

# 补阳还五汤对大鼠脑微血管内皮细胞氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用

范文涛<sup>1</sup>, 王利胜<sup>1\*</sup>, 范有明<sup>2\*</sup>, 李周<sup>1</sup>, 廖卫国<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 第三军医大学 高原军事医学系, 重庆 400038)

**[摘要]** **目的:**建立体外血脑屏障模型,研究补阳还五汤对氧糖剥夺再灌注损伤状态下血脑屏障功能及紧密连接相关蛋白表达的影响。**方法:**分离培养原代大鼠脑微血管内皮细胞,建立体外血脑屏障氧糖剥夺再灌注损伤模型,将细胞分为空白组、模型组、补阳还五汤提取液处理组,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞活性;采用转移小室(Transwell)检测牛血清白蛋白(BSA)的透过量;蛋白质印迹(Western blot)实验检测紧密连接蛋白闭合蛋白(Occludin)和紧密连接相关蛋白-1(ZO-1)的表达;利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测紧密连接蛋白 Occludin, ZO-1 mRNA 的表达。**结果:**与空白组比较,模型组细胞活力降低,BSA 的透过率明显升高,Occludin, ZO-1 蛋白及其 mRNA 的表达量明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤预处理后细胞存活性明显升高,BSA 的透过率降低,Occludin, ZO-1 蛋白及其 mRNA 的表达量明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**补阳还五汤能够降低氧糖剥夺再灌注处理对体外血脑屏障模型的损伤,上调紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin 蛋白及其 mRNA 的表达量。

**[关键词]** 补阳还五汤; 脑微血管内皮细胞; 氧糖剥夺再灌注; 血脑屏障; 紧密连接蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0111-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140111

## Buyang Huanwu Tang Protects Rat Brain Microvascular Endothelial Cells Injured by Oxygen-glucose Deprivation-reperfusion

FAN Wen-tao<sup>1</sup>, WANG Li-sheng<sup>1\*</sup>, FAN You-ming<sup>2\*</sup>, LI Zhou<sup>1</sup>, LIAO Wei-guo<sup>1</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an *in vitro* blood-brain barrier, in order to study the effects of Buyang Huanwu Tang on blood-brain barrier function and associated protein expression under the condition of oxygen and glucose deprivation-reperfusion injury. **Method:** The *in vitro* oxygen and glucose deprivation-reperfusion injury model was established by culturing the isolated primary rat brain microvascular endothelial cells. The cells were divided into three groups, namely blank group, model group and Buyang Huanwu Tang group, and then were processed by following steps. Cell counting kit (CCK-8) method was used to detect cell activity; Transwell assay was used to detect the permeation of bovine serum albumin (BSA); Western blot assay was used to detect the protein expressions of Occludin, ZO-1. Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) was used to detect the mRNA expressions of Occludin and ZO-1. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed significant decreases in cell activity, Occludin and ZO-1 protein and their mRNA expressions, and increase in BSA permeation rate ( $P < 0.05$ ). In Buyang Huanwu Tang group, cell survival rate was significantly

**[收稿日期]** 20150911(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373973);广东省省级科技计划项目(2013B032500015)

**[第一作者]** 范文涛,在读硕士,从事药物制剂新剂型与新技术研究,Tel:18223181475,E-mail:fanwentaolc@163.com

**[通讯作者]** \*王利胜,教授,博士生导师,从事药物制剂新剂型与新技术研究,Tel:020-39358043,E-mail:wli68@126.com;

\*范有明,副教授,从事病理生理学研究,Tel:15520062163,E-mail:214810781@qq.com

increased; bovine serum albumin (BSA) transmittance reduced; Occludin, ZO-1 protein and mRNA expression increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Buyang Huanwu Tang can reduce the oxygen glucose deprivation-reperfusion damage in the blood-brain barrier model *in vitro* and up-regulate ZO-1, Occludin protein and mRNA expression.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; rat brain microvascular endothelial cell; oxygen-glucose deprivation-reperfusion; blood brain barrier; tight junction protein

缺血性中风是临床常见的急性脑血管疾病,有较高的死亡率和致残率,补阳还五汤出自清代名医王清任所著《医林改错》,具有补气活血化瘀之功,是目前治疗脑缺血的常用方剂。大量临床病例观察表明补阳还五汤有助于减轻脑水肿,促进梗死灶的吸收,降低病残率,有利于患者神经功能恢复,在治疗脑缺血疾病方面有着确切的疗效<sup>[1]</sup>。但补阳还五汤作用机制的研究仍有待深入,尤其是补阳还五汤对脑微血管内皮细胞在抗脑缺血损伤中的作用及其机制还没有完全开展。脑微血管内皮细胞(BMECs)是构成血-脑屏障(BBB)的重要细胞,具有重要的生理作用,其形成的紧密连接是构成 BBB 结构的基础<sup>[2]</sup>。本研究利用体外氧糖剥夺再灌注模型模拟在体脑缺血损伤,观察了补阳还五汤对原代培养的大鼠脑微血管内皮细胞氧糖剥夺后屏障功能及紧密连接蛋白表达水平的变化,从而为脑微血管内皮细胞参与补阳还五汤抗脑缺血损伤提供直接的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 10 日龄 SD 大鼠,SPF 级,购自第三军医大学实验动物中心,合格证号 SCXK(渝)2007-0002。

**1.2 药物及试剂** 补阳还五汤处方来源于《医林改错》,由黄芪 120 g,赤芍 10 g,川芎 10 g,当归 10 g,干地龙 10 g,红花 10 g,桃仁 10 g 组成,药材均购于广州致信中药饮片有限公司,均由广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定。将药材按标准方法煎煮浓缩至含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,经大孔树脂柱滤过,冷藏备用。II 型胶原酶(美国 Gibco 公司,批号 1664521),牛血清白蛋白(BSA,美国 Sigma 公司,批号 USBA0139),细胞计数试剂盒(CCK-8,日本同仁化学研究所,批号 GB707),兔抗大鼠闭合蛋白(Occludin)抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR202125-1),兔抗大鼠 VIII 因子抗体和兔抗大鼠紧密连接相关蛋白-1(ZO-1)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 L1713, I0214),实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(日本 Takara 公司,批号 AK2802)。

**1.3 仪器** SXP-1C 型手术显微镜(上海医光仪器有限公司),MX61L 型倒置相差显微镜及 BX52 型

普通免疫荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Nanodrop 2000 型超微量分光光度计,240i 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱及 BK6160 型低氧恒温培养箱(美国 Thermo 公司);ELX800 型酶联免疫检测仪(英国 Bio-Tek 公司),170-8170 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),CFX96 型 qPCR 仪(美国 MJ 公司)。

## 2 方法

**2.1 rBMECs 的分离培养** 参照 Liu 等<sup>[3]</sup>的方法分离培养原代大鼠脑微血管内皮细胞。将 10 日龄新生大鼠麻醉、消毒后取出大脑,在无菌干滤纸上滚动除去脑膜和血管,分离左右大脑半球,除去大脑灰质以外的脑组织和大血管。将大脑灰质剪碎,150 × g 离心 3 min。向离心后的沉淀层中加入 25% 的 BSA,吹打均匀,匀浆液 600 × g 离心 10 min。将最底面的微血管层转移到新的 15 mL 离心管中,0.1% 的 II 型胶原酶 37 °C 消化 35 min,消化后的微血管细胞 150 × g 再次离心 5 min,吸弃上清,向沉淀中加入 DMEM/F12 完全培养基(含 10% FBS,100 U · mL<sup>-1</sup> 青霉素,100 U · mL<sup>-1</sup> 链霉素)放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**2.2 rBMECs 的鉴定** 倒置显微镜下观察 rBMECs 生长的形态学特征。细胞传至第 2 代后,制作成细胞爬片,用免疫荧光显微镜进行血管内皮细胞特异性标志物 VIII 因子相关抗原免疫荧光检测。

**2.3 氧糖剥夺再灌注损伤模型的建立及给药处理** 培养至第 2 代的 rBMECs 吸出原培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入 0.1% 的胰蛋白酶室温消化成单个细胞后加入完全培养基,轻轻吹打细胞使成细胞悬液,以  $1 \times 10^6$  个/mL 密度铺到 96 孔培养板中,每孔 100 μL。细胞培养 2 d 后,将培养板随机分为空白组更换 DMEM 含糖并始终在正常气体条件下培养;模型组造模参照文献[4]方法,更换 DMEM 无糖培养基,然后将培养板放入缺氧培养箱中培养 4 h(缺氧缺糖模拟脑缺血状态)。4 h 后,将 DMEM 无糖培养基换掉,加入含有胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,重新放入 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 8 h 给予复氧;补阳还五汤处理组造模同模型组;在更换 DMEM/F12 培养基时加入补阳还五汤提取液使其终质量浓度为 1,10,100,1 000 mg · L<sup>-1</sup>。

**2.4 CCK-8 法测定 rBMECs 的活性** 各组细胞终止培养前 1 h 取出培养板,向每孔中加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,继续放入培养箱中培养 1 h。然后将培养板放在酶标仪上 450 nm 处测定每孔的吸光度 *A*。

**2.5 血脑屏障通透性检测** 培养至第 3 代的 rBMECs 用胰酶消化后用培养基调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/mL,向 Transwell 培养板上室(孔径 1  $\mu$ m,有效膜面积 0.33  $\text{cm}^2$ )中加入含 rBMECs 的培养液 500  $\mu$ L,下室中加入培养液 1 500  $\mu$ L。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞形成紧密单层后,向上室中加入含 2% BSA 的培养基,将其随机分为空白组、模型组、补阳还五汤处理组(低、高剂量为 10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。分别吸取各组上室和下室的上清液,在酶标仪上 562 nm 处测定每孔的 *A*。参照下式<sup>[5]</sup>计算 BSA 透过率。

$$\text{BSA 透过率} = \frac{\text{下室液体 } A}{\text{上室液体 } A} \times 100\%$$

**2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 Occludin 及 ZO-1 蛋白水平** 将培养皿取出,置于冰上,预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,加入适量蛋白提取裂解液,用细胞刮刮取细胞,转移至离心管中,冰上裂解 15 min。然后 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,将上清转移至新的预冷的离心管中。BCA 法测蛋白浓度后,按照最低浓度调整各组蛋白浓度,加入上样缓冲液,95  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅内变性 10 min,冷却后 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。10% SDS-PAGE,每孔上样品量为 40  $\mu$ g,然后转到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,孵 Occludin 或 ZO-1 抗体(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。洗过后,孵辣根过氧化物酶耦联的羊抗兔 IgG(1:2 000);采用增强型化学发光试剂(ECL)方法显影,将显影结果用 Quantity One 软件对蛋白条带进行灰度扫描及图像分析,每组实验重复 3 次。

**2.7 qPCR 检测 Occludin 及 ZO-1 mRNA 的表达水平** 根据总 RNA 提取试剂盒的步骤提取细胞总 RNA,用超微量紫外分光光度计测定提取 RNA 的浓度,检测完 RNA 纯度以及完整性之后,按 qPCR 试剂盒说明书配置 qPCR 反应体系,进行逆转录及聚合酶链式反应。Occludin 引物上游 5'-AAACCCGAAGAAAGATGGACC-3',下游 5'-TCACTTTGCCGTGGAGGAG-3',扩增片段长度 198 bp;ZO-1 引物上游 5'-TTCCGCCTCTGTCCAACCTCT-3',下游 5'-ATGGGGGTGGCTCTGTTT-3',扩增片段长度 117 bp; $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物上游 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3',扩增片段长度 207 bp。

Occludin 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,61  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。ZO-1, $\beta$ -actin 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。收集数据,基因表达相对量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示,每组实验重复 3 次。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用单因素方差分析对各组间的数据进行比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 rBMECs 的鉴定** 培养 24 h 后可见细胞从贴壁的微血管段周围爬出,细胞呈短梭形、多角形,约 6~7 d 达到融合。融合后的细胞呈长梭形,可见漩涡状分布。rBMECs 在传至第 2 代时,制备细胞爬片,进行 VIII 因子相关抗原免疫荧光检测,计算阳性细胞率,得出培养的 rBMECs 纯度为 96%。见图 1。

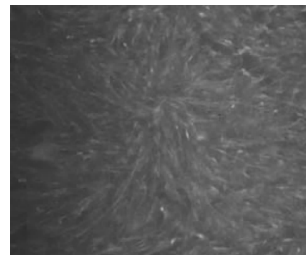


图 1 VIII 因子相关抗原免疫荧光检测( $\times 100$ )

Fig.1 Immunofluorescence assay of factor VIII related antigen of rBMECs( $\times 100$ )

**3.2 对 rBMECs 活力的影响** 与空白组比较,模型组 rBMECs 活力明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,不同质量浓度的补阳还五汤组 rBMECs 活力明显升高,尤其是 10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  补阳还五汤组 rBMECs 活力升高最为明显( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 补阳还五汤对 rBMECs 活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang on viability of rBMECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	rBMECs 活力( <i>A</i> )
空白	-	0.95 $\pm$ 0.02
模型	-	0.70 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	1	0.71 $\pm$ 0.03
	10	0.77 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
	100	0.88 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
	1 000	0.72 $\pm$ 0.02

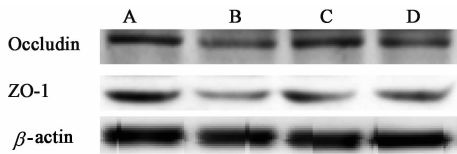
注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

**3.3 对 rBMECs 的 BSA 透过率的影响** 与空白组比较,模型组中 BSA 的透过率明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  补阳还五汤组 BSA 的透过率均明显降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 补阳还五汤对 rBMECs BSA 透过率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on BSA leakage rate of rBMECs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	BSA 透过率/%
空白	-	12.38 ± 1.35
模型	-	25.13 ± 1.92 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	10	19.38 ± 2.56 <sup>2)</sup>
	100	16.53 ± 1.12 <sup>2)</sup>

**3.4 对氧糖剥夺再灌注 rBMECs 的 Occludin 及 ZO-1 蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组 rBMECs 紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  补阳还五汤组均能明显升高 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达( $P < 0.05$ )。见图 2,表 3。



A. 空白组; B. 模型组; C. 补阳还五汤 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. 补阳还五汤 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 2 补阳还五汤对 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达的影响  
Fig. 2 Effects of Buyang Huanwu Tang on expression levels of Occludin and ZO-1 proteins in rBMECs

表 3 补阳还五汤对 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of Buyang Huanwu Tang on expression levels of Occludin and ZO-1 proteins in rBMECs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Occludin 蛋白	ZO-1 蛋白
空白	-	0.55 ± 0.04	0.50 ± 0.05
模型	-	0.36 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	10	0.44 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	100	0.47 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>2)</sup>

**3.5 对氧糖剥夺再灌注 rBMECs Occludin 及 ZO-1 mRNA 表达水平的影响** 与空白组比较,模型组 Occludin 及 ZO-1 mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  补阳还五汤组明显升高 Occludin 及 ZO-1 mRNA 表达水平( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 补阳还五汤对 rBMECs mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on Occludin and ZO-1 mRNA expression levels in rBMECs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Occludin mRNA	ZO-1 mRNA
空白	-	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05
模型	-	0.58 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	10	0.67 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	100	0.71 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.73 ± 0.05 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

补阳还五汤可通过改善血液流变性<sup>[6]</sup>、提高脑组织能量代谢<sup>[7]</sup>、抗炎、抗自由基损伤<sup>[8]</sup>、保护血脑屏障<sup>[9]</sup>等多种途径抗脑缺血损伤。基质金属蛋白酶(MMPs)可通过降解血管基底膜成分而导致血脑屏障的破坏,研究表明,补阳还五汤可下调大鼠脑组织 MMP-9 蛋白和基因表达,降低大鼠脑缺血再灌注 48 h 缺血侧伊文思蓝的含量,从而保护血脑屏障的正常功能<sup>[10]</sup>。本研究通过比较空白组、模型组与给药组之间的细胞活力值,确定了补阳还五汤对 rBMECs 氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用。BSA 透过率的结果与各组细胞活力一致,也就是说,质量浓度 10,100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的补阳还五汤预处理组均能显著提高 rBMECs 细胞活力,降低 BSA 的透过率。

脑微血管内皮细胞,是一种高度特殊化的内皮细胞,在维持血脑屏障功能上起着重要的作用,同时也最先受到在机体缺血及再灌注损伤的影响<sup>[11]</sup>。脑微血管内皮细胞之间的紧密连接是使其不同于中枢神经系统以外的内皮细胞的关键。紧密连接是连接复合体封闭上皮细胞最重要的部件,防止小分子物质从毛细血管漏出进入脑实质,缺血性脑损伤能够打开血脑屏障中的紧密连接,破坏血脑屏障,在脑缺血的发病机制中至关重要<sup>[12]</sup>。紧密连接是由复杂的紧密连接蛋白包括跨膜蛋白、黏附分子等组成,所有这些蛋白在调节紧密连接的开放中发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。其中, Occludin 及 ZO-1 与血脑屏障通透性密切相关<sup>[14]</sup>。在本研究中,笔者观察到,在微血管内皮细胞 Occludin 和 ZO-1 的表达在氧糖剥夺再灌注后 6 h 降低;然而,补阳还五汤能够有效抑制 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达的下调。补阳还五汤给药处理后血脑屏障中的紧密连接蛋白的表达显著增加,这可能为解释补阳还五汤能够减轻中风后的脑水肿提供依据<sup>[15]</sup>。

综上所述,研究结果进一步表明,补阳还五汤能够保护缺血性损伤中的细胞,是一种很有研究意义

的抗缺血性脑卒中的治疗剂。但要充分阐明其作用机制仍需要进一步的研究。

[参考文献]

[ 1 ] 陈冬,杨洁红. 补阳还五汤抗脑缺血作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(1):72-74.

[ 2 ] Abbott N J, patabendige A A, Dolman D E, et al. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 13-25.

[ 3 ] Liu Y, Xue Q, Tang Q, et al. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells [J]. Microvasc Res, 2013 (90): 199-205.

[ 4 ] Wang J, Li P T, Du H H, et al. Tong Luo Jiu Nao injection, a traditional Chinese medicinal preparation, inhibits MIP-1 $\beta$  expression in brain microvascular endothelial cells injured by oxygen-glucose deprivation [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1):151-157.

[ 5 ] Zhang P, Hou J C, Fu J H, et al. Baicalin protects rat brain microvascular endothelial cells injured by oxygen-glucose deprivation via anti-inflammation[J]. Brain Res Bull, 2013, 97:8-15.

[ 6 ] 吴东华. 补阳还五汤对急性脑梗死患者的疗效及血液流变学指标的影响[J]. 中国医药导报,2012,9(22):114-115.

[ 7 ] 卢永康,彭康,朱传武,等. 补阳还五汤对中风后遗症“气虚血瘀”大鼠模型能量代谢的影响[J]. 中华中医药学刊,2007,25(11):2280-2283.

[ 8 ] 谭文聪,张少欢,彭丹婷,等. 补阳还五汤对大鼠全脑

缺血再灌注的药效研究[J]. 广州中医药大学学报, 2012,29(3):279-282,338.

[ 9 ] 王新高,童萼塘,孙圣刚. 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2005,13(5):579-582.

[10] 龙建飞,张秋霞,王蕾. 补阳还五汤治疗缺血性中风药理作用机制的研究进展[J]. 世界中医药,2015,10(5):805-807.

[11] Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation [J]. Brain Pathol, 2000, 10(1): 113-126.

[12] Yang Y, Rosenberg G A. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease [J]. Stroke, 2011,42(11):3323-3328.

[13] Farkas A E, Capaldo C T, Nusrat A. Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1258: 115-124.

[14] Balbuena P, Li W, Ehrlich M. Assessments of tight junction proteins occludin, claudin 5 and scaffold proteins ZO1 and ZO2 in endothelial cells of the rat blood-brain barrier: cellular responses to neurotoxicants malathion and lead acetate[J]. Neurotoxicology, 2011, 32(1): 58-67.

[15] 周坚,王静新,蔡文智,等. 补阳还五汤对大鼠血管源性脑水肿的抗应激治疗作用[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):234-237.

[责任编辑 周冰冰]