中风瘀热方对缺血性脑卒中模型大鼠的干预作用及机制Δ

李　琬[1,2*]，刘炳周[3]，鞠建明[2]，彭蕴茹[2]，王　云[1,2#]（1.南京中医药大学附属中西医结合医院药剂科，南京 210028；2.江苏省中医药研究院，南京　210028；3.山东省寿光市人民医院药剂科，山东 寿光　262700）

中图分类号　R285.5；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）13-1601-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.13.11

摘　要　目的 研究中风瘀热方对缺血性脑卒中模型大鼠的干预作用及机制。**方法** 将85只大鼠随机分为假手术组（生理盐水，n=15）、模型对照组（生理盐水，n=18）、尼莫地平片组（阳性对照，10.8 mg/kg，n=18）和中风瘀热方高剂量组（20.52 g/kg，n=17）、中风瘀热方低剂量组（5.13 g/kg，n=17）。预防性连续给药7 d（每天1次）后，除假手术组外，其余各组均采用改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞（MCAO）模型。造模成功后，各组大鼠继续给药3 d。实验期间，观察大鼠一般情况，进行神经功能评分；末次给药后，计算脏器指数，观察大鼠脑梗死面积及脑组织病理形态学变化，检测大鼠脑组织及血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）水平及脑组织中胱天蛋白酶3（caspase-3）、磷酸化蛋白激酶B（p-AKT）蛋白的平均光密度值。**结果** 造模3 d后，与假手术组比较，模型对照组大鼠神经功能评分，脑指数、脾指数，脑梗死面积占比，脑组织和血清中TNF-α、IL-6水平，脑组织中caspase-3蛋白平均光密度值均显著升高（P<0.05或P<0.01）；脑组织出现核固缩、弥散性水肿等病变。与模型对照组比较，各给药组上述指标均有不同程度的改善，其中中风瘀热方高剂量组大鼠脑指数、脾指数，脑梗死面积占比，脑组织和血清中TNF-α水平，脑组织中caspase-3蛋白和p-AKT蛋白的平均光密度值均显著回调（P<0.05或P<0.01）。**结论** 中风瘀热方对MCAO模型大鼠有一定的防治作用；其机制可能是通过减少炎症因子TNF-α、IL-6的分泌，下调缺血侧脑组织中caspase-3蛋白表达，上调缺血侧脑组织中p-AKT蛋白表达，从而达到保护神经元的作用。

关键词　中风瘀热方；缺血性脑卒中；大脑中动脉阻塞模型；胱天蛋白酶3；磷酸化蛋白激酶B；大鼠

Intervention effect and mechanism of Zhongfeng yure decoction on ischemic stroke model rats

LI Wan[1,2], LIU Bingzhou[3], JU Jianming[2], PENG Yunru[2], WANG Yun[1,2]（1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3. Dept. of Pharmacy, Shouguang Municipal People's Hospital of Shandong Province, Shandong Shouguang 262700, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the intervention effect and mechanism of Zhongfeng yure decoction on ischemic stroke model rats. **METHODS** Totally 85 rats were randomly divided into sham operation group (normal saline, n=15), model control group (normal saline, n=18), Nimodipine tablet group (positive control, 10.8 mg/kg, n=18), high-dose group of Zhongfeng yure decoction (20.52 g/kg, n=17) and low-dose group of Zhongfeng yure decoction (5.13 g/kg, n=17), respectively. After 7 days of preventive continuous administration (once a day), except for the sham operation group, the rats' middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by the modified suture method in other groups. After modeling, the rats in each group continued to be administered for 3 days. During experiment, general condition of the rats was observed, and the neurological function score was performed. After the last administration, the organ index was calculated, the cerebral infarction area and pathological changes of brain tissue were observed. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin 6 (IL-6) in brain tissue and serum, and the average optical density value of caspase-3 and phosphorylated protein kinase B (p-AKT) protein in brain tissue were detected. **RESULTS** Three days after modeling, compared with sham operation group, the neurological function score, in brain tissue index, spleen tissue index, proportion of cerebral infarction area, the levels of TNF-α and IL-6 in brain tissue and serum, and the average optical density value of caspase-3 protein in brain tissue were significantly increased in the model control group (P<0.05 or P<0.01); karyopyknosis, diffuse edema and other lesions appeared in brain tissue. Compared with the model control group, the above indexes in each administration group were improved to varying degrees. Among them, there were significant regression in brain tissue index, spleen tissue index, proportion of cerebral infarction area, TNF-α level in brain tissue and serum, and the average optical density values of caspase-3 protein and p-AKT protein in brain tissue of rats

Δ **基金项目** 江苏省中西医结合医院院内制剂资助项目（No. YNZJ1920）

＊**第一作者** 主管中药师。研究方向：中药新产品研发及药效物质基础。E-mail：303692783@qq.com

＃**通信作者** 主管中药师，硕士。研究方向：中药新剂型、新工艺及中药质量控制。E-mail：632307956@qq.com

in high-dose group of Zhongfeng yure decoction ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Zhongfeng yure decoction has a certain intervention and therapeutic effect on MCAO model rats. The mechanism may be to reduce the secretion of inflammatory factors TNF-α and IL-6, down-regulate the expression of caspase-3 protein in ischemic brain tissue, up-regulate the expression of p-AKT protein, so as to protect the neurons.

KEYWORDS Zhongfeng yure decoction; ischemic stroke; middle cerebral artery occlusion model; caspase-3; phosphorylated protein kinase B; rats

缺血性脑卒中作为我国发病率最高的疾病之一，尤其高发于老年患者，严重危害人们的健康[1-2]。目前，静脉溶栓是临床公认的治疗缺血性脑卒中的主要方法，但溶栓药物组织型纤溶酶原激活物（tissue-type plasminogen activator，t-PA）会增加颅内出血的风险，且较窄的治疗窗限制了患者的最佳治疗时间[3]。因此，开发低副作用、高安全性的药物对缺血性脑卒中的治疗具有重要意义。

中风瘀热方是南京中医药大学附属中西医结合医院的临床经验方，由水牛角15 g、地黄10 g、赤芍10 g、郁金10 g、牡丹皮6 g、石菖蒲6 g配伍组成，具有清热开窍、凉血化瘀的功效，临床主要用于治疗急性脑梗死。多年临床观察表明，中风瘀热方可以改善患者的神经功能缺损和血液流变学指标，提高患者日常自主生活能力和生活质量[4-6]。本课题组前期采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）技术对中风瘀热方水提取液进行分析和鉴定[7]，明确了其主要化学成分有芍药苷、梓醇、益母草苷等。并且本课题组前期采用网络药理学方法对该方治疗缺血性脑卒中的作用靶点进行预测，发现靶点排名靠前的有蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）、胱天蛋白酶3（caspase-3）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）等，但缺少实验验证。因此，本研究探讨中风瘀热方对大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型大鼠的防治作用及可能机制，以期为中风瘀热方的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

AT201型电子天平购自瑞士Mettler Toledo公司；Vert A1型倒置荧光显微镜购自德国Carl Zeiss公司；Sorvall Legend Micro 21R型冷冻离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司；Tecan M200 Pro型酶标仪购自瑞士Tecan公司；R415型小动物呼吸麻醉机购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司；E100型显微镜、DS-U3型成像系统购自日本Nikon公司。

1.2 主要药品与试剂

中风瘀热方溶液（批号202008，规格为每1 mL含2.04 g生药）由南京中医药大学附属中西医结合医院实验室自制；尼莫地平片（批号BJ47363，规格30 mg/片）购自德国Bayer公司；TNF-α、IL-6试剂盒（批号分别为CK-E30635、CK-E30646）均购自苏州卡尔文生物科技有限公司；柠檬酸（pH6.0）抗原修复液、磷酸盐缓冲液（PBS）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）、正常兔血清、磷酸化AKT（phosphorylated AKT，p-AKT）一抗、caspase-3一抗、辣根过氧化酶（HRP）标记的山羊抗兔二抗、组化试剂盒DAB显色剂（批号分别为G1202、G0002、G5001、G1209、GB13012-3、GB110091、GB23303、G1211）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；苏木素-伊红（HE）染液（批号20200726）购自南京建成生物科技有限公司；注射用青霉素钠（批号190115）购自山东鲁抗医药股份有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为雄性SPF级SD大鼠，共85只，体质量250 g左右，鼠龄8周，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（沪）2018-0006。大鼠饲养于江苏省中医药研究院动物房内。饲养期间环境温度为（24±1）℃，相对湿度为55%±10%，大鼠自由进食、饮水。本实验方案经江苏省中医药研究院实验动物福利伦理审查委员会审查后实施，伦理号为AEWC-20200622-118。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

实验分为假手术组（$n=15$）、模型对照组（$n=18$）、尼莫地平片组（阳性对照，$n=18$）、中风瘀热方高剂量组（$n=17$）、中风瘀热方低剂量组（$n=17$）。将所有SD大鼠适应性喂养3周，待体质量为（350±20）g时，尼莫地平片组大鼠灌胃尼莫地平片10.8 mg/kg[8]；中风瘀热方高、低剂量组大鼠分别灌胃中风瘀热方20.52、5.13 g/kg（分别为成人临床等效剂量的4、1倍）；假手术组与模型对照组大鼠给予等体积生理盐水。每日灌胃给药1次，灌胃体积为10 mL/kg，连续7 d。末次给药后，大鼠隔夜禁食不禁水，用3%异氟烷在95%O_2/5%CO_2引导下于诱导盒中麻醉大鼠，假手术组只暴露右颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉，其余各组均参照改良线栓法制备大鼠MCAO模型[9]。采用一端为圆形的尼龙栓线（直径为0.26 mm），从颈外动脉进入颈内动脉内腔17～20 mm，直至感觉有阻力立即停止，此时将右颈总动脉处的活结结扎，将尼龙栓线固定于血管内，剪去多余的线头和尼龙栓线，无菌棉球清洁创口内的出血。缝合大鼠颈部皮肤，碘伏消毒后将大鼠置于保温毯上直至意识恢复。待大鼠手术自然苏醒后进行第1次神经功能评分：0分，无神经症状；1分，损伤对侧前肢不能伸直；2分，爬行时向对侧旋转；3分，行走时向手术对侧倾倒或转圈；4分，无自发活

动行为。评分结果为1～3分表示大鼠MCAO造模成功[10]。剔除造模过程中死亡大鼠和评分不达标大鼠，剩余大鼠继续给药3 d。最终假手术组剩余大鼠11只，模型对照组11只，尼莫地平片组10只，中风瘀热方高剂量组9只，中风瘀热方低剂量组9只。

2.2 标本采集与处理

末次给药前12 h大鼠禁食不禁水。末次给药后1 h进行麻醉，方法同“2.1”项下。腹主动脉取血3～5 mL，血液静置4 h后以4 000 r/min离心10 min，取上清液。大鼠处死后，快速取出其大脑、脾脏，用含肝素的等渗盐水冲洗，并用滤纸吸干、称质量。将部分脑组织用于制备TTC染色和HE染色病理切片，其他脑组织及血清样本于－80 ℃冰箱中保存备用。

2.3 大鼠一般情况观察、神经功能评分和脏器指数计算

实验期间每天观察大鼠的一般情况，包括毛色、饮水量、进食量、动作行为等，并记录其体质量。对造模成功的大鼠，于术后自然苏醒后、造模后1 d、造模后3 d分别进行神经功能评分（每组9～11只），评分方法和标准同“2.1”项下。计算大鼠脏器（脑、脾）指数：脏器指数＝脏器质量（g）/大鼠体质量（kg）。

2.4 大鼠脑梗死面积及脑组织病理形态学观察

采用TTC染色及HE染色法观察。取大鼠（每组5～6只）脑组织，置于冰箱中冷冻15 min，待大脑稍冻硬后取出，用锋利刀片沿大脑冠状面切片（约2 mm/片）。立即放入2%TTC染液中，37 ℃下避光孵育，每隔5 min摇晃1次脑组织切片，使其均匀接触到染液；20 min后取出脑组织切片，放入10%福尔马林溶液中固定。TTC染色正常组织呈深红色，梗死区域呈白色。使用Image J软件对照片进行分析，计算脑梗死面积占比：脑梗死面积占比（%）＝脑梗死区域面积/整个脑组织面积×100%[11]。将取出的新鲜大鼠脑组织放入预先配制好的10%福尔马林溶液中固定24 h，常规制备石蜡切片（厚度为4～6 μm）并进行HE染色，在显微镜下观察脑组织病理形态学变化。

2.5 大鼠脑组织及血清中炎症指标检测

采用酶联免疫吸附法检测。取“2.2”项下冻存的脑组织和血清样本（每组4～5只大鼠），常规解冻后，按相应试剂盒方法操作检测大鼠脑组织和血清中TNF-α、IL-6水平。

2.6 大鼠脑组织中caspase-3、p-AKT蛋白表达的检测

采用免疫组化法检测。取“2.2”项下冻存的大鼠脑组织（每组4～5只大鼠），室温解冻20 min，制备脑组织石蜡切片（厚度为4～6 μm），将切片脱蜡至水进行抗原修复，然后放入3%双氧水溶液中，室温避光孵育25 min；以3%BSA均匀覆盖组织，室温封闭30 min，滴加caspase-3和p-AKT一抗（稀释度分别为1∶100、1∶200），4 ℃孵育过夜；洗膜后滴加HRP标记的山羊抗兔二抗（稀释度为1∶200），室温孵育50 min；DAB显色，阳性表达为棕黄色；自来水冲洗切片终止显色，复染细胞核，脱水封片。采用Image J软件进行平均光密度分析，通过平均光密度值来反映免疫组化的蛋白表达强度。

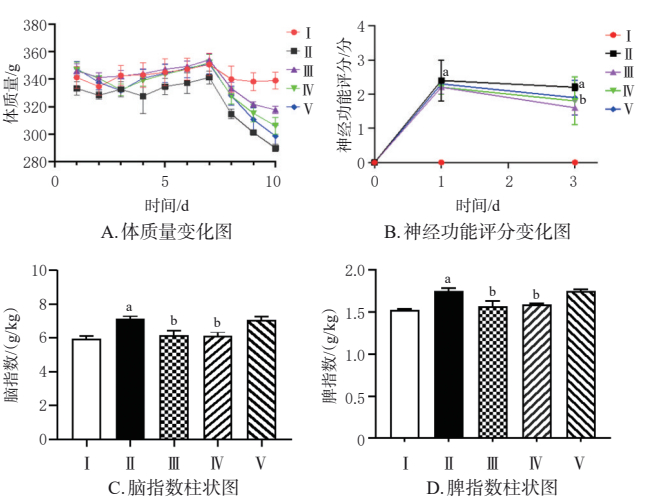
2.7 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠一般情况、神经功能评分和脏器指数测定结果

造模前7 d，各组大鼠精神状态良好，进食、进水正常，体质量整体呈缓慢增长趋势。在造模后3 d，模型对照组大鼠精神状态出现萎靡不振，进食、进水少量，体质量呈逐渐下降趋势。与模型对照组比较，各给药组大鼠精神状态有所改善，进食、进水有所恢复，体质量呈逐渐下降趋势但均高于模型对照组。各组大鼠的体质量变化见图1A。对造模成功后的大鼠继续灌胃给药3 d，结果显示，造模后1 d，与假手术组比较，模型对照组大鼠神经功能评分显著升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，各给药组大鼠神经功能评分差异无统计学意义（$P>0.05$）。造模后3 d，与假手术组比较，模型对照组大鼠神经功能评分显著升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，尼莫地平片组大鼠神经功能评分显著降低（$P<0.01$），中风瘀热方高、低剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$），详见图1B。脏器指数测定结果显示：与假手术组比较，模型对照组大鼠脑指数、脾指数均显著升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，各给药组大鼠脑指数、脾指数均有不同程度的回调，其中尼莫地平片组、中风瘀热方高剂量组大鼠脑指数、脾指数显著降低（$P<0.01$）。大鼠脑指数、脾指数测定结果见图1C、图1D。



A.体质量变化图　B.神经功能评分变化图
C.脑指数柱状图　D.脾指数柱状图

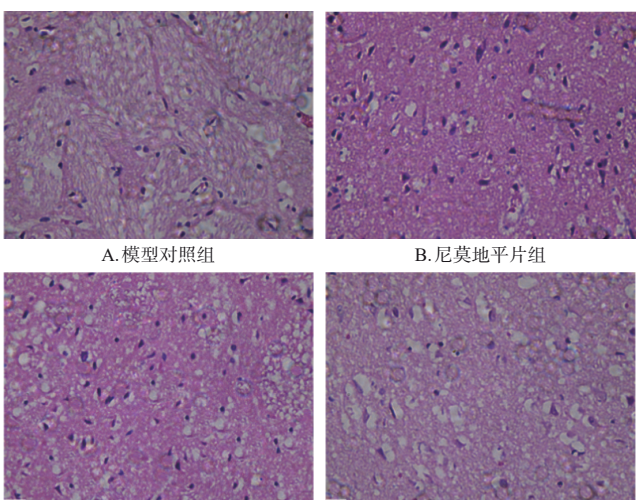
Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型对照组；Ⅲ：尼莫地平片组；Ⅳ：中风瘀热方高剂量组；Ⅴ：中风瘀热方低剂量组；a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与模型对照组比较，$P<0.01$。

图1 各组大鼠体质量、神经功能评分和脏器指数测定结果（$n=9\sim11$）

3.2 大鼠脑梗死面积及脑组织病理形态学观察结果

TTC染色结果显示：假手术组、模型对照组、尼莫地平片组、中风瘀热方高剂量组、中风瘀热方低剂量组大鼠脑梗死面积占比分别为0、(41.90±0.49)%、(28.60±3.90)%、(29.50±3.50)%、(34.50±0.85)%。与假手术组比较，模型对照组大鼠脑梗死面积占比显著升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，各给药组大鼠脑梗死面积占比均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。

HE染色结果显示：假手术组大鼠脑组织神经元排列均匀、大小正常，细胞核染色清晰，无炎症细胞浸润和水肿；与假手术组比较，模型对照组大鼠脑组织神经元大小不一，甚至有丢失，出现弥散性水肿，细胞核染色较浅、缩小；与模型对照组比较，各给药组大鼠脑组织水肿情况明显改善。HE染色结果见图2。



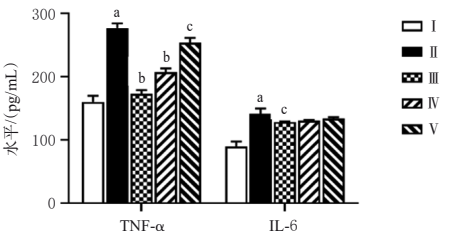
A.模型对照组　B.尼莫地平片组　C.中风瘀热方高剂量组　D.中风瘀热方低剂量组

注：假手术组图略。

图2　各组大鼠脑组织HE染色显微图（×400）

3.3 各组大鼠脑组织和血清中炎症指标检测结果

与假手术组比较，模型对照组大鼠脑组织和血清中TNF-α、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型对照组比较，各给药组大鼠脑组织和血清中TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），同时尼莫地平片组大鼠脑组织中IL-6水平显著降低（$P<0.05$）。大鼠脑组织中炎症指标检测结果见图3（血清图略）。



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型对照组；Ⅲ：尼莫地平片组；Ⅳ：中风瘀热方高剂量组；Ⅴ：中风瘀热方低剂量组；a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型对照组比较，$P<0.01$；c：与模型对照组比较，$P<0.05$。

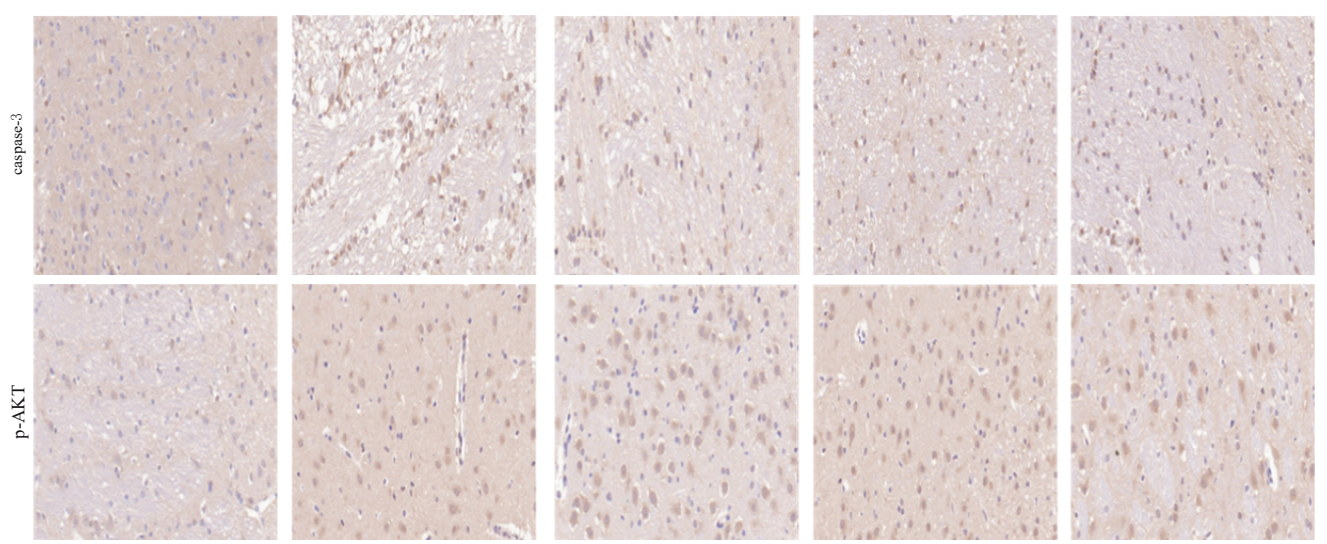
图3　各组大鼠脑组织中炎症指标检测结果（$n=4\sim5$）

3.4 大鼠脑组织中caspase-3、p-AKT蛋白表达的检测结果

与假手术组比较，模型对照组大鼠脑组织中caspase-3蛋白平均光密度值显著升高（$P<0.05$）；与模型对照组比较，尼莫地平片组和中风瘀热方高剂量组大鼠脑组织中caspase-3蛋白平均光密度值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），p-AKT蛋白平均光密度值均显著升高（$P<0.01$或$P<0.05$）。结果见图4、图5。

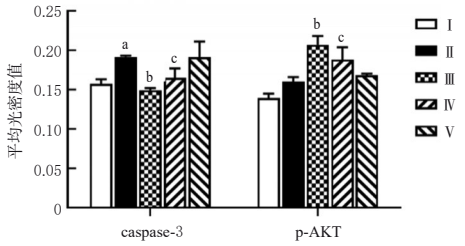
4 讨论

中风瘀热方是神经内科专家多年应用的临床经验方，用于治疗急性脑梗死，可使损伤的神经功能得到改善[4—6]。该方中水牛角清心肝而解热毒，直入血分而凉血，为君药。热盛必伤津，损伤阴血，故以地黄为臣药；地黄味甘、性寒，具有清热凉血、养阴生津的功效。佐药为赤芍和牡丹皮，二者清热凉血、活血散瘀。在此基础上增加了使药石菖蒲和郁金，进一步增强了原方清热开窍、凉血化瘀的功效。



A.假手术组　B.模型对照组　C.尼莫地平片组　D.中风瘀热方高剂量组　E.中风瘀热方低剂量组

图4　各组大鼠脑组织caspase-3、p-AKT蛋白表达免疫组化图（×400）



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型对照组；Ⅲ：尼莫地平片组；Ⅳ：中风瘀热方高剂量组；Ⅴ：中风瘀热方低剂量组；a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型对照组比较，$P<0.01$；c：与模型对照组比较，$P<0.05$。

图5　各组大鼠脑组织caspase-3、p-AKT平均光密度值结果（$n=4\sim5$）

缺血性脑卒中主要由MCAO引起，导致受累区域脑实质损伤，随后出现神经炎症、氧化应激、神经细胞凋亡等一系列反应[12]。研究表明，磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K）和AKT信号通路在发生缺血性脑卒中后的神经细胞中发挥着调节炎症、氧化应激和细胞凋亡等重要的生物学作用[13]。AKT是PI3K/AKT信号通路的下游蛋白，是一种胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，具有保护脑缺血、抗神经细胞凋亡的作用[14]，是已被证实参与细胞凋亡信号通路的重要蛋白。AKT被激活后生成p-AKT，进一步增强神经细胞的抗凋亡能力，促进神经元损伤的修复和再生[15]。本研究采用改良线栓法建立大鼠MCAO模型，通过HE染色进行病理形态学观察。结果表明，与假手术组比较，模型对照组大鼠脑组织表现出明显的神经元大小不一，甚至有丢失，并出现弥散性水肿；同时，模型对照组大鼠脑组织中p-AKT、caspase-3蛋白表达强度较假手术组有升高趋势，这提示中风瘀热方对MCAO模型大鼠的防治作用可能与促进PI3K/AKT信号通路激活有一定关联。

当缺血性脑卒中发生时，炎症因子可破坏促炎反应和抗炎反应间的动态平衡，在缺血性脑卒中的病程中发挥重要作用[16]。TNF-α和IL-6等促炎因子释放入血，会造成神经细胞广泛损伤和血脑屏障破坏。脑指数是反映脑水肿的主要指标，其值高低直接反映脑水肿的严重程度，同时也可反映脑细胞的损伤程度；脾脏作为一种重要的免疫器官，是淋巴细胞迁移和发生免疫应答、免疫效应的重要场所。本研究结果表明，与模型对照组大鼠相比，中风瘀热方各剂量组大鼠脑梗死面积显著减小，脑组织水肿程度减轻，脑指数、脾指数均有不同程度的降低，脑组织和血清中TNF-α、IL-6水平均有降低趋势，进一步说明中风瘀热方干预脑缺血与减少炎症反应有关。

综上所述，中风瘀热方对MCAO模型大鼠有一定的防治作用；其机制可能是通过减少炎症因子TNF-α、IL-6分泌，下调缺血侧脑组织caspase-3蛋白表达，上调缺血侧脑组织p-AKT蛋白表达，从而达到保护神经元的作用。但其发挥作用的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] FARINA M, VIEIRA L E, BUTTARI B, et al. The Nrf2 pathway in ischemic stroke: a review[J]. Molecules, 2021, 26(16): 5001.

[2] 王陇德，毛群安，张宗久，等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战：《中国脑卒中防治报告2018》概要[J]. 中国循环杂志，2019，34(2)：105-119.

[3] KADIR R R A, BAYRAKTUTAN U. Urokinase plasminogen activator: a potential thrombolytic agent for ischaemic stroke[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(3): 347-355.

[4] 龚杰. 基于KATP通道研究瘀热方对缺血性卒中后NVU的保护作用研究[D]. 南京：南京中医药大学，2021.

[5] 承诺. 瘀热方治疗脑梗死后认知功能障碍的临床疗效观察[D]. 南京：南京中医药大学，2022.

[6] 陆语迪. 瘀热方通过调控ROS/NLRP3对瘀热阻窍证急性缺血性脑卒中的脑保护作用研究[D]. 南京：南京中医药大学，2021.

[7] 王云，李琬，彭蕴茹，等. UPLC-Q-TOF-MS/MS技术结合网络药理学探讨中风瘀热方治疗缺血性脑卒中的作用机制[J]. 中药材，2022，45(12)：2905-2911.

[8] 缪晓东. 乳香：没药配伍有效部位的制备工艺研究及其对缺血性中风的保护作用[D]. 南京：南京中医药大学，2020.

[9] LEE J Y, CHOI S Y, OH T H, et al. 17β-estradiol inhibits apoptotic cell death of oligodendrocytes by inhibiting RhoA-JNK3 activation after spinal cord injury[J]. Endocrinology, 2012, 153(8): 3815-3827.

[10] 卢小叶，吕倩忆，李棋龙，等. Zea-longa评分与改良Garcia评分应用于针刺治疗CIRI大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报，2021，41(9)：1356-1360.

[11] 蔡静，黄文静，刘时喜，等. 基于TGF-β1/Smad3信号探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制[J]. 中草药，2020，51(24)：6294-6301.

[12] TRIAS E, BARBEITO L, YAMANAKA K. Phenotypic heterogeneity of astrocytes in motor neuron disease[J]. Clin Exp Neuroimmunol, 2018, 9(4): 225-234.

[13] 蔡亮，张炳东. PI3K/AKT信号通路在脑缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 广西医科大学学报，2021，38(10)：2012-2016.

[14] 陈岩岩，李花，刘旺华，等. 加味四君子汤通过调控Fibulin-5，p-Akt表达抗脑缺血大鼠神经细胞失巢凋亡机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(1)：112-120.

[15] NAMIKAWA K, HONMA M, ABE K, et al. Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration[J]. J Neurosci, 2000, 20(8): 2875-2886.

[16] LIU R R, SONG P P, GU X H, et al. Comprehensive landscape of immune infiltration and aberrant pathway activation in ischemic stroke[J]. Front Immunol, 2021, 12: 766724.

（收稿日期：2023-01-18　修回日期：2023-03-10）
（编辑：舒安琴）