

# 基于 PI3K/Akt/eNOS 信号通路探讨补阳还五汤对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响

王茹, 张磊, 李卫萍, 申艳方, 杜菊梅\*  
(陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000)

**[摘要]** **目的:**探讨补阳还五汤改善蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的相关分子机制。**方法:**将雄性 SD 大鼠 80 只随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤低、高剂量组(13, 26 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 每组 20 只。按照 10 mL·kg<sup>-1</sup> 每天灌胃给药 2 次, 连续 7 d。采用二次枕大池注血法制作蛛网膜下腔出血模型, 评估各组大鼠 1, 3, 5, 7 d 的神经功能评分, 利用苏木素-伊红(HE)染色对各组大鼠基底动脉直径进行测量, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测基底动脉脑组织磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K), 磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt), 内皮型一氧化氮合酶(eNOS), 神经型一氧化氮合酶(nNOS)蛋白的表达; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠脑脊液中一氧化氮(NO), 内皮素-1(ET-1)的表达。**结果:**与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分明显下降( $P < 0.05$ ), 基底动脉直径明显缩小( $P < 0.05$ ), 基底动脉脑组织 p-PI3K, p-Akt, eNOS, nNOS 蛋白的表达明显降低( $P < 0.05$ ), 脑脊液中 NO 明显减少( $P < 0.05$ ), ET-1 明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 不同剂量补阳还五汤组(26, 13 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)在治疗后 3~5 d 后大鼠神经功能评分均有不同程度升高, 基底动脉直径明显增宽( $P < 0.05$ ), p-PI3K, p-Akt, eNOS 蛋白的表达明显升高( $P < 0.05$ ), NO 明显升高( $P < 0.05$ ), ET-1 明显下降( $P < 0.05$ ); 与低剂量组比较, 经过 7 d 的补阳还五汤治疗后高剂量组神经功能评分明显升高( $P < 0.05$ ), 基底动脉直径增宽更明显( $P < 0.05$ ), p-PI3K, p-Akt, eNOS 蛋白的表达更高( $P < 0.05$ ), NO 升高更明显( $P < 0.05$ ), ET-1 下降更明显( $P < 0.05$ )。**结论:**补阳还五汤对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的保护作用可能与上调 PI3K/Akt/eNOS 信号通路中的 p-PI3K, p-Akt, eNOS 的表达, 从而增加 NO 产生有关。

**[关键词]** 补阳还五汤; 蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 内皮型一氧化氮合酶  
**[中图分类号]** R289; R743; R973 + .6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0022-06  
**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191136  
**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190218.1659.019.html>  
**[网络出版时间]** 2019-02-19 10:14

## Effect of Buyang Huanwu Tang on Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage in Rats Based on PI3K/Akt/eNOS Signaling Pathway

WANG Ru, ZHANG Lei, LI Wei-pin, SHEN Yan-fang, DU Ju-mei\*  
(The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism of Buyang Huanwu Tang in improving cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **Method:** Eighty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, Buyang Huanwu Tang low and high dose (13, 26 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) group. According to 10 mL·kg<sup>-1</sup>, the drug was administered twice a day for 7 days. The subarachnoid hemorrhage model was made by double occipital pool injection method. The neurological function scores of rats in each group were evaluated at 1, 3, 5 and 7 days. The diameter of basilar artery was measured by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of phospho-phosphoinositide 3-kinases (p-PI3K), phospho-protein kinase B (p-Akt),

**[收稿日期]** 20181220(008)

**[基金项目]** 陕西省中医药管理局目标课题项目(JCMS044)

**[第一作者]** 王茹, 在读硕士, 从事中医药防治脑血管病的研究, E-mail: 18700827511@163.com

**[通信作者]** \* 杜菊梅, 主任医师, 从事中医药防治脑血管病的研究, E-mail: 15091806663@126.com

endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) protein in basilar artery brain tissue were detected by Western blot. The expression of nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) in rat cerebrospinal fluid was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with sham operation group, the neurological function scores of the model group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the diameter of the basilar artery was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and The expression of p-PI3K, p-Akt, eNOS, nNOS proteins of the basilar artery brain tissue were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The level of NO in the cerebrospinal fluid was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the ET-1 was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the different doses in Buyang Huanwu Tang group ( $26, 13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) increased the neurological function scores 3 to 5 days after treatment, and the basilar artery diameter was significant increased ( $P < 0.05$ ). The expression of p-PI3K, p-Akt and eNOS protein was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The level of NO was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and ET-1 was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with low-dose group, the neurological scores of high-dose group were significantly increased after 7 days of treatment with Buyang Huanwu Tang ( $P < 0.05$ ), and the diameter of the basilar artery was significantly increased ( $P < 0.05$ ), p-PI3K, The expression of p-Akt and eNOS protein was higher ( $P < 0.05$ ), the increase of NO was more obvious ( $P < 0.05$ ), the decrease of ET-1 was more significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The protective effect of Buyang Huanwu Tang on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage may be related to up-regulation of p-PI3K, p-Akt and eNOS expression in PI3K/Akt/eNOS signaling pathway, thereby increasing NO production.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; phosphoinositide 3-kinases; protein kinase B; endothelial nitric oxide synthase

脑血管病是引起当今社会死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。蛛网膜下腔出血(SAH)后炎症,氧化应激,脑损伤和其他刺激引起的脑血管痉挛是导致卒中复发的重要因素<sup>[2]</sup>。SAH后脑血管痉挛的发病机制不仅包括炎症、氧自由基反应,血管收缩剂和血管舒张物质之间的失衡,还包括神经调节血管张力的变化,这也可能成为预测脑血管痉挛患者的主要检测指标<sup>[3]</sup>。目前脑血管痉挛的治疗方法主要有3H疗法(即给予“高血压、高容量、高稀释度”治疗),钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )通道阻滞剂,脑脊液引流,脑室穿刺引流和增加NO的利用度等<sup>[4]</sup>。但值得注意的是,这些治疗均存在不同程度诱发各种并发症及副作用的风险,且大部分治疗方法疗效尚不确切。

补阳还五汤出自清·王清任《医林改错》,是治疗中风之气虚血瘀证的经典方剂<sup>[5]</sup>。补阳还五汤广泛应用于中风,并作用于整个神经血管单元,是一种多靶点的神经保护方药,可作用于血管内皮细胞并调节脑血流量等,且具有较好的临床疗效<sup>[6]</sup>。补阳还五汤常用于缺血性中风的治疗及神经系统的保护,可促进周围神经再生,神经功能恢复的改善,减少梗塞体积以及受损血管和病变组织的修复,且具有良好的临床疗效及安全性<sup>[7]</sup>。然而,对于出血性中风患者,补阳还五汤的治疗仍然缺乏可靠的科学证据。现代中医认为,活血化瘀和祛风化痰治法对

SAH后脑血管痉挛可能产生积极影响,并且能明显缓解患者脑血管痉挛和再出血症状<sup>[8]</sup>。脑脊液置换联合补阳还五汤的中西医结合方法治疗SAH可明显降低脑血管痉挛的发生率,但其缓解脑血管痉挛的作用机制尚不明确<sup>[9]</sup>。因此,本实验重点探讨了补阳还五汤对SAH模型大鼠引起的脑血管痉挛的保护作用,并对该机制进行了进一步的研究,以期为临床治疗脑血管痉挛提供实验及理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠80只,体质量280~320g,由西安交通大学动物实验中心提供,合格证号SCXK(陕)2012-0003。动物实验设施由陕西中医药大学实验中心提供,本实验由陕西中医药大学动物管理和伦理委员批准,并严格按照国际实验动物福利和动物伦理学要求进行。

**1.2 药材** 补阳还五汤组方为黄芪片120g,当归6g,赤芍4.5g(中国陕西兴盛德药业有限公司,批号分别为20161101,20170501,20170401),川芎4.5g,西红花、桃仁和地龙各3g(中国陕西铎耀中药饮片有限公司,批号分别为20170201,20170301,20170501,20170401)。药材经陕西中医药大学第二附属医院药剂科辛玲歌主任药师鉴定均为正品。通过水煎醇沉法制备,先将药材现磨成细粉,加8倍蒸馏水回流提取2次,混合2次滤液,浓缩加乙醇至体

积分数至 80% 醇沉, 搅拌至沉淀生成, 得质量浓度为  $5.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的补阳还五汤浸膏备用,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。

**1.3 试剂** 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司, 批号 G1120); 兔抗磷酸化磷酸肌醇 3 激酶抗体(p-PI3K, 美国 Affinity 公司, 批号 AF3241); 兔抗磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt) 抗体, 兔抗内皮型一氧化氮合酶(eNOS), 辣根过氧化物酶(HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(武汉 Servicebio 公司, 批号分别为 AF0908, GB11086, GB23303, GB23301); 鼠抗神经型一氧化氮合酶(nNOS) 抗体(美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-5302);  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin), BCA 蛋白定量检测试剂盒, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物有限公司, 批号分别为 GB13001-1, G2026, G2003); 一氧化氮(NO) 酶联免疫吸附测定(ELISA) 试剂盒(南京建成生物工程有限公司, 批号 A013-2); 内皮素(ET-1) ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 批号 E-EL-R067c)。

**1.4 仪器** 80i 型普通光学显微镜(日本 Nikon 公司); TGL-16c 型台式离心机(中国上海安亭科技仪器有限公司); POLARstar OPTIMA 型酶标仪(德国 BMG 公司); RM2016 型病理切片机(中国上海徕卡仪器有限公司); VE-180 型电泳及转膜装置(上海天能科技有限公司); V300 型扫描仪(日本 Epson 公司); KZ-11 型匀浆仪(中国康涛科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模、分组及给药** 选用  $280 \sim 320 \text{ g}$  SD 雄性大鼠 80 只, 无菌洁净环境下适应性饲养 7 d, 自由摄取饲料和水。随机分为 4 组, 每组 20 只大鼠。采用改良二次枕大池注血法进行 SAH 大鼠模型的制备<sup>[10]</sup>: 用 10% 的水合氯醛对大鼠行腹腔注射( $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 取仰卧位, 行尾部消毒, 钝性分离大鼠尾动脉, 从尾动脉抽取动脉血  $0.3 \text{ mL}$  备用, 改俯卧位后钝性分离枕部肌肉暴露枕骨, 用  $1 \text{ mL}$  注射器穿刺入枕大池, 在 2 min 内将  $0.3 \text{ mL}$  的动脉血注入枕大池, 并缝合伤口。48 h 后同法取尾动脉血  $0.3 \text{ mL}$  注入枕大池, 制成大鼠 SAH 动物模型。假手术组注入等量生理盐水。手术后共死亡 15 只大鼠。制备模型后神经功能评分低于假手术组且有统计学差异, 则证明造模成功<sup>[11]</sup>。补阳还五汤组在模型成功后第 2 天, 经连续灌胃给药 7 d, 每日早晚各给药 1 次。根据每  $1 \text{ kg}$  体质量占有体表面积相对比值换算公式<sup>[12]</sup>, 补阳还五汤低剂量组( $13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )按

人和大鼠间体表面积折算的等效剂量给药, 补阳还五汤高剂量组( $26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )按 2 倍剂量给药<sup>[13]</sup>。

**2.2 大鼠神经功能评分** 采用双盲法及 Garcia 神经功能评分标准<sup>[14]</sup>对各组大鼠 1, 3, 5, 7 d 进行神经功能行为学评分, 分别从以下 6 个方面评定大鼠神经功能损伤程度, 最终得分为 6 项分数的总和。自主运动(将大鼠放入笼中观察 5 min), 0 分, 完全没动; 1 分, 仅移动一点位置; 2 分, 未接近所有侧面, 但至少接近一个侧面; 3 分, 四处走动, 至少触及。体态的对称性(提起尾部是指悬空, 观察四肢状态), 0 分, 四肢完全没动; 1 分, 四肢仅有轻微运动; 2 分, 四肢运动迟缓或肢体无力; 3 分, 四肢全部对称伸展。前肢伸展运动(悬尾使后肢悬空, 使之仅靠前肢行走), 0 分, 前肢完全没有动; 1 分, 前肢轻微伸展; 2 分, 前肢伸出不对称, 或伸展较差; 3 分, 两侧前肢都伸出, 大鼠对称地使用前肢行走。网屏实验, 1 分, 大鼠未能攀爬或趋于转圈而不是攀爬笼子; 2 分, 大鼠对刺激反应迟钝, 攀爬时受损或无力; 3 分, 大鼠很容易爬行, 并能紧紧抓住笼子。两侧身体触觉反射, 1 分, 大鼠对刺激无反应; 2 分, 大鼠对刺激反应迟钝; 3 分, 大鼠反应转头, 两侧刺激对称。两侧胡须触觉反射, 1 分, 大鼠对刺激无反应; 2 分, 大鼠双侧刺激反应迟缓; 3 分, 大鼠有转头反应, 两侧刺激对称。

**2.3 HE 染色检测大鼠基底动脉直径** 每组取 5 只大鼠, 神经功能评分后取材, 将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 打开胸腔, 剪开大鼠心脏部位右心耳, 由左心室灌入  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  生理盐水约  $250 \text{ mL}$ , 待左心耳流出清亮的液体时换用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液(pH 7.4)约  $250 \text{ mL}$  灌注后取脑组织, 将基底部位脑组织制作石蜡切片, 行 HE 染色前先脱蜡, 再将切片放入苏木精中染色 15 min, 用自来水冲洗至切片颜色变蓝。将切片放入分化液中 30 s, 自来水浸泡 15 min 后, 置于伊红染液 1 min, 自来水冲洗。脱水并透明, 最后中性树胶封固, 显微镜下观察基底动脉血管, 于 Image J 7.0 软件行基底动脉直径测量, 并行统计学分析。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测基底动脉血管组织 p-PI3K, p-Akt, eNOS, nNOS 蛋白的表达** 每组取 5 只大鼠, 取新鲜的大鼠基底动脉处脑组织, 按照组织  $60 \text{ mg}$  加入组织匀浆液  $200 \text{ } \mu\text{L}$  的比例混合组织, 充分匀浆后在冰浴放置 15 min。  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min。取上清用 BCA 法测蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 电泳, 配制 8% 分离胶,

5% 的浓缩胶。将样品加入电泳孔中,进行电泳。浓缩胶电压 75 V,分离胶用 120 V。转膜条件(湿转),采用 200 mA 转膜 1 h。5% 的脱脂牛奶封闭 1 h。加入一抗 p-PI3K(1:1 000), p-Akt(1:1 000), eNOS(1:1 000), nNOS(1:200),  $\beta$ -actin(1:3 000), 4 ℃ 孵育过夜。次日用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次,每次 5 min,加入对应的二抗 HRP 标记山羊抗兔,HRP 标记山羊抗小鼠,用 TBST 稀释 3 000 倍,室温下孵育 30 min 后,同上洗涤 3 次。最后用显影、定影试剂进行显影和定影,将胶片进行扫描存档,Alpha 软件处理系统分析目标带的灰度值。

**2.5 ELISA 检测大鼠脑脊液中 NO, ET-1 的表达水平** 每组取 5 只大鼠,将各组大鼠脑脊液分装于 0.5 mL 离心管中备用,20 × 洗涤稀释液稀释备用。NO 和 ET-1 水平的检测步骤严格按照 ELISA 试剂

盒说明书进行。酶标仪在 450 nm 波长测各孔的吸光度 A,绘制标准曲线,计算样本浓度。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 23.0 及 Graph Pad Prism 7.0 软件进行统计学处理,所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。方差分析采用 One-way ANOVA 方法,先进行方差齐性检验,若齐行 LSD 检验,若不齐行 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 补阳还五汤对 SAH 大鼠神经功能评分的影响** 造模后,与假手术组比较,模型组大鼠 1, 3, 5, 7 d 神经功能评分均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤低、高剂量组经过 3 ~ 5 d 的治疗后神经功能均明显改善( $P < 0.05$ );与补阳还五汤低剂量组比较,补阳还五汤高剂量组经过 7 d 的治疗后神经功能评分明显升高( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 补阳还五汤对 SAH 大鼠神经功能评分的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang on neurological function score in SAH rats( $\bar{x} \pm s$ )

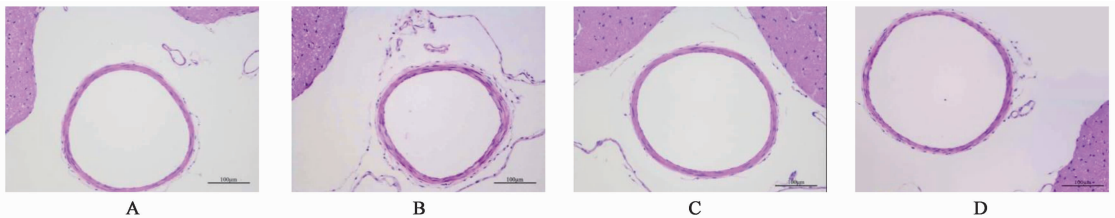
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	1 d	3 d	5 d	7 d
假手术	-	19	14.842 ± 1.014	15.684 ± 0.945	16.631 ± 0.830	17.368 ± 0.683
模型	-	15	10.266 ± 1.099 <sup>1)</sup>	11.533 ± 1.125 <sup>1)</sup>	13.000 ± 0.654 <sup>1)</sup>	13.800 ± 0.774 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	13	15	10.466 ± 0.990	13.066 ± 0.703 <sup>2)</sup>	15.733 ± 0.798 <sup>2)</sup>	16.006 ± 0.593 <sup>2)</sup>
	26	16	10.312 ± 1.138	13.187 ± 0.834 <sup>2)</sup>	15.338 ± 1.554 <sup>2)</sup>	16.625 ± 0.619 <sup>2,3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与补阳还五汤低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (表 2 ~ 4 同)。

**3.2 补阳还五汤对 SAH 大鼠基底动脉直径的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠基底动脉直径明显狭窄( $P < 0.05$ );与模型组比较,经过 7 d 的补阳还五汤治疗后,补阳还五汤低、高剂量组基底动脉直径

均明显增加( $P < 0.05$ ),且补阳还五汤高剂量组较补阳还五汤低剂量组直径增加更明显( $P < 0.05$ )。见图 1,表 2。

**3.3 补阳还五汤对 SAH 大鼠 p-PI3K, p-Akt, eNOS**



A. 假手术组; B. 模型组; C. 补阳还五汤低剂量组; D. 补阳还五汤高剂量组(图 2 同)

图 1 补阳还五汤对 SAH 大鼠基底动脉直径的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of Buyang Huanwu Tang on basilar artery diameter in SAH Rats(HE, ×200)

表 2 补阳还五汤对 SAH 大鼠基底动脉直径的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on basilar artery diameter in SAH Rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	直径/μm
假手术	-	291.394 ± 6.367
模型	-	273.548 ± 4.333 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	13	303.336 ± 4.376 <sup>2)</sup>
	26	317.306 ± 7.725 <sup>3)</sup>

蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 p-PI3K, p-Akt, eNOS 蛋白表达均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,经过 7 d 的补阳还五汤治疗后,补阳还五汤低、高剂量组 p-PI3K, p-Akt, eNOS 蛋白表达均明显升高( $P < 0.05$ );与补阳还五汤低剂量组比较,补阳还五汤高剂量组大鼠 p-PI3K, p-Akt, eNOS 蛋白表达较高( $P < 0.05$ )。见图 2,表 3。

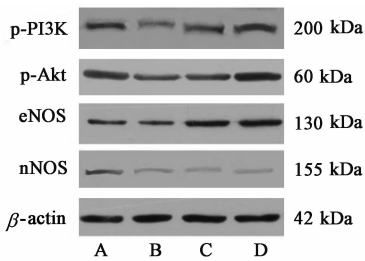


图 2 各组 p-PI3K, p-Akt, eNOS, nNOS 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of p-PI3K, p-Akt, eNOS and nNOS proteins in each group

表 3 补阳还五汤对 SAH 大鼠 p-PI3K, p-Akt, eNOS 和 nNOS 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on expression of p-PI3K, p-Akt, eNOS and nNOS protein in SAH Rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-PI3K/β-actin	p-Akt/β-actin	eNOS/β-actin	nNOS/β-actin
假手术	-	0.608 ± 0.019	0.536 ± 0.024	0.474 ± 0.016	0.035 ± 0.008
模型	-	0.340 ± 0.062 <sup>1)</sup>	0.380 ± 0.043 <sup>1)</sup>	0.382 ± 0.019 <sup>1)</sup>	0.207 ± 0.009 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	13	0.453 ± 0.006 <sup>2)</sup>	0.506 ± 0.027 <sup>2)</sup>	0.788 ± 0.311 <sup>2)</sup>	0.201 ± 0.006 <sup>2)</sup>
	26	0.626 ± 0.005 <sup>2,3)</sup>	0.752 ± 0.038 <sup>2,3)</sup>	0.817 ± 0.013 <sup>2,3)</sup>	0.241 ± 0.065 <sup>2)</sup>

表 4 补阳还五汤对 SAH 大鼠脑脊液中 NO, ET-1 的水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on levels of NO and ET-1 in cerebrospinal fluid of SAH rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NO/mol·L <sup>-1</sup>	ET-1/ng·L <sup>-1</sup>
假手术	-	27.854 ± 0.969	11.776 ± 0.422
模型	-	20.324 ± 1.128 <sup>1)</sup>	19.332 ± 0.492 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	13	25.534 ± 1.214 <sup>2)</sup>	14.516 ± 0.510 <sup>2)</sup>
	26	29.892 ± 0.817 <sup>2,3)</sup>	10.762 ± 0.491 <sup>2,3)</sup>

死亡率的关键之一,目前临床尚无防治蛛 SAH 后脑血管痉挛的安全、有效的确切治疗方法。中医药因其独特的理、法、方、药和临床实效,在心脑血管疾病防治方面具有独特优势,通过多环节、多靶点的整体调节作用,可在保证确切的临床疗效的同时减少不良反应的发生,因此积极探索传统中医药的潜在治疗作用,有望发掘出防治 SAH 发生后脑血管痉挛的安全、有效的治疗方法。

本研究结果表明灌胃给予 SAH 大鼠补阳还五汤 26, 13 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>对 SAH 后脑血管痉挛有保护作用,可以有效改善大鼠神经功能评分,并与前期研究结果相一致<sup>[13]</sup>。参与脑血流调节的 NO 主要由 eNOS 和 nNOS 催化的 L-精氨酸胺末端的氮原子和氧分子产生<sup>[15]</sup>。NO 是一种气态自由基,通过调节环磷酸鸟苷(cGMP)依赖性或非依赖性的病理机制调节其他血管活性物质,如抑制 ET-1 的释放使平滑肌舒

3.4 补阳还五汤对 SAH 大鼠脑脊液中 NO, ET-1 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑脊液中的 NO 水平明显降低( $P < 0.05$ ), ET-1 含量明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,经过 7 d 的补阳还五汤治疗后,补阳还五汤低、高剂量组 NO 水平均明显上升( $P < 0.05$ ), ET-1 含量均明显降低( $P < 0.05$ )。见表 4。

#### 4 讨论

预防迟发性脑血管痉挛是降低 SAH 致残率和

张<sup>[16]</sup>,在 SAH 发生后脑血管痉挛中 NO 和 ET-1 调控血管舒缩中起重要作用<sup>[17]</sup>。SAH 后蛛网膜下腔中的血凝块分解并释放诱导炎症和应激反应的产物,减少了血管壁中 NO 的合成,导致 NO 依赖性血管舒张成分的减少。这种调节导致血管壁的病理性收缩并发生脑血管痉挛。因此,增加 eNOS 催化活性和基因表达已成为预防和控制脑血管痉挛的重要途径<sup>[18]</sup>。PI3K/Akt 是一种重要的上游分子,可调节 eNOS 的活性和表达,PI3K 将无活性的细胞质 Akt 转移至质膜,并激活 Akt 使其与质膜上的钙调节蛋白(CaM)结合的 eNOS Thr49 残基去磷酸化,从而激活 eNOS<sup>[19]</sup>。补阳还五汤之前的研究即显示其可激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 p-Akt 的表达,从而减少急性脑缺血再灌注大鼠的脑损伤<sup>[20]</sup>;也有研究表明,补阳还五汤通过激活 PI3K/Akt 信号激活血小板生成素受体-2,从而促进脑出血大鼠模型中颅内新生血管的形成<sup>[21]</sup>。

脑动脉瘤破裂伴随血管痉挛的 SAH 的治疗仍然令人失望。SAH 后血管痉挛患者住院费用较高,住院时间较长,缺乏有效的血管痉挛治疗<sup>[22]</sup>。临床上,口服尼莫地平治疗脑血管痉挛患者可改善其功能转归,但对改善血管痉挛的疗效不准确<sup>[23]</sup>。本研究发现补阳还五汤具有抗血管痉挛作用,可以有效扩张基底动脉,并通过激活 PI3K/Akt 途径中 p-PI3K, p-Akt 蛋白的表达,促进 eNOS 的活化,使 NO 的生成增加并抑制 ET-1 的表达,可能是补阳还五汤

缓解 SAH 后脑血管痉挛的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] Mathers C D, Boerma T, Fat M D. Global and regional causes of death. [J]. Br Med Bull, 2009, 92(1): 7-32.
- [2] Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero J J, Ruiz de Azúa-Lo'pez Z, et al. Biomarkers of vasospasm development and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurol Sci, 2014, 341 (1/2): 119-127.
- [3] Koliaf A G, Sen J, Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches [J]. J Neur Res, 2010, 87(1): 1-11.
- [4] 王玉妹, 唐思魏, 石广志, 等. 蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛的发病机制和治疗进展[J]. 中国卒中杂志, 2016, 11(6): 494-500.
- [5] CHEN H, SONG H, LIU X, et al. Buyanghuanwu Decoction alleviated pressure overload induced cardiac remodeling by suppressing TGF- $\beta$ /Smads and MAPKs signaling activated fibrosis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 461-468.
- [6] WEI R L, TENG H J, YIN B, et al. A systematic review and Meta-analysis of Buyang Huanwu Tang in animal model of focal cerebral ischemia [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 4(6): 1-13.
- [7] HAO C Z, WU F, SHEN J, et al. Clinical efficacy and safety of Buyang Huanwu Tang for acute ischemic stroke: a systematic review and Meta-analysis of 19 randomized controlled trials [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012(3/4): 630124-630137.
- [8] 熊录, 范吉平. 蛛网膜下腔出血的病机研究——兼论其并发症脑血管痉挛 [J]. 中国中医急症, 2002, 11(3): 200-202.
- [9] 刘欣. 中西医结合治疗蛛网膜下腔出血 23 例 [J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(24): 2380-2381.
- [10] Raslan F. A modified double injection model of cisterna magna for the study of delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Exp Transl Stroke Med, 2012, 4(1): 23-23.
- [11] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. J Neurosci Methods, 2007, 167(2): 327-334.
- [12] 施新猷. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 417.
- [13] 仇志富, 吴晓光, 孟杰, 等. 补阳还五汤提取物灌胃对脑出血大鼠脑组织中 PI3K、AKT、Caspase-3 表达的影响 [J]. 山东医药, 2016, 56(9): 29-31.
- [14] Garcia J, Wagner S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-635.
- [15] Poulos T L, LI H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design [J]. Nitric Oxide, 2017, 63(4): 68-77.
- [16] Atochin D N, HUANG P L. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction [J]. Pflugers Arch, 2010, 460(6): 965-974.
- [17] LI X, XIA X, LI X. Plasmid pLXSN-mediated adrenomedullin gene therapy for cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Med Sci Monit, 2017, 23(7): 3293-3302.
- [18] Drake C T, Iadecola C. The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow [J]. Brain Lang, 2007, 102(2): 141-152.
- [19] ZHU J, SONG W, LI L, et al. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases [J]. Mol Brain, 2016, 9(1): 30-37.
- [20] 蔡俊, 张继平, 姚晖, 等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 122-126.
- [21] CUI H J, YANG A L, ZHOU H J, et al. Buyang Huanwu Tang promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-2 activation through the PI3K/Akt pathway in a mouse model of intracerebral hemorrhage [J]. BMC Complementary Altern Med, 2015, 15(1): 91-102.
- [22] CHOU C H, Reed S D, Allsbrook J S, et al. Costs of vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neurosurgery, 2010, 67(2): 345-351, 353.
- [23] Mayberg M R, Batjer H H, Dacey R, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke council, American heart association [J]. Stroke, 1994, 25(11): 2315-2328.

[责任编辑 孙丛丛]