

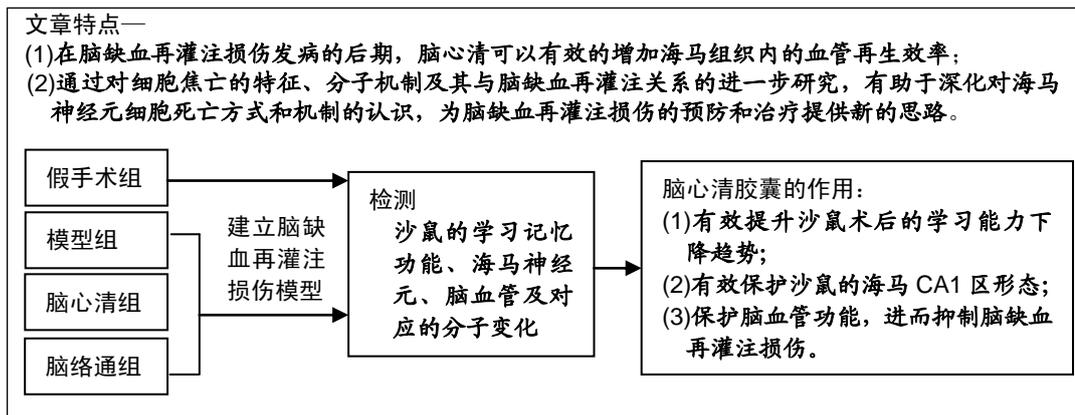
# 脑心清对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护机制

闵冬雨<sup>1</sup>, 李红岩<sup>2</sup>, 关乐<sup>1</sup>, 常江<sup>3</sup>, 张海宇<sup>4</sup>, 崔馨月<sup>5</sup>, 王鹏<sup>6</sup>, 曹永刚<sup>6</sup>(<sup>1</sup>辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市 110032; <sup>2</sup>沈阳麦迪信科技有限公司, 辽宁省沈阳市 110066; <sup>3</sup>葫芦岛市食品药品检验检测中心, 辽宁省葫芦岛市 125000; <sup>4</sup>沈阳市食品药品监督管理局, 辽宁省沈阳市 110001; <sup>5</sup>辽宁中医药大学16级中医学(5+3)一体化一班, 辽宁省沈阳市 110847; <sup>6</sup>哈尔滨医科大学大庆校区机能实验室, 黑龙江省大庆市 163319)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1974

ORCID: 0000-0001-6646-9555(闵冬雨)

文章快速阅读:



闵冬雨, 男, 1979年生, 辽宁省沈阳市人, 锡伯族, 2012年中国医科大学毕业, 博士, 硕士生导师, 副主任药师, 从事心脑血管疾病防治研究工作。

通讯作者: 曹永刚, 教授, 研究生导师, 哈尔滨医科大学大庆校区机能实验室, 黑龙江省大庆市 163319

文献标识码: B

投稿日期: 2018-11-28

送审日期: 2018-12-12

采用日期: 2019-04-19

在线日期: 2019-08-07



文题释义:

**缺血再灌注氧化应激:** 在脑部缺血再灌注的过程中, 脑组织内活性氧浓度增加/抗氧化活性降低, 从而积累大量的活性氧, 并进一步的诱导中性粒细胞炎症性浸润, 蛋白酶分泌增加, 随之产生大量氧化中间产物, 进一步刺激脑组织的损伤。

**细胞焦亡:** 细胞的程序性死亡方式, 其主要依赖半胱天冬酶 1(caspase-1)发生, 当细胞出现焦亡现象时, 会有大量的促炎因子释放, 相比于细胞凋亡及坏死, 细胞焦亡的过程更为剧烈。细胞焦亡会快速的形成质膜孔洞, 直接介导细胞肿胀、坏死。并大量释放细胞内容物, 并进一步刺激氧化应激反应的发生。其为脑缺血再灌注过程中的重要研究热点之一。

摘要

**背景:** 脑心清胶囊用于脑缺血再灌注损伤的治疗由来已久, 然而针对其作用机制的深入研究则相对较少。

**目的:** 应用分子生物学手段考察脑心清胶囊对脑缺血再灌注损伤沙鼠模型的治疗作用。

**方法:** 实验方案经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号为 21000092017072)。将 80 只雄性蒙古沙鼠随机分为假手术组、模型组、脑心清组及脑络通组, 后 3 组沙鼠应用无创微动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉 5 min 后松开, 建立脑缺血再灌注损伤模型; 假手术组不夹闭双侧颈总动脉。术后次日开始假手术组正常饲养, 模型组灌服同体积的生理盐水, 脑心清组按照 100 mg/(kg·d)灌胃给药, 脑络通组按照 100 mg/(kg·d)灌胃给药, 连续给药 21 d。在实验结束前 1 周进行水迷宫实验, 实验结束后麻醉下处死沙鼠取脑组织。检测沙鼠的学习记忆功能、海马神经元、脑血管及对应的分子变化情况。

**结果与结论:** ①同假手术组相比, 模型组沙鼠学习能力显著下降。而脑心清组及脑络通组则可有效提升术后的学习能力下降趋势; ②与模型组相比, 脑心清组及脑络通组神经元显著增多, 且排列较为整齐, 细胞轮廓清晰, 结构完整; ③与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠的超氧化物歧化酶和乳酸脱氢酶活性, 谷胱甘肽含量显著升高, 丙二醛含量显著降低( $P < 0.01$ ); ④与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠海马组织 ASC、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ); ⑤与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠的白细胞介素 18 和白细胞介素 1 $\beta$  含量明显降低( $P < 0.01$ ); ⑥与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠的血小板内皮细胞黏附分子 1 阳性细胞明显增多, 细胞间连接紧密; ⑦与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子 1 和磷酸化内皮型一氧化氮合酶表达显著上调, 一氧化氮含量显著升高( $P < 0.01$ ); ⑧结果说明, 脑心清胶囊可有效保护沙鼠的海马 CA1 区形态; 脑缺血再灌注时伴有脑血管功能紊乱, 脑心清胶囊可以保护脑血管功能, 进而抑制脑缺血再灌注损伤。

关键词:

脑心清胶囊; 脑缺血再灌注; 氧化应激; 炎症; 脑血管功能; 细胞焦亡

中图分类号: R452; R453; R318

基金资助:

国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531704); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室开放基金(zyzx1705), 项目负责人: 闵冬雨; 辽宁省科技厅项目(20180551110)

Min Dongyu, MD, Master's supervisor, Associate chief pharmacist, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Corresponding author: Cao Yonggang, Professor, Master's supervisor, Functional Laboratory of Harbin Medical University (Daqing), Daqing 163319, Heilongjiang Province, China

## Protective mechanism of *Naoxinqing* Capsule in rat models of cerebral ischemia/reperfusion injury

Min Dongyu<sup>1</sup>, Li Hongyan<sup>2</sup>, Guan Le<sup>1</sup>, Chang Jiang<sup>3</sup>, Zhang Haining<sup>4</sup>, Cui Xinyue<sup>5</sup>, Wang Peng<sup>6</sup>, Cao Yonggang<sup>6</sup> (<sup>1</sup>the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Shenyang Madison Technology Co., Ltd., Shenyang 110066, Liaoning Province, China; <sup>3</sup>Food and Drug Inspection and Testing Center of Huludao, Huludao 125000, Liaoning Province, China; <sup>4</sup>Shenyang Food and Drug Administration, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; <sup>5</sup>Class One, Department of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China; <sup>6</sup>Functional Laboratory of Harbin Medical University (Daqing), Daqing 163319, Heilongjiang Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** *Naoxinqing* capsule has been used for treating cerebral ischemia/reperfusion injury for a long time. However, there are relatively few in-depth studies on its mechanism.

**OBJECTIVE:** To investigate the therapeutic effect of *Naoxinqing* Capsule on gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion injury by molecular biological means.

**METHODS:** The study was approved by the Laboratory Animal Ethical Committee of Liaoning University of Chinese Medicine, approval No. 21000092017072. Eighty male Mongolian gerbils were randomly divided into sham, model, *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups, and the latter three groups underwent bilateral common carotid artery clip for 5 minutes, to establish the model of cerebral ischemia/reperfusion injury. The sham group received no common carotid artery clip. Next day, the sham group fed normally, the model group was given normal saline, *Naoxinqing* group was given the 100 mg/(kg·d) *Naoxinqing* via gavage, and *Naoluotong* group given 100 mg/(kg·d) *Naoluotong* via gavage, respectively, for 21 consecutive days. The water maze test was conducted at 1 week before experiment ended. The brain tissue was removed after experiment. The learning and memory function, hippocampal neurons, cerebrovascular and corresponding molecular changes were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Compared with the sham group, the learning ability in the model group was decreased significantly. *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups could effectively improve the learning ability after surgery. (2) Compared with the model group, the numbers of neurons in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups were increased significantly, arranged regularly with clear contour and complete structure. (3) Compared with the model group, in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups, the activities of superoxide dismutase and lactate dehydrogenase, and glutathione content were significantly increased, and the content of malonaldehyde was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). (4) The expression levels of ASC, NLRP3 and Caspase-1 in the hippocampus in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups were significantly lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). (5) The levels of interleukin-18 and interleukin-1 $\beta$  in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups were significantly lower than those in the model group ( $P < 0.01$ ). (6) Compared with the model group, the cells positive for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups were significantly increased, the cells contacted closely each other. (7) Compared with the model group, in the *Naoxinqing* and *Naoluotong* groups, the expression levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase were significantly up-regulated, and the content of nitric oxide was significantly increased ( $P < 0.01$ ). (8) These results indicate that *Naoxinqing* and *Naoluotong* can effectively protect the morphology of hippocampal CA1 region in gerbils. Cerebral ischemia/reperfusion injury is accompanied by cerebral vascular dysfunction. *Naoxinqing* Capsule can protect cerebral vascular function and inhibit cerebral ischemia/reperfusion injury.

**Key words:** *Naoxinqing* capsule; cerebral ischemia/reperfusion; oxidative stress; inflammation; cerebrovascular function; cell apoptosis

**Funding:** the National Program on Key Basic Research & Research Project (973 Program), No. 2013CB531704; the Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dynamism Theory and Application, National Key Laboratory of the Ministry of Education, No. zyxz1705 (to MDY); the Department of Science and Technology Department of Liaoning Province, No. 20180551110

## 0 引言 Introduction

中国每年有200多万人罹患脑血管疾病, 而临床上治疗脑缺血性疾病的唯一有效方法就是快速恢复脑组织的血流使其再灌注<sup>[1]</sup>。然而, 在进行缺血再灌注的过程中, 往往会加重脑部的损伤, 形成脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。因此在对脑缺血进行救治的过程中, 除了迅速恢复脑组织的灌注外, 亦需要对后续的再灌注损伤进行防治。脑缺血再灌注损伤的病理生理过程十分复杂, 一般认为, 随氧化应激反应, 细胞内出现了Ca<sup>2+</sup>超载, 并进一步引发血管功能的缺失, 最终引发细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>。同时, 越来越多的研究显示, 在脑缺血再灌注损伤发病的过程中, 细胞焦亡也发挥了重要的作用。细胞焦亡是一种促炎性程序性细胞死亡, 同细胞凋亡的程序性主动死亡的不同<sup>[5]</sup>, 细胞焦亡诱发的细胞死亡效果更为剧烈, 其快速的形成质膜孔洞, 诱发细胞肿胀进而坏死、并释放细胞内的内容和炎性递质<sup>[6]</sup>。因此, 细胞焦亡诱发细胞死亡的过程更为直接, 而对脑细胞带来的损伤也更大。随着对细胞焦亡的研究的深入, 如何有效的缓解由脑

缺血再灌注损伤所诱发的细胞焦亡, 协同其他治疗作用, 将大幅降低脑缺血再灌注损伤所带来的脑损伤。而尝试以药物, 特别是中药及有效成分对脑缺血再灌注损伤进行治疗, 取得了良好的效果<sup>[7]</sup>。

现针对脑缺血再灌注损伤的中药学研究, 多集中于单组份对于损伤神经的保护作用。如, 红景天苷可通过上调大鼠脑组织突触素(SYN)和生长相关蛋白43(GAP-43)的表达, 起到保护神经元, 快速恢复脑缺血再灌注损伤神经元的功能<sup>[8]</sup>。姜黄素则是通过上调脑组织内突触后致密区95(PSD-95)和突触素 I 的表达<sup>[9]</sup>, 以增强突触的功能。毛冬青甲素作用的分子靶点为生长相关蛋白43及碱性成纤维细胞生长因子, 并通过上调两者促进轴突的生长<sup>[10]</sup>。雷公藤内酯醇的作用靶点则是突触素和突触后致密区95<sup>[11]</sup>。然而, 现有针对中药抗脑缺血再灌注损伤所致细胞焦亡的研究不多。另外, 补阳还五汤、复方参芎滴丸、脑络欣通、脑脉通等中成药, 则对脑缺血再灌注损伤起到多靶点多层次的治疗效果<sup>[12]</sup>。考虑到大量中药有效成分在治疗脑缺血再灌注损伤中的作用, 可以在这些有效成分或成药中进行筛选, 以获得临

床缓解脑缺血再灌注损伤所致细胞焦亡的潜在药物成分。

脑心清胶囊的主要成分为柿叶。研究表明柿叶提取物中含有黄酮、有机酸和香豆素等化学物质,具有抗炎、抗氧化、降压、降血脂、改善血管平滑肌功能及血流动力学功能等作用,目前该药物已被广泛应用于心脑血管疾病的治疗<sup>[13-15]</sup>,现有的研究显示,脑心清可以有效改善脑动脉硬化及并保护脑缺血所致的神经损伤<sup>[16]</sup>。然而,上述研究开展较早,随着对脑缺血再灌注损伤所致的细胞焦亡的深入研究,如何从现有的治疗脑缺血再灌注损伤药物中,挖掘缓解细胞焦亡的药物,是对药物二次开发利用的关键。基于上述目的,研究拟以临床常用的治疗脑缺血再灌注损伤药物脑络通为阳性对照药,考察脑心清胶囊对脑缺血再灌注损伤的治疗机制。拟从学习记忆功能变化、氧化应激反应、炎症反应、细胞焦亡、脑血管修复等几个角度出发,通过对上述指标的考察以确定脑心清胶囊对脑缺血再灌注损伤的治疗机制,并为后续有效成分研究提供指导。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物观察。

1.2 时间及地点 实验于2017年12月至2019年4月在辽宁中医药大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雄性蒙古沙鼠80只,四五月龄,体质量50-70 g,由哈尔滨医科大学动物学部提供。

1.3.2 药品和试剂 脑心清胶囊(沈阳东新药业有限公司,批号:171002);脑络通胶囊(广州市花城制药厂,批号:20171002)。Nissl试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒、乳酸脱氢酶试剂盒、丙二醛试剂盒、谷胱甘肽试剂盒、一氧化氮试剂盒、白细胞介素18和白细胞介素1 $\beta$ 试剂盒均购自南京建成生物医学工程研究所。血小板内皮细胞黏附因子1、内皮型一氧化氮合酶和磷酸化内皮型一氧化氮合酶抗体购自Abcam公司,ASC、NLRP3和Caspase-1抗体购自Sigma公司。

1.3.3 主要仪器 水迷宫(成都泰盟科技有限公司),酶标仪(Thermo公司),电泳仪及相关设备(Bio-Rad公司),冰冻切片机(Leica公司),倒置显微镜(Nikon公司),低温高速离心机(Eppendorf公司),超纯水装置(法国Millipore公司),核酸蛋白定量仪(瑞士Amersshams公司),精密天平(瑞士Mettler公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组和给药方法 将80只雄性蒙古沙鼠随机分为假手术组、模型组、脑心清组及脑络通组。术后次日开始假手术组正常饲养,模型组灌服同体积的生理盐水,脑心清组按照100 mg/(kg·d)灌胃给药,脑络通组按照100 mg/(kg·d)灌胃给药,连续给药21 d。其中,在实验结束前1周进行水迷宫实验,包括4 d的隐蔽平台实验和1 d的空间探索实验。而Nissl染色、免疫荧光实验以及各marker检测,则在实验结束麻醉下处死沙鼠后进行。

1.4.2 建立脑缺血再灌注损伤模型 随机选取健康蒙古

沙鼠,戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg)麻醉后,用无创微动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉5 min,然后松开动脉夹,重新恢复血流进行再灌注,制成沙鼠脑缺血再灌注损伤模型,缝合皮肤。假手术组不夹闭双侧颈总动脉,其他手术操作与模型组相同。

### 实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	考察脑心清胶囊对脑缺血再灌注损伤沙鼠模型的治疗作用
借鉴已有标准实验动物造模:	参考本团队改良的建模方法,建立沙鼠脑缺血再灌注损伤模型 <sup>[17]</sup>
选择动物的条件:	①蒙古沙鼠;②雄性;③四五月龄;④体质量50-70 g;⑤健康
动物来源及品系:	蒙古沙鼠由哈尔滨医科大学动物学部提供
造模技术描述:	麻醉后,用无创微动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉5 min,然后松开动脉夹,重新恢复血流进行再灌注,制成脑缺血再灌注损伤模型,缝合皮肤
动物数量及分组方法:	80只雄性蒙古沙鼠随机分组:假手术组 n=20、模型组 n=20、脑心清组 n=20、脑络通组 n=20
造模成功评价指标:	Morris 水迷宫的结果有变化
造模后实验观察指标:	①沙鼠学习记忆功能;②海马神经元损伤情况;③海马组织氧化应激反应结果;④沙鼠海马组织 ASC、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达;⑤沙鼠海马组织白细胞介素 18 和白细胞介素 1 $\beta$ ;⑥沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子 1、磷酸化内皮型一氧化氮合酶及一氧化氮表达
造模过程中动物死亡原因:	再灌注时,由于缺血再灌注损伤有死亡的情况
如何补充造模过程中缺失的动物:	在实验前,每组多设沙鼠,通过实验过程中尽量减少麻醉药的量,保暖等措施减少死亡
造模后动物处理:	实验结束,每组随机选取6只沙鼠,麻醉下处死后取脑组织
伦理委员会批准:	实验方案经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号为 21000092017072)

1.4.3 水迷宫实验 水迷宫直径200 cm,水深30 cm,水温(20 $\pm$ 3)  $^{\circ}$ C,将水面平均分为4个象限。每只沙鼠每日训练2次,60 s/次,共计3 d。第4天开始进行定位航行实验,平台放置在任意象限,且位于水下1.5 cm,选取平台邻象限和对象限作为入水点,记录沙鼠在60 s内寻找到平台的时间,空间探索实验记录动物通过平台所在象限的次数。

1.4.4 Nissl染色 实验结束,每组随机选取6只沙鼠(剩余沙鼠用于氧化应激指标检测和Western blot实验)麻醉后处死,取脑组织制备切片,每只取3张脑片,滴加Nissl染色液,室温孵育10 min。PBST洗3次,每次5 min,中性树脂封固,镜下观察。

1.4.5 免疫荧光实验 沙鼠脑组织冰冻切片,PBS洗片3次,每次5 min;冰上操作,0.2%Tritonx-100致孔15 min,PBS洗片3次,每次5 min。山羊血清封闭60 min后直接滴加血小板内皮细胞黏附分子1-抗(1:200),4  $^{\circ}$ C条件下孵育24 h,PBS洗片3次,每次5 min,避光条件下,滴加荧光二抗(1:100)室温孵育30 min,PBS洗片3次,每次5 min;滴加DAPI染核5 min,PBS洗片3次,每次洗5 min。甘油封

固, 荧光显微镜下观察。

**1.4.6 乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量测定** 实验结束将剩余沙鼠麻醉后处死, 取脑组织。将沙鼠海马组织匀浆后备用; 具体的测定方法如下:

(1)超氧化物歧化酶测定(羟胺法): 首先, 向测定管内添加试剂一1.0 mL, 再添加待测组织匀浆液0.1 mL, 对照管内, 添加双蒸水0.1 mL, 再分别添加试剂二、试剂三和试剂四0.1 mL。该试剂管以漩涡震荡仪充分混匀后, 37 °C水浴孵化40 min, 添加显色剂2 mL。超氧化物歧化酶的具体计算公式为:

$$\text{组织中超氧化物歧化酶活力(U/mg)} = \frac{\text{对组 A 值} - \text{测定 A 值}}{\text{对照 A 值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量(mL)}} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度(g/L)}}{\text{白浓度(g/L)}}$$

(2)乳酸脱氢酶测定(微板法): 在96孔板内, 分别设定空白孔、标准孔、测定孔及对照孔4种。①分别向不同孔内添加双蒸水, 其中, 空白孔(25.0 μL)、标准孔(5.0 μL)、测定孔(0 μL)及对照孔(5.0 μL); ②向标准孔内添加0.2 mmol/L的标准溶液20 μL; ③分别向测定孔及对照孔内添加20 μL待测组织液; ④分别向全部孔内添加25 μL基质缓冲液; ⑤向测定孔内添加5 μL辅酶I; ⑥将96孔板混匀后, 37 °C温浴孵化15 min, 向全部孔内添加25 μL的2, 4-二硝基苯肼; ⑦将96孔板再次混匀后, 37 °C温浴孵化15 min, 向全部孔内添加250 μL的0.4 mol/L NaOH溶液。混匀后, 在室温内放置5 min。将96孔板放置于酶标仪内, 以450 nm进行检测。乳酸脱氢酶的计算公式为:

$$\text{组织中乳酸脱氢酶活力(U/g)} = \frac{\text{测定 A 值} - \text{对照 A 值}}{\text{标准 A 值} - \text{空白 A 值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.2 \text{ mol/L})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{\text{白浓度(g/mL)}}$$

其中: 每克组织蛋白37 °C与基质作用15 min, 反应体系中产生1 μmol丙酮酸为1 U。

(3)丙二醛测定(TBA法): ①分别向标准管内添加10 μmol/L的标准品0.1 mL、空白管内添加无水乙醇0.1 mL、向测定管及对照管内添加测试样品0.1 mL; ②向全部试管内添加0.1 mL的试剂一, 充分混匀后, 再添加3.0 mL的试剂二; ③向标准管、空白管及测定管内添加1.0 mL的试剂三。向对照管内, 添加50%的冰醋酸1 mL。

将待测试管以涡旋振荡器混匀后, 以保鲜膜扎紧试管口, 并刺破小孔。95 °C沸水浴40 min后, 取出冷却, 再3 500-4 000 r/min, 离心10min。取上清液在532 nm处, 以双蒸水为对照, 测定各管的吸光度。其具体计算公式为:

$$\text{组织中丙二醛含量(μmol/g)} = \frac{\text{测定 A 值} - \text{对照 A 值}}{\text{标准 A 值} - \text{空白 A 值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10 \text{ mol/L})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{\text{白浓度(g/L)}}$$

**1.4.7 一氧化氮、白细胞介素18和白细胞介素1β水平测定** 实验结束将沙鼠麻醉后处死, 取脑组织。根据测定试剂盒说明书, 将沙鼠海马组织匀浆, 以3 000 r/min离心10 min, 取上清液, 检测各管的吸光度值, 同时检测海马组织匀浆液的蛋白浓度, 根据公式计算海马组织一氧化氮、白细胞介素18和白细胞介素1β水平。

**1.4.8 蛋白质印迹法测定血小板内皮细胞黏附分子1、磷酸化内皮型一氧化氮合酶、ASC、NLRP3和Caspase-1的蛋白表达** 实验结束将沙鼠麻醉后处死, 取脑组织。精密

称取海马组织50 mg, 加入400 μL组织裂解液和4 μL蛋白酶抑制剂。匀浆机将组织绞碎, 放置冰盒上裂解40 min, 4 °C, 13 500 r/min, 离心15 min后抽取上清液, BCA法测蛋白浓度, 加入loading buffer煮沸变性10 min, 放于-80 °C条件下保存。通过Western blot检测海马组织血小板内皮细胞黏附分子1、磷酸化内皮型一氧化氮合酶、ASC、NLRP3和Caspase-1的蛋白表达。

**1.5 主要观察指标** ①沙鼠学习记忆功能; ②海马神经元损伤情况; ③海马组织氧化应激反应结果(乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、丙二醛水平); ④海马组织ASC、NLRP3和Caspase-1蛋白表达; ⑤海马组织白细胞介素18和白细胞介素1β水平; ⑥沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子1、磷酸化内皮型一氧化氮合酶及一氧化氮表达。

**1.6 统计学分析** 应用SPSS 18.0软件进行统计, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, 并利用最小显著性差异法(LSD)进行组间多重比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用沙鼠80只, 分成4组, 实验过程有脱失, 进入结果分析至少14只。

**2.2 脑心清胶囊抑制脑缺血再灌注诱导的沙鼠学习记忆功能障碍** 水迷宫定位航行实验结果显示, 模型组沙鼠的逃避潜伏期与假手术组相比明显延长( $P < 0.01$ ); 脑心清组和脑络通组沙鼠的逃避潜伏期与模型组相比明显缩短( $P < 0.01$ )。空间探索实验结果显示, 模型组沙鼠在目标象限的游泳时间、有效停留时间及穿梭次数明显减少( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 脑心清组和脑络通组沙鼠在目标象限的游泳时间、有效停留时间及穿梭次数明显增加( $P < 0.01$ )。见图1。

**2.3 脑心清胶囊抑制脑缺血再灌注诱导的海马神经元损伤** Nissl染色结果显示, 假手术组沙鼠的海马CA1区锥体细胞排列整齐、紧密, 细胞结构清晰完整, 细胞核正常, 染色质分布均匀, 胞浆内尼氏小体丰富。模型组沙鼠的海马CA1区可见部分神经元丢失, 排列不整齐, 细胞轮廓模糊, 结构不清, 部分神经元胞体皱缩, 核固缩, 胞浆深染, 胞浆内尼氏小体减小。与模型组相比, 脑心清组及脑络通组神经元显著增多, 且排列较为整齐, 细胞轮廓清晰, 结构完整, 神经元胞体舒展, 胞浆内尼氏小体增大。见图2。

**2.4 脑心清胶囊抑制海马组织氧化应激损伤** 沙鼠海马组织氧化应激反应结果显示, 与假手术组相比, 模型组沙鼠的乳酸脱氢酶和超氧化物歧化酶活性显著降低, 丙二醛含量显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠的超氧化物歧化酶和乳酸脱氢酶活性, 谷胱甘肽含量显著升高, 丙二醛含量显著降低( $P < 0.01$ )。见表1。

**2.5 脑心清胶囊抑制海马神经元焦亡** Western blot结果显示, 与假手术组相比, 模型组沙鼠海马组织ASC、NLRP3和Caspase-1蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 脑心清组及脑络通组沙鼠海马组织ASC、NLRP3和Caspase-1蛋白表达下调( $P < 0.05$ )。见图3。

表 1 沙鼠脑缺血再灌注后各组海马组织氧化水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1 Comparison of the oxygenation level in the hippocampus after gerbil cerebral ischemia/reperfusion injury

指标	假手术组	模型组	脑心清组	脑络通组
乳酸脱氢酶(U/mg)	263.3±13.4	205.8±12.6 <sup>a</sup>	241.5±13.1 <sup>b</sup>	242.6±12.9 <sup>b</sup>
超氧化物歧化酶(U/mg)	131.5±7.83	71.6±3.92 <sup>a</sup>	112.5±6.17 <sup>b</sup>	113.4±5.68 <sup>b</sup>
丙二醛(μmol/g)	3.5±0.27	5.8±0.37 <sup>a</sup>	3.5±0.22 <sup>b</sup>	3.6±0.24 <sup>b</sup>

表注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

**2.6 脑心清胶囊抑制脑缺血再灌注诱导的炎症反应** 通过试剂盒检测沙鼠海马组织白细胞介素18和白细胞介素1β的水平,结果显示,与假手术组相比,模型组沙鼠的白细胞介素18和白细胞介素1β质量浓度明显升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,脑心清组及脑络通组沙鼠的白细胞介素18和白细胞介素1β质量浓度明显降低( $P < 0.01$ )。见图4。

**2.7 脑心清胶囊抑制脑血管损伤** 免疫荧光染色实验结果显示,与假手术组相比,模型组沙鼠血小板内皮细胞黏附分子1阳性细胞较少,细胞间连接间断;与模型组相比,脑心清组及脑络通组沙鼠的血小板内皮细胞黏附分子1阳性细胞明显增多,细胞间连接紧密。见图5。

Western blot结果显示,与假手术组相比,模型组沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子1和磷酸化内皮型一氧化氮合酶表达显著下调( $P < 0.01$ );与模型组相比,脑心清组及脑络通组沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子1和磷酸化内皮型一氧化氮合酶表达显著上调,见图6。一氧化氮试剂盒检测结果显示,与假手术组相比,模型组沙鼠海马组织一氧化氮含量显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,脑心清组及脑络通组沙鼠海马组织一氧化氮含量显著升高( $P < 0.01$ ),见图6。

### 3 讨论 Discussion

脑组织的血流供应中断可引起一系列缺血级联反应,而随治疗恢复供血后,脑部又会产生脑缺血再灌注损伤<sup>[18]</sup>。由于脑缺血再灌注损伤会改变脑血管的形态及功能,进而降低脑部的物质交换能力,随供血供氧减少,诱发后续的氧化及炎症反应,最终损伤脑细胞<sup>[19]</sup>。由脑缺血再灌注损伤的发生机制可知,该过程是一个多通路多靶点的协同过程。而在治疗的过程中,最有效的办法的则是对脑缺血再灌注损伤发病所对应的相关通路全部进行抑制或阻断,而根据此次研究的结果可以看出,脑心清胶囊可以从多个角度缓解脑缺血再灌注损伤的症状。

发生脑缺血再灌注损伤时,患者的脑部功能往往受损。如文献报道可知,脑缺血会直接损伤脑部海马神经元树突棘,使其脱落或者消失,从而引起神经元的结构改变;同时,随着脑缺血再灌注损伤的发生,海马神经元会释放大量的谷氨酸,从而过度上调N丙二醛R受体,诱发兴奋性毒性损伤,两者的协同作用导致大脑出现学习记忆功能障碍<sup>[20-21]</sup>。因此,一般多以沙鼠的学习记忆能力损伤,评价脑缺血再灌注损伤主要以大鼠的脑部损害状况。由此次研究的结果可知,模型组沙鼠的逃避潜伏期明显长于假手术组,而对比阳性药及脑

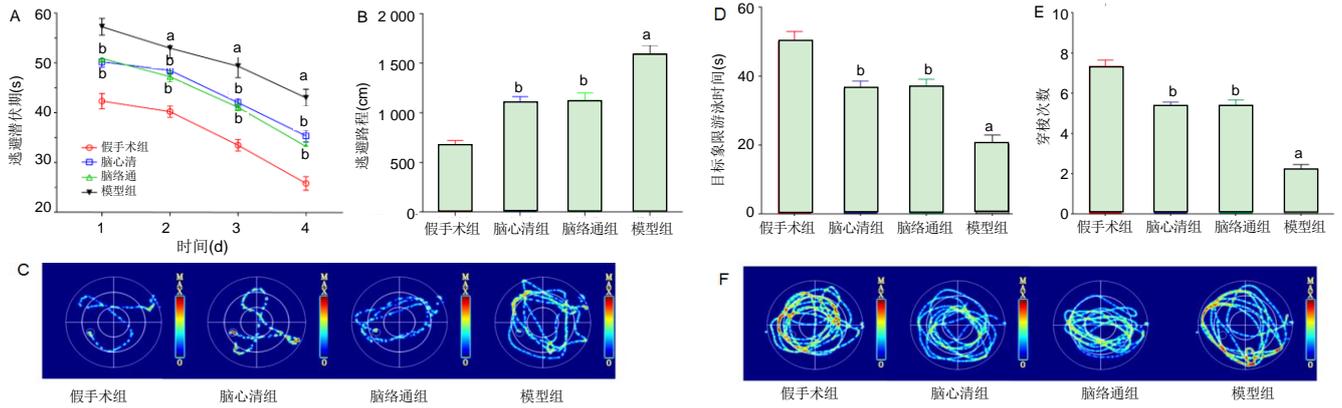
心清,沙鼠的逃避潜伏期则显著缩短( $P < 0.05$ ),同时,同模型组相比,目标象限的游泳时间、有效停留时间及穿梭次数明显增加( $P < 0.01$ )。该结果提示脑心清胶囊可以有效的改善脑缺血再灌注损伤症候,保护沙鼠脑缺血再灌注损伤后的学习记忆能力。然而,为了进一步证明上述机制的发生,作者从细胞形态及免疫组织化学等几个方面进行了深入的研究。

如前所述,脑出血以及脑缺血再灌注损伤会直接损伤脑部的海马神经元树突棘,其在脑部解剖层面的改变就是海马CA1区锥体细胞排列及形态的变化,随着脑缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡及焦亡,会发生神经元胞体皱缩,核固缩,胞浆深染,胞浆内尼氏小体的减小等症状<sup>[22-23]</sup>。此次研究的结果显示,脑心清对沙鼠学习能力的保护作用,主要是通过海马CA1区锥体细胞的保护实现的,根据此次研究的Nissl染色结果结果可知,相比于模型组,经过脑心清的治疗,沙鼠的神经元数量明显增多,而细胞的形态也较为整齐,神经元细胞的保护情况较好。该结果提示,脑心清对于沙鼠脑缺血再灌注损伤所致学习能力损伤,主要是通过对海马CA1区锥体细胞的保护得以实现的。而该机制,也被大量研究所验证<sup>[24]</sup>。此次研究从功能实验及解剖学形态两个角度考察了脑心清缓解脑缺血再灌注损伤的基础。为了进一步揭示脑心清在这一过程中发挥的作用,作者又开展了一系列分子生物学实验,以验证其机制。

由于脑缺血再灌注损伤的发病机制复杂,特别是早期脑缺血症状便启动了后续的一系列脑损伤机制。因此,研究拟从文献中报道的几个方面,对脑心清脑缺血再灌注损伤保护机制做以解释,具体的示意图如图7所示。

当脑部由缺血进入再灌注状态时,由于大量脑细胞受损,细胞液内的乳酸脱氢酶随之释放,抑制了线粒体的呼吸功能,过度损耗细胞内的ATP,进一步降低脑部的能量代谢效率,同时,乳酸脱氢酶可促进钙超载,促进氧自由基形成<sup>[25]</sup>。另一方面,由于脑部代偿忽然上升,加速了血钙超载,一氧化氮释放随之增多,在阻塞部位的脑组织出现了局部的自由基浓度剧烈上升<sup>[26]</sup>,从而介导了后续的一系列反应产生损伤。可以说,自由基的过量增加是脑缺血再灌注损伤发生的起点,而从自由基保护的机制出发,可从根源上限制脑缺血再灌注损伤的损伤。同时,清除脑缺血再灌注损伤模型内的乳酸脱氢酶浓度,可有效抑制后续的氧自由基损伤。在脑梗死区的氧化损伤,主要是通过丙二醛及超氧化物歧化酶的平衡得以实现的。由于脑部的自身结构导致其往往易于受到氧自由基的侵袭<sup>[27]</sup>,而在脑缺血再灌注损伤的发生的过程中,丙二醛往往过度表达<sup>[28]</sup>,该指标代表着脑组织的氧化损伤程度。另一方面,超氧化物歧化酶值则代表着脑组织对自由基的清除情况,以对抗氧化损伤<sup>[29]</sup>。根据此次研究的结果可知,在对模型沙鼠进行药物干预时,脑心清可有效的降低乳酸脱氢酶及丙二醛的浓度,提升超氧化物歧化酶值的浓度,从而降低脑缺血再灌注损伤的氧化损伤,起到脑保护作用。

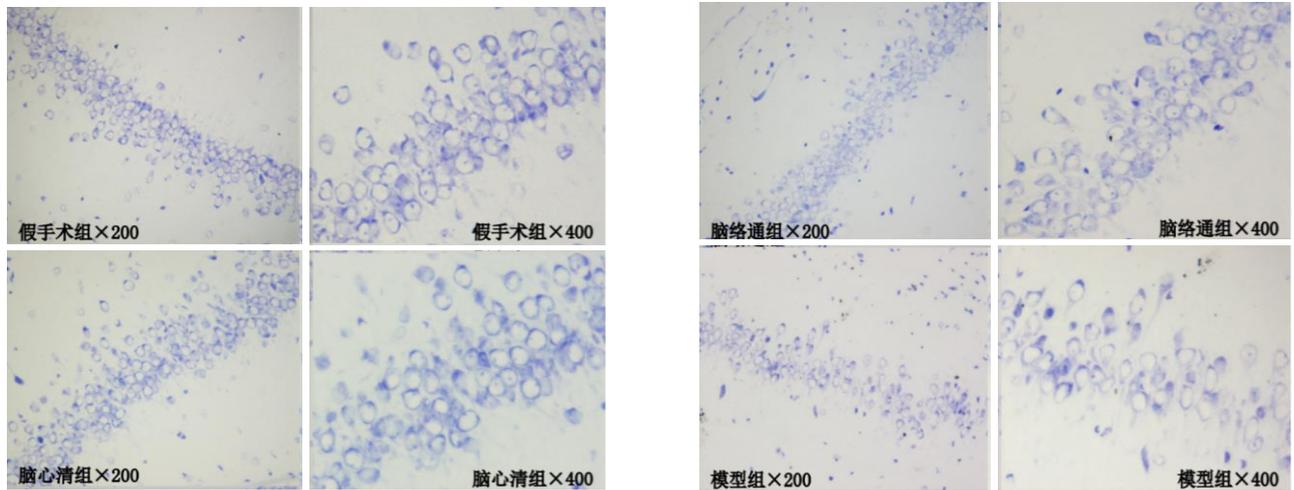
随着脑缺血再灌注损伤的发生,本身即会激活释放大量的炎症信号因子<sup>[6]</sup>;氧化损伤的不断持续,脑血管内皮细胞、



图注: 图 A 为逃避潜伏期; B 为逃避路程; C 为水迷宫定位航行实验轨迹图; D 为目标象限的游泳时间; E 为穿梭次数; F 为空间探索实验轨迹图。与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 各组水迷宫定位航行实验及空间探索实验结果

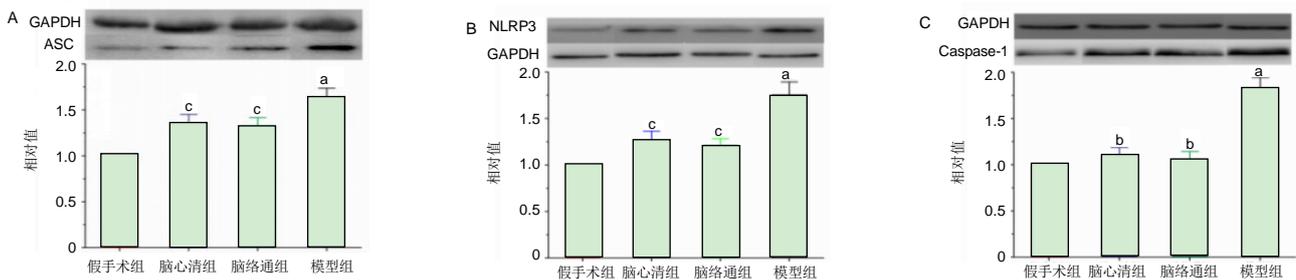
Figure 1 Water maze navigation test and spatial probe test results in each group



图注: 与模型组相比, 脑心清组及脑络通组神经元显著增多, 且排列较为整齐

图 2 各组沙鼠的海马 CA1 区 Nissl 染色结果

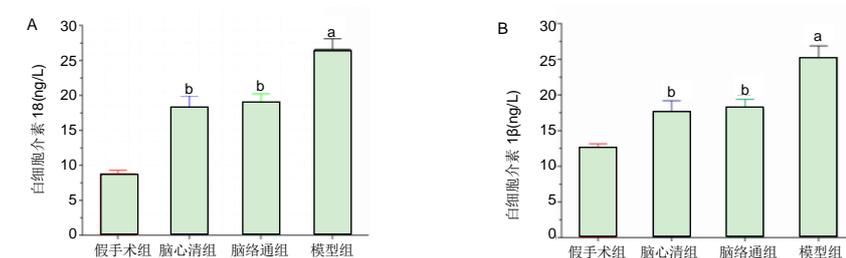
Figure 2 Nissl staining results of hippocampal CA1 in gerbils of each group



图注: 图 A 为 ASC 蛋白表达; B 为 NLRP3 蛋白表达; C 为 Caspase-1 蛋白表达。与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$

图 3 各组沙鼠海马组织 ASC、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达

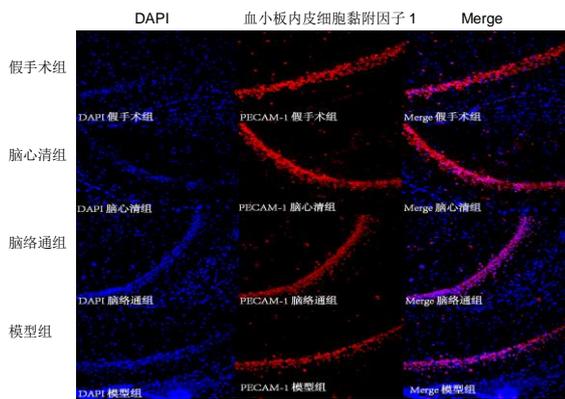
Figure 3 Protein expression levels of ASC, NLRP3 and Caspase-1 in the hippocampus of gerbils in each group



图注: 图 A 为白细胞介素 18 水平; B 为白细胞介素 1β 水平。与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 4 对比各组沙鼠海马组织白细胞介素 18 和白细胞介素 1β 水平

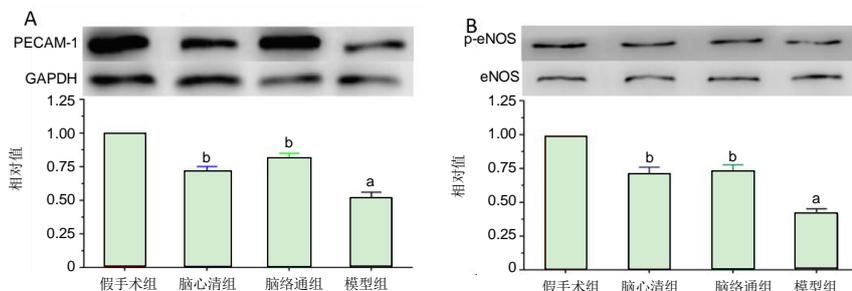
Figure 4 Protein expression levels of interleukin-18 and interleukin-1β in the hippocampus of gerbils in each group



图注:与模型组相比,脑心清组及脑络通组沙鼠的血小板内皮细胞黏附分子1阳性细胞明显增多,细胞间连接紧密

图5 各组沙鼠海马组织CA1区血小板内皮细胞黏附分子1阳性细胞对比(标尺=100 μm)

Figure 5 Cells positive for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in the hippocampal CA1 of gerbils in each group (scale bar=100 μm)



图注:图A为血小板内皮细胞黏附分子1(PECAM-1)表达;B磷酸化内皮型一氧化氮合酶(p-eNOS)表达;C为一氧化氮浓度。与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图6 对比各组沙鼠海马组织血小板内皮细胞黏附分子1和磷酸化内皮型一氧化氮合酶表达及一氧化氮水平

Figure 6 Expression levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase, and content of nitric oxide in the hippocampus of gerbils in each group

胶质细胞的凋亡,亦会使细胞内的炎症信号因子释放<sup>[30]</sup>,同时,随着炎症因子的不断释放,其所对应炎症信号通路也会被激活,从而放大了各类炎症损伤的级联效应<sup>[31]</sup>。另一方面,随大量炎症递质的释放,炎症通路的激活,脑细胞的焦亡程序会随之激活。脑缺血再灌注损伤的焦亡主要由半胱天冬酶(Caspase-1)依赖性介导<sup>[11]</sup>。而Caspase-1焦亡通路的上游靶点之一是凋亡相关斑点样蛋白(ASC),其功能是连接胞浆内受体和Caspase-1的接头蛋白<sup>[12]</sup>;NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)的功能和ASC类似,作为固有免疫中处理和递呈炎症信号的重要节点<sup>[32]</sup>,NLRP3可激活炎症体通路<sup>[33]</sup>,两者均可以活化Caspase-1以激活后续的炎症反应,在细胞焦亡的过程中,Caspase-1主要是通过Caspase-1→白细胞介素18和白细胞介素1β从而激活后续的脑细胞焦亡的发生。此次研究显示,脑心清可显著下调脑组织内ASC、NLRP3和Caspase-1的表达。从而抑制了Caspase-1所介导的细胞焦亡的发生。

除了作用于脑细胞的焦亡通路外,根据KEGG的查询结果可知<sup>[34]</sup>,白细胞介素18是NOD样受体信号通路及TNF信号通路重要靶点,而白细胞介素1β更是嵌入了NOD样受体、NF-KB、白细胞介素17、TRP及Toll样受体等众多炎症

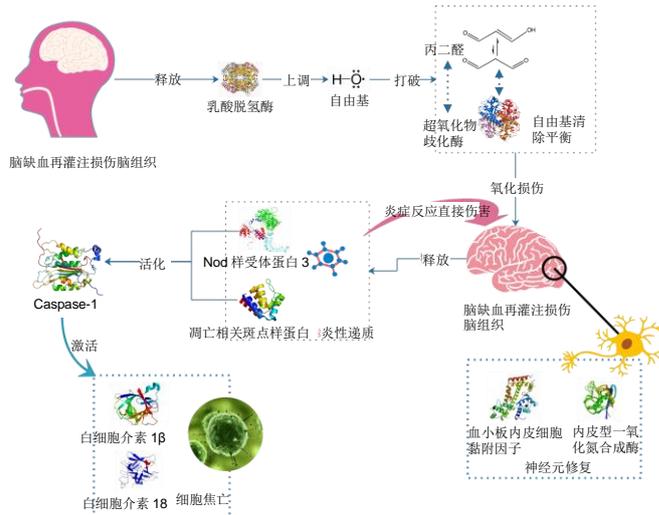


图7 脑心清作用于脑缺血再灌注损伤的机制  
Figure 7 Mechanism of Naoxingqing acting on cerebral ischemia/reperfusion injury

信号通路。两者本身即在脑缺血再灌注损伤的发生过程中发挥了重要作用<sup>[35-36]</sup>。随上游ASC、NLRP3→Caspase-1信号通路的抑制,下游的白细胞介素18和白细胞介素1β的表达亦随之下调,从而有效的抑制炎症损伤的发生。根据此次研究结果可知,随着脑缺血再灌注损伤的发生,模型组内的白细胞介素18和白细胞介素β的水平均显著性升高,而脑心通给药后,可迅速降低两者的浓度,结果提示,脑心通除了可以抑制细胞焦亡外,亦有效的参与了众多炎症反应信号通路,并随之发挥了炎症损伤保护作用。

在炎症发生的过程中,血小板内皮细胞黏附分子1的表达贯穿了整个炎症反应的过程,其是引起白细胞外渗的主要成分,且进一步的促进白细胞的迁移,从而激发了相应的炎症反应,因此,血小板内皮细胞黏附分子1在脑缺血再灌注损伤早期,主要是介导了大脑的炎症损伤<sup>[37]</sup>。而在后期,随着炎症反应的消失,血小板内皮细胞黏附分子1则通过对脑血管的修复,以实现脑组织保护的作用。该作用是通过两条通路介导的,分别是上游的PI3K/Akt上调内皮型一氧化氮合酶表达<sup>[38]</sup>,及其介导的下游的SDF-1/CXCR4通路增加血小板内皮细胞黏附分子1的表达<sup>[39]</sup>,最终促进缺血部位血管再生。在此次研究中,可以看出随着模型组给药,脑心清可以

有效上调脑组织内p-内皮型一氧化氮合酶和血小板内皮细胞黏附分子1的表达,而在海马组织内,血小板内皮细胞黏附分子1的表达也随之上升,结果提示,在发病的后期,脑心清可以有效增加海马组织内的血管再生效率。

因此,通过对细胞焦亡的特征、分子机制及其与脑缺血再灌注关系的进一步研究,有助于深化对海马神经元细胞死亡方式和机制的认识,为脑缺血再灌注损伤的预防和治疗提供新的思路。

**作者贡献:** 实验设计由通讯作者完成,实验实施由第一至第七作者完成,论文撰写由第一作者和通讯作者完成,评估由所有作者完成,均接受过正规训练。

**经费支持:** 该文章接受了“国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531704)”“辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家重点实验室开放基金(zyzx1705)”“辽宁省科技厅项目(20180551110)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号为21000092017072)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 陈伟伟,隋辉,马丽媛.中国心脑血管病流行现状及防治进展[J].心脑血管病防治,2016,16(2):79-83.

[2] 马小惠,张杰,黄志超,等.氟、砷对原代培养大鼠海马神经细胞氧化应激及凋亡影响的实验观察[J].新疆医科大学学报,2016,39(6):663-667.

[3] 何丽云,孙塑伦,范吉平,等.参麦注射液对神经细胞凋亡及胞浆钙变化的影响[J].中国中西医结合杂志,2001,21(8):605-607.

[4] 王启海,韩军,李睿,等.蜂胶总黄酮对全脑缺血再灌注大鼠脑血管舒张功能的影响[J].现代中药研究与实践,2015,29(4):10-12.

[5] 邱珍,夏中元,雷少青,等. NLRP3炎症小体在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注时细胞焦亡中的作用[J].中华麻醉学杂志,2018,38(6):732-735.

[6] FINK SL, COOKSON BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907-1916.

[7] 郭礼,黄格朗,周凯,等.中药及其有效成分防治脑卒中缺血再灌注损伤相关机制的研究进展[J].黑龙江中医药,2017,46(2):71-73.

[8] 刘晓梅,王淑英,刘斌.红景天苷对脑缺血再灌注大鼠脑神经元APE/Ref-1的影响[J].中国老年学,2009,29(5):518-520.

[9] AHMED T, ENAM SA, GILANI AH. Curcuminoids Enhance Memory in an Amyloid-infused Rat Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience.* 2010;169(3):1296-1306.

[10] 郑关毅,石旺清,陈晓东,等.毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后bFGF、GAP-43的表达及神经再生的影响[J].药理学,2011,46(9):1065-1071.

[11] 潘发福,梁明春,刘卉芳,等.雷公藤内酯醇对慢性脑缺血模型大鼠海马突触素和突触后致密物95的影响[J].中国老年学,2012,32(14):2964-2967.

[12] 任非非,刘敬霞.中医药促进脑缺血再灌注损伤神经重塑的优势与思考[J].中国中西医结合杂志,2017,37(7):123-129.

[13] 马莹娟,尚玉莹,王德杰,等.柿叶黄酮类化合物对D-半乳糖致衰老小鼠的抗抗氧化神经保护作用[J].复旦学报:医学版,2015,42(1):7-12.

[14] 覃斐章.柿叶总黄酮对L-NAME诱导的高血压大鼠的降压作用及其机制的研究[D].南宁:广西医科大学,2008.

[15] 唐竞.叶及其产品在心血管病糖尿病防治方面的新进展[J].山西医药杂志,2008,37(16):740-741.

[16] 贝伟剑.柿叶活性成分及脑心清片对脑缺血神经保护作用研究[D].广州:中山大学,2004.

[17] ZHU S, ZHANG Z, JIA LQ, et al. Valproic acid attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-pyroptosis pathways. *Neurochem Int.* 2019;124:141-151.

[18] 姜辰,杨浩鹏.葛根素对小鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制研究[J].中国卒中杂志,2018,13(1):58-63.

[19] 王文杰,左霞,郭俐宏,等.大株红景天注射液对大鼠脑缺血再灌注后血管内皮损伤的影响[J].新乡医学院学报,2016,33(1):26-29.

[20] 李春丽,杨吉平,衡爱玲,等.人参皂甙Rg1联合美满霉素对脑缺血大鼠海马内N丙二醛受体表达及学习记忆功能的影响[J].神经解剖学杂志,2013,29(5):508-512.

[21] 陶涛,秦文熠,秦新月,等.米诺环素对大鼠脑缺血再灌注损伤后学习记忆能力及海马神经元PSD-95蛋白表达的影响[J].重庆医科大学学报,2015,40(1):23-26.

[22] 李钢,陈旭. 盐酸戊乙奎醚对缺血再灌注损伤大鼠海马CA1区神经细胞及TNF- $\alpha$ 、IL-10表达的影响[J]. 中国临床研究,2018,31(1):51-55.

[23] 陈文博,寇亚芬,张引国,等.贝沙罗汀拮抗A $\beta$ (25-35)诱导的海马CA1区锥体神经谷氨酸能突触传递的抑制效应[J].天津医科大学学报,2017,23(4):285-289.

[24] 王金鑫,卢国彦,郭虹,等. 心脑舒通胶囊对蒙古沙鼠全脑缺血再灌注损伤模型的神经保护作用[J].中国临床药理学杂志,2017,33(6):518-521.

[25] 黎丹东,谢国旗,高延玲,等.清脑片对大鼠脑缺血再灌注损伤的预防作用[J].中国药房,2017,28(16):2198-2201.

[26] 方卫,李诺,覃斯娜,等.氯化钾溶液对大鼠脑组织缺血再灌注损伤的影响及机制[J].山东医药,2018,58(10):36-38.

[27] MIYAUCHI T, WEI EP, POVLISHOCK JT. Evidence for the Therapeutic Efficacy of Either Mild Hypothermia Or Oxygen Radical Scavengers After Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2014;31(8):773-781.

[28] LI W, TAN C, LIU Y, et al. Resveratrol Ameliorates Oxidative Stress and Inhibits Aquaporin 4 Expression Following Rat Cerebral Ischemia-reperfusion Injury. *Mol Med Rep.* 2015;12(5):7756-7762.

[29] 闫安,谢云亮.当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激水平及炎症因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):123-127.

[30] 兰晶,潘敬芳.姜黄素对脑缺血再灌注损伤大鼠PI3K/AKT/mTOR的影响[J].重庆医学,2017,46(1):42-45.

[31] HE Y, XIAO Y, YANG X, et al. Sirt6 Inhibits Tnf- $\alpha$ -induced Inflammation of Vascular Adventitial Fibroblasts Through Ros and Akt Signaling Pathway. *Exp Cell Res.* 2017;357(1):88-97.

[32] JIANG W, LV H, WANG H, et al. Activation of the Nlrp3/caspase-1 Inflammasome in Human Dental Pulp Tissue and Human Dental Pulp Fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):541-555.

[33] SUTTERWALA FS, OGURA Y, SZCZEPANIK M, et al. Critical Role for Nalp3/cias1/cryopyrin in Innate and Adaptive Immunity Through Its Regulation of Caspase-1. *Immunity.* 2006;24(3):317-327.

[34] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30.

[35] 甄瑾,傅永旺,朱润秀,等.免疫三氧自血回输治疗对急性缺血性脑卒中患者血清IL-18和hsCRP水平的研究[J]. 中国保健营养,2016,26(21):6.

[36] 李丹丹,马茜,王辛,等. IL-1 $\beta$ 在缺血性脑卒中发病中的作用机制研究进展[J].山东医药,2015,55(35):91-93.

[37] 韩翔宇,宋大庆,朱瑞云,等.促红细胞生成素经鼻给药对缺血再灌注大鼠神经功能及脑组织CD31的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2018,27(9):783-787.

[38] DEDOVA IV, NIKOLAEVA OP, SAFER D, et al. Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys J.* 2006;90(3):985-992.

[39] 阎雯,齐薛浩.白藜芦醇对新生大鼠神经元缺血缺氧时SDF-1/CXCR4通路抗凋亡作用的调控机制[J].中国病理生理杂志,2018,34(7):1177-1182.