

一种预防和/或治疗缺血再灌注损伤的中药组合物

技术领域

本发明涉及中医药领域，具体涉及一种预防和/或治疗缺血再灌注损伤的中药组合物。

背景技术

1966年，Jennings首先提出缺血再灌注损伤（ischemic reperfusion injury）的概念：当组织细胞低灌流缺血后获得血液再供应时，不但未使组织细胞缺血性损害减轻或恢复，反而加重了缺血性损伤。它是高等动物机体缺血后再灌注发生的普遍现象。如心脏手术、冠脉搭桥、脏器血供梗塞后再通、器官移植以及休克脏器低灌流纠正后都可能发生再灌注损伤。其损伤的程度与缺血的时间、侧支循环的情况、需氧的程度、再灌注的条件等密切相关。

对缺血性疾病的治疗，当然首要的是恢复血液灌注，目的在于解除组织的缺氧和营养物质供应不足的状态，以阻止缺血性损伤的发展或促使其恢复。

近年来，随着休克治疗的进步以及动脉搭桥术、溶栓疗法、经皮腔内冠脉血管成形术、心脏外科体外循环、心肺脑复苏，断肢再植和器官移植等方法的建立和推广应用，使许多组织器官缺血后重新得到血液再灌注。

大量临床实践证明，这种治疗在许多情况下都获得了较好的效果，因此，恢复血液灌注已成为治疗缺血性疾病的基本原则。

相对应的，目前治疗缺血再灌注损伤的药物有自由基清除剂和抗氧化剂、钙拮抗剂和通道抑制剂、抗炎药物等等。

丹参多酚酸，临床上使用的剂型是注射用丹参多酚酸，其作用是活血、化瘀、通脉。临床用于冠心病稳定型心绞痛，分级为Ⅰ、Ⅱ级，心绞痛症状表现为轻、中度，中医辨证为心血瘀阻证者，症见胸痛、胸闷、心悸。

三七总皂甙（三七总皂苷），临床上剂型为注射用血塞通，其药理作用是：扩张冠脉和外周血管、降低外周阻力、减慢心率、减少和降低心肌耗氧量、增加心肌灌注量、增加脑血流量、对心肌和脑缺血有一定改善作用；具显著抑制血小板凝聚、降低血液粘稠度、抑制血栓形成的作用；此外，本品还具降血脂，抗疲劳，耐缺氧，提高和增强巨噬细胞功能等作用。临床上主要用于脑血管后遗症，视网膜中央静脉阻塞，眼前房出血等。

黄芪总皂甙，临床上用于抗血栓形成，可以增强免疫、补中益气的作用。

目前，尚未见到丹参多酚酸、三七总皂苷和黄芪总皂苷三者合用的报道。

发明内容

本发明的目的，在于提供一种预防和/或治疗缺血再灌注损伤的中药组合物。该中药组合物由丹参多酚酸、三七总皂苷和黄芪总皂苷组成。

丹参多酚酸、三七总皂苷和黄芪总皂苷的重量比为（1~16）：（1~16）：（1~16）。

优选的，所述中药组合物中丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为（4~16）：（1~8）：（1~16）。

进一步优选，所述中药组合物中丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为（4~16）：（1~4）：（1~16）。

更进一步优选，所述中药组合物中丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为（4~8）：（1~4）：（1~16），或为（8~16）：（1~4）：（1~16）。

再次优选，所述中药组合物中丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为（4~8）：1：（5~16），或为（4~8）：（1~2）：（1~5）。

效果最佳，所述中药组合物中丹参多酚酸（a）、三七总皂苷（b）、黄芪总皂苷（c）的重量比为4：1：5。

本发明所用成分中:

丹参多酚酸为提取物, 含有丹酚酸 B、丹参素钠、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 E, 各成分的重量百分比分别为 40-95%、20-95%、3-15%、2-10%和 0.2-2.2%。

丹参多酚酸可以由以下方法制备: 丹参饮片用浓度为 20-90%的乙醇提取, 提取液浓缩至无醇, 提取物经过聚酰胺层析, 用水或浓度为 30%以下的乙醇洗去杂质, 以浓度为 30-95%的乙醇或者浓度为 0.05-0.3%的碳酸氢钠或者浓度为 0.01-0.3%的碳酸钠洗脱, 收集洗脱液, 调 pH 1-5.5, 通过弱极性或者非极性大孔树脂, 水洗或 20%以下乙醇洗去杂质, 30-95%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 干燥, 即得。

三七总皂苷为提取物, 含有的成分中: 三七皂苷 R_1 含量 5-20%, 人参皂苷 Rb_1 含量不少于 20%, 人参皂苷 Rd 含量 3-15%, 人参皂苷 Rg_1 含量不少于 30%, 人参皂苷 Re 含量不少于 2%, 五种皂苷含量总和不少于 80%。

三七总皂苷可以由以下方法制备: 取三七药材, 粉碎成粗颗粒, 加入 3-10 倍量浓度为 20-80%的乙醇回流提取两次, 每次 2-5 小时, 合并提取液, 提取液减压浓缩至无醇, 离心, 上清液经大孔吸附树脂进行富集, 3-10 倍柱体积水洗去糖类成分和部分色素, 继用 5-10 倍柱体积 30-70%乙醇进行洗脱, 收集醇洗脱液, 减压浓缩至干粉, 得三七总皂苷。

黄芪总皂苷为提取物, 黄芪总皂苷的重量百分含量为 20-100%, 其中黄芪甲苷含量为 20-95%。

黄芪总皂苷可以由以下方法提取: 取黄芪饮片, 粉碎成粗颗粒, 用 3-10 倍量浓度为 20-70%乙醇 (含 0.1-0.5%的碳酸氢钠) 回流提取两次, 每次 2-5 小时, 合并提取液, 提取液减压浓缩至药材 2-5 倍量体积, 离心, 上清液经大孔吸附树脂进行富集, 先用 2-8 倍柱体积的浓度为 0.1-1%的 NaOH 溶液冲洗, 再用 2-8 倍柱体积的浓度为 20-60%乙醇洗脱, 最后用 2-8 倍柱体积的浓度为 70-95%乙醇进行洗脱, 收集浓度为 70-95%的乙醇洗脱液。再通过大孔树脂脱色, 2-5 倍柱体积的浓度为 70-95%乙醇洗脱, 收集流出液和洗脱液, 减压浓缩至小体积, 结晶析出固体, 收集固体干燥, 得黄芪总皂苷。

本发明的另一目的是提供含该中药组合物的制剂, 该制剂由中药组合物和药学上可接受的载体组成。

所述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体, 选自填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、增溶剂、助悬剂、润湿剂、色素、溶剂、表面活性剂或矫味剂中的一种或几种。

所述填充剂选自淀粉、预胶化淀粉、糊精、葡萄糖、蔗糖、乳糖、乳糖醇、微晶纤维素、甘露醇、山梨醇或木糖醇;

所述粘合剂选自羧甲基纤维素钠、羟丙甲基纤维素、乙基纤维素、聚维酮、淀粉浆、蔗糖、糖粉、胶浆、明胶或聚乙二醇;

所述崩解剂选自交联羧甲基纤维素钠, 交联聚维酮、低取代羟丙基纤维素或羧甲基淀粉钠或淀粉;

所述润滑剂选自硬脂酸镁、滑石粉、微粉硅胶、PEG4000、PEG6000 或月桂醇硫酸钠;

所述增溶剂选自氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸氢钠、葡甲胺、L-赖氨酸或 L-精氨酸;

所述助悬剂选自微粉硅胶、蜂蜡、纤维素或固态聚乙二醇;

所述润湿剂选自甘油、吐温-80、乙氧基氢化蓖麻油或卵磷脂;

所述溶剂选自乙醇、液态聚乙二醇、异丙醇、吐温-80、甘油、丙二醇或植物油, 所述植物油选自大豆油、蓖麻油、花生油、调和油等;

所述表面活性剂选自十二烷基苯磺酸钠、硬脂酸、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、脂肪酸山梨坦或聚山梨酯 (吐温) 等;

所述矫味剂选自阿斯巴甜、蔗糖素、香精、甜菊素、安赛蜜、柠檬酸或糖精钠。

本发明的另一个目的, 在于提供该中药组合物的用途。

其中一个用途, 为本发明中药组合物在治疗和/或预防缺血再灌注损伤中的应用。本发明所述的缺血再灌注损伤, 包括但不限于脑缺血再灌注损伤、心肌缺血再灌注损伤、肾缺血再灌注损伤、下肢缺血再灌注损伤、脊髓缺血再灌注损伤、视网膜缺血再灌注损伤、皮瓣缺血再灌注损伤等。

本发明所述的缺血再灌注损伤，包括但不限于溶栓引起的缺血再灌注损伤，动脉搭桥术引起的缺血再灌注损伤，经皮腔内冠脉血管成形术引起的缺血再灌注损伤，心脏外科体外循环引起的缺血再灌注损伤，心肺脑复苏引起的缺血再灌注损伤，断肢再植和器官移植等引起的缺血再灌注损伤。

另外一个用途，是本发明提供的中药组合物可以与 tPA（组织型纤溶酶原激活物）组合用于溶栓，在第二用途中，中药组合物与 tPA 按照重量比为 10:（5-20）进行组合。

中药组合物可以减轻 tPA 引起的渗出和出血，增加的生存率，降低了神经损伤。

本发明提供的中药组合物具有以下优点：

本发明提供的中药组合物具有协同效果，可以治疗和/或预防缺血再灌注损伤，同时与 tPA 组合用于溶栓，效果好，副作用少。

附图说明

图 1A 为各组大鼠再灌注 24h 后脑组织片 TTC 染色图像；

图 1B 为是不同组 TTC 梗死面积的统计图；

图 2 A、图 2 B 分别表示了再灌注 3 h 和 24 h 后各组大鼠进行神经功能学评分的结果；

图 3 为各组小鼠颈总动脉内血栓的动态变化。初始值是 FeCl₃ 刺激前的基础值。10 分钟表示的是 FeCl₃ 刺激开始后 10 分钟（其中，FeCl₃ 滤纸包绕颈总动脉 3 分钟后去除）。4.5 小时表示的是 FeCl₃ 滤纸包绕血管开始后的 4.5 小时，也即给药开始的时间。5.5 小时表示的是给药后 1 小时。6.5 小时表示的是给药后 2 小时），24 小时表示的是给药后 24 小时；

图 4 为用激光多普勒血流量仪检测小鼠脑表面血流灌注的图像。初始值是 FeCl₃ 刺激前的基础值。10 分钟表示的是 FeCl₃ 刺激开始后 10 分钟（其中，FeCl₃ 滤纸包绕颈总动脉 3 分钟后去除）。4.5 小时表示的是 FeCl₃ 滤纸包绕血管开始后的 4.5 小时，也即给药开始的时间。5.5 小时表示的是给药后 1 小时。6.5 小时表示的是给药后 2 小时），24 小时表示的是给药后 24 小时；

图 5 为给药后 24 小时脑组织中渗出的伊文斯蓝含量（Evans Blueleakage），图中：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与 tPA 溶栓组相比 $p<0.05$ ；N=6；

图 6 为缺血半影区脑表面毛细血管后微静脉的血管通透性情况；图中：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与 tPA 溶栓组相比 $p<0.05$ ；N≤6；

图 7 为给药后 24 小时脑血管周围水肿、微血管开放数及干湿重比的变化；图中：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与 tPA 溶栓组相比 $p<0.05$ ；N≤6；

图 8 为给药后 24 小时后脑微血管内皮细胞缝隙连接蛋白的变化，脑血管内皮细胞细胞缝隙连接的透射电镜图像，箭头指示血管内皮细胞连接（TJ）。右脑缺血半影区皮层 ZO-1，VE-cadherin，occluding 和 JAM 的蛋白质印迹及定量统计。图中：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与本底组相比， $p<0.05$ ；† 与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。电镜图像 N=3，其余 N≥6；

图 9 为体外培养内皮细胞缺氧复氧后连接蛋白变化，脑微血管内皮细胞缺氧 4.5 小时，复氧同时给予 tPA 和/或 T541，内皮细胞间的紧密连接 Claudin-5、JAM-1 和粘附连接 VE-cadherin 的蛋白质免疫印迹代表图及统计。缺氧/复氧，Hypoxia/reoxygenation，H/R。图中：*与正常对照组相比， $p<0.05$ vs；#与模型组相比， $p<0.05$ 。N≥4；

图 10 为给药 24 小时后脑出血情况，给药 24 小时后脑出血和梗死代表图。取小鼠脑组织切成 1 毫米厚的薄片拍摄出血情况，迅速用 TTC 染液染色，记录梗死面积，其中图 A 为再灌注 24 小时后脑出血和梗死代表图，图 B 为血红蛋白分光光度测试盒检测各组右半脑组织中血红蛋白含量柱状图。图 C 为各组梗死面积统计。*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与本底组相比， $p<0.05$ ；† 与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。N≥6；

图 11 为给药 24 小时后脑缺血皮层基底膜及相关蛋白变化，图 A，扫描电镜图示脑皮质血管基底膜变化，白色箭头指示。基底膜，basement membrane，BM。N=3。图 B，蛋白免疫印迹显示给药 24 小时后 IV 型胶原（Collagen IV）和层粘连蛋白（Laminin）在右脑缺血半影区皮层的表达量。图 C-D，IV 型胶原（Collagen

IV) 和层粘连蛋白 (Laminin) 的蛋白免疫印迹统计。* 与假手术组相比 $p<0.05$, #与本底组相比 $p<0.05$, †与 tPA 溶栓组相比 $p<0.05$ 。N=6;

图 12 为给药 24 小时后脑组织能量变化, 图中: *与假手术组相比, $p<0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$, N=6-7;

图 13 为给药 24 小时后脑组织氧化应激损伤, 图中: *与假手术组相比, $p<0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。N≥6;

图 14 为给药 24 小时后脑组织 ATP5D 含量变化, 图中: *与假手术组相比, $p<0.05$; #与本底组相比, $p<0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。N=6;

图 15 为给药 24 小时后脑组织细胞凋亡染色, 其中, 图 A, 第 1 行显示给药 24 小时半影区脑皮质的 TUNEL 染色。第 2 行显示给药 24 小时半影区脑皮质神经元凋亡的透射电镜代表图。图 B, TUNEL 阳性细胞计数统计。*与假手术组相比, $p<0.05$; #与本底组相比, $p<0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。N=6;

图 16 为给药 24 小时后脑组织细胞凋亡情况, 图中*与假手术组相比, $p<0.05$; #与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。N=6;

图 17 为体外培养内皮细胞缺氧/复氧后细胞凋亡情况, 图中: *与正常对照组相比, $p<0.05$; #与模型组相比, $p<0.05$ 。N=6。

具体实施方式

实施例 1: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 1: 2: 4。

实施例 2: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 1: 4: 16。

实施例 3: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 2: 16: 1。

实施例 4: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 8: 1: 16。

实施例 5: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 16: 4: 1。

实施例 6: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 16: 8: 4。

实施例 7: 一种中药组合物

丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪总皂苷的重量比为: 4: 1: 5。

实验例 1: 丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪甲苷比例筛选实验

将三种药物根据均匀设计得到表 1 的前 6 组, 剩余的一组是根据预实验结果计算得到, 合计七个剂量组(比例):

表 1: 丹参多酚酸、三七总皂苷、黄芪甲苷配比

组别	丹参多酚酸 (a)	三七总皂苷 (b)	黄芪总皂苷 (c)
1	1	2	4
2	1	4	16
3	2	16	1
4	8	1	16
5	16	4	1
6	4	2	1

7	4	1	5
---	---	---	---

通过实验来验证 7 组的效果。每组总剂量为 20mg/kg。

1. 实验方法

1.1 实验动物

体重为 270-290 g 的雄性 Spragu-Dawley 大鼠 90 只，购于北京大学医学部动物中心，合格证号：SCXK（京）2006-0008。动物饲养在温度为 22 ± 2 °C，湿度为 $40\% \pm 5\%$ 的条件下，自由饮食、饮水，12 小时光照/黑暗交替。动物于实验前 12 小时，禁食自由饮水。

1.2 模型建立

用线栓法造成大鼠大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion, MCAO），建立大鼠大脑中动脉 I/R 型。详述如下，用复合麻醉剂实验前 5 分钟麻醉（腹腔注射），仰卧位固定大鼠，颈部正中去毛，75% 酒精消毒，颈部行长度约 3cm 正中切口，沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜后，避开气管两侧甲状腺和其外上方甲状旁腺，小心分离出颈总、颈外和颈内动脉。6-0 手术缝合线系于颈外动脉近心端，电凝颈外动脉及小分支。用微小动脉夹暂时夹闭颈内、颈总动脉，在颈外动脉上用显微手术剪剪一切口，将制备好的头端包有硅胶的栓线（线体直径 0.38 mm）经颈外动脉切口处缓慢插入颈内动脉至大脑中动脉起始处，堵塞大脑中动脉血液供应。进线长度约为距颈总动脉分叉处 1.8 cm-2.2 cm。90 min 后，拔出栓线，缝合皮肤，建立大鼠脑 I/R 模型。

模型建立后，各实验组（每组大鼠 10 只）分别给予上表中不同配比的中药组合物。假手术组采用同样的手术操作但不插入线栓。整个手术操作过程中维持大鼠肛温在 (37.0 ± 0.5) °C，术后继续用加热毯维持大鼠肛温，直到恢复活动。24 h 后，再次麻醉大鼠并处死取材。

1.3 脑梗死区域染色

用 TTC（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride）染色方法检测 I/R 损伤后大鼠脑梗死。具体方法为：在再灌注 24h 后，取出各组大鼠的大脑，在脑定位器上由前向后切成 5 个薄片放入 2% 的 TTC 中在 37 °C 下孵育 15 分钟，行 TTC 染色。非梗塞区被染成红色，梗塞区不着色仍为白色。

拍摄脑片 TTC 染色图片，用图像分析软件 ImageJ（Bethesda, MD, USA）计算 TTC 染色梗死面积占全脑面积百分比值，评价脑梗死程度。

1.4 神经学评分

在再灌注 3 h、24 h，按照 18 分评分标准对各组大鼠进行神经学评分，见表 2：

表 2：神经学评分

试验	评分标准	分数
提尾试验		3
	前肢屈曲	1
	后肢屈曲	1
	头部在 30s 内偏离垂直轴 $> 10^\circ$	1
将大鼠放置于地板上(正常值=0;最大值=3)		3
	正常行走为	0
	不能直线行走	1
	向轻瘫侧转圈为	2
	向轻瘫侧倾倒	3
感觉试验		2
	放置试验(视觉和触觉测试)	1
	本体感觉试验(深感觉，向桌子边缘压鼠爪刺激肢体肌肉)	2
平衡木试验(正常值=0;最大值=6)		6

稳定平衡姿势	0
紧抓平衡木边缘	1
紧抱平衡木，一肢体从平衡木垂落	2
紧抱平衡木，二肢体从平衡木垂落或在平衡木上旋转(>60 秒)	3
试图在平衡木上平衡但跌落(>40 秒)	4
试图在平衡木上平衡但跌落(>20 秒)	5
跌落，未尝试在平衡木上平衡(<20 秒)	6
反射丧失和不正常运动	4
耳廓反射(接触外耳道时摇头)	1
角膜反射(用棉丝轻触角膜时眨眼)	1
惊恐反射(对快弹硬纸板的噪音有运动反应)	1
癫痫、肌阵挛、肌张力障碍；	1

18 分改良小鼠神经学评分法 (mNSS)，正常小鼠得分为 0 分，最大 18 分，得分越高表示神经缺损越严重，具体结果评价见表 3

表 3：结果评价

0 分	1-6 分	7-12 分	13-18 分
正常小鼠	轻度损伤	中等损伤	严重损伤

2. 实验结果

2.1 TTC 染色结果：见图 1A 和图 1B。

图 1A 是各组大鼠再灌注 24h 后脑组织片 TTC 染色图像。图中白色区域表示梗死区域。图 1B 是不同组 TTC 梗死面积的统计图（具体结果见表 4）。

与假手术组相比，I/R 组大鼠右脑出现明显梗死。8:1:16、16:4:1、16:8:4 及 4:1:5 四个配伍能减少脑梗死面积，其中 8:1:16 及 4:1:5 两个配伍能明显减少脑梗死面积(图 1A，1B)。

2.2 神经学评分结果见图 2 A、图 2 B（分别表示了再灌注 3 h 和 24 h 后各组大鼠进行神经功能学评分的结果）和表 4。

表 4：不同组大鼠的梗死面积、3 小时和 24 小时的神经学评分（均值 ± 标准误）

组别	脑梗死面积 (%)	再灌注 3 小时神经功能学评分	再灌注 24 小时神经功能学评分
假手术组	0.0	0.0	0.0
缺血再灌注组	43.67 ± 1.940*	10.20 ± 0.4667*	8.800 ± 1.031*
1:2:4 组	38.69 ± 3.425*	9.000 ± 0.4944*	8.100 ± 0.7667*
1:4:16 组	36.74 ± 1.824*	9.500 ± 0.8596*	6.000 ± 0.8165*
2:16:1 组	35.99 ± 3.069	9.100 ± 0.7371*	6.800 ± 0.7860*
8:1:16 组	27.13 ± 3.699*#†	8.600 ± 0.7630*	4.600 ± 0.9684*#†
16:4:1 组	30.99 ± 2.436*#	8.500 ± 0.5426*	4.000 ± 0.6325*#†△
4:2:1 组	31.06 ± 3.074*#	8.000 ± 0.9888*	4.900 ± 0.8492*#†
4:1:5 组	24.06 ± 3.621*#†‡△	7.900 ± 0.8492*	5.600 ± 0.4761*#

注：*表示与假手术组比， $P < 0.05$ 。#表示与缺血再灌注比， $P < 0.05$ 。†表示与 1:2:4 组比， $P < 0.05$ 。‡表示与 1:4:16 组相比， $P < 0.05$ △表示与 2:16:1 组比， $P < 0.05$ 。

图 2 A、图 2 B 和表 4 结果显示：

与假手术组 (control) 相比，再灌注 3 h 和 24 h，大鼠神经功能学评分显著降低，7 个配伍组对再灌注 3h 的神经功能学评分的降低没有改善作用，但是，在再灌注 24 h，8:1:16、16:4:1、4:2:1、4:1:5 四个配伍组能显著改善大鼠神经功能学评分。

通过以上实验,可以得出当丹参多酚酸(a)、三七总皂苷(b)、黄芪总皂苷(c)三种药物的比例范围在(4~16):(1~8):(1~16),优选为(4~16):(1~4):(1~16)时,具有良好的改善缺血再灌注损伤的作用。

以下实验以溶栓造成的缺血再灌注损伤为例,选取上述实验中所确定最优比例范围内的不同组别,考察本发明中药组合物对于溶栓后的缺血再灌注损伤的保护作用,以及促进溶栓的作用。但这并不造成对本申请的保护范围的限制,因为任何原因造成的缺血再灌注损伤,都会表现为自由基过多、细胞钙超载、炎症反应等,治疗方法也是一致的。本发明的实验证实了本申请的中药组合物可以治疗溶栓后引起的缺血再灌注损伤,也一样可以推导出本申请的中药组合物也可以治疗其他原因引起的缺血再灌注损伤。

实验例 2: 对小鼠颈动脉血栓的促溶栓作用及溶栓后脑缺血再灌注损伤的保护作用

1. 动物实验模型建立及实验分组

1.1 动物模型建立

体重为 21 ± 2 克的雄性C57BL/6清洁级小鼠,购于北京大学医学部实验动物中心。动物饲养在温度 23 ± 2 摄氏度,相对湿度 $45\pm 5\%$ 的条件下,自由饮食饮水,12小时光照/黑暗交替。动物于实验前12小时,禁食并自由饮水。

用戊巴比妥钠(2%,45毫克/千克)腹腔注射麻醉动物,颈部皮肤备皮消毒。做颈正中切口,暴露并分离颈总动脉,采用一个防水垫片隔离长约2.5-3毫米长的颈总动脉与周围组织。用浸润10% FeCl_3 的滤纸包绕被分离的颈总动脉约1毫米宽,3分钟后除去滤纸,用0.9%的生理盐水清洗血管外侧。除去防水垫片。缝合颈部伤口。 Fe^{3+} 开始刺激定义为缺血开始,缺血10分钟后颈部血栓最大直径处堵塞血管,缺血15分钟后颈动脉远心端血流量小于基础值20%,且缺血4.5小时(即再灌注前)时血栓稳定,血栓面积直径最大处堵塞颈动脉血管直径60%及以上的动物入组。

1.2 实验分组

1.2.1 考察不同配比的本发明中药组合物对溶栓后缺血再灌注损伤的保护作用

缺血4.5小时后,按照随机分组结果给予药物或生理盐水治疗。小鼠股静脉插管,左股静脉泵注tPA(组织型纤溶酶原激活物)或生理盐水,右股静脉泵注本发明中药组合物或生理盐水,总药量10%推注,剩余90%静脉持续泵注1小时,速度0.1毫升/小时。本发明中药组合物选取三个配比组,分别为:

T541组(即黄芪总皂苷:丹参多酚酸:三七总皂苷=5:4:1);

T141组(即黄芪总皂苷:丹参多酚酸:三七总皂苷=1:4:1);

T582组(即黄芪总皂苷:丹参多酚酸:三七总皂苷=5:8:2)。

依据随机数字表将C57BL/6小鼠分为以下10组:

- (1) 假手术组,模型建立时用生理盐水替代 Fe^{3+} 刺激;
- (2) T541高剂量本底组(在假手术组的基础上给予T541 20毫克/千克,简称本底组);
- (3) 血栓组(给予等体积生理盐水);
- (4) T541高剂量溶栓组(单独给予T541 20毫克/千克);
- (5) tPA溶栓组(给予tPA);
- (6) T541低剂量组(给予tPA + T541 5毫克/千克);
- (7) T541中剂量组(给予tPA + T541 10毫克/千克);
- (8) T541高剂量组(给予tPA + T541 20毫克/千克);
- (9) T141组(给予tPA + T141 12毫克/千克);
- (10) T582组(给予tPA + T582 15毫克/千克)。

其中tPA均给予临床等效使用剂量10毫克/千克。各组给药方式见表5。

表 5: 动物实验分组方法及给药方式

	左股静脉给药	右股静脉给药	黄芪总皂苷: 丹参多酚酸: 三七总皂苷
假手术组	生理盐水	生理盐水	-
T541 高剂量本底组	生理盐水	T541 20 毫克/千克	5:4:1
血栓组	生理盐水	生理盐水	-
T541 高剂量溶栓组	生理盐水	T541 20 毫克/千克	5:4:1
tPA 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	生理盐水	-
T541 低剂量组	tPA 10 毫克/千克	T541 5 毫克/千克	5:4:1
T541 中剂量组	tPA 10 毫克/千克	T541 10 毫克/千克	5:4:1
T541 高剂量组	tPA 10 毫克/千克	T541 20 毫克/千克	5:4:1
T141 组	tPA 10 毫克/千克	T141 12 毫克/千克	1:4:1
T582 组	tPA 10 毫克/千克	T582 15 毫克/千克	5:8:2

左股静脉给予 tPA 临床等效使用剂量 10 毫克/千克或等体积生理盐水对照。右股静脉分别给予几组本发明中药组合物, 分别为 T541 低、中、高剂量组、T141 组、T582 组或等体积生理盐水对照。

其中, T541 低剂量组、中剂量组、高剂量组以及 T141 组、T582 组采用与 tPA 同时给药的形式, 这样既可以评价本发明中药组合物的促溶栓作用, 也可考察本发明中药组合物对于溶栓造成的缺血再灌注损伤的治疗作用, 动物实验中各观测指标及各组动物使用数量见表 6。

表 6: 动物实验中各观测指标及各组动物使用数量

	生存率(神经学评分)	血栓(梗死面积)(脑血流量)	出血	伊文斯兰渗出	微循环(脑干湿重比)	组化(免疫荧光)	电镜	分生	合计
假手术组	10	6	6	6	6	3	3	6	46
本底组	6	6	6	6	6	3	3	6	42
血栓组	9	6	6						21
T541 高剂量溶栓组	8	6	6						18
tPA 溶栓组	8	6	6	6	6	3	3	6	44
T541 低剂量组	8	6	6	6	6	3	3	6	20
T541 中剂量组	8	6	6						20
T541 高剂量组	9	6	6						48
T141 组	6	6	6						15
T582 组	6	6	6						18
合计	76	60	60	24	24	12	12	24	292

24 小时生存率及神经学评分各组数量不小于 6, 血栓观察、氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)梗死面积染色、脑血流量及出血情况观察各组数量为 6。选取假手术组、T541 高剂量本底组、tPA 溶栓组和最佳药物浓度组进行下一步观察。伊文斯兰渗出、微循环动态可视化观察、模型侧脑干湿重比和分子生物学指标检测各组数量为 6; 免疫荧光染色和电镜动物各组数量为 3。

记录小鼠再灌注后 24 小时生存率、神经学缺陷评分、颈动脉血栓面积变化和脑血流量灌注情况变化; 选取最佳药物浓度进行下一步分析。

再灌注 24 小时后采用正置显微镜动态微循环观测系统观察小鼠脑微循环动态变化, 记录大脑中动脉区域、前动脉区域和脑表面毛细血管后微静脉的白蛋白渗出情况。

再灌注 24 小时后处死小鼠取脑, 观察脑组织出血情况和梗死面积大小, 测量出血后脑组织中血红蛋白含量; 检测脑组织干湿重比和伊文斯兰渗出程度, 反映组织水肿情况; 脑组织 TUNEL 染色观察细胞凋亡严重程度; 连接蛋白 Occludin、Claudin-5、JAM-1、ZO-1、VE-cadherin 及基底膜成分层粘蛋白 laminin

蛋白质免疫印迹分析和部分连接蛋白及 laminin 免疫荧光染色，观察血管损伤时血脑屏障变化状态；扫描电镜和透射电镜检测脑缺血再灌注后结构变化；酶联免疫吸附测定脑组织 MDA、8-OHdG、ATP/ADP/AMP 及线粒体复合物 I、II 和 IV 活性的变化。

1.2.2 对比本发明中药组合物与拆方后各组分对颈总动脉血栓溶栓后再灌注损伤的治疗作用

为比较本发明中药组合物与拆方后各单独组分（黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷）或两两配伍组对 tPA 溶栓引起的再灌注损伤的治疗作用，本实验采用了 tPA 联合 T541 及 T541 中各单独成分或两两配伍的组别，分别为 tPA+黄芪总皂苷（tPA+HQ）、tPA+丹参多酚酸（tPA+DS）、tPA+三七总皂苷（tPA+SQ）、tPA+黄芪总皂苷 +丹参多酚酸（tPA+HQ+DS）、tPA+黄芪总皂苷+三七总皂苷（tPA+HQ+SQ）、tPA+丹参多酚酸+三七总皂苷（tPA+DS+SQ）和 tPA+ T541。具体分组见表 7。生理盐水为等体积对照。各组使用数量均为 6。

表 7：T541 拆方分组情况及各组给药情况

	左股静脉给药	右股静脉给药	数量
假手术组	生理盐水	生理盐水	6
T541 高剂量本底组	生理盐水	T541 20 毫克/千克	6
tPA 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	生理盐水	6
tPA+HQ 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	黄芪总皂苷 10 毫克/千克	6
tPA+SQ 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	三七总皂苷 2 毫克/千克	6
tPA+DS 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	丹参多酚酸 8 毫克/千克	6
tPA+HQ+SQ 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	黄芪总皂苷 10 毫克/千克，三七总皂苷 2 毫克/千克	6
tPA+HQ+DS 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	黄芪总皂苷 10 毫克/千克，丹参多酚酸 8 毫克/千克	6
tPA+SQ+DS 溶栓组	tPA 10 毫克/千克	三七总皂苷 2 毫克/千克，丹参多酚酸 8 毫克/千克	6
T541 高剂量组	tPA 10 毫克/千克	T541 20 毫克/千克	6
合计			54

1.3 细胞实验流程、分组及观测指标

1.3.1 细胞实验流程及分组

建立大鼠脑内皮细胞缺氧复氧模型：大鼠脑内皮细胞购自 ATCC 公司，正常培养传代至 5 至 6 代后进行实验。

分为（1）正常对照组；（2）模型组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升处理；（3）T541 高剂量给药组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升和 T541 400 微克/毫升处理；（4）T541 次高剂量给药组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升和 T541 40 微克/毫升处理；（5）T541 中剂量给药组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升和 T541 4 微克/毫升处理；（6）T541 次低剂量给药组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升和 T541 0.4 微克/毫升处理；（7）T541 低剂量给药组：缺氧 4.5 小时，复氧 3 小时，复氧开始时加 tPA 20 微克/毫升和 T541 0.04 微克/毫升处理。

用 Cellcounting Kit-8（简称 CCK-8，MedChem Express，中国）试剂盒测试不同药物处理下细胞活力与正常组细胞的差异。实验中分组为（1）正常对照组；（2）T541 高剂量药物本底组：正常细胞加 T541 400 微克/毫升处理 3 小时；（3）次高剂量药物本底组：正常细胞加 T541 40 微克/毫升处理 3 小时；（4）中剂量药物本底组：正常细胞加 T541 4 微克/毫升处理 3 小时；（5）次低剂量药物本底组：正常细胞加 T541 0.4 微克/毫升处理 3 小时；（6）低剂量药物本底组：正常细胞加 T541 0.04 微克/毫升处理 3 小时。

1.3.2 细胞实验观测指标

用 Cell-Counting Kit 8（CCK8）测试细胞活性，反映不同浓度的药物对于正常内皮细胞的影响；检测连接蛋白 Claudin-5（紧密连接蛋白-5）、JAM-1（连接黏附分子一型蛋白）、VE-cadherin（血管内皮细

胞钙粘连蛋白)含量变化;部分连接蛋白及细胞骨架 F-actin 免疫荧光染色;蛋白质免疫印迹分析检测凋亡相关蛋白 Bax (B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白)、Bcl-2 (B 细胞淋巴瘤-2)含量变化;蛋白质免疫印迹分析检测基质金属蛋白酶 (MMP)-3 及其前体 pro-MMP-3 的含量变化。

2. 试验方法

2.1 小鼠颈部血栓观察

采用正置显微镜动态观察小鼠颈动脉血栓。麻醉小鼠仰卧位置于鼠板上,做颈正中切口,暴露并分离颈总动脉,股静脉给予吖啶红荧光标记血小板,观察缺血前(即基础值)、缺血 10 分钟、缺血 4.5 小时(即再灌注前)、再灌注 1 小时、再灌注 2 小时及再灌注 24 小时小鼠颈动脉血栓变化。缺血前(即基础值)无血栓,缺血 10 分钟血栓最大直径处堵塞血管,缺血 15 分钟颈动脉远心端血流量降低为基础值 20%以下,且缺血 4.5 小时(即再灌注前)时血栓稳定,血栓面积堵塞颈动脉血管面积 60%及以上为颈动脉血栓模型成功标准,入组成功率达 90.9%。除假手术组和各本底组外,其余各组为模型成功后随机分组。

2.2 脑血流量测定

用连接计算机的激光多普勒血流灌注成像仪测定左右两侧大脑中动脉支配区域脑皮质血流量。麻醉小鼠俯卧位置于鼠板上,剪开左右侧顶骨上的皮肤使顶骨完全暴露,将连接计算机的低能量氦-氖激光器探头置于顶骨上 16-18 厘米处,检测缺血前(即基础值)、缺血 10 分钟、缺血 4.5 小时(即再灌注前)、再灌注 1 小时、再灌注 2 小时及再灌注 24 小时小鼠左右侧大脑中动脉血液供应区软脑膜血流量。用脑血流量分析软件 LDPIwin 3.1 (PeriScan PIM3 System, PERIMED, Stockholm, 瑞典)计算左右侧 MCA 支配的同样大小区域的脑皮质血流量。

2.3 神经学评分

在再灌注 24 小时,按照 15 分评分标准 (Garcia JH et al. Stroke. 1995;26:627-634.) 稍作修改,对各组小鼠进行神经学评分:

小鼠自主活动能力:将小鼠放在 25×15 厘米鼠笼中,记录其在 3 分钟内的活动轨迹,小鼠基本不活动记为 0 分,极少活动且未触碰鼠笼任何壁为 1 分,触碰任何一壁或为两壁为 2 分,触碰三壁及以上记为 3 分;

小鼠肢体对称性实验,将小鼠尾巴提起,观察左右身体活动轨迹,左右完全不对称为 0 分,几乎不对称为 1 分,中等程度不对称为 2 分,几乎对称 3 分;

开野试验测定实验,观察小鼠自由运动轨迹,不活动者为 0 分,原地转圈为 1 分,偏向一侧曲线运动为 2 分,直线运动为 3 分;

平衡木实验,在距离地面 10 厘米处放置 50×5×2 厘米木条,将小鼠放在一端,观察其在平衡木上运动轨迹,小鼠从平衡木上掉下来记为 0 分,悬挂在平衡木上记为 1 分,在平衡木上站立但运动很少记为 2 分,在平衡木上运动记为 3 分;

小鼠触须触摸实验,用小木棒触摸小鼠左右两侧触须,与右侧相比,左侧不反应者记为 1 分,左侧微弱反应记为 2 分,两侧反应相同记为 3 分。

小鼠神经学评分计算以上五个实验单项得分总和,15 分为正常小鼠,0 分表示小鼠死亡。

另一种评分方法介绍。改良神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS), 0-18 分。评分方法参照实验例 1 中的 1.4 部分。

2.4 脑出血情况及梗死面积测定

再灌注 24 小时,用 4 摄氏度预冷的 PBS 缓冲液由心脏灌流小鼠,开颅取脑,在脑立体定位器中由前向后切成 5 个薄片,用体视摄影显微镜迅速拍摄出血情况,置于-80 摄氏度保存,用血红蛋白分光光度测量试剂盒测量血红蛋白含量。

再灌注 24 小时,用 4 摄氏度预冷的 PBS 缓冲液由心脏灌流小鼠,开颅取脑,在脑立体定位器中由前向后切成 5 个薄片,在低温条件下迅速拍照记录出血情况,放入 2%的氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC), 中在 37 摄氏度下孵育 15 分钟,行 TTC 染色。非梗塞区被染成红色,梗塞区不着色仍

为白色。拍摄脑片 TTC 染色图片,用图像分析软件 ImageJ (Bethesda, MD, 美国) 计算 TTC 染色梗死面积占全脑面积百分比值,评价脑梗死程度。

2.5 微循环观察、伊文斯蓝渗出测定及脑组织干湿重比测定

血浆白蛋白漏出:在体视显微镜下,行小鼠股静脉插管(PE/08, 外径 0.36 毫米, 内径 0.20 毫米)。小鼠以俯卧位固定在小鼠脑微循环观察板上,剪去小鼠颅顶皮肤,暴露右侧顶骨,在体视显微镜下,用手提式颅钻将整个顶骨磨薄,直至顶骨只剩一层柔软的骨皮质。将 FITC 标记的血浆白蛋白(激发波长 420-490 纳米, 发射波长 520 纳米)按 50 毫克/千克用量,经股静脉缓慢推注。10 分钟后,在连接超敏感荧光 CCD 的正立荧光显微镜下,记录再灌注 24 小时后,小鼠脑表面直径 30-50 微米之间的毛细血管后微静脉、大脑中动脉支配区域动脉、大脑前动脉支配区域动脉的荧光图像,分析血浆白蛋白的漏出情况。用图像分析软件 ImageJ (Bethesda, MD, USA) 计算细静脉血管内 (Iv) 及血管外 (Ii) 的荧光强度,血浆白蛋白漏出量用 Ii/Iv 表示。

伊文斯蓝渗出:再灌注 21 小时后,将溶解于生理盐水的伊文斯蓝染料(2%, 4 毫升/千克)经股静脉缓慢推注至小鼠体内。3 小时后,心脏灌注生理盐水 15-20 毫升(右心耳流出液体为无色时停止灌注),随即取脑至 4%多聚甲醛中固定 3 小时,拿出后将脑切成 5 片,拍照并分开左右脑分别称重。将左右脑分别加入含有 1 毫升 50%三氯乙酸 EP 管中,匀浆,离心取上清。配置伊文斯蓝标准品,用多功能酶标仪检测伊文斯蓝含量(激发光 620 纳米, 发射光 680 纳米)。用每克脑组织中含有的伊文斯蓝微克数表示伊文斯蓝含量。

脑组织干湿重比:再灌注 24 小时后,立即麻醉小鼠,断头取脑,左右脑分别称重(记为湿重)。随后将脑置于 60 摄氏度干燥箱中放置 72 小时烘干,并称重(记为干重)。小鼠脑干湿重比按照(湿重-干重)/湿重 × 100%计算。

2.6 电镜观察

透射电镜:在再灌注 24 小时后,麻醉小鼠经左心室以 3 毫升/分钟的速度灌注 3%戊二醛 40 分钟,取脑,切小鼠右侧皮质成 1 毫米×1 毫米×1 毫米小块,3%戊二醛室温后固定 30 分钟或 4 摄氏度过夜。蔗糖于摇床上冲洗 3 次×15 分钟;锇酸室温固定 2 小时;0.2 摩尔/升 PBS 冲洗 3 次×5 分钟;30%、50%、70%和 90%丙酮分别脱水 15 分钟,100%丙酮脱水 3 次×5 分钟;100%丙酮与包埋剂 1:1 混合的预包埋剂中预浸,37 摄氏度过夜;纯包埋剂浸润,37 摄氏度 24 小时后 60 摄氏度固化 48 小时,自然冷却;包埋剂结束后修块、切片,切片厚度为 60 nm。用醋酸铀和柠檬酸铅对超薄片进行染色,在透射电镜(JEM 1230, JEOL, Tokyo, Japan)下观察、拍片。

扫描电镜:在再灌注 24 小时后,麻醉小鼠经左心室以 3 毫升/分钟的速度灌注 3%戊二醛 40 分钟,取脑,切取右侧皮质半影区,置于戊二醛中后固定 2 小时。PBS 磷酸盐缓冲液冲洗后,在 1%四氧化锇中后固定 2 小时,取合适剖面固定于金属托上。组织块镀金,并在扫描显微镜(JSM-5600LV, JEOL, Tokyo, Japan)下观察、拍片。

2.7 蛋白质免疫印迹分析及酶联免疫吸附实验

再灌注 24 小时,用生理盐水心脏灌流动物,取右脑皮质梗死半影区进行蛋白质免疫印迹分析。灌流后取出小鼠脑组织,切去小脑和前额叶,沿矢状位切去右脑靠近左右半脑中缝 1 厘米的脑组织,剩余组织沿 45 度角切取梗死半影区,剥下半影区脑皮质,低温保存。取右脑皮质,加入 1 × RIPA 裂解液及 Cocktail 蛋白酶抑制剂(1:100, Cell Signaling Technology, 美国)充分裂解后超声,17000 g 离心 30 分钟。取上清,按体积加入 5 × 上样缓冲液,在沸水中煮沸 20 分钟,放入-80 摄氏度保存。取多余上清用 BCA 蛋白定量液(ThermoScientific, 美国)蛋白定量,在酶标仪 560 纳米处测定吸光度值,根据标准曲线计算出蛋白浓度。在每个聚丙烯酰胺凝胶孔里加入等量的各组蛋白,浓缩胶 80 V 分离胶 100 V 恒压电泳分离,将分离好的蛋白条带通过电转移至 PVDF 膜上(Millipore, 美国),220 毫安 120 分钟转膜。膜在 5%的脱脂奶中室温封闭 1 小时,去除非特异性结合位点后,加入用 5%脱脂奶粉稀释的一抗 β-actin、claudin-5、occludin、ZO-1 (Abcam, 美国), VE-cadherin、JAM-1、MMP-3 (Santa Cruz Biotechnology, 美国), caveolin-1 (Cell

Signaling Technology, 美国), bcl-2、bax、laminin, 4 摄氏度孵育过夜。隔天用 TBST 10 分钟 × 3 次洗膜后, 加入用 5% 脱脂奶粉稀释的二抗室温孵育 1 小时, 加发光剂 (普利莱, 中国) 显色, 暗室中显影。用图像分析软件 Quantityone 分析电泳条带密度值。所有蛋白条带大小均为与内参 β -actin 或总目的蛋白所比而得的相对值表示。

使用酶联免疫吸附试剂盒测定模型侧脑组织皮质半影区 MDA (丙二醛)、8-OHdG (8-羟基-2'-脱氧鸟苷)、ATP (三磷酸腺苷)、ADP (腺苷二磷酸)、AMP (腺苷一磷酸) 的含量变化及线粒体复合物 I、II、IV、V 的活性变化。

每组数据至少使用六个样本进行至少重复三次的独立实验。

2.8 免疫荧光染色实验

再灌注 24 小时, 用 4 摄氏度预冷的 PBS 缓冲液由心脏灌流小鼠, 开颅取脑, 后固定 12 小时, 30% 蔗糖脱水后, OTC 包埋, 用冰冻切片机 (CM1800, Leica, Bensheim, Germany) 切成 10 微米厚冰冻切片, 风干后, 置入 0.1 摩尔/升 PBS 洗片 5 分钟, 600 瓦, 90 摄氏度条件下, 在微波炉内用 0.01 摩尔/升的枸橼酸钠进行抗原修复 10 分钟, 室温自然冷却 2 小时。PBST 37 摄氏度恒温恒湿 1 小时破膜后, PBS 缓冲液冲洗 5 分钟×3 次, 胃蛋白酶消化 15 分钟, PBS 缓冲液再次冲洗 5 分钟×3 次。羊血清封闭 30 分钟后, PBS 缓冲液冲洗 5 分钟×3 次, 加一抗 vWF (1:100, Millipore, Temecula, CA, USA) + JAM-1/Occludin/Laminin (1:50, Invitrogen, Camarillo, CA, USA), 4 摄氏度过夜。隔天取出复温 1 小时, PBS 缓冲液冲洗 5 分钟×3 次, 加入二抗 2 小时后, 再加入 Hoechst 33342 (1:100, Molecular Probes) 标记细胞核, 室温下避光孵育 10 分钟。用抗荧光淬灭封片剂进行封片。用激光扫描共聚焦显微镜 (TCS SP5, Leica, Mannheim, Germany), 在 63 倍物镜下观察和拍照。

2.9 统计分析

所有数据用 mean±SEM 表示, 用 GraphPad Prism 6.0 统计软件, One-Way ANOVA 或 Two-way ANOVA (脑血流量、神经学评分) 的方法对数据进行统计, 组间两两比较用 Bonferroni 矫正, $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3. 实验结果

3.1 颈动脉血栓变化

3.1.1 各组小鼠颈总动脉内血栓的动态变化: 见图 3

图 3 结果显示: 与假手术组相比, 其他各组的血栓在 FeCl_3 滤纸刺激后 10 分钟, 都可见观察到颈总动脉内的血栓形成, 在 4.5 小时血栓稳定。tPA 给药后, 血栓被部分地溶解, 但是, 在 24 小时后, 仍可观察到颈动脉内的血栓。T541 剂量依赖地增加了 tPA 的溶栓效果, 特别是大剂量的 T541 与 tPA 联用时, 溶栓效果明显增加, 在给药后 1 小时, 颈动脉内的血栓就明显的溶解了。

3.1.2 各个时间点的血栓面积: 见表 8

表 8: 不同时间点血栓面积数据 (N=6)

组别	FeCl_3 刺激前	FeCl_3 刺激后 10 分钟	FeCl_3 刺激后 4.5 小时	FeCl_3 刺激后 5.5 小时 (给药后 1 小时)	FeCl_3 刺激后 6.5 小时 (给药后 2 小时)	FeCl_3 刺激后 28.5 小时 (给药后 24 小时)
假手术组	0.0	0.0	0.0	0.37±0.37	0.28±0.18	0.32±0.26
血栓组	0±0	25.60±0.89*	26.86±1.46*	23.56±0.78*	24.35±1.61*	24.02±1.64*
T541 高剂量溶栓组	0±0	26.36±0.64*	26.17±1.52*	25.43±1.90*	25.73±2.27*	25.3±2.14*
tPA 溶栓组	0±0	25.13±1.34*	23.47±1.78*	22.14±1.36*	16.64±4.10*	11.15±2.61*#
T541 低剂量组	0±0	24.86±1.35*	22.82±1.16*	14.06±3.38*#†	12.28±2.57*#†	7.87±2.74*†
T541 中剂量组	0±0	25.67±1.79*	25.00±1.25*	15.51±2.19*#†	9.60±3.24*#†	3.91±0.43*†
T541 高剂量组	0±0	26.88±1.23*	25.32±0.56*	10.80±3.24*#†‡	2.78±1.38*#†‡\$	0.53±0.26*#†‡
T141 组	0±0	24.16±0.93*	25.15±1.19*	22.30±1.68*	18.97±2.73*	12.57±1.33*#

T582 组	0±0	25.56±1.50*	22.88±1.19*	17.71±1.00*	14.57±1.10*#	15.19±1.87*
--------	-----	-------------	-------------	-------------	--------------	-------------

注：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与血栓组相比， $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ ；‡与 T541 低剂量组相比， $p<0.05$ ；\$与 T541 中剂量组相比， $p<0.05$ 。

表 8 结果显示：与血栓组相比，tPA 组在 24 小时，血栓面积明显减少。单纯地给予 T541，没有显示出溶栓作用。但是，与 tPA 联用时，T541 低、中、高三个剂量组，在 1 小时开始，就增加了 tPA 的溶栓效果。而，T141 组和 T582 组增加溶栓效果的作用不佳。

3.2 脑血流量灌注

激光多普勒血流量仪检测小鼠脑表面血流灌注的结果见图 4 和表 9

表 9：不同时间点各组小鼠脑血流量数据（N=6）

组别	FeCl ₃ 刺激前	FeCl ₃ 刺激后 10 分钟	FeCl ₃ 刺激后 4.5 小时	FeCl ₃ 刺激后 5.5 小时 (给药后 1 小时)	FeCl ₃ 刺激后 6.5 小时 (给药后 2 小时)	FeCl ₃ 刺激后 28.5 小时 (给药后 24 小时)
假手术组	101.43±1.08	99.65±1.37	101.33±1.72	99.78±1.16	98.93±2.08	101.18±1.10
血栓组	100.47±1.44	59.39±3.79*	45.45±1.26*	46.27±1.65*	41.12±3.13*	35.80±1.73*
T541 高剂量溶栓组	99.39±1.02	50.86±5.76*	42.56±4.39*	45.58±4.28*	51.72±4.04*	31.43±2.49*
tPA 溶栓组	100.25±1.19	55.20±5.69*	49.58±7.44*	47.56±6.13*	41.46±4.49*	42.40±4.61*
T541 低剂量组	99.24±1.20	56.12±5.23*	59.12±3.98*	56.47±6.33*	57.93±4.11*	55.51±10.23*
T541 中剂量组	100.25±0.70	49.31±6.30*	51.10±7.29*	51.60±5.24*	55.46±7.92*	68.12±12.05*#†
T541 高剂量组	100.59±1.70	49.34±2.61*	49.83±3.65*	59.63±1.28*	75.51±6.18#†	82.70±1.74#†‡
T141 组	99.49±1.63	56.27±4.12*	42.66±5.91*	54.45±6.28*	49.40±8.05*	39.66±7.84*
T582 组	97.55±3.25	47.23±4.15*	43.61±2.72*	47.05±1.78*	54.20±6.77*	40.84±10.21*

注：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与血栓组相比， $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ ；‡与 T541 低剂量组相比， $p<0.05$ 。

表 9 结果显示：各组小鼠在初始条件下脑表面血流量无差异，且左右半脑血流量分布均匀。除假手术组外，各组小鼠在颈动脉血栓建立 10 分钟的患侧脑表面血流量明显下降，且 4.5 小时脑血流量仍未恢复。单纯地给予 T541 高剂量和 tPA，脑血流量没有明显的恢复。中剂量的 T541 与 tPA 联合使用，在给药后 24 小时，小鼠脑血流量明显的恢复。高剂量的 T541 与 tPA 联合使用，在给药后 2 小时，脑血流量明显地高于 tPA 组，24 小时后的脑血流量明显高于高剂量的 T541 与 tPA 联合使用组。而 T141 和 T582 联合 tPA 组的脑血流量没有明显的恢复。

3.3 生存率、神经学评分

3.3.1 各组小鼠给药后 24 小时的生存率

表 10：各组小鼠生存率（%）24 小时内变化

给药后/小时	假手术组	本底组	血栓组	T541 高剂 量溶栓组	tPA 溶栓 组	T541 低 剂量组	T541 中 剂量组	T541 高剂 量组	T141 组	T582 组
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
6					70.00	75.00			66.67	83.33
12					60.00	62.50	87.50		50.00	50.00
18			81.82		50.00	50.00	62.50	90.91		
24	100.00	100.00	81.82	90.00	50.00*#	50.00*#	50.00*#	81.82*†‡\$	50.00*#	50.00*#

注：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与血栓组相比， $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ ；‡与 T541 低剂量组相比， $p<0.05$ ；\$与 T541 中剂量组相比， $p<0.05$ 。

表 10 结果显示：假手术组和本底组，在观察期间内没有死亡。血栓组在给药后 18 和 24 小时的生存率均为 81.82%。T541 高剂量溶栓组的 24 小时生存率为 90%。tPA 给药后的 24 小时生存率为 50%，T541

的低剂量和中剂量没有改善 tPA 引起的 24 小时生存率的降低。T541 高剂量的 24 小时生存率为 81.82% ，与血栓组比较生存率明显提升（81.82% vs 50%）。T141 和 T582 也没有改善 tPA 引起的生存率降低。

3.3.2 给药后 24 小时神经学缺陷评分

采用的是 18 分改良小鼠神经学评分法（正常小鼠得分为 0 分，得分越高表示神经缺损越严重）；15 分评分标准（15 分为正常小鼠，0 分表示小鼠死亡）。

表 11：各组小鼠给药后 24 小时神经学缺陷评分表

组别	数量	18 分改良学评分	15 分评分
假手术组	8	0.44±0.18	14.38±0.50
本底组	8	0.36±0.15	14.33±0.17
血栓组	9	9.83±0.70*	6.2±0.77*
T541 高剂量溶栓组	7	4.00±1.62#	7.75±2.36*
tPA 溶栓组	10	7.45±0.73*	5.82±0.52*
T541 低剂量组	8	1.25±0.16#†	11.25±0.49#†
T541 中剂量组	8	2.25±0.41#†	12.00±0.96#†
T541 高剂量组	9	1.27±0.14#†	13.88±0.44#†‡
T141 组	6	5.00±2.00*#	9.00±1.61*
T582 组	6	2.33±0.44#‡	9.67±1.59*

注：*与假手术组相比，p<0.05；# 与血栓组相比，p<0.05；†与 tPA 溶栓组相比，p<0.05；‡与 T541 低剂量组相比，p<0.05。

表 11 结果显示：与假手术组和本底组相比，血栓组小鼠 24 小时的神经学评分，分别为 9.82（18 分改良学评分）和 6.2（15 分评分）。T541 高剂量组为 4（18 分改良学评分）。tPA 没有改善神经学评分。T541 的低、中、高剂量组都明显地改善了神经学评分，高剂量的作用明显地优于低剂量。

通过生存率、神经学缺陷评分、颈部血栓面积和脑血流量灌注情况选取 T541 高剂量组为最佳药物使用浓度，进行进一步分析。

3.4 伊文斯蓝渗出、脑微循环损伤及血管周围水肿

3.4.1 伊文斯蓝渗出：图 5 和表 12 结果显示：在给药后 21 小时小鼠静脉给予伊文斯蓝全身循环，3 小时后生理盐水冲去血管循环中的伊文斯蓝，取脑后切成 1 毫米厚的薄片观察渗入到脑组织中的伊文斯蓝。tPA 溶栓组脑组织有明显的伊文斯蓝渗出，相比假手术组，含量检测也有同样的结果，渗出的伊文斯蓝含量可以被 20 mg/kg 的 T541 抑制。tPA 溶栓组伊文斯蓝渗出明显，该渗出可以被高剂量 T541 联合使用减弱。

3.4.2 缺血半影区脑表面毛细血管后微静脉的血管通透性情况：

图 6 和表 12 结果显示：溶栓给药后 24 小时后，用动态可视化方法观察小鼠活体状态下缺血半影区脑表面毛细血管后微静脉的血管通透性情况。观察 30 分钟内血管内白蛋白漏出情况。tPA 溶栓组血浆白蛋白明显地渗出，T541 高剂量组可以显著地抑制血浆白蛋白的渗出。

3.4.3 给药后 24 小时脑血管周围水肿、微血管开放数及干湿重比：

透射电镜图像显示，假手术组和 T541 高剂量本底组血管结构完整，血管内皮光滑连续，与周围组织紧密相连。tPA 溶栓组中血管内皮粗糙，与周围组织间有明显水肿空隙，周围组织线粒体水肿。T541 高剂量组血管内皮相对光滑，血管周围水肿显著减少，线粒体结构致密，血管周围组织内也无水肿空隙。（见图 7 的第一、二行图）

扫描电镜显示：假手术组和 T541 高剂量本底组脑皮质整体结构平整，血栓形成 4.5 小时后给予 tPA 后 24 小时，脑皮质整体组织结构紊乱表面凹凸不平，联合给予 T541 明显改善整体组织状态。随机选取 5 个视野计数不同组别动物脑皮质血管开放数，可见 tPA 溶栓组与假手术组和 T541 高剂量本底组相比，脑

组织血管数显著减少。扫描电镜下每只小鼠随机选取 5 个 500 倍视野，计数右脑半影区脑皮质微血管开放数。N=3。（见图 7 的第三、四行图）

表 12：脑组织伊文斯蓝含量、白蛋白渗出比值、干湿重比

组别 (平均值± 标准误)	伊文斯蓝渗出 (N=6)	细静脉白蛋白渗出比值% (N=6)	微血管开放数 (N=3)	脑干湿重比 (N=6)
假手术组	1.56±0.51	101.60±1.67	34.38±1.32	0.780±0.003
本底组	2.85±0.23	100.60±1.77	35.00±1.69	0.783±0.001
tPA 溶栓组	17.55±1.23*	125.10±3.53*	21.07±1.54*	0.801±0.002*
T541 高剂量组	9.94±1.24#	110.80±3.38#	37.80±2.06#	0.784±0.001#

注：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。N≤6。

表 12 和图 7 的柱状图显示：给药后 24 小时，脑组织伊文斯蓝、血浆白蛋白渗出、干湿重比的统计结果。tPA 可引起伊文斯蓝渗出、血浆白蛋白渗出增加，脑微血管开放数减少，干湿重比的增加。T541 可以抑制 tPA 引起的上述变化。该结果提示，tPA 溶栓可以引起脑微血管渗出和脑水肿，而 T541 可以抑制 tPA 引起的脑微血管渗出和脑水肿。

3.5 给药后 24 小时脑微血管内皮细胞缝隙连接蛋白变化

T541 可改善半影区脑皮质给药后 24 小时后脑微血管内皮细胞缝隙连接蛋白的变化。透射电镜显示 tPA 溶栓组半影区脑皮质血管紧密连接结构打开，T541 联合 tPA 使用可以使得打开的内皮细胞连接结构关闭，恢复细胞正常连接。（见图 8）

蛋白免疫印迹检测右脑皮质半影区中连接蛋白含量变化（见图 8，表 13），发现紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、JAM 和粘附连接蛋白 VE-cadherin 在 tPA 溶栓组中均显著下降，该下降可以被 T541 联合 tPA 使用逆转。

表 13：给药后 24 小时脑组织连接蛋白定量统计数据

组别（平均值± 标准误）	数量	ZO-1/β-actin	VE-cadherin/β-actin	Occludin/β-actin	JAM-1/β-actin
假手术组	6	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0
本底组	6	0.90±0.07	0.85±0.08	1.02±0.06	1.07±0.04
tPA 溶栓组	7	0.42±0.05*#	0.53±0.07*#	0.38±0.02*#	0.52±0.04*#
T541 高剂量组	7	0.99±0.08†	0.85±0.09†	0.80±0.05†	0.95±0.01#†

注：*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与本底组相比 $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。

图 8 和表 13 结果提示：血栓形成 4.5 小时给予 tPA 溶栓后 24 小时，脑血管内皮间的紧密连接和与基底膜间的粘附连接均明显下降，血管结构不完整，可能导致后续的血管通透性增加，血管外渗出增加，进而增加潜在出血风险。T541 可以抑制 tPA 引起的脑血管内皮细胞缝隙连接蛋白损伤。

3.6 体外培养内皮细胞缺氧复氧后连接蛋白变化：见图 9 和表 14

为研究 tPA 和 T541 对血脑屏障，特别是血管内皮细胞和基底膜的影响，体外培养了大鼠脑微血管内皮细胞，缺氧 4.5 小时处理，复氧 3 小时，模拟体内缺血、溶栓后再灌注状态，复氧同时给予 tPA 及 T541 治疗。

用 CCK8 试剂盒测试正常细胞和正常细胞给予不同浓度 T541 的活性变化，结果发现：除了 T541 高剂量药物本底组对内皮细胞活性有抑制作用，其他 T541 组对内皮细胞活性与正常对照相比无明显差异。

在体外培养的脑内皮细胞中，缺氧/复氧后给予 tPA 治疗引起连接蛋白 VE-cadherin、Claudin-5 和 JAM-1 含量的下降，不同浓度的 T541 (400, 40, 4, 0.4 0.04 $\mu\text{g/ml}$) 可以不同程度恢复连接蛋白表达量，其中 40 $\mu\text{g/ml}$ T541 对 VE-cadherin、Claudin-5 和 JAM-1 蛋白量的降低都有恢复作用。T541 与 tPA 联用可以细胞连接蛋白含量降低，有助于维持内皮细胞的正常细胞形态。

T541 可改善体外培养内皮细胞缺氧/复氧（Hypoxia/reoxygenation, H/R）后连接蛋白变化损伤

表 14: 体外培养内皮细胞缺氧复氧后连接蛋白定量统计数据

组别 (平均值± 标准误)	VE-cadherin/β-actin (N=4)	Claudin-5/β-actin (N=6)	JAM-1/β-actin (N=6)
正常对照组	1.00±0	1.00±0	1.00±0
模型组	0.58±0.07*	0.40±0.06*	0.64±0.05*
T541 高剂量给药组	1.05±0.08#	0.87±0.21	0.91±0.04
T541 次高剂量给药组	1.04±0.08#	1.06±0.11#	1.14±0.11#
T541 中剂量给药组	0.79±0.05	0.98±0.12#	1.03±0.07#
T541 次低剂量给药组	0.75±0.12	0.78±0.17	0.97±0.05#
T541 低剂量给药组	0.66±0.06*	0.57±0.09	0.90±0.09

*与正常对照组相比, $p<0.05$ vs; # 与模型组相比, $p<0.05$ 。N≥4。

蛋白免疫印迹检测显示(图 9 和表 14): 体外培养脑微血管内皮细胞, 在经历缺氧复氧和 tPA 损伤后细胞紧密连接蛋白 Claudin-5、JAM-1 和粘附连接蛋白 VE-cadherin 表达量下降, 与体内实验脑皮质组织的细胞连接蛋白含量变化一致, 该降低的表达可以被 T541 和 tPA 联合使用, 且根据使用药物的浓度依存性改善, 其中 40 微克/毫升浓度的 T541 在细胞培养中对三种连接蛋白均有作用。上述结果提示 T541 可以通过改善脑微血管内皮细胞的紧密连接和粘附连接蛋白, 减少 tPA 损伤脑微血管, 降低渗出、水肿风险。

3.7 脑出血及基底膜主要蛋白变化

3.7.1 脑组织中血红蛋白含量及梗死面积变化: 见图 10 和表 15

表 15: 脑组织中血红蛋白含量及梗死面积

组别 (平均值± 标准误)	数量	血红蛋白含量	梗死面积
假手术组	6	2.83±0.21	0±0
本底组	6	4.50±0.52	0±0
tPA 溶栓组	7	13.55±3.72*#	15.68±4.81*#
T541 高剂量组	6	5.33±1.01†	5.04±0.68†

*与假手术组相比, $p<0.05$; #与本底组相比, $p<0.05$; †与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。N≥6。

将各组小鼠脑组织切成 1 毫米厚的薄片, 可以观察到 tPA 溶栓组模型侧脑皮层和实质区域有出血和梗死, 该现象可以被联合使用 T541 和 tPA 减轻(见图 10)。取各组小鼠右侧半脑组织检测出血情况, 发现 tPA 溶栓组血红蛋白含量明显上升, 而 T541 高剂量组降低了升高的血红蛋白含量, 可以恢复到假手术组和本底组水平(见图 10 和表 15)。

3.7.2 给药 24 小时后脑缺血皮层基底膜变化: 见图 11 和表 16

表 16: 给药后 24 小时脑组织中基底膜主要蛋白表达统计结果

组别 (平均值± 标准误)	数量	Collagen IV 含量	Laminin 含量
假手术组	6	1.00±0	1.00±0
本底组	6	1.00±0.03	0.92±0.11
tPA 溶栓组	6	0.68±0.04*#	0.47±0.06*#
T541 高剂量组	6	0.90±0.03†	0.96±0.14†

*与假手术组相比, $p<0.05$; #与本底组相比, $p<0.05$; †与 tPA 溶栓组相比, $p<0.05$ 。

图 11 和表 16 结果显示: 蛋白免疫印迹检测右脑皮质半影区中基底膜的主要成分 IV 型胶原(Collagen IV)和层粘连蛋白(Laminin)含量变化, 发现 Collagen IV 和 Laminin 表达量在 tPA 溶栓组中明显下降, 该下降可以被 T541 联合 tPA 使用逆转(见图 11)。提示缺血 4.5 小时给予 tPA 溶栓后 24 小时, 不仅脑血管的紧密连接和粘附连接下降, 还会减少 Collagen IV 和 Laminin 的表达, 影响内皮细胞和基底膜正常结构,

破坏血脑屏障，可能 tPA 造成出血风险增加的重要原因。联合使用 tPA 和 T541 可以维持 Collagen IV 和 Laminin 的表达，降低溶栓后出血风险。

3.8 给药后 24 小时脑组织能量变化:见图 12 和表 17

表 17: 给药后 24 小时脑组织中 ATP、ADP、AMP 含量

组别 (平均值± 标准误)	数量	ATP	ADP	AMP	ADP/ATP	AMP/ATP
假手术组	6	1.84±0.08	1.81±0.18	1.64±0.20	0.99±0.12	0.88±0.07
tPA 溶栓组	6	1.05±0.13*	2.51±0.24*	2.66±0.32*	2.45±0.10*	2.68±0.34*
T541 高剂量组	7	1.80±0.07†	1.93±0.13†	1.86±0.21†	1.07±0.06†	1.03±0.11†
tPA + 黄芪组	6	1.22±0.13*	2.02±0.19†	1.92±0.22	1.72±0.21	1.64±0.23†
tPA + 丹参组	6	1.05±0.08	2.54±0.32	2.26±0.17	2.46±0.27*	2.21±0.20†
tPA + 三七组	6	1.42±0.21	2.45±0.38	2.04±0.17	1.88±0.35	1.52±0.15†
tPA + 黄芪 + 丹参组	6	1.44±0.16	2.78±0.31	2.03±0.16	2.01±0.25*	1.48±0.16†
tPA + 黄芪 + 三七组	6	1.55±0.23	2.15±0.12†	1.99±0.18†	1.77±0.25	1.67±0.30†
tPA + 丹参 + 三七组	6	1.44±0.10	2.68±0.24	2.05±0.24	1.88±0.16	1.45±0.19†

*与假手术组相比, $p < 0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p < 0.05$ 。

取 T541 的三种主要成分: 黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷单成分和两两组合分组与 T541 比较。用酶联免疫吸附实验检测给药后 24 小时缺血半影区脑皮质的 ATP, ADP, AMP 含量变化, 计算 ADP/ATP 和 AMP/ATP 比值。给药 24 小时后, tPA 溶栓组的脑组织 ATP 含量明显减少, ADP 和 AMP 的含量增加, T541 联合 tPA 使用可以恢复减少的 ATP, 降低增加的 ADP 和 AMP。ADP/ATP 与 AMP/ATP 的比值在 tPA 溶栓组中增加, 前者被 T541 联合 tPA 使用逆转, 后者在 tPA + 黄芪组、tPA + 三七组、两两给药组和 tPA 联合 T541 高剂量治疗组别中好转。

3.9 给药后 24 小时脑组织氧化应激损伤及细胞凋亡

3.9.1 给药后 24 小时脑组织中 MDA、8-OHdG 含量及线粒体复合物活性

T541 改善缺血给药后 24 小时脑组织氧化应激损伤。取 T541 的三种主要成分: 黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷单成分和两两组合分组与 T541 比较。用酶联免疫吸附实验检测给药后 24 小时缺血半影区脑皮质的 MDA、8-OHdG 含量变化及线粒体复合物 (Complex) I、II、IV 活性。

表 18: 给药后 24 小时脑组织中 MDA、8-OHdG 含量及线粒体复合物活性

组别 (平均值± 标准误)	数量	MDA	8-OHdG	Complex I 活性	Complex II 活性	Complex IV 活性
假手术组	6	19.43±3.49	1.14±0.11	3.19±0.05	0.055±0.006	0.484±0.020
tPA 溶栓组	6	30.08±2.90*	1.84±0.11*	1.75±0.14*	0.025±0.005*	0.267±0.016*
T541 高剂量组	6	18.84±1.76†	1.18±0.08†	2.75±0.16†	0.051±0.004†	0.464±0.062†
tPA + 黄芪组	6	28.49±1.70	1.38±0.24	1.50±0.15*	0.037±0.003	0.287±0.014*
tPA + 丹参组	6	27.78±1.25	1.16±0.10†	1.42±0.05*	0.035±0.003	0.279±0.025*
tPA + 三七组	6	25.88±0.89	1.40±0.14	1.39±0.15*	0.031±0.001*	0.242±0.004*
tPA + 黄芪 + 丹参组	6	27.48±1.44	1.12±0.14†	2.18±0.13*	0.043±0.007	0.326±0.055*
tPA + 黄芪 + 三七组	6	23.52±0.52	1.40±0.12	2.02±0.14*	0.030±0.006*	0.235±0.023*
tPA + 丹参 + 三七组	6	29.09±1.86	1.38±0.17	2.55±0.12*†	0.041±0.005	0.279±0.007*

*与假手术组相比, $p < 0.05$; † 与 tPA 溶栓组相比, $p < 0.05$ 。

图 13 (给药 24 小时后脑组织氧化应激损伤) 和表 18 结果显示: T541 高剂量组显著抑制 tPA 溶栓组增加的脑皮质半影区中丙二醛 (MDA) 含量, tPA 加单独黄芪、丹参、三七或加黄芪+丹参、黄芪+三七、丹参+三七两两伍组效果均不如三味药联用的 T541。同样的, T541 高剂量组能明显抑制 tPA 溶栓组增加

的脑缺血半影区皮质中 8 羟基脱氧鸟苷酸 (8-OHdG)，除了 tPA+黄芪+三七组可以达到治疗效果外，其余 tPA 加黄芪、丹参、三七单味药或黄芪+丹参、丹参+三七两味药均不能达到显著效果。

在线粒体复合物活性检测中，tPA 溶栓后 24 小时线粒体复合物 I、II、IV 的活性降低。tPA+丹参+三七组可以显著恢复溶栓后下降的线粒体复合物 I 活性，tPA+黄芪+三七可以恢复线粒体复合物 II 活性，T541 高剂量组可以同时恢复线粒体复合物 I、II、IV 活性。而且 T541 高剂量组还可以将线粒体复合物 I、II、IV 活性恢复到假手术组水平，这是单味药和两两配伍组别不能达到的效果。

该实验结果提示 T541 中不同组分发挥不同作用，特别是在线粒体复合物活性改善方面各司其职。更有趣的是，即使单独使用黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷单味药没有显著差异，配伍成 T541 联合使用时能够发挥减少脑组织中 MDA 的增加、恢复线粒体复合物 I、IV 的活性的作用。表明多种药物配伍使用时不仅是简单相加的结果，而是产生了协同效应。

3.9.2 给药 24 小时后脑组织 ATP5D 含量变化：见图 14 和表 19

表 19：给药后 24 小时脑组织 ATP5D 含量

组别 (平均值± 标准误)	数量	ATP5D
假手术组	6	1.00±0
本底组	6	1.04±0.07
tPA 溶栓组	6	0.71±0.05*#
T541 高剂量组	6	0.93±0.05†

*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与本底组相比， $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。N=6

图 14 和表 19 结果表明：T541 恢复给药后 24 小时脑组织中 ATP5D 表达量降低。

综上，小鼠右颈总动脉血栓形成 4.5 小时，tPA 溶栓后 24 小时，小鼠缺血半影区脑皮层组织中不仅线粒体复合物 I、II、IV 活性下降，ATP5D 的表达量也降低。细胞缺乏能量时会导致细胞骨架 F-actin 丧失结构、排列紊乱，进而引起内皮细胞间的紧密连接和与基底膜之间的粘附连接蛋白断裂、降解，形成血管周围渗出、水肿。T541 不仅可以抑制线粒体复合物 I/II/IV 的活性下降，也逆转了 ATP5D 的低表达，加快线粒体复合物恢复，改善了氧化应激损伤。线粒体功能恢复进一步降低了 tPA 给药 24 小时之后的 ADP/ATP、AMP/ATP 的增加，改善了血管末端的能量供应，维持正常的血脑屏障。

3.9.3 给药 24 小时后脑组织细胞凋亡染色：见图 15 和表 20

表 20：给药后 24 小时脑组织 TUNEL 阳性细胞统计

组别 (平均值± 标准误)	数量	TUNEL 阳性细胞数
假手术组	6	0.14±0.10
本底组	6	0.83±0.41
tPA 溶栓组	6	27.14±1.77*#
T541 高剂量组	7	8.29±2.50†

*与假手术组相比， $p<0.05$ ；#与本底组相比， $p<0.05$ ；†与 tPA 溶栓组相比， $p<0.05$ 。N=6

图 15 和表 20 结果表明：溶栓给药后模型侧脑皮质中，tPA 溶栓组明显有大量的 TUNEL 阳性细胞，联合使用 T541 后 TUNEL 阳性细胞数显著减少，可能意味着 T541 可以减少单纯 tPA 溶栓后的凋亡细胞数量 (图 15)。透射电镜有相似的结果，图中可见 tPA 溶栓组神经元胞体皱缩变形，细胞质中细胞器结构异常且密度明显增加，核膜凹凸不平，核内出现异染色质。使用 T541 后神经元基本恢复正常胞体密度，线粒体等细胞器结构恢复，核膜平滑。

3.9.4 给药 24 小时后脑组织细胞凋亡：见图 16 和表 21

表 21：脑组织细胞凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 定量

组别 (平均值± 标准误)	数量	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
假手术组	6	1.00±0	1.00±0	1.00±0

tPA 溶栓组	6	1.51±0.14	5.52±0.78*	3.82±0.57*
T541 高剂量组	6	1.41±0.12	1.43±0.20#	1.14±0.24#
tPA + 黄芪组	6	1.47±0.14	3.17±0.35*#	2.32±0.39
tPA + 丹参组	6	1.35±0.17	3.29±0.48*#	2.65±0.48
tPA + 三七组	6	1.17±0.20	4.10±0.93*	4.09±1.34*
tPA + 黄芪 + 丹参组	6	1.14±0.15	1.78±0.08#	1.79±0.37
tPA + 黄芪 + 三七组	6	1.12±0.03	2.68±0.24#	2.37±0.16
tPA + 丹参 + 三七组	6	1.43±0.10	2.01±0.10#	1.43±0.12

*与假手术组相比, $p<0.05$; #与tPA溶栓组相比, $p<0.05$ 。N=6

图 16 和表 21 结果表明: T541 改善缺血给药后 24 小时脑组织细胞凋亡。取 T541 的三种主要成分: 黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷单成分和两两组合分组与 T541 比较。用蛋白质免疫印迹法检测给药后 24 小时缺血半影区脑皮质的凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的含量及其比值变化。tPA 溶栓 24 小时后小鼠脑组织提取蛋白中的 Bax 表达明显升高。黄芪总皂苷、丹参多酚酸、三七总皂苷, 及其两两和三三配伍都可抑制 Bax 的高表达。

3.9.5 体外培养内皮细胞缺氧/复氧后细胞凋亡情况: 见图 17 和表 22

表 22: 体外培养内皮细胞凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 定量

组别 (平均值± 标准误)	数量	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
正常对照组	6	1.00±0	1.00±0	1.00±0
模型组	6	0.69±0.12	2.44±0.51	4.57±0.75*
T541 高剂量给药组	6	0.79±0.10	1.92±0.27	2.60±0.25
T541 次高剂量给药组	6	0.88±0.10	2.01±0.51	1.78±0.18#
T541 中剂量给药组	6	0.99±0.16	2.33±0.47	2.31±0.45
T541 次低剂量给药组	6	0.83±0.11	2.72±0.67	3.41±0.83*
T541 低剂量给药组	6	0.56±0.11	2.81±0.48	4.55±0.47*

*与假手术组相比, $p<0.05$; #与模型组相比, $p<0.05$; †与tPA溶栓组相比, $p<0.05$ 。N=6

图 17 和表 22 结果表明: T541 可改善体外培养内皮细胞缺氧/复氧后细胞凋亡程度。蛋白质免疫印迹法检测体外培养脑微血管内皮细胞缺氧/复氧后的 Bcl-2、Bax 表达及其比值变化。

体内颈动脉血栓溶栓实验和体外缺氧/复氧实验均发现了缺血缺氧 4.5 小时后给予 tPA, 脑内皮细胞凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比值显著增加, 细胞凋亡增加。该结果与 TUNEL 染色及电镜一致。T541 联合给药能够减轻 tPA 引起的细胞凋亡现象。该作用可能与 T541 促进细胞线粒体能量代谢的恢复, 进而保护血管内皮细胞连接蛋白与基底膜主要蛋白的表达有关。