

# 地黄饮子通过 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 通路减轻老龄大鼠脑缺血再灌注损伤

程巨萍<sup>1</sup> 戴奉德<sup>2</sup> 郑娅<sup>3</sup>

1.宁波市医疗中心李惠利医院 浙江,宁波 315040 2.宁波市镇海区龙赛医院 3.宁波市康复医院

**摘要:** [目的] 探究地黄饮子(Dihuang Yinzi, DY)减轻老龄大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)的作用机制。[方法] 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、DY 低剂量组(6 g·kg<sup>-1</sup>)、DY 高剂量组(12 g·kg<sup>-1</sup>)、尼莫地平组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)。建立 CIRI 模型,进行神经功能评分,血小板聚集实验,采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazole chloride, TTC)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和尼氏染色检测脑梗死率及病理改变,流式细胞术测定血小板 α 颗粒膜糖蛋白 140(CD62P)表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR)检测沉默信息调节因子 2 同系物 1-腺苷酸活化蛋白激酶-雷帕霉素靶蛋白/内皮型-氧化氮合酶(silent information regulator 2 homolog 1-adenylate activated protein kinase-mammalian target of rapamycin/endothelial nitric oxide synthase, SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS)通路相关 mRNA 表达,免疫印迹法检测各相关蛋白表达情况。[结果] 与假手术组比较,模型组神经功能评分、脑梗死率、血小板聚集率、CD62P 表达、腺苷酸活化蛋白激酶(adenylate activated protein kinase, AMPK)mRNA,磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylation-adenylate activated protein kinase, p-AMPK)和磷酸化-氧化氮合酶(phosphorylation-nitric oxide synthase, p-eNOS)蛋白表达显著上升( $P<0.01$ ),SIRT1、mTOR 的 mRNA 及 SIRT1 和磷酸化-雷帕霉素靶蛋白(phosphorylation-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)蛋白表达显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),病理染色显示脑组织损伤严重,细胞核固缩。与模型组比较,DY 高剂量组神经功能评分、脑梗死率、CD62P 表达量、AMPK 的 mRNA 及 p-AMPK 和 p-eNOS 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),SIRT1、mTOR 的 mRNA 及 SIRT1、p-mTOR 蛋白表达显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),病理染色结果显示脑组织损伤情况减轻;尼莫地平组与 DY 高剂量组相似。[结论] DY 能够减轻 CIRI 引起的脑组织损伤,并起到神经保护作用,其作用机制可能与影响 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 通路相关蛋白的表达有关。

**关键词:** 地黄饮子; SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS; 脑缺血再灌注损伤; 调控; 老龄大鼠; 脑梗死率; 神经功能; 尼莫地平

**中图分类号:** R331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-5509(2022)11-1189-10

**DOI:** 10.16466/j.issn1005-5509.2022.11.003

**Dihuang Yinzi Alleviates Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Aged Rats through SIRT1-AMPK-MTOR/eNOS Pathway**  
CHENG Juping<sup>1</sup>, DAI Fengde<sup>2</sup>, ZHENG Ya<sup>3</sup> 1. Li Huili Hospital, Ningbo Medical Center, Ningbo(315040), China; 2. Longsai Hospital of Ningbo Zhenhai; 3. Ningbo Rehabilitation Hospital

**Abstract:** [Objective] To investigate the mechanism of Dihuang Yinzi(DY) in alleviating cerebral ischemia-reperfusion injury(CIRI) in aged rats. [Methods] Thirty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, DY low-dose group(6 g·kg<sup>-1</sup>), DY high-dose group(12 g·kg<sup>-1</sup>) and Nimodipine group(10 mg·kg<sup>-1</sup>). CIRI model was established in aged rats, then the neurological function score, platelet aggregation test, 2,3,5-triphenyltetrazole chloride(TTC), hematoxylin-eosin(HE) and Nissl staining were performed to detect cerebral infarction rate and pathological changes, and CD62P expression was determined by flow cytometry. The mRNA expression of silent information regulator 2 homolog 1-adenylate activated protein kinase-mammalian target of rapamycin/endothelial nitric oxide synthase(SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS) pathway was detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction(Real-time qPCR), and the expression of related proteins was detected by Western blot. [Results] Compared with sham operation group, neurological function score, cerebral infarction rate, platelet aggregation rate, CD62P expression, adenylate activated protein kinase(AMPK) mRNA and phosphorylation-adenylate activated protein kinase(p-AMPK) and phosphorylation-nitric oxide synthase(p-eNOS) protein expression were significantly increased( $P<0.01$ ). The mRNA expression of SIRT1 and mTOR, protein expression of SIRT1 and phosphorylation-mammalian target of rapamycin(p-mTOR) were significantly decreased( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Pathological staining showed severe brain tissue injury and nuclear pyrosis. Compared with model group, neurological function score, cerebral infarction rate, CD62P expression, mRNA expression of AMPK, protein expression of p-AMPK and p-eNOS in DY high-dose group were significantly decreased( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The mRNA expression of SIRT1 and mTOR, protein expression of SIRT1 and p-mTOR were significantly increased( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Pathological staining results showed that brain tissue damage was relieved, and the results of Nimodipine group were similar to those of DY high-dose group. [Conclusion] DY can alleviate CIRI-induced brain tissue injury and play a neuroprotective role, which may be related to regulating the expression level of SIRT1-AMPK-MTOR/eNOS pathway related proteins.

**Key words:** Dihuang Yinzi; SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS; cerebral ischemia-reperfusion injury; regulation; aged rats; cerebral infarction rate; neurological function; Nimodipine

基金项目:浙江省中医药管理局项目(2020ZB230)

Fund project: Zhejiang Administration of Traditional Chinese Medicine Project(2020ZB230)

通信作者:郑娅, E-mail: toubaofoxin@yahoo.cn

缺血性脑卒中是全球三大致死性疾病之一,病死率及复发率较高,给国家和社会带来了沉重负担<sup>[1-2]</sup>。恢复缺血区的供血是治疗的首要原则,但由此产生的脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)往往会加重病情<sup>[3]</sup>,因此探究 CIRI 的机制并寻找效的治疗药物是当今研究的重点。

中医将脑卒中归于中风范畴,目前认为脑卒中是由于邪毒损伤脑脉所致<sup>[4]</sup>。地黄饮子(Dihuang Yinzi, DY)出自《宣明论方》,由熟干地黄、肉苁蓉(酒浸,焙)、附子(炮)、五味子、麦门冬(去心)、菖蒲、远志(去心)、官桂、白茯苓、巴戟(去心)、山茱萸、石斛等组成<sup>[5]</sup>。研究发现, DY 可以缓解 CIRI 模型大鼠的神经功能损伤,减轻脑梗死,降低脑组织自噬水平,起到神经保护作用<sup>[6]</sup>。

研究发现,脑组织缺血后,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthases, eNOS)表达增加<sup>[7]</sup>。血小板虽无基因转录,但可以发生自噬,参与层流剪切应力介导的血管内皮细胞 eNOS 的表达上调<sup>[8]</sup>。血小板内沉默信息调节因子 2 同系物 1(silent information regulator 2 homolog 1, SIRT1)通过蛋白酶体和溶酶体途径,抑制体外血小板聚集和血栓形成<sup>[9]</sup>。Ganesan 等<sup>[9]</sup>研究证实,在含有 SIRT1 的胞质复合物中,腺苷酸活化蛋白激酶(adenylate activated protein kinase, AMPK)的激活受到肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)调节,而 SIRT1 是 LKB1 去乙酰化所必需。SIRT1-AMPK 通路能够作用于多囊卵巢综合征大鼠的颗粒细胞,发挥自噬抑制作用,并且能够调控大鼠体内的相关炎症因子水平,而 SIRT1/eNOS 信号通路具有延缓细胞衰老的作用<sup>[10]</sup>。AMPK 和雷帕霉素靶蛋白(mammalian target protein of rapamycin, mTOR)这两种信号分子呈相互拮抗的时向关系,且 AMPK-mTOR 通路能够参与机体的免疫调节,并且与自噬过程也密切相关<sup>[11]</sup>。基于此,本研究试图探讨 CIRI 中 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 通路对 eNOS 的调控作用,以及 DY 减轻老龄大鼠 CIRI 的相关机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物** 40 周龄雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 400~600 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005],饲养于杭州鹰吻生物科技有限公司动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2020-0024]。本研究通过杭

州鹰吻生物科技有限公司动物实验伦理审批(动物伦理审查批准号:EYOUNG-20210527-02)。

**1.2 实验材料** 抗 SIRT1 抗体、抗 AMPK 抗体、抗磷酸化腺苷酸活化激酶(phosphorylation-adenylate activated protein kinase, p-AMPK)抗体、抗磷酸化雷帕霉素靶蛋白(phosphorylation-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)抗体、抗 mTOR 抗体、抗磷酸化一氧化氮合酶(phosphorylation-nitric oxide synthase protein, p-eNOS)抗体、抗 eNOS 抗体、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体均购于美国 Affinity 公司(批号:DF6033、AF3423、AF6243、AF3308、AF6308、AF3247、AF0096、AF7021)。DY 由熟干地黄 18 g,山茱萸、肉苁蓉、茯苓各 12 g,石菖蒲 8 g,远志 9 g,麦门冬、石斛、巴戟天各 10 g,附子、肉桂、薄荷各 4 g,五味子 6 g,生姜 3 g,大枣 5 个组成,将各味中药浸泡于 5 倍体积水中 1 h,煮沸煎煮半小时,取出煎液再次加入 3 倍体积水,煎煮两次,收集过滤后浓缩至 2 g·mL<sup>-1</sup>。尼莫地平片购于上海源叶生物科技有限公司(批号:B20899),以 0.9% 氯化钠溶液制备成 1 g·L<sup>-1</sup> 的尼莫地平混悬液。

**1.3 实验设备** DM3000 型荧光显微镜及 RM2235 型石蜡切片仪均购于德国 Leica 公司;NIKON DS-U3 型成像系统为日本尼康公司产品;C6 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品;CFX Connect 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR)仪购于美国 Bio-Rad 公司;Steellex 型凝血系统购于北京中勤世帝科学仪器有限公司。

## 1.4 方法

**1.4.1 CIRI 模型建立** 大鼠喂养 7 d 后随机分为假手术组、模型组、DY 低剂量组(6 g·kg<sup>-1</sup>)、DY 高剂量组(12 g·kg<sup>-1</sup>)、尼莫地平组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)。大鼠以 1% 戊巴比妥钠 30 g·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射麻醉后,分离颈部动脉,结扎左侧颈总动脉及颈外动脉,于颈总动脉分叉近心端 4 mm 处插入线栓,插入深度约 18 mm,固定线栓,90 min 后去掉线栓完成再灌注,建立 CIRI 模型<sup>[12]</sup>。假手术组除不结扎外,与模型组进行同样操作。造模结束后 1.5 h,参照 Longa 评分法进行神经行为学评分,评分标准为:各项反应正常 0 分,对侧前爪不能轻松伸展 1 分,行走时出现对侧转圈现象 2 分,行走时出现向对侧跌倒的情况 3 分,丧失自发行走能力 4 分。将评分 1~3 分的大鼠随机分配到模型组及各个给药组。术后第 1

天起, DY各剂量组及尼莫地平组大鼠以相应药物灌胃, 假手术组与模型组予0.9%氯化钠溶液灌胃, 连续28 d。给药后, 各组大鼠再次进行神经行为学评分。

**1.4.2 血小板聚集实验** 给药10 d后, 大鼠腹股沟动脉取血, 120 r/min离心10 min, 制备富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。收集血清, 剩余血样1600 r/min离心10 min获得贫血小板血浆(platelet-poor-plasma, PPP)。以Steellex凝血系统记录血小板聚集情况, 将各组别的PRP加入到测试单元中, 随后加入聚合剂。以下列公式计算血小板聚集率(platelet aggregation inhibition rate, PAI),  $PAI(\%) = (MARc - MARt) / MARc \times 100\%$ , MARc为假手术组的最大聚集率, MARt为给药组的最大聚集率。

**1.4.3 大鼠脑梗死面积计算** 末次给药结束后处死大鼠, 分离脑组织, 切片后行2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazole chloride, TTC)染色。利用相应图像处理软件分析图片中梗死与非梗死区面积, 并计算脑梗死率。脑梗死率(%)=脑梗死区面积/脑总面积 $\times 100\%$ 。

#### 1.4.4 组织病理检测

**1.4.4.1 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色** 将大脑皮层组织固定脱水, 石蜡包埋后切片, 行HE染色, 镜检观察并进行脑损伤评分。组织形态正常0分; 只有少量细胞损伤1分; 出现大量细胞损伤, 细胞旁边出现大量空泡2分; 细胞明显损伤, 出现明显空泡3分; 大量细胞损伤, 出现大量空泡4分。

**1.4.4.2 Nissl染色** 将大脑海马组织固定脱水, 石蜡包埋后切片, 行Nissl染色, 镜检观察。

**1.4.5 流式细胞术检测血小板活化特异标志物CD62P表达** 大鼠麻醉后取血离心, 去血清后加入红细胞裂解液, 1 000 r/min离心5 min, 去上清液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ , 加入CD62P抗体2.5  $\mu\text{L}$ , 孵育0.5 h, 清洗重悬细胞, 流式细胞仪检测。

**1.4.6 Real-time qPCR检测大鼠脑组织中SIRT1、AMPK、mTOR mRNA表达** 处死大鼠后分离脑组织, 提取RNA, 经逆转录合成cDNA, 逆转录结束后进行Real-time qPCR反应。SIRT1、AMPK、mTOR mRNA表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。各引物序列见表1。

**1.4.7 免疫印迹法检测SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS通路相关蛋白表达** 制备蛋白样品, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转膜后加入一抗、二抗孵育, 化学发光显色, 收集图像并拍摄保存, 进行分析处理。

**1.5 统计学分析** 应用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析的SNK检验, 方差不齐者运用Kruskal-Wallis H检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠神经行为学评分比较** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经行为学评分显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, DY高剂量组及尼莫地平组大鼠神经行为学评分显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与尼莫地平组比较, DY低、高剂量组神经行为学评分明显升高( $P < 0.05$ ); DY低剂量组与高剂量组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

**2.2 各组大鼠脑梗死情况比较** 与假手术组比较, 模型组脑梗死面积及梗死率显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 给药组的脑梗死面积、梗死率显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与DY低剂量组比较, DY高剂量组脑梗死率显著降低( $P < 0.01$ ); 与尼莫地平组比较, DY低、高剂量组梗死率显著升高( $P < 0.01$ )。见图1。

**2.3 各组大鼠脑组织病理学改变比较** 与假手术组比较, 模型组脑组织损伤严重, 出现明显水肿, 脑损伤评分显著上升( $P < 0.01$ ); 而且细胞核固缩, 神经元数量显著减少( $P < 0.01$ )。与模型组比较, DY高剂量组和

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

目的基因	正向引物	反向引物
Rat SIRT1	ATCTCCAGATCCTCAAGCCA	CTTCCACTGCACAGGCACAT
Rat AMPK	CCTTCGGCAAAGTGAAGATTGG	ATGAAGGAACCCGTTGGAGG
Rat mTOR	CTGCACTGTTGTTCCTCC	ATCTCCCTGGCTGCTCCTTA
Rat $\beta$ -actin	CCC GCGAGTACAACCTTCTT	AACACAGCCTGGATGGCTAC

尼莫地平组脑组织损伤情况减轻,脑损伤评分显著降低( $P<0.01$ ),且神经元细胞核深染和固缩现象明显减少,神经元数量显著增加( $P<0.01$ )。与尼莫地平组比较,DY低、高剂量组神经行为学评分明显升高( $P<0.01, P<0.05$ ),神经元数量减少( $P<0.01$ )。与DY低剂量组比较,高剂量组脑损伤评分降低,而神经元数量增加( $P<0.01$ )。见表3、图2~3。

**2.4 各组大鼠血小板聚集率比较** 与假手术组比较,模型组血小板聚集率显著上升( $P<0.01$ )。与模型组比较,DY高剂量及尼莫地平组血小板聚集率显著降低( $P<0.05, P<0.01$ ),DY低剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与DY低剂量组比较,DY高剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与尼莫地平组比较,DY低、高剂量组ADP及PAF显著升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

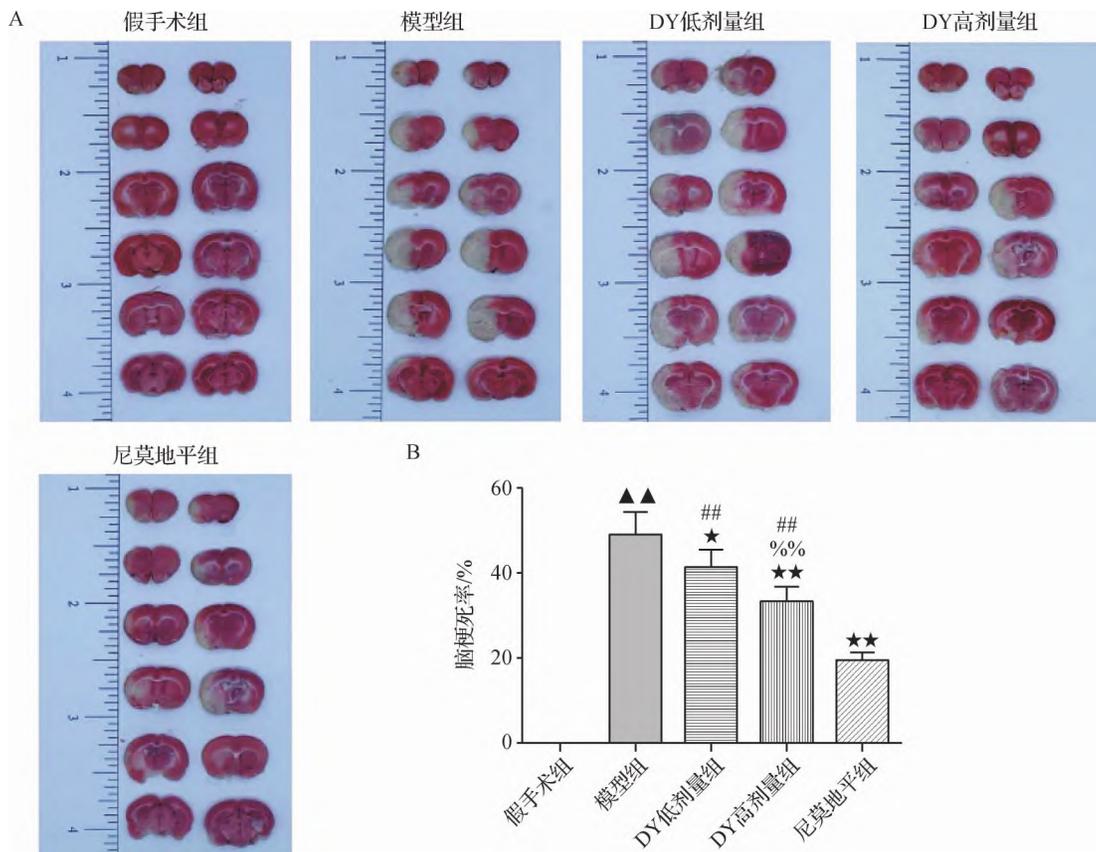
表2 各组大鼠神经行为学评分比较

Tab.2 Comparison of neurobehavioral scores of rats in each group

组别	假手术组	模型组	DY低剂量组	DY高剂量组	尼莫地平组
评分	0	3.50±0.55 <sup>▲▲</sup>	3.00±0.63 <sup>#</sup>	2.67±0.52 <sup>**</sup>	1.83±0.41 <sup>**</sup>

注:与假手术组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与尼莫地平组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, ▲▲ $P<0.01$ ; compared with model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; compared with Nimodipine group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .



注:A.CIRI大鼠脑梗死面积统计情况(TTC染色);B.CIRI大鼠脑梗死率。注:与假手术组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与DY低剂量组比较,<sup>%%</sup> $P<0.01$ ;与尼莫地平组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note: A. Statistics of cerebral infarction area in CIRI rats (TTC staining); B. Cerebral infarction rate in CIRI rats. Compared with sham operation group, ▲▲ $P<0.01$ ; compared with model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; compared with DY low-dose group, <sup>%%</sup> $P<0.01$ ; compared with Nimodipine group, <sup>##</sup> $P<0.01$ .

图1 各组大鼠脑梗死面积及梗死率

Fig.1 Area and rate of cerebral infarction in each group

**2.5 各组大鼠CD62P表达比较** 与假手术组比较, 模型组CD62P表达量显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较, 给药组CD62P表达量均显著降低( $P<0.05, P<0.01$ ); 与尼莫地平组比较, DY低剂量组CD62P表达量显著升高( $P<0.05$ )。见图4。

**2.6 各组大鼠脑组织SIRT1、AMPK、mTOR的mRNA表**

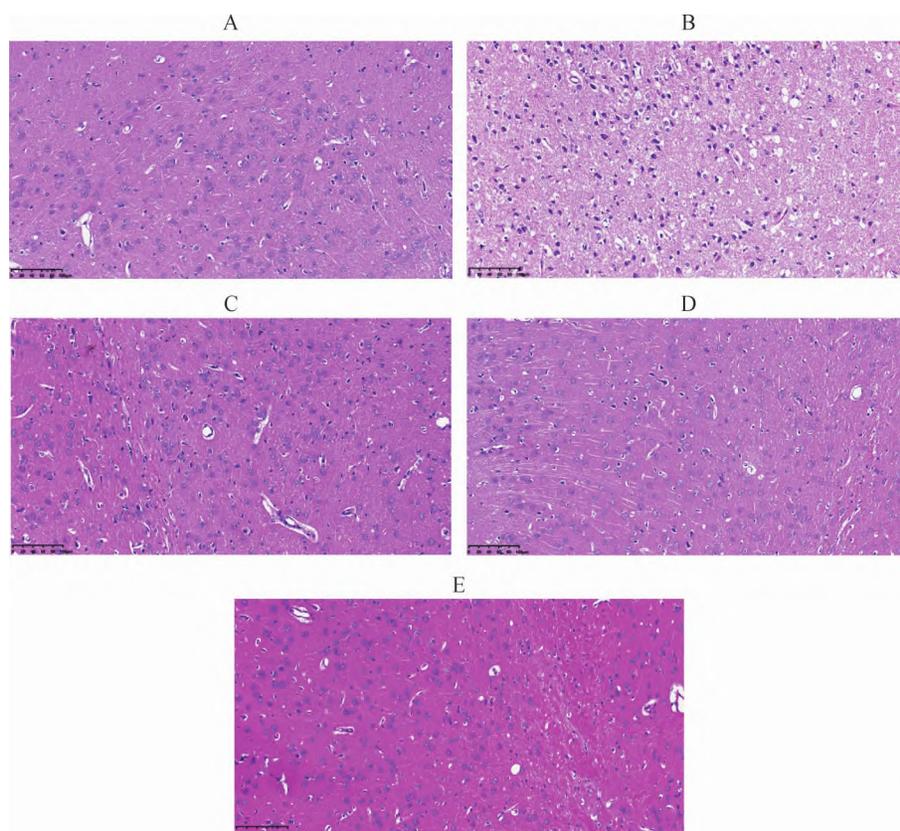
达比较 与假手术组比较, 模型组SIRT1、mTOR的mRNA表达显著降低, AMPK的mRNA的表达显著升高( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较, DY高剂量组的SIRT1、mTOR的mRNA表达显著升高, 同时AMPK的mRNA的表达显著降低( $P<0.01, P<0.05$ ); 尼莫地平组SIRT1及AMPK的mRNA表达显著降低, mTOR的mRNA

表3 各组大鼠脑梗死情况比较  
Tab.3 Comparison of cerebral infarction in each group

组别	脑损伤评分(分)	神经元个数(个)
假手术组	0.00±0.00	194.33±9.85
模型组	3.33±0.52 <sup>▲▲</sup>	41.67±4.08 <sup>▲▲</sup>
DY低剂量组	3.00±0.63 <sup>###</sup>	81.17±5.04 <sup>***</sup>
DY高剂量组	1.67±0.52 <sup>***%##</sup>	100.67±6.86 <sup>***%##</sup>
尼莫地平组	1.33±0.52 <sup>**</sup>	159.33±8.98 <sup>**</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与DY低剂量组比较, <sup>%</sup> $P<0.01$ ; 与尼莫地平组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, <sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; compared with DY low-dose group, <sup>%</sup> $P<0.01$ ; compared with Nimodipine group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ .

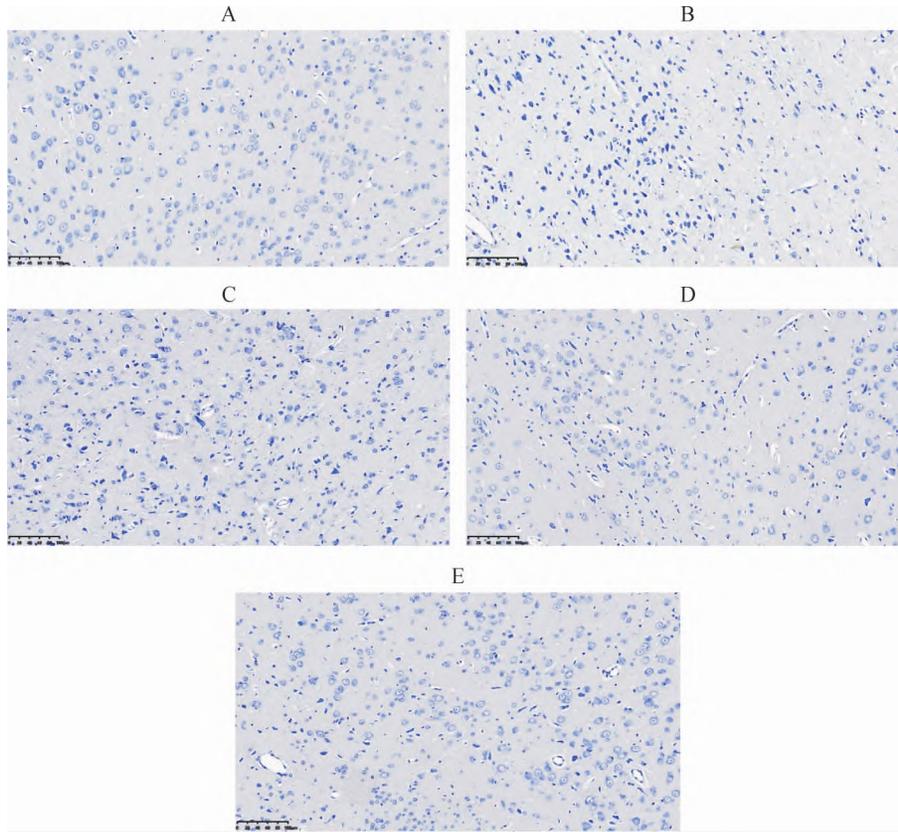


注: A.假手术组; B.模型组; C.DY低剂量组; D.DY高剂量组; E.尼莫地平组(标尺:100  $\mu\text{m}$ )。

Note: A. Sham operation group; B. Model group; C. DY low-dose group; D. DY high-dose group; E. Nimodipine group(Scale: 100  $\mu\text{m}$ ).

图2 各组大鼠脑组织病理学改变(HE染色, 200 $\times$ )

Fig.2 Histopathological changes of rat brain in each group(HE staining, 200 $\times$ )



注: A.假手术组; B.模型组; C.DY低剂量组; D.DY高剂量组; E.尼莫地平组(标尺:100 μm)。

Note: A. Sham operation group; B. Model group; C. DY low-dose group; D. DY high-dose group; E. Nimodipine group(Scale: 100 μm).

图3 各组大鼠脑组织病理学改变(Nissl染色, 200x)

Fig.3 Histopathological changes of rat brain in each group(Nissl staining, 200x)

表4 各组大鼠血小板聚集率比较

Tab.4 Comparison of PAI in each group

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	血小板聚集率		
	ADP	PAF	AA
假手术组	29.81±3.55	31.61±3.75	28.90±2.87
模型组	53.35±5.21 <sup>▲▲</sup>	55.05±5.24 <sup>▲▲</sup>	49.99±5.08 <sup>▲▲</sup>
DY 低剂量组	48.19±4.16 <sup>#</sup>	49.63±4.76 <sup>##</sup>	45.57±5.30
DY 高剂量组	46.91±2.96 <sup>*#</sup>	46.85±4.17 <sup>*#</sup>	42.18±3.56 <sup>*</sup>
尼莫地平组	41.70±3.48 <sup>**</sup>	40.49±4.59 <sup>**</sup>	43.01±4.93 <sup>*</sup>

注: ADP: 二磷酸腺苷; PAF: 血小板活化因子; AA: 花生四烯酸。与假手术组比较, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与尼莫地平组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note: ADP. Adenosine diphosphate; PAF. platelet activating factor; AA. arachidonic acid. Compared with sham operation group, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; compared with Nimodipine group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ .

表达显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); DY低剂量组SIRT1的mRNA表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), mTOR的mRNA表达显著下降 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与DY低剂量组比较, DY高剂量组mTOR的mRNA表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), AMPK的mRNA表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图5。

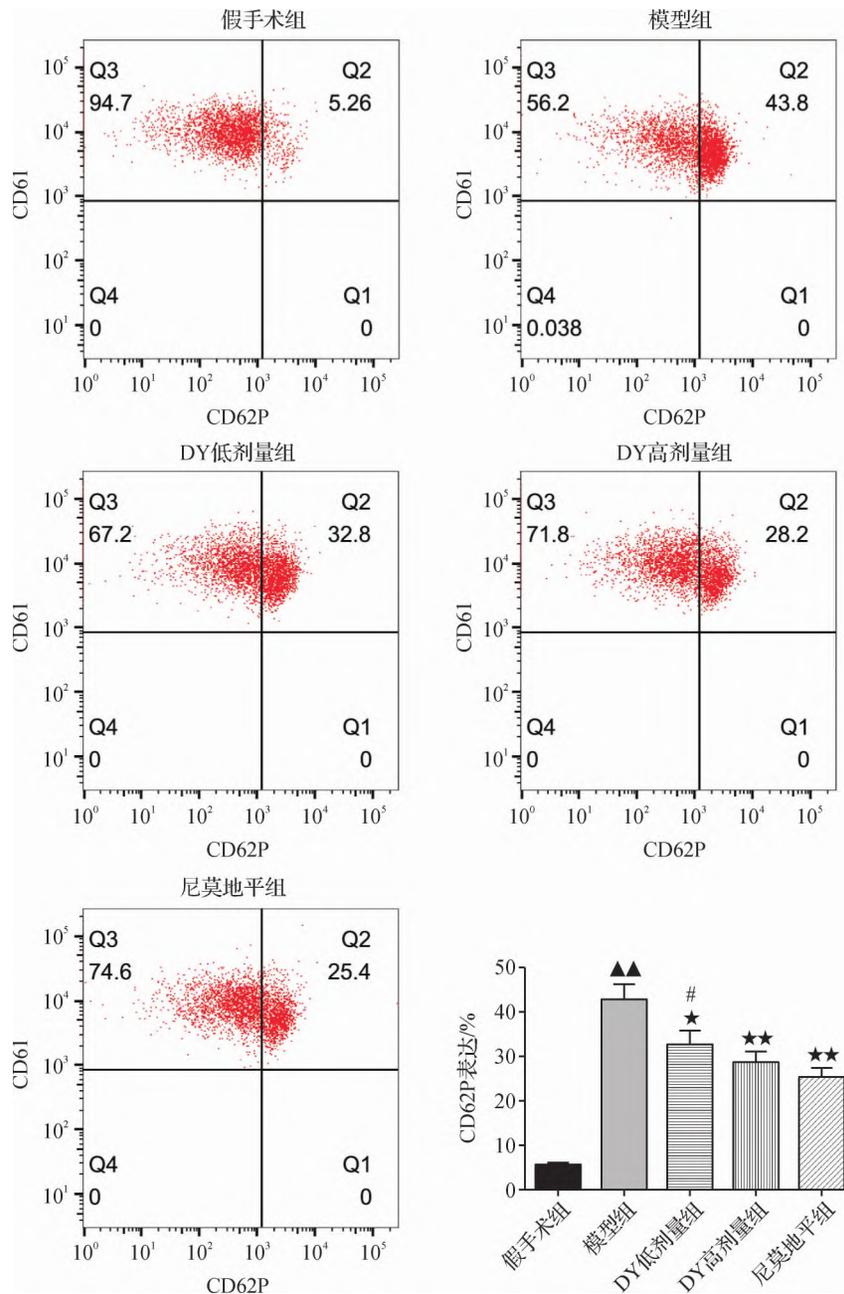
2.7 各组大鼠脑组织SIRT1、p-AMPK、p-mTOR和p-eNOS蛋白表达比较 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中p-AMPK和p-eNOS蛋白的表达水平均显著升高, SIRT1和p-mTOR蛋白的表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, DY高剂量组和尼莫地平

组大鼠脑组织中SIRT1和p-mTOR蛋白的表达水平显著升高,p-AMPK和p-eNOS蛋白的表达水平显著降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );DY低剂量组p-mTOR蛋白表达显著升高( $P<0.05$ )。与DY低剂量组比较,DY高剂量组大鼠脑组织中SIRT1含量显著升高( $P<0.05$ )。与尼莫地平组比较,DY低剂量组大鼠脑组织中SIRT1含量显著降低( $P<0.05$ )。见图6。

### 3 讨论

中风又称为脑卒中,多发于50岁以上老人,此时人体髓海空虚,元气虚弱,而肾为人之根本,主骨生髓,脑又为髓汇聚之处<sup>[13]</sup>。有学者指出,肾虚是缺血性中风的基本病机,而DY是临床上补肾法治疗缺血性中风的名方<sup>[14]</sup>,因此用DY治疗CIRI符合其病机。

何华等<sup>[15]</sup>证实,DY能够减轻大鼠脑水肿,减少脑

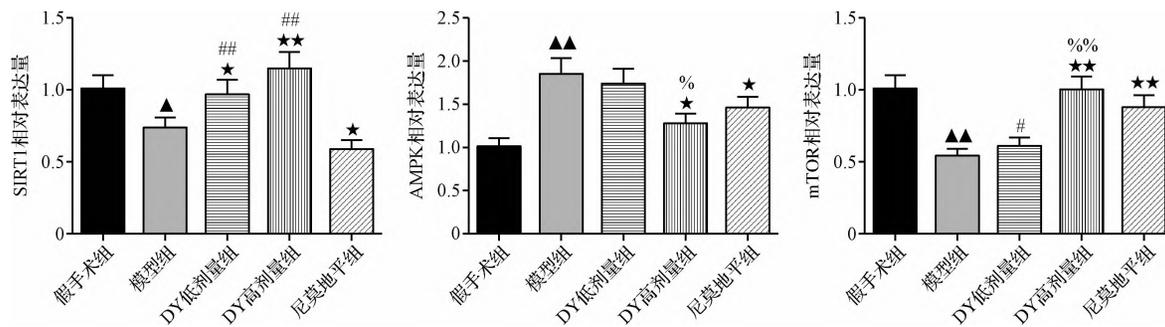


注:与假手术组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与尼莫地平组比较,# $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group, ▲▲ $P<0.01$ ; compared with model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; compared with Nimodipine group, # $P<0.05$ .

图4 各组大鼠CD62P表达比较

Fig.4 Comparison of CD62P in each group



注:与假手术组比较,▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型组比较,★ $P < 0.05$ ,★★ $P < 0.01$ ;与DY低剂量组比较,♯ $P < 0.05$ ,%% $P < 0.01$ ;与尼莫地平组比较,♯ $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ ; compared with model group, ★ $P < 0.05$ , ★★ $P < 0.01$ ; compared with DY low-dose group, ♯ $P < 0.05$ , %% $P < 0.01$ ; compared with Nimodipine group, ♯ $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

图5 各组大鼠脑组织中SIRT1、AMPK、mTOR mRNA表达比较

Fig.5 Comparison of mRNA expressions of SIRT1, AMPK and mTOR in brain tissue in each group

缺血再灌注脑梗死范围和病理损伤,对局灶性CIRI有较好的保护作用。李胜志等<sup>[16]</sup>观察发现,DY对CIRI模型大鼠的脑保护以及对神经干细胞增殖分化的促进作用与调控干细胞因子(stem cell factor,SCF)有关。段新芬等<sup>[17]</sup>对CIRI大鼠模型的研究发现,DY预处理对脑缺血大鼠脑组织神经元有保护作用,其作用机制可能与调节大鼠脑组织神经生长因子(nerve growth factor,NGF)表达,保护梗死区神经元有关。以上研究充分证实了,DY在治疗脑缺血相关疾病中的良好疗效,对CIRI的修复效果明确。

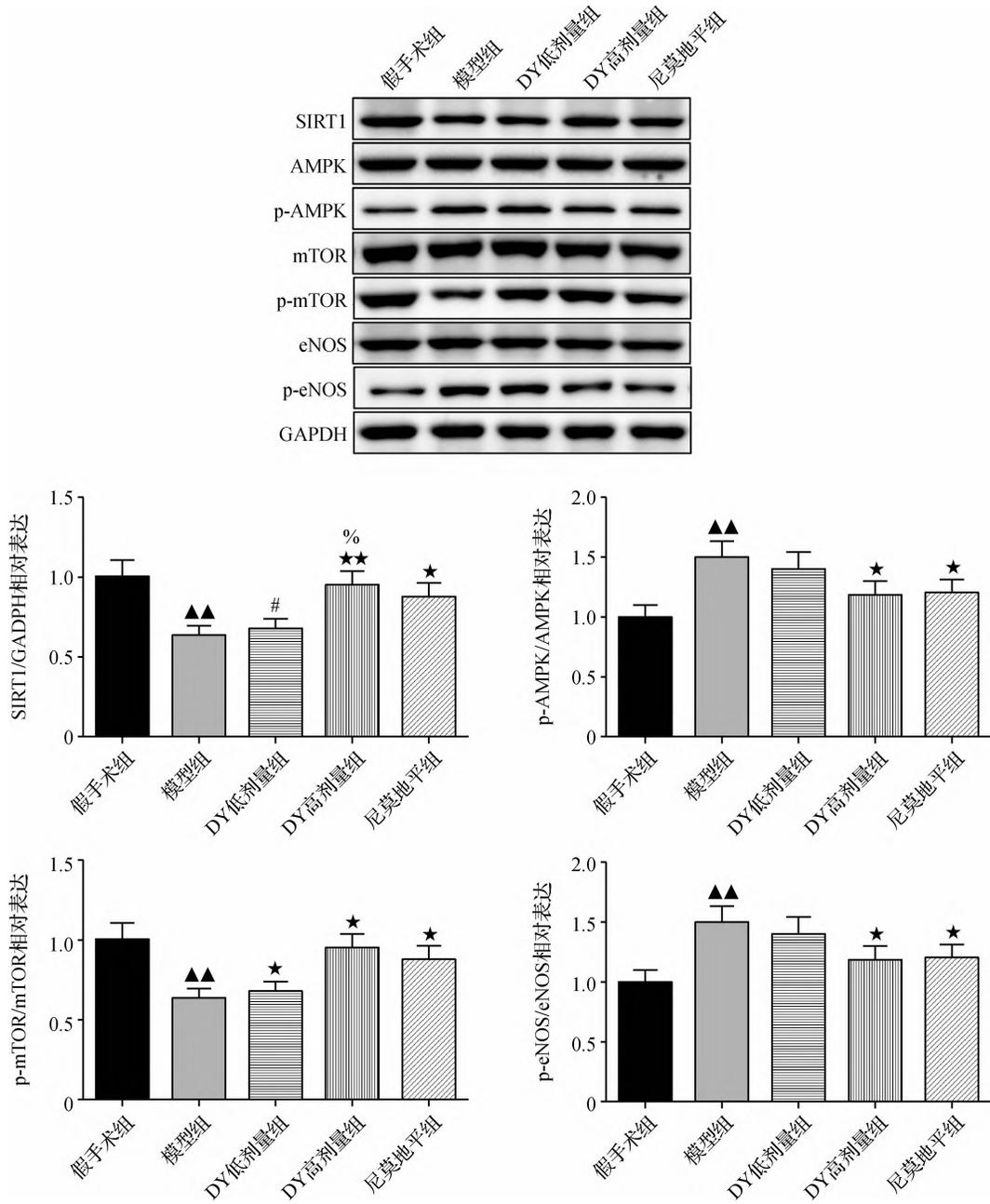
本研究通过线栓法成功制备脑缺血再灌注动物模型,DY处理后大鼠的神经功能评分、血小板聚集率、脑梗死面积均显著下降,提示DY对于脑组织有一定的保护作用。其中神经功能评分降低以及脑梗死面积减小,直观体现了脑组织病变程度的减轻;而血小板聚集率是反映血小板聚集功能的重要指标,当聚集率升高时容易形成血栓,给药后血小板聚集受到抑制,说明DY可以减轻血小板聚集,延缓并减轻血栓形成。HE及Nissl染色提示,用药后脑组织病理损伤情况改善,脑损伤评分减低,神经元数量增加,说明DY对于神经元有较好的保护作用。尼莫地平是治疗脑缺血的常见药物,因此选择其作为本文的阳性对照药物,实验结果提示,DY高剂量组的指标变化趋势与尼莫地平组接近,进一步证明DY对CIRI有治疗作用,而且与尼莫地平有类似的效果。

CD62P是血小板颗粒表面的特异性糖蛋白,在α颗粒膜表达,介导血小板黏附于内皮细胞,进而激活中性粒细胞,释放多种酶及细胞因子,损伤内皮细胞,

导致基底膜通透性增强,从而启动血栓形成<sup>[18]</sup>。流式细胞术检测得出,CIRI后血小板活化特异标志物CD62P表达显著增加,而药物处理后CD62P表达量均显著降低,表明DY可以降低血小板的活化水平,并且能够对血栓形成起到一定的抑制作用。

脑缺血后脑组织中eNOS单体增加,经有效干预后eNOS激活形成二聚体,选择性抑制eNOS则导致神经毒性,说明eNOS在脑缺血中起保护作用。当发生CIRI后,p-eNOS蛋白的表达水平显著升高,表明具有保护作用的eNOS发生了磷酸化,转化成了p-eNOS,从而加重了脑组织的损伤,而药物处理后p-eNOS蛋白的表达水平显著降低,eNOS表达量升高,说明药物起到了保护神经组织及细胞的作用。Mahmood等<sup>[19]</sup>研究发现,小鼠脑缺血大脑半暗带内,激活形式的eNOS二聚体与失活形式的单体的比例降低,从而引起继发损伤加重。当细胞能量充足时,AMPK处于失活状态,mTOR处于活化状态,而发生CIRI后,细胞缺氧导致AMPK催化亚基位点Thr172磷酸化激活,抑制mTOR活性,引起细胞自噬增强<sup>[20]</sup>。本研究中,模型组脑组织中SIRT1、mTOR mRNA及SIRT1和p-mTOR蛋白表达显著降低,AMPK mRNA及p-AMPK和p-eNOS蛋白表达显著上升,表明细胞受到了严重损伤,且SIRT1也参与了CIRI的过程,给药后SIRT1和p-mTOR蛋白表达升高,p-AMPK和p-eNOS蛋白表达降低,表明DY可起到保护大鼠脑组织的作用。

综上所述,DY能够显著改善CIRI引起的脑组织损伤,抑制血小板聚集,起到神经保护作用,其作用机制可能与SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS信号通路有关,



注:与假手术组比较,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; 与DY低剂量组比较,  $\%P < 0.05$ ; 与尼莫地平组比较,  $\#P < 0.05$ 。

Note: Compared with sham operation group,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ; compared with model group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; compared with DY low-dose group,  $\%P < 0.05$ ; compared with Nimodipine group,  $\#P < 0.05$ .

图6 各组大鼠脑组织中 SIRT1、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达比较

Fig.6 Comparison of protein expressions of SIRT1, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, eNOS and p-eNOS in brain tissues in each group

即上调SIRT1和p-mTOR, 下调p-AMPK和p-eNOS蛋白的表达水平。

参考文献:

References:

[1] FERNANDES B F S, CAMELLI P. Ischemic stroke and infectious diseases in low-income and middle-income countries[J]. Curr Opin Neurol, 2019, 32(1):43-48.  
 [2] 王芳. 脑梗死复发患者血栓弹力图特点及阿司匹林抵抗相

关因素分析[D]. 济南: 山东大学, 2015:58.

WANG Fang Characteristics of thromboelastogram and factors related to aspirin resistance in patients with recurrent cerebral infarction[D]. Ji'nan: Shandong University, 2015:58.

[3] ANSARI J, KAUR G, GAVINS F. Therapeutic potential of annexin A1 in ischemia reperfusion injury[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4):1211-1216.  
 [4] 徐雷, 齐江彤, 陈伟良. 不同分型的缺血性卒中患者急性期

- 高血压特点及其对预后的影响[J].浙江临床医学,2017,19(5):874-876.
- XU Lei, QI Jiangtong, CHEN Weiliang. Clinical characteristics and prognosis of acute hypertension in patients with ischemic stroke[J]. Zhejiang Clin Med J,2017,19(5):874-876.
- [5] 王英月,王斌.吴深涛教授应用地黄饮子临床验案[J].内蒙古中医药,2018,37(2):20-26.
- WANG Yingyue, WANG Bin. Clinical proved cases of Professor WU Shentao applying Dihuang Yinzi[J]. Inner Mong J Tradit Chin Med,2018,37(2):20-26.
- [6] 王俊杰,楼琦,汤娟娟,等.地黄饮子对脑缺血再灌注损伤大鼠保护作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):42-48.
- WANG Junjie, LOU Qi, TANG Juanjuan, et al. Protective effect of Dihuang Yinzi on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism[J]. Chin J Exp Tradit Med Form,2019,25(4):42-48.
- [7] PITTS N L, MYKLES D L. Localization and expression of molt-inhibiting hormone and nitric oxide synthase in the central nervous system of the green shore crab, *Carcinus maenas*, and the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,2017,203:328-340.
- [8] HATTORI Y, OKAMOTO Y, NAGATSUKA K, et al. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow[J]. Neuroreport,2015,26(3):113-117.
- [9] GANESAN R, HOS N J, GUTIERREZ S, et al. *Salmonella* Typhimurium disrupts Sirt1/AMPK checkpoint control of mTOR to impair autophagy[J]. PLoS Pathog, 2017,13(2):e1006227.
- [10] 邓煜,马智,胡俊,等.白藜芦醇调节SIRT1/AMPK通路抑制大鼠多囊卵巢综合征颗粒细胞内自噬的机制研究[J].重庆医科大学学报,2022,47(6):700-704.
- DENG Yu, MA Zhi, HU Jun, et al. The mechanism of resveratrol regulating SIRT1/AMPK pathway to inhibit autophagy in granulosa cells with polycystic ovary syndrome in rats[J]. J Chongqing Med Univ,2022,47(6):700-704.
- [11] GIOVANNINI L, BIANCHI S. Role of nutraceutical SIRT1 modulators in AMPK and mTOR pathway: evidence of a synergistic effect[J]. Nutrition,2017,34:82-96.
- [12] DAI M Y, WU L X, YU K Q, et al. D-carvone inhibit cerebral ischemia reperfusion induced inflammatory response TLR4/NLRP3 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother,2020,132:110870.
- [13] 甘海燕,李琳,杨琰,等.补阳还五汤调控小胶质细胞/巨噬细胞极化抑制大鼠脑缺血后炎症反应研究[J].浙江中医药大学学报,2019,43(1):1-6.
- GAN Haiyan, LI Lin, YANG Yan, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on microglia/macrophage polarization and inflammatory response after cerebral ischemia in rats[J]. J Zhejiang Chin Med Univ,2019,43(1):1-6.
- [14] 惠小珊,袁书章,张金生,等.基于量表等级化法对缺血性中风证候要素及治法的研究[J].中国中西医结合杂志,2020,10(14):1-5.
- HUI Xiaoshan, YUAN Shuzhang, ZHANG Jinsheng, et al. Study on the factors and treatment of ischemic stroke syndrome based on scale grading method[J]. Chin J Integr Tradit West Med,2020,10(14):1-5.
- [15] 何华,王桂香,钟士江,等.地黄饮子对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].山东医药,2006,46(4):28-29.
- HE Hua, WANG Guixiang, ZHONG Shijiang, et al. Protective effect of Dihuang Yinzi on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Shandong Med, 2006,46(4):28-29.
- [16] 李胜志,李庆云,马睿杰,等.地黄饮子对缺血性脑损伤 Nestin mRNA、SCF mRNA影响的实验研究[J].中医药信息,2008,25(1):77-79.
- LI Shengzhi, LI Qingyun, MA Ruijie, et al. Effects of Dihuang Yinzi on Nestin mRNA, SCF mRNA in ischemic brain injury[J]. Infor Tradit Chin Med,2008,25(1):77-79.
- [17] 段新芬,李文英,谢宁,等.加减地黄饮子预处理对局灶性脑缺血大鼠脑组织NGF表达的影响[J].天津中医药,2009,26(4):326-328.
- DUAN Xinfen, LI Wenyong, XIE Ning, et al. Effects of dihuang Yin pretreatment on NGF expression in focal cerebral ischemia rats[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2009,26(4):326-328.
- [18] 贾丽娜.脑梗死患者血浆Hcy、ET-1、NSE及血小板活化指标与近期预后的关系[J].国际医药卫生导报,2019,25(15):2527-2529.
- JIA Lina. Relationship between plasma Hcy, ET-1, NSE and platelet activation indices and short-term prognosis in patients with cerebral infarction[J]. Int Med Health Guid News,2019,25(15):2527-2529.
- [19] MAHMOOD Q, WANG G F, WU G, et al. Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice[J]. Phytomedicine, 2017,25:8-14.
- [20] 马秀娟,赵艳萌,王文良,等.补阳还五汤通过AMPK/mTOR/ULK1信号通路调控自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J].中国药理学通报,2022,38(1):147-152.
- MA Xiujuan, ZHAO Yanmeng, WANG Wenliang, et al. Buyang Huanwu Decoction regulates autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway and alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Chin Pharm Bull,2022,38(1):147-152.

(收稿日期:2022-02-09)