·实验研究·

当归补血汤调控 Nrf2/GPX4 通路改善血管性痴呆大鼠认知功能的机制

姜　玥[1],张越雯[1],余　康[3],郭运帅[3],万　婷[2*]

(1 广州中医药大学针灸康复临床医学院,广州 510000;2 广州中医药大学第一附属医院,广州 510000;3 广州中医药大学第一临床医学院,广州 510000)

[摘要] **目的:**探究当归补血汤(Danggui Buxue decoction,DBD)对双侧颈总动脉结扎(bilateral common carotid artery ligation,2-VO)血管性痴呆(vascular dementia,VD)模型大鼠核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)通路、脂质过氧化及突触可塑性的影响。**方法:**60 只雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、双侧颈总动脉结扎 VD 模型组、2-VO + 当归补血汤低剂量给药组、2-VO + 当归补血汤中剂量给药组、2-VO + 当归补血汤高剂量给药组、2VO + 多奈哌齐组,每组 10 只。造模 24 h 后,连续给药 4 周后取材。采用 Morris 水迷宫实验、避暗实验评价大鼠学习记忆能力,试剂盒检测脂质过氧化水平,尼氏染色观察海马神经元情况,免疫荧光染色观察海马神经元的表达,蛋白免疫印迹法检测通路及突触可塑性相关蛋白表达,透射电镜观察海马神经元线粒体及突触超微结构,高尔基染色观察大鼠海马神经元树突棘形态及密度。**结果:**Morris 水迷宫实验和避暗实验表明 DBD 可改善大鼠的学习记忆能力。尼氏染色和免疫荧光结果显示,DBD 给药后可提高 VD 模型组大鼠海马神经元数量,Nrf2 表达率及改善神经元损伤。VD 模型大鼠表现出谷胱甘肽水平下降,脂质过氧化物及 4-羟基壬烯醛水平上升,DBD 给药可减轻氧化应激。在 VD 模型大鼠中出现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)醌氧化还原酶 1、GPX4、Nrf2、突触后密度蛋白 95、突触素 1、脑源性神经营养因子蛋白的表达降低;DBD-H 组给药后均显著升高。透射电镜与高尔基染色显示,DBD 可改善神经元线粒体结构和突触超微结构,增加树突棘密度。**结论:**当归补血汤可通过调控 Nrf2/GPX4 信号通路,抑制神经元脂质过氧化,改善突触可塑性,从而发挥神经元保护作用,改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力。

[关键词] 当归补血汤;血管性痴呆;脂质过氧化;核因子 E2 相关因子/谷胱甘肽过氧化物酶 4;突触可塑性

[中图分类号] R96　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2026)18 - 1977 - 11

Mechanism of Danggui Buxue decoction regulating Nrf2/GPX4 pathway to improve cognitive function of vascular dementia rats

JIANG Yue[1], ZHANG Yue-wen[1], YU Kang[3], GUO Yun-shuai[3], WAN Ting[2*]

(1 *Clinical Medical College of Acupuncture Moxibustion and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510000, *China*; 2 *The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510000, *China*; 3 *The First Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effects of Danggui Buxue Decoction (DBD) on the nuclear factor erythroid 2-related factor 2/glutathione peroxidase 4 pathway, degree of lipid peroxidation, and synaptic plasticity of rats with vascular dementia (VD) induced by bilateral common carotid artery ligation (2-VO). **Methods**: Sixty male SPF grade SD rats were randomly divided into sham surgery group, bilateral common carotid artery ligation VD

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82104757);2023 年广州中医药大学第一附属医院 2023 年中青年骨干培育项目青优人才资助项目

[作者简介] 姜玥,女,博士研究生,主要从事中医药防治脑病研究。E-mail:jiangyue2917@163.com。

[通讯作者] *万婷,女,博士,主治医师,主要从事中医药防治脑病研究。E-mail:wanting2019@foxmail.com。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.18.010

model group, low-dose 2-VO + DBD group, medium dose 2-VO + DBD group, high-dose 2-VO + DBD group, and 2-VO + donepezil group, with 10 rats in each group. After 24 hours of modeling, continuous administration was performed for 4 weeks and samples were collected. The Morris water maze experiment and the dark avoidance experiment were used to evaluate the influence on the learning and memory ability of rats. The lipid peroxidation level was detected using a kit, and the morphology of hippocampal neurons was observed using Nissl staining. The expression of hippocampal neurons was observed using immunofluorescence staining, and the expression of pathway and synaptic plasticity-related proteins was detected using Western blotting. The mitochondria and synaptic ultrastructures of hippocampal neurons were observed using transmission electron microscopy, and the morphology and density of dendritic spines of hippocampal neurons were observed using Golgi staining. **Results**: The Morris water maze experiment and the dark avoidance experiment demonstrated that DBD could enhance the learning and memory abilities of rats. The results of Nissl staining and immunofluorescence showed that after DBD administration, the number of hippocampal neurons in the VD model group of rats increased, the expression rate of Nrf2 increased, and the neuronal damage was improved. VD rats showed a decrease in GSH levels, an increase in lipid peroxide and 4-hydroxynonenal levels, and DBD administration could alleviate oxidative stress. In VD rats, the expression of NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, GPX4, Nrf2, postsynaptic density protein 95, Synapsin1, and brain-derived neurotrophic factor proteins decreased, and all of these significantly increased after administration of high dose DBD. Transmission electron microscopy and Golgi staining showed that DBD could improve the mitochondrial structure and synaptic ultrastructure of neurons, and increase the density of dendritic spines. **Conclusion**: DBD can exert a neuroprotective effect and improve the learning and memory abilities of VD model rats by regulating the Nrf2/GPX4 signaling pathway, inhibiting neuronal lipid peroxidation, and enhancing synaptic plasticity.

[**Key words**] Danggui Buxue decoction; vascular dementia; lipid peroxidation; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/glutathione peroxidase 4; synaptic plasticity

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种由脑血管疾病引发、以慢性脑灌注不足为主要病理特征的与学习记忆缺陷相关的脑血管障碍性疾病[1-2]。在全球范围内,目前估计有 800 万至 1 700 万人受到 VD 的影响,预计到 2050 年这一数字将翻一倍[3]。这种脑血管活动的改变促进活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生[4-5],ROS 可与脂质膜反应,诱发脂质过氧化,导致脂质 ROS 不断累积,引起脂质过氧化[6]、神经元死亡、神经元突触丧失[7-8],当这种变化出现在与学习记忆能力相关的脑区,就会导致认知障碍的出现。核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2,Nrf2)是细胞应对脂质过氧化的重要调控因子,脂质过氧化引发的级联反应,导致神经元死亡及突触可塑性损伤,引起认知功能障碍,也是 VD 的重要病理环节,抑制神经元的脂质过氧化、改善神经突触的可塑性、抑制神经元死亡是治疗 VD 的策略[9]。

VD 归属“善忘病”“愚痴病”“痴呆”等范畴。中医认为,“治病必求于本,本于气血”,气血失和,脑神失养,神机失于统摄。因而调气和血,使得气血旺盛是髓海满盈、神机得用的前提。当归补血汤出自《内外伤辨惑论》,该方由黄芪和当归组成,其中重用黄芪,其用量 5 倍于当归,取黄芪重在大补脾肺之气,如《景岳全书》云“有形之血不能速生,无形之气应当急固,有形之血生于无形之气”,用黄芪以资化源,使气旺血生,并取其固肌表之功,防止滋阴补血固里不及,阳气外亡。配以少量当归养血和营,则促进阴阳的相互化生,气旺血生。目前研究表明,黄芪-当归药对能够益气活血,其机制主要包括抗氧化应激、抗炎、降血脂、降血糖、保护心功能、保护血管壁等[10]。临床研究表明,黄芪-当归药对可升高血清中超氧化物歧化酶,谷胱甘肽过氧化物酶水平,降低丙二醛的含量[11],其可通过激 Nrf2 通路调节脂质过氧化水平。

目前西药治疗 VD 多采用胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐、加兰他敏和卡巴拉汀等[12],但不良反应较多,使用时需谨慎。中医药治疗 VD 的安全性较高、疗效显著,其具体作用机制仍有待进一步阐明。

本文旨在探究当归补血汤通过降低 VD 模型大鼠脂质过氧化水平、改善突触可塑性,以 Nrf2/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)通路为研究靶点,探讨当归补血汤改善 VD 模型大鼠学习记忆能力的可能作用机制,为临床治疗 VD 提供参考。

材料与方法

1 动物

SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 60 只,体质量(170 ± 10) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(粤)2018-0034。于广州中医药大学实验动物中心 SPF 实验室饲养,12 h 明暗交替,温度 20 ~ 26 ℃,湿度 40% ~ 70%,自由进食饮水。本研究符合广州中医药大学实验动物伦理委员会标准,伦理批准号:20220223037。

2 药物

当归补血汤水溶液将黄芪与当归按 5∶1的比例混合,置于提取浓缩机组提取罐中,依次加入 8、6 倍体积(*V*/*W*)的水,经过 1 h 浸泡后,进行回流煎煮,每次煎煮时间为 2 h,煎煮 2 次后将 2 次煎煮液混合,随后进行旋蒸浓缩,温度 60 ℃,待浓缩液体积剩余 1/5 时停止浓缩,将所得的浓缩液放入真空干燥器箱中,恒温干燥制备成浸膏,每 g 浸膏含生药 3.74 g,将成品置于 -80 ℃冰箱长期保存。盐酸多奈哌齐(思博海,植恩生物技术股份有限公司,国药准字 H20010723,规格:5 mg·片$^{-1}$)。以上药物均购自广州中医药大学第一附属医院。中药饮片鉴定由广州华晰检测技术中心技术负责人张文景负责。

3 主要试剂及仪器

神经元特异核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)抗体(艾博抗贸易有限公司,批号:ab104224);突触后密度蛋白 95(postsynaptic density protein 95, PSD95)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:20665-1-AP);突触素 1(synapsin 1, SYN1)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:20258-1-AP);脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:28205-1-AP);烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)醌氧化还原酶 1(NAD (P) H quinone dehydrogenase 1, NQO-1)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:67240-1-Ig);GPX4 抗体(艾比玛特生物医药有限公司,批号:T56959);Nrf2 抗体(美国 Immunoway 贸易有限公司,批号:YM8624);β-肌动蛋白(beta-actin, βactin)抗体(德国 Sigma 公司,批号:A5441);尼氏(Nissl)染色液(碧云天生物技术有限公司,批号:C0117);脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:S0043S);4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4HNE)检测试剂盒(上海威奥科技有限公司,批号:ER20587M);谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:S0056);RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司,批号:P0013C);Biosharp 特超敏 ECL 化学发光底物试剂盒(兰杰柯科技有限公司,批号:BL520B);电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1102);高尔基染色液(百仟度生物科技公司,批号:B5001-B5005);812 包埋剂(SPI 公司,批号:90529-77-4)。

Morris 水迷宫(上海欣软信息科技有限公司);避暗实验箱(上海欣软信息科技有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);高速离心机(德国 Eppendorf 公司);全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);多光子共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司);超薄切片机(德国 Leica 公司,型号:UC7);钻石切片刀(瑞士 Diatome 公司,型号:Ultra 45°);透射电子显微镜(美国 FEI 公司,型号:TECNAI G 20 TWIN);SDS-PAGE 电泳仪(美国 Bio-rad 公司);化学发光成像系统(美国 Bio-rad 公司,型号:ChemiDoc XRS +)。

4 动物分组、造模

适应性喂养 1 周后,将大鼠分组为:假手术组(Sham)、双侧颈总动脉结扎 VD 模型组(2-VO)、2-VO + 当归补血汤低剂量给药组(DBD-L)、2-VO + 当归补血汤中剂量给药组(DBD-M)、2-VO + 当归补血汤高剂量给药组(DBD-H)、2-VO + 多奈哌齐组(DNP),每组 10 只。采用 4% 异氟烷对大鼠进行气麻,并在麻醉后以 2% 异氟烷维持麻醉。对大鼠颈部皮肤进行脱毛备皮及消毒。沿大鼠颈部正中剪开皮肤,暴露并结扎双侧颈总动脉。Sham 组仅剪开皮肤,暴露双侧颈动脉后,无须结扎,缝合伤口。待大鼠于红外线灯下自然苏醒即可。

5 给药方法

根据前期研究结果,当归补血汤低、中、高浓度给药剂量分别为 9.2、18.4、36.8 g·kg^{-1}[13]。多奈哌齐组按文献剂量[14]给予 3 mg·kg^{-1}多奈哌齐溶液灌胃。每天灌胃 1 次,连续灌胃 4 周后进行行为学测试,行为学测试期间维持灌胃给药。

6 观察指标及方法

6.1 学习记忆能力 Morris 水迷宫实验包括定位航行实验及穿越平台实验,将水迷宫分为 4 个象限,并做不同标记。之后将平台置于第 4 象限,往水迷宫内放入清水,水深没过平台 2 ~ 3 cm。d 1 为适应

性训练,任意象限面向池壁放入老鼠,60 s 后捞出。d 2 起进行正式测试。① 定向航行实验:将各组大鼠面向池壁,从 4 个象限按顺序依次放入水中,设定观察 60 s 内大鼠轨迹,记录大鼠找到平台所需的时间(即逃避潜伏期),若 60 s 内大鼠未找到平台,则在计时结束后,引导其至平台并停留 20 s 再移开,逃避潜伏期记为 60 s,连续训练 5 d;② 空间探索实验:d 7 将平台撤离,进行穿越平台实验。将大鼠从远离平台的象限放入水中,记录大鼠 60 s 内穿越原平台次数。

避暗实验装置中暗室底部不锈钢栅栏地板和电击刺激器相连,明室地板为同款不锈钢栅栏但不接电击刺激器。d 1 使大鼠适应避暗装置环境,将大鼠放入明室,将明暗室之间的拱门打开,让其在装置中自由穿梭 2 min,再放回笼中。d 2 为适应性训练,将大鼠头面向室壁放入明室中,因其天生喜阴暗地带,所以会通往暗室,在其抵达暗室后,关闭两室间的拱门,给暗室的栅栏通电,大鼠由于电刺激的作用,获得记忆。d 3 为正式实验,将大鼠放入明室中,设定观察时间为 300 s,记录大鼠进入暗室的潜伏期,观察期内大鼠未进入暗室,则将其潜伏期记录为 300 s。

6.2 尼氏染色观察海马神经元情况 行为学测试结束后 d 2,大鼠麻醉后,经心脏灌注 4% 多聚甲醛固定后,于冰上迅速取脑,经石蜡包埋后行海马组织 CA1 区、CA3 区切片,切片经脱蜡复水,置于尼氏染色液中,经水洗,1% 冰醋酸分化,切片烤干,透明封片后进行光学显微镜镜检及图像采集分析。

6.3 免疫荧光染色观察海马 NeuN、Nrf2 蛋白的表达 海马组织切片经脱蜡复水、EDTA 修复、画圈自发荧光淬灭、血清封闭后滴加 NeuN 抗体(1∶200)、Nrf2 抗体(1∶200),置于湿盒 4 ℃孵育过夜,次日滴加山羊抗兔荧光二抗(1∶500)、山羊抗小鼠荧光二抗(1∶500),避光室温孵育 50 min,DAPI 复染细胞核后封片,切片于共聚焦显微镜下观察并采集图像。

6.4 蛋白质免疫印迹法检测 PSD95、SYN1、BDNF、NQO-1、GPX4、Nrf2 蛋白表达 抗氧化及突触可塑性相关蛋白:取相应新鲜海马组织,组织匀浆,裂解液冰上裂解,离心取得上清。经电泳、电转、封闭、一抗二抗孵育后,发光液显影,化学发光成像系统中观察、显影、拍摄图片。GPX4、BDNF 稀释比例为 1∶1 000;SYN1、Nrf2 稀释比例为 1∶2 000;PSD95 稀释比例为 1∶4 000;NQO-1 稀释比例为 1∶5 000;β-actin 稀释比例为 1∶10 000。

6.5 检测 LPO、4HNE、GSH 水平、总抗氧化能力评估氧化应激水平 大鼠麻醉后,迅速断头取脑,称重匀浆后按照试剂盒说明书测定 LPO、4HNE、GSH 水平及总抗氧化能力。

6.6 透射电镜观察海马神经元超微结构 ① 取材及固定:大鼠麻醉后,迅速断头取脑,取海马组织的 1 ~ 2 mm^3,加入于 4 ℃保存固定的 2.5% 戊二醛;② 锇酸固定:经 0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次,15 min·次$^{-1}$,用 1% 的锇酸 ×0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(pH 7.4)室温(20 ℃)固定 2 h;然后再经 0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(pH 7.2)漂洗 3 次,15 min·次$^{-1}$;③ 脱水:组织经 30%、50%、70%、80%、85%、90%、100%(2 次)酒精梯度上行脱水,15 ~ 20 min·次$^{-1}$;④ 渗透:渗透剂依次为丙酮∶环氧树脂(2∶1),丙酮∶环氧树脂(1∶1),环氧树脂,37 ℃烘箱内,每次渗透 8 ~ 12 h;⑤ 包埋:将渗透好的样品放入包埋板中,加入包埋剂环氧树脂,在 60 ℃烘箱中聚合 48 h;⑥ 切片:超薄切片机切片 80 ~ 100 nm;⑦ 双染色:铀铅双染色(2% 醋酸铀饱和水溶液,枸橼酸铅),室温染色 15 min,切片室温干燥过夜,电镜观察。

6.7 高尔基染色观察海马 CA1 区神经元树突棘形态学变化 动物经麻醉处理后,获取完整的脑组织,并以蒸馏水冲洗其表面残留血液。随后,将脑组织置于通风橱内的高尔基固定液中,进行预处理固定。待固定阶段完成,替换为高尔基浸染液,持续浸泡 14 d 后,用生理盐水对组织进行彻底漂洗。借助振动切片机完成切片制备,并用高尔基显影液进行显影。完成显影后,进行盖玻片封固。切片应在避光、恒温条件下储存。最后,借助图像扫描仪采集影像,用于分析大鼠海马 CA1 区域神经元的树突分支及树突棘的形态学特征。

7 数据分析与处理

实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,检验效能取双侧 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。实验中所得结果均来自 3 次独立实验。符合正态分布的数据以均数 ± 标准差形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法(方差齐)。不符合正态分布或是方差不齐的数据资料以中位数(M)、四分位数(P25、P75)表示,采用非参数中的 Kruskal-Wallis 单因素 ANOVA(k 个样本)进行检验。

定位航行实验中大鼠逃避潜伏期属于重复测量设计资料,采用一般线性模型中的重复测量设计资

料的单变量方差分析,如实验数据不满足球形检验,采用多元方差分析,在总体比较有统计学意义($P<0.05$)的基础上,各组间两两比较用 LSD 法(方差齐)或塔姆黑尼 T2 法(方差不齐)。其余行为学实验结果数据符合正态分布,采用单因素方差分析进行处理,同时进行方差同质性检验,方差齐选用 LSD 法进行比较,若方差不齐,采用 Welch 检验和 Brown-Forsythe 检验。

结　果

1　当归补血汤对 VD 模型大鼠学习记忆能力的影响

正式实验开始后,除 VD 模型组大鼠以外,其余各组从 d 1 ~ d 5,大鼠逃避潜伏期均呈逐渐缩短的趋势。重复测量方差分析结果显示,逃避潜伏期随着时间推移发生显著变化($P<0.01$),具有统计学意义,与 Sham 组大鼠比较,2-VO 组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$)。与 2-VO 组比较,DBD 给药组、DNP 组大鼠逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$,$P<0.01$)。与 DBD-H 组比较,DNP 组大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),见表 1。对比各组大鼠游泳轨迹,可发现 Sham 组大鼠进入水池后能迅速找到平台登陆,游泳路线短且轨迹简单。2-VO 组大鼠仍类似探索期游泳,游泳路线无规律及目标,轨迹凌乱,无法在观察期内迅速找到平台。相较于 2-VO 组大鼠,DBD 给药组和 DNP 组大鼠游泳路线更简单,能高效找到平台并登陆,见表 1、图 1。

表 1　DBD 对 VD 模型大鼠逃避潜伏期的影响　　s,$\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	给药剂量/g·kg^{-1}	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5
Sham 组	—	53.54 ± 3.78	44.82 ± 3.18	40.72 ± 3.45	36.19 ± 2.37	26.35 ± 2.41
2-VO 组	—	54.49 ± 4.21	52.53 ± 4.38	52.62 ± 4.19	53.77 ± 4.29[a]	52.42 ± 4.95[a]
DBD-L 组	9.2	52.74 ± 4.03	51.62 ± 3.20	49.85 ± 3.06	47.56 ± 3.47	43.60 ± 3.49[b]
DBD-M 组	18.4	52.39 ± 3.22	50.36 ± 3.55	45.24 ± 3.14	43.20 ± 3.94[b]	36.63 ± 2.55[c]
DBD-H 组	36.8	53.98 ± 3.54	48.28 ± 2.67	42.62 ± 2.89	38.43 ± 2.72[c]	30.98 ± 3.08[c]
DNP 组	0.003	53.05 ± 3.72	51.94 ± 3.43	45.38 ± 3.72	44.75 ± 3.60[b]	41.48 ± 3.02[c]

与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$

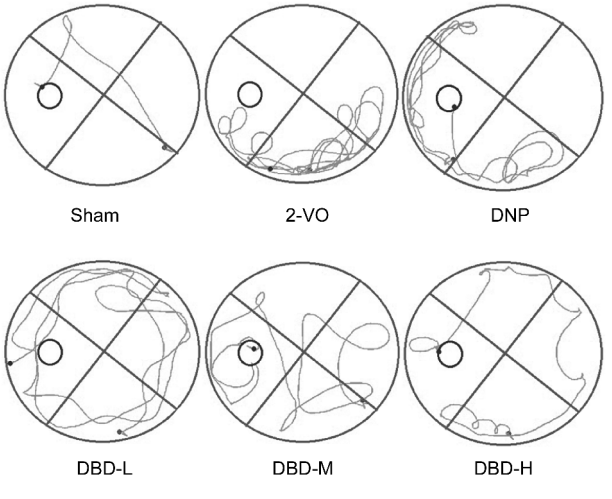


图 1　DBD 对 VD 模型大鼠游泳轨迹的影响

与 Sham 组比较,2-VO 组大鼠穿越原平台次数显著减少($P<0.01$)。与 2-VO 组比较,DBD 给药组和 DNP 组大鼠穿越原平台次数明显增多($P<0.05$,$P<0.01$)。与 DBD-H 组比较,DNP 组大鼠穿越平台次数明显减少($P<0.05$),见表 2。

表 2　DBD 对 VD 模型大鼠穿越原平台次数的影响　　$\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	给药剂量/g·kg^{-1}	穿越原平台数/次
Sham 组	—	3.02 ± 0.68
2-VO 组	—	0.88 ± 0.61[a]
DBD-L 组	9.2	1.25 ± 0.49[b]
DBD-M 组	18.4	1.60 ± 0.54[b]
DBD-H 组	36.8	2.38 ± 0.47[c]
DNP 组	0.003	1.72 ± 0.55[c]

与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$

避暗实验过程包括记忆的获得、巩固及再现阶段,通过这一过程可评价大鼠学习记忆功能的重要指标。如图 1 所示,与 Sham 组大鼠相比,VD 大鼠从明室进入到暗室的逃避潜伏期缩短,表明 VD 大鼠对暗室的电刺激记忆弱于 Sham 组大鼠,DBD-H 组、DBD-M 组大鼠对暗室的电刺激记忆优于 2-VO 组大鼠($P<0.05$,$P<0.01$),而 DBD-L 组差异无统计学意义($P>0.05$),但是其逃避潜伏期长于 2-VO 组。当归补血汤能够加强大鼠对负面刺激的记忆力并做出避害选择,表明其能增加学习记忆功能,改善其认知障碍,见表 3。

表 3 DBD 对 VD 模型大鼠避暗实验逃避潜伏期的影响(系数比) $\bar{x} \pm s, n = 8$

组别	给药剂量/g·kg^{-1}	逃避潜伏期
Sham 组	—	188.75 ± 9.95
2-VO 组	—	91.08 ± 10.38[a]
DBD-L 组	9.2	96.33 ± 12.29
DBD-M 组	18.4	132.91 ± 13.23[b]
DBD-H 组	36.8	172.08 ± 9.02[c]
DNP 组	0.003	153.67 ± 10.90[b]

与 Sham 组比较,a:$P < 0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$

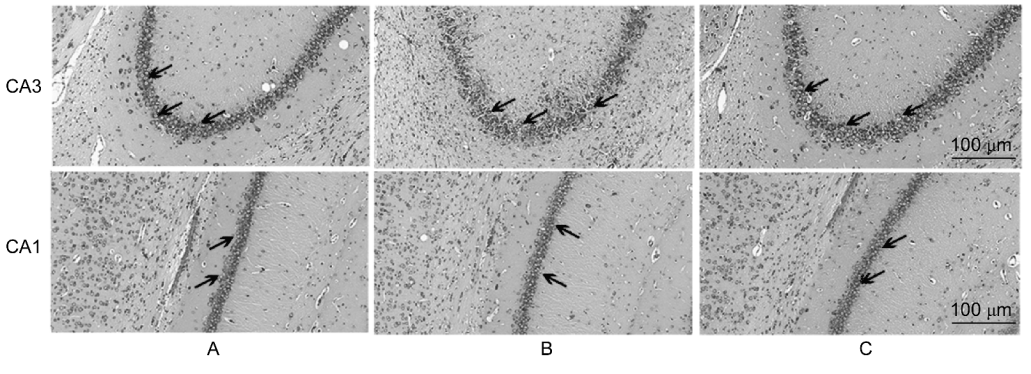
2 当归补血汤对 VD 模型大鼠神经元的影响

VD 模型组大鼠海马 CA1 和 CA3 区健康神经元细胞排列无序,整体数量及密度减低,尼氏体出现大量丢失,细胞核萎缩或消失。相比于 2-VO 组大鼠,DBD-H 组大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元整体数量及密度增加($P < 0.05$,$P < 0.05$),神经元排列有序,紧密,细胞形态正常,见表 4、图 2。

表 4 DBD 对 VD 模型大鼠海马 CA1 和 CA3 区尼氏阳性细胞数量的影响 $\bar{x} \pm s, n = 3$

组别	CA1 区尼氏阳性细胞百分比	CA3 区尼氏阳性细胞百分比
Sham 组	100.00 ± 8.90	100.00 ± 9.25
2-VO 组	61.12 ± 4.30[a]	52.33 ± 4.21[a]
DBD-H 组	87.88 ± 6.41[b]	86.70 ± 5.19[b]

与 Sham 组比较,a:$P < 0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P < 0.05$

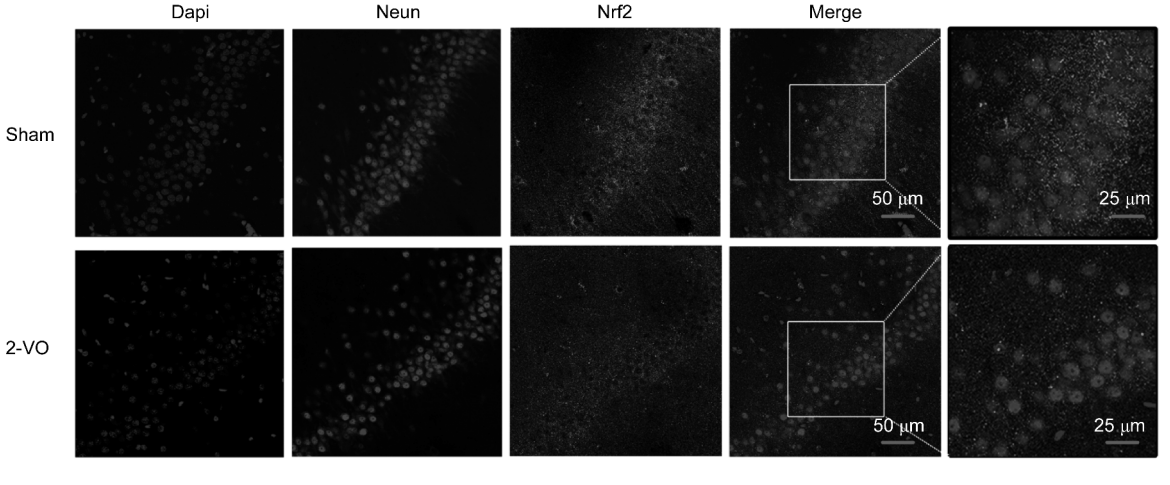


A:Sham 组;B:2-VO 组;C:当归补血汤 DBD-H 组;图中箭头为尼氏体

图 2 当归补血汤对 VD 模型大鼠神经元的影响(尼氏染色,×320)

3 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马 NeuN 和 Nrf2 蛋白表达的影响

NeuN 蛋白的表达广泛应用于脑神经相关疾病研究,被广泛应用于评价脊髓、大脑皮层、海马和小脑中神经元细胞类型成熟程度。Nrf2 是细胞抗氧化防御系统的核心调控因子,其在中枢系统中,对抗氧化防御、线粒体维护、抗炎作用、解毒与代谢调控、促进神经营养因子表达等方面起到关键作用。通过免疫荧光实验检测 NeuN 和 Nrf2 蛋白的表达,可以评价大鼠神经元细胞的数量及成熟程度以及 Nrf2 蛋白表达量。Sham 组及 DBD-H 组海马神经元和 Nrf2 阳性表达率均明显高于 2-VO 组,见图 3。



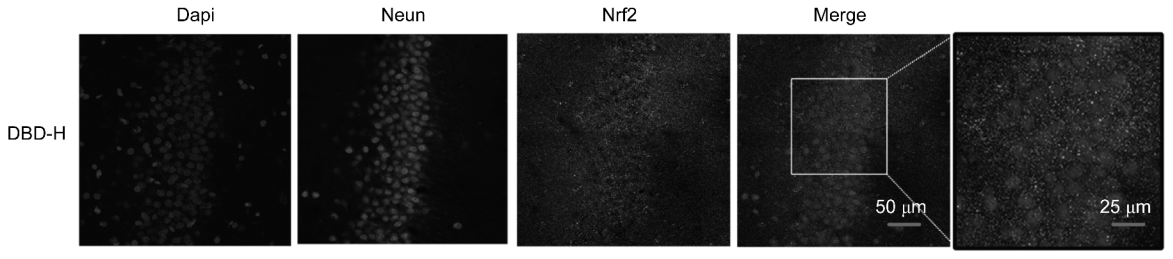
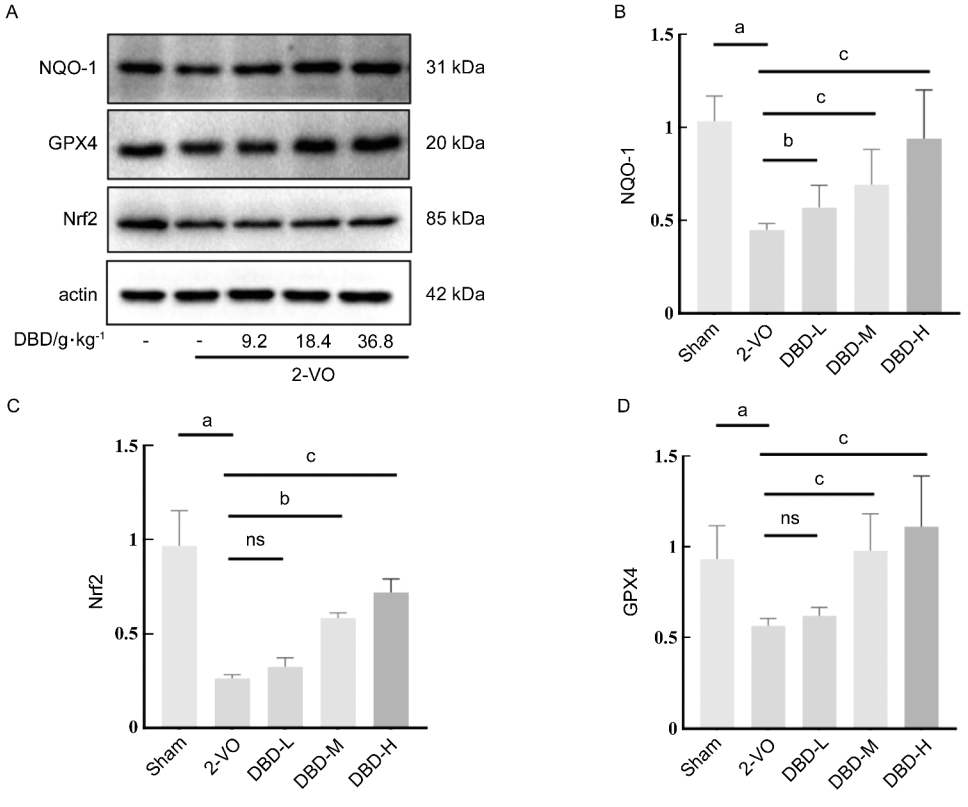


图 3 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马 NeuN 和 Nrf2 蛋白表达的影响(免疫荧光,×300,×600)

4 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马组织抗氧化通路相关蛋白表达的影响

与 Sham 组比较,2-VO 组大鼠 Nrf2、GPX4、NQO-1 蛋白的表达降低($P<0.01$)。与 2-VO 组比较,DBD-M 组、DBD-H 组大鼠 Nrf2、GPX4 蛋白表达量显著上调($P<0.05$),而 DBD-L 组差异无统计学意义($P>0.05$)。与 2-VO 组比,DBD-L、DBD-M、DBD-H 给药组大鼠 NQO-1 蛋白的表达显著上调($P<0.05$,$P<0.01$),见图 4。

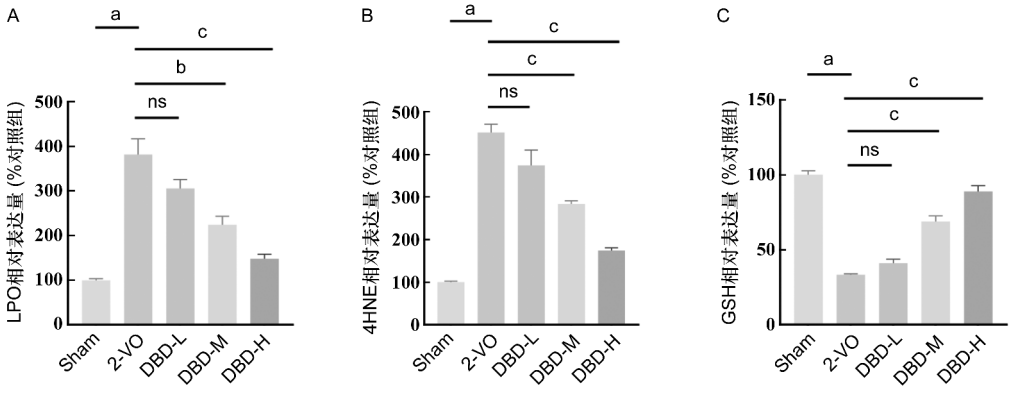


A:各组大鼠海马组织中 NQO1、Nrf2、GPX4 蛋白表达情况;B:NQO-1 蛋白定量分析;C:Nrf2 蛋白定量分析;D:GPX4 蛋白定量分析。与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$;$\bar{x}\pm s$,$n=3$

图 4 各组大鼠海马组织抗氧化通路相关蛋白表达情况

5 当归补血汤对 VD 模型大鼠脂质过氧化的影响

与 Sham 组比较,2VO 组大鼠 GSH 水平显著下降,4HNE、LPO 水平显著上升($P<0.01$),提示 2-VO 组大鼠脑组织脂质过氧化程度升高,存在氧化应激情况。与 2-VO 比较,DBD-M 组、DBD-H 组抗氧化物 GSH 水平显著上升,脂质过氧化程度(LPO),4HNE 水平显著下降($P<0.01$),而 DBD-L 组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。

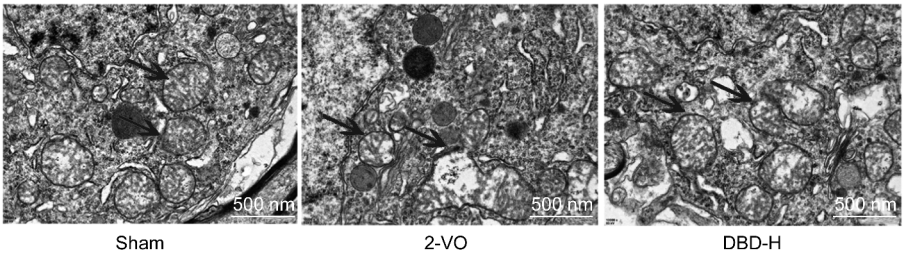


A:各组大鼠 LPO 水平;B:各组大鼠 4HNE 水平;C:各组大鼠 GSH 水平;与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$;$\bar{x}\pm s$,$n=3$

图 5 各组大鼠 GSH、LPO、4HNE 水平的影响

6 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马神经元线粒体形态的影响

在透射电镜下,Sham 组大鼠海马神经元中线粒体数量丰富,形态结构完整,线粒体嵴清晰,基质均匀;2-VO 组大鼠海马神经元中线粒体出现固缩或肿胀,线粒体嵴加粗,电子密度加深;DBD-H 组大鼠海马神经元中线粒体数量较丰富,线粒体形态结构完整,嵴清晰,基质均匀,见图 6。

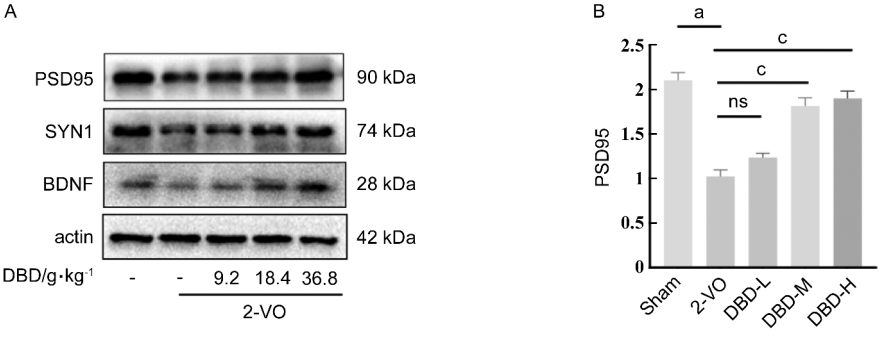


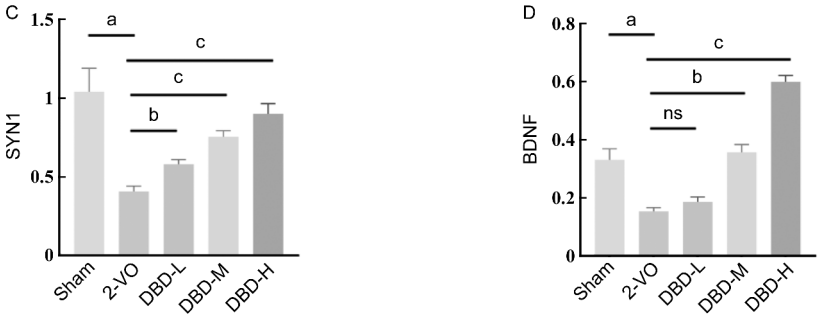
图中箭头指向线粒体

图 6 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马神经元线粒体形态的影响(×10 000)

7 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马组织突触可塑性相关蛋白表达的影响

PSD95 是突触后致密区中一种含量极高的支架蛋白。PSD95 在突触可塑性,特别是长时程增强中扮演着核心角色。SYN1 是主要存在于突触前神经末梢的一种磷酸蛋白。它与突触小泡的膜表面结合,是调控神经递质释放的关键蛋白之一。BDNF 是突触可塑性的重要调节因子,对神经元的生存、发育、分化以及功能维持至关重要。与 Sham 组比较,2-VO 组大鼠突触可塑性相关蛋白 PSD95、SYN1、BDNF 降低($P<0.05$)。与 2-VO 组比较,DBD-M、DBD-H 组大鼠 PSD95、BDNF 蛋白表达量显著上调($P<0.05$)。与 2-VO 组比,DBD-L、DBD-M、DBD-H 组大鼠 SYN1 蛋白的表达显著上调($P<0.05$),见图 7。



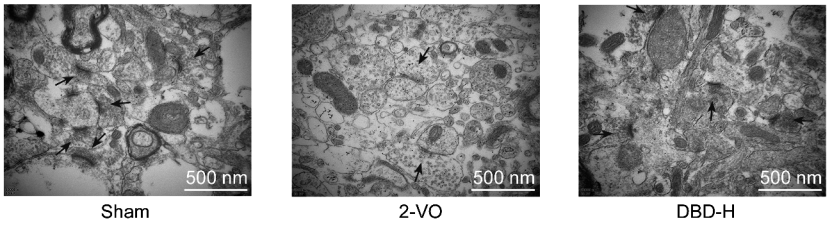


A:各组大鼠海马组织中 PSD95、SYN1、BDNF 蛋白表达情况;B:PSD95 蛋白定量分析;C:SYN1 蛋白定量分析;D:BDNF 蛋白定量分析;与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$;$\bar{x}\pm s$,$n=3$

图 7 各组大鼠海马组织突触可塑性相关蛋白表达情况

8 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马组织突触超微结构的影响

与 Sham 组比较,2-VO 组大鼠海马突触超微结构呈现显著损伤,突触前膜与突触后膜偶见不规则肿胀、膜结构模糊,间隙内电子密度明显降低、不均匀。突触前终末内突触小泡数量较少;突触前膜活性区不清晰,突触后致密区变薄、电子密度降低,提示突触传递效率下降。且视野内有较少处于活性状态的突触传递,提示突触传递功能降低。与 2-VO 组相比,DBD-H 组突触结构明显改善,突触间隙电子密度增加,突触小泡在突触前聚集,数量较多,突触前膜活性区清晰,突触后致密区变厚、电子密度明显增加,且视野中有较多处于活性状态的突触传递,见图 8。



图中箭头指向突触结构

图 8 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马突触超微结构的影响(×10 000)

9 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马组织树突及树突棘形态的影响

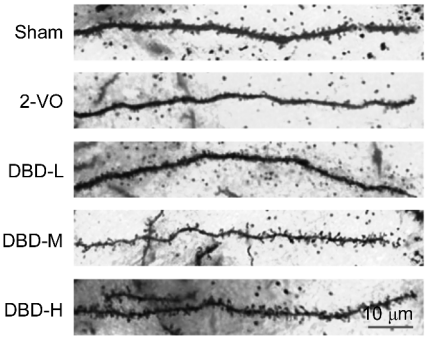
与 Sham 组比较,2-VO 组大鼠海马组织神经元树突主干较细,树突棘次级分支较少,分布稀疏不均,树突棘数量减少,密度明显降低($P<0.05$)。与 2-VO 组相比,DBD 给药后,DBD-M、DBD-H 组树突次级分支显著增多,树突棘分布恢复均匀致密,数量增多,密度明显升高($P<0.01$),见表 5 及图 9。

表 5 当归补血汤对树突棘密度的影响

$\bar{x}\pm s$,$n=6$

组别	给药剂量/g·kg^{-1}	树突棘密度/个·10 μm^{-1}
假手术组	—	7.73 ± 1.22
VD 模型组	—	2.98 ± 0.47[a]
低剂量组	9.2	3.90 ± 0.57
中剂量组	18.4	4.86 ± 0.86[c]
高剂量组	36.8	7.24 ± 0.52[c]

与 Sham 组比较,a:$P<0.01$;与 2-VO 组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$



各组大鼠海马树突棘形态及密度代表图

图 9 当归补血汤对 VD 模型大鼠海马树突及树突棘形态的影响

讨 论

VD 发病机制复杂,在中医归因为本虚标实,本虚以气血亏虚为病理基础。当归补血汤以“益气生

血”为根本大法,通过黄芪大补元气以生血、行血,当归养血活血以濡窍、通络,共同实现气血双补、瘀去络通的目标,使脑髓得充,神明得安。樊秦等[15]研究结果表明,当归补血汤能够提高抗氧化酶活性,降低脂质过氧化程度,上调 SOD、GSH-PX 的表达,降低 MDA、AchE 的表达,从而调整胆碱能神经递质的释放改善认知障碍。此外,有研究表明,中药可以通过调节氧化应激相关通路,抑制脂质过氧化,改善线粒体损伤、减轻谷氨酸兴奋性毒性等多种作用机制[16],从而起到改善认知障碍的作用。氨基-3,5-二甲基金刚烷胺盐酸盐、盐酸多奈哌齐等药物是国际上公认用于治疗 VD 的一线药物,其中多奈哌齐通过调节能量代谢,减轻神经退行性变、改善线粒体结构治疗慢性脑灌注不足的病理特征,故本实验西药对照组选用多奈哌齐[17-18]。

本研究采用 Morris 水迷宫实验和避暗实验观察大鼠学习记忆能力,结果证实 DBD 组能显著改善 VD 大鼠的学习记忆能力,呈现出剂量依赖性,且 DBD-H 组效果与 DNP 组相当。

脑慢性灌注不足条件下,抗氧化防御间的平衡遭到破坏,过量 ROS 与脂质发生反应产生脂质过氧化物,其降解前会产生活性醛产物,对神经元产生毒性,导致神经元坏死[19]。本研究中 VD 模型大鼠 GSH 水平下降,LPO 生成增加,4HNE 水平上升,而 DBD 能逆转这种改变,提示 DBD 能够改善脑慢性灌注不足状态下的脂质过氧化反应。在众多中药发挥抗氧化、减轻认知障碍的治疗机制中,Nrf2 是其共同干预的关键靶点。Nrf2 是抗氧化防御的主要调控因子,介导胶质细胞中抗氧化蛋白的表达,可作为关键靶点阻止 VD 的发生及恶化。在脑缺血缺氧造成的氧化应激环境下,Nrf2 会从与 Keap1 的偶联中释放出来,进入细胞核,激活抗氧化反应元件,从而启动下游的抗氧化酶因子 NQO1、HO-1 的表达[20],减轻氧化应激,保护神经元,抑制 VD 的发生发展。GPX4 作为 Nrf2 的下游,可将 GSH 转化为氧化谷胱甘肽,细胞毒性脂质过氧化物通过从相应的醇或游离过氧化氢转化为水的方式,还原脂质过氧化物,因而 GPX4 是脂质过氧化反应中的重要指标[21-22]。

此外,线粒体是产生 ROS 的主要细胞器,缺血缺氧状态下累积的过量的 ROS 会破坏线粒体形态,本研究电镜结果显示,VD 模型组大鼠海马神经元中可见线粒体出现固缩或肿胀,嵴加粗,电子密度加深,而 DBD-H 组可改善海马 CA1 区线粒体形态结构。本研究检测了抗氧化应激通路 Nrf2/GPX4 通路,发现 2-VO 组大鼠海马中,Nrf2、GPX4、NQO1 蛋白的表达降低,经 DBD 给药后,上述蛋白表达均增加。结合尼氏染色及 NeuN 免疫荧光结果,提示 DBD 能够通过 Nrf2/GPX4 轴,改善氧化应激水平。以上结果均表明,DBD 可改善 VD 大鼠的脂质过氧化损伤。

中枢神经系统损伤的恢复有赖突触可塑性的改变,其以突触数量和形态为基础。突触结构的损伤是神经元损伤的关键病理因素[23]。PSD95 是位于接收神经元的突触后膜上最丰富、最重要的骨架蛋白,能与相关蛋白结合向下传导膜信号。SYN1 位于发送神经元的突触前末梢的囊泡膜上,主要负责调控神经递质的释放,促进突触的发生与分化。SYN1、PSD95 的协同作用能够调节突触可塑性,提高神经递质传递效能[24]。在 VD 模型大鼠中,缺血缺氧导致 SYN1 和 PSD95 蛋白表达水平降低,突触超微结构的破坏是突触可塑性受损的直接形态学证据,透射电镜结果显示,2-VO 组大鼠海马突触结构显著损伤,与蛋白表达水平高度吻合,证实了 VD 模型中突触传递受损。本研究中发现,DBD 干预组 BDNF、SYN1 和 PSD95 蛋白表达水平增加,且 DBD-H 组突触结构明显改善,处于活性状态突触传递增多,这表明突触的传递效率和功能恢复。神经营养因子具有促进脑损伤后神经功能恢复的作用,BDNF 是具有代表性的神经营养因子,可以通过调控树突和轴突的生长,影响突触结构与功能的可塑性,调节神经元分化和存活,从而促进神经发育过程和脑缺血损伤的修复[25]。已有研究证实,Nrf2 在调节海马体突触损伤中起到重要作用,可通过抑制铁死亡减轻 BDNF 下调所致的突触损伤[26]。树突棘是神经元接收兴奋性突触输入的主要部位,其数量、密度和形态的变化直接反映了神经元形成和维持突触连接的能力。2-VO 组大鼠 BDNF 蛋白表达量降低,树突棘较少提示神经功能受损,突触可塑性障碍,DBD 给药干预后,DBD-M、DBD-H 组 BDNF 蛋白表达量明显增高,其表达上调与 DBD 中 DBD-H 组树突棘密度恢复密切相关,说明 DBD 可显著改善树突棘的形成与成熟,从而提高突触可塑性。

综上所述,本研究证实 DBD 对 VD 模型大鼠的学习记忆力有显著改善作用,其作用机制可能为调控 Nrf2/GPX4 信号通路,降低脂质过氧化水平,增强抗氧化能力,恢复突触可塑性,增加神经营养因

子,从而降低慢性灌注不足导致的神经细胞死亡。中药组方具有多成分、多环节、多靶点的特点[27-29],其治疗 VD 的机制复杂,该方发挥作用的具体有效成分及作用方式尚未明确,有待通过体外实验进一步验证与研究。

[参 考 文 献]

[1] LECORDIER S, MANRIQUE-CASTANO D, EL-MOGHRABI Y, *et al*. Neurovascular alterations in vascular dementia: emphasis on risk factors[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 727590.

[2] NYÚL-TÓTH Á, PATAI R, CSISZAR A, *et al*. Linking peripheral atherosclerosis to blood-brain barrier disruption: elucidating its role as a manifestation of cerebral small vessel disease in vascular cognitive impairment[J]. *GeroScience*, 2024, 46(6): 6511-6536.

[3] DONKIN R, FUNG YL, SINGH I. Fibrinogen, Coagulation, and Ageing[J]. *Subcell Biochem*, 2023, 102: 313-342.

[4] JELLINGER KA. Recent update on the heterogeneity of the Alzheimer's disease spectrum[J]. *J Neural Transm*, 2022, 129(1): 1-24.

[5] LV H, LIU Y, YANG X, *et al*. Research progress on the role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular dementia and its treatment[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2025, 34(12): 108475.

[6] LEE TH, CHARCHAR P, SEPAROVIC F, *et al*. The intricate link between membrane lipid structure and composition and membrane structural properties in bacterial membranes[J]. *Chem Sci*, 2024, 15(10): 3408-3427.

[7] PLASCENCIA-VILLA G, PERRY G. Roles of oxidative stress in synaptic dysfunction and neuronal cell death in Alzheimer's disease[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(8): 1628.

[8] WALLER R, NARRAMORE R, SIMPSON JE, *et al*. Heterogeneity of cellular inflammatory responses in ageing white matter and relationship to Alzheimer's and small vessel disease pathologies[J]. *Brain Pathol*, 2021, 31(3): e12928.

[9] ZHU H, HONG F, YANG S. The Roles of Nitric Oxide Synthase/Nitric Oxide Pathway in the Pathology of Vascular Dementia and Related Therapeutic Approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4540.

[10] 王文越, 刘珊, 吕琴, 等. 黄芪-当归药对益气活血药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 207-216.

[11] 陈柯源, 宋向东, 程峰, 等. 当归补血汤发酵产物对肉鸡免疫和抗氧化能力的影响[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 992-999.

[12] SINHA K, SUN CC, KAMARI R, *et al*. Current status and future prospects of pathophysiology-based neuroprotective drugs for the treatment of vascular dementia[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(4): 793-799.

[13] 祁桂芳, 姜玥, 谭韵湘, 等. 当归补血汤对血管性痴呆模型大鼠 PINK1/Parkin 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(2): 15-24.

[14] PELLEGRINI C, D'ANTONGIOVANNI V, FORNAI M, *et al*. Donepezil improves vascular function in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2021, 9(6): e871.

[15] 樊秦, 张延英, 夏鹏飞, 等. 当归补血汤对血管性痴呆大鼠学习记忆障碍改善及其机制研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 2-6.

[16] 林龙, 吴林, 劳祎林, 等. 中医药复方干预血管性痴呆的作用及机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 111-114.

[17] JIAN WX, ZHANG Z, ZHAN JH, *et al*. Donepezil attenuates vascular dementia in rats through increasing BDNF induced by reducing HDAC6 nuclear translocation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(5): 588-598.

[18] YANG XX, CHEN QQ. Efficacy of the combined use of donepezil with either quetiapine or sodium valproate in patients with Alzheimer's disease with behavioral and psychological symptoms of dementia, and their effects on vascular endothelial growth factors[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 21(1): 10.

[19] TRUJILLO-RANGEL WÁ, ACUÑA-VACA S, PADILLA-PONCE DJ, *et al*. Modulation of the circadian rhythm and oxidative stress as molecular targets to improve vascular dementia: a pharmacological perspective[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(8): 4401.

[20] YANG T, ZHANG F. Targeting transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) for the intervention of vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 97-116.

[21] ASHRAF A, JEANDRIENS J, PARKES HG, *et al*. Iron dyshomeostasis, lipid peroxidation and perturbed expression of cystine/glutamate antiporter in Alzheimer's disease: Evidence of ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101494.

[22] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175-185.

[23] 杨波, 陈新华, 李丽, 等. "补肾健脾,填精益髓"针法治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 世界中医药, 2025, 20(22): 4123-4129, 4139.

[24] 张鹏飞, 姚晰晨, 刘晨, 等. 天智颗粒对 VD 大鼠海马 SYN、PSD95 表达及突触可塑性的影响[J]. 中医学报, 2023, 38(8): 1717-1724.

[25] LU JY, DI FLORIO DN, BOYA P, *et al*. Autophagy and mitophagy at the synapse and beyond: implications for learning, memory and neurological disorders[J]. *Autophagy*, 2026, 22(1): 10-52.

[26] ZENG T, LI JJ, XIE LP, *et al*. Nrf2 regulates iron-dependent hippocampal synapses and functional connectivity damage in depression[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 212.

[27] 胡亚男, 闫微, 高玲, 等. 益髓解毒方对血管性痴呆大鼠海马突触可塑性的影响及作用机制[J]. 世界中医药, 2024, 19(23): 3604-3611.

[28] 陈雨菲, 曲淼, 张婧, 等. 基于络病学说从血络气络论治血管性痴呆[J]. 世界中医药, 2024, 19(9): 1276-1278, 1285.

[29] 杨梦琳, 刘霞, 张运辉, 等. 丹龙醒脑方对血管性痴呆大鼠神经血管单元及突触可塑性的影响[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(13): 2214-2224.

编辑:毕晓帆/接受日期:2026-04-14