平肝活血散对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响及作用机制初探Δ

宋发萍[1*]，张　洁[1]，唐　勇[2]，刘宗梅[1]，王晓玲[2#]（1.陕西中医药大学第一临床医学院，陕西 咸阳　712000；2.安康市中医医院脑病科，陕西 安康　725000）

中图分类号　R932；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）24-2999-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.24.11

摘　要　目的　探讨平肝活血散对大鼠脑缺血再灌注损伤（CIRI）的影响及作用机制。**方法**　采用线栓法制备CIRI模型。将大鼠分为假手术组、模型组、阳性对照组（通心络胶囊0.325 g/kg）和平肝活血散低、中、高剂量组（3.02、6.04、12.08 g/kg），每组12只。各组大鼠灌胃等量水或对应药液，每日1次，连续14 d。干预第1、7、14天对大鼠神经功能进行Longa评分。末次给药后，测定大鼠脑梗死体积百分比，观察神经元损伤（神经元密度）和凋亡情况，检测脑缺血皮层中p53、B淋巴细胞瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶3（Caspase-3）、活化Caspase-3（Cleaved Caspase-3）蛋白表达水平。**结果**　与假手术组比较，模型组大鼠干预第1、7、14天的Longa评分、脑梗死体积百分比均显著升高（$P<0.05$）；脑缺血皮层细胞排列紊乱，尼氏小体缺失、空泡，出现大量细胞凋亡；病灶侧神经元密度、Bcl-2蛋白表达均显著降低（$P<0.05$），脑缺血皮层中p53、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，平肝活血散高剂量组大鼠脑缺血皮层中Bcl-2表达均显著升高（$P<0.05$）；平肝活血散中、高剂量组大鼠干预第7、14天的Longa评分均显著降低（$P<0.05$），其余指标亦显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　平肝活血散可保护CIRI模型大鼠脑神经，抑制细胞凋亡；其机制可能与下调p53、Bax、Caspase-3蛋白表达，上调Bcl-2蛋白表达有关。

关键词　平肝活血散；脑缺血再灌注损伤；细胞凋亡；大鼠

Preliminary study on the effect of Pinggan huoxue powder on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism

SONG Faping[1], ZHANG Jie[1], TANG Yong[2], LIU Zongmei[1], WANG Xiaoling[2]（1. The First Clinical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Dept. of Neurology, Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Ankang 725000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of Pinggan huoxue powder on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats. **METHODS** CIRI model was induced by suture-occluded method. SD rats were divided into sham operation group, model group, positive control group (Tongxinluo capsule 0.325 g/kg), Pinggan huoxue powder low-dose, medium-dose and high-dose groups (3.02, 6.04, 12.08 g/kg), with 12 rats in each group. Each group was given constant volume of water or drug intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. Longa score was used to evaluate neurological function of rats on the 1st, 7th and 14th day of intervention. After the last administration, the percentage of cerebral infarction volume in rats was measured, and neuronal injury (neuronal density) and neuronal apoptosis were observed; the protein expressions of p53, B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-3 and activated Caspase-3 (Cleaved caspase-3) in brain tissue were detected. **RESULTS** Compared with sham operation group, Longa score at the 1st, 7th and 14th day of intervention and the percentage of cerebral infarction volume in model group significantly increased ($P<0.05$), and the arrangement of cortical cells in ischemic side was disordered, Nissl bodies were absent and vacuolated, and a large number of cell apoptosis occurred. The neuronal density and protein expression of Bcl-2 at the lesion side were significantly decreased ($P<0.05$), while the protein expressions of p53, Bax, Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the expressions of Bcl-2 in cerebral ischemia cortex of rats in Pinggan huoxue powder high-dose group were significantly increased ($P<0.05$). Longa scores of rats in Pinggan huoxue powder medium-dose and high-dose groups on the 7th and 14th day of intervention were significantly decreased ($P<0.05$), and other indexes were also significantly reversed ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Pinggan huoxue powder can protect cerebral nerves and inhibit apoptosis of CIRI model rats, the mechanism of which may be related to down-regulating the protein expressions of p53, Bax and Caspase-3 and up-regulating the protein expression of Bcl-2.

KEYWORDS　Pinggan huoxue powder; cerebral ischemia-reperfusion injury; apoptosis; rat

Δ**基金项目**　陕西省中医药管理局课题（No.2021-GJ-JC011）；陕西省2021年度中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目（No.2021-01-GJ-019）

＊**第一作者**　主治医师。研究方向：脑血管病的基础与临床治疗。电话：029-87080532。E-mail：710043936@qq.com

＃**通信作者**　主任医师。研究方向：脑血管病的基础与临床治疗。电话：0915-8183605。E-mail：akwxl@163.com

缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）约占卒中总人数的80%，是世界第二大死亡原因和第三大致残原因[1]。时间窗内静脉溶栓和动脉取栓是IS急性期的有效治疗手段[2]。脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia-reperfusion injury，CIRI）是IS预后不良的重要因素。细胞凋亡在CIRI病理进程中发挥着重要作用，受*p*53、*Bcl*-2、*Bax*、*Caspase*-3等基因的调控，已有研究证实抑制细胞凋亡可减轻CIRI，保护神经功能[3]。

平肝活血散是陕西省名中医王晓玲教授治疗卒中的经验方，由天麻15 g、赤芍12 g、三七6 g、益母草15 g、竹茹10 g组成，具有平肝熄风、活血化瘀、清热化痰之功。前期研究证实，该方能促进脑出血患者脑水肿消退，改善超敏C反应蛋白、肿瘤坏死因子表达[4-5]。方中主药在CIRI中发挥神经保护作用，可有效抑制神经元凋亡[6-7]，但其作用机制尚不明确。为此本研究考察了平肝活血散对大鼠CIRI的影响，初探其作用机制，旨在为明确平肝活血散治疗CIRI的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括TB-718EL型组织包埋机（湖北泰维科技实业股份有限公司）、Nikon Eclipse E100型显微镜（日本Nikon公司）、RT-6100型酶标仪（美国Rayto公司）、D3024R型台式高速冷冻离心机[大龙兴创实验仪器（北京）有限公司]、Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪（美国Bio-Rad公司）、Odyssey型双色红外荧光成像系统（美国Li-Cor公司）等。

1.2 药品与试剂

平肝活血散配方颗粒剂（批号分别为0052263、0060273、0041413、8111413、0095043，剂量与平肝活血散剂量等效）购自广东一方制药有限公司；通心络胶囊（批号219980015，规格0.26 g/粒）购自石家庄以岭药业股份有限公司；4%多聚甲醛溶液（批号AR1068）购自武汉博士德生物工程有限公司；2，3，5-氯化三苯基四氮唑（TTC）试剂（批号DY30104-10g）购自上海迪医明生物科技有限公司；尼氏染液（批号G1036）、TUNEL试剂盒（批号G1507）、BCA蛋白定量检测试剂盒（批号G2026）、聚偏二氟乙烯膜（批号G6015）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；小鼠*β*-肌动蛋白（*β*-actin）单克隆抗体（批号8227）、兔抗抑癌p53单克隆抗体（批号33889）、兔抗B淋巴细胞瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）单克隆抗体（批号196495）、兔抗Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）多克隆抗体（批号32503）、兔抗胱天蛋白酶3（Caspase-3）单克隆抗体（批号184787）、兔抗活化Caspase-3（Cleaved Caspase-3）多克隆抗体（批号32042）均购自英国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗小鼠免疫球蛋白G二抗（批号分别为ZB-2306、ASP-9100）均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；其余试剂均为实验室常用规格，水为纯净水。

1.3 动物

80只SD雄性大鼠，体质量（200±20）g，购于成都达硕实验动物有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（川）2020-030。动物饲养环境：温度（22±2）℃，相对湿度（50±10）%。本实验通过陕西中医药大学伦理委员会审批，批准号为SUCMDL20210907001。

2 方法

2.1 造模

大鼠造模前适应性喂养1周，然后参考相关文献[8]，采用线栓法造模，具体操作如下：大鼠麻醉后固定于木板上，沿颈部正中作2 cm左右纵行切口，钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉；使用手术线结扎颈总动脉近心端，另在颈外动脉和颈内动脉（两者分叉部位上约2 mm处）用手术线各打一活结，在颈总动脉靠近分叉前1 cm作一“V”切口，线栓进入方向为颈总动脉→颈内动脉，进线栓长度17～18 mm，感觉线栓有轻微阻力时停止推进，此时线栓前端到达大鼠大脑中动脉起始处，立即夹闭颈内动脉防止线栓脱落；1 h后拔出线栓，观察大鼠眼球颜色，以白色变为红色，表示CIRI模型造模完成。大鼠造模清醒后，依照Longa评分法对神经功能进行评分：0分表示无神经功能缺损症状，1分表示左前爪或后肢无法完全伸展，2分表示行走时左转或追尾，3分表示爬行时向左倾倒，4分表示意识丧失或不能自主行走[9]；1～3分表明CIRI模型造模成功，评分为0或4分的大鼠被剔除。假手术组大鼠仅分离血管不插线栓。

2.2 分组与给药

80只大鼠选取12只作为假手术组，剩余大鼠按“2.1”项下方法进行造模，结果有60只大鼠造模成功，成功率为88%。将造模成功的大鼠随机分为模型组、阳性对照组（通心络胶囊0.325 g/kg，根据成人与大鼠等效剂量系数换算临床等效剂量）和平肝活血散低、中、高剂量组（3.02、6.04、12.08 g/kg，按临床等效剂量的50%、100%、200%设置），每组12只。假手术组及模型组大鼠灌胃等体积水，各给药组大鼠灌胃相应剂量药液（以水为溶剂制备的混悬液），每日1次，连续14 d。

2.3 检测指标

2.3.1 神经功能评分 观察各组9只大鼠干预第1、7、14天的Longa评分。

2.3.2 脑梗死体积 采用TTC法测定。干预14 d后，从每组取3只大鼠，麻醉处死后取脑组织，沿冠状面切片，厚约2 mm，于2% TTC试剂中37 ℃避光染色30 min，再于4 ℃预冷的4%多聚甲醛溶液中固定2 h，拍照后用Image-Pro Plus 6.0软件分析，记录大鼠脑梗死体积（染为灰白色）及全脑体积（染为红色），计算脑梗死体积百分

比=（脑梗死面积×厚度）/（全脑面积×厚度）×100%。

2.3.3　神经元损伤　采用尼氏染色。干预14 d后，从每组取4只大鼠，麻醉处死后取脑组织，于4%多聚甲醛溶液中固定24 h，行脱水包埋，切片，梯度乙醇水化，甲苯胺蓝染液染色后冰醋酸分化，二甲苯透明后，中性树胶封固，置于显微镜下观察，使用Image-Pro Plus 6.0软件分析神经元密度（模型组大鼠在取材时死亡1只）。

2.3.4　神经元凋亡　采用TUNEL染色。每组取“2.3.3”项下4只已处死大鼠的脑组织切片，脱蜡，用梯度乙醇水化，蛋白酶K工作液修复，破膜后加buffer室温平衡，加反应液，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚染色，封片，置于显微镜下观察（凋亡细胞的细胞核为绿色荧光，正常细胞核为蓝色荧光）。

2.3.5　脑缺血皮层中凋亡相关蛋白表达　采用Western blot法检测。干预14 d后，从每组取3只大鼠，麻醉后予生理盐水心脏灌流，冰上取脑。右脑组织裂解，提取总蛋白，用BCA法检测蛋白定量，添加1/5体积的5×上样缓冲液，蛋白煮沸变性，电泳后转至聚偏二氟乙烯膜上，室温封闭1 h，加入p53、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃摇床过夜；用1×TBST缓冲液清洗3次，加入相应二抗（稀释比例均为1∶10 000），室温避光孵育2 h，用1×TBST缓冲液清洗3次。运用Odyssey型双色红外荧光成像系统成像、拍照。借助Image J软件计算目标蛋白条带与内参（β-actin）灰度值的比值，以此作为目标蛋白的表达水平。

2.4　统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的数据以$\bar{x}\pm s$表示，方差齐性时，多组间比较采用单因素方差分析，并采用LSD法进行两两比较；方差不齐时，多组间比较采用Tamhane's $T2$检验。不符合正态分布且方差不齐的数据，以$M(P_{25},P_{75})$表示，并采用Kruskal-Wallis H检验。Longa评分使用两因素重复测量资料的方差分析进行组间比较。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　大鼠神经功能评分

与假手术组比较，模型组大鼠干预第1、7、14天的Longa评分均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠干预第7和14天的Longa评分均显著降低（$P<0.05$）。与同组干预第1天比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠第14天的Longa评分均显著降低（$P<0.01$）。与同组干预第7天比较，模型组、阳性对照组和平肝活血散低、高剂量组大鼠第14天的Longa评分均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1　各组大鼠的Longa评分比较（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，分）

组别	第1天	第7天	第14天
假手术组	0	0	0
模型组	2.33±0.71[a]	2.67±0.50[a]	2.22±0.67[ad]
阳性对照组	2.22±0.44	2.00±0.50[b]	1.33±0.50[bce]
平肝活血散低剂量组	2.11±0.78	2.44±0.53	1.78±0.44[e]
平肝活血散中剂量组	2.33±0.50	1.89±0.60[b]	1.56±0.53[bc]
平肝活血散高剂量组	2.33±0.50	2.11±0.60[b]	1.67±0.50[bcd]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与同组第1天比较，$P<0.01$；d：与同组第7天比较，$P<0.05$；e：与同组第7天比较，$P<0.01$

3.2　大鼠脑梗死情况

与假手术组比较，模型组大鼠右脑呈现明显的灰白色梗死区，其脑梗死体积百分比显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑梗死体积百分比均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图1、表2。



假手术组　模型组　阳性对照组　平肝活血散低剂量组　平肝活血散中剂量组　平肝活血散高剂量组

图1　各组大鼠脑组织TTC结果

表2　各组大鼠脑梗死体积百分比和神经元密度测定结果

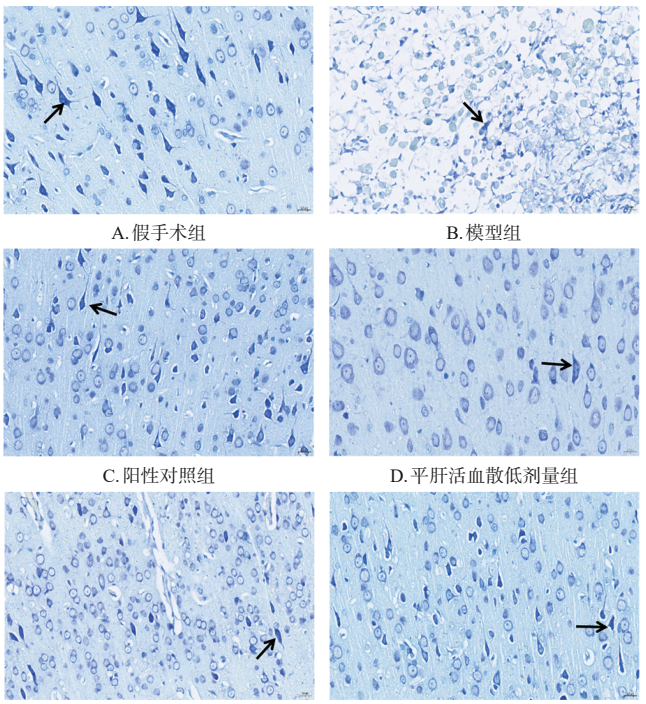
组别	脑梗死体积百分比（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）/%	神经元密度[$M(P_{25},P_{75})$，模型组$n=3$，其余组$n=4$]/mm^2
假手术组	0	1 603.09（1 462.56，1 651.52）
模型组	28.73±2.04[a]	1 279.74（1 140.58，1 290.66）[a]
阳性对照组	5.71±1.34[c]	1 863.68（1 810.47，1 982.37）[b]
平肝活血散低剂量组	18.57±3.29	1 525.32（1 436.64，1 712.23）[d]
平肝活血散中剂量组	5.51±1.61[c]	1 586.72（1 460.51，2 484.44）[b]
平肝活血散高剂量组	3.62±0.72[b]	1 634.47（1 520.55，2 356.20）[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与阳性对照组比较，$P<0.05$

3.3　大鼠神经元损伤情况

假手术组大鼠脑缺血皮层细胞排列整齐，结构完整，着色均匀，尼氏小体染色规则。模型组大鼠脑缺血皮层细胞紊乱，形态不规则，尼氏小体缺失形成空泡。与假手术组比较，模型组大鼠尼氏小体数量明显减少。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层神经元损伤均有不同程度减轻，尼氏小体数量明显增加。结果见图2。

与假手术组比较，模型组大鼠脑缺血皮层神经元密度显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层神经元密度均显著增加（$P<0.05$）。与阳性对照组比较，平肝活血散低剂量组大鼠脑缺血皮层神经元密度显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。



→：尼氏小体

图2　各组大鼠神经元损伤染色图（尼氏染色，×400）

3.4　大鼠神经元凋亡情况

假手术组大鼠脑缺血皮层未见凋亡细胞，模型组、平肝活血散低剂量组大鼠脑缺血皮层可见大量细胞凋亡。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层凋亡细胞数量均有不同程度减少。结果见图3。

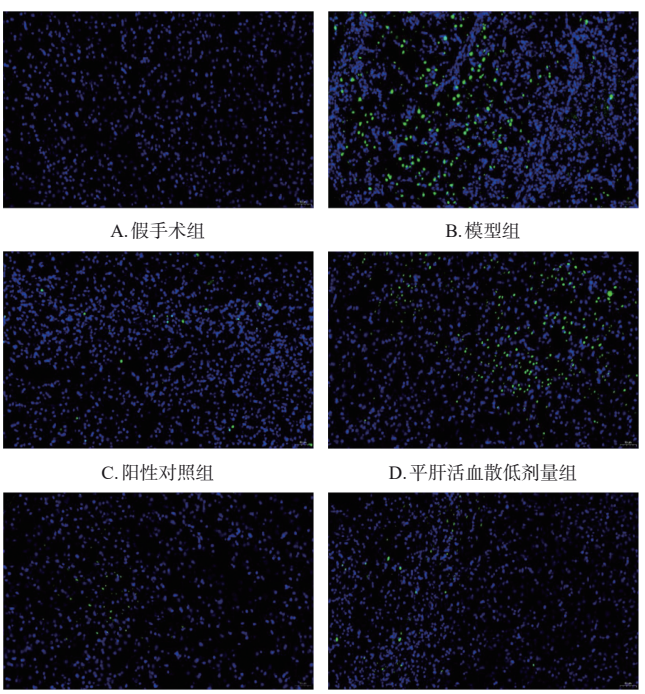


图3　各组大鼠神经元凋亡情况（TUNEL染色，×400）

3.5　大鼠脑缺血皮层中凋亡相关蛋白表达

与假手术组比较，模型组大鼠脑缺血皮层中p53、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著升高（$P<0.01$），Bcl-2蛋白表达均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层中p53、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），阳性对照组和平肝活血散高剂量大鼠脑缺血皮层中Bcl-2蛋白表达均显著升高（$P<0.05$）。与阳性对照组比较，平肝活血散低剂量组大鼠脑缺血皮层中上述蛋白表达差异均有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$），平肝活血散高剂量组大鼠脑缺血皮层中Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4、表3。

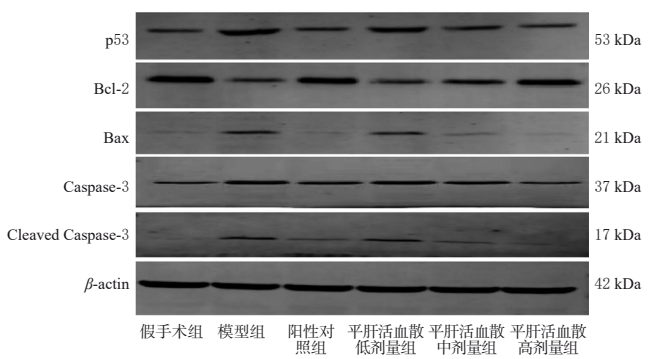


图4　各组大鼠脑缺血皮层中凋亡相关蛋白表达的电泳图

表3　各组大鼠脑皮缺血层中凋亡相关蛋白表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p53	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Cleaved Caspase-3
假手术组	0.29±0.07	0.89±0.14	0.13±0.05	0.17±0.02	0.12±0.06
模型组	0.55±0.09[a]	0.50±0.09[b]	0.45±0.16[a]	0.39±0.02[a]	0.36±0.08[a]
阳性对照组	0.28±0.08[c]	0.86±0.17[d]	0.20±0.08[c]	0.28±0.03[c]	0.20±0.05[d]
平肝活血散低剂量组	0.47±0.09[e]	0.51±0.10[c]	0.40±0.11[e]	0.40±0.03[f]	0.36±0.05[f]
平肝活血散中剂量组	0.36±0.08[d]	0.61±0.12	0.21±0.04[c]	0.28±0.02[c]	0.24±0.03[d]
平肝活血散高剂量组	0.29±0.09[c]	0.85±0.15[d]	0.12±0.03[c]	0.16±0.02[cf]	0.05±0.02[ce]

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与假手术组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$；e：与阳性对照组比较，$P<0.05$；f：与阳性对照组比较，$P<0.01$

4　讨论

CIRI指脑梗死区域恢复血流后引发更为严重损害的病理生理现象[10]。通心络胶囊是根据中医络病理论研制而成的中药复方制剂，具有益气活血化瘀、祛风通络止痛的功效，临床上常用于治疗心脑血管病[11]。动物实验研究表明，通心络胶囊可降低CIRI大鼠神经功能损伤评分及脑梗死体积，且抗凋亡作用明确，因此本研究将其作为阳性对照药物[12-13]。CIRI的主要病理改变为神经元破坏、变性，脑梗死范围的大小、肢体活动障碍亦可很大程度反映其严重程度[14-15]。本研究的尼氏染色实验结果显示，与模型组比较，阳性对照组和平肝活血

散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层细胞紊乱、尼氏小体缺损、空泡情况均改善，且神经元密度显著增加。同时阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠的Longa评分、脑梗死体积百分比均较模型组显著降低。这提示中、高剂量的平肝活血散可减轻大鼠CIRI，具有神经保护作用。

细胞凋亡是由多重调节基因共同参与完成的一系列复杂的级联反应，为脑缺血再灌注后迟发性神经元死亡的主要原因[16]。p53是细胞凋亡连锁反应的第一关键因素，可调控多种细胞凋亡和蛋白转录因子的表达。据报道，脑缺血缺氧可激活p53表达增多，随之调控下游的Bax和Bcl-2蛋白[17]；Bcl-2、Bax是Bcl-2家族调节和执行内部细胞凋亡的关键蛋白，在中枢神经系统中都有所表达，Bcl-2是最重要的抗细胞凋亡因子，与Bax作用互相拮抗，可通过介导线粒体、内质网途径来抑制缺血所致的神经元凋亡[18]。Bax是细胞凋亡启动的最强决定因素，在凋亡信号的刺激下，Bax移动并插入线粒体外膜形成Bax大通道，致使线粒体外膜完整性被破坏，加速凋亡进程[19]。Caspase-3为凋亡执行蛋白，正常情况下，以无活性酶原的形式存在于细胞质中，其活性形式（Cleaved Caspase-3）的表达是细胞凋亡的标志[20]。Caspase-3的激活主要依赖于线粒体外膜上细胞色素C的释放，细胞色素C通过半胱氨酸蛋白激酶作用或与凋亡酶激活因子1结合致使胞浆内多种重要的蛋白质被裂解失活，进而细胞核固缩、薄膜发泡、凋亡小体形成，最终发生凋亡[21]。本研究的TUNEL染色实验结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠脑缺血皮层可见大量细胞凋亡；Western blot实验结果发现，与假手术组比较，模型组大鼠脑缺血皮层中p53、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著升高，Bcl-2蛋白表达显著降低，这提示p53、Bax、Caspase-3、Bcl-2蛋白参与了神经元凋亡。有研究证实，药物控制或基因干预使p53、Bax、Caspase-3蛋白表达降低，Bcl-2蛋白表达升高，可抑制神经元凋亡，减轻CIRI，发挥脑神经保护作用[3,22]。本研究结果显示，与模型组比较，阳性对照组和平肝活血散中、高剂量组大鼠脑缺血皮层中p53、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白表达均显著降低，阳性对照组和平肝活血散高剂量组大鼠脑缺血皮层中Bcl-2蛋白表达均显著升高。这提示中、高剂量的平肝活血散可下调p53、Bax、Caspase-3蛋白表达，上调Bcl-2蛋白表达，抑制脑皮层细胞凋亡。

综上所述，平肝活血散可保护CIRI模型大鼠脑神经，抑制细胞凋亡；其机制可能与下调p53、Bax、Caspase-3蛋白表达，上调Bcl-2蛋白表达有关。

参考文献

[1] WANG Y J, LI Z X, GU H Q, et al. China stroke statistics 2019: a report from the national center for healthcare quality management in neurological diseases, China national clinical research center for neurological diseases, the Chinese stroke association, national center for chronic and non-communicable disease control and prevention, Chinese center for disease control and prevention and institute for global neuroscience and stroke collaborations[J]. Stroke Vasc Neurol, 2020, 5(3): 211-239.

[2] HERPICH F, RINCON F. Management of acute ischemic stroke[J]. Crit Care Med, 2020, 48(11): 1654-1663.

[3] XIE Y L, ZHANG B, JING L. miR-125b blocks Bax/Cytochrome C/Caspase-3 apoptotic signaling pathway in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting p53[J]. Neurol Res, 2018, 40(10): 828-837.

[4] 王晓玲，唐勇，张展峰，等. 中西医结合序贯方案治疗出血性中风56例疗效观察[J]. 中医杂志，2012，53(10)：857-859，863.

[5] 张超，潘平康，吴宗涛，等. 自拟出血性中风1、2号方治疗急性出血性中风疗效评价[J]. 海南医学，2021，32(19)：2503-2506.

[6] WANG D, WANG Q, CHEN R, et al. Exploring the effects of *Gastrodia elata* Blume on the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury using UPLC-Q/TOF-MS-based plasma metabolomics[J]. Food Funct, 2019, 10(11): 7204-7215.

[7] ZHENG Z, LIANG S, SUN S, et al. Clinical observation of salvianolic acid combined with *Panax notoginseng* saponins combined with basic nursing intervention on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Healthc Eng, 2022, 2022: 8706730.

[8] 袁柳媚，卢小叶，夏云，等. 线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞脑缺血模型的体会[J]. 中国医药科学，2022，12(2)：7-10.

[9] 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.

[10] 徐芳琴，郭超，王婧雯. 山柰酚对脑缺血/再灌注损伤的体内外保护作用机制研究[J]. 中国药房，2022，33(17)：2065-2071.

[11] 高志杰，王立新. 通心络胶囊对脑缺血再灌注损伤小鼠的保护作用及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(11)：93-99.

[12] CHENG X, HOU Z, SUN J, et al. Protective effects of Tongxinluo on cerebral ischemia/reperfusion injury related to Connexin 43/Calpain Ⅱ/Bax/Caspase-3 pathway in rat

[J]. J Ethnopharmacol,2017,198:148-157.
[13] 李佳佳,朱云波,康玲伶,等. 通心络对脑缺血再灌注大鼠TLR4和NF-κB表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2020,36(6):672-676.
[14] 吴斌,曹国胜,瞿领航,等. 参附注射液调节NF-κB信号通路改善小鼠脑缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(9):2085-2088.
[15] 吕明义,邓淑玲,郭文晏,等. 木犀草素抑制JAK2/STAT3信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤作用的研究[J]. 天津医药,2022,50(4):363-368.
[16] ZHANG L N,ZHANG X W,LI C Q,et al. Vagal nerve stimulation protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting autophagy and apoptosis[J]. Neuropsychiatr Dis Treat,2021,17:905-913.
[17] LIU Y,WU X,DU D,et al. p53 inhibition provides a pivotal protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury via the Wnt signaling pathway[J]. Cerebrovasc Dis,2021,50(6):682-690.
[18] 彭智远,刘旺华,曹雯. 脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2017,35(8):1957-1961.
[19] DINGELDEIN A P G,LINDBERG M J,ADEN J,et al. Bax to the future:a novel,high-yielding approach for purification and expression of full-length Bax protein for structural studies[J]. Protein Expr Purif,2019,158:20-26.
[20] MIAO M S,WANG T,LOU X,et al. The influence of stachydrine hydrochloride on the reperfusion model of mice with repetitive cerebral ischemia[J]. Saudi J Biol Sci,2017,24(3):658-663.
[21] BOCK F J,TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2020,21(2):85-100.
[22] LI M L,DONG M M,HUANG C J,et al. Effect of electroacupuncture on expression of hippocampal caspase-3 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Zhen Ci Yan Jiu,2022,47(5):422-427.

(收稿日期:2022-07-19 修回日期:2022-11-25)
(编辑:邹丽娟)

(上接第2998页)

本研究通过熵权法对迷迭香酸等4个指标进行客观赋权,再根据各指标的权重计算相对关联度,有效避免了因主观判断误差对权重分配的影响。熵权法分析结果显示,迷迭香酸、总黄酮、水分、水溶性浸出物含量的权重分别为0.297 1、0.277 5、0.163 7、0.261 6,以迷迭香酸含量的权重最大,表明其对夏枯草药材的质量影响最大。总黄酮含量权重排名第2位,提示总黄酮含量也是影响夏枯草药材质量的重要指标。相对关联度结果显示,最大值为0.616 3,最小值为0.159 3,表明不同批次的药材质量存在差异,其中S16～S24批药材质量排名靠前,提示江苏南京产夏枯草质量较优。

综上所述,以迷迭香酸、总黄酮、水分及水溶性浸出物含量为评价指标,采用熵权法和灰色关联度分析法可用于夏枯草的质量评价;不同批次夏枯草质量存在差异,以江苏南京产夏枯草质量最优。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:292.
[2] 赵东升,朱鹤云,关皎,等. RP-HPLC法同时测定夏枯草中3种三萜酸的含量[J]. 中国药房,2012,23(27):2533-2535.
[3] 方罗,林能明,吴永江. 高效液相色谱同时测定夏枯草药材中4种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(5):616-619.
[4] 付晓瑞,李继昌,张明智. 夏枯草近代研究进展概述[J]. 中医研究,2005,18(6):60-62.
[5] 钟楚楚,赵晋彤,范宇,等.夏枯草总黄酮提取方法的比较[J].广州化工,2020,48(2):70-72.
[6] 刘颖,范巧佳.夏枯草与白毛夏枯草的性状及组织显微鉴定[J].中药材,2007,30(10):1230-1234.
[7] 黄宽,付鹏,林艾和,等.不同产地夏枯草HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J].中华中医药学刊,2021,39(12):124-128,290.
[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:114,232.
[9] 朱喜安,魏国栋.熵值法中无量纲化方法优良标准的探讨[J].统计与决策,2015(2):12-15.
[10] 冯治国,赵祺,朱强,等.基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量[J].中草药,2021,52(12):3689-3695.
[11] 孙振阳,张景珍,王思雨,等.基于灰色关联度法评价西红花饮片质量[J].中成药,2019,41(10):2430-2434.
[12] 杨昌贵,龚安慧,张成刚,等. HPLC法同时测定续断药材中7个成分的含量[J]. 中国药房,2022,33(6):680-684.
[13] 高婷.探究影响中药储存及养护的常见因素[J].心血管病防治知识(学术版),2018(12):95-96.
[14] 陈宇航,郭巧生,刘丽,等.贮藏年限及药材分级对夏枯草药材品质的影响[J].中国中药杂志,2012,37(7):882-886.

(收稿日期:2022-04-08 修回日期:2022-10-20)
(编辑:陈 宏)