DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.028

益肾活血通窍方对单侧前庭功能障碍大鼠小脑绒球区Glu－IR、GFAP和ERK1/2调控及突触重塑的影响

田雨[1],冷辉[2],石磊[2],王爱平[2],张琦[2],曲汝鹏[2],曲中源[2],马贤德[1]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨益肾活血通窍方对单侧前庭功能障碍大鼠患侧小脑绒球区的谷氨酸免疫反应物(Glutamate immunoreactivity,Glu－IR)、胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)和细胞外信号调节激酶1/2(Extracellular signal－regulated kinases 1 and 2,ERK1/2)的表达影响,以及对突触重塑发挥的作用机制。方法 将88只大鼠作为研究对象,通过随机分组筛选出空白组、假手术组、模型组、益肾活血通窍方低剂量组(9.20 g/kg)、益肾活血通窍方中剂量组(18.39 g/kg)、益肾活血通窍方高剂量组(36.78 g/kg)共6组。采用氯仿进行右耳鼓室注射法建立单侧前庭功能障碍大鼠模型,造模后,通过行为学评价、谷氨酸含量检测、免疫组化法、免疫荧光法和Western blot法,评估各组大鼠前庭功能和相关生物标志物的表达。结果 术后12 h,与假手术组及空白组比,模型组失衡行为评分及空间姿势反射明显升高,出现头偏斜、转圈异常神经损伤行为($P<0.01$),谷氨酸含量降低,Glu－IR蛋白表达降低,GFAP细胞增殖活化程度增多,排列紧密,细胞纤维突起程度增加,ERK1/2免疫荧光强度显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,益肾活血通窍方低剂量组、中剂量组、高剂量组谷氨酸含量增加,Glu－IR蛋白表达升高,GFAP细胞增殖活化程度降低,ERK1/2免疫荧光亮度表达降低,高剂量组表达最明显($P<0.05$)。术后7 d,与假手术组及空白组相比,模型组失衡行为评分和空间姿势反射消失,大鼠运动正常,头偏斜、转圈异常行为消失($P>0.05$),谷氨酸含量降低,Glu－IR蛋白表达降低,GFAP细胞增殖活化高,ERK1/2免疫荧光强度明显($P<0.05$)。与模型组相比,益肾活血通窍方低剂量组、中剂量组、高剂量组谷氨酸含量增加,Glu－IR蛋白表达升高,GFAP细胞增殖活化程度降低,ERK1/2免疫荧光亮度表达降低,高剂量组表达最明显($P<0.05$)。与术后12 h模型组相比,术后7 d模型组大鼠的谷氨酸含量升高,Glu－IR蛋白表达升高,GFAP细胞增殖活化程度降低,ERK1/2免疫荧光亮度表达降低($P<0.05$)。结论 益肾活血通窍方通过多靶点调控Glu－IR、GFAP和ERK1/2的表达,促进突触重塑机制,加快了前庭代偿过程,为前庭功能障碍治疗提供了新方向。

关键词:益肾活血通窍;前庭;谷氨酸;突触重塑;前庭代偿
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)02-0156-09

Yishen Huoxue Tongqiao Formula(益肾活血通窍方) Modulates Glu－IR,GFAP and ERK1/2 in Vestibular Dysfunction Rats: Implications for Cerebellar Synaptic Remodeling

TIAN Yu[1],LENG Hui[2],SHI Lei[2],WANG Aiping[2],ZHANG Qi[2],QU Rupeng[2],QU Zhongyuan[2],MA Xiande[1]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To investigate the effects of Yishen Huoxue Tongqiao Formula(益肾活血通窍方) on the expressions of glutamate immunoreactivity(Glu－IR), glial fibrillar acidic protein(GFAP) and extracellular signal regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) in the affected cerebellar glomerulus area of rats with unilateral vestibular dysfunction as well as its mechanism of action on synaptic remodeling. *Methods* In this experiment, 88 rats were selected as the research subjects and randomly divided into six groups: blank group, sham operation group, model group, and low (0.92 mg/mL), medium(1.83 g/mL) and high(3.66 g/mL) dose groups of Yishen Huoxue Tongqiao Formula. A rat model of unilateral vestibular dysfunction was established by injecting chloroform into the right ear tympanic cavity. After modeling, the vestibular function and the expressions of related biomarkers of each group were evaluated by behavioral evaluation, glutamate content detection, immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blot methods. *Results* 12 h after operation,compared with the sham operation group and the blank group, the imbalance behavior score and spatial posture reflex were significantly increased in the model group,and there were abnormal nerve injury behaviors such as head deviation and rotation($P<0.01$). The glutamic acid content and Glu－IR protein expression were decreased,the proliferation and activation degree of GFAP cells were increased,the degree of cell fiber protration was in-

基金项目:吴阶平医学基金项目(320.6750.18332);辽宁省应用基础研究计划项目(2023JH2/101300055)
作者简介:田雨(1997－),女,河北石家庄人,博士在读,研究方向:眩晕及耳蜗微循环障碍的基础与临床。
通讯作者:冷辉(1976－),男,辽宁辽阳人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:眩晕及耳蜗微循环障碍的基础与临床。E-mail:lengh1976@163.com。

creased and the ERK1/2 immunofluorescence intensity was significantly increased ($P<0.05$). Compared with those in the model group, the glutamate contents, Glu – IR protein expressions, proliferation and activation degree of GFAP cells and ERK1/2 immunofluorescence brightness expressions were increased in Yishen Huoxue Tongqiao Formula low, medium and high dose groups, and the expression was most obvious in high dose group ($P<0.05$). After 7 days of operation, compared with those in the sham operation group and the blank group, the unbalanced behavior score and spatial posture reflex disappeared in the model group, the normal movement, abnormal head deviation and turning behavior disappeared ($P>0.05$), the glutamic acid content decreased, the Glu – IR protein expression decreased, the GFAP cell proliferation and activation increased, and the ERK1/2 immunofluorescence intensity was obvious ($P<0.05$). Compared with those in the model group, the glutamate contents, Glu – IR protein expressions, proliferation and activation degree of GFAP cells and ERK1/2 immunofluorescence brightness expressions were increased in the Yishen Huoxue Tongqiao Formula low, medium and high dose groups, and the expression was most obvious in the high dose group ($P<0.05$). Compared with those in the model group 12 h after operation, the glutamic acid content and Glu – IR protein expression were increased, the proliferation and activation degree of GFAP cells were decreased, and the immunofluorescence brightness expression of ERK1/2 was decreased in the model group ($P<0.05$). *Conclusion* By regulating the expressions of Glu – IR, GFAP and ERK1/2 through multiple targets, Yishen Huoxue Tongqiao Formula promotes the synaptic remodeling mechanism, accelerates the vestibular compensatory process, and provides a new direction for the treatment of vestibular dysfunction.

Keywords: tonifying kidney and promoting blood circulation and dredging orifices; vestibule; glutamic acid; synaptic remodeling; vestibular compensation

前庭功能障碍是一种表现为急性且持续性的眩晕，常伴有恶心、呕吐等不适症状的前庭综合征[1-3]。其发病率逐年上升且已成为主要的耳科疾病之一，其发病机制与病毒感染、免疫反应、炎症反应和血管梗死等相关[3-6]。近年来，有研究发现谷氨酸免疫反应物（Glutamate immunoreactivity，Glu – IR）在前庭功能障碍中有潜在作用[7-9]。Glu – IR 是一种兴奋性神经递质，在神经元的信息交流过程中，可以引起神经元的兴奋。Glu – IR 可诱导突触可塑性变化，GFAP 和 ERK1/2 可以促进突触连接的建立和稳定，为神经系统的正常发育提供保障。胶质纤维酸性蛋白[10]（Glial fibrillary acidic protein，GFAP）是一类重要的神经可塑性改变及星形胶质细胞激活的生物标志物，在维持细胞结构与信号传导方面起着重要作用。细胞外信号调节激酶 1/2[11-12]（Extracellular signal – regulated kinases 1 and 2，ERK1/2）是一组主要负责调控细胞的增长、分化等过程的蛋白激酶，在神经系统的发展中具有重要作用。尽管已有研究开始关注 Glu – IR、GFAP 和 ERK1/2 在神经系统中的作用[13-15]，但它们与前庭代偿之间的联系仍然是一个较少被探讨的领域。

值得注意的是，中医药在改善前庭功能方面具有独特优势。基于“肾为耳窍之主，心为耳窍之客”的中医理论体系，益肾活血通窍方通过熟地黄、山茱萸、丹参、川芎等药物实现多靶点协同作用。益肾活血通窍方出自《医级宝鉴·卷八》杞菊地黄汤联合《陈素庵妇科补解》桃仁红花煎的加减方[16-17]，前期研究表明[18-20]，该方治疗耳源性眩晕的临床有效率可达 93.33%，长期疗效较好，且对大鼠模型前庭内侧核具有保护作用。然而，目前关于该方剂治疗前庭功能障碍，调节前庭代偿机制的研究尚未完全明确。因此，本研究在前期的临床疗效观察和动物实验基础上，探讨益肾活血通窍方对前庭代偿的作用及其分子机制，旨在为中医药治疗前庭功能障碍提供依据。

1 材料

1.1 动物

选择饲养于辽宁中医药大学实验动物中心的 88 只 8 周龄无特定病原体（Specific pathogen free，SPF）的 SD 大鼠，体质量（200 ± 20 g），并将其饲养在（20 ± 2 ）℃的环境中。本实验中涉及的实验动物购于辽宁长生生物技术股份有限公司［许可证号：SCXK（辽）2020 – 0001］，经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审核通过（编号：21000042023148）。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 中药方剂 益肾活血通窍方，药用：熟地黄 20 g，山药 15 g，山茱萸 20 g，丹皮 15 g，泽泻 15 g，枸杞 20 g，菊花 15 g，桃仁 15 g，红花 15 g，茯苓 15 g，丹参 15 g，石菖蒲 15 g，炙甘草 10 g，该方中草药材购于辽宁中医药大学附属医院门诊。

1.2.2 试剂和抗体 0.9% 氯化钠溶液（货号：H20083400，四川科伦药业股份有限公司）；谷氨酸含量检测试剂盒（货号：BC1585，北京索莱宝生物科技有限公司）；Glu – IR 抗体（货号：AF6306，江苏亲科生物研究中心有限公司）；GFAP 抗体（货号：WL0836，沈阳万类生物科技有限公司）；ERK1/2 抗体（货号：A4782，武汉爱博泰克生物技术公司）；二抗 Rabbit IgG – HRP（货号：ab6721，英国 abcam 公司）；免疫显色试剂（货号：KIT – 9710，福州迈新生物技术有限公司）、DAB 显色试剂盒（货号：DAB – 0031，福州迈新生物技术有限公司）；免疫荧光染色试剂盒（货号：P0186，江苏碧云天生物技术有限公司）；TBST（货号：BL1683A，安徽白鲨生物技术有限公司）；PBS（货号：GZ10010，江苏晨逸京泽生物科技有限公司）。

1.2.3 设备 高速匀浆机（T10BS25，IKA 公司）；全波长酶标仪（MD sepectraMax i3，美谷分子仪器上海有限公司）；全自动化学发光分析仪（4200SF，上海天能科技有限公司）；光学显微镜、倒置生物显微镜（DM2000、DM18，Leica 公司）。

2 方法

2.1 分组与造模

本实验将 88 只健康的成年 SD 大鼠适应性喂养 7 d，随机分 12 组，筛选出 12 h 空白组（4 只）、12 h 假手术组（8 只）、12 h 模型组（8 只）以及 3 个不同剂量的 12 h 益肾活血通窍方治疗组（每组 8 只）。7 d 空白组（4 只）、7 d 假手术组（8 只）、7 d 模型组（8 只）以及 3 个不同剂量的 7 d 益肾活血通窍方治疗组（每组 8 只）。

在麻醉状态下，模型组及治疗组利用电子耳镜和鼓膜穿刺针向大鼠的右耳鼓室注入 0.2 mL 的氯仿有机溶液。假手术组大鼠，在相同的麻醉条件下，执行相同操作流程，不过注入的是 0.2 mL 的 0.9% 氯化钠溶液。注射后分别于 12 h、7 d 观察大

鼠行为学特征。行为学评价后，分别于12 h、7 d取大鼠小脑绒球组织。

2.2 给药

依据人鼠体表面积的6.3倍换算公式，将益肾活血通窍方煎煮浓缩至低、中、高3个剂量组9.20、18.39、36.78 g/kg的生药浓度。分装成袋，4 ℃冰箱保存备用。造模后，于12 h及7 d分组灌胃，各治疗组分别以9.20、18.39、36.78 g/kg的益肾活血通窍方剂量灌胃，而其余各组则予以等量的0.9%氯化钠溶液，1次/d。

2.3 取材

各组随机抽1只大鼠使用戊巴比妥钠进行腹腔麻醉，迅速置于冰面上断头取全脑浸泡于4%多聚甲醛中，室温固定。其余大鼠麻醉后，断头并取右侧小脑绒球置于冻存管中，存于-80 ℃冰箱。

2.4 指标检测方法

2.4.1 行为学评价 (1)失衡行为测评：参考PETROSINI L[21]的方法，分别于12 h、7 d时间点对大鼠进行失衡行为评分及头偏斜度测量。(2)空间姿势反射：将大鼠放置在海绵垫上方50 cm处，让其自然落下，然后对其落下的全过程进行观测：大鼠俯卧状，四足落地为阴性，如果有身体一侧或背部着地，说明是阳性。阴性反应为数字0，阳性反应为数字1，重复6次。

2.4.2 小脑绒球谷氨酸含量检测 取大鼠的小脑绒球组织，称重0.1 g，做好标记，放进新EP管，加入谷氨酸试剂，进行研磨，样本经离心处理，条件设定为10 000 r/min，持续10 min，全程保持在4 ℃的低温环境中。随后，将分离出的上清放置于冰上，以备后续检测之用。

2.4.3 免疫组织化学染色法检测小脑绒球GFAP分子的表达 将组织进行石蜡包埋切片、烘烤、脱蜡、抗原修复后，PBS漂洗，加免疫显色试剂中的试剂1及试剂2，室温分别孵育10 min，PBS漂洗。4 ℃过夜孵育一抗GFAP(1∶50)，次日PBS漂洗，加试剂3及试剂4，室温分别孵育10 min，PBS漂洗，加入DAB显色液，避光反应10 min，通过光学显微镜观察并拍照。

2.4.4 免疫荧光染色法检测小脑绒球ERK1/2分子的表达 将组织进行石蜡包埋切片、烘烤、脱蜡、抗原修复后，PBS漂洗。封闭液对样本进行1 h的封闭处理，PBS漂洗。4 ℃过夜孵育一抗ERK1/2(1∶200)，次日室温避光孵育二抗Rabbit IgG-HRP(1∶1000)，最终用含DAPI的抗荧光淬灭剂封片，加盖玻片，暗室晾干。使用倒置生物显微镜观察。

2.4.5 Western blot法检测小脑绒球Glu-IR分子的表达 取大鼠右侧小脑绒球0.1 g组织，冰上解冻后剪碎、匀浆，4 ℃离心后收集上清，BCA法测定蛋白浓度，电泳分离后转至PVDF膜，5%脱脂奶粉封闭1 h，4 ℃过夜孵育一抗Glu-IR(1∶1000)。次日TBST漂洗，次日室温孵育二抗Rabbit IgG-HRP(1∶20 000)，TBST漂洗，滴加HCL发光液显影后用化学发光分析仪显影成像，ImageJ图像分析软件分析条带灰度值，计算各蛋白与GAPDH灰度值之比。

2.5 统计学分析

使用SPSS 22.0软件来分析实验数据，并将符合正态分布的数值以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)描述，以$P<0.05$为差异有统计学意义。利用ImageJ和GraphPadPrism 9.0软件进行数据分析。

3 结果

3.1 各组大鼠行为学评价结果

行为学评价结果表明，在术后12 h及术后7 d，与空白组相比，假手术组大鼠无头偏斜度及失衡症状，两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后12 h，与空白组和假手术组相比，模型组及低、中、高剂量组大鼠，失衡症状评分和头部倾斜角度均呈现出升高的趋势，差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比，低、中、高剂量组大鼠，失衡症状评分和头偏斜度均有所下降，且高剂量组下降幅度更为明显，差异有统计学意义($P<0.05$)。在术后7 d，与空白组和假手术组相比，模型组以及低、中、高剂量组无头偏斜度及失衡症状，差异无统计学意义($P>0.05$)。与术后12 h的模型组相比，术后7 d模型组大鼠头偏斜度和失衡症状下降，差异有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

3.2 各组大鼠空间姿势反射结果

空间姿势反射结果表明，在术后12 h及术后7 d，与空白组相比，假手术组大鼠空间姿势反射均阴性，两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后12 h，与空白组和假手术组相比，模型组及低、中、高剂量组大鼠，空间姿势反射均阳性，差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比，低、中、高剂量组大鼠，空间姿势阳性反射逐步下降，且高剂量组下降幅度更为明显，差异有统计学意义($P<0.01$)。在术后7 d，与空白组和假手术组相比，模型组以及低、中、高剂量组空间姿势反射均阴性，差异无统计学意义($P>0.05$)。与术后12 h模型组相比，术后7 d模型组大鼠空间姿势反射均阴性，差异有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

3.3 各组大鼠小脑绒球谷氨酸含量检测结果

谷氨酸含量检测结果表明，在术后12 h及术后7 d，与空白组相比，假手术组大鼠谷氨酸含量接近，差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后12 h及术后7 d，与空白组和假手术组相比，模型组以及低、中、高剂量组大鼠谷氨酸含量均降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比，低、中、高剂量组的大鼠谷氨酸含量均增加，其中高剂量组谷氨酸含量显著增加，差异有统计学意义($P<0.05$)。与术后12 h模型组相比，术后7 d模型组大鼠谷氨酸含量增加显著，差异有统计学意义($P<$

表1 大鼠治疗前后失衡行为评分及头偏斜度测量变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	12 h头偏斜度/(°)	12 h失衡评分/(分)	7 d头偏斜度/(°)	7 d失衡评分/(分)
空白组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
假手术组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	84.96±0.96△△**	6.89±0.41△△**	0.00±0.00★★	0.00±0.00★★
低剂量组	8	64.81±1.40△△**	5.39±1.03△△**	0.00±0.00	0.00±0.00
中剂量组	8	44.65±1.49△△**	5.10±1.28△△**	0.00±0.00	0.00±0.00
高剂量组	8	34.50±1.24△△**##	3.00±0.54△△**#	0.00±0.00	0.00±0.00

注：△△与空白组比较，$P<0.01$；**与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；★★与模型组12 h比较，$P<0.01$。

表 2 大鼠治疗前后空间姿势反射变化比较($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	n	12 h 性质	12 h 空间姿势反射	7 d 性质	7 d 空间姿势反射
空白组	8	阴性	0.00 ± 0.00	阴性	0.00 ± 0.00
假手术组	8	阴性	0.00 ± 0.00	阴性	0.00 ± 0.00
模型组	8	阳性	31.66 ± 0.57△△**	阴性	0.00 ± 0.00★★
低剂量组	8	阳性	29.33 ± 1.15△△**	阴性	0.00 ± 0.00
中剂量组	8	阳性	28.00 ± 1.73△△**	阴性	0.00 ± 0.00
高剂量组	8	阳性	21.66 ± 2.88△△**##	阴性	0.00 ± 0.00

注:△△与空白组比较, $P<0.01$;** 与假手术组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$;★★与模型组 12 h 比较,$P<0.01$。

0.01)。见表 3。

表 3 大鼠治疗前后患侧谷氨酸含量检测变化比较($\bar{x} \pm s$)

单位:μmol/g

组别	n	12 h	7d
空白组	8	7.00 ± 0.39	7.43 ± 0.32
假手术组	8	6.90 ± 0.36	7.24 ± 0.46
模型组	8	1.97 ± 0.58△△**	3.87 ± 0.94△*★★
低剂量组	8	3.07 ± 0.22△△**	5.10 ± 0.09△*
中剂量组	8	3.46 ± 0.26△△**	5.46 ± 0.26△*
高剂量组	8	4.38 ± 0.44△△**##	6.09 ± 0.10△*##

注:△与空白组比较, $P<0.05$;△△与空白组比较, $P<0.01$;* 与假手术组比较,$P<0.05$;** 与假手术组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$;★★与模型组 12 h 比较,$P<0.01$。

3.4 各组大鼠小脑绒球免疫组织化学染色 GFAP 结果

免疫组织化学染色表明,在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组相比,假手术组大鼠 GFAP 表达接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组和假手术组相比,模型组以及低、中、高剂量组大鼠 GFAP 细胞增殖活跃度更高,其排列更为密集,并且细胞纤维的凸显程度也有所增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠的 GFAP 免疫反应密度有所降低,其中高剂量组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与术后 12 h 模型组相比,术后 7 d 模型组大鼠右侧 GFAP 的细胞增殖活化程度显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见插页XXX图 1、表 4。

3.5 各组大鼠小脑绒球免疫荧光染色 ERK1/2 结果

免疫荧光结果表明,在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组的大鼠相比,假手术组大鼠 ERK1/2 荧光表达接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组和假手术组相比,模型组以及低、中、高剂量组大鼠 ERK1/2 荧光强度更强,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠 ERK1/2 荧光强度有所降低,其中高剂量组荧光强度显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与术后 12 h 模型组相比,术后 7 d 模型组大鼠 ERK1/2 荧光强度显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见插页XXXI-插页XXXII图 2、图 3。

表 4 大鼠治疗前后患侧 GFAP 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h GFAP	7 d GFAP
空白组	8	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.02
假手术组	8	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02
模型组	8	0.32 ± 0.01△△**	0.25 ± 0.03△**★
低剂量组	8	0.30 ± 0.02△△**	0.22 ± 0.04△*
中剂量组	8	0.28 ± 0.02△△**	0.21 ± 0.02△△**
高剂量组	8	0.21 ± 0.02△△**##	0.16 ± 0.01△#

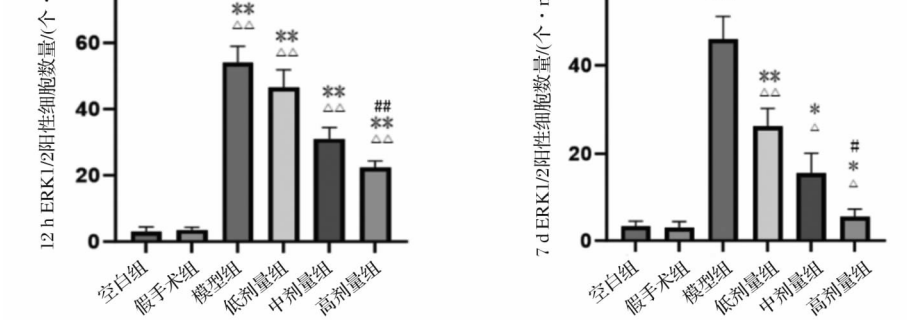
注:△与空白组比较, $P<0.05$;△△与空白组比较, $P<0.01$;* 与假手术组比较,$P<0.05$;** 与假手术组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$;★与模型组 12 h 比较,$P<0.05$。

3.6 各组大鼠小脑绒球 Western blot 的 Glu-IR 蛋白表达量结果

Western blot 结果表明,在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组相比,假手术组大鼠 Glu-IR 表达接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。在术后 12 h 及术后 7 d,与空白组和假手术组相比,模型组以及低、中、高剂量组大鼠 Glu-IR 表达减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠 Glu-IR 的表达增加,其中高剂量组显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与术后 12 h 模型组相比,术后 7 d 模型组大鼠 Glu-IR 组明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 4、图 5a ~ 图 5b。

4 讨论

单侧前庭功能障碍性疾病,在中医药学中属于“耳眩晕”范畴。经典理论认为心、肾与耳之间存在密切联系,肾开窍于耳,心寄窍于耳。《医贯》[22]提到:“肾为耳窍之主,心为耳窍之客”。肾藏精,精生髓,髓聚于脑,而耳与脑相通,肾精充足是耳窍功能正常的根本保障。心主血脉,通过推动脉管内血液循环,将营养物质送至耳窍,是维持耳部正常功能的重要基础。益肾活血通窍法的治疗原则主要是通过补益肾精、养血活血、通窍醒脑来促进前庭代偿,缓解前庭功能障碍的症状。益肾活血通窍方以《医级宝鉴·卷八》杞菊地黄汤联合《陈素庵妇科补解》桃仁红花煎加减组成[16-17],遵循君臣佐使的配伍原则,



注:△与空白组比较, $P<0.05$;△△与空白组比较, $P<0.01$;* 与假手术组比较,$P<0.05$;** 与假手术组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$;★与模型组 12 h 比较,$P<0.01$。

图 3 大鼠治疗前后患侧 ERK1/2 表达比较(免疫荧光检测,×200,$n=8$)

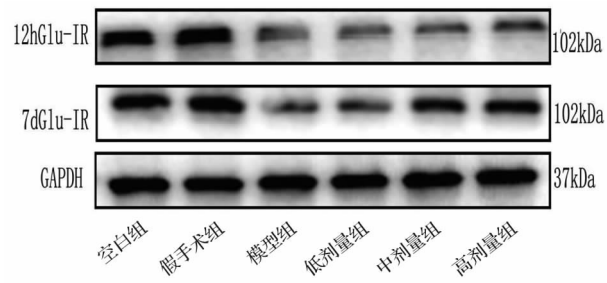


图 4 大鼠治疗前后患侧 Glu－IR 蛋白表达比较
（Western blot 检测结果，$n=8$）

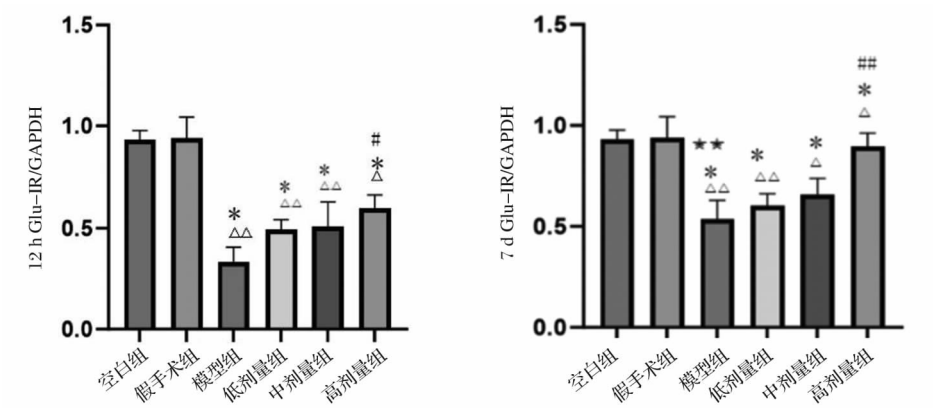
能够在多靶点的基础上，协同发挥作用。君药为方剂的根基，其中熟地黄、山茱萸、山药、枸杞作为君药，可滋阴补血、益精填髓[23]。臣药辅助君药，其中红花、丹参、桃仁可辅助君药活血通窍。丹参尤显卓越，可以增强活血化瘀与养血安神之力，契合“一味丹参，功同四物”，为耳窍功能的恢复创造了更为有利的条件。佐药配合君臣之药，其中石菖蒲，凭通窍醒神之功，于君、臣药作用后，进一步疏耳窍、引气血至病所。丹参与之配合，恰合“治风先治血，血行风自灭”之理，借活血通窍驱前庭障碍之“风邪”，稳五官功能平衡。炙甘草作为使药，调和诸药，使各药协同达平衡态。现代药理学研究表明[24]，杞菊地黄汤可通过血液循环、血管内皮生长因子受体信号通路等改善血管功能，促进机体修复损伤。桃仁红花煎[25－26]中丹酚酸 A、羟基红花黄色素 A 及丝裂原活化蛋白激酶等成分具有神经保护的作用。结合前期研究基础发现[18－20,27]，益肾活血通窍方在缓解耳眩晕，治疗前庭功能障碍方面有独特疗效。综上，益肾活血通窍法在调节神经系统功能、促进神经功能恢复方面具有明确的物质基础和作用机制。

研究发现[28－29]谷氨酸能使神经元活动与星形胶质细胞相互作用，可以调节谷氨酸浓度和突触重塑性，同时通过 ERK1/2 信号通路的激活，协同促进神经元和星形胶质细胞功能的改善，这与本文研究内容一致。本文研究结果表明益肾活血通窍法可以缓解大鼠前庭功能障碍的症状，其机制可能与 Glu－IR、GFAP 和 ERK1/2 发挥作用，加快前庭代偿有关。前庭代偿[30]是指当一侧外周前庭系统受损后，产生的眩晕、呕吐、身体失衡等症状随着时间逐渐自行缓解的现象。

Glu－IR 是[7－9]是一种兴奋性神经递质，在神经元的信息交流过程中，扮演着重要的角色。研究表明[31]，在一侧前庭器官受损后，小脑绒球区会引发谷氨酸改变，从而调整对身体平衡和眼球运动的控制，启动前庭代偿过程。研究发现[32－33]，丹参酮和石菖蒲挥发油在调节谷氨酸水平和改善突触重塑方面具有潜在的药理作用。本研究同样观察到，术后 12 h 和术后 7 d，与空白组和假手术组相比，模型组及低、中、高剂量组谷氨酸含量及 Glu－IR 均降低。低、中、高剂量组与模型组相比，谷氨酸含量及 Glu－IR 则升高。其中高剂量组升高明显。此外，术后 7 d 模型组谷氨酸含量及 Glu－IR 较术后 12 h 模型组升高。提示前庭代偿与谷氨酸含量及 Glu－IR 有关，谷氨酸含量及 Glu－IR 降低可能反映了突触功能的初期受损。在益肾活血通窍方高剂量组中，谷氨酸含量及 Glu－IR 的升高可能促使突触前神经元合成和释放更多的谷氨酸，增强突触重塑及神经兴奋，促进神经元间的信息传递，从而加快前庭代偿。

GFAP 是[10]一种主要在中枢神经系统星形胶质细胞中的中间丝蛋白，通过激活信号通路，促使神经元形成新的突触连接，从而调节突触结构和功能。作为神经系统的诊断标志[34]，常对炎症和神经变性疾病进行评估。在前庭代偿过程中，GFAP 的调节有助于神经递质在神经元之间的信号传递。研究表明[35]，枸杞糖肽能够降低星形胶质细胞表达，缓解神经性疼痛。本研究发现，在术后 12 h 及术后 7 d，与空白组和假手术组相比，模型组及各剂量组右侧 GFAP 细胞增殖活化增强。与模型组相比，各剂量组免疫反应密度低，高剂量组显著降低。术后 7 d 模型组右侧 GFAP 细胞增殖活化程度较术后 12 h 模型组显著下降。GFAP 细胞增多表明神经组织中的胶质细胞激活，参与了神经组织修复和功能代偿。GFAP 表达水平的降低可能与神经炎症的减轻和神经微环境的稳定有关。

ERK1/2 是[11－12,36]一种能够调控细胞的生长、分化和存活，还可调节突触前膜上的蛋白质转运和囊泡释放机制的关键分子，具有增强突触的结构和功能稳定性，促进前庭代偿过程中的突触重塑性变化的功能。研究表明[37]，ERK 通过调节突触后密度蛋白－95 等关键突触蛋白的表达和分布，从而调整小脑绒球的神经回路，以促进前庭代偿。ERK1/2 信号通路的激活，协同促进神经元和星形胶质细胞功能的改善，使突触传递更加高效。研究发现[38]，山茱萸提取物通过抑制 ERK 信号传导，减轻了星形胶质细胞的炎症反应。本研究发现，术后 12 h 及术后 7 d，模型组及各剂量组 ERK1/2 荧光表达增强。与模型组相比，各剂量组荧光表达降低，高剂量组明显降低，且术后 7 d 模型组荧光表达较术后 12 h 模型组显著降低。ERK1/2 表



注：△与空白组比较，$P<0.05$；△△与空白组比较，$P<0.01$；＊与假手术组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；★★与模型组 12 h 比较，$P<0.01$。

图 5 大鼠治疗前后患侧 Glu－IR 蛋白表达比较（Western blot，$n=8$）

达增加表明细胞内信号通路的启动,参与了神经组织修复和功能代偿。ERK1/2 表达的降低可能反映了细胞应激反应的减弱,这可能与前庭代偿过程中神经细胞功能的恢复和适应性变化有关。在高剂量组中 GFAP 及 ERK1/2 表达明显降低可能表明高剂量治疗能够进一步调节星形胶质细胞的活动和神经信号传导,从而加速前庭代偿过程。这可能与高剂量组治疗增强了神经保护和修复机制,促进了神经功能的恢复有关。

综上所述,通过多靶点作用机制使益肾活血通窍方在改善神经信号传导、促进神经修复与再生、调节细胞信号通路等多个层面发挥作用,更有效地进行前庭代偿,为前庭功能障碍的治疗提供了新的潜在方向和理论依据。

参考文献

[1] LEE S U, KIM H J, KIM J S. Bilateral vestibular dysfunction[J]. Semin Neurol, 2020, 40(1): 40 - 48.
[2] NEUHAUSER H K. The epidemiology of dizziness and *Vertigo*[J]. Handb Clin Neurol, 2016, 137: 67 - 82.
[3] 姜树军, 单希征, 韩鹏, 等. 巴拉尼协会《急性单侧前庭病/前庭神经炎诊断标准》解读[J]. 北京医学, 2023, 45(8): 729 - 732.
[4] XING Y, SI L H, ZHANG W T, et al. Etiologic distribution of dizziness/*Vertigo* in a neurological outpatient clinic according to the criteria of the international classification of vestibular disorders: a single - center study[J]. J Neurol, 2024, 271(5): 2446 - 2457.
[5] VAN STIPHOUT L, PLESHKOV M, LUCIEER F, et al. Patterns of vestibular impairment in bilateral vestibulopathy and its relation to etiology[J]. Front Neurol, 2022, 13: 856472.
[6] KIM H A, LEE H. Recent advances in understanding audiovestibular loss of a vascular cause[J]. J Stroke, 2017, 19(1): 61 - 66.
[7] BROUSSARD D M. Dynamics of glutamatergic synapses in the medial vestibular nucleus of the mouse[J]. Eur J Neurosci, 2009, 29(3): 502 - 517.
[8] 江艺鑫. UL 对清醒大鼠 MVN 区 Glu 含量和 c - Fos 蛋白表达的影响[D]. 延吉:延边大学,2018.
[9] PERFILOVA V N,TYURENKOV I N. Glutamate metabotropic receptors: structure, localisation, functions[J]. Usp Fiziol Nauk,2016,47(2):98 - 112.
[10] HOL E M, PEKNY M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 32: 121 - 130.
[11] 葛新滢, 邵露露, 高雪林, 等. 细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路调控细胞侵袭性的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2023, 45(1): 155 - 160.
[12] 李鑫, 朱文浩, 高颖. ERK1/2 通路及其介导多发性硬化发病的研究进展[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2015, 17(4): 880 - 884.
[13] 张广云, 胡晓, 袁平, 等. 谷氨酸诱导新生小鼠皮层神经细胞损伤体外模型的建立[J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(4): 363 - 367.
[14] ZHENG X X, YANG J Y, HOU Y W, et al. Prediction of clinical progression in nervous system diseases: plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP)[J]. Eur J Med Res, 2024, 29(1): 51.
[15] 赵雅宁, 高俊玲. ERK1/2 信号通路与脑创伤后神经细胞凋亡的研究新进展[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(6): 953 - 955.
[16] 董西园. 医级[M]. 朱杭溢, 冯丹丹,校注. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 482.
[17] 陈素庵, 张晋峰, 李萌, 等. 陈素庵妇科补解[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 15 - 16.
[18] 张琦. 益肾活血通窍法对耳源性眩晕缓解期耳石器异常患者影响的临床研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
[19] 张琦, 冷辉, 金婧, 等. 益肾活血通窍法对 D - 半乳糖致老化大鼠模型前庭内侧核 PI3K/AKT 信号通路和氧化应激的影响[J]. 国际老年医学杂志, 2024, 45(2): 162 - 166.
[20] 冷辉, 张琦, 马贤德, 等. 单侧前庭功能丧失大鼠患侧前庭内侧核及小脑绒球中 GLU - IR、GFAP、GABA B2 的表达[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2021, 29(4): 424 - 429.
[21] PETROSINI L. Compensation of vestibular symptoms in hemilabyrinthectomized guinea pigs. Role of the sensorimotor activation[J]. Behav Brain Res, 1983, 8(3): 335 - 342.
[22] 赵献可. 医贯[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 252.
[23] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:化学工业出版社,2016:541 - 1254
[24] 多芳芳, 邹志东, 王文娟, 等. 杞菊地黄丸对血管紧张素Ⅱ诱导损伤的血管内皮细胞超微结构的影响[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(10): 1751 - 1752, 1750.
[25] 杨森. 中药方剂桃仁红花煎的计算药理学研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
[26] 冯丹萍, 段宝忠, 夏从龙, 等. 红花化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2253 - 2255.
[27] 王锦玲, 吴子明, 王尔贵, 等. 银杏叶制剂对一侧迷路切除后前庭内侧核区突触素表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2002(19): 1751 - 1753.
[28] 杨晓运, 李智, 秦绿叶, 等. 星形胶质细胞和神经元之间谷氨酸 - 谷氨酰胺的代谢偶联[J]. 生理科学进展, 2003, 34(4): 350 - 352.
[29] YING H Y, ZHANG Z L, WANG W, et al. Inhibition of calcium - sensing receptor alleviates chronic intermittent hypoxia - induced cognitive dysfunction *via* CaSR - PKC - ERK1/2 pathway[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(4): 2099 - 2115.
[30] 李洁, 时海波. 前庭代偿与治疗机制研究进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2024, 38(3): 256 - 260.
[31] 周雯. 大鼠单侧迷路破坏术后代谢型谷氨酸受体亚型 mGluR4 和 mGluR7 在前庭内侧核及小脑绒球中变化的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
[32] LI H F, HAN W J, WANG H Y, et al. Tanshinone IIA inhibits glutamate - induced oxidative toxicity through prevention of mitochondrial dysfunction and suppression of MAPK activation in SH - SY5Y human neuroblastoma cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 4517486.
[33] FENG P, CHEN Y H, SUN K X, et al. Volatile oil from Acori graminei Rhizoma affected the synaptic plasticity of rats with tic disorders by modulating dopaminergic and glutamatergic systems[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 335: 118676.
[34] 何晓峰, 邓文静. 血浆 GFAP 与 NfL 水平评估创伤性脑损伤患者疾病严重程度及预后的价值[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2024, 27(7): 826 - 830.
[35] 吴海姣. 枸杞糖肽 LbGp 缓解大鼠 L5 SNL 诱导的神经病理性疼痛的作用及外周机制[D]. 福州: 福建师范大学, 2023.
[36] 王友, 张程斐, 周洛卿, 等. 基于 PPARγ/ERK1/2 信号通路探讨补肾开玄通络方对 db/db 小鼠的肾脏保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 5849 - 5855.
[37] LIU D, WANG J, TIAN E, et al. mGluR1/IP3/ERK signaling pathway regulates vestibular compensation in ON UBCs of the cerebellar flocculus[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(2): e14419.
[38] CAO B, ZENG M N, HAO F X, et al. *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. attenuates $A\beta_{25-35}$ - induced mitochondrial damage and neuroinflammation in mice by modulating the ERK pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155709.