

通络益智方通过 PERK 介导的内质网应激途径减轻大鼠血管性痴呆模型记忆缺陷的实验研究

薛大力^{1a}, 张晓哲², 王慧², 马冠峰^{1a}, 郭素鹏^{1b} (1. 邢台医学高等专科学校第二附属医院 a. 神经内科; b. 检验科, 河北邢台 054000; 2. 邢台医学高等专科学校, 河北邢台 054000)

摘要: 目的 观察自拟通络益智方对血管性痴呆 (VD) 大鼠记忆缺陷及内质网应激 (ERS) 的影响及其机制。方法 将 50 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为假手术 (Sham) 组、模型组、通络益智方 (TLYZF) 低剂量 (12.5 mg/kg/d) 组、TLYZF 中剂量 (25 mg/kg/d) 组 and TLYZF 高剂量 (50 mg/kg/d) 组, 每组 10 只。除 Sham 组外, 其他组大鼠采用改良双侧颈总动脉结扎法构建 VD 模型。TLYZF 干预 4 周后, 采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠学习记忆能力; 苏木素-伊红染色检测海马病理结构; 尼氏染色检测海马神经元损伤; 原位末端转移酶标记染色检测海马神经元凋亡; 酶联免疫吸附试验检测海马组织炎症因子含量; 蛋白免疫印迹法检测海马组织细胞凋亡及 ERS 相关蛋白的表达。结果 与 Sham 组比较, 模型组大鼠平均逃逸潜伏期延长, 穿越平台次数减少 ($t=14.059, 8.534$), 海马神经元排列紊乱、形态模糊、胞质空泡化、胞核固缩、炎症细胞浸润增多, 尼氏体数量减少 ($t=17.131$), 神经元凋亡率升高 ($t=17.701$), TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量增多 ($t=6.541, 6.957, 10.014$), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、裂解型半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3)、葡萄糖调控蛋白 78 (GRP78)、磷酸化内质网激酶 (p-PERK/PERK)、磷酸化真核细胞起始因子 2 α (p-eIF2 α) / eIF2 α , 激活转录因子 4 (ATF4) 和转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 表达增多 ($t=13.548 \sim 76.468$), B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 蛋白表达降低 ($t=39.691$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与模型组比较, TLYZF 治疗后大鼠平均逃逸潜伏期缩短 ($t=2.476, 7.266, 11.306$), 穿越平台次数增多 ($t=2.187, 4.471, 6.932$), 海马神经元相对规则、胞核清晰、炎症细胞浸润明显减少, 尼氏体含量增加 ($t=4.359, 9.477, 11.449$), 神经元凋亡率降低 ($t=3.631, 6.145, 7.580$), TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量减少 ($t=2.382 \sim 8.293$), Bax ($t=4.696, 16.250, 20.250$), cleaved caspase-3 ($t=15.205, 27.000, 26.833$), GRP78 ($t=5.918, 13.139, 13.741$), p-PERK/PERK ($t=13.416, 14.230, 17.889$), p-eIF2 α /eIF2 α ($t=20.152, 39.346, 50.750$), ATF4 ($t=12.093, 24.395, 22.946$) 和 CHOP 蛋白 ($t=21.592, 19.207, 22.136$) 表达降低, Bcl-2 蛋白表达增多 ($t=7.474, 20.761, 35.350$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$), 且高剂量组治疗效果最佳。结论 自拟通络益智方可减轻 VD 大鼠海马神经元凋亡和炎症损伤, 其作用机制可能与抑制 PERK 介导的 ERS 有关。

关键词: 血管性痴呆; 通络益智方; 内质网应激

中图分类号: R-332; 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2025) 01-0017-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.01.04

Experimental Study of Tongluo Yizhi Formula Attenuating Memory Deficits in Rat Model of Vascular Dementia through PERK-mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathway

XUE Dali^{1a}, ZHANG Xiaozhe², WANG Hui², MA Guanfeng^{1a}, GUO Supeng^{1b} (1a. Department of Neurology; 1b. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Hebei Xingtai 054000, China; 2. Xingtai Medical College, Hebei Xingtai 054000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of self-formulated Tongluo Yizhi formula on memory deficits and endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats with vascular dementia (VD) and its mechanism. **Methods** Fifty SPF-grade Wistar rats were randomly divided into sham surgery group, model group, TLYZF low-dose (12.5 mg/kg/d) group, TLYZF medium dose (25 mg/kg/d) group and TLYZF high-dose (50 mg/kg/d) group, with 10 rats in each group. Except for the Sham group, other rats were subjected to modified bilateral carotid artery ligation to construct VD models. After 4 weeks of TLYZF intervention, Morris water maze experiment was used to evaluate the learning and memory abilities of rats. Hematoxylin eosin staining was used to detect the pathological structure of the hippocampus. Nissl staining was used to detect hippocampal neuronal damage. In

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划 (20242376)。

作者简介: 薛大力 (1981-), 男, 硕士, 副教授/副主任医师, 研究方向: 神经内科诊疗, E-mail: xuedaliluck5733@163.com。

通讯作者: 张晓哲 (1980-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 中医药研究, E-mail: zhangxiaozhe123@126.com。

situ end transfer enzyme labeling staining was used to detect hippocampal neuronal apoptosis. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the content of inflammatory factors in hippocampal tissue. Protein immunoblotting was used to detect apoptosis of hippocampal tissue cells and the expression of ERS related proteins. **Results** Compared with the Sham group, the average escape latency of the model group was prolonged ($t=14.059$), the number of crossing the platform was reduced ($t=8.534$), the hippocampal neurons were disorderly arranged, the morphology was fuzzy, the cytoplasmic vacuolization, the nuclear pyknosis, the inflammatory cell infiltration increased, the number of Nissl bodies decreased ($t=17.131$), and the neuronal apoptosis rate increased ($t=17.701$). The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 increased ($t=6.541, 6.957, 10.014$), the expression of Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase-3, glucose-regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated endoplasmic reticulum kinase (p-PERK)/PERK, phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α (p-eIF2 α)/eIF2 α , activating transcription factor 4 (ATF4) and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) increased ($t=13.548 \sim 76.468$), while the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein was decreased ($t=39.691$), and the difference were statistically significant (all $P < 0.05$), respectively. Compared with the model group, the average escape latency of TLYZF-treated rats was shortened ($t=2.476, 7.266, 11.306$), the number of platform crossing was increased ($t=2.187, 4.471, 6.932$), the hippocampal neurons were relatively regular, the nucleus was clear, the inflammatory cell infiltration was significantly reduced, the content of Nissl bodies was increased ($t=4.359, 9.477, 11.449$), the apoptosis rate of neurons was decreased ($t=3.631, 6.145, 7.580$), the contents of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were decreased ($t=2.382 \sim 8.293$), the expression of Bax ($t=4.696, 16.250, 20.250$), cleaved caspase-3 ($t=15.205, 27.000, 26.833$), GRP78 ($t=5.918, 13.139, 13.741$), p-PERK/PERK ($t=13.416, 14.230, 17.889$), p-eIF2 α /eIF2 α ($t=20.152, 39.346, 50.750$), ATF4 ($t=12.093, 24.395, 22.946$) and CHOP protein ($t=21.592, 19.207, 22.136$) decreased, while Bcl-2 protein increased ($t=7.474, 20.761, 35.350$), the differences were statistically significant (all $P < 0.05$), respectively, and the high-dose group had the best therapeutic effect. **Conclusion** Self-formulated Tongluo Yizhi formula could reduce the apoptosis and inflammatory injury of hippocampal neurons in VD rats, and its mechanism may be related to inhibiting ERS mediated by PERK.

Keywords: vascular dementia; Tongluo Yizhi formula; endoplasmic reticulum stress

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由各种脑血管疾病或长期慢性脑低灌注引起的神经功能异常综合征^[1]。研究发现, VD 发病机制与内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 密切相关, ERS 通过诱导神经元过度凋亡, 引发认知功能障碍^[2-3]。因此, 抑制 ERS 介导的神经元凋亡可能是防治 VD 的重要途径。中医将 VD 归属于“呆病”“健忘”等范畴, 病症在脑^[4]。清代叶天士所著《临证医案指南》指出“初为气结在经, 久则血伤入络, 脉络失充则元神失养”, 强调了痴呆“络脉阻滞”特点。络脉受损, 则脑窍失养进一步加重, 久之脑髓失容, 神机失用最终发展为痴呆。基于叶天士“久病入络”理论, 本课题组前期以“通络”为原则, 采用扶正、虫蚁、辛香、辛温通络药, 创新自拟通络益智方, 施于临床疗效较好^[5]。但该方是否通过调控 VD 患者神经元 ERS 从而发挥治疗作用, 目前尚不清楚。本研究拟采用改良双侧颈总动脉结扎法制备 VD 模型大鼠, 通过给予不同剂量通络益智方干预, 从 ERS 角度探讨通络益智方对 VD 大鼠神经元的保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源 SPF 级雄性健康 Wistar 大鼠 50 只, 8 ~ 10 周龄, 体重 220 ± 20 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2021-0004。

1.2 仪器与试剂 通络益智方免煎细颗粒剂, 由上海

世远生物工程公司制备。苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (C0105S), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (PT516), 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β (PI303) 和 IL-6 (PI328) 检测 ELISA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Nissl 染色试剂盒 (SY 2432, 北京伊塔生物科技有限公司); 原位末端转移酶标记 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 染色凋亡检测试剂盒 (SNM535, 北京佰奥莱博科技有限公司); 葡萄糖调控蛋白 78 (glucose regulatory protein 78, GRP78) (3418S), 蛋白质激酶 RNA 样端激活因子 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) (5063S), 磷酸化 (phosphorylated, p)-PERK (5071S), CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein -homologous protein, CHOP) (4495S), 裂解型半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3, cleaved caspase-3) (6408S), β -肌动蛋白 (β -actin, 35127S) 抗体 (美国 CST 公司); 真核细胞起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) (ab169528), p-eIF2 α (ab131505), 激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) (ab270980), B 淋巴细胞瘤 -2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2) (ab182858), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) (ab32503) 抗体 (美国 Abcam 公司)。Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Chemi Doc XRS 化学发光凝

胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司); NIB 910 光学显微镜(深圳博士达器械设备有限公司); HBS-ScanX 酶标仪(南京德铁生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 VD 模型构建及分组: 所有小鼠禁食禁水 12h, 根据相关文献^[6], 采用改良双侧颈总动脉结扎法构建 VD 模型。具体方法: 使用 3g/dl 异氟烷麻醉大鼠, 仰卧位固定。颈部消毒后沿前正中中线行约 1.5cm 切口, 钝性分离双侧颈总动脉并用 5-0 手术缝线结扎, 逐层缝合切口, 碘伏消毒防止感染。

按照随机数字表法将实验大鼠分为 5 组, 每组 10 只: ① Sham 组: 与 VD 相同手术过程, 但不进行双侧颈总动脉结扎; ② 模型组; ③ 通络益智方(TLYZF) 低剂量组; ④ TLYZF 中剂量组; ⑤ TLYZF 高剂量组。TLYZF 低、中和高剂量组分别于造模完成后 6h, 灌胃剂量为 12.5, 25 和 50 mg/kg 的通络益智方(参考人临床计量, 低、中和高剂量分别相当于临床用量的 1/2, 1 和 2 倍)^[5], 每日 1 次, 疗程 4 周。Sham 组和模型组仅给予等量生理盐水灌胃。

1.3.2 Morris 水迷宫行为学检测: 实验装置由一个直径 200cm, 深 60cm, 内壁黑色的圆形水池组成, 其中水温保持在 23 ~ 25℃, 室温保持在 24 ~ 26℃。实验分两部分进行: ① 定位航行试验: 将水池分成四个相等的象限, 在第一象限的中心点水面下 2 ~ 3cm 处放置一个直径 20cm 的平台。将大鼠放入水中, 记录大鼠找到平台并在其上停留超过 3s 所花费的时间, 记为逃逸潜伏期。如果大鼠未能找到平台, 则将潜伏期记录为 90s。② 空间探索实验: 在定位航行试验结束后 24h 进行空间探索实验, 拿掉平台, 将大鼠放入水中, 观察大鼠在 90s 测试期间穿过或停留目标象限的时间。

1.3.3 标本采集及处理: 行为学测试结束后, 腹膜下注射 1g/dl 戊巴比妥钠(50mg/kg) 深度麻醉大鼠并断头, 冰上钝性分离海马组织。一部分海马组织放入 4g/dl 多聚甲醛中固定 48h, 梯度乙醇和二甲苯脱水透明后行常规石蜡包埋, 3μm 厚度切片备用。其余组织用高速匀浆器在预冷的 Tris 缓冲液(150 mmol/L, pH7.4) 中匀浆, 4℃ 下 3 000 r/min 离心 5min, 取上清液储存在 -80℃ 备用。

1.3.4 HE 染色检测海马病理结构: 海马组织切片脱蜡复水后, 苏木精染色 10 min, 5g/dl 乙酸分化液 30s, 伊红染色 1 min, 梯度乙醇(75, 85, 95 和 100g/dl) 脱水各 10s, 二甲苯透明 1min, 通风橱自然晾干后中性树脂封片, 光学显微镜下随机选择 5

个视野观察并拍照。

1.3.5 Nissl 染色检测海马神经元损伤: 将海马组织切片脱蜡复水后, 浸入 1g/dl 甲苯胺蓝中染色 15min, 蒸馏水清洗。95 g/dl 乙醇分化, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明后在光学显微镜下观察拍照, 利用 Image J 分析神经元形态变化并对 Nissl 阳性细胞计数^[7]。

1.3.6 TUNEL 染色检测海马神经元凋亡: 切片用 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 滴加蛋白酶 K(20mg/L) 透化 30min。再次清洗后, 滴加 TUNEL 反应液孵育 60min, 过氧化氢冲洗淬灭酶活性, 后联合抗生物蛋白过氧化氢酶和二氨基联苯胺覆盖, 最后滴加显色底物 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐/硝基四氮唑蓝 10 min, 终止反应, 脱水, 透明, 封片, 凋亡细胞为棕黄色。光学显微镜下随机选择 5 个视野拍照记录并计算 TUNEL 阳性细胞率。

1.3.7 ELISA 检测海马组织炎症因子含量: 按照相应 ELISA 试剂盒使用说明书分别检测 TNF-α, IL-1β 和 IL-6 含量。

1.3.8 蛋白免疫印迹法检测海马组织凋亡和 ERS 相关蛋白表达: 放射免疫沉淀法(RIPA) 裂解缓冲液提取海马组织总蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白浓度。将 50μg 蛋白通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 上样缓冲液行电泳分离。湿转至聚偏二氟乙烯膜上。室温下, 将膜放入 5g/dl 脱脂牛奶中封闭 1h, 4℃ 下用抗 Bcl-1, Bax, cleaved caspase-3, GRP78, p-PERK, PERK, p-eIF2α, eIF2α, ATF4, CHOP 和 β-actin 一抗孵育过夜。次日, 将膜放入含辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 的二抗稀释液中孵育 1h。使用电化学发光法(ECL) 显影, Image J 软件分析目的蛋白灰度值, 所有目的蛋白以 β-actin 作为内参。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力比较 见表 1。Morris 水迷宫检测发现, 模型组大鼠平均逃逸潜伏期较 Sham 组延长($t=14.059$), 穿越平台次数减少($t=8.534$), 差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。与模型组比较, 通络益智方低、中和高剂量组大鼠的平均逃逸潜伏期逐渐缩短($t=2.476, 7.266, 11.306$), 穿越平台次数逐渐增加($t=2.187, 4.471, 6.932$), 呈浓度依赖性, 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。

表 1 各组大鼠逃逸潜伏期和穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

项目	Sham 组	模型组	TLYZF			F	P
			低剂量组	中剂量组	高剂量组		
逃逸潜伏期(s)	24.29 ± 3.47	57.52 ± 6.62	50.76 ± 5.54	39.23 ± 4.42	28.84 ± 4.53	58.843	<0.001
穿越平台次数(次)	6.83 ± 1.56	1.74 ± 1.06	2.65 ± 0.78	3.82 ± 1.02	4.98 ± 1.03	14.519	<0.001

2.2 各组大鼠海马病理结构比较 见图 1。Sham 组大

鼠海马组织轮廓清晰, 神经元排列紧密整齐, 细胞

核完整。模型组大鼠海马组织形态模糊，神经元排列紊乱，出现胞质空泡化和胞核固缩，炎性细胞浸

润增多。TLYZF低、中和高剂量组大鼠海马神经元相对规则，细胞核清晰，炎性细胞浸润程度逐渐降低。

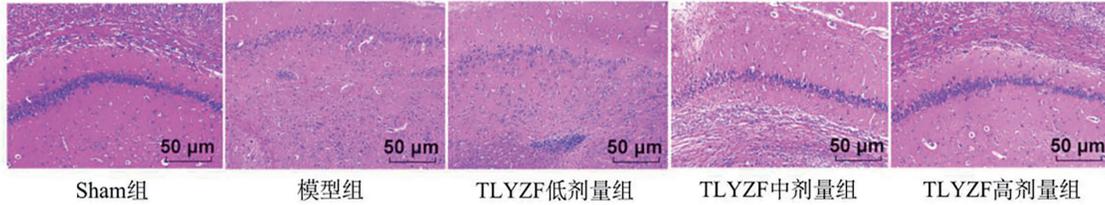


图1 HE染色检测大鼠海马病理结构(×400)

2.3 各组大鼠海马神经元损伤程度比较 见图2。Sham组大鼠海马神经元形态无异常，尼氏体丰富。与Sham组相比，模型组大鼠表现出以海马组织萎缩和固缩为标志的严重神经元损伤，尼氏体数量减少(56.82±6.82个/视野 vs 165.98±12.51个/HP)，差异具有统计学

意义($t=17.131, P<0.001$)。与Sham组相比，TLYZF低、中和高剂量组大鼠海马神经元损伤减轻，尼氏体数量(77.82±8.34个/HP, 128.32±15.54个/HP, 146.82±16.20个/HP)逐渐增加，差异具有统计学意义($t=4.359, 9.477, 11.449$, 均 $P<0.01$)，呈浓度依赖性。

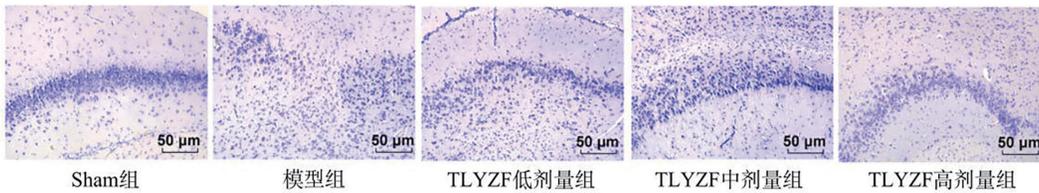


图2 尼氏染色检测大鼠海马神经元损伤(×400)

2.4 各组大鼠海马神经元凋亡率比较 与Sham组相比，模型组大鼠海马神经元凋亡率明显升高(46.72%±5.48% vs 3.24%±0.37%)，差异具有统计学意义($t=17.701, P<0.001$)。与模型组比较，TLYZF低、中和高剂量组大鼠海马神经元凋亡率(36.72%±2.81%, 28.91%±3.46%, 25.36%±3.11%)逐渐降低，差异具有统计学意义($t=3.631, 6.145, 7.580$, 均 $P<0.01$)，呈浓度依赖性。

表2。Western blot结果显示，与Sham组相比，模型组大鼠海马组织Bax和cleaved caspase-3蛋白表达增多($t=18.783, 32.119$)，Bcl-2蛋白表达降低($t=39.691$)，差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。与模型组比较，通络益智方低、中和高剂量组大鼠海马组织Bax($t=4.696, 16.750, 20.250$)和cleaved caspase-3($t=15.205, 27.000, 26.833$)蛋白表达逐渐降低，Bcl-2蛋白表达逐渐增多($t=7.474, 20.761, 35.350$)，差异有统计学意义(均 $P<0.001$)，具有浓度依赖性。

2.5 各组大鼠海马组织细胞凋亡相关蛋白表达比较 见

表2 各组大鼠海马组织凋亡相关蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

项目	Sham组	模型组	TLYZF			F	P
			低剂量组	中剂量组	高剂量组		
Bcl-2蛋白	1.22±0.03	0.58±0.02	0.76±0.05	1.08±0.05	1.15±0.03	328.863	<0.001
Bax蛋白	0.58±0.06	1.42±0.08	1.21±0.06	0.78±0.03	0.61±0.04	207.785	<0.001
cleaved caspase-3蛋白	0.55±0.03	1.27±0.04	0.93±0.03	0.73±0.02	0.67±0.03	392.402	<0.001

2.6 各组大鼠海马组织炎症因子水平比较 见表3。与Sham组相比，模型组大鼠海马组织TNF- α ，IL-1 β 和IL-6含量增多($t=6.541, 6.957$ 和 10.014 ，均 $P<0.01$)。与模型组比较，通络益智方低、中和

高剂量组大鼠海马组织TNF- α ($t=2.842, 3.898, 5.631$), IL-1 β ($t=2.536, 3.983, 6.172$)和IL-6($t=2.382, 4.677, 8.293$)含量逐渐降低，差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)，具有浓度依赖性。

表3 各组大鼠海马组织炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

项目	Sham组	模型组	TLYZF			F	P
			低剂量组	中剂量组	高剂量组		
TNF- α (ng/ml)	1.35±0.17	2.41±0.32	1.98±0.11	1.77±0.18	1.52±0.15	12.736	<0.001
IL-1 β (pg/ml)	31.23±5.34	53.82±4.92	44.72±6.34	40.23±5.83	34.24±5.11	14.723	<0.001
IL-6 (pg/ml)	6.87±0.83	23.11±3.53	18.23±2.92	14.11±2.46	7.82±2.13	66.973	<0.001

2.7 各组大鼠海马组织GRP78和PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP通路相关蛋白表达 见表4。与Sham组相

比，模型组大鼠海马组织中GRP78，p-PERK/PERK，p-eIF2 α /eIF2 α ，ATF4和CHOP蛋白表达增多，差异

具有统计学意义 ($t=13.548, 40.500, 76.468, 27.000, 30.312$, 均 $P<0.001$)。与模型组比较, 通络益智方低、中和高剂量组大鼠海马组织 GRP78 ($t=5.918, 13.139, 13.741$), p-PERK/PERK ($t=13.416, 14.230,$

17.889), p-eIF2 α /eIF2 α ($t=20.152, 39.346, 50.750$), ATF4 ($t=12.093, 24.395, 22.946$) 和 CHOP ($t=21.592, 19.207, 22.136$) 蛋白表达逐渐降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$), 具有浓度依赖性。

表4 各组大鼠海马组织 GRP78 和 PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP 通路相关蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

项目	Sham组	模型组	TLYZF			F	P
			低剂量组	中剂量组	高剂量组		
GRP78	0.53 \pm 0.07	1.32 \pm 0.11	0.96 \pm 0.08	0.61 \pm 0.05	0.55 \pm 0.06	157.426	<0.001
p-PERK/PERK	0.13 \pm 0.02	0.94 \pm 0.04	0.64 \pm 0.03	0.58 \pm 0.04	0.54 \pm 0.03	265.674	<0.001
p-eIF2 α /eIF2 α	0.82 \pm 0.02	3.64 \pm 0.08	2.87 \pm 0.03	1.98 \pm 0.05	1.61 \pm 0.04	328.371	<0.001
ATF4	0.51 \pm 0.03	1.32 \pm 0.06	0.93 \pm 0.04	0.63 \pm 0.02	0.58 \pm 0.04	278.934	<0.001
CHOP	0.61 \pm 0.02	1.34 \pm 0.05	0.82 \pm 0.02	0.79 \pm 0.04	0.64 \pm 0.05	232.563	<0.001

3 讨论

VD 好发于老年人, 且多继发于各种脑血管疾病或长期慢性脑低灌注, 随着全球人口老龄化, 其发病率逐渐升高。目前, 西医治疗以抗血小板聚集、营养神经、扩张血管、改善脑供血等对症治疗为主, 但其疗效有限且会产生一定不良反应。而中医药因其多组分多靶点协同治疗效应, 对 VD 治疗效果较好, 具有独特优势^[2-3]。

中医络病理论认为, VD 多为久病入络, 患者在出现肾精亏虚和痰瘀内阻后, 虚痰瘀毒相互作用, 导致脉络空虚、阻滞和损伤, 是典型的脑络病症^[4]。清代叶天士《临证指南医案》中指出^[8]: “凡久恙必入络” “初为气结在经。久则血伤入络” “凡寒、暑、劳形、阳气受损、嗔怒动肝、七情郁结等皆能致气血阻滞而伤人经络”等。即所谓“络病”, 无论内因外因, 影响到络脉气血正常运行, 皆可致使络脉瘀阻或亏虚。自拟通络益智方方中人参、黄芪等具有益气通络之效^[9]; 水蛭、蜈蚣、地龙等药物能够搜剔血络, 温通气血^[10]; 添加益智仁、石菖蒲等益智醒脑之品, 再配以吴茱萸、川穹、丹参等温香通络药, 使本方具有益气活血, 搜风通络, 益智健脑的作用。本团队前期的临床小样本研究发现^[5], 通络益智方对 VD 患者早期干预疗效显著, 但其作用机制尚未可知。

改良双侧颈总动脉结扎法已被广泛用于研究慢性缺血导致神经损伤的机制, 可在大鼠引发与 VD 患者类似的病理改变, 如脑白质病变、轴突和髓鞘受损、皮质和海马 CA1 区神经元损伤、神经胶质细胞活化、氧化应激反应、血脑屏障破坏和金属蛋白酶基质激活等^[11]。本研究构建的 VD 模型大鼠表现出明显的认知障碍和海马组织及神经元损伤, 证实模型构建成功。此外, 基于 Mirros 水迷宫实验, 经通络益智方治疗四周后的 VD 大鼠的认知功能障碍和海马神经元病变得显著改善, 高剂量通络益智方显示出最优效应。这些结果表明, 自拟通络益智方对 VD 大鼠海马神经元损伤具有保护作用, 可改善学习和记忆能力, 发挥与前期临床研究类似的治疗效果^[5]。

内质网对蛋白折叠等生理过程具有重要调控作用, 多种条件如缺氧、应激、感染、钙稳态紊乱、

热休克、紫外线辐射和机械损伤等均可能导致内质网中未折叠/错误折叠蛋白质的积累, 并导致内质网自我修复机制 ERS 的激活, 以试图恢复受干扰的稳态^[12]。VD 的血管病理改变可导致慢性血流持续低灌注, 脑内神经元缺氧和能量代谢受阻, 引起蛋白质折叠功能损伤, 诱发 ERS, 这可能是 VD 发生发展的关键机制。研究显示, 缺氧细胞抵抗 ERS 的保护机制之一是进化上保守的未折叠蛋白质反应 (unfolded protein response, UPR)。UPR 首先试图恢复蛋白质稳态, 若错误折叠蛋白累积过多超过 UPR 修复能力, 则会诱导内质网凋亡信号分子 CHOP 转录启动, 直接激活 caspase-3, 调节 Bcl-2 家族蛋白的表达, 触发细胞凋亡以应对严重的 ERS^[13]。此外, CHOP 表达增加后, 能够激活 NF- κ B, 导致炎症因子分泌, 进一步诱导细胞死亡和炎症反应^[14]。因此, VD 患者神经元 ERS 诱导的细胞凋亡和炎症反应可能与患者认知功能障碍具有密切联系。陈晨等^[2]发现, 大蒜素能够通过抑制 ERS 减轻 VD 大鼠海马神经元凋亡和炎症损伤。杨圆圆等^[15]研究显示, 丹参及其活性成分可有效降低 VD 大鼠海马神经元凋亡并抑制炎症因子 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的生成。与这些研究结果类似, 本团队自拟通络益智方治疗 VD 大鼠显示出显著的保护作用, 能够明显抑制 CHOP, Bcl-2/Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达, 神经元凋亡以及炎症因子分泌, 提示通络益智方可能通过抑制 ERS 对 VD 大鼠海马组织发挥保护作用。

PERK 是具有激酶性质的 I 型跨膜蛋白, 当未折叠/错误折叠的蛋白聚集在内质网腔内时, 其 N 端会发生寡聚化, 并在激酶结构域发生自磷酸化, 导致 PERK 激活^[16]。磷酸化的 PERK 将募集并激活 eIF2 α , 抑制蛋白质翻译, 从而减少未折叠蛋白质在内质网腔中的积累。虽然磷酸化的 eIF2 α 能在一定程度抑制部分蛋白翻译, 减轻内质网的负担, 但却能特异性促进 ATF4 表达, 直接激活 CHOP 启动凋亡。这些组分共同形成 PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP 通路^[17]。GRP78, 位于 ER 的管腔中, 作为 UPR 的主要传感器, 是 ERS 的标志蛋白^[18]。在正常稳态情况下, GRP78 与 PERK, IRE1 α 和 ATF6

结合,抑制它们的活化。当未折叠/错误折叠的蛋白质在内质网腔中达到过量水平时,GRP78由于对未折叠/错误折叠蛋白的亲合力增加,与PERK,IRE1 α 和ATF6解离启动UPR。因此设法调节GRP78表达和PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP通路活性以抑制神经元ERS可能是治疗VD的潜在有效策略。袁茵等^[19]发现,何首乌提取物二苯乙烯苷可通过调控GRP78表达和PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP通路激活,抑制神经元凋亡,改善VD大鼠学习记忆障碍。LIU等^[3]研究显示,游泳运动可调控PERK/ATF4/CHOP通路,抑制VD大鼠海马ERS相关蛋白表达,改善VD大鼠认知功能。与这些研究结果类似,本研究亦发现,通络益智方干预后,VD大鼠海马组织中GRP78, p-PERK, p-eIF2 α , ATF4和CHOP蛋白表达降低,表明通络益智方对VD大鼠ERS相关蛋白具有一定的调控作用。

综上所述,自拟通络益智方能够减轻VD大鼠海马神经元凋亡和炎症损伤,改善记忆缺陷,其作用机制可能与抑制PERK介导的ERS有关。然而本研究仍存在一些不足之处,未设置PERK抑制或激活组,并与通络益智方联合应用,以验证通络益智方对ERS的特异性作用,本课题组接下来拟对本研究中的不足之处进行深入探讨。

参考文献:

- [1] HOSOKI S, HANSRA G K, JAYASENA T, et al. Molecular biomarkers for vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2023, 19(12): 737-753.
- [2] 陈晨, 孙志涛, 张洪峰. 大蒜素通过抑制内质网应激减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤[J]. *中南药学*, 2023, 21(7): 1827-1832.
CHEN Chen, SUN Zhitao, ZHANG Hongfeng. A llicin reduce the damage of hippocampal neurons in rats with vascular dementia by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Central South Pharmacy*, 2023, 21(7): 1827-1832.
- [3] LIU Fang, LI Mengxing, WANG Yu, et al. Mechanism of swimming exercise intervention on rats with vascular dementia based on PERK/ATF4/CHOP pathway[J]. *Rehabilitation Medicine*, 2023, 33(4): 333-340.
- [4] 韦羨萍. 中医治疗血管性痴呆的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(22): 35-38.
WEI Xian-ping. Research progress of vascular dementia treated by traditional Chinese medicine[J]. *China Medicine and Pharmacy*, 2023, 13(22): 35-38.
- [5] 薛大力, 张晓哲. 自拟通络益智方治疗血管性痴呆的效果[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(18): 4622-4624.
XUE Dali, ZHANG Xiaozhe. Effect of self-proposed Tongluo Yi Zhi formula in the treatment of vascular dementia[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2017, 37(18): 4622-4624.
- [6] WU Sha, HUANG Rong, ZHANG Ruiqin, et al. Gastrodin and gastrodigenin improve energy metabolism disorders and mitochondrial dysfunction to antagonize vascular dementia[J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2598.
- [7] YUAN Fangyu, JU Cheng, ZANG Caixia, et al. Gardenia jasminoides extract GJ-4 alleviates memory deficiency of vascular dementia in rats through PERK-mediated endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2023, 51(1): 53-72.
- [8] 宋佳, 卫东锋, 陈仁波, 等. 基于数据挖掘分析叶天士《临证指南医案》治疗脑系疾病的用药规律[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(7): 17-21.
SONG Jia, WEI Dongfeng, CHEN Renbo, et al. Data mining analysis of the medication pattern in the treatment of cerebral diseases in Ye Tianshi's *clinical guide of medical records* [J]. *China Medical Herald*, 2023, 20(7): 17-21.
- [9] 王婉莹, 姜思亮, 柴军红, 等. 黄芪和人参配伍的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中医学报*, 2023, 51(8): 104-109.
WANG Wanying, JIANG Siliang, CHAI Junhong, et al. Research progress on pharmacological action and clinical application of combination of radix astragalus and radix ginseng [J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2023, 51(8): 104-109.
- [10] 曹亚丽, 李智杰. 基于络病理论运用虫类药治疗中风后遗症[J]. *亚太传统医药*, 2024, 20(1): 114-117.
CAO Yali, LI Zhijie. Treatment of sequelae of apoplexy with insect medicine based on collateral disease theory[J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2024, 20(1): 114-117.
- [11] 杨丹, 杨丽君, 唐鲜娥, 等. 延龄草总皂苷对2-VO模型大鼠认知功能及神经血管单元的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(3): 316-322
YANG Dan, YANG Lijun, TANG Xian'e, et al. Effects of total saponins of *Trillium tschonoskii* Maxim on cognitive function and neurovascular unit in 2-VO model rats[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2024, 49(3): 316-322.
- [12] CHEN Xingyi, SHI Chaoran, HE Meihui, et al. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 352.
- [13] SPENCER B G, FINNIE J W. The role of endoplasmic reticulum stress in cell survival and death [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2020, 181: 86-91.
- [14] 陈宇, 郑彦楷, 李大彪, 等. 植物多糖对内质网应激介导的动物细胞凋亡、炎症和氧化损伤的影响及其作用机制[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(12): 7641-7647.
CHEN Yu, ZHENG Yankai, LI Dabiao, et al. Effects of plant polysaccharides on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, inflammation and oxidative damage of animal cells and their mechanisms [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(12): 7641-7647.
- [15] 杨圆圆, 倪金霞, 王迪, 等. 丹参及其活性成分治疗血管性痴呆作用机制的研究进展[J]. *环球中医药*, 2023, 16(7): 1475-1481.
YANG Yuanyuan, NI Jinxia, WANG Di, et al. Research progress on the mechanism of action of *Salvia miltiorrhiza* and its active ingredients in the treatment of vascular dementia[J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2023, 16(7): 1475-1481.
- [16] 李智军, 姜海燕, 边超, 等. LINC01503调控ERK磷酸化促进食管鳞状细胞癌放疗抵抗的机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(2): 25-31.
LI Zhijun, JIANG Haiyan, BIAN Chao, et al. Mechanism of LINC01503 promotes radiotherapy resistance to esophageal squamous cell carcinoma by

- regulating ERK phosphate acidization[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(2): 25-31.
- [17] AZIZI M, SALEHI-MAZANDARANI S, NIKPOUR P, et al. The role of unfolded protein response-associated miRNAs in immunogenic cell death amplification: a literature review and bioinformatics analysis [J]. *Life Sciences*, 2023, 314: 121341.
- [18] RANA S V S. Endoplasmic reticulum stress induced by toxic elements: a review of recent developments[J]. *Biological Trace Element Research*, 2020, 196(1): 10-19.
- (上接第16页)
- LUO Wei, BIAN Ying, HE Qing, et al. Research of a case of abnormal glycated hemoglobin A1c value caused by rare variant hemoglobin J-Lome[J]. *Chinese Journal of Diabetes Mellitus*, 2019, 11(7): 489-492.
- [6] CHENG Xinqi, LI Ming, WU Jie, et al. HbG-Coushatta: an unexpected discovery during HbA1c measurement [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 444: 163-166.
- [7] 秦良谊. 我国异常血红蛋白发生率、分布及遗传多态性[J]. *医学研究杂志*, 2003, 32(12): 12-14.
- QIN Liangyi. The incidence, distribution and genetic polymorphism of the abnormal hemoglobin in China [J]. *Bulletin of Medical Research*, 2003, 32(12): 12-14.
- [8] 李厚钧, 赵贤宁, 李力, 等. 我国“丝绸之路”地区异常血红蛋白的分布[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75(5): 280-283.
- LI Houjun, ZHAO Xianning, LI Li, et al. The distribution of abnormal hemoglobins in the silkroad region of China [J]. *National Medical Journal of China*, 1995, 75(5): 280-283.
- [9] LI Youqiong, HUANG Huiping, CHEN Zhizhong, et al. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for detection and quantification of hemoglobin New York[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2016, 54(1): 91-95.
- [10] LI Youqiong, TIAN Mao, QIN Ting, et al. Capillary electrophoresis resolves inconclusive HPLC analysis for hemoglobin variants: a study of two cases[J]. *Clinical Laboratory*, 2018, 64(7): 1305-1309.
- [11] 谭渭泉, 周淑云, 杨建中. 陕西省五地区异常血红蛋白的调查[J]. *第四军医大学学报*, 1984, 5(2): 109-113.
- TAN Weiquan, ZHOU Shuyun, YANG Jianzhong. Investigation of abnormal hemoglobin in five regions of Shaanxi province[J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 1984, 5(2): 109-113.
- [12] XU Nan, YANG Xudong, ZHANG Yanping, et al. The unexpected detection of a novel mutation in a patient with Hb G-taipei during glycated hemoglobin test [J]. *Clinical Laboratory*, 2023, 69(5). doi: 10.7754/Clin.Lab.2022.220824.
- [13] 王妍, 林敏, 韩志君, 等. 江苏省无锡地区异常血红蛋白病的流行病学调查[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(2): 316-318.
- WANG Yan, LIN Min, HAN Zhijun, et al. Epidemiological investigation of abnormal hemoglobinopathy in Wuxi, Jiangsu province[J]. *the Journal of Practical Medicine*, 2012, 28(2): 316-318.
- [14] 黄媛媛, 叶丽花, 黄俊, 等. 广西来宾市育龄人群珠蛋白生成障碍性贫血基因检测结果分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2024, 39(2): 96-102.
- HUANG Yuanyuan, YE Lihua, HUANG Jun, et al. Analysis of gene testing results for thalassemia in childbearing-age population of Laibin city, Guangxi[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2024, 39(2): 96-102.
- [15] 李友琼, 黄惠嫔, 覃桂芳, 等. 血红蛋白E的表型与基因型分析[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(10): 861-864.
- LI Youqiong, HUANG Huipin, QIN Guifang, et al. Phenotype and genotype analysis of hemoglobin E[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2012, 33(10): 861-864.
- [16] 李友琼, 陈治中, 梁亮, 等. 广西地区血红蛋白Q-Thailand的表型和基因型分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(2): 164-168.
- LI Youqiong, CHEN Zhizhong, LIANG Liang, et al. Analysis of the phenotype-genotype relationship of hemoglobin Q-Thailand in Guangxi[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2016, 33(2): 164-168.
- [17] ZHANG Xiuming, WEN Dongmei, XU Shengnan, et al. Effects of hemoglobin variants Hb J Bangkok, Hb E, Hb G Taipei, and Hb H on analysis of glycated hemoglobin via ion-exchange high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2018, 32(1): e22214.
- [18] 徐安平, 夏勇, 纪玲, 等. 血红蛋白变异体对糖化血红蛋白不同检测系统的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(7): 470-474.
- XU Anping, XIA Yong, JI Ling, et al. Influences of hemoglobin variants on different HbA1c measurement systems[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2015, 38(7): 470-474.
- [19] XU Anping, CHEN Weidong, XIA Yong, et al. Effects of common hemoglobin variants on HbA1c measurements in China: results for α - and β -globin variants measured by six methods[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2018, 56(8): 1353-1361.
- [20] YUAN Yanping, ZHOU Xianghai, GAO Leili, et al. Silent hemoglobin variant during capillary electrophoresis: a case report[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2020, 11(4): 1014-1017.
- [21] 周翔海, 纪玲, 纪立农, 等. 影响糖化血红蛋白临床应用的血红蛋白变异体识别的专家共识[J]. *中国糖尿病杂志*, 2023, 31(8): 561-570.
- ZHOU Xianghai, JI Ling, JI Linong, et al. Expert consensus on the identification of hemoglobin variants affecting the clinical application of HbA1c[J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2023, 31(8): 561-570.
- [22] CHENG Xinqi, LI Ming, WU Jie, et al. HbG-Coushatta: an unexpected discovery during HbA1c measurement[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 444: 163-166.
- 收稿日期: 2024-03-27
修回日期: 2024-06-04