

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.14.015

实验研究

基于肝功能安全剂量选择的脑络欣通复方对脑缺血再灌注模型大鼠血管新生及局部脑血流量的影响

谭辉, 王键*, 尹婷婷, 胡建鹏, 王京华, 何玲, 徐伟

(安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室, 安徽省合肥市梅山路 103 号, 230038)

[摘要] 目的 探讨脑络欣通复方对脑缺血再灌注 (MCAO/R) 模型大鼠血管新生及局部脑血流量 (rCBF) 的影响及可能作用机制。方法 160 只 Wistar 大鼠, 70 只随机分成正常组、低剂量正常组、中剂量正常组、高剂量正常组、低剂量诱发组、中剂量诱发组和高剂量诱发组各 10 只, 各剂量正常组与诱发组大鼠分别给予 400 mg/kg、800 mg/kg、1000 mg/kg 的脑络欣通复方溶液 1 ml/ (100 g · d) 灌胃, 连续灌胃 7 天后各诱发组大鼠采用 50% CCl₄-橄榄油溶液腹腔注射, 诱发完成 24h 后检测各组大鼠肝功能包括血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和白蛋白 (Alb) 水平, 以筛选安全剂量; 90 只随机分为假手术组、模型组和脑络欣通组各 30 只, 模型组和脑络欣通组采用线栓法制作 MCAO/R 模型, 根据安全剂量实验结果灌胃给予脑络欣通组安全剂量药液, 分别于灌胃第 3、7、14 天检测各组大鼠脑组织匀浆血小板生成素 (TPO)、内皮素 (ET) 水平以及血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 并动态观察 rCBF。结果 与正常组、低剂量正常组、中剂量正常组比较, 高剂量正常组及各诱发组大鼠 ALT、AST 均升高, LDH、Alb 均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中剂量诱发组比较, 高、低剂量诱发组 ALT、AST 升高, Alb 降低 ($P < 0.01$), 故以中剂量 800mg/kg 为安全剂量。与假手术组比较, 模型组 TPO 和 ET 水平明显升高, VEGF 蛋白表达增加, rCBF 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络欣通组 TPO 和 ET 水平显著降低, VEGF 蛋白表达增加, rCBF 明显恢复 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脑络欣通组不同时间点比较, TPO、ET 第 7、14 天较第 3 天水平明显下降, VEGF 蛋白表达第 7、14 天较第 3 天增加, rCBF 第 14 天较第 3 天显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 脑络欣通复方可通过调节模型大鼠凝血纤溶调节因子、VEGF 以及促进血管新生而改善血流状态、提高局部脑血流量, 挽救缺血半暗带神经元, 进而发挥对缺血性脑血管病的治疗作用。

[关键词] 脑缺血再灌注; 脑络欣通复方; 血小板生成素; 内皮素; 血管内皮生长因子; 脑血流量

脑络欣通复方是著名新安医家王乐甸先生临床经验方, 为新安医学益气活血法的代表方, 用药精当, 组方严谨, 针对缺血性脑血管病疗效显著^[1-2]。本研究通过观察脑络欣通复方对四氯化碳 (CCl₄) 诱发急性肝损伤模型大鼠肝功能的影响来探索其实验用适当剂量, 继而研究其对大脑中动脉闭塞模型大鼠脑缺血再灌注 (MCAO/R) 损伤后

微血管新生的影响。选择丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和白蛋白 (Alb) 为切入点, 观察不同剂量脑络欣通复方对肝功能的影响, 选择合适剂量; 并以内皮素 (ET)、血小板生成素 (TPO)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及局部脑血流量 (rCBF) 为检测指标, 观察其对 MCAO/R 大鼠血管新生及局部血液供应的影响并探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 160 只, 16 ~ 18

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAI26B00); 国家中医药管理局全国中医学术流派传承工作室建设项目 [国中医药人教函 (2012) 228 号]; 安徽省教育厅 2016 年度高校自然科学研究项目 (KJ2016A404)

* 通讯作者: 13695602939@163.com, (0551) 65169060

周龄, 体重 250 ~ 300 g, 安徽医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (皖) 2011-002。独立送风隔离笼具 (康为 IR60) 饲养, 笼内温度控制在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%。

1.2 主要试剂和仪器

ET、TPO ELISA 试剂盒 (上海源叶科技有限公司, 批号分别为 20130302A、20130306A), ALT、AST、LDH、Alb 试剂盒 (四川 Maker 生物科技有限公司, 批号分别为 0112121、0112091、0412091、1011041), 橄榄油 (中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: 080321), VEGF 单克隆抗体、正常山羊血清封闭液、生物素化山羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 TC1377、TC1467、DD1640)。

IKA-HB10 旋转蒸发仪, 郑州长城科工贸有限公司; 7020 全自动生化仪, 日立高科技贸易 (上海) 有限公司; Sigma 2-46PK 冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; FD-1C-50 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; Thermo-4510 酶标仪, 美国热电公司; CHR-III 双极电凝器, 上海 Fisher 实验器材有限公司; PeriFlux 5000 激光多普勒仪, 瑞典 Perimed (中国) 公司; 102 型中速定性滤纸, 上海美墅化学制品有限公司。

1.3 药物

脑络欣通复方由黄芪、红花、三七、川芎、蜈蚣、当归、天麻组成, 按 15 : 5 : 2 : 3 : 1 : 5 : 5 比例共 502.2 g 中药饮片 (购于安徽中医学院国医堂门诊部) 于中药粉碎机内制成药粉, 加蒸馏水 1600 ml 于自动煎药机中煎煮 60 min, 自然冷却, 过滤。冷冻离心机离心去滓 (4°C , $4000 \times g$, 5 min), 旋转蒸发仪低压低温 ($< 45^\circ\text{C}$) 浓缩至 197 ml, 于冷冻干燥机内低温真空 (-45°C , $< 20\text{Pa}$) 制成脑络欣通冻干粉共 51.3 g, 计算产出率为 10.22%。将脑络欣通冻干粉分别配制成浓度分别为 40、80、100 mg/ml 的溶液。

2 方法

2.1 脑络欣通复方安全剂量实验

2.1.1 动物分组与处理 70 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分成正常组、低剂量正常组、中剂量正常组、高剂量正常组、低剂量诱发组、中剂量诱发组和高剂量诱发组, 每组 10 只。各低、中、高剂量正常组与诱发组大鼠分别给予 400 mg/kg、800 mg/kg、1000 mg/kg 脑络欣通溶液, 按 1 ml/(100 g · d) 灌胃给药。参照文献 [3-4], 各诱发

组大鼠在连续 7 天灌胃给药后以 3 ml/kg 剂量腹腔注射 50% CCl_4 -橄榄油溶液, 各正常组大鼠灌注等体积生理盐水, 诱发完成 24 h 后采集标本。

2.1.2 观察指标及方法 各组大鼠腹主动脉采血, 冷冻离心机 (4°C , $2000 \times g$, 10 min) 离心收集血清, -70°C 保存。运用全自动生化仪检测各组大鼠血清 ALT、AST、LDH 和 Alb 含量。常规清洗、校准仪器, 各样本取 450 μl 于消毒 EP 管内, 按顺序放入样品盘, 操作严格按试剂盒说明书进行。

2.2 脑络欣通复方作用机理实验

2.2.1 动物分组与模型制备 90 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分成假手术组、模型组、脑络欣通组, 每组 30 只。模型组和脑络欣通组大鼠参照 EZLonga 法^[5]改良制备脑缺血模型。1.5 号红狼牌尼龙鱼线截成 50 mm 长, 一端用蚊香火焰烧灼成圆钝, 解剖镜下观察头端直径为 (0.3 ± 0.02) mm 者留用并在 20 mm 和 30 mm 处打结制备栓线待用。水合氯醛麻醉大鼠, 钝性分离动脉, 电凝枕动脉和甲状腺上动脉。在颈外动脉近游离端斜剪 “V” 形切口并快速插入栓线, 插入颈内动脉约 (18.0 ± 0.5) mm, 造成局灶性脑缺血, 2 h 后拔出栓线少许 (约 5 mm) 造成缺血再灌注。假手术组不插线, 仅做颈动脉分离。手术过程中应用激光多普勒仪监测缺血区 rCBF, 再灌注之前 rCBF 降低到开始水平 70% 以下且苏醒后神经功能缺损评分为 2 ~ 3 分者为模型制作成功^[6]。神经功能缺损评分: 0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 向外侧转圈; 3 分: 向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失^[7]。

2.2.2 干预方法 根据安全剂量实验结果, 脑络欣通组大鼠选择 800 mg/kg 剂量灌胃, 1 ml/(100 g · d)。模型组和假手术组灌胃等量生理盐水。

2.2.3 观察指标及方法 各组分别于治疗第 3、7、14 天处死 7 只大鼠, 腹主动脉采血, 冷冻离心机 (4°C , $2000 \times g$, 10 min) 离心收集血清, -70°C 保存。采血后于冰面上快速取脑, 弃脑干和小脑, 分离右侧大脑, 按 1 : 9 加 PBS 制成 10% 的脑组织匀浆, 冷冻离心机 (4°C , $2000 \times g$) 离心 5 min 吸取上清, 用于 TPO、ET 检测。其余大鼠多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌流固定 30 min 后断头取脑, 去小脑和脑干, 放入固定液中固定 1 周, 常规脱水、透明、浸蜡, 从视交叉后连续制作脑部冠状切片。

运用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定各组大鼠脑组织 TPO、ET 水平。严格按试剂盒说明进行稀释、建立标准曲线、加样、

温育、配液、洗涤、显色等步骤，在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值，转换为浓度进行统计分析。

每组大鼠取同部位进行切片，常规免疫组化检测脑组织 VEGF 的表达，具体步骤严格按试剂盒说明书操作。显微镜观察每张切片，选额顶叶皮质，根据缺血半暗带定位方法^[8]选相近部位同倍(×400)的 7 个不同视野，测定每个视野下阳性反应细胞面积。

运用激光多普勒仪，在造模过程中以及各时间点处死大鼠前监测 rCBF。选取手术侧梗死灶及其周边组织作为监测区域。大鼠麻醉后俯卧，沿颅骨正中偏右切开皮肤及皮下组织，钝性分离筋膜，暴露颅骨，定位头部右侧距矢状缝 2 mm，冠状缝前 1 mm 处，用生物胶将探头座固定于此，安装连接探头，常规调试仪器和校零。根据文献^[9]，该点是脑缺血后梗死灶的额顶运动区和苍白球部位，皮质梗死部位是缺血周边区域(深度在大脑皮质 1 mm 以内)，此即缺血半暗带区。

2.3 统计学方法

数据分析应用 SPSS 17.0 统计学分析软件，计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单因素方差分析，经正态性检验和方差齐性检验后，方差齐时采用 LSD 法进行两两比较，方差不齐时用 Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。图像统计采用 DP801 图像分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司)。

3 结果

3.1 各组大鼠肝功能指标比较

实验过程中由于灌胃针头破损，导致低、中、高剂量诱发组分别有 1、2、2 只大鼠死亡。表 1 示，正常组、低剂量正常组、中剂量正常组各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)；与正常组、低剂量正常组和中剂量正常组比较，高剂量正常组

和各诱发组大鼠血清 ALT、AST 水平均显著升高，Alb 显著降低，而各诱发组的 LDH 较中剂量正常组均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与高剂量正常组比较，高、低剂量诱发组大鼠 ALT、AST 均显著升高，中剂量诱发组 ALT、AST 降低，且各诱发组 Alb 显著降低($P < 0.01$)，高剂量诱发组 LDH 显著降低($P < 0.05$)。与低剂量诱发组和高剂量诱发组比较，中剂量诱发组 ALT 和 AST 显著降低，Alb 显著升高($P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠脑组织 TPO 和 ET 水平比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组大鼠各时间点脑组织 TPO 和 ET 水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较，脑络欣通组各时间 ET 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，第 7、14 天 TPO 水平均显著降低($P < 0.05$)。与第 3 天比较，脑络欣通组第 7、14 天 ET 与 TPO 水平均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与第 7 天比较，第 14 天 TPO 水平显著下降($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间脑组织血小板生成素和
内皮素水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	血小板生成素	内皮素
假手术组	第 3 天	7	93.31 ± 9.26	81.76 ± 9.75
	第 7 天	7	94.05 ± 10.01	80.87 ± 8.97
	第 14 天	7	93.88 ± 9.89	81.57 ± 9.60
模型组	第 3 天	7	145.98 ± 13.01**	131.12 ± 20.28**
	第 7 天	7	140.05 ± 12.58**	120.01 ± 20.15**
	第 14 天	7	120.82 ± 9.98**▲	118.45 ± 15.40**▲
脑络欣通组	第 3 天	7	139.31 ± 9.82**	100.53 ± 12.94*△
	第 7 天	7	105.20 ± 9.01*△▲	83.20 ± 7.74△▲
	第 14 天	7	95.21 ± 6.20△▲▲#	82.99 ± 7.05△▲▲

注：与假手术组同时间比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组同时间比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ ；与本组第 3 天比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与本组第 7 天比较，# $P < 0.05$

3.3 各组大鼠脑组织 VEGF 表达阳性面积比较

表 3 示，假手术组可见 VEGF 少量表达；与假

表 1 各组大鼠肝功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	丙氨酸氨基转移酶 (U/L)	门冬氨酸氨基转移酶 (U/L)	乳酸脱氢酶 (U/L)	白蛋白 (g/L)
正常组	10	37.50 ± 5.09	153.68 ± 15.61	3040.44 ± 636.81	68.98 ± 11.01
低剂量正常组	10	37.44 ± 5.10	152.71 ± 15.02	3032.58 ± 636.66	68.31 ± 10.15
中剂量正常组	10	38.46 ± 5.17	162.74 ± 15.10	3132.65 ± 636.71	69.46 ± 10.12
高剂量正常组	10	132.23 ± 9.84*△▲▲	215.03 ± 7.61*△▲▲	2232.66 ± 636.51	31.41 ± 4.70*△▲▲
低剂量诱发组	9	215.03 ± 7.61*△▲▲##□	314.77 ± 15.36*△▲▲##□	2056.54 ± 636.90▲	17.39 ± 1.88*△▲▲##□
中剂量诱发组	8	92.94 ± 10.15*△▲▲##	196.28 ± 6.37*△▲▲##	1461.00 ± 212.87*△▲▲	22.64 ± 1.82*△▲▲
高剂量诱发组	8	314.77 ± 15.36*△▲▲##□	502.19 ± 23.94*△▲▲##□	1359.50 ± 212.44*△▲▲#	12.60 ± 1.92*△▲▲##□

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与低剂量正常组比较，△ $P < 0.01$ ；与中剂量正常组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与高剂量正常组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与中剂量诱发组比较，□ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠不同时间脑组织血管内皮生长因子表达阳性面积比较 (μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	7	529.29 $\pm$ 80.67	550.86 $\pm$ 82.62	482.57 $\pm$ 86.62
模型组	7	1431.29 $\pm$ 243.32*	2474.71 $\pm$ 365.09*▲	1720.00 $\pm$ 241.56*▲
脑络欣通组	7	3485.86 $\pm$ 381.01*△	9375.29 $\pm$ 867.72*△▲▲	6393.57 $\pm$ 378.68*△▲

注: 与假手术组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组前一时间比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 4 各组大鼠不同时间局部脑血流量比较 (PU, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	插线后 5 min	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	7	122.56 $\pm$ 8.42	121.17 $\pm$ 8.28	122.45 $\pm$ 7.85	123.39 $\pm$ 8.70
模型组	7	11.33 $\pm$ 1.59*	91.22 $\pm$ 4.76*▲	92.40 $\pm$ 4.28*▲	93.91 $\pm$ 4.12*▲
脑络欣通组	7	10.75 $\pm$ 1.37*	91.80 $\pm$ 4.67*▲	101.48 $\pm$ 5.97*△▲	122.51 $\pm$ 7.23*△▲#

注: 与假手术组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组插线后 5 min 比较, ▲ $P < 0.01$; 与本组第 3 天比较, # $P < 0.01$

手术组比较, 脑络欣通组、模型组各时间 VEGF 表达均显著增加 ($P < 0.01$), 且脑络欣通组各时间点 VEGF 表达与模型组比较均显著升高 ($P < 0.01$)。模型组与脑络欣通组第 7 天时 VEGF 表达均较第 3 天时显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 第 14 天时均较第 7 天时表达减少 ($P < 0.05$)。

3.4 各组大鼠 rCBF 比较

表 4 示, 与假手术组比较, 模型组和脑络欣通组大鼠在各时间点 rCBF 均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 脑络欣通组大鼠第 7 天与 14 天时 rCBF 明显恢复 ($P < 0.01$)。模型组、脑络欣通组大鼠第 3、7、14 天时较插线后 5 min rCBF 显著增加, 脑络欣通组第 14 天时较第 3 天时显著增加 ($P < 0.01$)。

4 讨论

安全剂量实验结果显示, 不同剂量的脑络欣通复方对实验大鼠的肝功能影响不同, 与 1000 mg/kg 剂量组大鼠比较, 800 mg/kg 和 400 mg/kg 剂量都能缓解由 CCl_4 造成的肝损伤而起到一定的肝保护作用, 800 mg/kg 剂量组更为明显, 相反在正常组和 CCl_4 诱发组, 1000 mg/kg 剂量则会造成或加重实验大鼠的肝损伤, 这可能与剂量过大有关, 具体机制有待于进一步研究。综上, 本课题选择 800 mg/kg 作为合适剂量用于脑络欣通复方作用机理实验研究。

缺血性脑血管病发生后, 在受损脑组织中存在血流低灌注区, 而机体会通过诱导血管新生而增加受损区的血氧供应, 在一定程度上挽救缺血半暗带区域的神经细胞, 减少梗死体积, 从而改善脑缺血后的神经功能^[10-12]。VEGF 是内皮细胞特异性的促进有丝分裂原及趋化因子, 可促进内皮细胞增殖

而加速血管新生及侧支循环的建立, 改善脑血流及直接保护神经元。在脑缺血早期, 半暗带区神经组织功能丧失但有潜在的可逆性, 故超早期恢复缺血半暗带区血流是改善组织损伤的关键^[13]。恢复血流除依赖丰富的血管条件外, 还受到血液流变性的影响, 而凝血纤溶功能直接影响着血液流变性。ET 和 TPO 是凝血纤溶系统相关调节因子, 当血管内皮受损时内皮细胞分泌并激活 TPO 和 ET, 导致凝血功能亢进及动脉痉挛, 最终形成栓塞^[14]。ET 作为强效血管收缩剂参与了脑梗死的发生发展, 可引起脑血管痉挛、脑水肿, 导致颅内压升高, 加重脑缺血缺氧状态^[15-17]。TPO 是分布在细胞膜上的一种糖蛋白, 有特异性调节巨核细胞和血小板的作用, 可明显促进骨髓 CD34^+ 细胞血小板膜糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 的表达, 同时还可增强二磷酸腺苷对 GP IIb/IIIa 的活化作用, 而 GP IIb/IIIa 是形成血栓的最关键因素, 是血小板活化的标记物, 在导致血栓形成的过程中起到关键作用^[18-19]。

rCBF 可直接反映局部脑组织的灌注状态。应用激光多普勒仪监测 rCBF 既有优点也有局限性, 优点在于监测的实时性和直观性, 不足则是测量结果的相对性。但是, 如果在实验过程中保证测量条件的一致性, 不严格要求测定对象的基础数值, 仅从数据实时变化和对比的角度去考虑, 则可体现出本实验的研究意义和方法的优越性^[2]。

脑络欣通复方作用机理实验结果显示, 脑络欣通复方可以调节由 MCAO/R 造成的 TPO、ET 异常分泌, 通过降低 TPO 水平, 减弱 TPO 对 GP IIb/IIIa 的活化程度, 进而减少血栓的形成。随着治疗时间的延长, ET 的水平也显著下降。结合本课题前期研究及脑络欣通药物的药理作用, 例如黄芪可兴奋

中枢神经,有显著的扩血管作用,可改善脑部的血液循环;蜈蚣含有组胺样物质,能扩张毛细血管,缓解小动脉痉挛和 ET 升高所造成的强烈血管收缩^[20-21],这可能跟脑络欣通复方改善 MCAO/R 造成的脑水肿及降低颅内压作用有关^[22-23]。激光多普勒仪检测 rCBF 结果表明,随着治疗时间的延长,缺血区血流量逐渐恢复。同时,脑络欣通复方可以增强缺血脑组织 VEGF 的表达,以血管内皮细胞胞浆为主,神经元细胞也有少量表达,急性期以后,随着时间的延长 VEGF 表达逐渐减弱,提示脑络欣通复方可能通过上调缺血脑组织中 VEGF 表达而促进脑微血管新生从而改善局部血供。

总之,血液的“浓、黏、集、聚”状态、血流缓慢、血栓形成和栓塞引起脑组织血液循环障碍是缺血性脑血管疾病最重要的病理机制之一^[24]。本研究选择合适剂量的脑络欣通复方,通过作用于 MCAO/R 模型大鼠调节其凝血纤溶调节因子及 VEGF 而改善血流状态、促进脑局部血管新生而改善局部脑血流量,挽救缺血半暗带神经元,为脑络欣通复方的临床应用和开发提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨文明,李祥,王键,等. 脑络欣通治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(12):1424-1427.
- [2] 王键,谭辉,胡建鹏,等. 脑络欣通对大鼠中动脉闭塞缺血再灌注损伤模型大鼠空间认知功能和局部脑血流量的影响[J]. 中医杂志,2013,54(8):687-691.
- [3] SHI H, LIU X, TANG G, et al. Ethanol extract of *Portulaca Oleracea* L. reduced the carbon tetrachloride induced liver injury in mice involving enhancement of NF- κ B activity[J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(6):746-755.
- [4] 雷扬,周爱民,郭涛,等. 痰热清注射液对急性肝损伤大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1226-1230.
- [5] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [6] 王世全,余良,郭宁,等. 白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注的治疗作用[J]. 现代生物医学进展,2012,12(16):3057-3059.
- [7] 王辛,马茜,李丹丹,等. 脑缺血大鼠脾质量指数与神经功能缺损评分及脑梗死体积的相关性[J]. 医学研究生学报,2015,28(9):920-925.
- [8] LOVE S. Oxidative stress in brain ischemia[J]. *Brain Pathol*, 1999, 9(1):119-125.
- [9] YANG GY, BETZ AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1994, 25(8):1658-1665.
- [10] 郑咏秋,李磊,刘建勋,等. 华佗再造浸膏对大鼠局灶性脑缺血/再灌注神经发生作用及机制研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(5):891-895.
- [11] WEI L, ERINJERI JP, ROVAINEN CM, et al. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke[J]. *Stroke*, 2001, 32(9):2179-84.
- [12] YE YL, HUANG CY, JIANG LL, et al. Huanglian-Jie-Du-Tang extract protects against chronic brain injury after focal cerebral ischemia via hypoxia-inducible factor-1 α -regulated vascular endothelial growth factor signaling in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3):355-361.
- [13] 常坤鹏,丁小灵. 缺血性脑卒中新生血管相关因子的研究[J]. 脑与神经疾病杂志,2015,23(4):312-316.
- [14] 王键,谭辉,菅威,等. 脑络欣通对局灶性脑缺血-再灌注大鼠血液流变学及相关调节因子的作用[J]. 中国脑血管病杂志,2012,9(11):590-594.
- [15] DEMAERSCHALK BM, SILVER B, WONG E, et al. ASPECT scoring to estimate >1/3 middle cerebral artery territory infarction[J]. *Can J Neurol Sci*, 2006, 33(2):200-204.
- [16] 邱乐,王新生,刘擎. 益气活血法改善缺血性脑卒中急性期大鼠微循环障碍的机制[J]. 中国老年学杂志,2012,32(11):2323-2325.
- [17] 董璇,郝亚荣,张黎军. 老年高血压病合并腔隙性脑梗死患者血清内皮素及高敏 C 反应蛋白的研究[J]. 卒中与神经疾病,2011,18(3):171-172.
- [18] KUMAR S, RAJSHEKHAR G, PRABHAKAR S. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute ischemic stroke[J]. *Neurol India*, 2008, 56(4):399-404.
- [19] OFFERMANN S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors[J]. *Circ Res*, 2006, 99(12):1293-1304.
- [20] 郭伟. 中药黄芪的药理及临床研究概况[J]. 山西中医,2011,27(11):52-54.
- [21] 陈武忠,曹海燕. 中药蜈蚣的研究进展[J]. 中国现代中药,2011,13(7):54-57.
- [22] 王键,胡建鹏,李净. 脑络欣通对脑缺血再灌注大鼠 Fas、FasL 蛋白表达、脑水肿及神经体征的影响[J]. 中华中医药杂志,2005,20(2):86-88.
- [23] 高峰,崔激. 颅脑外伤后微循环异常变化及损伤机制[J]. 白求恩医学院学报,2012,10(3):216-218.
- [24] 孟胜喜,霍清萍,王兵,等. 从痰瘀角度论治缺血性脑血管病[J]. 山东中医杂志,2015,34(10):733-735.

Effects of Naoluo Xintong Compound Formula (脑络欣通复方) on Angiogenesis and Local Cerebral Blood Flow in Rats Model with Cerebral Ischemia and Reperfusion based on Safe Dose Selection for Liver Function

TAN Hui, WANG Jian, YIN Tingting, HU Jianpeng, WANG Jinghua, HE Ling, XU Wei

(Key Laboratory of Xin'an Medicine of the Ministry of Education, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, 230038)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of *Naoluo Xintong Compound Formula* (脑络欣通复方) on angiogenesis and local relative cerebral blood flow (rCBF) in rats with middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) and its possible mechanism. **Methods** One hundred and sixty Wistar rats in total were used in the study. Seventy Wistar rats were randomly divided into a normal group, a low dose normal group, a middle dose normal group, a high dose normal group, a low dose induced group, a middle dose induced group, and a high dose induced group, with 10 rats in each group. Rats in the different dose normal groups and induced groups were given 400 mg/kg, 800 mg/kg, or 1000 mg/kg of *Naoluo Xintong Compound Formula* solution 1 ml/(100 g • d) for gavage, respectively. The rats in each induced group were injected with 50% CCl₄ olive oil solution after 7 days of continuous gavage. Twenty-four h after inducing completed, liver function of rats, including serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transfer enzyme (AST), lactate dehydrogenase (LDH), and albumin (ALB) were tested to select safe dose. Another 90 Wistar rats were randomly divided into a sham operation group, a model group and a *Naoluo Xintong Compound Formula* group, with 30 rats in each group. MCAO/R model was made with thread embolism method in model group and *Naoluo Xintong* group. According to the results from the above safe dose experiment, safety dose of *Naoluo Xintong* liquid were given for gavage. On the 3rd, 7th, and 14th day of gavage, levels of homogenates thrombopoietin (TPO) and endothelial (ET), as well as expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in brain were tested, and dynamic observation rCBF was observed in each group. **Results** Compared with that in the normal group, low dose normal group, and middle dose normal group, the AST and ALT both increased, Alb and LDH decreased in high dose normal group and each of induced groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Compared with that in the middle dose induced group, levels of ALT and AST increased, while Alb level decreased in the high and low dose induced groups ($P < 0.01$). Therefore, the middle dose of 800 mg/kg was the safe dose. Compared with that in the sham operation group, levels of TPO and ET significantly increased, expression of VEGF increased, and rCBF decreased in model group ($P < 0.01$); Compared with that in the model group, levels of TPO and ET significantly decreased, expression of VEGF increased, and rCBF was significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in *Naoluo Xintong* group. Comparison between different time points in *Naoluo Xintong* group showed that, levels of TPO and ET significantly decreased on the 7th and 14th day compared with those on the 3rd day; expression of VEGF protein significantly increased on the 7th and 14th day compared with that on the 3rd day; and rCBF significantly increased on the 14th day compared with that on the 3rd day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Naoluo Xintong Compound Formula*, by regulating coagulation fibrinolysis regulation factor and VEGF, as well as promoting angiogenesis in the model rats, could improve blood flow state, improve the regional cerebral blood flow, and save the ischemic penumbra to treat ischemic cerebrovascular disease.

Keywords cerebral ischemia and reperfusion; *Naoluo Xintong Compound Formula*; thrombopoietin; endothelin; vascular endothelial growth factor; cerebral blood flow

(收稿日期: 2015-08-15; 修回日期: 2015-12-28)

[编辑: 焦 爽]