DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.03.016

补中益气汤调节DNA甲基化酶影响SCH母鼠后代脑线粒体功能改善认知能力

陈巍[1,2],黄杨玲[1],付强[1],李晓钰[1],武跃华[2],马贤德[1],高天舒[3],贾连群[1],王佳[1]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034;
3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 研究补中益气汤对亚临床甲状腺功能减退(subclinical hypothyroidism,SCH)母鼠后代脑神经发育的影响并探讨其可能作用机制,同时比较了不同中药剂量与西药的疗效作用。方法 SD成年雌性大鼠,采用"甲状腺全切+术后左甲状腺激素(Leftothyroxine,L-T4)皮下注射"建立SCH模型。随机分为以下6组:假手术组、模型组、补中益气汤低剂量组(4.1 g/kg·d)、补中益气汤中剂量组(8.19 g/kg·d)、补中益气汤高剂量组(16.38 g/kg·d)、优甲乐组(4.5 μg/kg·d),完成SCH大鼠模型后与正常的雄鼠合笼交配,交配前2周开始给药直至取材。取材为孕13 d(E13)胎盘组织、出生后7 d(P7)仔鼠脑组织,21 d(P21)仔鼠行水迷宫实验。放射免疫法(Radioimmunoassay,RIA)检测血清中T4(T4);酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测血清中促甲状腺激素(Thyroid stimulating hormone,TSH);电镜观察脑组织线粒体形态学;采用2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针法检测细胞内ROS;比色法检测线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性;蛋白质印迹(Western blotting,Wb)方法检测DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)DNMT1、DNMT3a、DNMT3b,及DNA去甲基化酶10-11易位蛋白(ten-eleven-translocation protein,TET)TET1、TET2。结果 与假手术组比较,模型组大鼠血清促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone,TSH)水平明显升高、P21 d仔鼠Morris水迷宫成绩显著下降、电镜下神经元线粒体形态破坏;E13 d胎盘组织和P7 d仔鼠脑组织中活性氧(ROS)水平升高、线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性降低,P7 d脑组织促甲基化DNMT1、DNMT3a及DNMT3b蛋白灰度值下降、甲基化反向调节TET1、TET2蛋白水平上升。与模型组比较,补中益气汤中剂量组和高剂量组及西药组可降低SCH大鼠升高的TSH水平、改善P21 d仔鼠Morris水迷宫成绩、降低脑组织中ROS水平及线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性,改善仔鼠神经元线粒体的形态,升高甲基化DNMT1、DNMT3a及DNMT3b蛋白灰度值水平、降低甲基化反向调节TET1、TET2蛋白水平。结论 补中益气汤可改善SCH母鼠后代仔鼠的学习记忆能力,其机制可能与调节甲基化进而改善线粒体能量代谢水平恢复线粒体功能有关。

关键词:妊娠亚临床甲减;仔鼠脑发育;补中益气汤;线粒体能量代谢;甲基化
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)03-0096-09

Effect of Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) on Brain Mitochondrial Function to Improve Cognitive Ability in The Offsprings of Maternal SCH Rats through Regulating DNA Methyltransferase

CHEN Wei[1,2],HUANG Yangling[1],FU Qiang[1],LI Xiaoyu[1],WU Yuehua[2],MA Xiande[1],GAO Tianshu[3],JIA Lianqun[1],WANG Jia[1]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110034,Liaoning,China;
3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To study the effect of Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) on the neural development of the offsprings of subclinical hypothyroidism(SCH) rats and explore its possible mechanism of action. At the same time,to compare the therapeutic effects of different doses of traditional Chinese medicine and Western medicine. *Methods* Adult female SD rats were used to establish an SCH model using total thyroidectomy and postoperative subcutaneous injection of L-T4,and the rats were randomly divided into the following 6 groups:sham surgery group,model group,low-dose group of Buzhong Yiqi Decoction[4.1 g/(kg·d)],medium dose group of Buzhong Yiqi Decoction[8.19 g/(kg·d)],high-dose group of Buzhong Yiqi Decoction

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82004340);辽宁省教育厅高等学校基本科研项目(面上项目)(2100221283);辽宁省教育厅科学研究经费项目(面上项目)(LJKZ0877)
作者简介:陈巍(1980-),女,辽宁铁岭人,主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治内分泌代谢病。
通讯作者:贾连群(1975-),女,辽宁营口人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:jlq-8@163.com。
王佳(1984-),女,辽宁沈阳人,主治医师,博士后在站,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:461228348@qq.com。

[16.38 g/(kg·d)], euthyrox group[4.5 μg/(kg·d)]. After completing the SCH model, the model rats mated with normal male rats in a cage, and started administration 2 weeks before mating until sample collection. The samples were taken out from placental tissue at day 13 of pregnancy(E13) and brain tissue from offsprings at day 7 after birth(P7). Water maze experiments were performed on offsprings at day 21. Radioimmunoassay(RIA) method was used to detect total thyroxine(T4) in serum. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect thyroid stimulating hormone(TSH) in serum. The mitochondrial morphology of brain tissue was observed through electron microscopy. Intracellular reactive oxygen species(ROS) was detected by DCFH-DA probe method. Mitochondrial DNA copy number was detected by using RT-PCR. DNA methyltransferase(DNMT)1, DNMT3a, DNMT3b, ten-eleven-translocation protein(TET)1 and TET2 were detected by the Western blotting(Wb) method. *Result* Compared with those of the sham surgery group, the serum TSH levels of the model group were significantly increased, the Morris water maze scores of the 21-day offspring rats were significantly decreased, and the morphology of neuronal mitochondria was damaged under electron microscopy. On day 13, the levels of ROS increased and the activities of mitochondrial respiratory chain complexes Ⅰ and Ⅱ decreased in placental tissue and brain tissue of 7-day offspring rats. On day 7, the grayscale values of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b proteins promoted methylation in brain tissue decreased, and the levels of TET1 and TET2 proteins regulated by reverse methylation increased. Compared with those of the model group, the medium dose and high dose groups of Buzhong Yiqi Decoction as well as the Western medicine group can reduce the elevated TSH levels in SCH rats, improve Morris water maze performance in 21-day offspring rats, reduce ROS levels and mitochondrial respiratory chain complex Ⅰ and Ⅱ activity in brain tissue, improve the morphology of neuronal mitochondria in offspring rats, increase the grayscale values of methylated DNMT1, DNMT3a and DNMT3b proteins, and reduce the levels of TET1 and TET2 proteins regulated by reverse methylation. *Conclusion* Buzhong Yiqi Decoction can improve the learning and memory abilities of offsprings of maternal SCH rats, and its mechanism may be related to regulating methylation to improve mitochondrial energy metabolism and restore mitochondrial function.

Keywords: subclinical hypothyroidism during pregnancy; brain development of rat offspring; Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤); mitochondrial energy metabolism; methylation

妊娠期亚临床甲减(subclinical hypothyroidism, SCH)可导致胎儿神经智力发育损伤[1-3],有研究显示其发病与外周组织甲状腺激素(thyroid hormone, TH)缺乏导致的神经细胞分化、迁移、突触形成异常有关。TH 对神经发育具有重要的作用,轻微 TH 水平波动就可引起神经发育的异常,但目前对 TH 影响脑发育确切的机制尚未完全明了。已知 TH 对线粒体功能有重要调节作用,临床研究发现妊娠期 SCH 母体线粒体功能损伤是造成后代阿氏评分低的重要影响因素[4-5]。动物实验研究显示补中益气汤可以改善脾虚模型大鼠肝脏、胃组织中线粒体的能量代谢,但是否对 SCH 母体后代脑发育损伤有影响目前还没有报道。因此,本研究采用"甲状腺全切+左甲状腺激素(Leftothyroxine, L-T4)皮下注射"建立 SCH 母鼠模型,拟从线粒体能量及甲基化代谢角度阐述补中益气汤对 SCH 母鼠后代仔鼠脑发育的治疗效果及作用机制,为中医药治疗本病提供研究基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠,体质量为(180±10)g,共 80 只,购于北京华富康生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0008,饲养于辽宁中医药大学清洁级动物实验中心,室温 22~25 ℃,相对湿度 40%~50%。所有动物经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准,动物伦理号:21000042021093。

1.2 药物

补中益气汤:黄芪 18 g,白术 9 g,甘草 9 g,人参 6 g,陈皮 6 g,升麻 6 g,柴胡 6 g,当归 3 g,购于辽宁中医药大学附属第二医院(亳州三峰中药饮片有限公司,批号分别为白术 23001、黄芪 240101、甘草 230101、人参 220801、当归 231001、柴胡 236230601、陈皮 231102、升麻 230301)。按国家炮制标准进行炮制后,原药材加 5 倍量双蒸水,煮 2 次合并滤液,100 ℃恒温水浴加热浓缩,浓缩成含生药浓度 2.0 g/mL 的汤剂,置于 4 ℃冰箱备用;左甲状腺素钠片[优甲乐,默克雅柏药业(中国)有限公司,批准文号 H20140052]50 μg/片,将片剂碾碎后溶于蒸馏水中制浓度为 2.0 g/mL 的混悬液;L-T_4 针剂:L-T_4(Sigma USA,批号:XW00514891),用 0.9% NS 配制成浓度为 0.95 μg/mL 的针剂。

1.3 试剂

大鼠甲状腺素(thyroxine, T4)放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号 20220613);大鼠 TSH 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(德国 LDN, ARE-8600-48t/E13);DCFH-DA 探针(上海碧云天生物技术有限公司,S0033S);大鼠 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase1, DNMT1)、DNA 甲基转移酶 3a(DNA methyltransferase3a, DNMT3a)、DNA 甲基转移酶 3b(DNA methyltransferase3b, DNMT3b),及 DNA 去甲基化酶 10-11 易位蛋白 1(ten-eleven-translocation protein1, TET1)、DNA 去甲基化酶 10-11 易位蛋白 2(ten-eleven-translocation protein2, TET2)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 AF5150、AF1732、AF1384、AF8118、AF8119);Trizol 液(Invitrogen 生产,批号 15596026);线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所生产,批号分别为 A089-1-1、A089-2-1)。

1.4 仪器

TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);MT-200 Morris 水迷宫、Morris 水迷宫动态图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);DM LS2 生物数码显微镜(德国徕卡公

司);H7650 透射电子显微镜(日本电子株式会社);EPS300 电泳仪(上海天能科技有限公司);DYCP-40E 垂直电泳槽(北京市六一仪器厂);DYCP-40E 转印电泳槽(北京市六一仪器厂);BIO-RAD 梯度 PCR 仪(美国伯乐公司);4200SF 凝胶成像分析仪(上海天能生产);紫外分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司);GL-21MC 低温高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);WD-9405B 水平摇床(北京六一仪器厂);HXP-9052MBE 电热恒温培养箱(上海博讯公司医疗设备);FSH-Ⅱ高速电动匀浆机(江苏金坛市环宇科学仪器);anthos 2010 全自动酶标仪(奥地利 Anthos Labtec Instruments)。

2 方法

2.1 动物模型构建

120 只 SD 雌性大鼠,随机抽取 8 只作为正常对照组采用假甲状腺切除手术,仅暴露甲状腺而不伤及甲状腺,随后缝合,普通饲料加蒸馏水饲养。其余 102 只采用其"甲状腺全切+术后 L-T_4(0.95 μg/100 g·d)皮下注射[6]"制备 SCH 大鼠模型。术后饲以普通饲料和高钙水(0.1% Ca^{2+})预防术后缺钙。1 个月后测定甲状腺功能以验证 SCH 模型,正常对照组大鼠血清 TSH 水平均值的 90% 置信区间:0.014~0.020 mU/L、血清 TT4 水平均值的 90% 置信区间:85.3~158.3 μg/mL。以此作为评价 TSH 及 TT4 标准,造模成功 SCH 大鼠模型为 90 只,成功率为 93.75%。后与正常的雄鼠合笼交配,雌∶雄=2∶1,当雌鼠阴道涂片镜下发现精子确定为妊娠 0 d,记为 E0。在 E0-E13,继续予 L-T4 0.95 μg/(100 g·d)皮下注射,自 E13d 始 L-T4 剂量调整为 1.00 μg/(100 g·d),持续皮下注射至仔鼠出生。

2.2 分组及给药

手术组随机分为 5 组(每组 8 只),加上之前的正常对照组共分为 6 组。按每千克大鼠体质量每日剂量=成人用药剂量÷70 kg×6.25;西药 L-T_4 给药剂量参考文献报道[5-7]4.5 μg/(kg·d),均采用灌胃的给药方法。即:①正常对照组:约等体积 5 mL 生理盐水灌胃;②模型组:同假手术组;③中药低剂量组:4.10 g/(kg·d)灌胃;④中药中剂量组:8.19 g/(kg·d)灌胃;⑤中药高剂量组:16.38 g/(kg·d)灌胃;⑥西药组:予左甲状腺素片混悬液 4.5 μg/(kg·d)灌胃。孕前 2 周给药直至生产,灌胃期间大鼠饲料、饮水、称重及 L-T_4 针剂处理同造模中所述之情形。取材,取 E13 d 母鼠胎盘及 P7 d 仔鼠脑组织、血清。实验流程见图 1。

2.3 实验方法

学习记忆能力检测(Morris 水迷宫实验)取出生后 21 d 仔鼠(P21)行 Morris 水迷宫实验,采用 Nunez J 的检测方法[8]。测试内容包括定位巡航和空间探索。测试前先对仔鼠行水迷宫训练,具体步骤为:①平台放置在水池中心并高于水平面 1.5 cm,使仔鼠能看见平台,水温在 26 ℃左右;②每只仔鼠训练 3 次,每次入水前将红布条套在仔鼠的后背(计算机软件对红色分辨率高),便于识别。③设置水池壁四个入水点(N、S、E、W)并做好标记,选择其中一个入水点,面向池壁从入水点处放入,让仔鼠在 60 s 内搜索平台;④如果在 60 s 内没有找到平台则记录为 60 s,引导仔鼠找到平台并休息 10 s;⑤每个入水点重复上述训练步骤 3 次,共 4 个入水点,每只仔鼠共完成 12 次训练;⑥每只仔鼠依照上述步骤完成训练。

2.3.1 定位巡航测试 ①水温保持 26 ℃,水池内放入脱脂奶粉,调低平台高度在水面下 1.5 cm,使大鼠不能看见平台;②将大鼠从入水点面向水池壁放入水中,实验人员坐回到电脑前,从电脑屏幕观察大鼠的情况,并记录大鼠找到平台的时间,如果大鼠在 60 s 内没有找到平台,则记录为 60 s,由实验人员引导大鼠到平台,所有大鼠到达平台后在平台上休息 10 s,擦干后放回鼠笼。③每只大鼠共测试 12 次,每个入水点测试 3 次,共 4 个入水点(N、S、E、W),每次测试持续 60 s。第一次按 N、S、E、W 顺序,第二次按 S、W、E、N 顺序,第三次按 N、W、S、E 顺序,每次入水时间间隔不少于 10 min。

2.3.2 空间探索 撤掉平台,所有大鼠入水点选择在 N 点,记录 30 s 内大鼠穿越平台的次数,以及找到平台的时间。

2.3.3 实验步骤 放射免疫分析法(Radioimmunoassay,RIA)检测血清 T_4,血清标本交由中国医科大学放射免疫科检测。见插页 XXV 图 1。

酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测大鼠血清 TSH,按试剂盒说明书操作步骤完成。

透射电镜下观察脑组织线粒体的形态学特征。取 P7 d 仔鼠,置于断头器下断头并立即放于冰盘上分离出脑组织,用预冷的 4 ℃ 0.9% 生理盐水冲洗,滤纸吸干,留取海马组织,于电镜固定液内避光固定 2 h,锇酸固定、脱水、浸透、饱和醋酸铀及柠檬酸铅染色、包埋,制成 80 nm 超薄切片,于透射电镜下观察海马神经细胞线粒体超微结构变化。

采用 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针法检测 E13 d 胎盘组织及 P7 d 脑细胞内活性氧(Reactive oxygen species,ROS);比色法检测仔鼠脑组织中线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ;蛋白质印迹(Western blotting,Wb)检测 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、TET1、TET2 相关蛋白表达提取各组脑组织总蛋白,BCA 法检测蛋白定量,分离目的蛋白,封闭液封闭,在孵育盒中加入一抗,放入 4 ℃冰箱,过夜。经 TBST 洗 3×10 min 后放入二抗(1∶5000)孵育 1 h,再用 TBST 洗,用 ECL 显色法显色曝光。采用 Image j 软件进行蛋白条带灰度值分析。

血清谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase,ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase,AST)、谷氨酰转移酶(Glutamyltransferase,GGT)、肌酐(creatinine,CREA)指标送至辽宁中医药大学附属第二医院临床检验中心完成。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行数据统计。采用单因素方差分析,方差齐应用 Tukey HSD 方法,方差不齐应用 Dunnett T3 方法;Morris 水迷宫实验中定向巡航实验数据采用重复测量方差分析。

3 结果

3.1 雌鼠 SCH 模型评价

与假手术组比较,模型组 TSH 水平高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$),TT4 水平与假手术组差异无统计学意义($P>0.05$),说明 SCH 造模成功。见表 1。

表 1 各组大鼠 TSH、TT4 指标检测

组别	n	TSH/(μIU·mL^{-1})	TT4/(ng·mL^{-1})
模型组	8	137.349(114.7,163.2)[a]	142.885(118.1,167.5)
假手术组	8	102.495(82.9,106.1)	152.440(131.7,168.8)

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$。

3.2 雌鼠妊娠评价

合笼后第 2 日雌鼠阴道涂片镜下发现精子确定为妊娠 0 d。见插页 XXV 图 2。

4 疗后安全性指标

各组雌鼠血清肝功、肾功指标比较与假手术组相比，各组大鼠血清 ALT、AST、GGT、CREA 指标各组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果提示补中益气汤对大鼠肝肾功能无损伤。见表 2。

5 疗效指标

5.1 各组仔鼠 Morris 水迷宫定位巡航及空间探索测定指标比较

（1）各组仔鼠逃避潜伏期结果。

各组仔鼠第 1、2、3、4、5 天逃避潜伏期比较，经方差分析，结果：第 1、2 天各组间差异无统计学意义（$P>0.05$）；第 3、4、5 天各组仔鼠的逃避潜伏期比较差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。与假手术组相比，模型组逃避潜伏期延长（$P<0.05$）；与模型组相比，补中益气汤中剂量组、高剂量组及优甲乐组逃避潜伏期缩短（$P<0.05$）；各治疗组组间比较，补中益气汤中剂量组逃避潜伏期明显缩短（$P<0.05$）。见表 3。

（2）各组仔鼠空间探索结果。

空间探索实验结果显示，各组仔鼠穿越平台次数比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。与假手术组相比，模型组仔鼠跨平台次数显著减少（$P<0.05$）；与模型组相比，各治疗组仔鼠跨平台次数显著增多，（$P<0.05$）。结果提示补中益气汤中剂量组、补中益气汤高剂量组及优甲乐组可改善 SCH 后代仔鼠的记忆能力。见表 4。

5.2 给药后各组大鼠血清甲功指标

与假手术组比较，模型组 TSH 水平增高（$P<0.05$）；与模型组比较，补中益气汤中剂量、高剂量、优甲乐组 TSH 水平降低（$P<0.05$）；与补中益气汤中剂量组比较，补中益气汤低剂量组、补中益气汤高剂量组、优甲乐组 TSH 均升高（$P<0.05$）。TT4 水平各组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果提示补中益气汤中剂量组可有效恢复大鼠甲状腺功能。见表 5。

5.3 疗后各组仔鼠 P7 d 海马 CA1 区线粒体形态学观察

与假手术组比较，模型组 P7 d 仔鼠海马组织线粒体数量减少，线粒体肿胀破裂甚或萎缩，双层膜结构不清晰，嵴膜断裂、消失，嵴表面颗粒脱失；与模型组比较，补中益气汤中剂量组线粒体形态则较为完整，线粒体数量增多，能清晰地观察到嵴和双层膜结构，嵴表面颗粒完整。补中益气汤低剂量组及优甲乐组线粒体恢复较差。结果提示补中益气汤能很好地恢复线粒体形态。见插页 XXVI 图 3。

5.4 疗后各组 E13 胎盘组织、仔鼠 P7 脑组织线粒体 ROS 结果

与假手术组比较，模型组 E13 d 胎盘组织和仔鼠 P7 d 脑组织中线粒体 ROS 水平均升高（均 $P<0.05$）；与模型组相比较，补中益气汤中剂量组、高剂量组及优甲乐组线粒体 ROS 水平下降（均 $P<0.05$）；与补中益气汤中剂量组比较，E13 d 补中益气汤高剂量组、补中益气汤低剂量组线粒体 ROS 水平明显升高，提示补中益气汤中剂量组在 E13 d 改善胎盘组织 ROS 水平优于低、高剂量组（均 $P<0.05$）；P7 d 补中益气汤高剂量组、补中益气汤低剂量组、优甲乐组脑组织线粒体 ROS 水平明显升高（均 $P<0.05$），提示补中益气汤中剂量组疗效最优。见表 6。

5.5 疗后各组 E13 d 胎盘组织，仔鼠 P7 d 脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ酶活性

与假手术组比较，模型组 E13 d 胎盘组织和 P7 d 脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性降低（均 $P<0.05$）；与模型组比较，各治疗组 E13 d 胎盘组织和 P7 d 脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性均升高（均 $P<0.05$）；与补中益气汤中剂量组比较，补中益气汤低剂量组、补中益气汤高剂量组、优甲乐组分别在 E13 d 胎盘组织、P7 d 仔鼠胎盘组织及脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅱ活性降低，在 P7 d 补中益气汤中剂量组改善度大于补中益气汤低剂量组及高剂量组（$P<0.05$）。见表 7。

5.6 各组仔鼠 P7 d 脑组织 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、TET1、TET2 蛋白表达

与假手术组比较，模型组脑组织中 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 的蛋白灰度值下降（均 $P<0.05$），TET1、TET2 的蛋白水平上升（均 $P<0.05$）；与模型组相比，补中益气汤低剂量组、补中益气汤中剂量组、补中益气汤高剂量组及优甲乐组脑组织中 DNMT1、DNMT3b 的蛋白灰度值上升，TET1、TET2 的蛋

表 2 各组大鼠血清肝功、肾功指标（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	剂量/（mg·kg^{-1}）	ALT/（U·L^{-1}）	AST/（U·L^{-1}）	GGT/（U·L^{-1}）	CREA/（μmol·L^{-1}）
假手术组	8	-	49.17±11.16	122.67±26.32	0.50±0.55	29.17±6.43
模型组	8	-	54.50±10.37[a]	118.00±25.33[a]	0.17±0.41[a]	30.00±6.07[a]
补中益气汤低剂量组	8	4.1	53.17±14.02[a]	133.83±36.76[a]	-0.17±0.41[a]	30.17±7.70[a]
补中益气汤中剂量组	8	8.19	45.17±3.66[a]	104.00±10.64[a]	0.17±0.75[a]	24.17±1.17[a]
补中益气汤高剂量组	8	16.38	48.17±9.20[a]	115.50±26.32[a]	-0.33±0.52[a]	32.00±5.02[a]
优甲乐组	8	0.004 5	54.50±12.88[a]	121.67±29.24[a]	0.17±0.41[a]	30.83±7.03[a]

注：a 与假手术组比较，$P>0.05$。

表 3 补中益气汤对仔鼠逃避潜伏期影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	剂量/（mg·kg^{-1}）	第 1 天/（s）	第 2 天/（s）	第 3 天/（s）	第 4 天/（s）	第 5 天/（s）
假手术组	8	-	46.30±3.44	46.80±1.72	33.50±1.87	26.00±2.10	18.10±3.87
模型组	8	-	47.17±1.47	47.00±1.90	43.00±3.14[a]	40.00±1.38[a]	35.00±2.42[a]
补中益气汤低剂量组	8	4.1	47.50±1.38	46.67±1.21	43.17±3.60[a,c]	37.33±3.33[a,b,c]	33.00±3.22[a,c]
补中益气汤中剂量组	8	8.19	47.33±1.63	47.33±1.21	36.83±1.47[a,b]	32.83±1.47[a,b]	23.67±3.14[a,b]
补中益气汤高剂量组	8	16.38	47.33±1.37	46.33±1.51	39.83±3.66[a,b]	37.50±2.43[a,b]	30.00±6.90[a,b]
优甲乐组	8	0.004 5	47.17±1.47	47.33±1.37	37.83±1.17[a,b]	33.50±3.08[a,b]	24.17±2.79[a,b]

注：a 与假手术组比较，$P<0.05$；b 与模型组比较，$P<0.05$；c 与补中益气汤中剂量组比较，$P<0.05$。

表 4 P21 d 补中益气汤对仔鼠空间探索影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	跨越平台次数/(次)
假手术组	8	-	10.50 ± 3.73
模型组	8	-	1.50 ± 0.55^{a,c}
补中益气汤低剂量组	8	4.10	2.83 ± 0.98^{a,c}
补中益气汤中剂量组	8	8.19	6.83 ± 2.79^{a,b}
补中益气汤高剂量组	8	16.38	6.67 ± 2.16^{a,b}
优甲乐组	8	0.004 5	6.67 ± 1.37^{a,b}

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。

表 5 补中益气汤对 SCH 母鼠甲功的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	TSH/(μIU·mL^{-1})	TT4/(ng·mL^{-1})
假手术组	8	-	77.71 ± 4.45	155.51 ± 55.04
模型组	8	-	280.82 ± 12.48^{a}	133.88 ± 22.21
补中益气汤低剂量组	8	4.1	209.96 ± 30.16^{a,c}	141.92 ± 7.15
补中益气汤中剂量组	8	8.19	87.93 ± 15.80^{b}	144.10 ± 20.42
补中益气汤高剂量组	8	16.38	92.16 ± 15.50^{b,c}	143.86 ± 32.81
优甲乐组	8	0.004 5	140.68 ± 19.03^{b,c}	147.04 ± 19.75

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。

表 6 补中益气汤对 E13 d 胎盘组织线粒体、P7 d 脑组织线粒体 ROS 水平影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	ROS(E13)	ROS(P7)
假手术组	8	-	2 180.78 ± 65.47	2 202.67 ± 72.99
模型组	8	-	5 342.61 ± 45.77^{a,c}	5 365.78 ± 68.44^{a}
补中益气汤低剂量组	8	4.10	4 933.94 ± 812.15^{a,b,c}	4 889.17 ± 306.87^{b,c}
补中益气汤中剂量组	8	8.19	3 747.37 ± 629.04^{a,b}	3 146.15 ± 267.97^{b}
补中益气汤高剂量组	8	16.38	4 401.83 ± 273.43^{a,b,c}	3 840.59 ± 151.46^{b,c}
优甲乐组	8	0.004 5	3 566.22 ± 277.94^{a,b}	3 479.48 ± 171.75^{b,c}

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。

表 7-1 补中益气汤对 E13 d 胎盘组织、P7 d 仔鼠脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅰ影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	Comples Ⅰ(E13)	Comples Ⅰ(P7)
假手术组	8	-	23.87 ± 1.41	23.68 ± 1.11
模型组	8	-	13.02 ± 0.38^{a,a}	12.20 ± 0.47^{a}
补中益气汤低剂量组	8	4.10	13.15 ± 0.64^{a,b,c}	12.96 ± 0.61^{a,c}
补中益气汤中剂量组	8	8.19	20.72 ± 1.07^{a,b}	20.57 ± 0.86^{a,b}
补中益气汤高剂量组	8	16.38	18.24 ± 0.84^{a,b}	18.95 ± 0.42^{a,b,c}
优甲乐组	8	0.004 5	19.73 ± 0.87^{a,b}	20.06 ± 1.31^{a,b}

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。

表 7-2 补中益气汤对 E13 d 胎盘组织、P7 d 仔鼠脑组织线粒体呼吸链复合物Ⅱ影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	Comples Ⅱ(E13)	Comples Ⅱ(P7)
假手术组	8	-	33.73 ± 1.31^{b}	32.95 ± 1.33^{b}
模型组	8	-	22.08 ± 1.76^{a}	21.49 ± 1.00^{a}
补中益气汤低剂量组	8	4.10	21.98 ± 1.31^{a,c}	20.86 ± 0.45^{a,c}
补中益气汤中剂量组	8	8.19	29.06 ± 0.76^{a,b}	29.56 ± 1.10^{a,b}
补中益气汤高剂量组	8	16.38	25.79 ± 3.22^{a,b,c}	26.39 ± 2.74^{a,b,c}
优甲乐组	8	0.004 5	29.12 ± 1.63^{a,b}	29.49 ± 1.91^{a,b}

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。

白灰度值下降(均 $P<0.05$),补中益气汤中剂量组、补中益气汤高剂量组及优甲乐组 DNMT3a 的蛋白灰度值下降(均 $P<0.05$);与补中益气汤中剂量组比较,补中益气汤高剂量组、补中益气汤低剂量组、优甲乐组 DNMT1、DNMT3b、DNMT3a 的蛋白灰度值降低(均 $P<0.05$),TET1、TET2 的蛋白灰度值上升(均 $P<0.05$)。见表 8、图 4。

6 讨论

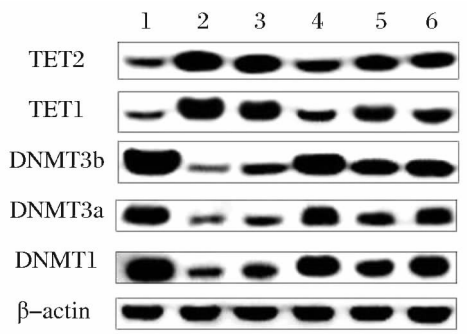
妊娠期 SCH 脑组织低甲状腺激素水平(TH)状态是后代脑发育损伤的重要原因之一,TH 参与线粒体的能量代谢[8-12],在线粒体的内膜、基质中均发现了 TH 的受体,而线粒体活性氧(ROS)增加和线粒体呼吸链复合物酶活性降低是线粒体能量代谢异常重要指标之一,也是线粒体损伤的重要标志。细胞内的 ROS 主要由线粒体电子传递链上的电子传递复合物(ETC)产生,高水平的 ROS 可直接损伤线粒体[13]。有研究显示,在妊娠 SCH 患者血清及胎盘中可见到线粒体肿胀、变形、ROS 增多,通过调节 TH 对胎盘线粒体 DNA 甲基化具有重要作用[14]。因此妊娠期 SCH 母体中存在线粒体功能异常,与 TH 水平降低有关。

线粒体是半自主性的细胞器,受表观遗传学(甲基化)的修饰。近年发现线粒体 DNA(mtDNA)甲基化在影响神经细胞发育及在神经疾病中具有重要作用。DNMT3a 和 DNMT3b 为形成甲基化的转移酶,其中 DNMT3 在成熟的神经元内高表达,此指标可以观察出生后仔鼠的神经元活动情况。DNMT1 为维持甲基化的转移酶,具有线粒体定位序列(MTS)并引导新合成的多肽链移位到线粒体基质中,定位在线粒体中的 DNMT(mtDNMT1)与线粒体 DNA(mtDNA)结合,调控线粒体基因组编码基因及核基因组编码基因的表达,参与早期的胚胎发育[15-16]。TET 蛋白属于 DNA 甲基胞嘧啶双加氧酶 TET 家族,是重要的 5mC 转变成 5hmC 的中间蛋白,5mC 在 TET 甲基胞嘧啶双加氧酶的作用下氧化形成 5hmC[17-18],TET1、TET2 存在于皮层和海马神经元的线粒体内,在不同的脑区随着年龄的增长存在差异[19]。

表 8 补中益气汤对 P7 d 仔鼠脑组织 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、TET1、TET2 蛋白表达影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	TET2/β-actin	TET1/β-actin	DNMT3b/β-actin	DNMT3a/β-actin	DNMT1/β-actin
假手术组	8	-	0.45 ± 0.01	0.34 ± 0.01	1.61 ± 0.01	1.12 ± 0.23	1.45 ± 0.02
模型组	8	-	1.18 ± 0.00^{a}	1.19 ± 0.00^{a}	0.22 ± 0.00^{a}	0.34 ± 0.07^{a}	0.42 ± 0.01^{a}
补中益气汤低剂量组	8	4.10	1.00 ± 0.00^{b,c}	0.91 ± 0.01^{b,c}	0.28 ± 0.01^{b,c}	0.35 ± 0.03^{c}	0.51 ± 0.01^{b,c}
补中益气汤中剂量组	8	8.19	0.68 ± 0.01^{b}	0.51 ± 0.01^{b}	1.11 ± 0.01^{b}	0.83 ± 0.17^{b}	0.88 ± 0.03^{b}
补中益气汤高剂量组	8	16.38	0.87 ± 0.01^{b,c}	0.75 ± 0.01^{b,c}	0.76 ± 0.00^{b,c}	0.61 ± 0.13^{b}	0.64 ± 0.02^{b,c}
优甲乐组	8	0.004 5	0.75 ± 0.01^{b,c}	0.55 ± 0.00^{b,c}	0.73 ± 0.00^{b,c}	0.70 ± 0.14^{b}	0.76 ± 0.03^{b,c}

注:a 与假手术组比较,$P<0.05$;b 与模型组比较,$P<0.05$;c 与补中益气汤中剂量组比较,$P<0.05$。



注:1. 对照组;2. 模型组;3. 补中益气汤低剂量组;4. 补中益气汤中剂量组;5. 补中益气汤高剂量组;6. 优甲乐组。

图 4 补中益气汤对 P7 d 仔鼠脑组织 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、TET1、TET2 蛋白表达影响($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

妊娠期 SCH 后代脑发育损伤目前中医尚无理论论述。对非妊娠期 SCH 发病的病因认为以饮食水土失宜、情志不畅多见,也与先天禀赋、体质密切相关,各家多从脾虚、肾虚或脾肾两虚论治。因妊娠 SCH 可出现胎动不安、滑胎、后代认知功能减退等情况,加之妊娠的特殊生理特性是以气血为用,故我们认为本病的病因病机为母体脾失健运,脾不升清,化源不足,而至胎失所养。《脾胃论·脾胃盛衰论》曰:"百病皆由脾胃衰而生也,内伤脾胃,百病由生"。我们提出,妊娠期 SCH 后代脑发育异常发病的重要中心环节为母体"脾虚"致子代"元神失养",治疗上以补后天、实先天"健脾益气"为治疗原则。补中益气汤是"健脾益气"的代表方剂,出自李东垣《脾胃论》,其中黄芪补中益气为君药,人参、白术、甘草健脾益气为臣药,配陈皮调理气机,升麻、柴胡升举清阳,共为使药,该方具有"补中益气,升阳举陷"之功效,故选用补中益气汤干预妊娠 SCH 致后代脑发育异常的治疗。

Morris 水迷宫是评价大鼠学习记忆能力体现认知功能情况的重要指标,包括定位巡航和空间探索两部分。人类儿童时期脑发育相当于仔鼠出生后 21 d(P21),此时脑发育同样对 TH 敏感,其发育仍受孕期神经发育的影响,P21 仔鼠刚刚具备 Morris 水迷宫的能力,此时适合评估仔鼠的认知功能。我们的研究结果显示,妊娠期 SCH 雌鼠的仔鼠在出生后 P21 存在 Morris 水迷宫成绩的降低,提示存在认知功能的损伤,补中益气汤能明显提高仔鼠的水迷宫成绩。

在人类妊娠早期(相当于大鼠孕 13 d),胎儿所需的 TH 完全依赖于母体,此期脑发育主要是脑神经元的倍增及大脑皮质神经元迁移。而人类孕中晚期及出生时(相当于仔鼠出生后 7 d),TH 来源于母体及自身,主要是神经胶质发生和髓鞘成熟期。因 E13 d 胎鼠无法分辨脑组织,因此我们在实验过程中观察了 E13 d 的胎盘组织的线粒体情况及出生后 7 d 仔鼠脑组织线粒体及甲基化情况。

我们的研究结果显示,在 SCH 雌鼠 E13 d 胎盘组织中 ROS 水平增高同时线粒体呼吸链复合物酶活性降低,这一病理改变在出生后 P7 d 仔鼠脑组织中持续存在,进一步我们采用透射电镜观察 P7 d 仔鼠脑组织线粒体有不同程度线粒体形态结构的破坏,这一结论与国外 Anne - Dorthe、Novakovic 等"妊娠期 SCH 母体线粒体功能损伤是造成妊娠 SCH 后代阿氏评分低的重要影响因素"[20-21]的研究结论一致。补中益气汤可以很好地恢复线粒体功能损伤。

其次,我们检测了出生后 P7 d 仔鼠脑组织中与胚胎干细胞发育相关的甲基化指标 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b、TET1、TET2[22-24],研究结果显示在 SCH 雌鼠后代脑组织中 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 的蛋白灰度值下降,TET1、TET2 的蛋白水平上升,提示了 SCH 雌鼠后代脑组织存在去甲基化现象,但因检测样本为脑组织故尚不能证明该甲基化是来源于线粒体还是细胞核,尽管如此,我们发现补中益气汤能有效地双向调节这一现象,我们推测该甲基化来源于线粒体或细胞核,也可能存在线粒体 DNA 甲基化与细胞核甲基化互相作用的情况,这有待于进一步研究。

综上,补中益气汤能改善妊娠期 SCH 雌鼠后代的认知能力,其中补中益气汤中剂量组疗效最优,且优于西药优甲乐,其机制可能与调节甲基化进而改善线粒体能量代谢水平恢复线粒体功能、减少脑 ROS、调节甲状腺激素有关。由于脑线粒体提取量小,没能检测线粒体 DNA 甲基化的含量变化,不能更深层次地了解甲基化的具体位点,后续将在此方向进行完善。

参考文献

[1] HADDOW J E, PALOMAKI G E, ALLAN W C, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child[J]. N Engl J Med, 1999, 341(8): 549-555.

[2] LI Y, SHAN Z, TENG W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2010, 72(6): 825-829.

[3] 薛海波,李元宾,滕卫平,等. 妊娠早期母亲亚临床甲状腺功能减退症对其后代脑发育影响的前瞻性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(11): 916-920.

[4] ANNE-DORTHE, FELDTHUSEN, JACOB, et al. Pregnancy-induced alterations in mitochondrial function in euthyroid pregnant women and pregnant women with subclinical hypothyroidism; relation to adverse outcome[J]. Journal of Clinical & Translational Endocrinology, 2014, 1(1): 13-17.

[5] NOVAKOVIC, TANJA. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on amniotic fluid cells oxidative status[J]. Reproductive Toxicology, 2018, 7(78): 97-101.

[6] 于晓会,刘爱华,朱帅俊,等. 孕期亚临床甲减大鼠模型的建立[J]. 实用预防医学, 2015, 22(6): 686-688.

[7] CHOKSI K B, BOYLSTON W H, RABEK J P, et al. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2004, 1688(2): 95-101.

[8] CHEN D Y, LI L, REN F, et al. Maternal hypothyroidism during pregnancy alters the function of the retinol-binding protein 4-mediated mitochondrial permeability conversion pore in the kidneys of offspring rats[J]. Clinics (Sao Paulo), 2021, 76: 2096.

[9] NOLI L, KHORSANDI S E, PYLE A, et al. Effects of thyroid hormone on mitochondria and metabolism of human preimplantation embryos[J]. Stem Cells, 2019, 38(3): 3129.

[10] RAGHU RAMANATHAN, SOHUM A PATWA, AHMAD HASSAN Ali, et al. Thyroid hormone and mitochondrial dysfunction: therapeutic implications for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (masld)[J]. Cells, 2023, 12(24): 2415.

[11] VAMESU, BIANCA M, VAMESU, et al. Thyroid hormone modulates hyperoxic neonatal lung injury and mitochondrial function[J]. JCI Insight, 2023, 8(8): 280.

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.03.017

电针预处理基于 mTOR/NLRP3 信号通路改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制

姜春宏,贺丽丽,刘顺畅,白桦,顾一煌,李开平
(南京中医药大学,江苏 南京 210000)

摘要:目的 基于 mTOR/NLRP3 信号通路探讨电针预处理抗大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制。方法 70 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组、电针 + 生理盐水组,电针 + MHY1485(mTOR 激动剂)组,各 14 只。采用超声心动图评估大鼠心脏功能指标心室射血分数(LVEF)和左心室短轴缩短率分数(LVFS),苏木精 - 伊红(HE)染色法观察心肌组织病理学改变,酶联免疫吸附法(ELISA)检测心肌组织中肿瘤坏死因子 - α(TNF - α)水平变化,实时荧光定量 PCR(RT - qPCR)检测心肌组织中凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 - 1(Caspase - 1)、白细胞介素 - 1β(IL - 1β)、白细胞介素 - 18(IL - 18)的基因表达水平,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、NOD 样受体家族蛋白 3(NLRP3)及核因子 - κB(NF - κB)的表达水平。结果 与假手术组相比,模型组大鼠 FS、EF 值下降($P<0.05$);心肌组织出现肌纤维断裂、结构模糊、炎性细胞浸润等现象,心肌组织内 TNF - α 含量升高($P<0.05$),Caspase - 1、ASC、IL - 1β、IL - 18 的基因相对表达水平($P<0.05$)与 mTOR、NLRP3、NF - κB 的蛋白表达水平均上调($P<0.05$);与模型组相比,电针组大鼠 FS、EF 值上升($P<0.05$),心肌组织肌纤维结构改善,炎性细胞浸润减少,心肌组织内的 TNF - α 含量降低($P<0.05$),Caspase - 1、ASC、IL - 1β、IL - 18 的基因相对表达水平($P<0.05$)与 mTOR、NLRP3、NF - κB 的蛋白表达水平($P<0.05$)均下调;与电针 + 生理盐水组比,激动剂组大鼠心肌组织损伤加重,心肌组织内 TNF - α 含量升高($P<0.05$),Caspase - 1、ASC、IL - 1β、IL - 18 的基因相对表达水平($P<0.05$)与 mTOR 与 NLRP3、NF - κB 的蛋白表达水平($P<0.05$)均上调。结论 mTOR 激动剂 MHY1485 可减弱电针对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠心肌组织损伤的保护作用,电针预处理能减轻 MIRI 大鼠心肌细胞炎性反应,进而改善缺血再灌注引起的心肌组织损伤;因此推断电针预处理改善大鼠 MIRI 损伤的机制可能与 mTOR/NLRP3 信号通路有关。

关键词:心肌缺血再灌注损伤;电针预处理;炎症;mTOR/NLRP3 信号通路
中图分类号:R245.97 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)03-0102-08

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81974583)
作者简介:姜春宏(1997 -),女,山东烟台人,硕士在读,研究方向:中医养生方法技术研究与应用。
通讯作者:李开平(1967 -),男,安徽马鞍山人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医养生治未病的基础与研究。E-mail:lkp67@163.com。

[12] NA WONHO, FU LIEZHEN, LUU NGA, et al. Thyroid hormone directly activates mitochondrial fission process 1 (Mtfp1) gene transcription during adult intestinal stem cell development and proliferation in Xenopus tropicalis [J]. Gen Comp Endocrinol, 2020, 299:113590.
[13] 佟惊宇,姜钧文,孔德昭,等. 基于线粒体自噬理论探讨健脾祛痰化瘀法对动脉粥样硬化的治疗作用[J]. 实用中医内科杂志, 2023,37(2):46 - 49.
[14] JANSSEN B G, BYUN H M, ROELS H A, et al. Regulating role of fetal thyroid hormones on placental mitochondrial DNA methylation: epidemiological evidence from the ENVIRONAGE birth cohort study [J]. Clin Epigenetics, 2017, 9(1):66.
[15] SHOCK L S, THAKKAR P V, PETERSON E J, et al. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(9):3630 - 3635.
[16] REN L, ZHANG C, TAO L, et al. High - resolution profiles of gene expression and DNA methylation highlight mitochondrial modifications during early embryonic development[J]. Journal of Reproduction & Development, 2017, 63(3):247 - 261.
[17] 程易尘,吴晓明,罗瑛. TET 酶及其中间产物的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3):572 - 576.
[18] MOYON SARAH, FRAWLEY REBECCA, MARECHAL DAMIEN, et al. TET1 - mediated DNA hydroxymethylation regulates adult remyelination in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):3359.
[19] DAVAA GANCHIMEG, DAVAA GANCHIMEG, HONG JIN YOUNG, et al. Exercise Ameliorates Spinal Cord Injury by Changing DNA Methylation[J]. Cells, 2021, 10(1):143.
[20] 吴巧敏,常兴,张心爱,等. 基于线粒体能量代谢障碍探讨从脾肾论治动脉粥样硬化机制[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(4):58 - 61.
[21] UYSAL F, CINAR O, CAN A. Knockdown of Dnmt1 and Dnmt3a gene expression disrupts preimplantation embryo development through global DNA methylation[J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(12):1 - 10.
[22] 李静,于学文,杨洋,等. 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 DNA 低甲基化及机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(4):6.
[23] NOGUCHI H, MURAO N, KIMURA A, et al. DNA Methyltransferase 1 Is Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus[J]. J Neurosci, 2016, 36(22):6050 - 6068.
[24] WONG MARGARET, GERTZ BARRY, CHESTNUT BARRY A, et al. Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS[J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7:279.

补中益气汤调节 DNA 甲基化酶影响 SCH 母鼠后代脑线粒体功能改善认知能力

（正文见 96－102 页）

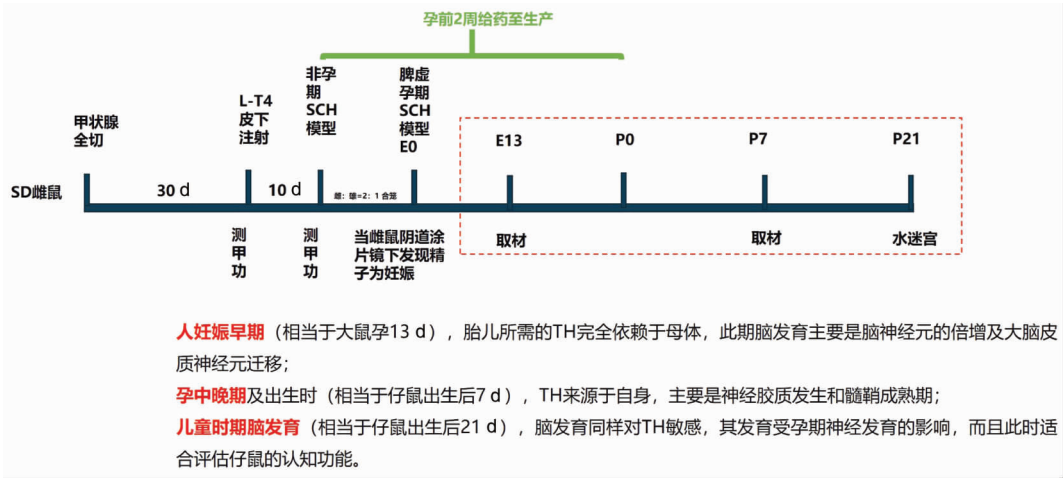


图 1　实验方案流程

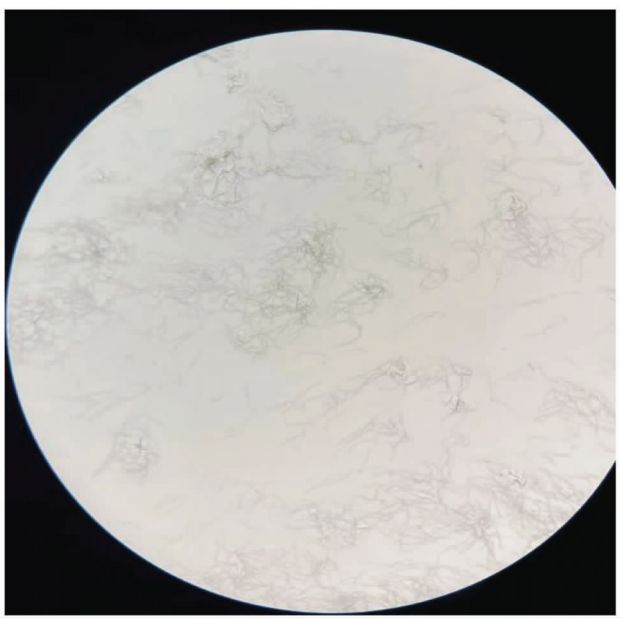


图 2　雌鼠显微镜下阴道涂片观察（光学显微镜 ×200）

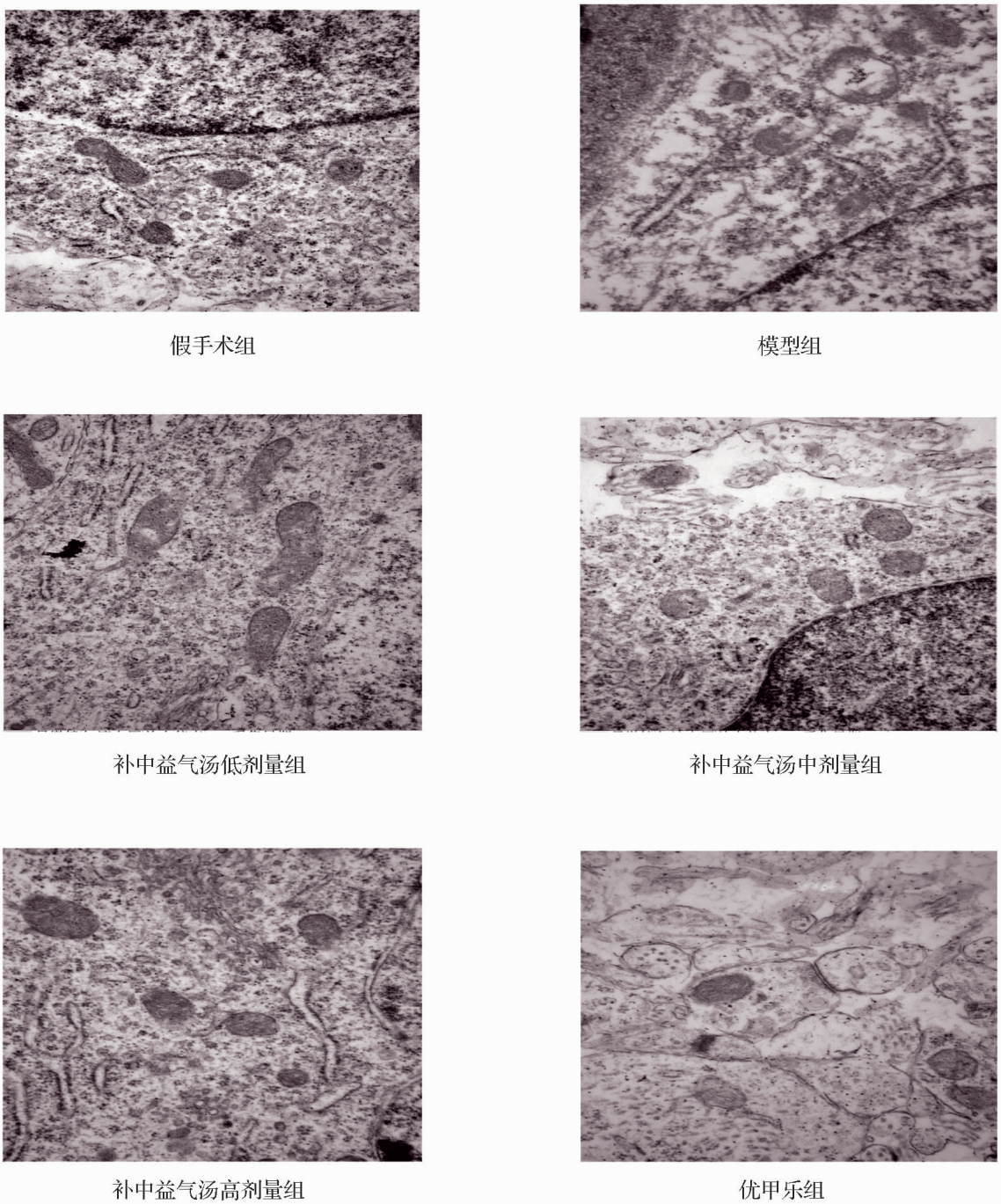


图 3 补中益气汤对 P7 d 仔鼠脑海马神经元线粒体影响(电镜 ×40 000)