

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

朱慧渊¹, 苗琦¹, 王江¹, 刘妍如¹, 王文瑄¹, 罗斌¹, 党珊^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省人民医院, 西安 710068)

[摘要] 目的:本研究拟通过神经病理学——分子神经生物学——功能行为学等多个层面,研究丹参、红花有效组分配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤相关致炎因子的调控作用及其机制。方法:将32只SD大鼠随机分为假手术组,模型组,丹参、红花有效组分配伍(丹红配伍,720 mg·kg⁻¹)组、尼莫地平(0.5 mg·kg⁻¹)组,每组8只。除假手术组,其余各组采用改良MCAO法制备缺血性脑卒中损伤的相关模型,分别于再灌0,6 h灌胃给药。采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组缺血性损伤引起的脑组织病理学改变,免疫组化及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠脑组织中相关致炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和核转录因子E2相关因子2(Nrf2)蛋白及mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠脑组织中Nrf2蛋白表达,探讨其抗脑缺血损伤炎症反应的作用机制。结果:HE染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织正常表达的神经元计数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组大鼠脑组织存活神经元计数明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。免疫组化和Real-time PCR结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中IL-1 β 和Nrf2蛋白阳性及mRNA表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组IL-1 β 和Nrf2蛋白阳性及mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。Western blot结果显示,与假手术组相比较,模型组大鼠的脑组织中Nrf2蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组大鼠脑组织中Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:丹参、红花有效组分配伍能明显下调IL-1 β 和Nrf2蛋白表达,其机制是激活炎症通路的蛋白表达,减少神经细胞凋亡,最终达到抑制缺血性脑卒中损伤过程中的相关炎症反应。

[关键词] 丹参; 红花; 组分配伍; 脑缺血; 炎症反应

[中图分类号] R2-0;R289;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0077-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202137

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200827.0845.001.html>

[网络出版日期] 2020-8-27 10:12

Mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* Component Compatibility on Inflammatory Factor in Brain Tissue of Rats with Ischemic Stroke

ZHU Hui-yuan¹, MIAO Qi¹, WANG Jiang¹, LIU Yan-ru¹, WANG Wen-xuan¹, LUO Bin¹, DANG Shan^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

[Abstract] **Objective:** This study intends to study the regulatory effect and mechanism of the effective components of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* on inflammatory factors related to cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through multiple levels of neuropathology, molecular neurobiology and functional behavior. **Method:** The 32 male rats were randomly divided into four groups: sham group, model group, Danhong components compatibility group(720 mg·kg⁻¹), nimodipine (0.5 mg·kg⁻¹) groups, each

[收稿日期] 20200404(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503491);陕西中医药大学第二附属医院学科创新团队项目(2020XKTD-C01)

[第一作者] 朱慧渊,博士,教授,从事方剂量效关系和临床应用工作,E-mail:498734724@qq.com

[通信作者] *党珊,博士,副教授,副主任医师,从事老年代谢病研究,E-mail:brightsadny@126.com

group of eight male rats. Cerebral ischemia was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) approach. The treatment was performed immediately and at 6 hour after MCAO. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to check the changes of brain histopathology, immunohistochemistry and Real time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to check the expression of IL-1 β and Nrf2 in brain tissue, Western blot was used to detect the protein expression of Nrf2 in brain tissue. The aim is to investigate the treatment mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* components in a rat model of cerebral ischemic-reperfusion injury. **Result:** HE staining results showed, compared with sham group, the surviving neurons amount in the model group was significantly reduced ($P < 0.01$), compared with the MCAO group, the number of surviving neurons in the brain tissue of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility group and nimodipine group was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of immunohistochemistry and Real-time PCR showed that, compared with normal group, IL-1 β and Nrf2 expression in model group were significantly increased ($P < 0.01$), compared with MCAO group, the expression of IL-1 β and Nrf2 in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility group and the nimodipine group was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot results showed that, compared with sham group, Nrf2 positive expression in model group was much more increased ($P < 0.01$), compared with MCAO group, the expression of Nrf2 in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility group and the nimodipine group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The combination of effective components of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* can significantly down-regulate the expression of IL-1 β and Nrf2 proteins. The mechanism is to activate the protein expression of inflammatory pathways, reduce the apoptosis of nerve cells, and finally inhibit the inflammatory response in the process of ischemic stroke injury.

[Key words] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Carthami Flos*; component compatibility; cerebral ischemic stroke; inflammatory reaction

缺血性脑卒中一直是现代医学研究的热点话题。现代流行病学研究表明,脑血管疾病死亡率居世界前位,其中缺血性脑卒中具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点^[1-2]。缺血脑损伤相关疾病的病理反应过程十分复杂,其中涉及多个环节,多种因素,其病理机制主要包括炎症反应、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、细胞凋亡等,其中免疫性炎症是脑缺血损伤的重要病理进程,因此抗脑缺血的炎症反应是防治脑缺血的关键^[3-4]。现代医学常用的治疗药物包括他汀类药物,*N*-乙酰半胱氨酸(NAC),糖皮质激素、钙通道阻滞剂等^[5]。

缺血性脑卒中的临床表现以口眼歪斜,肢体活动不遂,甚至突然晕倒,不省人事,意识障碍,言语不利为主,发病机制与气虚、血瘀、痰浊等病理因素关系密切^[6]。近年来报道发现,中医药在防治缺血性脑中风方面有独特的优势,临床报道有效率较为显著,值得进一步推广^[7]。活血化瘀药丹参、红花均具有抗栓、抗炎等效应,临床疗效确切^[8-9]。然而,以往的中医方剂配伍研究多停留在饮片配伍或中药单一成分层面,定量评价中药组分配伍拮抗或协同

效应较少。因此,本实验重点多组分配伍研究,以丹参、红花中的有效组分丹参酮、丹参素、丹酚酸和羟基红花黄色素为本实验的关键治疗药物,以脑缺血损伤后的炎症反应为基准点,以中医药整体免疫调节为主导思路,重点检测缺血性脑损伤大鼠神经病理改变及脑组织致炎因子相关蛋白的阳性表达,探讨其对缺血性脑损伤炎症反应的作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康成年SD雄性大鼠32只,体质量250~320 g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号SCXK(浙)2014-0001,适应性饲养3 d。动物实验经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 丹参酮(中国药品生物制品检定所,批号110766-200619);丹参素,丹酚酸,羟基红花黄色素(南京世洲生物科技有限公司,批号分别为SZ201707038DSS, SZ201706001DA, SZ201702005QA);尼莫地平(上海源叶生物工程有限公司,批号66085-59-4);核转录因子E2相关因子2(Nrf2)兔来源多克隆抗体,白细胞介素(IL)-1 β 兔来源多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR106735-7,

GR1134-17);鼠和兔来源一抗免疫组化试剂盒(丹麦 Dako 公司,批号 1701777A);trizol 试剂, SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 12183-555, 11752-050);RNase-Free DNase Set(德国 Qiagen 公司,批号 79254);Power SYBR® Green PCR Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号 4367659);苏木素-伊红(HE)染色液(上海三爱思试剂有限公司,批号 20170612)。

1.3 仪器 MICROM HM340E 型石蜡切片机(德国 Microm 公司);BX60 型荧光显微镜摄像机(日本 Olympus 公司);GNP-9080 型隔水式恒温培养箱, DHG-9140A 型电热恒温干燥箱(上海精宏医疗设备有限公司);HI120 型摊片机(德国 Leica 公司);CFX384 多重实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪, Mini-PROTEAN 电泳系统, Mini Trans-Blot 转印系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 将 32 只大鼠随机分为假手术组,模型组,丹参、红花(丹红)有效组分配伍组和尼莫地平组,每组 8 只。根据课题组前期研究结果^[10-11]换算大鼠用药量,丹红有效组分配伍组($720 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)(按照以往实验的筛选结果^[10],最佳丹红有效组分配伍的比例为丹参酮 240 mg,丹参素 320 mg,丹酚酸 120 mg,羟基红花黄色素 40 mg),尼莫地平组($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别采用生理盐水配置成混悬液进行给药,于脑缺血再灌注 0, 6 h 分别灌胃给药,假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

2.2 模型制备 实验动物的模型制备按照文献[12]方法,改良后复制大脑中动脉局灶性栓塞(MCAO)。采用 10% 水合氯醛腹腔注射($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,将其仰卧固定。后将大鼠的颈正中部分切开,暴露右颈总动脉(CCA),颈内、外动脉(ICA 及 ECA),以及右侧颈外动脉和右侧颈内动脉的分支,并采用挂线方式,为后续实验做好准备。接下来进行结扎并剪断 ECA 分支,用动脉夹阻断右侧颈总动脉,在距右侧颈总动脉分叉 0.8~1.0 cm 处用双重丝线结扎颈外动脉,在右侧颈外动脉近心端剪一小口,从切口处插入一端加热成光滑球形且经过多聚赖氨酸处理的 4-0 尼龙线(直径为 0.25 mm,距球端 2 cm 处作标记)。经分叉处轻轻插入 ICA,当将尼龙线插入距颈总动脉分叉 1.8~2.0 cm 位置处。随后,在颈外动脉尼龙线插入的近心端进行结

扎。假手术组的尼龙线只进入 0.5 cm 左右,保证不阻断大脑中动脉的血供。经 60 min 缺血处理,抽出尼龙线,扎紧切口,并颈总动脉的动脉夹去除,后开始再灌注 24 h,大鼠苏醒后出现同侧 Horner 征和对侧以前肢为重的偏瘫表明造模成功^[13]。

2.3 HE 染色观察大鼠脑组织病理学改变 大鼠缺血再灌注 24 h 后,处死,取材。脑组织病理切片放入二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,依次放入 95% 乙醇, 0.5% 伊红乙醇染色液中静置 1 min 取出, 80% 乙醇进行分化,切片脱水,晾干,封片。普通光学显微镜下观察结果并照相,观察梗死灶情况,并计数大脑皮层下的存活神经元密度,具体计数方法为每张切片选择皮层梗死缺血灶区域在 200 倍视野下拍照 3~5 张,计数整个视野内存活神经元的细胞数,然后取平均数。

2.4 免疫组化检测大鼠脑组织 IL-1 β 和 Nrf2 蛋白阳性表达 病理切片放入二甲苯中脱蜡,依次进行水化、冲洗,滴加 DAB 显色液,通过显微镜控制显色,1 min 后自来水冲洗终止反应。苏木素液复染细胞核后,将切片脱水至透明,晾干,中性树胶封片。Nrf2 蛋白的表达采用阳性细胞数计数方法:选择大脑皮层梗死缺血灶 3~5 个视野在 200 倍视野下拍照,使用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件计数视野内阳性细胞数占视野总细胞数的阳性百分比,进行数理统计分析。IL-1 β 的表达采用图像分析系统测量方法:选择大脑皮层梗死缺血灶 3~5 个视野在 200 倍视野下拍照,使用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测量该视野阳性细胞 mean density 值,进行数理统计分析。

2.5 Real-time PCR 检测大鼠脑组织 IL-1 β 和 Nrf2 的 mRNA 表达 按 trizol 说明书提取各组大鼠脑组织总 RNA,依据 Primer Premier 6.0 版本和 Beacon designer 7.8 版本的软件进行处理,设计定量 PCR 引物,按照逆转录试剂盒进行操作,反应条件为 95 °C 预变性 1 min,循环程序设定为 95 °C 15 s, 63 °C 25 s,共 40 个循环,反应完成后作熔解度曲线分析。设计的 PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。IL-1 β 引物序列上游 5'-CCTAGGAAACAGCAATGGTCGGGAC-3',下游 5'-GTCAGAGGCAGGGAGGGAACAC-3',片段长度 239 bp; Nrf2 引物序列上游 5'-GCAAGCGACTCATGGTCATCTACAA-3',下游 5'-CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3',片段长度 149 bp。实验所用的每个样品均采用 3 次重复,

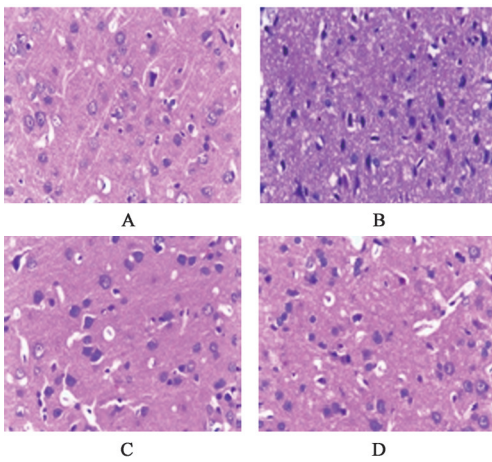
各mRNA的相对表达量均采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法表示。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑组织Nrf2蛋白表达 脑组织总蛋白提取测定后,行SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,加入一抗(1:1 500),二抗(1:2 000),4℃孵育过夜。制备工作液,室温孵育转印膜保鲜膜密封,进行显影和定影。采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值。

2.7 统计学方法 本实验检测的数据均采用SPSS 17.0版本的软件进行统计学处理,数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较首先确定样本是否符合正态分布,然后方差齐性检验,根据方差齐性选用 t 检验法进行处理。

3 结果

3.1 对大鼠脑组织病理学改变的影响 正常状态下,大鼠脑组织细胞大小均匀、排列整齐,与假手术组比较,模型组脑组织可见明显的缺血及梗死灶,以及脑组织充血、水肿、破碎等损伤,神经元细胞数量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,丹红有效组分配伍组及尼莫地平组均出现少量细胞排列紊乱,体积固缩及破碎的锥体细胞比模型组相比明显减少,淡染区面积增大,神经元细胞数量明显增多($P<0.05, P<0.01$)。见图1,表1。



A.假手术组;B.模型组;C.丹红配伍组;D.尼莫地平组(图2~4同)

图1 丹红有效组分配伍对大鼠脑组织病理的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Carthami Flos component compatibility on rat brain histopathology (HE,×200)

3.2 对大鼠脑组织IL-1 β 和Nrf2蛋白阳性表达的影响 与假手术组比较,模型组IL-1 β 和Nrf2蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组IL-1 β 和Nrf2蛋白表达明显降低($P<0.05$),说明丹红配伍可显著降低炎症反应,减轻脑损伤。见图2,3,表2。

表1 丹红有效组分配伍对大鼠脑组织存活神经元细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Carthami Flos component compatibility on survival neurons of rat brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	神经元细胞数/个
假手术	-	80.087±10.176
模型	-	26.973±10.324 ¹⁾
丹红配伍	720	43.887±4.075 ³⁾
尼莫地平	0.5	40.876±11.652 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05, ^3)$ $P<0.01$ 。

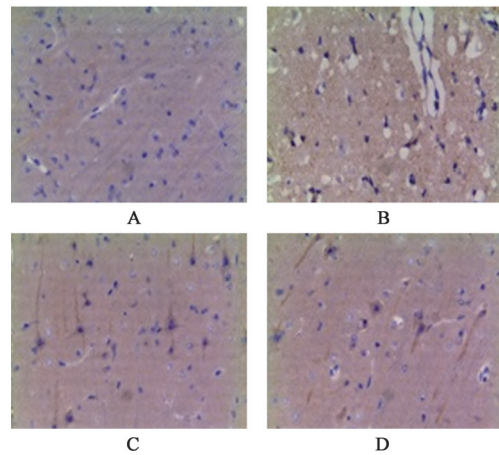


图2 丹红有效组分配伍对大鼠脑组织IL-1 β 蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 2 Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Carthami Flos component compatibility on expression of IL-1 β protein in rat brain(IHC,×200)

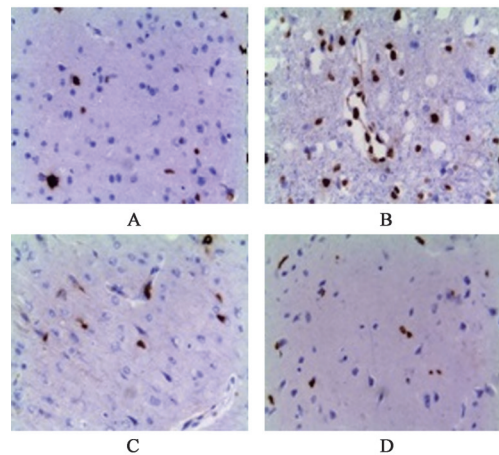


图3 丹红有效组分配伍对大鼠脑组织Nrf2蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Carthami Flos component compatibility on expression of Nrf2 protein in rat brain(IHC,×200)

3.3 对大鼠脑组织IL-1 β 和Nrf2的mRNA表达的影响 与假手术组比较,模型组IL-1 β 和Nrf2

表2 丹红有效组分配伍对脑组织 IL-1 β 和 Nrf2 阳性表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility on positive expression of IL-1 and Nrf2 in brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β	Nrf2
假手术	-	0.228 \pm 0.027	9.949 \pm 3.498
模型	-	0.278 \pm 0.018 ¹⁾	45.257 \pm 16.838 ¹⁾
丹红配伍	720	0.236 \pm 0.019 ²⁾	26.984 \pm 13.141 ²⁾
尼莫地平	0.5	0.236 \pm 0.007 ²⁾	25.837 \pm 9.494 ²⁾

注:与假手组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组 IL-1 β 和 Nrf2 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。见表3。

表3 丹红有效组分配伍对脑组织 IL-1 β 和 Nrf2 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility on expression of IL-1 β and Nrf2 in brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β	Nrf2
假手术	-	1.820 \pm 0.498	23.842 \pm 3.909
模型	-	13.625 \pm 1.872 ¹⁾	114.920 \pm 34.549 ¹⁾
丹红配伍	720	4.023 \pm 1.050 ²⁾	42.753 \pm 13.130 ²⁾
尼莫地平	0.5	3.972 \pm 0.962 ²⁾	56.521 \pm 7.964 ²⁾

注:与假手组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表4同)。

3.4 对大鼠脑组织 Nrf2 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 Nrf2 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,丹红配伍组和尼莫地平组大鼠脑组织 Nrf2 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$),说明治疗有效,可显著降低炎症反应。见图4,表4。

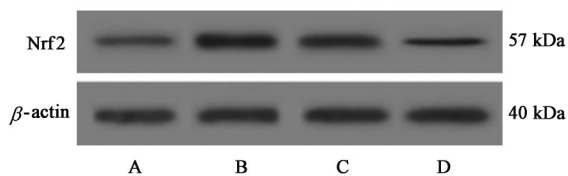


图4 大鼠脑组织 Nrf2 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Nrf2 protein expression in rat brain tissue

4 讨论

近年来,脑卒中成为威胁人类健康与安全的疾病之一,其中缺血性脑卒中占脑卒中患者的60%~70%^[14]。缺血性脑卒中是指在动脉粥样硬化的病理基础上,脑血流循环障碍而引起脑组织缺血,进而

表4 丹红有效组分配伍对脑组织致炎因子 Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* component compatibility on expression of inflammatory factor Nrf2 in brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Nrf2/ β -actin
假手术	-	3.477 \pm 1.402
模型	-	14.170 \pm 0.773 ¹⁾
丹红配伍	720	7.097 \pm 1.012 ²⁾
尼莫地平	0.5	7.735 \pm 4.210 ²⁾

打破脑组织的血氧平衡状态,出现一系列病理损伤^[15]。随着科学研究的深入,有学者发现,炎症反应是导致缺血性脑损伤的关键因素之一^[16-17]。脑缺血后,一方面,脑组织细胞释放大量的炎性因子^[18],如 IL-1,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等,这些炎性因子相互作用,引发一系列级联反应,加重脑损伤^[19]。另一方面,脑缺血发生后,诱导机体自身保护系统,刺激机体氧化应激反应,促使 Nrf2 活化,参与抗炎、抗氧化作用,来减轻脑损伤^[20-21]。

丹参-红花是经典药对之一,二者同属于活血化瘀药,均归心、肝经,其中丹参性微寒,味苦,具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、除烦安神的功效;红花辛温,具有活血通经、祛瘀止痛的功效^[22]。其中丹参为君药,红花为臣药,二者合用,一寒一温,相辅相成,祛邪不伤正,活血通络、祛瘀生新,成为中医临床常用的经典药对之一^[23],其中以此为基础研发的中药制剂丹红注射液现已在临床上广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[24],大数据统计结果显示,该品种为临床应用最多的活血化瘀中药注射剂之一^[25]。科学研究发现,丹参的化学成分主要包括脂溶性和水溶性成分。丹参酮是脂溶性成分的代表,丹参素和丹酚酸属于水溶性成分,已有研究证实脂溶性成分具有清除自由基、抗炎、抗氧化等作用,水溶性成分具有抑制血小板凝集,扩张血管的作用^[26]。研究发现红花的成分复杂,目前已知的主要活性成分为红花黄色素^[27]。实验证明,红花黄色素具有抗炎的作用,能够抑制脑缺血再灌注产生的炎性细胞和自由基反应,减轻脑损伤,发挥保护神经元的作用^[28]。实验研究结果提示,中药丹参与红花针对抗脑缺血的有效部位主要包括4种有效成分,主要为丹参酮、丹参素、丹酚酸以及羟基红花黄色素。本课题组前期实验结果提示,丹参酮 240 mg,丹参素 320 mg,丹酚酸 120 mg 及羟基红花黄色素 40 mg 配伍比例的治疗效果最佳^[10]。

本实验通过观察 Nrf2 炎症通路中炎症因子 IL-1, Nrf2 蛋白的阳性表达变化,旨在探讨丹红有效组分配伍对缺血性脑卒中的 Nrf2 炎症反应通路的作用机制。已有报道,IL-1 是炎症细胞的强烈趋化因子,能够诱导脑缺血后炎症反应,引起神经元损伤。小胶质细胞是中枢神经系统具有监测内环境稳态作用的细胞,脑缺血发生后,大脑中的小胶质细胞被激活,可产生大量的炎症因子,其中包括 IL-1, TNF- α 等,炎症因子在中枢神经系统炎症反应中相互作用,导致神经细胞凋亡,造成神经损伤,促使脑缺血损伤进一步发展^[29-31]。因此,降低 IL-1 的产生是抑制炎症反应进一步发生的关键。Nrf2 是一种具有神经保护作用的重要转录因子,同时在抗氧化作用中起着关键作用。机体正常状态下,Nrf2 以失活状态存在,脑缺血发生后,机体产生氧化应激反应促使 Nrf2 活化,表达增高,从而通过抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡和促进血管新生来减轻脑损伤^[32-33]。当 IL-1 水平升高时,Nrf2 表达也随之上升来抑制 IL-1 的释放,降低炎症反应,从而发挥保护机体的作用^[34]。因此,通过激活 Nrf2 通路来减轻疾病的症状成为治疗缺血性脑损伤的重要思路。

本实验分别采用免疫组化, Real-time PCR 及 Western blot, 测定脑组织内 IL-1 β 和 Nrf2 蛋白及 mRNA 表达,结果显示丹红有效组分配伍组能不同程度减少 IL-1 β 和 Nrf2 蛋白及 mRNA 表达。这与组织病理学(HE 染色)观察结果相一致;以上结果表明,丹参、红花有效组分配伍的干预机制,可能与调控炎症因子 IL-1 β 诱导的 Nrf2 通路的蛋白表达相关,进而减少神经细胞的凋亡,达到抗脑缺血损伤的保护作用。已有实验研究证实,丹参、红花有效成分配伍显著降低脑梗死体积,减轻脑水肿,促进神经功能的修复^[35]。二者合用疗效优于单味药,具有较强的抗炎症损伤和抗氧化等作用^[36]。现代研究发现,丹参-红花配伍发挥保护作用机制各有侧重。丹参药理作用偏于清除自由基、抗氧化反应等方面,而红花药理作用偏向于保护心脑血管,改善微循环等方面^[37]。丹参-红花配伍共同发挥抗炎反应,抗氧化等作用,二者协同增效,发挥药物的最大治疗效果。由于临床上脑缺血是依其病理机制的不同进行对症治疗,所以本实验研究最佳丹红有效组分配伍组的作用机制也仅从某一角度展现其保护作用的优势,仅为临床精准用药提供一定的参考。

[参考文献]

- [1] SELVAMANI A, WILLIAMS M H, MIRANDA R C, et al. Circulating miRNA profiles provide a biomarker for severity of stroke outcomes associated with age and sex in a rat model [J]. Clin Sci, 2014, 127(2): 77-89.
- [2] CONSOLI D, PACIARONI M, AGUGLIA M, et al. Prevalence of patent foramen ovale in ischemic stroke in Italy: the SISIFO study [J]. Neurol Sci, 2014, 35(6): 867-873.
- [3] 崔小英,于建设,都义日,等. 脑缺血再灌注损伤及脑保护药物研究进展[J]. 河北医药, 2016, 38(4): 596-600.
- [4] 贾壮壮,陈红阳,赵磊,等. 丹参多酚酸配伍三七总皂苷通过调节 M1/M2 型小胶质细胞极化对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 天津中医药, 2020, 37(7): 824-830.
- [5] 王晓平,倪京满. 脑缺血再灌注损伤的研究及药物治疗进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(6): 659-663, 691.
- [6] 杨小钰,黄海红,谌泽芳,等. 脑缺血再灌注后炎症反应研究进展及中西医结合防治思路[J]. 中国现代医药杂志, 2019, 21(12): 95-99.
- [7] 李晓琼,林荣清,杨璧璘,等. 中医药治疗缺血性中风研究新进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 145-147.
- [8] 张玲. 丹红注射液对脑缺血保护作用的研究进展[J]. 药品评价, 2019, 16(12): 7-9.
- [9] 祝敬伟,齐继红. 丹红注射液治疗急性脑梗死的效果及对患者神经功能、炎症因子水平的影响[J]. 临床医学, 2020, 40(2): 95-97.
- [10] 朱慧渊,韦克克,张琛,等. 丹参、红花组分配伍对缺血性脑卒中后大鼠神经功能及脑组织病理学影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(2): 12-15.
- [11] 夏颖. 丹参、红花有效组分配伍抗脑缺血再灌注损伤炎症反应作用及其机制的研究[D]. 西安: 陕西中医药大学, 2018.
- [12] 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.
- [13] 林军,李艳芳,李冲,等. 线栓法大鼠 MCAO 模型制作的要点及经验总结[J]. 医学综述, 2018, 24(17): 3398-3402, 3408.
- [14] 张燕欣,梁佳威,万梅绪,等. 注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中的药理作用及机制研究概述[J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1469-1479.
- [15] 王艳华. 半夏白术天麻汤加味辅助治疗缺血性脑卒中风痰瘀阻证 53 例临床观察[J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(4): 49-52.

- [16] THIEL A, CECHETTO D F, HEISS W D, et al. Amyloid burden, neuroinflammation, and links to cognitive decline after ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(9):2825-2829.
- [17] HUANG J, UPADHYAY U M, TAMARGO R J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia [J]. *Surg Neurol*, 2006, 66(3):232-245.
- [18] IADECOLA C, ANRATHER J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(7):796-808.
- [19] 陈孝男, 杨爱琳, 赵亚楠, 等. 缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3):422-432.
- [20] 安祥, 阳昀, 刘开祥, 等. 肢体缺血后处理通过 Nrf2/ARE 通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. *广西医学*, 2017, 39(7):1029-1031, 1034.
- [21] XU X, ZHANG L, YE X, et al. Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion [J]. *Inflamm Res*, 2017, 27(9):1095-1096.
- [22] 高学敏. 中药学[M]. 2版. 北京:中国中医药出版社, 2007:311.
- [23] 吕燕妮, 付龙生, 魏筱华. 丹参与红花配伍机制的系统生物学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(5):220-224.
- [24] 任攀, 周明学, 刘卫红, 等. 丹红注射液治疗心脑血管疾病的药理作用研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(31):6197-6200.
- [25] 李贵华, 姜红岩, 谢雁鸣, 等. 基于大数据 84697 例冠心病中医证候及其中西药使用分析[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(18):3462-3468.
- [26] 姜雪, 史磊. 丹参活性成分及药理作用研究进展[J]. *药学研究*, 2017, 36(3):166-169.
- [27] 吴振华. 中药红花研究进展的概述[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(34):33-34.
- [28] 刘飞, 邓云, 段春寒. 中药红花抗脑缺血损伤作用机制的研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2018, 16(1):151-154.
- [29] 江珊, 俞晓飞. 基于脑出血后小胶质细胞极化及细胞自噬活动探讨中医药干预发挥的抗损伤-促修复双重作用机制的研究进展[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(2):346-352.
- [30] TAYLOR R A, SANSING L H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, doi:10.1155/2013/746068.
- [31] 杜利鹏, 黄卫锋, 冯知涛, 等. Nrf2 在脑缺血再灌注损伤中的作用及机制研究进展[J]. *生理科学进展*, 2019, 50(6):418-422.
- [32] XIA B, LIU H, XIE J, et al. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth via activating the Nrf2/ARE pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5):1426-1432.
- [33] HOU Y H, WANG Y T, Qi H, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 336:32-39.
- [34] 张璐璐. 缺血再灌注大鼠模型中 Nrf2 的表达变化及意义[D]. 新乡:新乡医学院, 2019.
- [35] 宋金军, 周竹晨, 陈冰, 等. 丹参与红花水溶性成分伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤的作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(7):1616-1619.
- [36] 瞿城. 丹参-红花药对配伍效应与物质基础研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.
- [37] 梁启超. 丹参、红花配伍研究评价[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(8):18.

[责任编辑 孙丛丛]