论　著

基于Nrf-2通路探讨蛭龙活血通瘀胶囊对脑出血大鼠氧化应激损伤的机制

梁俊杰[1]，杨　燕[1]，刘天助[2]，徐厚平[3]，刘　平[1]，张　蕾[3]，刘孟楠[1]，杨思进[1,3]
1.西南医科大学附属中医医院 心血管内科（泸州 646000）；2.西南医科大学附属中医医院 神经内科（泸州 646000）；3.西南医科大学附属中医医院，国家中医临床研究基地（泸州 646000）

【摘　要】目的 探究蛭龙活血通瘀胶囊治疗脑出血氧化应激损伤的机制。**方法** 将45只清洁级SD大鼠随机均分为假手术组（Sham组），脑出血模型组（ICH组），蛭龙活血通瘀胶囊组（ZL组）。ICH组及ZL组以自体血注入法造模，造模成功后，ZL组以蛭龙活血通瘀胶囊（1 g·kg^{-1}·d^{-1}）灌胃，ICH组及Sham组以等剂量生理盐水灌胃，喂养7 d后，观察各组大鼠神经功能缺损程度，检测脑组织及血清内氧化因子与抗氧化因子的表达，检测脑海马组织中抗氧化应激相关蛋白表达情况。**结果** 与Sham组相比，ICH、ZL组有明显神经功能缺损，脑组织及血清中抗氧化因子含量降低，氧化因子含量增加，脑组织中核因子E2相关因子2（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf-2）相关通路蛋白表达程度升高；与ICH组相比，ZL的神经功能缺损程度减轻，脑组织及血清中抗氧化因子含量增加，氧化因子含量减少，脑组织中Nrf-2相关通路蛋白表达程度更高。**结论** 蛭龙活血通瘀胶囊能减轻脑出血大鼠的神经功能损伤，缓解脑组织病变，提高大鼠脑出血后Nrf-2相关蛋白表达及脑组织抗氧化能力，减轻脑出血后的氧化应激损伤。

【关键词】蛭龙活血通瘀胶囊；氧化应激；核因子E2相关因子2；脑出血
【中图分类号】R743.34　　**文献标志码**　A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2024.01.010

Mechanism investigation of Zhilong Huoxue Tongyu Capsule on oxidative stress injury in rats with cerebral hemorrhage based on Nrf-2 pathway

LIANG Junjie [1], YANG Yan [1], LIU Tianzhu [2], XU Houping [3], LIU Ping [1], ZHANG Lei [3], LIU Mengnan [1], YANG Sijin [1,3]
1.Department of Cardiovascular Medicine, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2.Department of Neurology, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】Objective To explore the mechanism of Zhilong Huoxue Tongyu capsules in treating oxidative stress injury of cerebral hemorrhage. **Methods** The total of 45 SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), intracerebral hemorrhage model group (ICH group), and Zhilong Huoxue Tongyu capsule administration group (ZL group). ICH group and ZL group were modeld with autologous blood injection method. After successful establishments of the models, ZL group was given Zhilong Huoxue Tongyu capsule (1 g·kg^{-1}·d^{-1}) by gavage, ICH group and ZL group were given an equal dose of normal saline by gavage. After 7 days of feeding, the degrees of neurological impairment in rats in each group were observed, the expression of oxidation factors and antioxidant factors in brain tissue and serum were detected, and the expression of antioxidant stress related proteins in hippocampus tissue were detected. **Results** Compared with the sham group, the ICH and ZL groups showed more severe neurological deficits, lower levels of antioxidant factors in brain tissue and serum, higher levels of oxidative factors, and higher protein expression of nrf-2-related pathways in brain tissue; Compared with the ICH group, ZL group exhibited a reduced degree of neurological deficit, an increased content of antioxidant factors in brain tissue and serum, a reduced content of oxidative factors, and a higher degree of nrf-2-related pathway protein expression in brain tissue. **Conclusion** Zhilong Huoxue Tongyu capsules could reduce nerve function injury and brain tissue lesion in rats with cerebral hemorrhage, improve the expression of Nrf-2 related protein, improve the antioxidant capacity of brain tissue, and reduce the oxidative stress injury after cerebral hemorrhage.

【Key words】Zhilong Huoxue Tongyu Capsules; Oxidative stress; Nrf-2; Cerebral hemorrhage

脑出血（intracerebral hemorrhage，ICH）是一种有极高致死率及致残率的全球性疾病，占所有卒中类型的10% ~20%[1]。在我国，脑出血患者3月致残率及致死率可达40.4% ~ 59.5%，1年致残率及致死率同样高达38.9% ~ 63.9%[2]。损伤机制包括出血直接损伤脑组织和继发性脑损伤（secondary brain injury，SBI）。其中

基金项目：四川省科技计划重点研发项目（2019YFS0543）；四川省中医药管理局基金项目（2020ZD002）
通信作者：杨思进，E-mail:ysjimn@sina.com
引用本文：梁俊杰，杨燕，刘天助，等. 基于Nrf-2通路探讨蛭龙活血通瘀胶囊对脑出血大鼠氧化应激损伤的机制[J]. 西南医科大学学报，2024，47（1），45-50.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2024.01.010

继发性脑损伤包括血脑屏障破坏，血红蛋白诱导的铁超负荷，兴奋性毒性，神经炎症激活，氧化应激和神经细胞死亡/凋亡等病理生理过程[3-4]。氧化应激是一种因自由基和活性氧及其代谢物增加或抗氧化机制减弱而引起炎症反应的一种体内氧化与抗氧化失衡的状态[5]，是脑出血继发性损伤的重要部分。目前西医治疗以清除血肿、促使脑组织修复、防止再出血、控制血压及降低颅内压为主要手段[6]。研究表明，中西医结合治疗脑出血能更大程度恢复神经功能缺损，降低远期致死率及致残率[7]。

脑出血中医称为出血性中风，其关键病机为“阴阳失调，气血逆乱，上泛于脑”。蛭龙活血通瘀胶囊（简称蛭龙胶囊）就是基于玄府理论，由杨思进教授团队研发，用以防治心脑系统疾病的中药制剂，具有益气活血、化瘀通络之效[8]，能补元气，通血脉，开玄府，调升降[9]。前期研究表明蛭龙胶囊有调节血脂[10]、抗动脉粥样硬化[11-12]、抗炎[10,13]、保护血管内皮[13-14]、抑制心室重构[15]、减轻血脑屏障损伤等作用[16-18]，在治疗脑出血时，能通过抗炎、延缓细胞凋亡、调控水通道蛋白表达等途径改善血脑屏障、保护脑神经、减轻脑水肿[19-22]。氧化应激损伤是脑出血后继发性脑损伤的重要组成部分，核因子E2相关因子2（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf-2）信号通路是抗氧化应激损伤的重要通路，但蛭龙胶囊对于脑出血后氧化应激损伤是否有治疗作用尚未见相关研究。因此本研究拟观察蛭龙胶囊治疗脑出血模型大鼠神经功能缺损情况，检测脑组织中丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）等氧化应激相关指标以及脑组织内Nrf-2、血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）、醌氧化还原酶-1（quinone oxidoreductase-1，NQO-1）的蛋白表达水平，以探讨蛭龙胶囊通过Nrf-2通路对脑出血的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验药物制备

蛭龙胶囊由黄芪、大血藤、桂枝、水蛭、地龙五味中药材采取蛭龙胶囊新工艺[23]制备而成。制备方法：水蛭、地龙采用乙醇进行浸泡提取，制备滤液备用；水蛭、地龙制备后的药物残渣同黄芪、大血藤、桂枝采用水煎煮提取，共煎2次，混合所得煎液；将乙醇提取滤液与水煎提取煎液混合并过滤。对混合后药液进行减压浓缩，得到浸膏，采用糊精为母核，沸腾制粒，粉碎成粉，装成胶囊即得。批准文号：川药字Z20070528，规格0.4 g×48粒/瓶，由西南医科大学附属中医医院制剂室提供。

1.2 实验动物

清洁级3月龄雄性健康SD大鼠45只（250±20 g），由西南医科大学动物实验中心提供，实验动物生产许可证号：SCXK（川）2018-17，经适应性喂养，饮食、饮水正常、无不良反应者，纳入实验。本研究经西南医科大学动物实验伦理中心审批（编号：20211111-002）。

1.3 实验药物、试剂及仪器

药物：蛭龙胶囊（0.4 g/粒，西南医科大学附属中医院制剂室）。试剂：BCA蛋白浓度测定试剂盒（P0009，Beyotime），DAB试剂盒（ZLI-9018，北京中杉金桥生物有限公司），HO-1抗体大鼠兔克隆抗体（ab85309，Abcam），NQO-1抗体大鼠兔克隆抗体（A19586，Abclonal），Nrf-2抗体大鼠兔克隆抗体（A1244，Abclonal），β-actin抗体大鼠兔克隆抗体（AC026，Abclonal），生物素化山羊抗兔IgG（H+L）（S0001，affinity），二抗兔克隆抗体（GB23303，Servicebio），总蛋白（TP）测定试剂盒（A045-2，南京建成生物工程研究所），超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒（A001-3，南京建成生物工程研究所），丙二醛（MDA）测定试剂盒（A003-1，南京建成生物工程研究所），谷胱甘肽（GSH）测定试剂盒（A006-1-1，南京建成生物工程研究所）。仪器：电泳仪（JY200C，北京君意东方电泳设备有限公司），酶标仪（Spectra MAX Plus384，美谷分子仪器有限公司），UV752N紫外可见分光光度计（UV752N，上海佑科仪器仪表有限公司），化学发光凝胶成像仪（5200，上海天能科技有限公司），数码三目摄像显微摄像系统（BA400 Digital，麦克奥迪实业集团有限公司）。

1.4 动物模型的建立和分组

脑出血模型造模采用自体血注入法：造模前大鼠禁食8 h后称重，以戊巴比妥钠麻醉（40 mg/kg），待麻醉成功，暴露大鼠颅顶，备皮常规消毒后，大鼠以俯卧位固定于脑立体定位仪上，取前囟点中线，靠右侧旁开3.0 mm，沿矢状面向后1.5 mm，牙科钻钻透颅骨，深度至硬脑膜，不伤及脑实质。鼠尾消毒后，于尾根部抽取大鼠自体血约100 μL。于颅骨骨孔方向，垂直进针约5 mm，缓慢注入100 μL自体血液，注血时间10 min，后留针15 min。骨蜡封闭颅骨骨孔，经逐层缝合后，头皮消毒。其中Sham组只穿刺，不注血。

分组及给药：将大鼠编号后按照随机数字表法分为Sham组，ICH组，ZL组，每组各15只。ICH模型评定方式采用Longa评分评定，分值介于1至3分的记作造模成功，Sham组大鼠造模后无神经功能损伤体征记为造模成功，造模成功者计入实验，造模失败者予以相应补充。造模成功后，ZL组以蛭龙胶囊（1 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$），溶解于0.9%生理盐水中，连续灌胃7 d，Sham组及ICH组大鼠给予等剂量生理盐水灌胃7 d。

1.5 水迷宫实验检测神经功能

水迷宫实验于喂养第3 d开始适应性训练，为期4 d，每天进行4次，每次间隔2 h。将大鼠面向池壁放入水

池中游泳2 min，记录爬上平台时间，记为逃避潜伏期，若2 min内大鼠未爬上平台，则逃避潜伏期记为120 s；实验2 min内爬上平台次数记为穿越平台次数。第7 d进行正式实验，实验步骤同适应性实验，记录各组大鼠的逃避潜伏期及穿越平台次数。

1.6 免疫组化染色观察大鼠脑组织Nrf-2表达情况

处死各组大鼠，留取脑组织，置于4%多聚甲醛中固定24 h，常规石蜡包埋、切为4 μm厚切片，经二甲苯脱蜡及不同浓度乙醇水化后，浸入柠檬酸盐缓冲液中处理30 min，PBS漂洗3次后用3%的过氧化氢溶液于室温处理10 min，随后PBS清洗3次，每次5 min。滴加山羊血清封闭液，室温20 min；滴加一抗（Nrf-2，Abclonal，1:50稀释），4 ℃过夜；PBS洗3次，每次5 min；滴加二抗（兔克隆抗体，Servicebio，1:100稀释），37 ℃孵育30 min；PBS洗3次，每次5 min；经DAB显色、苏木素复染、返蓝、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下每张切片随机选取3个高倍镜视野（×400）观察计数，以细胞出现棕色染色为Nrf-2阳性细胞，取阳性细胞比率进行统计学分析。显微摄像系统对切片进行图像采集，使用Halo数据分析系统计算每张图像阳性面积占比。

1.7 Elisa检测大鼠脑皮质组织相关氧化应激指标含量

给药7 d后处死大鼠，经心尖取血1 mL，取大鼠脑皮质组织，ELISA法检测血清、脑皮质组织SOD活性及MDA、GSH含量，具体步骤依据如下：处死大鼠后，经心尖取血1 mL，3 000 r/min离心10 min，取上清液待检；脑组织分离灶周2 mm组织，经过清洗、称重、捣碎后，制备组织匀浆，离心，取上清液备用。标准品充分荡匀并稀释，蒸馏水50倍稀释制备洗涤缓冲液，同时全部溶液充分摇匀备用，96孔板检测，标准品和样品均采用复孔。稀释后的标本置入50反应孔内添加50 μL稀释好的标准品和50 μL样品，迅速滴入50 μL生物素标记抗体。覆膜后振荡均匀，室温放置3 h。清除孔内液后以洗涤液填充摇匀30 s，用吸水纸吸干洗涤液，重复洗涤3次。每个反应孔内分别加入两组试剂各50 μL，充分混合，在37 ℃温度中温育20 min，同时避光，取下酶标板，将终止液快速加入，每孔50 μL，完成后迅速使用酶标仪于450 nm波长处检测每个反应孔的OD值。制作曲线，以横坐标（X）表示检测物质标准品浓度，纵坐标（Y）表示吸光度OD值。根据OD值由标准曲线换算待测蛋白分子含量浓度。

1.8 Western Blot检测大鼠脑海马组织

Nrf-2、HO-1、NQO-1蛋白质表达：取大鼠海马脑组织，加入RIPA裂解液，4 ℃下制备组织匀浆。BCA试剂盒测定蛋白浓度，根据所测蛋白浓度计算上样体积。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，PVDF转膜。5%脱脂牛奶室温封闭1 h，分别加一抗Nrf-2（1:1 000）、HO-1（1:1 000）、NQO-1（1:2 000）及β-actin（1:50 000）4 ℃孵育过夜，用TBST将PVDF膜洗3次，每次5 min。第2 d加二抗室温孵育3 h，用TBST洗PVDF膜3次，每次10 min。用天能GIS机箱控制软件V2.0对条带进行曝光扫描，Image J软件对光密度值进行分析，检测Nrf-2、HO-1、NQO-1蛋白表达水平，以β-actin为内参比较，得出各蛋白表达水平。

1.9 统计学分析

应用GraphPad Prism 8.0软件进行统计，计量数据以平均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多样本均数间比较采用One-Way ANOVA检验，两两比较采用LSD法，$P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蛭龙胶囊对脑出血大鼠神经功能的影响

与Sham组比较，ICH及ZL组大鼠的逃避潜伏期升高，穿越平台次数降低（$P < 0.05$）。ZL组的逃避潜伏期低于ICH组，穿越平台次数高于ICH组（$P < 0.05$），见表1。

表1 各组大鼠水迷宫实验结果比较（$\bar{x} \pm s$）

Table1 Comparison of water maze test results of rats in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数(次)
Sham	12	31.37 ± 1.26	5.58 ± 1.26
ICH	12	60.98 ± 3.60^{a}	2.92 ± 0.95^{a}
ZL	12	41.00 ± 3.20^{ab}	4.33 ± 1.03^{ab}

注：a表示与Sham组比较，$P < 0.05$；b表示与ICH组相比，$P < 0.05$。

2.2 蛭龙胶囊对脑出血大鼠脑组织细胞Nrf-2蛋白免疫组化染色的影响

阴性染色细胞核为蓝色，Nrf-2阳性表达为棕黄色。Sham组大鼠脑组织神经细胞有序排列、整体组织致密，仅有较少组织疏松和Nrf-2蛋白染色；ICH组神经细胞整体排列疏松，散在Nrf-2蛋白染色的阳性细胞；ZL组神经细胞排列较为致密，可见散在疏松、空泡，及大量阳性染色细胞，见图1。与Sham组相比，ICH组大鼠脑组织Nrf-2蛋白表达增加，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），ZL组大鼠脑组织Nrf-2蛋白表达水平升高，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。与ICH组相比，ZL组大鼠脑组织Nrf-2蛋白表达水平升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表2。

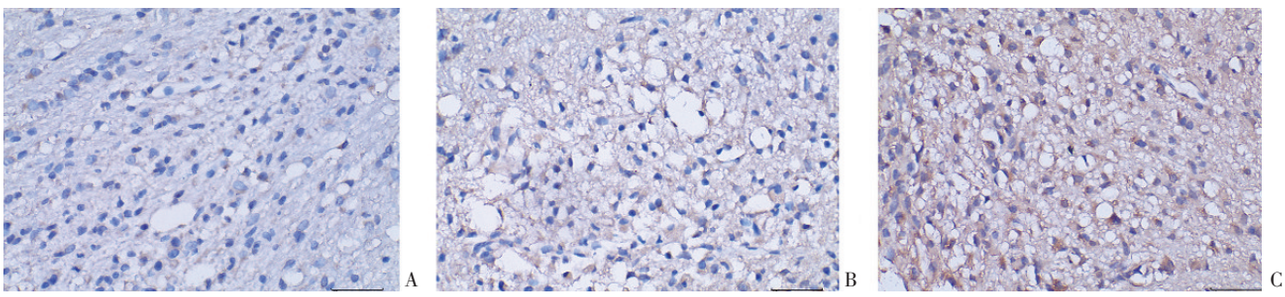


图1 蛭龙胶囊对大鼠脑组织Nrf-2蛋白免疫组化染色的影响

Figure 1 Effects of Zhilong capsule on immunohistochemical staining of Nrf-2 protein in rat brain tissues

注：A：假手术组（Sham组）；B：脑出血模型组（ICH组）；C：蛭龙胶囊组（ZL组）。

表2 大鼠脑组织Nrf-2免疫组化染色阳性面积占比（$\bar{x} \pm s$）

Table 2 Proportion of positive area of Nrf-2 immunohistochemical staining in rat brain tissues（$\bar{x} \pm s$）

组　别	n	阳性面积占比
Sham	3	2.79 ± 1.74
ICH	3	4.89 ± 1.40
ZL	3	8.656 ± 2.39[ab]
F		15.62
P		0.0042

注：a表示与Sham组相比，$P < 0.01$；b表示与ICH组相比，$P < 0.05$。

2.3 蛭龙胶囊对脑出血大鼠血清及脑皮质组织的SOD活性及MDA、GSH含量的影响

与Sham组比较，ICH组及ZL组脑出血大鼠大脑皮质中MAD含量上升（$P < 0.01$），SOD活性和GSH的含量下降（$P < 0.05$）。与ICH组比较，ZL组皮质中MDA含量下降（$P < 0.01$），SOD活性、GSH含量上升（$P < 0.05$）。与Sham组比较，ICH组及ZL组脑出血大鼠血清中MDA的含量上升（$P < 0.01$），SOD活性和GSH含量下降（$P < 0.05$）。与ICH组比较，ZL组血清中MDA含量下降（$P < 0.01$），SOD活性、GSH含量上升（$P < 0.01$），见表3。

表3 各组大鼠脑组织及血清氧化应激指标（$\bar{x} \pm s$）

Table 3 Oxidative stress index of brain tissue and serum of rats in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	SOD活性（U/mgprot）		MDA（nmol/mgprot）		GSH（mgGSH/gprot）	
	皮质	血清	皮质	血清	皮质	血清
Sham	57.63 ± 3.44	229.13 ± 12.31	1.95 ±0.19	2.92 ± 0.64	0.43 ± 0.05	2.88 ± 0.23
ICH	41.57 ± 1.38[a]	177.66 ± 6.86[a]	5.50 ± 0.52[a]	9.18 ± 0.82[a]	0.23 ± 0.02[a]	1.69 ± 0.24[a]
ZL	49.06 ± 0.72[ab]	202.67 ± 7.72[ab]	3.07 ± 0.12[ab]	6.08 ± 1.10[ab]	0.30 ± 0.02[ab]	2.30 ± 0.21[ab]
F	54.31	30.79	122.7	50.91	34.23	28.27
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

注：a表示与Sham组相比，$P < 0.01$；b表示与ICH组相比，$P < 0.05$。

2.4 蛭龙胶囊对脑出血大鼠脑海马组织氧化应激指标的蛋白表达的影响

各组大鼠脑海马组织指标比较：与Sham组相比，其余两组脑出血大鼠氧化应激指标Nrf-2、NQO-1、HO-1的蛋白表达均有明显上升（$P < 0.05$）；与ICH组相比，ZL组的Nrf-2、NQO-1、HO-1蛋白表达水平更高（$P < 0.05$），见表4、图2。

表4 大鼠脑海马组织Nrf-2、HO-1、NQO-1蛋白的表达（$\bar{x} \pm s$）

Table 4 Expression of Nrf-2, HO-1 and NQO-1 proteins in hippocampus of rats（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Nrf-2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO-1/β-actin
Sham	3	1.05 ± 0.05	1.1714 ± 0.16	0.8593 ± 0.13
ICH	3	1.37 ± 0.07[a]	1.5523 ± 0.12[a]	1.2270 ± 0.10[a]
ZL	3	1.68 ± 0.12[ab]	1.8558 ± 0.08[ab]	1.7526 ± 0.15[ab]
F		43.46	24.65	37.18
P		0.0003	0.0013	0.0004

注：a表示与Sham组相比，$P < 0.05$；b表示与ICH组相比，$P < 0.05$。

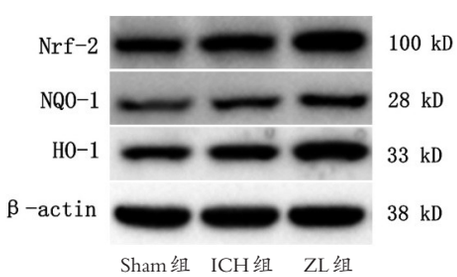


图2 蛭龙胶囊对大鼠ICH模型脑海马组织Nrf-2及相关蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of Zhilong capsule on expression of Nrf-2 and related proteins in hippocampus of rats with ICH model

3 讨论

脑出血属于传统医学中的“中风”病，近代又提出了“出血性中风”的病名。杨思进教授总结历史各大医家理论并结合自身多年临床经验，提出“瘀血毒水、玄府闭塞”为其基本病机[24]，根据“血不利则为水”“离

经之血便为瘀”等中医经典理论[25]创立了“开玄启闭”治疗心脑血管疾病的方法。蛭龙胶囊是杨思进教授团队在玄府理论基础上研究而成，全方以黄芪为君，大补肺脾之元气，兼有利水之功，《神农本草经》中谓其治“大风癞疾”；《神农本草经》中谓水蛭能逐恶血，瘀血，利水道[26]，用水蛭一则能逐其瘀血，二则能通利水邪；地龙一可通血络，二可开玄府；大血藤则助水蛭、地龙活血通络，三者共为臣药。桂枝为使药，助君药黄芪一使元气上入脑府，二使瘀血浊毒下行二腑；与水蛭、地龙、大血藤同用，辛温助其行，增强诸药通络开玄之功。全方配伍精当，药简力宏，有益气活血、化瘀通络之功。脑出血后的SBI机制以继发性脑缺血、炎症反应、氧化应激损伤、凝血酶的毒性作用、神经细胞的自噬和凋亡[3]等为主，这与中医出血性中风后产生的瘀、血、毒、水等病理产物导致[27]的损伤有共通性。氧化应激反应与炎症反应、神经细胞凋亡等SBI机制紧密相关，是脑出血继发性损伤的重要部分。

在脑组织损伤后，红细胞的裂解及毒性产物的产生能诱导自由基与某些分子相互作用形成活性自由基，从而对机体造成损伤。机体自身的抗氧化防御系统可以通过抗氧化剂的产生而抵抗损伤。抗氧化剂能与自由基相互作用，通过保护机体的重要分子阻断相关级联反应。脑出血后血肿形成，血液内红细胞裂解，血管损伤，炎症反应等均能广泛产生微血管超氧自由基。这些超氧自由基主要由羟基自由基、超氧阴离子、过氧化氢等构成。ROS能在生理状态下作为部分信号通路的转导因子，高浓度的ROS则能对脂质和蛋白产生氧化反应，这些氧化反应会破坏细胞结构完整，损坏信号转导通路，影响线粒体能量代谢，甚至导致DNA的损毁而造成细胞死亡[5,28]。清除超氧自由基可降低创伤后超氧自由基水平，防止微血管自我调节功能的丧失，减少细胞结构损毁及死亡[29]。Nrf-2是抗氧化应激的经典通路的激活蛋白，其相关通路激活后有治疗心、脑、肾、肝、神经系统相关损伤，抗衰老，抗癌等临床作用[30]。相关研究表明脑出血后Nrf-2蛋白的激活能有效减少脑出血后的继发性脑损伤[31]。当抑制Nrf-2表达后，脑出血模型大鼠死亡率升高，神经功能缺损加重，炎性产物增加，抗氧化相关蛋白（HO-1、NQO-1）表达减少[32]。本研究中，ZL组大鼠脑组织免疫组化切片可见较其他组更多的Nrf-2蛋白阳性表达，表明Nrf-2相关通路激活。NQO-1、HO-1均为Nrf-2的下游靶蛋白，ZL组大鼠脑海马组织NQO-1、HO-1蛋白表达量增加，表示Nrf-2/HO-1通路激活，发挥其对神经系统的保护作用。HO-1蛋白是脑出血后抗氧化应激的重要蛋白，有研究表明其能反映ICH急性期的脑组织水肿及神经功能损伤程度[33]。脑出血后血红蛋白的裂解能产生一系列氧自由基，促使细胞凋亡及坏死[34]。而HO-1蛋白的表达能对抗细胞凋亡及产生的坏死因子，将血红蛋白转化为铁、一氧化碳和胆红素[35]，以减少血红蛋白与自由氧结合，进而减轻血管内皮细胞和大脑胶质细胞受到的氧化损伤。同时HO-1蛋白还能激活相关抗氧化应激因子（过氧化氢酶、谷胱甘肽），清除MDA等氧化产物起到抗氧化作用[36]。MDA是氧化应激产生的下游产物，是一种细胞毒性物质，脑出血后的氧化应激过程中，会产生大量MDA，其通过诱发神经细胞凋亡及消耗抗氧化物质从而加重脑组织损伤[37]。ZL组脑组织及血清中MDA含量均较ICH组减少，表明蛭龙胶囊能减少氧化应激毒性产物产生。SOD、GSH是抗氧化应激的重要分子，能清除自由基及阻断其后续的脂质过氧化反应和细胞损伤[37]，从而保护神经细胞及其功能。ZL组、ICH组较Sham组的血清及脑组织有更高的SOD、GSH含量，表明脑出血后机体自身抗氧化应激机制的激活，ZL组抗氧化应激因子含量较ICH组更高，表明蛭龙胶囊能增加脑出血大鼠抗氧化应激因子的生成。ZL组血清中毒性产物及抗氧化因子含量均高于大脑皮质，与中医理论的瘀血毒水致病理论有一定共通性，为后续外周血清检测相关氧化指标及临床治疗提供一定实验依据。

蛭龙活血通瘀胶囊由黄芪、水蛭、地龙、桂枝、大血藤五味中药制成。现代药理研究表明，黄芪能抗衰老、抗肿瘤、抗氧化、调节免疫[38]；水蛭能抗凝血、抗血栓、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤[39]；桂枝有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和抗菌等作用[40]；大血藤能抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、调节免疫[41]；地龙能降压、抗肿瘤、增强免疫、抗炎、抗纤溶[42]。而ICH后炎性反应、氧化应激损伤是神经功能进行性损害的主要原因[43]。ICH后大量血细胞破裂导致凝血相关毒性物质生成，是氧化应激和炎症反应的重要诱因，活化的小胶质细胞，浸润后的白细胞及巨噬细胞等分泌的促炎因子也会导致炎症反应产生和加重[44]。脑出血后氧自由基产生会激活大量炎症细胞并伴随炎性因子如TNF（tumor necrosis factor）、IL-1β（interleukin-1β）的释放，这些炎症因子也能产生各种自由基，从而加重氧化应激损伤[45]。炎症细胞活化浸润，大量的炎症因子、趋化因子生成，过量的炎症因子可活化NF-κB（nuclear factor kappa-B）信号通路。而NF-κB信号通路的活化可抑制Nrf-2相关的抗氧化应激途径，进而加重氧化应激损伤[46]。结合现代药理研究，蛭龙胶囊中的药物有效成分可能通过抗炎、抗氧化应激、抗凝血相关毒性物质等多途径起到对脑出血的治疗作用。

4 结论

蛭龙活血通瘀胶囊能明显提高Nrf-2相关蛋白的表达，增加血清及脑组织中抗氧化因子含量，降低毒性

产物含量，减轻脑出血后氧化应激损伤，进而改善神经功能缺损。其机制可能是通过激活Nrf-2相关信号通路来完成，但具体分子机制还需进一步验证。

5 参考文献

[1] AN S J, KIM T J, YOON B W. Epidemiology, risk factors, and clinical features of intracerebral hemorrhage: an update[J]. Journal of Stroke, 2017, 19(1): 3-10.
[2] WU S M, WU B, LIU M, *et al*. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. The Lancet. Neurology, 2019, 18(4): 394-405.
[3] SHAO L Q, CHEN S C, MA L.Secondary brain injury by oxidative stress after cerebral hemorrhage: recent advances[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2022, 16: 853589.
[4] TSCHOE C, BUSHNELL C D, DUNCAN P W, *et al*. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets[J]. Journal of Stroke, 2020, 22(1): 29-46.
[5] QU J, CHEN W X, HU R, *et al*. The injury and therapy of reactive oxygen species in intracerebral hemorrhage looking at mitochondria[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016:2592935.
[6] SHEN Z K, WANG L K, WU G F, *et al*. Computed tomographic black hole sign predicts postoperative rehemorrhage in patients with spontaneous intracranial hemorrhage following stereotactic minimally invasive surgery[J]. World Neurosurgery, 2018, 120: e153-e160.
[7] 高利.高血压性脑出血急性期中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国全科医学, 2016, 19(30): 3641-3648.
[8] 刘孟楠，刘平，杨思进.蛭龙活血通瘀胶囊防治动脉粥样硬化性疾病作用机制的研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(4): 388-390.
[9] 杨思进，董丽，罗钢，等.基于“玄络”新概念创新运用风药开玄法防治心脑疾病[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(19): 3490-3494.
[10] LIU M N, LUO G, LIU T Z, *et al*. Zhilong Huoxue Tongyu capsule alleviated the pyroptosis of vascular endothelial cells induced by ox-LDL through miR-30b-5p/NLRP3[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 3981350.
[11] 刘孟楠，杨思进，刘平，等. 蛭龙活血通瘀胶囊联合阿托伐他汀钙对家兔颈动脉粥样硬化斑块的组织学影响[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(6): 518-522.
[12] 董丽，江云东，潘洪，等. 蛭龙活血通瘀胶囊治疗颈动脉硬化患者的临床疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 234-238.
[13] 李洋，刘炳，白雪，等. 益气祛风通络法对冠心病PCI术后患者血管炎性反应和内皮功能的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(2): 200-206.
[14] 李小林，杨思进，白雪. 蛭龙活血通瘀胶囊对心肌梗死大鼠内皮祖细胞动员[J]. 泸州医学院学报, 2014, 37(4): 401-403.
[15] 罗钢，宋震宇，杨廷富，等. 心脏磁共振评价益气祛风通络法对气虚血瘀型慢性心衰患者心肌重塑的影响[J].西南医科大学学报, 2020, 43(6): 571-575.
[16] 耿路，廖慧玲.蛭龙活血通瘀胶囊防治急性缺血性卒中出血性转化作用机制的研究进展[J].西南医科大学学报, 2021, 44(1): 91-95.
[17] 汤润，张娟，任维，等. 蛭龙活血通瘀胶囊防治心血管疾病研究进展[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3):237-240.
[18] 张娟，汤润，任维，等. 蛭龙活血通瘀胶囊防治脑部疾病研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2569-2573.
[19] 王蔚，杜渊，钟霞，等. 蛭龙活血通瘀胶囊对脑出血大鼠血脑屏障通透性及紧密连接蛋白的影响[J]. 广西中医药, 2021, 44(5): 72-76.
[20] 王蔚，杜渊，王洪连，等. 蛭龙活血通瘀胶囊通过Rho/ROCK通路改善脑出血后脑水肿的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 142-147.
[21] 王蔚，钟霞，杜渊，等. 蛭龙活血通瘀胶囊对模型大鼠脑出血后脑组织水肿及ZO-1、Occludin的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(12): 2084-2086, 2096.
[22] 王蔚，杜渊，王洪连，等. 蛭龙活血通瘀胶囊对脑出血大鼠血清炎性因子的影响[J]. 广西中医药, 2020, 43(2):65-68.
[23] 刘孟楠，任维，张伟，等. 蛭龙活血通瘀胶囊抑制NLRP3炎症小体活化抗U937巨噬细胞焦亡的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 156-161.
[24] 董丽，张德绸，江云东，等.“风药开玄”理论在脑病治疗中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4933-4934.
[25] (汉)张仲景. 金匮要略[M]. 第二军医大学出版社, 2012.
[26] (三国)吴普. 神农本草经[M]. 第二军医大学出版社, 2012.
[27] 刘小江，李军，管义祥. 抑制MicroRNA-27b调控Nrf2/ARE信号通路对高血压性脑出血大鼠模型脑损伤的机制研究[J]. 河北医学, 2020, 26(1): 76-80.
[28] FORRESTER S J, KIKUCHI D S, HERNANDES M S, *et al*. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. Circulation Research, 2018, 122(6): 877-902.
[29] ZHANG C Y, REN X M, LI H B, *et al*. Simvastatin alleviates inflammation and oxidative stress in rats with cerebral hemorrhage through nrf2-are signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6321-6329.
[30] 郭瑞俊，郭佩俊，韩云彪，等. 基于氧化应激探讨Nrf2/HO-1信号通路与临床疾病关系研究进展[J]. 河北医药, 2022, 44(20): 3157-3162.
[31] 李奕，袁月，丁子惠，等. 核因子E2相关因子2在脑出血中的研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(2): 460-463.
[32] 张曼青，陈志颖，鲍兵，等. Nrf2-ARE信号通路对脑出血灶周神经保护作用的机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(7): 580-585.
[33] 王欢欢，王刚，仲婷婷，等. 脑原位缺血预处理通过Nrf2/HO-1信号通路减轻大鼠缺血再灌注损伤[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1477-1481.
[34] TAN X, YANG Y, XU J G, *et al*. Luteolin exerts neuroprotection via modulation of the p62/Keap1/Nrf2 pathway in intracerebral hemorrhage[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1551.
[35] WEI C C, KONG Y Y, LI G Q, *et al*. Nicotinamide mononucleotide attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-13.
[36] CHEN-ROETLING J, REGAN R F. Targeting the Nrf2-heme oxygenase-1 axis after intracerebral hemorrhage[J].Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(15): 2226-2237.
[37] 王红磊，韦红巧，李祝森，等. 绿茶多酚对急性脑出血大鼠抗氧化能力及神经细胞凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(15): 2048-2052.
[38] 刘颖，张金莲，邓亚羚，等. 黄芪多糖提取、分离纯化及其药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 6035-6038.
[39] 姜秋，王玲娜，刘谦，等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5806-5816.
[40] 徐锋，王德健，王凤，等. 桂枝挥发油的药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4653-4657.
[41] 赵秀梅，柯洪琴，于慧斌. 大血藤药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医药导报, 2014, 20(11): 41-43.
[42] 李思维，郝二伟，杜正彩，等. 广地龙化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2560-2571.
[43] ARONOWSKI J, ZHAO X R. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury[J]. Stroke, 2011, 42(6): 1781-1786.
[44] WANG J A, DORÉ S. Inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2007, 27(5): 894-908.
[45] HU X M, LEAK R K, SHI Y J, *et al*. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair[J]. Nature Reviews Neurology, 2015, 11(1): 56-64.
[46] SAHA S, BUTTARI B, PANIERI E, *et al*. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5474.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2023-01-29;修回日期:2023-08-14)