

· 论 著 ·

# 丁苯酞对急性脑梗死大鼠血液流变学及血清同型半胱氨酸水平的影响

闫欣 江涛 李娜 唐彦

(河北省保定市第二中心医院, 河北保定 072750)

**【摘要】**目的 研究丁苯酞(NBP)对急性脑梗死大鼠血液流变学、血清同型半胱氨酸(Hcy)水平和超敏C反应蛋白(hs-CRP)及血管内皮因子(VEGF)等指标的影响,以及NBP对神经细胞凋亡的调节作用及其机制。方法 将大鼠分为假手术对照组(CK, n=10)、急性脑梗死组(ACI, n=10)和药物组(ACI+NBP, n=10);采用高压液相色谱法检测Hcy浓度,ELISA法检测大鼠血清中VEGF和hs-CRP的水平,TUNEL法检测大鼠脑组织神经细胞凋亡。结果 与CK组相比,急性脑梗死大鼠神经细胞凋亡数目显著增加,使用NBP后得到缓解并基本恢复到CK组水平。与CK组相比,急性脑梗死大鼠中红细胞压积由37.4%显著增加至42.7%,而使用NBP后红细胞压积又恢复到37.9%,并接近CK组状态( $P<0.01$ );在血沉检测结果中,急性脑梗死大鼠血沉由15.52 mm/h显著增加到18.86mm/h,在NBP处理后显著降低至16.18mm/h( $P<0.01$ )。大鼠血浆粘度检测结果中,急性脑梗死大鼠血浆粘度和CK组相比有显著升高( $P<0.01$ ),并在NBP处理后恢复初始水平;急性脑梗死大鼠纤维蛋白原也由较低水平的2.98mg/L显著增加至3.66mg/L,而在ACI+NBP组则显著降至2.68mg/L。与CK组相比,急性脑梗死ACI大鼠血清中Hcy含量显著提高了约1.6倍( $P<0.01$ ),而ACI+NBP组大鼠则与对照差异不显著( $P>0.05$ )。同时,ACI大鼠VEGF含量较CK组显著增加约1.2倍( $P<0.01$ ),hs-CRP检测结果较CK组也显著增加( $P<0.01$ ),而在NBP处理下显著降低( $P<0.01$ )。结论 NBP有助于急性脑梗死大鼠神经功能修复,抑制神经细胞凋亡的发生,改善ACI大鼠血液流变学和Hcy水平,影响血管内皮功能和超敏C反应蛋白水平,从而改善ACI大鼠生存质量。

**【关键词】** 丁苯酞; 急性脑梗死; 血液流变学; 同型半胱氨酸; 超敏C反应蛋白; 血管内皮生长因子

**【中图分类号】** R972 **【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.11876/mimt202004004

## Effects of Butylphthalide on Hemorheology and Serum Homocysteine Levels in Rats with Acute Cerebral Infarction

Yan Xin, Jiang Tao, Li Na, Tang Yan. The Second Central Hospital, Baoding City, Hebei Province, Hebei Baoding 072750, China  
Corresponding author: Yan Xin, Email: 499298180@qq.com

**【Abstract】** Objective To study the effects of butylphthalide (NBP) on hemorheology, serum homocysteine (Hcy) levels, hs-CRP, and vascular endothelial factor (VEGF) in rats with acute cerebral infarction, and the effects of NBP on nerves. Regulation of apoptosis and its mechanism. **Methods** Rats were divided into sham operation control group (CK, n=10), acute cerebral infarction group (ACI, n=10) and drug group (ACI + NBP, n=10). Phase chromatography was used to detect the concentration of Hcy, ELISA was used to detect the levels of VEGF and hs-CRP in rat serum, and TUNEL was used to detect the neuronal apoptosis of rat brain tissue. **Results** Compared with the sham-operated control group (CK), the number of neuron apoptosis in acute cerebral infarction rats increased significantly, and the situation was alleviated and returned to the control group level when treated with NBP. Compared with the CK group, the hematocrit in rats with acute cerebral infarction increased significantly from 37.4% to 42.7%, and after using NBP, the hematocrit returned to 37.9% and was close to the state of CK ( $P<0.01$ ). In the test results, the erythrocyte sedimentation rate of rats with acute cerebral infarction increased significantly from 15.52 mm/h to 18.86 mm/h, and decreased significantly to 16.18 mm/h after NBP treatment ( $P<0.01$ ). In the plasma viscosity test results of rats, the plasma viscosity of rats with acute cerebral infarction was significantly higher than that of the CK group ( $P<0.01$ ), and recovered to the initial level after NBP treatment; similarly, the acute cerebral infarction was large. Fibrinogen in rats also increased significantly from a lower level of 2.98 mg/L to 3.66mg/L, while in the ACI+NBP group it decreased significantly to 2.68mg/L. Compared with the CK group, the serum homocysteine content in ACI

基金项目: 保定市科技局项目; 项目名称: 急性缺血性卒中患者应用阿替普酶联合丁苯酞治疗的临床研究;  
项目编号: 17ZF222

第一作者、通讯作者: 闫欣, 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管病临床和药理研究, Email: 499298180@qq.com

rats with acute cerebral infarction was significantly increased by about 1.6 times ( $P < 0.01$ ), while the ACI + NBP group rats were not significantly different from the control ( $P > 0.05$ ). At the same time, the content of VEGF in ACI rats increased significantly by about 1.2 times compared with the CK group ( $P < 0.01$ ). Similarly, the hs-CRP test results also increased significantly compared with the CK group ( $P < 0.01$ ), and decreased significantly under the treatment of NBP ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** NBP treatment is helpful for the repair of neurological function in rats with acute cerebral infarction, inhibits the occurrence of neuronal apoptosis, improves the blood rheology and homocysteine levels in ACI rats, and affects vascular endothelial function and hypersensitivity C Reactive protein levels improve the quality of life of ACI rats.

**【Key words】** Butylphthalide; Acute cerebral infarction; Hemorheology; Homocysteine; hs-CRP; VEGF

急性脑梗死 (ACI) 是一种临床常见的脑血管疾病<sup>[1]</sup>, 提高脑梗死的治愈率将是人们面临的主要任务。大量研究表明, 在脑缺血和缺氧后 24h 内, 大量血管内皮生长因子 (VEGF) 和其他神经营养因子 (NF) 发生应激增殖, 并在缺血性半影区中开始产生大量内皮细胞, 并扩展到梗塞区域<sup>[2, 3]</sup>。而血液粘度增加和红细胞聚集是溶栓和患者死亡后第二次血栓形成的主要原因<sup>[4]</sup>。因此, 有效降低血液粘度并减少炎症反应以改善高凝状态具有重要意义, 可降低溶栓后再出血风险。

丁苯酞 (DL-3- 正丁基酞, NBP) 是首先在我国上市的一类新药<sup>[5]</sup>, 对急性缺血性中风具有治疗作用<sup>[6]</sup>。NBP 可抑制神经细胞凋亡, 并保护神经细胞免受由缺血和缺氧引起的损伤, 神经功能缺损、脑缺血和记忆损害<sup>[7]</sup>。超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 是中风等脑部疾病的危险因素之一。为进一步研究 NBP 在脑梗死治疗中的价值, 着重分析了 NBP 对血液流变学、血清同型半胱氨酸水平和 hs-CRP 及血管内皮因子这些指标的影响, 以及 NBP 对神经细胞凋亡的调节作用及其机制, 以期为 ACI 有效治疗方案提供理论参考和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的建立和处理分组

实验动物为雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (8 周龄, 250 ~ 300g), 购于中国科学院上海医学研究院, 将其喂养在笼子里, 在昼夜节律的室温下喂食。将大鼠分为 (CK,  $n=10$ )、ACI 组 (ACI,  $n=10$ ) 和药物组 (ACI+NBP,  $n=10$ ), 三组均接受相同的饮食。在实验结束时用戊巴比妥钠 (70mg/kg) 处死。所有动物程序均按照动物研究指南进行, 并由医院委员会审查并批准。

### 1.2 血浆 Hcy 的检测及检测设备

经过 1 夜禁食后, 空腹收集大鼠血液样本。将样品储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  用于后续实验。血浆样本通过高压液相色谱法检测 Hcy 的浓度, 参考 Ozdem 等<sup>[8]</sup>方法。仪器设备: K2025 高效液相色谱仪 (济南海能仪器股份有限公司)。

### 1.3 ELISA 法检测大鼠血清中 VEGF 和 hs-CRP 的水平

将  $100\mu\text{L}$  样品稀释液和血清添加到每个孔

中, 然后在  $37^{\circ}\text{C}$  的恒温箱中保温 1.5h。随后, 将  $100\mu\text{L}$  生物素标记的抗体工作溶液添加到每个孔中, 在  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 1h。之后, 将  $100\mu\text{L}$  的抗生物素蛋白 -HRP 标记的工作溶液添加到每个孔中, 在  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 30min。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 洗涤 3 次后, 将 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 底物溶液 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 洗涤加入以终止反应, 使用酶标仪测量吸光度。最后, 根据计算公式计算 VEGF 和 hs-CRP 的水平。

### 1.4 TUNEL 法检测大鼠脑组织神经细胞凋亡

将脑组织切片用 4% 多聚甲醛固定, 用 PBS 洗涤 3 次, 并逐滴添加  $50\mu\text{L}$  TdT 酶反应溶液。随后滴加  $50\mu\text{L}$  链霉亲和素 -TRITC 标记溶液, 在黑暗中孵育 30min。用 PBS 洗涤 3 次后, 用 4', 6-二脒基 -2- 苯基吡啶 (DAPI) 染色溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 保留细胞核, 然后在室温下孵育 15min。最后, 在显微镜下观察染色。

### 1.5 数据处理与统计分析

均采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。实验数据表示为平均值  $\pm$  标准差。首先进行方差的均一性, 然后进行  $t$  检验以比较两组之间的差异。单向方差分析用于比较不同组之间的差异, 然后进行事后检验 (最低显着性差异)。  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果

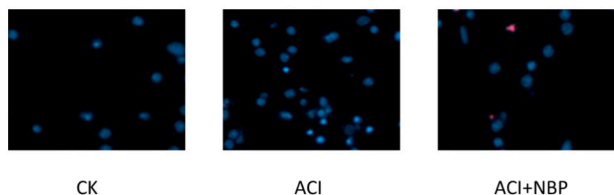
### 2.1 NBP 对 ACI 大鼠脑神经元凋亡的影响

通过 TUNEL 染色法检测了 ACI 大鼠脑神经元凋亡, 结果表明, 与对照相比, ACI 大鼠神经元细胞凋亡数目显著增加 (图 1), 而使用 NBP 处理后神经细胞凋亡的情况得到了缓解, 基本恢复到 CK 组水平。

### 2.2 大鼠中红细胞压积和血沉的变化

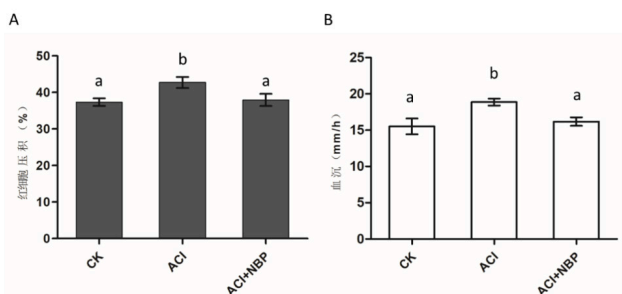
对大鼠红细胞压积和血沉进行检测, 结果发现, 与 CK 组相比, ACI 大鼠红细胞压积由 37.4% 显著增加至 42.7%, 而使用 NBP 后红细胞压积恢复到 37.9%, 接近 CK 组状态 (图 2A,  $P < 0.01$ )。在血沉检测结果中, ACI 大鼠血沉由 15.52mm/h 增加到 18.86mm/h (图 2B), 且在 NBP 处理后显著降低至

16.18mm/h ( $P<0.01$ )。



(注: CK: 假手术组对照, ACI: ACI大鼠模型, ACI+NBP: 丁苯酞处理后的ACI大鼠)

图1 NBP对ACI大鼠脑神经元凋亡的影响

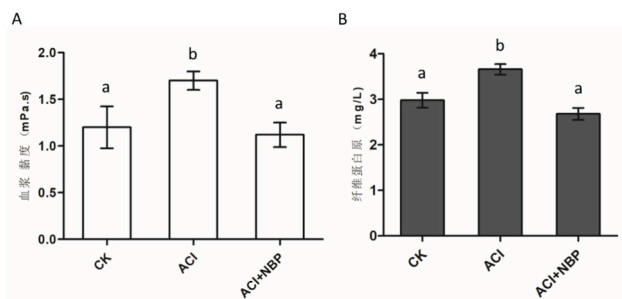


(注: 图中不同字母 (ab) 代表差异的显著性 ( $P<0.01$ ), CK: 假手术组对照, ACI: ACI大鼠模型, ACI+NBP: 丁苯酞处理后的ACI大鼠)

图2 ACI大鼠中红细胞压积(A)和血沉(B)的变化情况

### 2.3 血浆黏度和纤维蛋白原含量水平的变化

对大鼠血浆粘度检测结果如图3A, ACI大鼠中血浆粘度和假手术组(CK)对照相比有显著的升高,并在NBP处理后恢复初始水平( $P<0.01$ )。相似的,ACI大鼠中纤维蛋白原也由较低水平的2.98mg/L显著增加至3.66mg/L,而在ACI+NBP组则显著降至2.68mg/L(图3B,  $P<0.01$ )。这些结果说明,NBP能够显著改善ACI大鼠血液流变学指标,从而对大鼠起到保护作用。



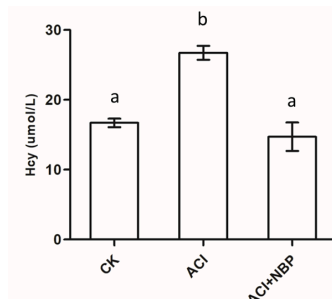
(注: 图中不同字母 (ab) 代表差异的显著性 ( $P<0.01$ ), CK: 假手术组对照, ACI: ACI大鼠模型, ACI+NBP: 丁苯酞处理后的ACI大鼠)

图3 ACI大鼠中血浆黏度(A)和纤维蛋白原含量水平(B)的变化情况

### 2.4 血清同型半胱氨酸水平的变化

同型半胱氨酸(Hcy)是评价ACI的重要指标,利用高效液相色谱仪检测了不同分组大鼠血清Hcy水平,结果如图4所示。与CK组相比,ACI大鼠

血清中Hcy含量显著提高约1.6倍( $P<0.01$ ),而ACI+NBP组大鼠中则与对照差异不显著( $P>0.05$ )。说明NBP能有效减少ACI大鼠Hcy水平,有效保护ACI大鼠。

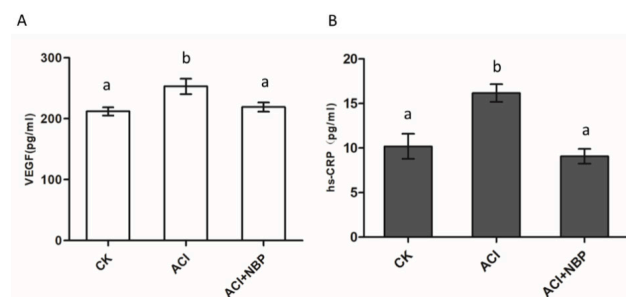


(注: 图中不同字母 (ab) 代表差异的显著性 ( $P<0.01$ ), CK: 假手术组对照, ACI: ACI大鼠模型, ACI+NBP: 丁苯酞处理后的ACI大鼠)

图4 ACI大鼠中血清同型半胱氨酸水平的变化情况

### 2.5 血管内皮因子和超敏感C反应蛋白水平的变化

为了进一步验证实验结果可靠性,还对大鼠血管内皮因子(VEGF)和hs-CRP水平进行了检测。结果:ACI大鼠VEGF含量较对照组显著增加约1.2倍( $P<0.01$ ),而ACI+NBP组大鼠VEGF则与CK组无显著差异(图5A)。同样,hs-CRP检测结果与VEGF结果类似,NBP的处理显著降低其在ACI大鼠中的高表达(图5B,  $P<0.01$ ),从而有效缓解了ACI的症状。



(注: 图中不同字母 (ab) 代表差异的显著性 ( $P<0.01$ ), CK: 假手术组对照, ACI: ACI大鼠模型, ACI+NBP: 丁苯酞处理后的ACI大鼠)

图5 ACI大鼠VEGF(A)含量和hs-CRP(B)水平的变化

## 3 讨论

我国是脑血管疾病高发国家<sup>[9]</sup>,缺血性脑血管疾病的发病率占脑血管疾病的70%~80%,且脑梗死死亡率和致残率相对较高<sup>[10]</sup>。因此,疾病严重程度的早期评估、及时的针对性治疗已成为脑梗死研究重点<sup>[11]</sup>。

He等<sup>[12]</sup>指出,DL-NBP对创伤性脊髓损伤具有神经保护和抗炎作用。体内外实验均证明DL-NBP可以显著增强小胶质细胞的活化和炎性因子的



释放,提高脊髓损伤的运动能力,并减少大鼠模型腔内脊髓损伤的面积。Zhao等<sup>[13]</sup>发现DL-NBP对脑外伤具有良好的治疗作用,同时实验证明,用DL-NBP治疗后损伤周围区域的凋亡因子水平显著降低。实验也发现用NBP处理后ACI大鼠中神经元细胞凋亡数目显著减少,说明其对神经元细胞凋亡具有有效地抑制作用,从而保护脑组织细胞免受损伤。研究结果还显示,用NBP治疗后的ACI大鼠中红细胞压积、血沉、血浆黏度和纤维蛋白原均显著低于对照组,由此表明NBP具有促进纤维蛋白溶解的作用及能有效改善ACI大鼠的血液流变学性质。以对ACI大鼠起到保护作用。

Hcy是在蛋氨酸代谢过程中形成的一种含硫非蛋白质氨基酸<sup>[14]</sup>,是动脉粥样硬化等血管疾病发病的危险因子之一。已证实Hcy与许多疾病密切相关<sup>[15]</sup>。总血浆Hcy升高被称为高同型半胱氨酸血症(HHcy)。研究证明HHcy可减轻内皮功能障碍,促进毒性半胱氨酸加合物代谢并维持氧化应激<sup>[16]</sup>。

hs-CRP是脑梗死患者炎症反应重要指标之一,hs-CRP水平的提高能够有效指示炎症反应的严重程度,是脑梗死患者预后不良的高危因素之一<sup>[17,18]</sup>。报道,hs-CRP的增加对动脉粥样硬化斑块进展与脱落具有显著促进作用<sup>[19]</sup>。而血管内皮因子(VEGF)主要作用是调节机体血管渗透性,在机体脑组织缺氧情况下,活化巨噬细胞和单核细胞以及星形胶质细胞,能够分泌VEGF,从而加重患者缺血脑组织水肿<sup>[20]</sup>。实验经过检测发现,NBP能够有效的降低大鼠因ACI引起的VEGF和hs-CRP水平急剧增加的情况,抑制了其显著的增加,从而有效的缓解脑梗死大鼠炎症和血管内皮功能。给予ACI大鼠NBP治疗有助于神经功能修复,抑制神经细胞凋亡的发生,改善ACI大鼠血液流变学和同型半胱氨酸水平,以及影响血管内皮功能和超敏C反应蛋白水平,从而改善ACI大鼠的生存质量。

#### 参考文献

- [1] 张立新,张志强.急性脑梗死的物理治疗及研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2002,24(2):122-125.
- [2] 姚瑞芹,李林.血管内皮细胞生长因子在缺血性脑损伤中血管新生、神经发生和神经保护的作用[J].中国康复理论与实践,2007,13(3):208-211.
- [3] 雷建锋,赵媛媛,王战京,等.超高磁场下大鼠脑血管成像技术应用[J].现代仪器与医疗,2020,26(2):49-52.
- [4] Orlov SV, Domashenko MA, Kostyreva MV, et al. Hemorheology and hemostasis in patients suffering from ischemic cerebral stroke and metabolic syndrome [J]. Klin. Med. 2007, (85): 40-44.
- [5] 彭英.左旋丁基苯酞抗脑缺血和抗老年痴呆的药理作用及机制研究[D].中国协和医科大学,2004.
- [6] Tian Z, Wang J, Wang Y, et al. Effects of butylphthalide on cognitive decline in diabetic rats [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9131-9136.
- [7] Liu RZ, Fan CX, Zhang ZL, et al. Effects of DL-3-n-butylphthalide on cerebral ischemia infarction in rat model by mass spectrometry imaging [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2451.
- [8] Ozdem S, Samanci S, Tasatargil A, et al. Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats [J]. Scand J Clin Lab Invest. 2007, 67(7): 748-756.
- [9] Chen, X., & Wang, K. The fate of medications evaluated for ischemic stroke pharmacotherapy over the period 1995-2015 [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2006, 6(6): 522-530.
- [10] Writing Group Members, Mozaffarian, D., Benjamin, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2016, 133, 447-454.
- [11] Kidwell, CS, Liebeskind, DS, et al. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century [J]. Stroke, 2001, 32(6): 1349-1359.
- [12] He Z, Zhou Y, Lin L, et al. DL-3-n-butylphthalide attenuates acute inflammatory activation in rats with spinal cord injury by inhibiting microglial TLR4/NF-kappa B signalling [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 3010-3022.
- [13] Zhao Y, Lee JH, Chen D, et al. DL-3-n-butylphthalide induced neuroprotection, regenerative repair, functional recovery and psychological benefits following traumatic brain injury in mice [J]. Neurochem Int. 2017, 111: 82-92.
- [14] Selhub J. Homocysteine metabolism [J]. Annu Rev Nutr. 1999, 19: 217-246.
- [15] M Suliman, P Stenvinkel, AR Qureshi et al., The reverse epidemiology of plasma total homocysteine as a mortality risk factor is related to the impact of wasting and inflammation [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2007, 22(1): 209-217.
- [16] JC Chambers, A McGregor, J Jean-Marie, et al. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: An effect reversible with vitamin C therapy [J]. Circulation, 1999, 99(9): 1156-1160.
- [17] 郑建琼,杨安.超敏C反应蛋白水平与急性脑梗死病情的相关性[J].中国临床药理学杂志,2014,30(5):391-393.
- [18] 蔡国锋,梁洪文,孙波,等.交叉电项针对治疗急性脑梗死的磁共振波谱成像的影响[J].现代仪器与医疗,2020,26(2):53-55.
- [19] 万鸿平,邓小容,杜敏,等.丹红注射液对急性进展性脑梗死病人Hcy、hs-CRP的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(13):1538-1540.
- [20] 林彩云.急性脑梗死患者血管内皮功能和同型半胱氨酸水平变化的研究[J].中国医药科学,2018,175(7):240-242,263.