

活血康脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

万嘉洋， 万海同， 何 昱， 虞 立， 杨洁红， 周惠芬*
(浙江中医药大学，浙江 杭州 310053)

摘要：目的 探究活血康脑颗粒（黄芪、巴戟天、葛根等）对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 建立大鼠大脑中动脉栓塞（MCAO）模型，SD 大鼠随机分为假手术组，模型组，阳性对照组，活血康脑颗粒低、中、高剂量组。测试神经功能评分，TTC 染色计算脑梗死体积，酶联免疫吸附（ELISA）法检测超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、6-酮-前列腺素（6-keto-PGF_{1α}）、血栓素 B₂（TXB₂）、白细胞介素-1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α），逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）法检测基质金属蛋白酶 9（MMP-9）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）表达水平。为了观察活血康脑颗粒对血小板聚集功能的影响，全自动血凝分析仪分析凝血时间，ELISA 法测定血浆组织型纤溶酶原激活物（t-PA）和抑制物（PAI）活性，全自动生化分析仪检测血液流变学指标。**结果** 活血康脑颗粒能显著减少脑梗死体积，改善神经功能，降低 MDA 含量，增加 SOD 活性；升高 6-keto-PGF_{1α} 水平，降低 TXB₂ 含量；减少 IL-1β 和 TNF-α 表达；抑制 MMP-9、ICAM-1 表达；延长白陶土部分凝血活酶时间（KPTT）、血浆凝血酶原时间（PT）；升高 t-PA 活性，抑制 PAI 活性；降低全血黏度，提高红细胞变形能力。活血康脑颗粒每个剂量组的量效呈正相关。**结论** 活血康脑颗粒可保护大鼠脑缺血再灌注损伤，其机制可能与抗自由基损伤、抗血栓、抗脑血管痉挛、改善脑血管通透性、抗炎、抗凝血、改善血液流变学异常变化有关。

关键词：活血康脑颗粒；脑缺血再灌注损伤；抗自由基；抗炎；抗凝血；抗血栓；血液流变学

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)11-2236-07

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2017. 11. 003

Protective effects of Huoxue Kangnao Granules on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WAN Jia-yang， WAN Hai-tong， HE Yu， YU Li， YANG Jie-hong， ZHOU Hui-fen*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: AIM To explore the protective effects of Huoxue Kangnao Granules (*Astragali Radix*, *Morindae officinalis Radix*, *Puerariae lobatae Radix*, etc.) on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **METHODS** The rat model for middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established, SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control group, Huoxue Kangnao Granules low-, middle- and high-dose groups. Nerve function score was tested. Volume of cerebral infarction was calculated by TTC staining. SOD, MDA, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, IL-1β and TNF-α were detected by ELISA. The expression levels of MMP-9 and ICAM-1 were detected by RT-PCR. To observe the influence of Huoxue Kangnao Granules on platelet aggregative function, clotting time was analyzed by automatic blood coagulation analyzer, plasma T-PA and PAI activities were determined by ELISA, and hemorheology indices were detected by automatic biochemical analyzer. **RESULTS** Huoxue Kangnao Granules could significantly decrease cerebral infarction volume, improve nerve function, reduce MDA content, increase SOD activity; increase 6-keto-PGF_{1α} level, reduce TXB₂ content; decrease TNF-α and IL-1β expressions; inhibit MMP-9 and ICAM-1 expressions; extend KPTT and PT; elevate t-PA activity, inhibit

收稿日期：2017-05-18
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81630105，81603531）；浙江省自然科学基金资助项目（LZ17H270001）；浙江省中医药管理局资助项目（2016ZZ010）
作者简介：万嘉洋（1997—），女，从事中药药效学研究。E-mail: m18968177650@163.com
* 通信作者：周惠芬（1986—），女，实验师，从事中药有效成分分离及中药药代学和药效学研究。Tel:（0571）86633179，E-mail: zhouhui fen2320@126.com

2236

PAI activity; decrease whole blood viscosity, enhance erythrocyte deformation ability. Each dosage group of Huoxue Kangnao Granules had a positive correlation between dose and response. **CONCLUSION** Huoxue Kangnao Granules can protect cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, whose mechanisms may be related to anti-free radical injury, anti-thrombus, anti-cerebral vasospasm, improving cerebrovascular permeability, anti-inflammatory, anti-coagulation and improving abnormal changes of hemorheology.

KEY WORDS: Huoxue Kangnao Granules; cerebral ischemia-reperfusion injury; anti-free radical; anti-inflammatory; anticoagulation; antithrombus; hemorheology

鉴于缺血性脑卒中临床多有气虚血瘀证，以往中医药治疗多采用活血化瘀或益气活血等方药^[1]，该类治法虽具有一定疗效，但也有许多不良后果，如易致脑缺血再灌注损伤、出血等不良后果^[2]。因此，对脑缺血的治疗不仅要使血流再通，还要防止再灌注损伤。

中药复方制剂活血康脑颗粒由生黄芪、巴戟天、野葛根、地龙、黄芩、川芎 6 味药材组成，具有益气活血、养阴生津等功效，临床用于治疗缺血性脑血管疾病。本实验采用线栓法诱导大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型，观察活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料

1.1 药品和试剂 活血康脑颗粒（杭州华东医药集团康润制药有限公司，批号 140101-140103）；维脑路通片（山西亚宝药业股份有限公司，批号 131140）；尼莫地平胶囊（海南普利制药有限公司，批号 130628）；阿司匹林片肠溶片（沈阳奥吉娜药业有限公司，批号 131109）；复方丹参片（云南白药集团股份有限公司，批号 ZMB1306）；氯化三苯四氮唑（TTC，南京建成科技有限公司，批号 20140508）；SOD 活性和 MDA 含有量检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；6-keto-PGF_{1α}和 TXB₂含有量检测试剂盒（上海信帆生物科技有限公司）；IL-1β和 TNF-α检测试剂盒（上海源叶生物科技有限公司）；t-PA 和 PAI 活性检测试剂盒（上海信帆生物科技有限公司）；Trizol Reagent（TaKaRa 公司，批号 14105）；DEPC（Amresco 公司，批号 C6H1005）；逆转录试剂盒（Takara 公司，批号 AK2301）；PCR 试剂盒（Takara 公司，批号 AK3702）；DNA Ladder Marker（上海莱枫生物科技有限公司，批号 C0714）；引物（上海生工生物工程股份有限公司）。

1.2 仪器 7020 全自动生化分析仪（日立公司）；酶标仪（美国 MD SpectraMax Plus384）；DYY-8C 型琼脂糖凝胶电泳仪（北京市六一仪器厂）；赛多

利斯（Sartorius）BS110S 电子天平（北京赛多利斯天平有限公司）；Sigma 2-16PK 离心机（Sigma 公司）；CA500 全自动凝血仪（日本希森美康）；DY89-II 型电动玻璃匀浆机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；CFB-3120 型荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad 公司）。

1.3 动物 健康 SD 雄性大鼠，体质量 290 ~ 300 g，饲养条件合格证 SYXK（浙）2013-0184，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，许可证号 SCXK（沪）2013-0016。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠随机分为假手术组（正常组）、脑缺血再灌注损伤组（模型组）、阳性药物对照组 [尼莫地平组 0.008 1 g/(kg·d)、维脑路通组 0.048 6 g/(kg·d)、阿司匹林组 0.009 g/(kg·d)、复方丹参片组 0.259 g/(kg·d)]、活血康脑颗粒治疗组 [1.5、3.0、6.0 g/(kg·d)]。将活血康脑颗粒和阳性药物临用前用生理盐水配成混悬液，分别于再灌注时灌胃给药 1 次，早晚各 1 次，连续 2 d；假手术组与模型组灌胃等量生理盐水。

2.2 大鼠脑缺血再灌注损伤模型制备 参照 Longa 等^[3]改良的线栓法来制作大脑中动脉栓塞模型（MCAO）：用 10 % 水合氯醛（1 mL/100 g）麻醉大鼠，固定消毒后在颈部正中切口，分离右侧颈总动脉（CCA）、颈内动脉（ICA）和颈外动脉（ECA）。结扎 ECA，尽量远离分叉处，并用动脉夹暂时阻断 CCA，于分叉处附近动脉夹暂时夹闭 ICA 远心端，在 ECA 剪口，从剪口处将鱼线插入，从 ECA 插入到分叉处 ICA，调整方向并沿着 ICA 走向轻轻推进，遇到阻力停止推进，插入鱼线约 18 mm，将鱼线固定在 ECA 上。缺血 90 min 后，拔出栓线，再灌，结扎 ECA 近分叉位置。缝合切口，酒精消毒，防止感染。假手术组未插入鱼线，其他步骤同上。

2.3 神经功能评分 参照 Bederson 等^[4]报道的 0 ~ 3 分分级方法，建立大鼠脑缺血再灌注损伤模

型并给药，在 24、48、72 h 时间点观察并记录神经功能缺失症状：没有神经功能缺失症状为 0 分；提尾，病灶对侧肢体屈曲为 1 分；除 1 分征象外，病灶对侧的侧推阻力下降为 2 分；除 1、2 分征象外，有向瘫痪侧旋转征象为 3 分。中途死亡及颅底出血者均不予统计。

2.4 脑梗死体积比 灌胃给药后，断头取脑，迅速置于冰箱 -20 ℃ 冷冻 15 min，自前脑额极起沿标尺用锋利刀片切出 6 片冠状切片，每片厚 2.5 mm，将脑片置 2% TTC 染色液中，于 37 ℃ 下孵育 30 min。将脑片按切片顺序排列，用数码相机拍照后输入计算机，用图像分析软件计算每一片缺血面积及总体面积，再计算梗死面积比值。

2.5 大鼠脑组织 SOD、MDA、6-keto-PGF_{1α}、TXB₂、IL-1β、TNF-α、MMP-9、ICAM-1 检测 大鼠灌胃给药后，断头取脑，分离缺血侧脑内皮组织，按照试剂盒说明书分别对脑组织匀浆中 SOD、MDA、6-keto-PGF_{1α}、TXB₂、IL-1β、TNF-α 进行测定。采用 RT-PCR 法检测 *MMP-9*、*ICAM-1* 表达水平，测定均按其测定试剂盒说明书进行。引物 *β-actin*：正向 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'，反向 5'-CCCAT-ACCCACCATCACACC-3'。*ICAM-1*：正向 5'-TCTCATGCCCGTGAATTATG-3'，反向 5'-TTGA-TTCAAAGCAAAGGCTTCT-3'。*MMP-9*：正向 5'-ATCTGTATGCTCGTGGCTCTAA-3'，反向 5'-TGG-CTTCCTCCGTGATTCG-3'。

2.6 活血康脑颗粒对二磷酸腺苷（ADP）诱导的大鼠血小板聚集功能的影响 大鼠灌胃给药后，10% 水合氯醛（0.4 mL/100 g）腹腔麻醉，心脏取血，3.8% 枸橼酸钠抗凝，血量与抗凝剂之比为 9：1。血小板聚集实验：25 ℃ 室温下将抗凝管以 1 000 r/min 离心 10 min，得到富含血小板血浆（PRP），存放备用；抗凝管再以 3 000 r/min 离心，

得自身对照样品血小板血浆（PPP），以 ADP 作为诱导剂，采用比浊法在 CA500 全自动血凝仪测定血小板聚集性。具体操作方法参照仪器使用说明书和试剂盒测试说明书，以 5 min 时血小板聚集率（%）表示结果。

2.7 活血康脑颗粒对凝血时间的影响 大鼠灌胃给药后，10% 水合氯醛（0.4 mL/100 g）腹腔麻醉，心脏取血，3.8% 枸橼酸钠抗凝，血量与抗凝剂之比为 9：1。具体操作方法参照 CA500 全自动血凝仪仪器使用说明书和试剂盒测试说明书。

2.8 血浆中 t-PA、PAI 测定 大鼠灌胃给药后，10% 水合氯醛（0.4 mL/100 g）腹腔麻醉，心脏取血，肝素钠抗凝，4 000 r/min 离心 10 min，取上清。严格按照酶联免疫（ELISA）试剂盒说明书操作。

2.9 活血康脑颗粒对脑缺血大鼠血液流变学指标的影响 血液流变学指标检测高、低切全血黏度，红细胞变形能力。全血黏度测定：取肝素抗凝血 0.8 mL，加入测试杯中，计算机采样获得切变率 200/s 和 1/s 的全血黏度值（mPa·s）。红细胞变形能力测定：取肝素抗凝血 0.04 mL，加入 1 mL 悬浮液混合，取 0.8 mL 上全自动生化分析仪测试，计算机采样获得红细胞最大变形能力。

2.10 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 活血康脑颗粒对大鼠神经行为学评分影响 与假手术组相比，模型组神经行为学评分明显升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组相比，活血康脑颗粒组及尼莫地平组均能显著减轻大鼠神经功能缺损症状（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）；活血康脑颗粒减轻大鼠神经功能缺损症状与其给药浓度正相关。见表 1。

表 1 活血康脑颗粒对大鼠脑缺血后神经功能缺损症状的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 10$ ）
Tab. 1 Effect of Huoxue Kangnao Granules on neurological deficit after cerebral ischemia in rats（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 10$ ）

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	神经功能缺损症状评分/分		
		24 h	48 h	72 h
假手术组	—	0.20 ± 0.11	0.42 ± 0.20	0.32 ± 0.10
模型组	—	2.50 ± 0.67 ^{▲▲}	2.61 ± 0.81 ^{▲▲}	2.33 ± 0.89 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	1.90 ± 0.57 [△]	1.10 ± 0.88 ^{△△}	0.50 ± 0.53 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	2.45 ± 0.69	1.45 ± 0.69 ^{△△}	0.91 ± 0.54 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	2.40 ± 0.84	1.80 ± 0.92 [△]	1.30 ± 0.95
尼莫地平组	0.008 1	2.10 ± 0.74	1.50 ± 0.71 ^{△△}	0.80 ± 0.63 ^{△△}

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

3.2 脑梗死体积 在建立模型 72 h 后，测定脑梗死体积。与假手术组相比，模型组脑梗死总体积明

显增加（ $P < 0.01$ ）；与模型组相比，尼莫地平组、活血康脑颗粒组脑梗死体积比显著减少（ $P <$

0.05, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 活血康脑颗粒对大鼠脑缺血后脑梗死的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Effect of Huoxue Kangnao Granules on cerebral infarction after cerebral ischemia in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	梗死体积比
假手术组	—	0
模型组	—	0.260 ± 0.033 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	0.041 ± 0.021 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	0.125 ± 0.029 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	0.178 ± 0.037 [△]
尼莫地平组	0.008 1	0.080 ± 0.027 ^{△△}

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

3.3 大鼠脑组织 SOD、MDA、6-keto-PGF_{1α}、TXB₂、IL-1β、TNF-α、MMP-9、ICAM-1 检测

3.3.1 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注大鼠脑皮质 SOD 活力和 MDA 含有量的影响 对 SOD 活力的影响：与假手术组相比，模型组明显下降 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒各剂量组均具有显著差异 ($P < 0.01$)，表明活血康脑颗粒可显著提高脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 SOD 活力。

对 MDA 含有量的影响：与假手术组相比，模型组明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，活血康脑颗粒各剂量组、维脑路通组均具有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明活血康脑颗粒高、中剂量能显著降低脑缺血再灌注大鼠脑皮质 MDA 含有量 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 SOD 活力和 MDA 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Effects of Huoxue Kangnao Granules on SOD activity and MDA content in cerebral cortex of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	SOD/(NU·mg prot ⁻¹)	MDA/(nmol·mg prot ⁻¹)
假手术组	—	20.346 ± 5.932	1.439 ± 0.808
模型组	—	9.887 ± 2.802 ^{▲▲}	5.384 ± 1.636 [▲]
活血康脑颗粒组	6.0	23.535 ± 6.483 ^{△△}	1.472 ± 0.347 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	17.532 ± 5.240 ^{△△}	2.562 ± 1.225 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	17.515 ± 5.507 ^{△△}	2.614 ± 1.392 [△]
维脑路通组	0.048 6	11.730 ± 4.321	3.286 ± 0.535 [△]

注：与假手术组比较，[▲] $P < 0.05$ ，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

3.3.2 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑 6-keto-PGF_{1α} 和 TXB₂ 含有量的影响 对脑皮质 6-keto-PGF_{1α} 含有量的影响：与假手术组相比，模型

组明显降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高剂量组具有显著差异 ($P < 0.05$)，各剂量组量效关系呈正相关，表明活血康脑颗粒能显著提高脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 6-keto-PGF_{1α} 的含有量。

对脑皮质 TXB₂ 含有量的影响：与假手术组相比，模型组明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高、中剂量组均具有极显著差异 ($P < 0.01$)，表明活血康脑颗粒能显著降低脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 TXB₂ 含有量。见表 4。

表 4 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑 6-keto-PGF_{1α} 和 TXB₂ 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 4 Effects of Huoxue Kangnao Granules on the contents of 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂ in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	6-keto-PGF _{1α} /(pg·mg prot ⁻¹)	TXB ₂ /(pg·mg prot ⁻¹)
假手术组	—	3 000.0 ± 144.6	20 610.0 ± 976.3
模型组	—	2 530.1 ± 132.0 ^{▲▲}	23 128.8 ± 1 544.9 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	2 708.9 ± 155.8 [△]	20 677.5 ± 747.1 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	2 672.7 ± 166.0	21 113.8 ± 795.5 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	2 627.8 ± 247.7	22 161.3 ± 1 536.4
维脑路通组	0.048 6	2 707.7 ± 192.2 [△]	21 715.0 ± 1 488.1 [△]

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

3.3.3 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 IL-1β、TNF-α 水平的影响 与假手术组相比，模型组脑组织 IL-1β 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.01$)；活血康脑颗粒高、中剂量组和维脑路通组能显著降低脑组织内 IL-1β 和 TNF-α 的表达，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑 IL-1β、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 5 Effects of Huoxue Kangnao Granules on the levels of IL-1β and TNF-α in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
假手术组	—	187.49 ± 32.50	1 193.38 ± 203.02
模型组	—	300.49 ± 23.34 ^{▲▲}	2 032.97 ± 353.07 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	213.42 ± 33.47 ^{△△}	1 240.27 ± 326.80 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	238.81 ± 17.73 ^{△△}	1 360.41 ± 356.47 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	283.87 ± 31.71	1 967.57 ± 174.71
维脑路通组	0.048 6	243.91 ± 65.26 ^{△△}	1 345.54 ± 273.89 ^{△△}

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{△△} $P < 0.01$

3.3.4 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 MMP-9、ICAM-1 基因表达量的影响 与假手术组相比，模型组 ICAM-1、MMP-9 mRNA 的表达

显著上调 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高、中剂量组均能显著下调 *ICAM-1*、*MMP-9* mRNA 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 6。

表 6 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠脑 *MMP-9*、*ICAM-1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 6 Effects of Huoxue Kangnao Granules on the expressions of *MMP-9* and *ICAM-1* mRNA in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	<i>MMP-9</i>	<i>ICAM-1</i>
假手术组	—	1	1
模型组	—	5.76 ± 1.91 ^{▲▲}	7.76 ± 3.10 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	2.20 ± 0.78 ^{△△}	1.67 ± 0.35 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	3.06 ± 1.19 [△]	2.99 ± 1.35 [△]
活血康脑颗粒组	1.5	4.53 ± 2.56	5.78 ± 1.85
维脑路通组	0.048 6	2.87 ± 1.01 [△]	2.51 ± 0.45 ^{△△}

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3.4 活血康脑颗粒对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集功能的影响 与假手术组比较，模型组 5 min 时血小板聚集率极显著上调 ($P < 0.01$)；与模型组比较，活血康脑颗粒各剂量组和阿司匹林组对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 7。

表 7 活血康脑颗粒对血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 7 Effect of Huoxue Kangnao Granules on platelet aggregation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	5 min 时血小板聚集率/%
假手术组	—	41.5 ± 4.1
模型组	—	75.7 ± 5.1 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	57.8 ± 2.3 ^{△△}
活血康脑颗粒组	3.0	63.0 ± 1.7 ^{△△}
活血康脑颗粒组	1.5	68.9 ± 3.8 [△]
阿司匹林组	0.009	53.2 ± 1.9 ^{△△}

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3.5 活血康脑颗粒对凝血时间的影响 活血康脑颗粒对白陶土部分凝血活酶时间 (KPTT) 的影响：与假手术组相比，模型组显著缩短 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高、中剂量组和阿司匹林组均具有显著延长的作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，各剂量组量效关系呈正相关，表明活血康脑颗粒具有延长 KPTT 的作用。

活血康脑颗粒对血浆凝血酶原时间 (PT) 的影响：与假手术组相比，模型组显著缩短 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高剂量组和阿司匹林组具有显著延长 PT 的作用 ($P < 0.05$)，

各剂量组量效关系呈正相关，表明活血康脑颗粒具有延长 PT 的作用。见表 8。

表 8 活血康脑颗粒对 KPTT 和 PT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 8 Effects of Huoxue Kangnao Granules on KPTT and PT ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	KPTT/s	PT/s
假手术组	—	16.68 ± 0.87	8.89 ± 0.36
模型组	—	14.20 ± 0.61 ^{▲▲}	7.98 ± 0.34 ^{▲▲}
活血康脑颗粒组	6.0	15.48 ± 1.32 ^{△△}	8.32 ± 0.17 [△]
活血康脑颗粒组	3.0	14.88 ± 1.16 [△]	8.14 ± 0.20
活血康脑颗粒组	1.5	14.32 ± 1.32	8.12 ± 0.32
阿司匹林组	0.009	15.98 ± 0.42 ^{△△}	8.72 ± 0.15 [△]

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3.6 血浆中 t-PA、PAI 活性测定 对血浆 t-PA 活性的影响：与假手术组相比，模型组显著降低 t-PA 活性 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高、中剂量组和维脑路通组均显著提高血浆 t-PA 活性 ($P < 0.01$)。

对血浆 PAI 活性影响：与假手术组相比，模型组显著提高 PAI 活性 ($P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高、中剂量组和维脑路通组均显著降低血浆 PAI 活性 ($P < 0.01$)。见表 9。

表 9 活血康脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠血浆 t-PA、PAI 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 9 Effects of Huoxue Kangnao Granules on the activities of plasma t-PA and PAI in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	t-PA/ (ng·mL ⁻¹)	PAI/ (ng·mL ⁻¹)	PAI/ t-PA
假手术组	—	13.26 ± 1.99	0.943 ± 0.257	0.071
模型组	—	7.82 ± 0.68 ^{▲▲}	1.892 ± 0.178 ^{▲▲}	0.241
活血康脑颗粒组	6.0	12.74 ± 1.29 ^{△△}	1.229 ± 0.343 ^{△△}	0.096
活血康脑颗粒组	3.0	11.33 ± 1.57 ^{△△}	1.504 ± 0.128 ^{△△}	0.133
活血康脑颗粒组	1.5	8.83 ± 1.06	1.733 ± 0.405	0.196
维脑路通	0.049	10.49 ± 1.97 ^{△△}	1.464 ± 0.241 ^{△△}	0.140

注：与假手术组比较，^{▲▲} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{△△} $P < 0.01$

3.7 活血康脑颗粒对脑缺血大鼠血液流变学指标的影响

3.7.1 活血康脑颗粒对脑缺血性大鼠全血黏度的影响 与假手术组相比，模型组全血黏度高切、低切均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组相比，活血康脑颗粒高剂量组全血黏度高切、低切均具有显著差异 ($P < 0.05$)；活血康脑颗粒各剂量组量效关系呈正相关，表明活血康脑颗粒可降低脑缺血大鼠全血黏度的异常升高。见表 10。

表 10 活血康脑颗粒对脑缺血性大鼠全血黏度的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 10 Effect of Huoxue Kangnao Granules on whole blood viscosity in rats with cerebral ischemia
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	全血黏度/(mPa·s)	
		高切/(200·s ⁻¹)	低切/(1·s ⁻¹)
假手术组	-	4.20 ± 0.70	8.09 ± 1.97
模型组	-	13.12 ± 5.73▲	17.10 ± 5.10▲▲
活血康脑颗粒组	6.0	5.26 ± 1.10△	10.50 ± 2.20△
活血康脑颗粒组	3.0	6.70 ± 2.46	11.13 ± 3.88
活血康脑颗粒组	1.5	8.36 ± 1.45	13.47 ± 2.40
复方丹参片组	0.259	5.57 ± 0.91△	11.06 ± 1.83

注：与假手术组比较，▲*P* < 0.05，▲▲*P* < 0.01；与模型组比较，△*P* < 0.05

3.7.2 活血康脑颗粒对脑缺血性大鼠红细胞变形能力的影响 与假手术组相比，模型组显著降低 (*P* < 0.01)；与模型组相比，活血康脑颗粒高剂量组和复方丹参片组具有极显著差异 (*P* < 0.01)；活血康脑颗粒各剂量组量效关系呈正相关，提示活血康脑颗粒具有提高脑缺血性大鼠红细胞变形能力的作用。见表 11。

表 11 活血康脑颗粒对脑缺血性大鼠红细胞变形能力的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 11 Effect of Huoxue Kangnao Granules on deformability of red blood cells in rats with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	红细胞变形能力
假手术组	-	1.285 ± 0.178
模型组	-	0.857 ± 0.091▲▲
活血康脑颗粒组	6.0	1.187 ± 0.081△△
活血康脑颗粒组	3.0	0.953 ± 0.043
活血康脑颗粒组	1.5	0.903 ± 0.037
复方丹参片组	0.259	1.034 ± 0.043△

注：与假手术组比较，▲▲*P* < 0.01；与模型组比较，△*P* < 0.05，△△*P* < 0.01

4 讨论

脑缺血再灌注时，激发多途径大量产生自由基，同时体内清除自由基能力下降，受损区生物膜结构破坏，进一步引发脂质过氧化连锁反应。MDA 是主要脂质过氧化物，能使细胞结构和功能发生破坏；SOD 是人体最重要的自由基清除剂，当自由基显著增多时，其含量和活性会显著下降^[5-6]。本实验表明，活血康脑颗粒能显著降低脑组织 MDA 含量，提高 SOD 活性，具有提高细胞抗氧化、抑制其脂质过氧化的作用，可抗自由基对脑组织的损伤。

血管病变性疾病血管壁合成前列环素 (PGI₂)，血小板激活后血栓素 A₂ (TXA₂) 比例及平衡失调，会导致血栓形成^[7]，TXA₂/PGI₂ 不稳定，所以检测其代谢产物 TXB₂/6-keto-PGF_{1α}。本实验表明，活血康脑颗粒显著降低脑组织中 TXB₂ 含量，显著升高 6-keto-PGF_{1α} 含量，具有抗血栓作用。

大鼠脑缺血再灌注损伤后，TNF-α、IL-1β 等被激活，进一步导致内皮细胞间紧密连接被破坏，使得大鼠血脑屏障的通透性增加^[8-10]。本研究结果显示，活血康脑颗粒高、中剂量组均能显著抑制缺血再灌注损伤脑组织中 IL-1β 和 TNF-α 的表达，有效抑制炎症级联反应。

ICAM-1 是介导粘附反应的一个重要粘附分子，介导循环中的白细胞与内皮细胞粘附，进而浸润到血管外脑实质，导致缺血后炎症^[11]，能够在转录水平上促进基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达上调。MMP-9 作为细胞外基质蛋白水解酶，通过下调 VEGF 的表达，导致缺血后脑组织新生血管形成障碍^[12]，加重组织损伤，同时通过细胞因子和基因刺激参与神经炎症反应应答，启动子区包含转录因子活化蛋白-1、核转录因子-kB。活血康脑颗粒可显著下调 MMP-9、ICAM-1 表达，抑制炎症反应。

白陶土部分凝血活酶时间 (KPTT) 是内源性凝血系统敏感的筛选指标，凝血酶原时间 (PT) 是外源性凝血系统较为敏感的筛选指标^[13]。本实验结果表明，活血康脑颗粒具有显著延长 KPTT、PT 的作用，对缺血性脑血管疾病的治疗作用与本药抗凝血作用有关。

大鼠脑缺血再灌注损伤后，t-PA 是纤溶系统的重要因子，可释放入血，促进纤溶酶原的激活，进行生理性纤溶，机体能通过其清除血管内不适当的血栓形成。PAI 是 t-PA 的抑制剂，其活性变化与血栓形成密切相关，PAI/t-PA 平衡失调可诱发纤溶功能紊乱^[14-15]。本研究表明，活血康脑颗粒可显著抑制 PAI 活性，增高 t-PA 活性，调节两者活性比，提高纤溶水平。

研究表明，心脑血管疾病血瘀证患者血液流变性及红细胞变形指数大多存在着异常变化^[16-18]。临床研究发现，采用活血化瘀药物治疗后，随着患者微循环和血液循环障碍的改善，其血液流变性也相应得到改善。本实验表明，活血康脑颗粒具有抑制脑缺血大鼠全血黏度异常升高、提高其红细胞变

形能力的作用。

总之，活血康脑颗粒可使脑梗死体积减小，减少神经功能损伤，可使脑组织 MDA 含有量降低，SOD 活性增高；升高 6-keto-PGF_{1α} 含有量，降低 TXB₂ 含有量；降低脑组织内 IL-1β 和 TNF-α 表达，下调 MMP-9、ICAM-1 表达；显著延长 KPTT、PT 的作用；升高 t-PA 活性，下降 PAI 活性；降低全血黏度，提高红细胞变形能力，各剂量组量效关系呈正相关，提示活血康脑颗粒具有抗自由基损伤、抗血栓、抗脑血管痉挛、改善脑血管通透性、抑制炎症反应、抗凝血、提高纤溶活性、溶栓消栓、改善异常血液流变学变化作用。本实验为研究活血康脑颗粒保护脑缺血再灌注损伤的机制提供参考，并为其在脑血管方面的临床应用提供实验依据。

参考文献：

[1] 万海同, 郑筱祥. 中医药防治缺血性中风的临床与实验研究概况[J]. 中国中医急症, 1998, 7(5): 231-235.

[2] 丁爱国, 张树泉. 缺血性脑梗塞早期中医治疗探讨[J]. 山东中医杂志, 1990, 9(1): 28-29, 38.

[3] Longa, E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[4] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986; 17(3): 472-476.

[5] 汪兴宇, 张宇燕, 万海同, 等. 参芎注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 503-506.

[6] Huang H F, Guo F, Cao Y Z, *et al.* Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (MnSOD) mimics: antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(10): 811-818.

[7] 轻曼古丽·阿吉, 马 虎, 美合热阿依·伊萨克, 等. 槭枹总黄酮对血栓形成和血小板聚集作用的影响[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1589-1592.

[8] Fumie K, Takashi S, Hideyuki Y, *et al.* The rapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(3): 500-506.

[9] 于健宁, 奚九一. 白鹤冲剂对肿瘤坏死因子-α 刺激的血管内皮细胞核因子-κB 激活的影响[J]. 中医杂志, 2005, 46(4): 297-299.

[10] 周惠芬, 艾进超, 万海同, 等. 参芎注射液对缺血再灌注损伤大鼠炎症损伤的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2408-2412.

[11] 张丽慧, 魏尔清. ICAM-1、VCAM-1 在脑缺血损伤炎症机制中的作用及调控[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(11): 1281-1285.

[12] Valable S, Montaner J, Bellail A, *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1 [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491-1504.

[13] 万海同, 白海波, 杨洁红, 等. 养阴益气活血冲剂对脑缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2): 85-87.

[14] 舒明春, 万海同, 周惠芬, 等. 谷红注射液抗脑缺血性再灌注损伤的作用及其机制[J]. 中国中药杂志, 2014, 24(2): 4829-4833.

[15] 李卫征, 高重阳. 急性脑梗死患者血浆 t-PA 及 PAI-1 的变化及意义[J]. 中国社区医师, 2014, 30(7): 96-99.

[16] 席玉冰. 血液流变学在心脑血管疾病方面的应用价值[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(8): 1405-1406.

[17] 冯永钦, 谢传英, 张清平, 等. 心脑血管疾病血液流变学指标的分析[J]. 中国血液流变学杂志, 2002, 12(1): 22-26.

[18] 邱巧丽, 苏 洁, 陈素红, 等. 复方白术提取物对高脂血症大鼠脂质代谢、血液流变学和微循环的影响[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1437-1443.