

补阳还五汤对大鼠缺血性脑中风损伤后轴突再生的影响

余爱明, 闫向丽, 郑昊圳, 贺颖颖, 钟倪俊, 王利胜*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探索补阳还五汤促进缺血性脑中风大鼠轴突再生和神经康复的作用。方法:SD大鼠共180只,建立大脑中动脉梗死(MCAO)模型,选取造模成功的大鼠随机分成模型组、补阳还五汤组($12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和尼莫地平组($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设假手术组,每组28只。连续灌胃给药7 d后,断头取脑,通过TTC染色检测脑梗死率,测定脑含水量检测脑水肿程度,改良银染法观察轴突变性,免疫荧光染色观察神经微丝蛋白-200(NF-200)的表达,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测排斥性导向分子a(RGMA),Ras同源酶(Rho),Rho激酶(ROCK)和脑衰反应调节蛋白2(CRMP2)的mRNA表达,并通过改良神经功能评分观察神经功能恢复情况。结果:与假手术组比较,模型组的脑梗死体积和脑含水量显著上升($P<0.01$),神经功能显著下降($P<0.01$),轴突变性和神经纤维损伤严重,轴突生长相关蛋白的mRNA表达异常($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组和尼莫地平组的脑损伤程度明显降低,表现为脑梗死率和脑含水量显著降低($P<0.01$),轴突变性减少;NF-200阳性染色增多;RGMA, Rho和ROCK的mRNA表达明显降低($P<0.05$),CRMP2的mRNA表达显著升高($P<0.01$),神经功能明显提高($P<0.05$)。结论:补阳还五汤可通过调节轴突生长相关蛋白的mRNA表达促进缺血性脑中风损伤后轴突再生,从而改善神经功能。

[关键词] 补阳还五汤;缺血性脑中风;轴突再生;轴突生长相关蛋白;神经康复

[中图分类号] R2-0;R289;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0015-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202141

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200831.1016.001.html>

[网络出版日期] 2020-8-31 11:22

Effect of Buyang Huanwu Tang on Axonal Regeneration of Rats After Ischemic Stroke Injury

YU Ai-ming, YAN Xiang-li, ZHENG Hao-zhen, HE Ying-ying, ZHONG Ni-jun, WANG Li-sheng*

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Buyang Huanwu Tang (BHT) on axonal regeneration and neurological rehabilitation of the rats suffering ischemic stroke (IS). **Method:** A total of 180 SD rats were used to establish a middle cerebral artery infarction (MCAO) model. The animals that were successfully modeled were randomly divided into model group, BHT group ($12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and nimodipine group ($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a sham group was established, with 28 rats in each group. After seven-days intragastric administration of BHT, the animals were sacrificed. TTC staining was used to test cerebral infarction. Brain water content was measured to observe cerebral edema. Bielschowsky's silver staining and immunofluorescence were performed to observe axonal degeneration and the protein expression of neurofilament protein-200 (NF-200). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze the mRNA expression of repulsion oriented molecule a (RGMA), Ras homologous enzyme (Rho), Rho kinase (ROCK), and collapsin response regulatory protein 2 (CRMP2). Neurological function scores assay was used to examine neurological

[收稿日期] 20200430(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873228,81573872);本科高校基础研究重大项目及应用研究重大项目(2017KZDXM018);广州中医药大学“薪火计划”项目(XH20170108);广州中医药大学学科特色培育项目(XKP2019004)

[第一作者] 余爱明,硕士,从事药物制剂新剂型与新技术、中药复方体内过程及其作用机制研究,E-mail:aimingyu126@126.com

[通信作者] *王利胜,博士,教授,从事药物制剂新剂型与新技术、中药复方体内过程及其作用机制研究,E-mail:wlis68@126.com

recovery. **Result:** Compared with sham group, the cerebral infarction volume and brain water content increased significantly ($P<0.01$), and motor function was markedly decreased in the model group. Axonal degeneration and nerve fiber damage were obviously observed. Also, gene expression of axon growth-related protein was deviation from normal ($P<0.01$). Compared with model group, the cerebral infarction rate ($P<0.01$), brain water content ($P<0.01$) and axonal degeneration of BHT group and nimodipine group were significantly reduced. The expression of NF-200 was increased. Also, the mRNA expression of RGMa, Rho and ROCK was lower ($P<0.05$) while the mRNA expression of CRMP2 was higher ($P<0.01$). And the neurological function was significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion:** BHT can promote axon regeneration after ischemic stroke injury by regulating the mRNA expression of axon growth-related protein, thereby improving nerve function.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; ischemic stroke; axonal regeneration; axon growth-related protein; neurological rehabilitation

缺血性脑中风(IS)是一类常见的脑血管疾病,具有高发病率和致残率的特点。在IS发生的几小时后可观察到轴突反应,包括轴突轴浆凝聚、轴突破碎溶解和髓鞘轮廓失常等^[1]。轴突损伤导致神经元之间、皮质和皮质以下的中枢之间信号传递异常,神经细胞间建立的联系中断,所以患者在病情缓和过后多出现肢体、语言和认知功能障碍等中风后遗症^[2-3]。因此,促进IS后神经元轴突的生长,在梗死灶周围建立新的神经网络,有利于神经康复。文献报道,IS后排斥性导向分子a(RGMa)蛋白表达升高,激活Ras同源酶(Rho),进而活化Rho激酶(ROCK)是诱导轴突塌陷的重要抑制因素,抑制这些因子的表达可促进轴突再生^[4-5]。

中医基础理论认为,气血是脑功能的物质基础^[6],气血亏虚是IS的主要证型之一。补阳还五汤出自王清任《医林改错·卷下·痿痹论》,具有补气活血,疏通经脉的功效,临床上已经广泛用于IS的治疗。能恢复患者局部血流,降低全血黏度,改善患者瘫痪、口舌歪斜等异常症状^[7],这依赖于神经功能的恢复,和神经网络的重新建立有关。目前对补阳还五汤发挥抗IS的作用机制主要集中在溶栓^[8]、抗炎^[9]和抗凋亡^[10]等的研究,但补阳还五汤对IS后轴突再生的作用未见相关报道。本研究拟观察补阳还五汤促进IS大鼠轴突再生的作用,探索补阳还五汤是否通过RGMa等信号分子进行调节,以期补阳还五汤发挥促进IS神经康复的作用机制提供补充。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,250~300 g,共180只,购于广州中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2008-0020。饲养于广州中医药大学实验动物中心,使用许可证号SYXK(粤)2018-0001。

动物实验经广州中医药大学伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤由黄芪120 g,赤芍5 g,当归尾6 g,川芎3 g,桃仁3 g,红花3 g,地龙3 g组成^[11],购于康美药业,经广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定为正品。用时经回流提取并浓缩至含饮片 $1.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水提液,参照前期对补阳还五汤指纹图谱的研究^[12],进行质量控制;尼莫地平片由广东华南药业集团有限公司提供,批号180402,使用时用研钵研磨成细粉,用生理盐水配成 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液;红四唑(TTC,天津科密欧化学试剂有限公司,批号12HB4387-2009);多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司,批号20150427);trizol(美国Thermo Fisher公司,批号15596-026);Glodenstar™ RT6 cDNA Synthesis Mix Kit, 2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) Kit(广州擎科生物技术有限公司,批号分别为TSK3145, TSE202);神经微丝蛋白-200(NF-200)一抗(美国Abcam公司,批号ab82259);Alexa Fluor 594 荧光二抗(美国Affinity公司,批号S0005)。

1.3 仪器 TKZ型电热恒温震荡水槽(上海精鸿设备有限公司);DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精鸿仪器设备有限公司);CryoStar NX50 HOVPD型冰冻切片仪,5020型梯度PCR仪,ABI7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher公司);BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司);LSM800型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);JXFSTPRP-CL型组织研磨仪(广州科朋科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠大脑中动脉梗死模型的建立 采用大鼠中动脉梗死模型(MCAO)复制IS模型^[13]。麻醉大鼠后,将大鼠固定在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温电热板上。钝性分离

颈部肌肉,依次暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎颈总动脉和颈外动脉。夹闭颈内动脉,在颈总动脉远心端开一小口,将一条直径为0.26 mm的尼龙丝沿着颈总动脉插入颈内动脉,阻断大脑中动脉血流。缺血2 h后恢复供血,结扎颈内动脉并关闭术野,肌肉注射青霉素预防感染。假手术组仅分离血管,不进行缺血再灌注操作。动物清醒恢复运动后,参考Zea-Longa's标准评分法^[14]对大鼠MCAO模型进行评分:0分,无神经功能缺失;1分,不可以完全伸展右前肢;2分,出现追尾征;3分,行走时向右侧倾倒;4分,丧失意识,不能行走。选取1~3分的大鼠进行后续实验。

2.2 动物分组与给药 造模成功的大鼠随机分为模型组、补阳还五汤组和尼莫地平组,另设假手术组,每组28只。成人每日剂量为140 g,按照成人与大鼠等效剂量换算^[15],大鼠的给药剂量为12 g·kg⁻¹;尼莫地平为20 mg·kg⁻¹,即灌胃给予对应的溶液10 mL·kg⁻¹。其余给予相同剂量的生理盐水,连续给药7 d,取脑组织检测相关指标。

2.3 神经功能评分检测神经功能恢复情况 参照文献^[16]方法,分别于给药后1, 3, 5, 7 d检查大鼠自发活动,四肢运动,前爪伸展能力,攀爬能力,身体触觉反应和触须反应6个指标。最后的分数为6项评价项目的总分,最高18分,最低3分,总分越低表示神经功能损伤越重。

2.4 TTC染色检测脑梗死率 末次给药后,取大鼠大脑置于-20 °C冰箱冰冻30 min,作冠状切片。把脑片放入2% TTC溶液中37 °C水浴30 min。取出后用生理盐水小心洗去TTC,拍照,用Image Pro Plus 6.0图像分析软件测量红、白色区域面积,计算梗死率。脑梗死率=(缺血对侧半球体积-缺血侧非梗死体积)/缺血对侧半球体积×100%。

2.5 烘干法测定脑含水量 末次给药后,迅速断头取脑,作冠状切片,每片约3 mm厚,立刻用电子天平称质量,得到脑湿重。将脑片置于烘烤过的锡箔纸上,在烘箱中102 °C烘干12 h,称质量,得到脑干重。脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.6 改良银染色检测轴突变性情况 给药7 d后,分别用4 °C生理盐水和4%多聚甲醛对大鼠进行心脏灌注,直至大鼠肢体僵直。取脑组织入4%多聚甲醛固定12 h,用蔗糖溶液梯度脱水后制作冰冻切片(10 μm)。冰冻切片放入20% AgNO₃溶液中37 °C水浴30 min,10%甲醛溶液固定后将切片浸润于银氨溶液中30 s,再次固定。蒸馏水洗片1次,随

后进行脱水、透明和封片步骤,于光学显微镜下观察轴突变性情况。

2.7 免疫荧光检测轴突再生情况 冰冻切片入PBS溶液中洗3次,依次用0.3% Triton X-100透膜30 min,10%山羊血清封闭抗原1 h。加入NF-200(1:50)一抗在4 °C冰箱中孵育过夜。隔天加入Alexa Fluor 594荧光二抗(1:50)在37 °C恒温水浴1 h,用抗荧光淬灭剂封片后,在激光共聚焦显微镜下观看荧光强度。

2.8 Real-time PCR检测轴突生长相关蛋白mRNA表达 末次给药后处死大鼠,迅速取脑,用trizol裂解液提取梗死侧脑组织的总RNA。RNA用无酶水溶解后,用微量紫外分光光度计测定其纯度和浓度, RNA纯度范围1.8~2.1。参考说明书方法, RNA在42 °C, 2 min; 60 °C, 5 min; 50 °C, 15 min; 80 °C, 5 min的程序下逆转录成cDNA,在95 °C, 5 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 32 s程序下扩增40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法计算目的mRNA的表达,以β-肌动蛋白(β-actin)作为内参, RGMa, Rho, ROCK2及脑衰反应调节蛋白2(CRMP2)mRNA引物由广州粤穗生物科技有限公司提供,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

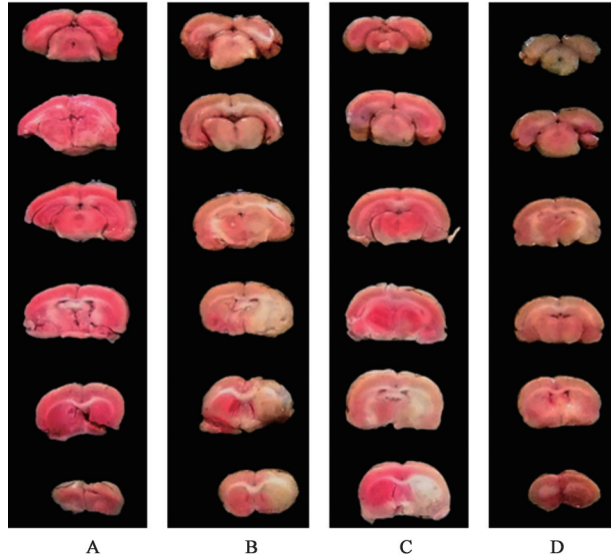
引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 AGGGAAATCGTGCGTGACAT	150
	下游 GAACCGCTCATTGCCGATAG	
RGMa	上游 TCCAGACATGTAAGGTGCAA	160
	下游 ACTTTCTGGTCCACACACTCT	
Rho	上游 TATTGAAGTGGACGGGAAGCA	140
	下游 AACTATCAGGGCTGTCGATGGA	
ROCK2	上游 GCTCAAGACATGCTCAATCA	178
	下游 ACATGGCAACAGACTTTGC	
CRMP2	上游 ACCAACGCGACCCAAAGTCTT	130
	下游 GAGCACTGTTGTGCGTCTTG	

2.9 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件分析实验结果,计量资料经过正态性和方差齐性检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料进行单因素方差分析,两组计量资料采用t检验, P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑梗死和脑水肿的影响 正常脑组织中的脱氢酶与TTC反应呈现红色,而梗死区脱氢酶活性下降,不能与之反应而成白色。与假手术组比较,

模型组出现明显的白色梗死区域,脑梗死率和脑含水量显著上升($P<0.01$);补阳还五汤干预后,与模型组比较,白色区域减少,梗死率和脑含水量显著降低($P<0.01$),表明补阳还五汤可减少脑梗死和脑水肿程度,帮助脑部恢复供血。见图1,表2。



A.假手术组;B.模型组;C.补阳还五汤组;D.尼莫地平组(图2~3同)
图1 补阳还五汤对大鼠脑梗死的影响

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwu Tang (BHT) on cerebral infarction of rats

表2 补阳还五汤对大鼠脑梗死率和脑水肿的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Effect of BHT on cerebral infarction rate and brain water content of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	脑梗死率	脑含水量
假手术	-	0	75.21 \pm 1.05
模型	-	23.12 \pm 1.58 ¹⁾	83.71 \pm 1.43 ¹⁾
补阳还五汤	12	8.49 \pm 2.70 ²⁾	79.32 \pm 1.02 ²⁾
尼莫地平	2 \times 10 ⁻²	8.02 \pm 2.78 ²⁾	78.62 \pm 0.08 ²⁾

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

3.2 对大鼠轴突再生的影响 假手术组的大鼠大脑神经纤维被染成深褐色,呈丝状,有规律地排列;模型组出现大量轴突回缩球和轴突肿胀,神经纤维断裂。与模型组比较,补阳还五汤组中轴突回缩球和轴突肿胀减少,神经纤维增长,说明轴突变性程度减轻,见图2。在假手术组的脑组织切片中可明显看到NF-200蛋白表达,在模型组中仅观察到少量荧光。与模型组比较,补阳还五汤干预后,NF-200阳性染色加深,表达增多,说明补阳还五汤干预后可促进缺血性脑中中风后轴突再生,见图3。

3.3 对大鼠神经功能恢复的影响 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能明显受损($P<0.01$);与模型

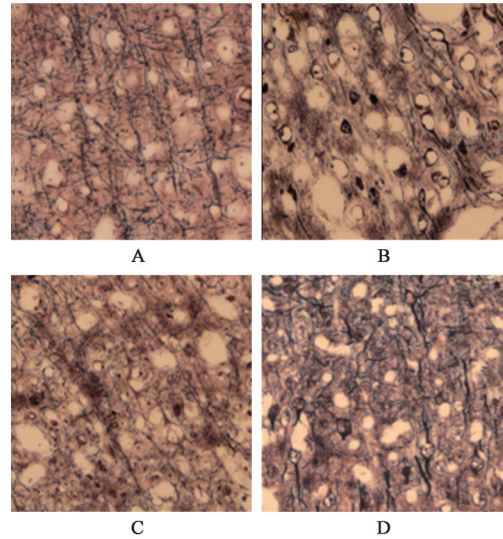


图2 补阳还五汤对大鼠轴突变性的影响(改良银染色, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of BHT on axonal degeneration of rats (bielschowsky's silver staining, $\times 400$)

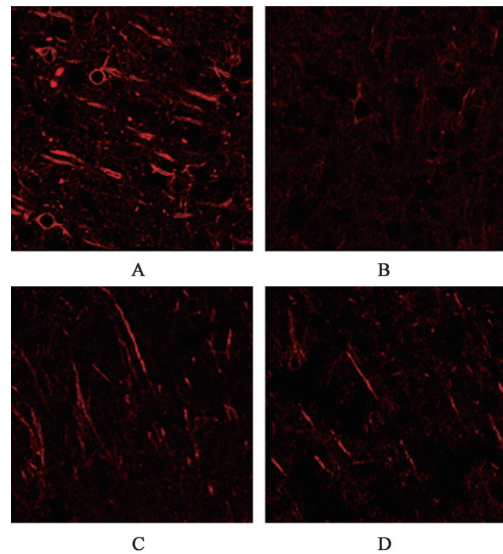


图3 补阳还五汤对大鼠轴突再生的影响(免疫荧光, $\times 600$)

Fig. 3 Effect of BHT on axonal regeneration of rats (IF, $\times 600$)

组比较,补阳还五汤组大鼠的神经功能在给药第1天没有改善,给药干预第5天和第7天,补阳还五汤组的大鼠在四肢运动,前爪伸展能力,攀爬能力,身体触觉反应,以及触须反应等方面的神经功能均有恢复($P<0.05$),说明补阳还五汤可促进IS损伤后神经功能康复。见表3。

3.4 对大鼠轴突生长相关蛋白mRNA表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠轴突生长相关蛋白RGMa和ROCK的mRNA表达均显著升高($P<0.01$),CRMP2的mRNA表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤可显著降低梗死脑组织中RGMa, Rho和ROCK的mRNA表达量,差异具有统

表3 补阳还五汤对大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of BHT on motor function score of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第3天	第5天	第7天
假手术	-	17.50±0.76	17.33±0.75	17.50±0.76	17.67±0.47
模型	-	9.00±1.24 ¹⁾	8.33±0.94 ¹⁾	8.67±1.49 ¹⁾	9.67±2.29 ¹⁾
补阳还五汤	12	9.50±2.06	10.67±2.43	12.33±2.43 ²⁾	15.17±1.46 ²⁾
尼莫地平	2×10 ⁻²	8.17±1.07	9.17±1.46	11.17±2.54 ²⁾	11.83±1.57 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05。

统计学意义(P<0.05, P<0.01),并显著提高CRMP2的mRNA表达(P<0.01),提示补阳还五汤可通过调节

轴突生长相关蛋白的mRNA表达,促进轴突再生。见表4。

表4 补阳还五汤对大鼠轴突生长相关蛋白mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of BHT on mRNA level of axon growth-associated protein of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RGMa	Rho	ROCK	CRMP2
模型	-	1.79±0.19 ²⁾	0.79±0.07 ¹⁾	3.71±0.70 ²⁾	0.22±0.06 ²⁾
补阳还五汤	12	0.22±0.05 ³⁾	0.38±0.06 ³⁾	1.89±0.22 ³⁾	1.00±0.06 ³⁾
尼莫地平	2×10 ⁻²	0.20±0.06 ³⁾	0.29±0.07 ³⁾	0.78±0.13 ³⁾	1.81±0.20 ³⁾

注:设假手术组各mRNA表达量均为1;与假手术组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.01。

4 讨论

中医理论认为,IS发病多因脏腑机能衰退,气虚血瘀导致脑髓失养,针对此,治疗上主张益气活血。补阳还五汤为“益气活血”的代表方剂,方中重用黄芪大补元气,使气旺血行,为君药。当归尾活血而不伤血,为臣药。赤芍、川芎、红花、桃仁协同当归尾活血祛瘀,地龙通经活络,同为佐药,共奏益气行血,活血通络之功。药理研究表明,补阳还五汤能够降低MCAO大鼠全血高黏状态,抑制血小板聚集和黏附,从而产生抗血栓作用^[17]。围绕梗死灶周围的缺血半暗带,若能及时进行保护,可挽回这一部分组织,防止梗死范围进一步扩大。本研究结果显示,补阳还五汤可改善脑梗死和脑水肿,推测可能与疏通血管,及时恢复缺血半暗带血流有关。

神经元维持正常的生理功能有赖于轴突成分在胞内双向运输形成轴浆流提供营养物质^[18]。轴浆流的运输是耗能的过程,脑缺血时脑组织能量供应不足必然导致轴浆流减缓或停止,中断维持轴突再生的营养物质供应,阻碍了轴突再生^[19]。NF-200是构成轴突中间丝的骨架蛋白,其功能是使神经纤维易于伸展和防止断裂,被认为是轴突的标志物^[20]。本实验显示补阳还五汤可提高NF-200表达,减少轴突回缩球和轴突水肿,提示其可以增加轴突的数量和长度,帮助神经元间恢复联系,最终促进神经功能的恢复。也提示补阳还五汤可能通过增加局部血流促进轴突的生长,这有待在后续实验中

进一步探讨。

RGMa是一种强烈的轴突再生抑制因子,与受体蛋白结合可最终诱导轴突生长锥塌陷^[21]。研究表明,脑缺血损伤后抑制RGMa表达,一方面可以抑制生长堆塌陷,另一方面可刺激神经再生^[22]。Rho可在RGMa的诱导下活化,随后激活ROCK,诱导神经回缩,导致不可逆损伤^[23]。而CRMP2高表达可诱导微管组装和轴突伸长^[24]。本研究结果表明补阳还五汤作用于IS大鼠,可降低RGMa,Rho和ROCK的mRNA表达,提高CRMP2的mRNA表达,进一步说明其可调节轴突生长相关蛋白,促进神经元轴突生长。

综上所述,本实验结果初步证明补阳还五汤可通过调节轴突生长相关蛋白促进IS损伤后轴突再生,帮助神经功能恢复,为补阳还五汤发挥抗缺血性脑中风的作用机制提供新的实验补充。

[参考文献]

- [1] TRICAUD N, PARK H T. Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(22):4049-4057.
- [2] CHEN X, LIN S, GU L, et al. Inhibition of miR-497 improves functional outcome after ischemic stroke by enhancing neuronal autophagy in young and aged rats[J]. Neurochem Int, 2019, 127:64-72.
- [3] 郭启云,郭沐洁,张林,等. 脑卒中患者自我效能与跌倒效能的相关性分析[J]. 中华行为医学与脑科学杂

- 志, 2016, 25(4):347-349.
- [4] 陆跃, 赵晖, 姚晓泉, 等. 侯氏黑散中风药、补虚药对脑缺血大鼠轴突生长抑制信号通路Nogo-A/NgR与RhoA/Rock2的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(12):1017-1021.
- [5] MONNIER P P, ANA S, PAOLO M, et al. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons [J]. *Nature*, 2002, 419(6905):392-395.
- [6] 周少峰, 施润瑾, 高嘉骏. 浅谈补液充髓养脑对神志活动的作用[J]. 福建中医药, 2019, 50(3):47-48.
- [7] 郑武. 补阳还五汤治疗中风后遗症气虚血瘀证临床研究[J]. 中医学报, 2017, 32(12):2452-2455.
- [8] 齐英娜, 谭明生, 王延雷, 等. 补阳还五汤对大鼠急性上颈脊髓损伤后血小板活化因子的影响[J]. 中国骨伤, 2018, 31(2):170-174.
- [9] DOU B K, ZhOU W J, LI S C, et al. Buyang Huanwu Tang attenuates infiltration of natural killer cells and protects against ischemic brain injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4):1286-1300.
- [10] ZHENG X W, SHAN C S, XU Q Q, et al. Buyang Huanwu Tang targets SIRT1N/VEGF pathway to promote angiogenesis after cerebral Ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:1-10.
- [11] 李翼. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:197-198.
- [12] LIAO F, MENG Y, ZHENG H, et al. Biospecific isolation and characterization of angiogenesis-promoting ingredients in Buyang Huanwu Tang using affinity chromatography on rat brain microvascular endothelial cells combined with solid-phase extraction, and HPLC-MS/MS[J]. *Talanta*, 2018, 179:490-500.
- [13] 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.
- [14] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [15] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001:202-203.
- [16] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: Statistical validation [J]. *Stroke*, 1995, 26 (4) : 627-635.
- [17] 卞敬琦, 牛雯颖, 冯月男, 等. 补阳还五汤对气虚血瘀模型血小板活化影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(2):43-46.
- [18] WORTMAN J C, SHRESTHA U M, BARRY D M, et al. Axonal transport: how high microtubule density can compensate for boundary effects in small-caliber axons [J]. *Biophys J*, 2014, 106(4):813-823.
- [19] DATTA A, AKATSU H, HEESE K, et al. Quantitative clinical proteomic study of autopsied human infarcted brain specimens to elucidate the deregulated pathways in ischemic stroke pathology[J]. *J Proteomics*, 2013, 91(556):556-568.
- [20] DURKEU L S, HOSSAINI M, SCHUTTENHELM B N, et al. Re-innervation patterns by peptidergic substance-P, non-peptidergic P2X3, and myelinated NF-200 nerve fibers in epidermis and dermis of rats with neuropathic pain[J]. *Exp Neurol*, 2013, 241(1) : 13-24.
- [21] EIJI M, HARUKAZU N, ALAIN C. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance[J]. *J Neurosci Nurs*, 2006, 26(22):6082-6088.
- [22] COLLEEN M, THOPSON K M, KENNEDY T E. Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: predominance of UNC-5 homologues in adulthood[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77 (5):690-700.
- [23] HIRAGA A, KUWABARA S, DOYA H, et al. Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury[J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2010, 11(3):217-224.
- [24] NIWA S, NAKAMURA F, TOMABECHIY, et al. Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) :10681-10698.

[责任编辑 孙丛丛]