蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠14 d神经功能评分明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),且有效改善脑组织病理变化,显著降低脑梗死率( $P<0.01$ ),血清IL-6、IL-1 $\beta$ 、MMP-9表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),VEGFR2含量显著增加( $P<0.01$ ),中药高、中剂量组及脑心通组VEGF含量明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),中药低剂量组虽有下降趋势,但差异无统计学意义,中药高剂量组和脑心通组脑组织ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),P-gp、MRP1蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。结论:黄芪赤风汤可以通过改善脑组织病理变化,减少炎症反应、促进血管生成、调节血脑屏障(BBB)功能,从而发挥治疗脑梗死作用。

**[关键词]** 黄芪赤风汤; 脑梗死; 炎症; 血管生成; 血脑屏障; 紧密连接蛋白

**[中图分类号]** R2-0;R285;R33;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0026-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220643

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220125.1748.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-27 8:18

### Therapeutic Effect of Huangqi Chifengtang on Cerebral Infarction Rat Model and Its Effect on Expression of ZO-1, Claudin-5, P-gp and MRP1 Protein in Brain Tissue

LIU Shu-yu, WANG Qiu-yue, LIU Shu-min\*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Institute of Traditional Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the therapeutic effect and mechanism of Huangqi Chifengtang on middle cerebral artery embolism(MCAO) rat model. **Method:** The 90 SPF male rats were randomly divided into sham operation group, model group, high, medium and low dose groups of Huangqi Chifengtang (8.10, 4.05, 2.025 g·kg<sup>-1</sup>) and positive drug group (Naoxintong 0.32 g·kg<sup>-1</sup>). MCAO rat model was established and intervened with Huangqi Chifengtang, and the neurological scores of each group were scored. The area of cerebral infarction was calculated by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), The contents

**[收稿日期]** 2021-08-22

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金项目(ZD2020H006);黑龙江中医药大学优秀创新人才(领军人才)项目(2018RCL13)

**[第一作者]** 刘舒毓,在读硕士,从事中药药性理论及药效物质基础研究,E-mail:1366076152@qq.com

**[通信作者]** \*刘树民,博士,教授,博士生导师,从事中药药性理论及药效物质基础研究,E-mail:keji-liu@163.com

of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), the pathological changes of brain tissue in each group were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. Western blot was used to detect zonule atresia protein-1 (ZO-1), tight junction protein-5 (Claudin-5) and P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance protein 1 (MRP1). **Result:** Compared with the sham operation group, the neurological function score and cerebral infarction rate of the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the levels of IL-6, IL-1 $\beta$  and MMP-9 in serum were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the levels of ZO-1 and Claudin-5 protein expression decreased significantly ( $P < 0.01$ ), and the levels of P-gp and MRP1 protein expression increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the neurological function score of rats in each administration group decreased significantly at 14 days ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the pathological changes of brain tissue effectively improved, the rate of cerebral infarction significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the expression level of IL-6, IL-1 $\beta$  and MMP-9 in serum decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the content of VEGFR2 increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the content of VEGF increased significantly in high, medium dose and positive drug groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Although it decreased in low dose group, there was no significant difference. The levels of ZO-1 and Claudin-5 protein expression in brain tissue of high dose group and positive drug group increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the level of MRP1 and P-gp protein expression decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Huangqi Chifengtang can play a therapeutic role in rats with cerebral infarction by improving the pathological changes of brain tissue, reducing inflammatory reaction, promote angiogenesis and regulating the function of blood-brain barrier (BBB).

**[Keywords]** Huangqi Chifengtang; cerebral infarction; inflammation; angiogenesis; blood brain barrier; tight junctional protein

脑梗死又称缺血性中风或缺血性卒中,是由动脉闭塞狭窄致使脑供血不足而引发的脑血管疾病<sup>[1]</sup>。2013年一项调查结果指出,中国缺血性中风的发病率约占中风总数的70%以上<sup>[2]</sup>。脑梗死主要发病人群为50~75岁的中老年人,但由于等肥胖、高血压、吸烟、酗酒等多种原因导致其发病率呈现年轻化趋势<sup>[3]</sup>。《中国卫生健康统计年鉴》(2019版)显示,2018年我国城市和农村缺血性中风的死亡率分别约为0.04%和0.05%<sup>[4]</sup>。同时,脑梗死发病后还常伴有偏瘫、失语等症,严重影响患者正常生活,给家庭造成沉重负担。

近年来,大量实验研究及临床观察显示中医药在治疗脑梗死及相关疾病过程中起到了较好作用<sup>[5]</sup>,如朱慧渊等<sup>[6]</sup>对丹参红花药对进行研究发现其有效成分配伍能通过调控白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)蛋白及mRNA表达,进而减少神经细胞凋亡,起到保护脑缺血损伤的作用;孙晓丽等<sup>[7]</sup>研究发现龙生蛭胶囊通过抗氧化、抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达发挥其对脑组织保护作用;唐冰榕等<sup>[8]</sup>研究加味四君子汤通过增加紧密连接蛋白(Occludin),闭锁小带蛋白-1(ZO-1),紧密连接蛋

白-1(Claudin-1)的表达保护血脑屏障、减轻脑水肿;薛冰洁等<sup>[9]</sup>研究发现益气通络颗粒促进脑血管新生对气虚血瘀脑梗大鼠起到缓解作用。

黄芪赤风汤出自《医林改错》,由黄芪、赤芍、防风组成,具有行气活血、祛风通络等功效。课题组前期研究发现,黄芪赤风汤能够显著改善大鼠脑水肿状况,缩小脑梗死面积,降低脑组织及血清低氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )、NLRP3炎症小体(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)表达水平<sup>[10]</sup>。基于以上理论,且黄芪赤风汤对脑梗死作用机制尚未完善,本研究以大脑中动脉梗阻(MCAO)大鼠模型为研究对象,以MCAO模型大鼠脑组织病理状况,IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-6(IL-6)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)含量,以及ZO-1、紧密连接蛋白-5(Claudin-5)、P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药蛋白1(MRP1)蛋白表达水平为检测指标,通过苏木素-伊红(HE)染色、蛋白免疫印迹法(Western blot)及酶联免疫吸附测定法(ELISA)等方法,继续探究该方改善脑缺血症状的潜在作用机制,为黄芪赤风汤治疗脑梗死的进一步深入研究奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性SD大鼠90只,SPF级,体质量(240±20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2019-0001。实验动物饲养于黑龙江中医药大学中药研究院动物室,自由进食饮水,饲养环境为恒温(23±2)℃,相对湿度58%。本实验经过黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号20190921。

**1.2 药材及制备方法** 黄芪赤风汤由黄芪(内蒙古)、赤芍(辽宁)、防风(内蒙古)组成,饮片均购自黑龙江修生堂药业有限公司,批号分别为20190501,20190301,20190402,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为合格品。黄芪赤风汤高、中、低剂量组(中药高、中、低剂量组)按4:2:1倍数称取,根据前期研究<sup>[11]</sup>黄芪、赤芍、防风按10:3:2比例,中剂量相当于临床等效剂量,黄芪、赤芍、防风分别为30、9、6g,加8倍量水浸泡30min,煎煮3次,每次1h,4层纱布充分过滤,合并3次滤液后转移至旋转蒸发器中浓缩,得到浓缩液放入冻干机中冻干,得到出膏率分别为39.38%、39.49%、39.52%的冻干粉,于干燥皿中存储备用。

**1.3 药品与试剂** 脑心通胶囊(陕西步长制药有限公司,批号200486);3%戊巴比妥钠(德国默克公司,批号P11011);IL-6、IL-1 $\beta$ 、MMP-9、VEGF、VEGFR2 ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20201201、20201203、20201128、20201203、20201203);MRP1抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号bs-8157R);P-gp、ZO-1抗体(美国Gene Tex公司,货号分别为GTX109673、GTX108627);Claudin-5抗体(美国Abbkine公司,货号ABP50990);BCA蛋白定量试剂盒(赛默飞世尔科技中国有限公司,货号PICPI23223);10%十二烷基硫酸钠(SDS)、10%过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、磷酸盐缓冲液(PBS)、聚山梨酯-20、RIPA组织细胞快速裂解液、2,3,5氯化三苯基四氮唑(TTC)染液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为S1010、A1030、T8090、P1010、T8220、R0020、G3005);蛋白预染Marker(加拿大Fermentas公司,货号SM1811);ECL发光液(美国Millipore公司,货号WBKLS0100);HE染色液(鸿泉生物科技有限公司,货号HQ60001)。

**1.4 仪器** SY-5000型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Alpha 1-4 LDplus型冻干机(德国Christ公司);M200pro型酶标仪(瑞士Tecan公司);KDC-

160HR型高速冷冻离心机(安徽科大创新股份有限公司中佳分公司);mini protean 3cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司);TE77XP型半干转印电泳仪(美国Hofer公司);Tanon-5200型化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司);CX41型正置显微镜(日本Olympus公司);SQ 2125型石蜡切片机(德国Leica公司);D5100型数码相机(日本Nikon公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、造模及给药** 大鼠适应性饲养1周后,随机分为假手术组、模型组、中药高、中、低剂量组及脑心通组,每组15只。采用改良大鼠中脑动脉栓塞法<sup>[8]</sup>制备大鼠脑梗死模型,大鼠麻醉后,仰卧位固定在木板上,颈部脱毛,分离肌肉组织,游离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA);手术线结扎ECA和CCA近心端,同时动脉夹夹闭ICA,形成一个Y形封闭血管环境;使用眼科剪在CCA远心端剪一小口,将栓线沿切口插入CCA,顺着血管方向进入ICA至动脉夹处,在开口上方系活结,固定栓线,防止松开动脉夹后出血,松开ICA动脉夹,缓慢沿着血管插入栓线至稍感阻力即停止插入(动脉分叉处19~20mm),扎紧活结,缝合皮肤。假手术组处理方法同上,但不插线栓。根据人与大鼠体表面积换算系数,将中药高、中、低剂量组药物冻干粉用蒸馏水配制成质量浓度为0.33、0.16、0.08 g·mL<sup>-1</sup>的药液,相当于含生药量8.10、4.05、2.025 g·kg<sup>-1</sup>,脑心通胶囊内容物溶于蒸馏水中配制成0.032 g·mL<sup>-1</sup>的溶液,相当于原药物0.32 g·kg<sup>-1</sup>。手术24h后,按10 mL·kg<sup>-1</sup>体质量灌胃给药14d,每天1次,模型组和假手术组灌以等体积生理盐水。

**2.2 各组大鼠神经行为学评价** 观察各组大鼠精神状态,在造模后1,7,14d进行神经行为学(Longa)评分<sup>[9]</sup>。评分标准:0分,四肢活动正常,无神经功能缺损;1分,尾部垂直提起大鼠时可见左前爪呈屈曲状态,不能伸直;2分,平地行走时大鼠向左侧倾斜,身体可向左侧转圈;3分,行走不稳,整个身体向左侧倾倒;4分,有意识障碍或不能自主行走。除假手术组外,造模组大鼠评分1~3分视为模型制备成功纳入实验研究。最终每组选取15只大鼠进行后续实验。此外,评分为4分的模型大鼠易造成死亡,故不纳入实验范围。

**2.3 TTC染色测定脑梗死率** 手术后14d进行神经功能评分后,腹主动脉取血,处死大鼠,断头取脑,脑组织用生理盐水冲洗干净,于-20℃冰箱速冻20min,将大脑自前向后切成5个约2mm厚度的冠

状切片,将脑片置于2% TTC染液中,37℃避光染色30 min,其间用镊子翻动脑组织,使染色均匀。倒掉TTC染液,加入4%多聚甲醛溶液固定,按顺序排好,拍照保存。应用Image-Pro Plus 6.0软件计算梗死面积,脑梗死率=梗死面积/总面积×100%。

**2.4 HE染色观察各组大鼠脑组织病理学变化** 末次给药后,取脑组织,生理盐水冲洗后放入4%多聚甲醛中固定48 h后,脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、HE染色,显微镜进行图像采集。

**2.5 ELISA检测血清中IL-6、IL-1β、MMP-9、VEGF和VEGFR2含量** 大鼠末次给药后,腹主动脉取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径8.58 cm),取血清,置于-80℃冰箱保存,按照试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血清IL-6、IL-1β、MMP-9、VEGF和VEGFR2含量。

**2.6 Western blot检测各组大鼠脑组织紧密连接蛋白及外排蛋白的表达** 由于TTC、HE、ELISA各项指标与剂量呈相关性,故而本部分中药组只选用效果最佳的高剂量进行检测。取大鼠脑组织剪切成细小碎片,裂解后4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径5 cm),取上清,BCA试剂盒进行蛋白质

定量后贮存于-80℃冰箱。每个样本取蛋白15 μg,加上样缓冲液,沸水浴10 min,电泳。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入一抗ZO-1(1:1 000)、Claudin-5(1:500)、MRP1(1:500)、P-gp(1:500)和GAPDH(1:5 000)抗体,4℃孵育过夜,TBST洗涤,按照1:1 000稀释HRP标记的二抗,37℃孵育1 h,TBST洗涤,加ECL发光液暗室避光5 min,压胶,化学发光成像分析系统进行分析,Image J软件计算灰度值。

**2.7 统计学分析** 通过SPSS 26.0进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间比较符合正态分布采用最小显著性差异法(LSD)检验,不符合正态分布则采用Dunnett's T3检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对神经功能行为学评分结果影响** 与假手术组比较,模型组神经功能评分显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,中药高、中、低剂量组和脑心通组神经功能评分均有所下降,且14 d时各给药组评分下降明显( $P<0.05, P<0.01$ )。见表1。

表1 黄芪赤风汤(HQCFD)对脑梗死大鼠神经功能行为学评分的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 1 Effect of HQCFD on neurobehavioral score of rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

分

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	1 d	7 d	14 d
模型组		2.73±0.46 <sup>2)</sup>	2.67±0.49 <sup>2)</sup>	2.53±0.52 <sup>2)</sup>
假手术组		0.27±0.46	0.00±0.00	0.00±0.00
中药高剂量组	8.10	2.80±0.41 <sup>2)</sup>	2.07±0.46 <sup>2)</sup>	1.13±0.35 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	4.05	2.67±0.49 <sup>2)</sup>	2.27±0.46	1.60±0.51 <sup>4)</sup>
中药低剂量组	2.025	2.73±0.46 <sup>2)</sup>	2.53±0.52	2.00±0.53 <sup>3)</sup>
脑心通组	0.32	2.67±0.49 <sup>2)</sup>	2.06±0.46 <sup>3)</sup>	1.27±0.46 <sup>4)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表6同)

**3.2 对脑梗死大鼠脑梗死率的影响** TTC染色结果表明,假手术组全脑均匀染色,未见白色梗死部分,说明假手术对其脑组织无影响;与假手术组比较,模型组脑组织有明显的梗死区,脑梗死率显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组梗死率显著降低( $P<0.01$ ),见图1和表2。

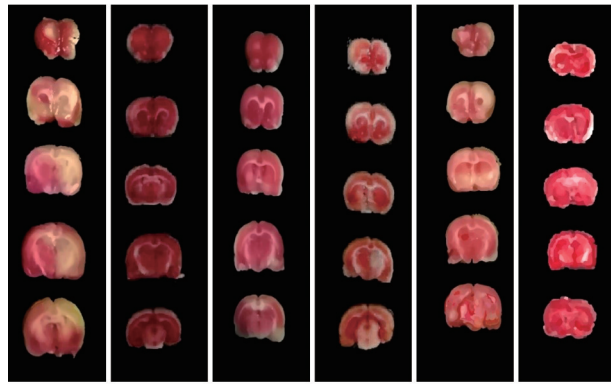
**3.3 对脑梗死大鼠脑组织病理形态学的影响** 假手术组大鼠脑组织结构清晰完整,神经细胞排列整齐,无炎性细胞浸润,细胞周围间隙致密无水肿,无明显异常;模型组大鼠脑组织梗死灶部分可看到大片神经细胞消失、稀疏,间质水肿疏松,排列紊乱;与模型组比较,中药高、中剂量组和脑心通组神经

细胞排列相对整齐。见图2。

**3.4 对脑梗死大鼠血清IL-6和IL-1β含量的影响**

与假手术组比较,模型组IL-6和IL-1β表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中IL-6、IL-1β表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见表3。

**3.5 对脑梗死大鼠血清MMP-9、VEGF和VEGFR2含量的影响** 与假手术组比较,模型组MMP-9表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中MMP-9表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),VEGF、VEGFR2表达水平显著升高( $P<0.01$ )。见表4。



注:A. 模型组;B. 假手术组;C. 中药高剂量组;D. 中药中剂量组;E. 中药低剂量组;F. 脑心通组(图2-图4同)

图1 HQCFD对脑梗死大鼠模型的脑组织TTC染色的影响

Fig. 1 Effect of HQCFD on TTC staining in brain tissue of cerebral infarction rat model

表2 HQCFD对脑梗死大鼠脑梗死率的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of HQCFD on cerebral infarction rate in rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	脑梗死率/%
模型组		52.75±1.45 <sup>2)</sup>
假手术组		0.00±0.00
中药高剂量组	8.10	11.08±1.19 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	4.05	19.92±0.91 <sup>4)</sup>
中药低剂量组	2.025	46.90±1.42 <sup>4)</sup>
脑心通组	0.32	13.23±0.62 <sup>4)</sup>

3.6 对脑梗死大鼠脑组织ZO-1、Claudin-5蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,高剂量组和脑心通组ZO-1、Claudin-5蛋白表达水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见图3和表5。

3.7 对脑梗死大鼠脑组织P-gp、MRP1蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组P-gp、MRP1蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,中药高剂量组和脑心通组P-gp、MRP1蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。见图4和表6。

#### 4 讨论

中医将脑梗死归为“中风”“卒中”“偏枯”范畴,认为脉络虚空,风邪入中;气血逆乱,瘀血阻闭脑窍,局部气机失调,脑失濡养;阴阳失衡而上犯于脑者均可发为卒中,其病机关键与“风”“痰”“虚”“瘀”有关,其中“气虚血瘀”型最为常见<sup>[12-13]</sup>。目前临床治疗脑梗死的常用中药多为益气药,活血化瘀药和祛风药。

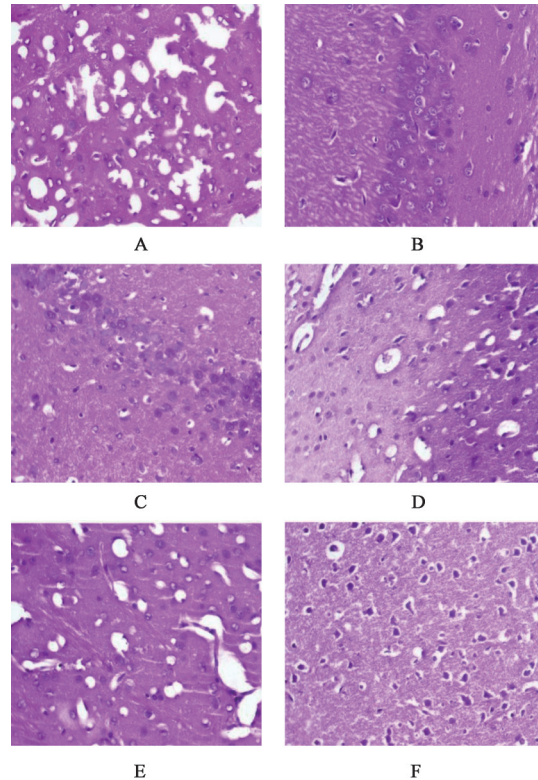


图2 HQCFD对脑梗死大鼠脑组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of HQCFD on morphological changes of brain tissue in rats with cerebral infarction (HE, ×200)

表3 HQCFD对脑梗死大鼠血清IL-6、IL-1β含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of HQCFD on content of IL-6 and IL-1β in serum of rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6	IL-1β
模型组		32.32±3.97 <sup>2)</sup>	113.31±6.47 <sup>2)</sup>
假手术组		9.45±3.52	65.24±8.02
中药高剂量组	8.10	18.04±3.43 <sup>4)</sup>	67.97±6.09 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	4.05	21.91±2.99 <sup>4)</sup>	83.76±6.38 <sup>4)</sup>
中药低剂量组	2.025	26.87±3.59 <sup>3)</sup>	96.77±5.16 <sup>4)</sup>
脑心通组	0.32	18.17±4.21 <sup>4)</sup>	66.75±5.36 <sup>4)</sup>

黄芪赤风汤由黄芪、赤芍、防风3味药组成,其中黄芪补气升阳,充养脑络,为君药;赤芍凉血散瘀,通经活络,为臣药;防风轻扬升散,辅助君、臣药以上达脑窍,为佐使药,诸药合用具有益气活血祛风之效。王清任云:“此方治诸病皆效者,能使周身之气通而不滞,血活而不瘀,气通血活。”由此可见,黄芪赤风汤治疗脑梗死与中医“益气活血”的治疗理念相符。现代药理研究表明,黄芪及其主要活性成分黄芪甲苷具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡、神经保护等作用,能够阻止神经细胞凋亡,改善神经功

表4 HQCFD对脑梗死大鼠血清MMP-9、VEGF、VEGFR2含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of HQCFD on content of MMP9, VEGF and VEGFR2 in serum of rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MMP-9/ng·L <sup>-1</sup>	VEGF/ng·L <sup>-1</sup>	VEGFR2/μg·L <sup>-1</sup>
模型组		255.64±25.40 <sup>2)</sup>	75.88±14.28	0.28±0.12
假手术组		92.13±18.26	70.54±6.18	0.33±0.29
中药高剂量组	8.10	112.43±21.87 <sup>4)</sup>	101.17±6.21 <sup>4)</sup>	3.19±0.59 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	4.05	168.19±59.14 <sup>4)</sup>	95.33±11.32 <sup>3)</sup>	1.37±0.51 <sup>4)</sup>
中药低剂量组	2.025	207.37±36.83 <sup>3)</sup>	71.57±21.83	0.85±0.28 <sup>4)</sup>
脑心通组	0.32	103.23±13.84 <sup>4)</sup>	102.32±14.82 <sup>4)</sup>	2.18±0.99 <sup>4)</sup>

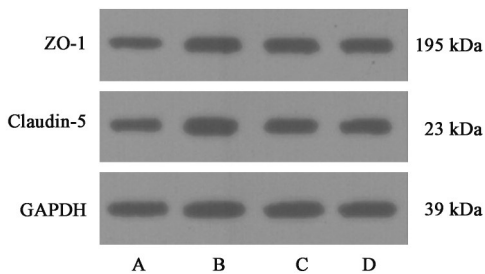


图3 脑梗死大鼠脑组织ZO-1、Claudin-5蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of ZO-1 and Claudin-5 proteins in brain tissue of rats with cerebral infarction

表5 HQCFD对脑梗死大鼠脑组织ZO-1、Claudin-5蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of HQCFD on expression of ZO-1 and Claudin-5 proteins in brain tissue of rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ZO-1 /GAPDH	Claudin-5 /GAPDH
模型组		0.65±0.05 <sup>2)</sup>	0.67±0.05 <sup>2)</sup>
假手术组		1.02±0.05	1.04±0.03
中药高剂量组	8.10	0.86±0.06 <sup>4)</sup>	0.86±0.02 <sup>4)</sup>
脑心通组	0.32	0.95±0.12 <sup>3)</sup>	0.95±0.03 <sup>4)</sup>

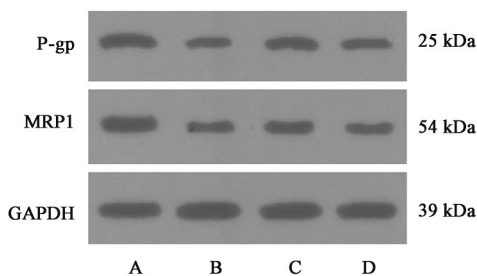


图4 对脑梗死大鼠脑组织P-gp、MRP1蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of P-gp and MRP1 proteins in brain tissue of rats with cerebral infarction

能,降低血脑屏障(BBB)通透性,增强神经新生和血管再生,治疗脑缺血性疾病<sup>[14-16]</sup>。赤芍可以缩小缺血性脑卒中大鼠脑梗死面积,减少细胞凋亡,增加脑微血管密度,缓解脑组织病理状态。其药效成分芍药苷能够通过上调VEGF/VEGFR2表达水平促

表6 HQCFD对脑梗死大鼠脑组织P-gp、MRP1蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of HQCFD on expression of P-gp and MRP1 proteins in brain tissue of rats with cerebral infarction ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	P-gp /GAPDH	MRP1 /GAPDH
模型组		0.96±0.11 <sup>2)</sup>	1.01±0.06 <sup>2)</sup>
假手术组		0.48±0.02	0.49±0.03
中药高剂量组	8.10	0.76±0.04 <sup>3)</sup>	0.78±0.07 <sup>3)</sup>
脑心通组	0.32	0.70±0.10 <sup>3)</sup>	0.75±0.11 <sup>3)</sup>

进血管生成<sup>[17-18]</sup>。防风具有抗凝血作用。

MCAO模型为模拟人局部脑缺血的经典模型,该方法无需进行开颅手术,操作简单,成模率较高,且梗死区域可控,模型动物的梗死范围差异较小<sup>[19]</sup>。本研究通过右侧颈内动脉线栓法制备MCAO大鼠模型,并以造模24h后神经功能评分为模型成功与否的终末指标。结果显示,模型组与黄芪赤风汤低剂量组大鼠死亡率均为20%,而中药高、中剂量组及脑心通组死亡率为13.33%,假手术组无死亡。同时,黄芪赤风汤各组大鼠的神经功能评分也明显低于模型组,提示黄芪赤风汤可以降低模型大鼠死亡率,并在一定程度上改善模型大鼠的神经功能。

正常情况下,机体处于抑炎和促炎的动态平衡状态。脑缺血发生时,病变组织会产生大量炎症细胞和炎性介质,从而激活免疫应答反应,而活化的小胶质细胞又可转变为吞噬细胞分泌IL-6、IL-1β、TNF-α等促炎介质,并引入大量的白细胞进入脑组织,参与炎症反应,进一步导致更严重的脑水肿以及组织坏死,加剧脑缺血造成的损伤<sup>[20]</sup>。本研究结果发现,中药高、中、低剂量组大鼠血清IL-6和IL-1β含量较模型组均显著减少,提示黄芪赤风汤可能是通过降低IL-6和IL-1β含量,抑制炎症反应,改善脑缺血状态,发挥治疗脑梗死作用。

MMP-9是基质金属蛋白酶家族成员,具有一定的底物特异性。脑梗死形成后,MMP-9可以通过降解细胞外基质提高BBB通透性,增加炎性细胞浸润,促进炎症反应和神经细胞凋亡,从而加剧脑缺血/再灌注损伤<sup>[21]</sup>。此外,MMP-9的过度表达可抑制VEGF的产生,进一步阻止神经发生和血管生成<sup>[22]</sup>。VEGF是一种特异性刺激血管内皮细胞增殖的生长因子,在脑缺血恢复期新生血管重塑中具有重要作用<sup>[23]</sup>。CHAN等<sup>[24]</sup>研究表明,VEGF通过激活脑内皮细胞和神经干细胞中的VEGFR2,改善脑缺血对脑实质的影响。本研究结果发现,黄芪赤风汤可以显著降低MCAO模型大鼠血清MMP-9含量,升高VEGF/VEGFR2含量,并且高剂量组优于中、低剂量组,呈现一定的剂量依赖性,提示降低MMP-9含量,上调VEGF/VEGFR2表达水平是黄芪赤风汤促进血管生成的机制之一。

BBB在调节大脑代谢、协调外周器官功能、维持中枢神经系统稳态微环境等方面起着关键作用<sup>[25]</sup>。紧密连接是构成BBB的结构基础,ZO-1和Claudin-5是紧密连接蛋白之一。ZO-1分布于多种上皮细胞和内皮细胞的闭锁小带中,对病理情况下BBB的损伤状态较为敏感,是检测内皮细胞屏障结构和功能的良好指标。Claudin-5是脑内细胞紧密连接的主要细胞粘附分子,对脑毛细血管内皮细胞屏障恢复中起关键作用。大量研究指出,ZO-1和Claudin-5的表达水平降低表明BBB的通透性增加<sup>[26-27]</sup>。本研究提示,黄芪赤风汤可以显著上调ZO-1和Claudin-5的蛋白表达水平,加强MCAO模型大鼠BBB紧密连接,保护并促进BBB功能恢复。

P-gp是一种能量依赖性药物外流泵,可选择性的将底物从间质液转运至血液,阻止外源性毒素进入脑组织<sup>[28]</sup>。然而,缺血、炎症、氧化应激等均会引起P-gp表达增高,从而促进药物外排,降低药物疗效并引起耐药性<sup>[29]</sup>。MRP1与P-gp结构相似,亦是ABC家族转运蛋白之一,具有BBB保护作用,但也可以阻止药物透过BBB<sup>[30]</sup>。本研究表明,脑缺血损伤后P-gp和MRP1表达均显著增加,给予黄芪赤风汤治疗14d后P-gp和MRP1的表达水平明显降低,表明黄芪赤风汤可以抑制外排蛋白表达,减少药物外排。

综上所述,黄芪赤风汤能够有效改善MCAO模型大鼠脑梗死病理状况,降低血清IL-6、IL-1 $\beta$ 、MMP-9含量,升高VEGF和VEGFR2含量,下调外排蛋白表达水平,提高紧密连接蛋白表达水平,促

进BBB修复,提示黄芪赤风汤抗脑梗死作用可能与其降低炎症反应,促进血管生成,以及改善BBB功能密切相关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 张艾嘉,王爽,王萍,等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,26(5):227-240.
- [2] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. Circulation, 2017, 135(8):759-771.
- [3] LEE J H, JEONG S N. A population-based study on the association between periodontal disease and major lifestyle-related comorbidities in South Korea: an elderly cohort study from 2002-2015 [J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(11):575.
- [4] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2019:284-298.
- [5] 杨程,张婕,李花,等. 中医药治疗脑梗死的临床研究进展[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8):1963-1965.
- [6] 朱慧渊,苗琦,王江,等. 丹参、红花有效组分配伍对缺血性脑卒中大鼠脑组织致炎因子的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(21):77-83.
- [7] 孙晓丽,王勇,刘俊杰,等. 龙生蛭胶囊对脑卒中大鼠行为学的影响及脑组织的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24):23-29.
- [8] 唐冰镛,李花,刘旺华,等. 加味四君子汤对脑缺血大鼠脑组织Occludin, ZO-1, Claudin-1蛋白及其mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):57-63.
- [9] 薛冰洁,黄吉生,马博,等. 益气通络颗粒促气虚血瘀证脑梗大鼠血管新生的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1):112-118.
- [10] WANG Q Y, ZHANG N, LIU S Y, et al. Saposhnikovia Radix enhanced the angiogenic and anti-inflammatory effects of Huangqi Chifeng Tang in a rat model of cerebral infarction [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021:4232708.
- [11] 刘树民,卢芳,陈平平,等. 一种用于治疗脑梗死的中药组合物及制备方法:黑龙江, CN112843133A [P]. 2021-05-28.
- [12] 高红莉,王德才,曲晓兰,等. 黄芪丹参配伍对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织VEGF和bFGF mRNA表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(5):95-98.
- [13] 孟庆琦,米妍,侯悦. 基于神经血管单元各组成部分保护作用的中药抗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中

- 草药, 2021, 52(17): 5445-5454.
- [14] 姜辉, 顾胜龙, 张玉婷, 等. 黄芪化学成分和药理作用研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 93-96.
- [15] SHI Y H, ZHANG X L, YING P J, et al. Neuroprotective effect of Astragaloside IV on cerebral ischemia/reperfusion injury rats through Sirt1/mapt pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 639898.
- [16] LI L, GAN H, JIN H, et al. Astragaloside IV promotes microglia/macrophages M2 polarization and enhances neurogenesis and angiogenesis through PPAR $\gamma$  pathway after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 92: 107335.
- [17] 陈敏纯, 闫抗抗, 曹青, 等. 赤芍对缺血性脑卒中大鼠 PGC-1 $\alpha$ /Nrf2 通路促血管新生作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(4): 36-40.
- [18] LIU R, ZHENG Y, HAN T, et al. Angiogenic actions of paeoniflorin on endothelial progenitor cells and in ischemic stroke rat model[J]. Am J Chin Med, 2021, 49(4): 863-881.
- [19] 姜启永. miR-24 降低脑梗死大鼠的血脂水平并抑制脑组织细胞凋亡[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [20] LI C, SUN T, JIANG C. Recent advances in nanomedicines for the treatment of ischemic stroke[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(7): 1767-1788.
- [21] GUO P, JIN Z, WU H, et al. Effects of irisin on the dysfunction of blood-brain barrier in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. Brain Behav, 2019, 9(10): e01425.
- [22] ZHANG H T, ZHANG P, GAO Y, et al. Early VEGF inhibition attenuates blood-brain barrier disruption in ischemic rat brains by regulating the expression of MMPs[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(1): 57-64.
- [23] XU J, ZHANG P, CHEN Y, et al. Sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate ameliorates cerebral ischemic injury through regulation of angiogenesis[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(4): 1122.
- [24] CHAN S J, ESPOSITO E, HAYAKAWA K, et al. Vascular endothelial growth factor 165-binding heparan sulfate promotes functional recovery from cerebral ischemia[J]. Stroke, 2020, 51(9): 2844-2853.
- [25] WEN J, QIAN S, YANG Q, et al. Overexpression of Netrin-1 increases the expression of tight junction-associated proteins, Claudin-5, Occludin, and ZO-1, following traumatic brain injury in rats[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3): 881-886.
- [26] ZHANG Q, TAN J, WAN L, et al. Increase in blood-brain barrier permeability is modulated by tissue kallikrein via activation of bradykinin B1 and B2 receptor-mediated signaling[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 4283-4297.
- [27] XIAO H, LIU J, HE J, et al. 17 $\beta$ -estradiol attenuates intracerebral hemorrhage-induced blood-brain barrier injury and oxidative stress through SRC3-mediated PI3K/Akt signaling pathway in a mouse model[J]. ASN Neuro, 2021, 13: 17.
- [28] DEMARS K M, YANG C, HAWKINS K E, et al. Spatiotemporal changes in p-glycoprotein levels in brain and peripheral tissues following ischemic stroke in rats[J]. J Exp Neurosci, 2017, 11: 117.
- [29] WANG F, JI S, WANG M, et al. HMGB1 promoted P-glycoprotein at the blood-brain barrier in MCAO rats via TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 880: 173189.
- [30] VERSCHEIJDEN L, VAN HATTEM A C, PERTIJS J, et al. Developmental patterns in human blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier ABC drug transporter expression[J]. Histochem Cell Biol, 2020, 154(3): 265-273.

[责任编辑 孙丛丛]