

实验研究

DOI: 10. 13288/j. 11-2166/r. 2022. 09. 013

化癥解毒方对缺血性中风癥毒互结证模型大鼠
脑细胞自噬及血脑屏障通透性的影响

彭珣, 李定祥, 马若梦, 李钰佳, 蔡昱哲, 邓奕辉✉

湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路300号, 410208

[摘要] **目的** 探讨化癥解毒方预防缺血性中风癥毒互结证的可能作用机制。**方法** 60只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组及化癥解毒方低、高剂量组, 每组15只。化癥解毒方低、高剂量组大鼠分别给予9.5、28.5 g/(kg·d)化癥解毒方灌胃, 假手术组及模型组大鼠给予3 ml生理盐水灌胃, 均连续7天。除假手术组外, 其余各组大鼠均于灌胃第4天开始给予角叉菜胶腹腔注射, 连续3天, 灌胃第7天给予大鼠1次背部皮下注射干酵母悬液。末次灌胃24 h后采用大脑中动脉闭塞(MCAO)线栓法制备缺血性中风癥毒互结证病证结合模型。造模24 h后进行神经功能缺损评分; 各组大鼠随机选取5只大鼠采用TTC染色法观察脑组织梗死率; 伊文思蓝(EB)渗透法检测脑组织血脑屏障(BBB)通透性; Western blot法检测脑组织自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、选择性自噬接头蛋白(p62)和咬合蛋白(Occludin)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死率和神经功能缺损评分增加, 脑组织Beclin1蛋白表达和LC3 II/LC3 I值增加, p62、Occludin蛋白表达降低, EB含量上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 化癥解毒方低剂量组脑梗死率、神经功能缺损评分、LC3 II/LC3 I值降低, Occludin蛋白表达上升, 化癥解毒方高剂量组脑梗死率、神经功能缺损评分、LC3 II/LC3 I值、EB含量、Beclin1蛋白表达下降, p62蛋白和Occludin蛋白表达增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与化癥解毒方低剂量组比较, 化癥解毒方高剂量组大鼠脑梗死率、EB含量、Beclin1蛋白表达、LC3 II/LC3 I值显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 化癥解毒方可明显预防缺血性中风癥毒互结证脑损伤, 以高剂量较佳, 其作用机制可能是抑制脑细胞自噬, 从而保护BBB功能。

[关键词] 缺血性中风; 癥毒互结证; 化癥解毒方; 细胞自噬; 血脑屏障

缺血性中风(ischemic stroke)是脑血管疾病的主要类型, 占有脑血管疾病的70%~80%, 是一种由于永久性或暂时性的局部脑供血不足, 出现局限性脑组织缺血、缺氧, 从而导致缺血灶不可逆损伤的疾病^[1]。对于脑血管疾病, 王永炎院士提出以“毒损脑络”为研究切入点^[2], 认为“癥毒互结”是缺血性中风的病因病机, “癥”“毒”在缺血性中风的理论研究和临床应用中皆体现出重要价值^[3-5]。本课题组前期将具有益气活血化癥功效的脑泰方^[6]与清热解毒功效的黄连解毒汤^[7-9]合用化

裁为化癥解毒方治疗缺血性中风, 结果表明化癥解毒方能发挥协同作用, 减轻大脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠脑组织损伤, 明显改善血小板功能和血管内皮功能^[10-11]。现代研究显示, 脑血管内皮屏障功能变化在缺血性中风发生发展中起着重要作用^[12], 在缺血性脑损伤时自噬激活对血脑屏障(blood brain barrier, BBB)有双重作用, 即保护和损伤作用, 具体发挥何种作用与自噬激活程度密切相关^[13]。因此, 本研究基于前期研究探讨化癥解毒方对自噬介导的BBB通透性变化的影响, 以期阐明化癥解毒方预防缺血性中风癥毒互结证的作用机制提供研究基础。本研究通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会审查(批准号: LL2020060301)。

基金项目: 国家自然科学基金(81874416); 湖南省科技创新团队项目(2020RC4050)

✉ 通讯作者: 644138330@qq.com

1 材料与方法

1.1 动物

60 只健康雄性 SPF 级 SD 大鼠，体质量 250 ~ 280 g，购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（湘）2019-0004。适应性喂养 3 天后进行实验，饲养于湖南中医药大学动物实验中心，室温 22 ~ 26℃，相对湿度 50% ~ 70%，自由饮水、进食。

1.2 药物

化癍解毒方组成：黄芪 40 g，川芎 15 g，僵蚕 10 g，地龙 10 g，黄连 5 g，黄芩 5 g，栀子 5 g。黄芪、川芎、黄连购自湖南春可回中药饮片有限公司，僵蚕购自湖南三湘中药饮片有限公司，地龙、栀子购自安徽普仁中药饮片有限公司，黄芩购自湖南省弘华中药饮片有限公司。将中药饮片浸泡 40 min，武火煮沸转文火煎 30 min 取药液，所剩药渣按前法再煎一次，将两次药液混匀后过滤，浓缩成相当于生药 2 g/ml 的药液，4℃ 保存备用。

1.3 试剂与仪器

2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）、伊文思蓝（EB）、甲酰胺、小鼠单克隆抗体微管相关蛋白 1 轻链 3（LC3）（美国 Sigma 公司，批号分别为 T8877-25G、E2129-10G、V900064、SAB1305552）；小鼠单克隆抗体咬合蛋白（Occludin）、兔多克隆抗体自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1（Beclin 1）、单克隆抗体 β-肌动蛋白（β-actin）（美国 Proteintech 公司，批号分别为 66378-1-Ig、11306-1-AP、66009-1-Ig）；兔单克隆抗体选择性自噬接头蛋白（p62）（美国 CST 公司，批号 23214S）；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗小鼠二抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗（美国 Proteintech 公司，批号分别为 SA00001-1、SA00001-2）；水合氯醛、角叉菜胶（CA）（上海麦克林生化科技有限公司，批号分别为 C804539、C804872）；高活性干酵母（湖北安琪酵母股份有限公司，批号 GB/T20886）；ECL 超敏化学发光液（美国 Advansta 公司，批号 K-12045-D50）；MCAO 栓线（北京西浓科技有限公司，批号 2634-A4）。

5810R 低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Spark 多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；DYY-6C 凝胶电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；Amersham Imager 600 多功能成像仪（美国 GE Healthcare 公司）。

1.4 动物分组及处理

60 只大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组及化癍解毒方低、高剂量组，每组 15 只。化癍解毒方低、高剂量组每天上午 10 点分别给予 9.5、28.5 g/（kg·d）化癍解毒方灌胃，其中低剂量为大鼠与 70 kg 成人等效剂量^[14]的 1.25 倍，高剂量为低剂量的 3 倍。假手术组、模型组均给予 3 ml 生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 1 次，连续 7 天。

1.5 模型制备及评价

癍毒互结证型模型制备参照文献^[15]。除假手术组外，其余各组大鼠均于灌胃第 4 天开始给予 CA 50 mg/kg 腹腔注射，每天上午灌胃前注射 1 次，连续 3 天，灌胃第 7 天上午灌胃前仅给予大鼠 1 次背部皮下注射 0.1% 干酵母悬液（10 ml/kg）。末次灌胃 24 h 后采用 MCAO 线栓法^[16]制备大鼠脑缺血模型，具体方法为：造模前 12 h 禁食、予少量水。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛（3.5 ml/kg）麻醉，麻醉成功后将大鼠仰卧位固定，暴露右侧颈总动脉并分离出来，于分离出的颈总动脉处造一小孔，从此处将栓线插入颈内动脉，前进直至造成大脑中动脉闭塞并结扎，以线栓插入大脑中动脉即刻开始计时，24 h 后取材。假手术组大鼠除未用栓线及结扎外，其余外科手术过程同 MCAO 线栓法造模过程。各组大鼠取材前 12 h 禁食、予少量水。

模型评价：CA 和 MCAO 线栓法主要用于致“血癍”证，酵母菌引起的炎症反应模拟里热状态，体现“热毒”证^[17]。CA 注射后第 2 天大鼠尾部远心端开始出现颜色变暗的表现，说明此时大鼠已出现血流不畅、微循环障碍的情况。MCAO 线栓法造模后 24 h 大鼠不仅出现神经功能缺损，四肢末梢皮肤颜色也开始变暗变紫，代表短时间内症状加重明显，“毒”致病有来势凶猛，发病急骤，传变迅速的特点^[18]，以上说明大鼠符合癍毒互结证病情急重、传变迅速等特征。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 神经功能缺损评分 各组大鼠取材麻醉前评估神经功能缺损程度，评分参考 Zea Longa 评分标准^[16]。0 分：无神经功能缺损，大鼠正常活动；1 分：将大鼠尾端提起后，不能完全伸展左前肢；2 分：将大鼠置于平地上，向左绕圈行走；3 分：将大鼠置于平地上，向左侧倾倒；4 分：大鼠左侧偏瘫，不能自发行走且意识水平低下。分值越高，提示大鼠神经功能缺损越严重。得分 1 ~ 3 分为造

模成功。

1.6.2 TTC 染色检测脑梗死率 每组 15 只大鼠中按随机数字表法选出 5 只。造模后 24 h 麻醉大鼠，取脑置于 -20°C 冰箱冷冻 30 min 后取出，切除嗅球、小脑及脑干部位，切取右脑冠状位脑片 5 片，每片厚度 2 mm。将脑片置于 2% TTC 溶液， 37°C 避光水浴 15 min，每 5 min 将每片脑片翻面 1 次，使其充分均匀染色后固定于 4% 的多聚甲醛中，过夜后相机采集图像。采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析脑梗死面积，梗死率=5 片梗死区域总面积/5 片脑片总面积 $\times 100\%$ 。

1.6.3 EB 渗漏法检测 BBB 通透性 每组剩余 10 只大鼠按随机数字表法取出 5 只。取材时间同前，取材前 2 h 经尾静脉注入 2% 的 EB (4 ml/kg)，瞬间大鼠眼巩膜、全身皮肤变蓝，表示 EB 体内循环成功，2 h 后麻醉大鼠，先用 4°C 的 0.9% 氯化钠溶液约 50 ml 经心脏灌注，流出液变清亮后，速取右脑皮层组织，称重后分别放入 15 ml 离心管，并分别向每管中加入 5 ml 甲酰胺并破碎脑组织匀浆，将匀浆液置于 37°C 避光静置水浴 48 h，4 000 r/min、 25°C 离心 15 min，离心半径为 17.8 cm，取上清液检测。用酶标仪检测波长为 630 nm 的吸光度，制作标准曲线。根据 EB 标准曲线定量分析 EB 含量。脑组织 EB 含量($\mu\text{g/g}$)=EB 含量($\mu\text{g/ml}$) $\times$ 甲酰胺量(ml)/脑湿重(g)。

1.6.4 Western blot 法检测脑组织 Beclin1、LC3、p62、Occludin 蛋白水平 每组剩余 5 只大鼠造模后 24 h 麻醉，取右脑皮层组织，从中提取总蛋白，测蛋白浓度，电泳，转膜到聚偏二氟乙烯膜上，配 5% 脱脂奶粉浸泡携带目的蛋白的膜，室温下封闭 90 min 后将膜置于 4°C 与一抗(Beclin1 1:5000, LC3 1:1000, p62 1:1000, Occludin 1:10 000, β -actin 1:5000) 孵育过夜，将膜用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。将 HRP 标记的二抗稀释后(山羊抗小鼠二抗 1:5000, 山羊抗兔二抗 1:6000)与膜共同室温孵育 60 min，结束后用 TBST 洗 3 次，每次 10 min，用 ECL 化学发光液显色曝光。使用 Quantity One 4.6.2 软件分析条带，目的蛋白以样品条带灰度值/相应内参灰度值表示，内参为 β -actin。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理。数据符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间均数比较用完全随机设计多样本单因素方差分析，组间两两比较满足方差齐性用 LSD 法或 SNK 法检验，

不满足方差齐性用 Games-Howell 法；不符合正态分布以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示，用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分比较

表 1 示，与假手术组比较，模型组大鼠神经功能缺损评分显著增高($P<0.01$)；与模型组比较，化瘀解毒方低、高剂量组大鼠神经功能缺损评分明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，且两组差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠神经功能评分比较 [分, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	神经功能缺损评分
假手术组	15	0
模型组	15	2.00 (2.00, 3.00) ^{a)}
化瘀解毒方低剂量组	15	1.00 (1.00, 2.00) ^{b)}
化瘀解毒方高剂量组	15	1.00 (1.00, 1.00) ^{c)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠脑梗死率比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死率显著升高($P<0.01$)；与模型组比较，化瘀解毒方高、低剂量组脑梗死率明显下降($P<0.01$)；与化瘀解毒方低剂量组比较，化瘀解毒方高剂量组脑梗死率明显下降($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠脑梗死率比较 ($\%, \bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脑梗死率
假手术组	5	0
模型组	5	28.80 $\pm$ 0.03 ^{a)}
化瘀解毒方低剂量组	5	21.00 $\pm$ 0.05 ^{b)}
化瘀解毒方高剂量组	5	16.00 $\pm$ 0.01 ^{b) c)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与化瘀解毒方低剂量组比较 $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠脑组织 EB 含量比较

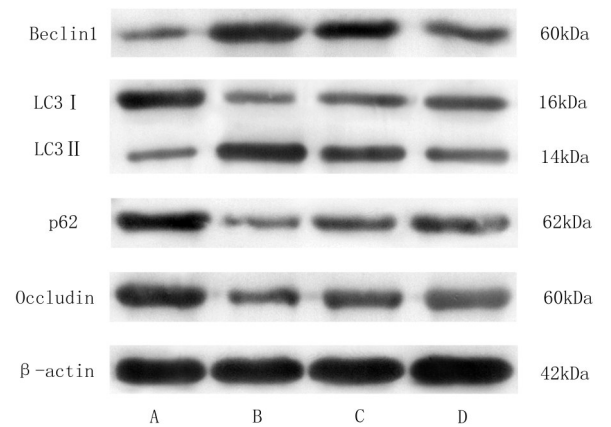
表 3 示，与假手术组比较，模型组大鼠脑组织 EB 含量明显上升($P<0.05$)；与模型组比较，化瘀解毒方低剂量组大鼠 EB 含量差异无统计学意义($P>0.05$)，化瘀解毒方高剂量组大鼠 EB 含量明显降低($P<0.05$)；与化瘀解毒方低剂量组比较，化瘀解毒方高剂量组大鼠 EB 含量显著降低($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠脑组织 Beclin1、LC3 II/LC3 I、p62、Occludin 蛋白表达比较

表 4、图 1 示，与假手术组比较，模型组脑组

表 3 各组大鼠脑组织 EB 含量比较 (μg/g, $\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	EB 含量
假手术组	5	3.38±0.79
模型组	5	15.60±5.32 ^{a)}
化瘀解毒方低剂量组	5	7.71±1.50
化瘀解毒方高剂量组	5	3.60±1.12 ^{b) c)}

注: EB, 伊文思蓝。
a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与化瘀解毒方低剂量组比较, $P<0.01$ 。



注: A, 假手术组; B, 模型组; C, 化瘀解毒方低剂量组; D, 化瘀解毒方高剂量组; Beclin1, 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1; LC3, 微管相关蛋白 1 轻链 3; p62, 选择性自噬接头蛋白; Occludin, 咬合蛋白。

图 1 各组大鼠脑组织 Beclin1、LC3 II/LC3 I、p62、Occludin 蛋白电泳图

织 Beclin1 蛋白表达及 LC3 II/LC3 I 值显著增加, p62、Occludin 蛋白表达显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化瘀解毒方低剂量组 Beclin1、p62 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), LC3 II/LC3 I 值明显减少, Occludin 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$), 化瘀解毒方高剂量组 Beclin1 蛋白表达、LC3 II/LC3 I 值显著减少, p62、Occludin 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与化瘀解毒方低剂量组比较, 化瘀解毒方高剂量组 Beclin1 蛋白表达、LC3 II/LC3 I 值显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 4 各组大鼠脑组织 Beclin1、LC3 II/LC3 I、p62、Occludin 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	Beclin1/β-actin	LC3 II/LC3 I	p62/β-actin	Occludin/β-actin
假手术组	5	0.15±0.43	0.35±0.03	0.50±0.14	0.48±0.09
模型组	5	0.47±0.11 ^{a)}	2.57±0.61 ^{a)}	0.19±0.05 ^{a)}	0.19±0.07 ^{a)}
化瘀解毒方低剂量组	5	0.39±0.73	1.24±0.15 ^{b)}	0.30±0.07	0.32±0.06 ^{b)}
化瘀解毒方高剂量组	5	0.25±0.02 ^{b) d)}	0.69±0.11 ^{c) e)}	0.37±0.11 ^{b)}	0.35±0.10 ^{c)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与化瘀解毒方低剂量组比较, $P<0.05$; e) 与化瘀解毒方低剂量组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

缺血性中风瘀毒互结证多因脏腑功能虚弱而致瘀血内生, 瘀久化热, 热从毒化, 瘀毒互结, 壅堵脑络, 发为中风。瘀为常, 毒为变, 瘀为毒形成的基础, 毒是瘀的发展和转归^[19]。将化瘀通络、清热解毒等方法相互配合, 对提高临床疗效, 改善预后具有重要意义^[20-21]。缺血性中风瘀毒互结证多见于急性期, 病机以瘀毒壅塞脑络为标, 但其本在正气虚损, 故应以益气活血化瘀兼清热解毒为治法加减用药。因此本研究选择体现益气活血化瘀兼以清热解毒的方剂, 以期更全面体现化瘀解毒法。在本研究中, 化瘀解毒方预处理的低、高剂量均明显降低大鼠神经功能缺损评分, 表明 7 天预处理提供了针对缺血性中风瘀毒互结证损伤的脑组织保护。鉴于本研究体现化瘀解毒法的代表方在临床治疗和实验研究中的确切效果, 因此未设阳性对照组。

自噬是真核细胞的一种分解代谢途径, 适当水平的激活可以发挥保护作用, 过度激活则对细胞有损伤作用, 甚至导致细胞死亡^[22]。有研究^[23]表明, 自噬在脑缺血动物模型中的 12~24 h 达到峰值。缺血性中风瘀毒互结证模型大鼠血液黏度高, 炎症因子增高, 易形成血栓^[15], 加上积累的毒素代谢不畅造成脑血管堵塞。缺氧、营养不足、毒素等正是诱导自噬激活的重要因素, 多种诱导因素共同作用可能导致自噬过度激活。Beclin1 是自噬诱导的重要蛋白, 能触发自噬蛋白级联反应^[24], 诱导自噬激活后, 分布于细胞质中的胞质型 LC3 (LC3I) 通过修饰和结合磷脂酰乙醇胺, 形成脂化 LC3 (LC3II), LC3 II 是一种重要自噬标记物, 在自噬激活过程中结合于自噬小体膜上, 与自噬小体的数量呈正相关。Western blot 法检测 LC3 蛋白, LC3 II 由于磷脂酰乙醇胺的影响, 条带显示 LC3 II 处于分子量小于 LC3I 的区域, 因此得到 LC3I 和 LC3 II 两条条带, 目前 LC3 II/LC3 I 蛋白比值被广泛应用于定量细胞自噬活性^[25-26]。p62 通过 LC3 II 相互作用区直接结合, 最终与自噬溶酶体一起被降

解,即自噬激活时 p62 水平降低,因此 p62 水平升高通常被认为是自噬活性受抑制^[27]。Beclin1 蛋白和 LC3 II/LC3 I 值增加, p62 蛋白表达减少表示自噬过程的激活,反之则代表自噬水平下降。临床研究^[28-30]显示,缺血性脑血管疾病患者细胞 LC3 II/LC3 I 值或 LC3II 基因表达过度增加,治疗后或预后好的患者细胞 LC3 II/LC3 I 值或 LC3II 基因水平明显下降。本研究结果显示,与假手术组比较,模型大鼠脑组织 Beclin1 蛋白和 LC3 II/LC3 I 值显著增加, p62 蛋白表达显著减少,表示自噬诱导、发生到降解全过程显著激活。

紧密连接是 BBB 的主要结构和功能组件,紧密连接的损失会导致 BBB 受损,通透性增加^[31-32]。BBB 通透性增加是缺血性中风急性期的主要病理生理改变,会导致脑组织损伤加重^[33]。Occludin 是紧密连接构造稳定且敏感的蛋白标志物,其含量的变化可作为衡量 BBB 受损程度的指标^[34]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 Occludin 蛋白表达显著减少,EB 含量明显增加,说明 BBB 功能受损,通透性明显增加。

本研究结果显示,与模型组比较,化瘀解毒方低剂量组 LC3 II/LC3 I 值下降, Occludin 蛋白表达上升,而 EB 含量和 Beclin1、p62 蛋白表达改变具有同高剂量的趋势,但未达到统计学意义。化瘀解毒方高剂量组 Beclin1 蛋白表达和 LC3 II/LC3 I 值明显下降, p62 蛋白表达明显增加,说明化瘀解毒方高剂量组自噬从诱导、发生到降解全过程明显被抑制,同时 Occludin 蛋白表达量显著增加,EB 含量明显降低,说明 BBB 屏障功能得到明显的恢复。有研究^[35]表明,补阳还五汤可降低小鼠脑缺血后半暗带组织 LC3 II/LC3 I 值,抑制 p62 蛋白的降解,抑制自噬,减少脑梗死面积,不同的活血化瘀中药也能通过抑制缺血、缺氧性损伤引发的过度自噬保护神经细胞、脑微血管内皮细胞^[36-37],说明益气活血法可以通过抑制自噬保护脑组织。另有研究^[38-39]证明清热解毒法有下调炎症、毒性物质水平,改善脑血管微循环,对抗血栓形成等作用,提示清热解毒法可能通过减少诱导自噬激活的因素降低自噬发生的可能性。本研究中,化瘀解毒方高剂量组大鼠脑组织 Beclin1 蛋白表达和 LC3 II/LC3 I 值下降, p62 蛋白上升,自噬全过程明显被抑制,这些结果可能与化瘀解毒法减少缺氧、营养不足、炎症、毒性物质等自噬诱导因素,从而抑制自噬过程密切相关。因此,活血化瘀、清热解毒协同奏效,共同抑

制缺血性中风瘀毒互结证大鼠脑组织自噬过度激活,从而保护 BBB,使脑组织损伤程度减轻。

综上所述,化瘀解毒方能保护缺血性中风瘀毒互结证大鼠 BBB 功能,减轻脑组织损伤和神经功能缺损的程度,可能跟抑制自噬过度激活有关,且高剂量作用优于低剂量。本研究从体内实验对化瘀解毒方改善缺血性中风的作用机制进行了初步探索,后续有待通过体外实验对自噬影响 BBB 通透性的机制以及化瘀解毒方的干预作用进行研究。

参考文献

- [1]贾建平,陈生弟,崔丽英,等.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2013:175-186.
- [2]王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J].中国中西医结合杂志,1997,17(4):195-196.
- [3]仲爱芹,徐士欣,张军平.从瘀毒论治缺血性中风的理论探析[J].中华中医药学刊,2015,33(3):573-575.
- [4]赵越,杨文明.化瘀解毒法在中风病中的运用价值[J].中医药临床杂志,2012,24(3):253-255.
- [5]张黎,杨隼,王健.从毒瘀学说论治急性缺血性脑中风临床观察[J].云南中医中药杂志,2019,40(3):23-25.
- [6]米招娣,兰斌,成绍武,等.中药复方脑泰方药理药效及有效组分关联分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(6):1997-2005.
- [7]李鹏,张小雪.黄连解毒汤治疗缺血性中风 50 例[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(18):55-56.
- [8]陈桂霞.黄连解毒汤加味治疗缺血性中风 30 例疗效分析[J].中医临床研究,2015,7(36):49-50.
- [9]王文杰,陈赛贞,徐红燕,等.黄连解毒汤抗脑缺血研究进展及展望[J].江西中医药,2018,49(11):70-74.
- [10]李定祥,刘文华,文果,等.化瘀解毒法对 MCAO 大鼠血浆 TAT、F1+2、vWF、D-二聚体含量的影响[J].中华中医药学刊,2016,34(4):843-846.
- [11]邓奕辉,覃弘宇,文果,等.化瘀解毒法对 MCAO 大鼠凝血酶及其受体、脑组织 MCP-1、NF-κB 的表达及中性粒细胞浸润的影响[J].世界中医药,2016,11(4):575-579.
- [12]谢倩,马荣,王建,等.小窝蛋白-1 调节脑缺血损伤神经血管单元的保护机制研究[J].中国药理学杂志,2021,56(14):1124-1130.
- [13]王侯棋,徐鹏,范红结,等.细胞自噬与血脑屏障的关系研究进展[J/OL].解放军医学杂志.(2021-10-18)[2021-11-06].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20211015.1357.007.html>.
- [14]贺石林,王健,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2013:48-49.
- [15]蒋成婷,葛金文,聂慧芳,等.缺血性中风瘀毒互结证

- 病证结合动物模型研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(9): 69-74.
- [16] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [17] 邓家刚, 郝二伟, 杜正彩, 等. 中医瘀热互结证大鼠模型的建立及评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 402-405.
- [18] 张允岭, 郭蓉娟, 王嘉麟, 等. 基于专家问卷的中医“毒”的特性分析[J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 27-29.
- [19] 钟霞, 焦华琛, 李运伦, 等. 瘀毒概念探微[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2377-2380.
- [20] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 1-6, 16.
- [21] 刘亚琼, 朱陵群, 王硕仁, 等. 中风病“毒损脑络”病机假说研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(2): 98-100.
- [22] WANG JF, MEI ZG, FU Y, et al. Puerarin protects rat brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(6): 989-998.
- [23] TIAN F, DEGUCHI K, YAMASHITA T, et al. In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1107-1114.
- [24] HAN T, GUO M, GAN M, et al. TRIM59 regulates autophagy through modulating both the transcription and the ubiquitination of BECN1[J]. *Autophagy*, 2018, 14(12): 2035-2048.
- [25] LI X, HE S, MA B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12-27.
- [26] MARENINOVA OA, JIA W, GRETTLER SR, et al. Transgenic expression of GFP-LC3 perturbs autophagy in exocrine pancreas and acute pancreatitis responses in mice[J]. *Autophagy*, 2020, 16(11): 2084-2097.
- [27] MA S, ATTARWALA IY, XIE XQ. SQSTM1/p62: a potential target for N-eurodegenerative disease[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(5): 2094-2114.
- [28] 费丰敏, 褚欢. 缺血性脑血管病患者外周血细胞自噬因子的表达意义[J]. 中国慢性病预防与控制, 2017, 25(4): 286-289.
- [29] 郭宇, 王若丹, 周楷. 急性缺血性脑卒中患者外周血自噬及凋亡相关基因表达水平及临床意义[J]. 中国临床神经科学, 2021, 29(3): 241-246.
- [30] 李雪莉, 杨清武. 依达拉奉对急性缺血性卒中患者外周血自噬及氧化应激水平的影响[J]. 重庆医学, 2021, 50(21): 3682-3686.
- [31] KIM JH, BYUN HM, CHUNG EC, et al. Loss of integrity: impairment of the blood-brain barrier in heavy metal-associated ischemic stroke[J]. *Toxicol Res*, 2013, 29(3): 157-164.
- [32] PAGE S, MUNSELL A, Al-Ahmad AJ. Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junctions complexes in stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2016, 13(1): 16.
- [33] YANG C, HAWKINS KE, DORÉ S, et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135-C153.
- [34] 张运克, 傅小欧, 李可. 麝香黄芪复方滴丸对缺血再灌注损伤大鼠脑组织紧密连接蛋白表达影响[J/OL]. 中华中医药学刊. (2021-06-08) [2021-11-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210608.0835.004.html>.
- [35] 周胜强, 易健, 周赛男, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血小鼠半暗带细胞自噬水平的影响[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(2): 119-123.
- [36] 朱丽娟, 罗建云, 张安平, 等. 当归挥发油通过抑制自噬减轻拟缺血再灌注神经细胞损伤[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 56-59.
- [37] YANG G, WANG N, SETO SW, et al. Hydroxysafflor yellow A protects brain microvascular endothelial cells against oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury: Involvement of inhibiting autophagy via class I PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140: 243-257. doi: 10.1016/j.brainresbull. 2018. 05. 011.
- [38] 张婷, 宋厚盼, 林也, 等. 黄连解毒汤之“清热解毒”药效与作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 135-139.
- [39] 翁翔, 吴云虎. 清热解毒通络汤辅助治疗对热毒痰瘀互阻型前循环短暂性脑缺血发作患者预后及血管内皮功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(23): 2536-2539, 2561.

Effects of *Huayu Jiedu Formula* (化瘀解毒方) on Brain Cell Autophagy and Blood Brain Barrier Permeability in Ischemic Stroke Model Rats with Binding of Stasis and Toxin Syndrome

PENG Xun, LI Dingxiang, MA Ruomeng, LI Yujia, CAI Yuzhe, DENG Yihui

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Huayu Jiedu Formula* (化瘀解毒方, HJF) in preventing ischemic stroke (IS) with binding of stasis and toxin syndrome. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, and the low- and high-dose HJF group, with 15 rats in each group. The rats in the low- and high-dose HJF groups were given 9.5 g/(kg·d) and 28.5 g/(kg·d) of HJF by gavage, respectively, while those in the sham operation group and the model group were given 3 ml of normal saline by gavage, all for 7 consecutive days. Except for the sham operation group, rats were given intraperitoneal injection of carrageenan from the 4th day of gavage for 3 consecutive days, and were then given subcutaneous injection of dry yeast suspension to the back on the 7th day of gavage. Twenty-four hours after the last gavage, middle cerebral artery occlusion (MCAO) suture method was used to develop the disease-syndrome combined model of IS with binding of stasis and toxin syndrome. Neurological deficit score was assessed 24 hours after modeling. TTC staining method was used to observe the infarction rate of brain tissue in five randomly selected rats in each group. Evans blue (EB) penetration method was used to detect the permeability of blood brain barrier (BBB) in brain tissue. Western blotting was used to detect the protein expressions of autophagy key molecule yeast Atg6 homolog 1 (Beclin1), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), selective autophagy adaptor protein (p62) and Occludin in brain tissue. **Results** Compared to the sham operation group, the model group had increased cerebral infarction rate and neurological deficit score, higher Beclin 1 protein expression and LC3II/LC3I value, lower p62 and Occludin protein expression, and higher EB content ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, the low-dose HJF group had decreased cerebral infarction rate, neurological deficit score and LC3II/LC3I value as well as increased Occludin protein expression, while the high-dose HJF group had decreased cerebral infarction rate, neurological deficit score, LC3II/LC3I value, EB content and Beclin1 protein expression, and increased p62 and Occludin protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the low-dose HJF group, the high-dose group had lower cerebral infarction rate, EB content, Beclin1 protein expression, and LC3II/LC3I value ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** HJF can effectively prevent the brain damage of IS rats with binding of stasis and toxin syndrome, and high dose is associated with better effect. Its mechanism may be related to the inhibition of the brain cells autophagy, thereby protecting the BBB function.

Keywords ischemic stroke; binding of stasis and toxin syndrome; *Huayu Jiedu Formula* (化瘀解毒方); autophagy; blood brain barrier

(收稿日期: 2021-11-09; 修回日期: 2022-02-25)

[编辑: 王利芬]