

赤芍红花配伍对脑缺血小鼠线粒体功能的保护作用

陈敏纯, 郑洁, 张冬艳, 薛润青, 张萌, 闫抗抗, 曹青*
(西北大学附属医院·西安市第三医院药剂科, 陕西 西安 710018)

摘要: **目的** 探讨赤芍红花配伍对脑缺血小鼠线粒体功能的保护作用。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、赤芍组 (0.75 g/kg)、红花组 (0.375 g/kg)、赤芍红花组 (赤芍 0.75 g/kg+红花 0.375 g/kg), 每组 12 只, 采用改良线栓法构建大脑中动脉阻塞小鼠模型, 给药 7 d 后通过 Garcia 评分评估神经功能损伤情况, TTC 染色检测脑梗死面积, HE 染色观察脑组织病理学变化, 检测 ROS、MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性评价氧化损伤情况, Western blot 法检测 ND6、PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达, ELISA 法检测 8-OHdG 水平。**结果** 与模型组比较, 赤芍组、红花组、赤芍红花组均能减轻缺血性脑卒中小鼠的脑梗死面积, 改善神经活动、组织病理、氧化应激和线粒体氧化损伤, 升高脑组织 PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达 ($P<0.05$), 以赤芍红花组更明显。**结论** 赤芍红花可能通过激活 PGC-1 α /Nrf2 通路调控线粒体功能, 发挥脑保护作用。

关键词: 赤芍; 红花; 线粒体; 脑缺血

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3126-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.047

缺血性卒中严重危害人类健康, 具有高死亡率和高致残率, 在全球范围内造成巨大的经济和社会负担^[1]。由于其病理机制复杂, 临床缺乏药物精准干预的靶点。线粒体是脑缺血损伤重要的靶细胞器, 线粒体结构和功能的维持对挽救缺血半暗带区, 修复损伤神经元有着重要的意义^[2]。维持线粒体结构和功能完整性与中医理论“益气活血, 活血化瘀”密切相关。中医学认为“气”是体内血行的动力, 气血调和是血液正常运行基本条件。中医的“气”与生物能密切相关^[3], 线粒体是制造能量的细胞器, 是产生“气”的源头。维持线粒体结构和功能完整性是益气、行气、活血的机制所在。赤芍红花配伍常见于治疗心脑血管疾病的方剂中, 如王清任《医林改错》中的补阳还五汤、通窍活血汤、血府逐瘀汤等。红花为升浮之品, 性温, 味辛, 有行气活血、散瘀止痛的功效。赤芍为沉降之物, 性微寒, 味苦, 有破血行气、清热解毒、引血下行的功效。一升一降内外通和, 则有行气活血化瘀之功。赤芍红花配伍改善脑缺血损伤, 疗效确切, 但其脑保护作用与维持线粒体结构和功能完整的相关性及协同作用分子机制, 仍不清楚。本研究考察赤芍红花配伍通过调控线粒体功能改善脑缺血损伤, 并深入研究 PGC-1 α /Nrf2 信号通路调控线粒体功能的分子机制。

1 材料

1.1 仪器 FlexStation 3 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Muliskan MK3 酶标仪 (美国赛默飞公司); H1650R 冷冻高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 752 分光光度计 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); DYY-7C 电泳仪、DYCZ-40 转膜仪 (北京六一仪器有限公司); BX53 型生物显微镜 (日本奥林巴斯公司); FU8010 电子显微镜 (日本日立公司); Leica RM 2016 轮转式切片机 (德国 Leica 公司)。

1.2 试剂与药物 赤芍 (陕西兴盛德药业有限责任公司, 批号 20191201); 红花 (西安瑞盈生物科技有限公司, 批号 RY20221002)。丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、总超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司, 批号 A003-1、A001-1、A005-1); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 S0033S); ND6 抗体 (美国 Affinity 公司, 批号 DF9676); PGC-1 α 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 66369-1-Ig); Nrf2 抗体 (美国 Santa 公司, 批号 Sc-365949)。

1.3 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 42~56 日龄, 体重 18~22 g, 购于湖北省实验动物研究中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2020-0018]。小鼠饲养于温度 20~

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2023-JC-YB-657); 西安市科技计划项目 (21YXYJ0040); 西安市中医药项目 (SZY202102)

作者简介: 陈敏纯 (1982—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事中药药理及抗凝治疗研究。Tel: (029) 61816234, E-mail: minchun.chen@163.com

* **通信作者:** 曹青 (1984—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事临床药学及质量标准研究。Tel: (029) 61816234, E-mail: carlosq@163.com

25 ℃，相对湿度 50%~60% 的动物房，小鼠进行适应性饲养 1 周后开始实验 [实验动物使用许可证号 SYXK（鄂）2022-0065]。本研究经西安市第三医院医学伦理委员会审核通过（批号 2021.1190）。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 将 60 只小鼠随机分为假手术组、模型组、赤芍组（0.75 g/kg）、红花组（0.375 g/kg）、赤芍红花组（赤芍 0.75 g/kg+红花 0.375 g/kg），每组 12 只。按《标准化煎药中心基本要求》（SCM02-2018）方法，将赤芍或红花煎煮制成汤剂，采用喷雾干燥技术将汤剂制成细颗粒。2020 年版《中国药典》记载的赤芍生药临床剂量为每天 6~12 g，红花为每天 3~10 g，本研究选取赤芍 6 g，红花 3 g。根据人和小鼠的体表面积换算，等效剂量为赤芍

0.75 g/kg，红花 0.375 g/kg。采用改良的大脑中动脉栓塞法制备脑缺血模型，小鼠术前禁食 12 h，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后固定小鼠，沿颈部正中切开皮肤，预先准备好的丝线结扎颈总动脉和颈内外动脉，在颈总动脉上斜行剪一个小口，置入 MCAO 线栓，缺血 60 min 后，拔出线栓，消毒并缝合皮肤。假手术组小鼠仅切开皮肤并分离血管，随后缝合皮肤。小鼠麻醉清醒后 2 h，参照 Garcia 评分对小鼠进行神经功能评分，每项评分 2 分以下者纳入研究。假手术组和模型组小鼠灌胃给予生理盐水，给药组灌胃给予相应药物，每天 1 次，连续 1 周。

2.2 神经功能评分 采用 Garcia 评分对小鼠神经功能进行评估，标准见表 1，得分越低，神经功能损伤程度越高。

表 1 Garcia 评分标准

项目	得分/分			
	0	1	2	3
自主运动	没有活动	几乎不能活动	能活动,但活动范围无达到鼠笼的 3 面	活动范围至少达鼠笼的 3 面
四肢活动对称性	左侧没有活动	左侧肢体有轻微活动	左侧肢体缓慢活动	双侧肢体活动对称
前肢的对称性	左侧不活动,无法伸展	左侧能活动,肢体轻微伸展	左侧活动,肢体伸展,但不如右侧	双侧前肢对称伸展
鼠笼中攀援情况		不能攀援	左侧稍弱	攀援正常
触摸双侧躯干		左侧无反应	左侧反应减弱	反应对称
触须反应		左侧无反应	左侧反应减弱	反应对称

2.3 TTC 染色检测脑梗死面积 神经功能评分结束后处死小鼠，取脑，放置脑槽切片，切成 2 mm 厚的片子，用 2% TTC 染色 15 min，4% 多聚甲醛固定 24 h。拍照，用 photoshop CS 图片处理软件计算梗死面积。计算梗死面积（红色为正常脑组织，白色为脑梗死组织）百分比。

2.4 HE 染色观察脑组织病理学变化 取脑组织于 4% 多聚甲醛中浸泡、固定，常规脱水、石蜡包埋、切片（5 μm）、烤片，然后脱蜡至水，用苏木精染色 7 min，1% 盐酸乙醇分化，流水泛蓝染色 30 min，伊红染胞浆 5 min，用乙醇脱水，二甲苯透明，树脂胶封片，于光学显微镜下观察，随机选取皮质缺血区域内 3 个不同区域拍照并保存图片。

2.5 ROS、MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性检测 用预冷的 PBS 冲洗脑组织，去除残留血液，称定质量，充分研磨匀浆，取上清液，按照相关试剂盒说明书操作，检测 ROS、MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性。

2.6 Western blot 法检测脑组织 ND6、PGC-1α、Nrf2 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解脑组织，提取蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冻存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，室温封闭 2 h，分别加入 ND6（1：2 000）、PGC-1α（1：5 000）、Nrf2（1：200）抗体，4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000）室温孵育 2 h，显色剂曝光，以 β-actin 为内参，通过 IPP 软件计算蛋白灰度值。

2.7 ELISA 法检测脑组织 8-OHdG 水平 严格按照试剂盒

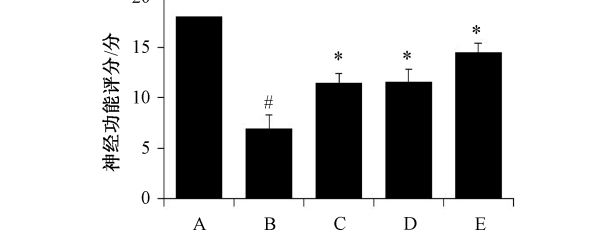
说明书步骤，检测小鼠脑组织 8-OHdG 水平。

2.8 透射电镜观察脑组织线粒体形态 取各组脑组织，切成 2 mm 薄片，放入 2.5% 戊二醛固定液中固定 4 h，系列梯度乙醇（30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%）脱水，采用日立电子显微镜 FU8010 观察脑组织线粒体形态。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，若方差不齐，采用 Welch 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠神经功能评分的影响 与假手术组比较，模型组小鼠神经功能评分降低（ $P<0.05$ ），表明模型制备成功；与模型组比较，赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠神经功能评分升高（ $P<0.05$ ），以赤芍红花组更明显，见图 1。

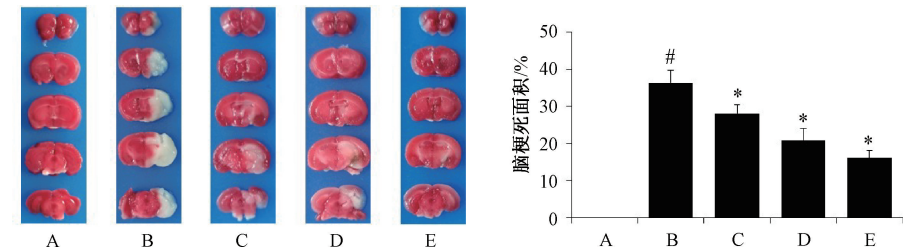


注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为赤芍组，D 为红花组，E 为赤芍红花组。与假手术组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ 。

图 1 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠神经功能评分的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

3.2 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠脑梗死面积的影响 与假手术组比较，模型组小鼠脑梗死面积增加 ($P<0.05$)；与

模型组比较，赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠脑梗死面积减少 ($P<0.05$)，以赤芍红花组更明显，见图 2。



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为赤芍组，D 为红花组，E 为赤芍红花组。与假手术组比较， $^{\#}P<0.05$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ 。

图 2 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠脑组织病理形态的影响 假手术组小鼠大脑皮层神经元细胞排列整齐，数量多，形态正常，细胞核清晰，边界可辨；模型组小鼠大脑皮层神经元存在空泡化空间，神经元丢失严重，细胞排列紊乱，

细胞核固缩，颜色深染，胞体变形，形态不规则（黑色箭头）；赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠脑组织空泡和神经元丢失减少，神经元细胞的正常结构消失但形态尚存，赤芍红花组改善更明显，见图 3。

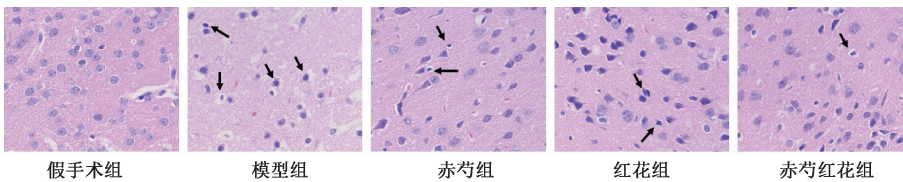
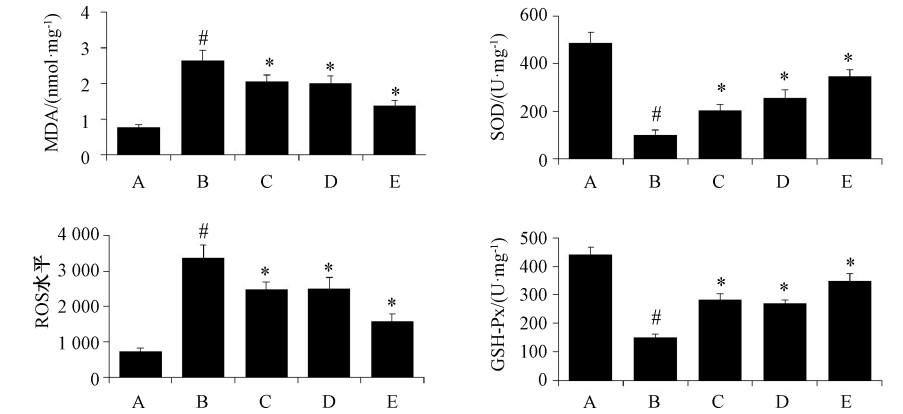


图 3 各组小鼠脑组织病理变化 (HE, $\times 200$)

3.4 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠氧化应激水平的影响 与假手术组比较，模型组脑缺血小鼠 ROS、MDA 水平升高 ($P<0.05$)，SOD、GSH-Px 活性降低 ($P<0.05$)；与模型组

比较，赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠 ROS、MDA 水平降低 ($P<0.05$)，SOD、GSH-Px 活性升高 ($P<0.05$)，以赤芍红花组更明显，见图 4。



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为赤芍组，D 为红花组，E 为赤芍红花组。与假手术组比较， $^{\#}P<0.05$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ 。

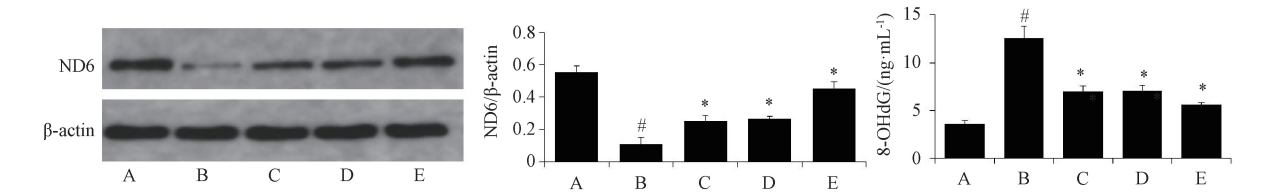
图 4 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠氧化应激水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.5 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠线粒体氧化损伤的影响 与假手术组比较，模型组小鼠 ND6 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，8-OHdG 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠 ND6 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，8-OHdG 水平降低 ($P<0.05$)，以赤芍红花组更明显，见图 5。如图 6 所示，模型组小鼠线粒体肿胀明显，液泡变大，嵴断裂；赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠线粒体形态和肿胀程度明显改善。

Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，赤芍组、红花组、赤芍红花组小鼠 PGC-1 α 、Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，以赤芍红花组更明显，见图 7。

4 讨论

临床以红花、赤芍为主要组成的中药复方制剂和中成药有数百种，如补阳还五汤、通窍活血汤、步长脑心通胶囊、脑血栓片等，这些药物治疗缺血性脑卒中应用广泛且疗效确切，充分证实红花赤芍药对配伍使用发挥脑保护作用。《药品化义》中记载“红花为血中气药，能泻又能补，佐赤芍治遍身血气刺痛，此其行导而活血也”。红花赤芍配



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为赤芍组，D 为红花组，E 为赤芍红花组。与假手术组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 5 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠线粒体氧化损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

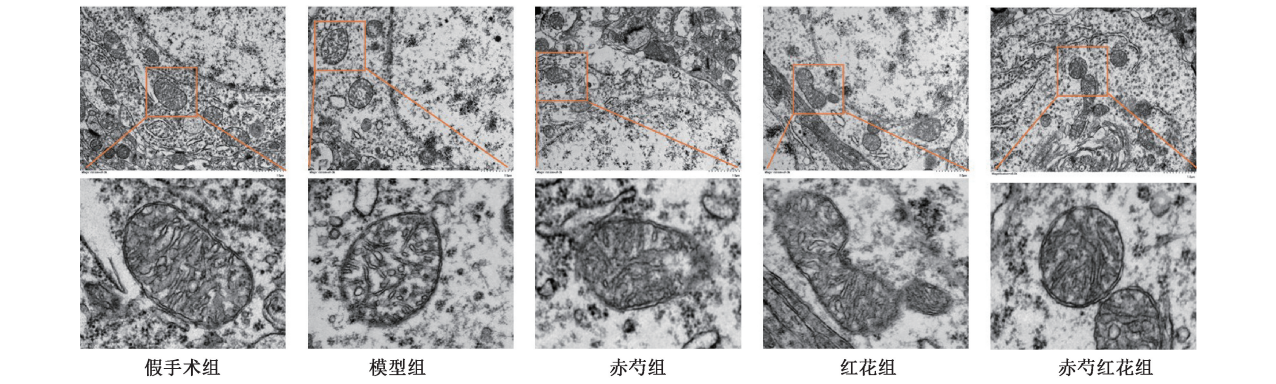
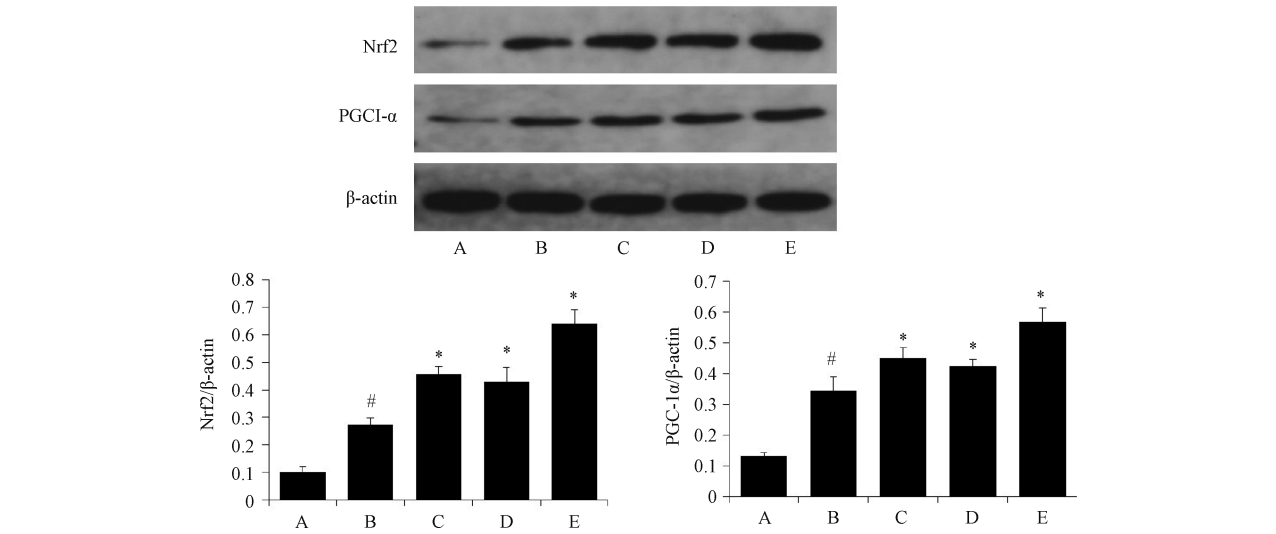


图 6 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠线粒体超微结构的影响



注：A 为假手术组，B 为模型组，C 为赤芍组，D 为红花组，E 为赤芍红花组。与假手术组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 7 赤芍红花配伍对脑缺血小鼠脑组织 PGC-1α、Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

伍治疗缺血性脑卒中，以红花味辛气轻，血中之气药，上达巅顶，下通血海，行气活血，散瘀止痛；佐以苦寒散泄的赤芍，破血行气，清热解毒，引血下行，红花升浮之品配伍赤芍沉降之物，一升一降内外通和，从而达到治疗的目的。

中医认为“气虚血瘀，瘀血阻滞”是缺血性脑卒中的主要病机，气虚是发病之本，血瘀乃病发展之核心，故以“益气营血，活血化瘀”为主要治法。合理运用中医药疗法，利用中药多组分、多重靶点的整体调节优势，改善缺血性脑卒中患者神经元细胞损伤的级联反应，尤其在营养神经功能方面显示出独特的优势^[4-5]。赤芍红花为活血祛瘀药对，“药有个性之特长，方有合群之妙用”，两药配伍，

以益气行血之力，助活血化瘀之功倍增。本研究显示，赤芍红花配伍通过 PGC-1α/Nrf2 途径调控线粒体功能修复受损神经元细胞，改善神经功能，发挥抗缺血性脑卒中作用。

缺血性脑损伤后，血管闭塞和神经元供氧不足诱导线粒体碎片化，扰乱 ATP 供应并导致 ROS 过度积累^[6]。细胞内产生大量的 ROS 造成线粒体功能障碍，启动细胞凋亡信号分子^[7]，激活线粒体凋亡通路^[8]，同时使线粒体 DNA 致突变，转录有缺陷的电子传递链组分^[9]。线粒体是调控脑缺血后神经元生存状态的核心环节。线粒体结构和功能的维持对改善缺血区域脑组织的氧化应激，抑制神经元细胞凋亡有着重要意义^[10-11]。Chouchani 等^[12]证实，通过药物抑制线粒体呼吸链上酶复合物电子传递，可以限制线粒体

ROS 产生,改善氧化损伤、细胞死亡。本研究结果表明,赤芍红花配伍可缓解 ROS 的累积,促进抗氧化酶分泌(SOD、GSH-Px)。Hayakawa 等^[13]发现脑缺血后星形胶质细胞释放健康的线粒体,可修复受损的神经元细胞,提示血浆中的线粒体循环转运至脑组织可修复因缺血而损伤的神经元。研究表明,星形胶质细胞可以将线粒体转移到受损的神经元上,以增强其活力和恢复能力^[14]。本研究结果显示,赤芍红花促进 mt-DNA 编码的呼吸链复合物 I 的 ND6 表达,抑制 mt-DNA 氧化产物 8-OHdG 生成,有抗线粒体氧化损伤,维持线粒体功能的作用。

PGC-1 α 是一种多功能转录共激活物,通过 Nrf2 的相互作用调节线粒体生物发生、呼吸和各种抗氧化酶,保护神经元抗氧化损伤^[15]。PGC-1 α 共同激活核呼吸因子 Nrf1 和 Nrf2 的转录,进而调节线粒体转录因子 A (TFAM) 的转录。TFAM 易位到线粒体基质中,刺激 mt-DNA 复制和线粒体基因表达^[16]。研究表明,赤芍主要有效成分鞣花酸通过激活 PGC-1 α /Nrf2 信号通路增加抗氧化应激活性,从而保护神经元细胞免受缺血缺氧损伤^[17]。本研究发现,赤芍红花组 PGC-1 α /Nrf2 表达升高,且高于单独用药组。进一步分析表明,赤芍红花组 PGC-1 α /Nrf2 的过表达促进 ND6 表达和抑制 8-OHdG 生成。赤芍红花配伍组 PGC-1 α /Nrf2 的过表达有增强线粒体功能,减少 ROS 产生,增强线粒体抗氧化防御系统,从而发挥抗缺血性卒中作用。

5 结 论

赤芍红花通过激活 PGC-1 α /Nrf2 通路调控线粒体功能,从而发挥脑保护作用。同时,赤芍红花配伍具有益气营血、活血化瘀的作用,未来可用科学、量化的语言解释民族药应用理论,为防治缺血性脑卒中提供一个新的药物治疗思路。

参考文献:

[1] Ma Q F, Li R, Wang L J, *et al.* Temporal trend and attributable risk factors of stroke burden in China, 1990-2019: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Public Health*, 2021, 6(12): e897-e906.

[2] Kaur M M, Sharma D S. Mitochondrial repair as potential pharmacological target in cerebral ischemia[J]. *Mitochondrion*, 2022, 63: 23-31.

[3] 林 谦,农一兵,黄启福.从心肌能量代谢探讨慢性心力衰

竭心气虚证的实质[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30 (7): 445-446; 474.

[4] 陈 红,吴俊杰,薛 强,等.以线粒体为靶点抗缺血性脑卒中中药有效成分研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25 (11): 1236-1240.

[5] 顾玉宝,刘敬霞.回医药治疗脑卒中的作用机制及应用研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(9): 2306-2308.

[6] Wei N, Pu Y H, Yang Z H, *et al.* Therapeutic effects of melatonin on cerebral ischemia reperfusion injury: Role of Yap-OPA1 signaling pathway and mitochondrial fusion[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 203-212.

[7] Andrabi S S, Parvez S, Tabassum H. Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets[J]. *Protoplasma*, 2020, 257(2): 335-343.

[8] Andrabi S S, Ali M, Tabassum H, *et al.* Pramipexole prevents ischemic cell death *via* mitochondrial pathways in ischemic stroke[J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(8): dmm033860.

[9] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke[J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 263-275.

[10] He Z, Ning N Y, Zhou Q X, *et al.* Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 146: 45-58.

[11] 宋玉莹,崔 琳,何玉凤,等.线粒体对心血管疾病铁死亡的影响及其中医药研究进展[J]. *世界中医药*, 2023, 18 (23): 3473-3477.

[12] Chouchani E T, Pell V R, Gaude E, *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS[J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 431-435.

[13] Hayakawa K, Esposito E, Wang X H, *et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke[J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 551-555.

[14] Lee E H, Kim M, Ko S H, *et al.* Primary astrocytic mitochondrial transplantation ameliorates ischemic stroke [J]. *BMB Rep*, 2023, 56(2): 90-95.

[15] Rius-Perez S, Torres-Cuevas I, Millan I, *et al.* PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1452696.

[16] Tang B L. Sirt1 and the mitochondria[J]. *Mol Cells*, 2016, 39 (2): 87-95.

[17] 陈敏纯,张婧一,张雨晨,等.鞣花酸对缺血性脑卒中大鼠的保护作用[J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2331-2335.