

·实验研究·

本文引用: 张 艺, 左丽婉, 张 启, 伍昌总, 刘春华. 通窍定眩饮调节糖酵解改善脑缺血大鼠血管新生的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(4): 531-537.

## 通窍定眩饮调节糖酵解改善脑缺血大鼠血管新生的机制研究

张 艺, 左丽婉, 张 启, 伍昌总, 刘春华\*  
湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

**〔摘要〕** 目的 探究通窍定眩饮对脑缺血后血管新生的分子机制,并基于糖酵解通路探讨其可能的作用机制。方法 共40只大鼠,随机选取6只为假手术组,余采用大鼠大脑中动脉阻塞法建立脑缺血模型。24只造模成功的大鼠用随机分为模型组、丁苯酞组、联合用药组、通窍定眩饮组,每组6只。假手术组、模型组予蒸馏水10 mL/(kg·d)灌胃,丁苯酞组予丁苯酞54 mg/(kg·d)灌胃,联合用药组予丁苯酞54 mg/(kg·d)和中药药液14.6 g/(kg·d)灌胃,通窍定眩饮组予中药药液14.6 g/(kg·d)灌胃。干预3 d后采用Zea-Longa法观察大鼠的神经功能评分; TTC染色法确定脑梗死范围; ELISA法检测乳酸、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)和葡萄糖含量,免疫组化法检测葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)、己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)、乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)蛋白的表达以及微血管密度变化。结果 与假手术相比,模型组有明显神经功能缺损,脑梗死体积比明显增加( $P<0.05$ ),乳酸含量增加( $P<0.05$ ),ATP和葡萄糖含量减少( $P<0.05$ ),GLUT1、HK2、LDHA蛋白的表达增加( $P<0.05$ ),微血管密度增加( $P<0.05$ )。与模型组相比,丁苯酞组神经功能缺损程度及脑梗死体积比明显降低( $P<0.05$ ),乳酸、ATP和葡萄糖含量无显著变化( $P>0.05$ ),GLUT1、HK2、LDHA蛋白的表达无显著变化( $P>0.05$ ),微血管密度增加( $P<0.05$ );联合用药组和通窍定眩饮组神经功能缺损程度及脑梗死体积比明显降低( $P<0.05$ ),乳酸、ATP和葡萄糖含量均增加( $P<0.05$ ),GLUT1、HK2、LDHA蛋白的表达及微血管密度显著增加( $P<0.05$ )。与联合用药组相比,丁苯酞组脑梗死体积比增加( $P<0.05$ ),乳酸、ATP和葡萄糖含量减少( $P<0.05$ ),GLUT1、HK2、LDHA蛋白的表达降低( $P<0.05$ ),微血管密度降低( $P<0.05$ );通窍定眩饮组脑梗死体积比增加( $P<0.05$ ),乳酸、ATP和葡萄糖含量无显著变化( $P>0.05$ ),GLUT1、HK2、LDHA蛋白的表达无显著变化( $P>0.05$ ),微血管密度降低( $P<0.05$ )。结论 通窍定眩饮对脑缺血模型具有一定的神经保护作用,其机制可能与调控糖酵解通路促进血管新生有关。

**〔关键词〕** 通窍定眩饮;糖酵解;脑缺血;血管新生;葡萄糖转运蛋白1;己糖激酶2;乳酸脱氢酶A

**〔中图分类号〕**R285.5

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.04.001

## Mechanism of Tongqiao Dingxuan Decoction regulating glycolysis to improve angiogenesis in rats with cerebral ischemia

ZHANG Yi, ZUO Liwan, ZHANG Qi, WU Changzong, LIU Chunhua\*

The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

**〔Abstract〕 Objective** To explore the molecular mechanism of Tongqiao Dingxuan Decoction (TQDXD) on cerebral ischemia-induced angiogenesis, and to discuss its possible mechanism of action based on the glycolysis pathways. **Methods** A total of 40 rats

**〔收稿日期〕**2023-10-12

**〔基金项目〕**湖南省教育厅科研项目(22A0269);湖南省研究生科研创新项目(CX20220818)。

**〔通信作者〕**\*刘春华,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:liuchunhua@hnu.edu.cn。

were used, six rats were randomly selected as sham-operated group, and the rest were used to establish a cerebral ischemia model by the method of middle cerebral artery occlusion. Twenty-four rats with successful modeling were randomized into model, butylphthalide, combination, and TQDXD groups, with six rats in each group. Sham-operated and model groups were treated with distilled water 10 mL/(kg·d), butylphthalide group with butylphthalide 54 mg/(kg·d), combination group with butylphthalide 54 mg/(kg·d) and TQDXD 14.6 g/(kg·d), and TQDXD group with TQDXD 14.6 g/(kg·d). All the drugs and distilled water were administered by gavage. After 3 d of intervention, the neurological function of the rats was scored using the Zea-Longa method; the extent of cerebral infarction was determined by TTC staining; the levels of lactate, adenosine triphosphate (ATP), and glucose were measured by ELISA; the protein expressions of glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), and lactate dehydrogenase A (LDHA), as well as changes in microvessel density were examined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited significant neurological deficits and obviously increased volume ratio of cerebral infarction ( $P<0.05$ ), elevated lactate level ( $P<0.05$ ), decreased ATP and glucose levels ( $P<0.05$ ), higher protein expressions of GLUT1, HK2, and LDHA ( $P<0.05$ ), and increased microvessel density ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the butylphthalide group showed significantly reduced neurological deficits and volume ratio of cerebral infarction ( $P<0.05$ ), and increased microvessel density ( $P<0.05$ ), with no significant changes in lactate, ATP, and glucose levels ( $P>0.05$ ), nor in the protein expressions of GLUT1, HK2, and LDHA ( $P>0.05$ ); both the combination and TQDXD groups showed significantly reduced neurological deficits and volume ratio of cerebral infarction ( $P<0.05$ ), increased lactate, TP, and glucose levels ( $P<0.05$ ), and significantly elevated protein expressions of GLUT1, HK2, and LDHA, and microvessel density ( $P<0.05$ ). Compared with the combination group, the butylphthalide group exhibited increased cerebral infarction area ( $P<0.05$ ), decreased lactate, ATP, and glucose levels ( $P<0.05$ ), lower protein expressions of GLUT1, HK2, and LDHA ( $P<0.05$ ), and reduced microvessel density ( $P<0.05$ ); the TQDXD group showed increased cerebral infarction area ( $P<0.05$ ) and decreased microvessel density ( $P<0.05$ ), with no significant changes in the levels of lactate, ATP, and glucose ( $P>0.05$ ), nor in the protein expressions of GLUT1, HK2, and LDHA ( $P>0.05$ ). **Conclusion** TQDXD has a certain neuroprotective effect on cerebral ischemia model, and its mechanism may be related to regulating glycolysis pathways to promote angiogenesis.

[**Keywords**] Tongqiao Dingxuan Decoction; glycolysis; cerebral ischemia; angiogenesis; glucose transporter 1; hexokinase 2; lactate dehydrogenase A

中风是全世界致残和死亡的第二大原因,缺血性中风(ischemic stroke, IS)占其中 87%,其高发病率和致残率造成极高的医疗负担<sup>[1]</sup>。IS 急性期治疗的主要目的是迅速重建缺血区血液供应,尽可能挽救受损的脑细胞,减轻缺血缺氧对脑组织造成的不可逆性损伤。目前,溶栓和血管内介入治疗(包括血管内机械取栓、动脉溶栓、血管成形术)是临床上常用的方法<sup>[2]</sup>,然而,有限的治疗时间窗以及严格的适应证和禁忌证等因素可能导致溶栓治疗的延迟<sup>[3]</sup>。IS 后脑血容量的增加与血管新生有关,通过促进缺血半暗带区血管新生,对恢复局部血液供应和重建受损神经元功能等方面起到重要作用<sup>[4]</sup>。而血管内皮细胞依赖糖酵解产生能量;在生理条件下,血管内皮细胞中 85%以上的 ATP 由糖酵解产生<sup>[5]</sup>。当发生缺氧时,神经元和血管内皮细胞的糖酵解过程加速,

以暂时维持细胞的正常能量供应<sup>[6]</sup>。此外,糖酵解过程中产生的乳酸还可以抑制免疫监视,刺激内皮细胞形成新的血管<sup>[7]</sup>。因此,维持适度的糖酵解有助于促进血管新生。前期研究<sup>[8-10]</sup>发现,通窍定眩饮可降低患者血黏度、改善动脉供血、促进血管新生、恢复脑缺血神经功能。而目前尚未明确通窍定眩饮是否能通过调节糖酵解和促进血管新生保护神经元。在本研究中,我们拟在进一步证实通窍定眩饮对大鼠的神经保护作用的基础上,重点观察通窍定眩饮对大鼠的神经保护作用是否与促进糖酵解反应有关。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,体质量 250~280 g,共 40 只,由湖南中医药大学动物实验中心提供(动物编号:

430727231101448513),购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南中医药大学动物实验中心[许可证号:SYXK(湘)2019-0009]。室温 20~25 ℃,湿度 50%~70%,自由进食、饮水,适应性喂养 1 周,术前 12 h 禁食不禁水。实验通过湖南中医药大学实验委员会审查批准(编号:LL2023060702)。

## 1.2 药物

通窍定眩饮(黄芪 30 g、熟地黄 15 g、制何首乌 10 g、葛根 45 g、红花 10 g、赤芍 10 g、地龙 10 g、桃仁 10 g、天麻 10 g、石菖蒲 10 g、川芎 6 g)饮片购自湖南中医药大学第二附属医院。通窍定眩饮生药量为 166 g,设成人标准体质量为 70 kg,大鼠/成人换算系数为 6.18<sup>[11]</sup>,制成浓度为 14.6 g/(kg·d)(等同于成人常规量)的中药药液,冷藏备用。将丁苯酞软胶囊(石药集团恩必普药业有限公司,国字准号:H20050299,规格:0.1 g\*24 粒,批号:1182303114)内的药物倒出,每剂加入 60 mL 纯水,制成剂量浓度为 54 mg/(kg·d)的西药药液。

## 1.3 主要试剂及仪器

GLUT1 抗体、HK2 抗体、LDHA 抗体、血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,CD31)抗体、ATP 含量测定试剂盒、乳酸含量试剂盒、葡萄糖含量测定试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司,批号分别为 AF03468、AF04602、AF10640、SAF005、ADS-W-A001-96、ADS-W-T009-96、AF1023)。1% TTC 染色液(上海毕得医药科技股份有限公司,批号:01G230149);4%多聚甲醛(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:01J230124);恒温箱(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司,型号:RM2016);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P)。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

采用大脑中动脉线栓法制作脑缺血模型<sup>[9]</sup>,将

大鼠麻醉后固定,利用常规眼科剪从颈部正中切开,暴露并游离颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎翼颞动脉,避免线栓插入翼颞动脉,颈外动脉残端用眼科剪剪开一“V”型小口,插入尼龙线栓直至大脑中动脉的起始处,遇轻微阻力后停止进线,线栓插入(17.5±0.5) mm,结扎消毒后逐层缝合皮下组织和皮肤。假手术组大鼠麻醉成功后,仰卧位固定,颈部正中切口,分离并暴露右侧颈总动脉及颈内、外动脉后缝合切口。术后参考 Zea-Longa 5 分法评分,得分 0 表示没有明显的神经症状,得分 1 表示无法完全伸展左前肢,得分 2 表示旋转到左侧,得分 3 表示走路时向左倾倒,而得分 4 则表示无法有意识地独自行走。得分越高则表明神经功能缺损越严重,其中分值 1~3 分(无法完全伸展左前肢、旋转到左侧、走路时向左倾倒)认为造模成功。

### 2.2 动物分组

造模前选择 6 只大鼠作为假手术组,造模成功后,取 24 只造模成功大鼠按照随机数字表法随机分为模型组、丁苯酞组、联合用药组、通窍定眩饮组,每组 6 只。

### 2.3 药物干预

造模后第 1 天开始,丁苯酞组予西药药液 10 mL/(kg·d);通窍定眩饮组予中药药液 10 mL/(kg·d);联合用药组予西药药液 10 mL/(kg·d)联合中药药液 10 mL/(kg·d);假手术组、模型组予等量蒸馏水 10 mL/(kg·d)。分别予相应药物干预 3 d 后取材。

### 2.4 观察指标

2.4.1 神经功能学评分 在第 3 天用单盲法对各组大鼠进行 Zea-Longa 5 分法评分。

2.4.2 TTC 染色法检测脑梗死体积 取脑后,切除大脑半球以外组织,用 TTC 染液染色。观察染色结果可见正常脑组织染成红色,缺血区呈灰白色。用 4%多聚甲醛进行固定,24 h 后采集图片,并用 ImagePro Plus 6.0 软件分析每片脑组织的梗死面积、脑片总面积。每只大鼠脑梗死体积比=(脑片梗死总面积/脑片总面积)×100%。

2.4.3 ELISA 法测定 ATP、乳酸、葡萄糖含量 按照试剂盒说明书进行标准品制备,称取约 0.1 g 脑组织加入研钵中,加入 1 mL 提取液,进行冰浴匀浆,

12 000 r/min(离心半径 10 cm),4 ℃离心 10 min,取上清液,置冰上待测,酶标仪预热 30 min 以上,调节波长至 450 nm,混匀,立即于 37 ℃条件下避光反应 30 min,于 450nm 处读取吸光值 A,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。读取 OD 值。绘制标准曲线,分别计算 ATP( $\mu\text{mol/g}$ )、乳酸( $\mu\text{mol/g}$ )、葡萄糖( $\text{mmol/L}$ )含量,通过与假手术组含量对比得出相对值。

**2.4.4 免疫组化法测定脑组织中糖酵解相关蛋白 GLUT1、HK2、LDHA 表达** 取包埋后的脑组织切片,过氧化氢浸泡,湿盒中进行一抗孵育,加二抗, PBS 冲洗, DAB 显色,显微镜下观察显色结果,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片,将切片置于光学显微镜下观察,采用 Scan Scope 数字病理扫描系统计数阳性细胞数,其中阳性细胞数为棕黄色颗粒或胞质染成黄色。用 ImagePro Plus 6.0 软件进行分析相关蛋白表达的平均光密度值。

**2.4.5 免疫组化法测定微血管密度** 使用 PANNORAMIC 全景切片扫描仪将组织切片上机,采用 CaseViewer 2.4 扫描软件选取组织的目的区域进行 200 倍成像,成像完成后使用 ImagePro Plus 6.0 分析软件,选取切片中大脑皮层缺血区的 3 个视野,对 CD31 标记的微血管断面数目进行计数,并计算 3 个视野血管数的平均值,即微血管密度值(个/视野)。

## 2.5 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9.0 统计作图软件进行分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,符合正态性分布,组间比较采用方差分析。若方差齐,则采用单因素方差分析, LSD 法进行两两比较;若方差不齐,则采用 Welch 检验, Dunnett's T3 法进行两两比较。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 通窍定眩饮对神经功能评分的影响

假手术组大鼠 Zea-Longa 评分结果为 0 分,神经功能表现正常。与假手术组比较,模型组、联合用药组及通窍定眩饮组大鼠的 Zea-Longa 评分差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,3 d 丁苯酞组、联合用药组和通窍定眩饮组的 Zea-Longa 评分较模型组下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与同组 0 d 相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 1。

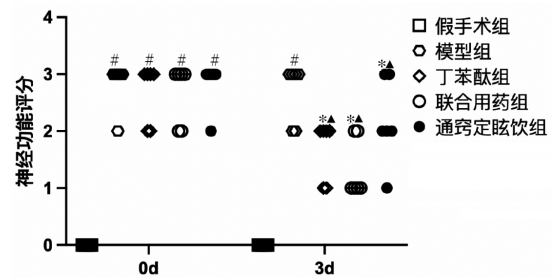


图 1 各组神经功能评分结果 ( $n=6$ )

注:与假手术组比较, # $P < 0.05$ ;与模型组相比, \* $P < 0.05$ ;与同组 0 d 比较, ▲ $P < 0.05$ 。

### 3.2 通窍定眩饮对大鼠脑梗死体积的影响

脑缺血 3 d, 梗死脑组织 TTC 染色结果显示,模型组大鼠具有明显的梗死组织,提示造模成功。与模型组比较,丁苯酞组、联合用药组和通窍定眩饮组脑梗死组织均显著减小 ( $P < 0.05$ );与联合用药组比较,丁苯酞组和通窍定眩饮组大鼠脑梗死体积比增加 ( $P < 0.05$ )。详见图 2、图 3。

### 3.3 通窍定眩饮对乳酸、ATP、葡萄糖的影响

与假手术组相比,模型组大鼠皮层乳酸含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), ATP 和葡萄糖含量显著降低 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,联合用药组和通窍定眩饮组大鼠皮

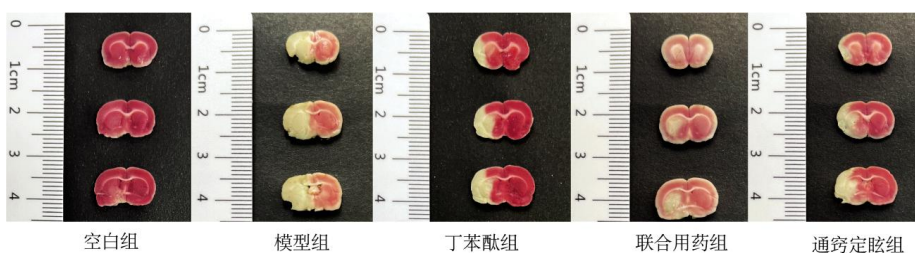


图 2 各组大鼠 TTC 染色 ( $n=3$ )

注:正常的脑组织呈现红色,而梗死区域则呈现为浅色或无色。

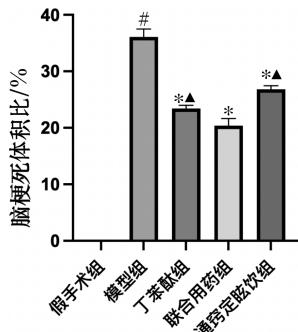


图 3 各组大鼠脑梗死体积比 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与联合用药组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

层乳酸含量、ATP 和葡萄糖含量增加 ( $P<0.05$ )。与联合用药组相比,丁苯酞组乳酸、ATP 和葡萄糖含量减少 ( $P<0.05$ );通窍定眩饮组乳酸、ATP 和葡萄糖含量无显著变化。详见图 4。

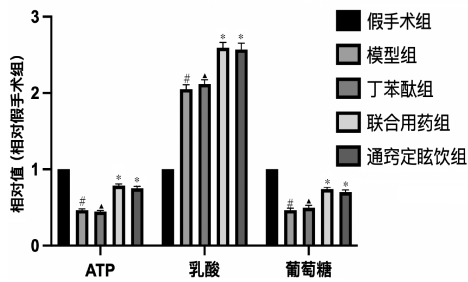


图 4 各组大鼠乳酸、ATP、葡萄糖相对含量表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与联合用药组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

### 3.4 通窍定眩饮对 GLUT1、LDHA、HK2 蛋白的影响

与假手术组比较,在药物干预第 3 天,模型组大鼠皮层 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,丁苯酞组 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白表达水平无显著变化 ( $P>0.05$ ),联合用药组与

通窍定眩饮组大鼠皮层 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ )。与联合用药组相比,丁苯酞组 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白的表达降低 ( $P<0.05$ );通窍定眩饮组 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白的表达无显著变化 ( $P<0.05$ )。详见图 5、图 6。

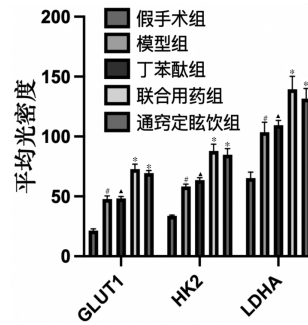


图 5 各组大鼠糖酵解相关蛋白平均光密度 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与联合用药组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

### 3.5 通窍定眩饮对微血管密度的影响

与假手术组比较,在药物干预后第 3 天,模型组大鼠皮层微血管密度增加 ( $P<0.05$ );与模型组比较,丁苯酞组、联合用药组和通窍定眩饮组皮层微血管密度显著增加 ( $P<0.05$ );与联合用药组比较,丁苯酞组和通窍定眩饮组皮层微血管密度降低 ( $P<0.05$ )。详见图 7、图 8。

## 4 讨论

缺血性脑卒中归属于中医学“缺血性中风”范畴,以“虚、火、风、痰、气、血”为总病机,王清任在《医林改错·半身不遂本源》中指出:“夫元气藏于气管之内,分布周身,左右各得其半……无气则不能功,不

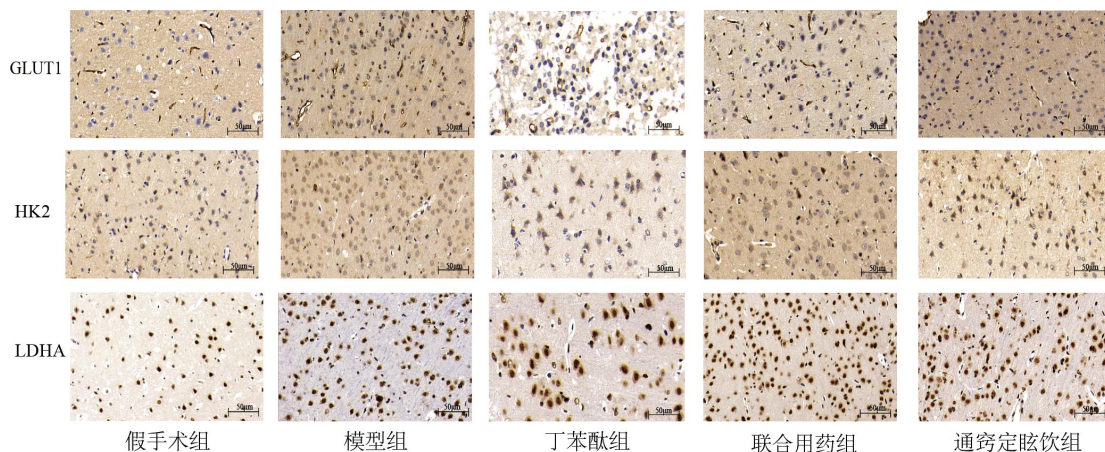


图 6 各组大鼠 GLUT1、HK2、LDHA 蛋白阳性表达(免疫组化染色,  $\times 400$ )

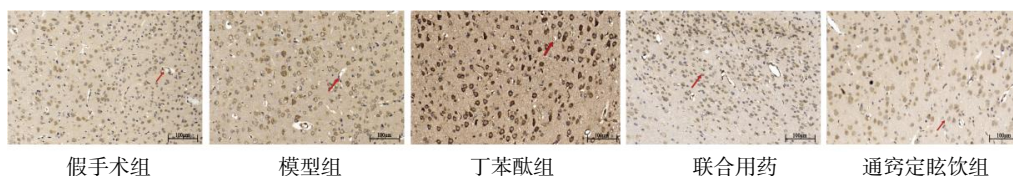


图7 各组大鼠微血管的表达(免疫组化染色,×200)

注:红色箭头所示为微血管。

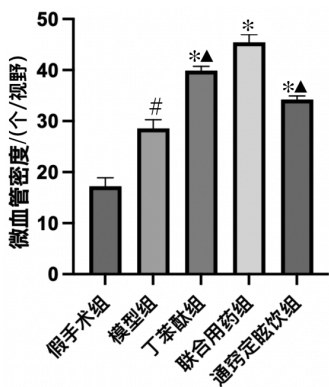


图8 各组大鼠微血管密度( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注:与假手术组比较, $^{\#}P<0.05$ ;与模型组比较, $^*P<0.05$ ;与联合用药组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

能动。”指出元气不足,不能濡养周身致半身不遂,“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,气为血帅,气虚血行不畅,久停则为瘀,提出因虚致瘀的观点,并以此创制补阳还五汤治疗气虚血瘀所致的IS。刘春华教授认为,本病以脾肾亏虚为内因,痰瘀为发病之宿根,将IS病机总结为“气精亏虚、痰瘀阻络”,并立“益气填精、活血化痰”为基本治法;方中以黄芪、熟地黄、制何首乌为君,黄芪健脾补气,令气旺血行,痰浊无以内生,血行瘀去则经络畅通,熟地黄、制首乌补益肝肾之阴精以平肝阳并充养脑髓;以葛根、红花、赤芍、地龙、桃仁为臣,葛根升发清阳以养脑窍,红花、当归补血活血,赤芍、桃仁活血化痰以通脑络;天麻、石菖蒲为佐,天麻性味甘平,善化痰平肝,石菖蒲性味辛温,可开窍豁痰、醒神益智;川芎为血中之气药,活血行气通络,善上行头目而为使。诸药合用,共奏益气填精、活血化痰之功,以达脑络畅通,神机复用之效。前期研究表明,通窍定眩饮在缺血性脑卒中后通过抑制凋亡、促进神经元的修复<sup>[8]</sup>和促进血管新生<sup>[12]</sup>等途径发挥抗脑缺血的作用。本研究结果发现,模型组大鼠神经功能评分、脑梗死体积比明显增加,经通窍定眩饮干预后,大鼠的神经功能评分、脑梗死体积比明显降低,大鼠脑组织

微血管密度有所增加,提示通窍定眩饮通过调节血管新生对模型大鼠发挥神经保护作用,该结果与前期研究<sup>[9]</sup>相吻合。

越来越多的证据表明,在脑缺血后,脑组织能够通过能量代谢的重编程和抗氧化防御来增强其代谢可塑性<sup>[13]</sup>。代谢重编程是生物体内适应不同的生理条件或环境压力,代谢途径和代谢活动重新调整或改变的过程。而糖酵解是维持细胞在低氧环境下生存的重要代谢途径,有助于细胞在缺氧环境中继续正常运作<sup>[14]</sup>。有研究表明,糖酵解是维持血管内皮细胞增殖、迁移及血管形成的关键调节剂<sup>[15]</sup>。在缺氧情况下,神经元及血管内皮细胞糖酵解加速,维持细胞的正常能量供应<sup>[16]</sup>。然而随着缺血缺氧的进一步加重,代谢重编程被过度激活,糖酵解加速并产生过量的乳酸,可能导致继发性脑损伤<sup>[17]</sup>。脑缺血后脑组织可能适应性反应增强脑组织中的葡萄糖摄取缓解脑缺血损伤,脑组织中 GLUT-1 的表达增加<sup>[18]</sup>。在葡萄糖酵解途径的起始阶段,在病理状态下 HK2 被诱导将细胞内摄取的葡萄糖磷酸化,并增加细胞的葡萄糖利用率<sup>[19]</sup>,最终 LDHA 催化丙酮酸转化为乳酸,并在此过程中释放能量,在短时间内为细胞提供ATP。本研究中,模型组大鼠糖酵解相关蛋白表达增加,乳酸增加,ATP、葡萄糖含量减少,提示在缺氧环境下,脑组织通过糖酵解途径供能;而经通窍定眩饮干预后,糖酵解相关蛋白表达进一步增加,ATP、乳酸、葡萄糖含量均升高,提示通窍定眩饮可能通过促进糖酵解进程,激发血管新生,从而减少脑梗死面积,在脑缺血前期,为脑细胞供氧供能提供保障。动物实验研究表明,丁苯酞可以通过多种分子机制促进血管新生和发挥神经保护作用<sup>[20-21]</sup>,本实验中,联合用药能有效增加微血管密度、减少脑梗死面积,为中西医结合治疗脑缺血提供有力证据。

综上所述,本研究初步证明通窍定眩饮可能通

过上调糖酵解相关蛋白和促进微血管增生的方式,减少模型大鼠的脑梗死面积和改善神经功能评分。这一研究为通窍定眩饮在脑缺血治疗中的应用提供了可靠的科学依据。由于研究时限,未能长时间观察糖酵解相关蛋白表达及代谢产物,未来,我们将进一步研究通窍定眩饮治疗脑梗死的量效关系及给药时长对糖酵解的影响,深入探究糖酵解对脑梗死发展的影响机制,为临床治疗提供新的研究方向。

## 参考文献

- [1] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139–e596.
- [2] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9): 666–682.
- [3] SHAROBEAM A, JONES B, WALTON-SONDA D, et al. Factors delaying intravenous thrombolytic therapy in acute ischaemic stroke: A systematic review of the literature[J]. *Journal of Neurology*, 2021, 268(8): 2723–2734.
- [4] PRADILLO J M, HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ M, FERNÁNDEZ-VALLE M E, et al. Influence of metabolic syndrome on post-stroke outcome, angiogenesis and vascular function in old rats determined by dynamic contrast enhanced MRI[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2021, 41(7): 1692–1706.
- [5] PENG H L, WANG X L, DU J B, et al. Metabolic reprogramming of vascular endothelial cells: Basic research and clinical applications[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 626047.
- [6] LIANG J, HAN R R, ZHOU B. Metabolic reprogramming: Strategy for ischemic stroke treatment by ischemic preconditioning[J]. *Biology*, 2021, 10(5): 424.
- [7] LEE D C, SOHN H A, PARK Z Y, et al. A lactate-induced response to hypoxia[J]. *Cell*, 2015, 161(3): 595–609.
- [8] 侯帆. 基于 BDNF/TrkB 途径探讨益气定眩饮抗脑缺血作用机制的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [9] 贺桂莲, 谢刘阳, 刘春华, 等. 益气定眩饮通过抑制凋亡和促进血管新生改善大鼠脑缺血损伤研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(8): 1188–1196.
- [10] 郑燕姣, 赵茜, 刘春华. 益气定眩饮对 PCIV 气虚血瘀证家兔后循环供血的影响[J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35(5): 137–139.
- [11] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 282.
- [12] 贺桂莲. 基于 EPO/EPOR 通道探讨益气定眩饮抗脑缺血大鼠作用机制的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [13] HUANG N, LI S N, XIE Y X, et al. Reprogramming an energetic AKT-PAK5 axis boosts axon energy supply and facilitates neuron survival and regeneration after injury and ischemia[J]. *Current Biology*, 2021, 31(14): 3098–3114.
- [14] SUN X R, YAO Z M, CHEN L, et al. Metabolic reprogramming regulates microglial polarization and its role in cerebral ischemia reperfusion[J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2023, 37(6): 1065–1078.
- [15] LUO J Y, SUN P B, ZHANG X, et al. Canagliflozin modulates hypoxia-induced metastasis, angiogenesis and glycolysis by decreasing HIF-1 $\alpha$  protein synthesis via AKT/mTOR pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (24): 13336.
- [16] GUO S C, COSKY E, LI F W, et al. An inhibitory and beneficial effect of chlorpromazine and promethazine (C+P) on hyperglycolysis through HIF-1 $\alpha$  regulation in ischemic stroke[J]. *Brain Research*, 2021, 1763: 147463.
- [17] WILLS M, DING Y C. Beyond reperfusion: Enhancing endogenous restorative functions after an ischemic stroke[J]. *Brain Circulation*, 2020, 6(4): 223–224.
- [18] ZHANG J Z, HAN J, ZOU J, et al. Gualou Guizhi Decoction improves glucose metabolism and alleviates microglia-associated inflammation after cerebral ischemia[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 2022: 9438250.
- [19] LI Y, LU B Z, SHENG L X, et al. Hexokinase 2-dependent hyperglycolysis driving microglial activation contributes to ischemic brain injury[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2018, 144(2): 186–200.
- [20] WANG Y P, SHEN Y F, LIU Z Y, et al. DI-NBP (dl-3-N-butylphthalide) treatment promotes neurological functional recovery accompanied by the upregulation of white matter integrity and HIF-1 $\alpha$ /VEGF/notch/Dll4 expression[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1595.
- [21] WANG J H, LI Y Y, YU H H, et al. DI-3-N-butylphthalide promotes angiogenesis in an optimized model of transient ischemic attack in C57BL/6 mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 751397.

(本文编辑 苏维)