温肺降浊方调控 RhoA/ROCK2 信号通路改善 VaD 大鼠海马神经元损伤的作用机制*

胡跃强[1]，吴林[2]，莫雪妮[2]，邓秋媚[1]，赖菁菁[1]，秦红玲[1]，向军军[1]

1. 广西中医药大学第一附属医院，广西 南宁 530023；2. 广西中医药大学，广西 南宁 530020

摘要：目的：基于 RhoA/ROCK2 信号通路探讨温肺降浊方对血管性痴呆（vascular dementia，VaD）大鼠发挥神经保护作用的机制。方法：从 60 只 SD 大鼠中随机选取 10 只作为假手术组，剩余大鼠采用双侧颈总动脉永久结扎法制备 VaD 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、温肺降浊方组（2 g·kg^{-1}）、ROCK2 干扰组（shROCK2，5.07×10^{12} VG·mL^{-1}）、阴性对照组以及联合组（shROCK2＋温肺降浊方），每组 10 只。各组大鼠以中药或生理盐水灌胃，每日 1 次，持续 4 周。采用 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力，尼氏染色法观察神经元形态和尼氏小体数量。采用 RT－PCR 法、Western blot 法检测大鼠海马 RhoA、ROCK2、肌球蛋白轻链（myosin light chain，MLC）、肌球蛋白轻链磷酸酶（myosin light chain phosphatase，MLCP）表达水平。结果：与假手术组比较，模型组大鼠的逃避潜伏期延长且穿越平台次数减少（$P<0.05$）；与模型组比较，温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠的逃避潜伏期缩短且穿越平台次数增加（$P<0.05$）；与温肺降浊方组、shROCK2 组比较，联合组大鼠的逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加（$P<0.05$）。尼氏染色显示，与假手术组比较，模型组大鼠海马尼氏小体数量减少（$P<0.05$）；与模型组比较，温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠海马尼氏小体数量增加（$P<0.05$）；与温肺降浊方组、shROCK2 组比较，联合组大鼠海马尼氏小体数量增加（$P<0.05$）。RT－PCR 与 Western blot 显示，与假手术组比较，模型组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，温肺降浊方组（*MLC* 基因除外）、shROCK2 组与联合组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 表达水平降低（$P<0.05$）。与 ROCK2 干扰组与温肺降浊方组比较，联合组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 表达水平降低（*MLC* 基因除外）（$P<0.05$）。结论：温肺降浊方可改善 VaD 大鼠的学习记忆能力，其作用机制可能与抑制 RhoA/ROCK2 信号通路有关。

关键词：血管性痴呆；温肺降浊方；RhoA/ROCK2 信号通路；海马；神经元
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.03.104
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)03－0635－07

Action Mechanism of Wenfei Jiangzhuo Formula in Ameliorating Hippocampal Neuronal Damage in VaD Rats by Modulating RhoA/ROCK2 Signaling Pathway

HU Yueqiang[1]，WU Lin[2]，MO Xueni[2]，DENG Qiumei[1]，LAI Jingjing[1]，QIN Hongling[1]，XIANG Junjun[1]

1. The First Affiliated Hospital to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine，Nanning Guangxi China 530023；
2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine，Nanning Guangxi China 530020

Abstract：Objective：To investigate the mechanism of neuroprotective effect of Wenfei Jiangzhuo Formula on vascular dementia（VaD）rats by regulating RhoA/ROCK2 signaling pathway. Methods：Ten out of 60 SD rats were randomly selected as the sham operation group，and the remaining rats were used to prepare the VaD model by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. The rats

* **基金项目**：国家自然科学基金项目（81860842）；广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目（桂教人才 202006）；广西中医脑病临床研究中心项目（桂科 AD20238028）

were randomly divided into the model group, Wenfei Jiangzhuo Formula group (2 g · kg^{-1}), the ROCK2 interference group (shROCK2, 5.07×10^{12} VG · mL^{-1}), the negative control group, and the combined group (shROCK2 + Wenfei Jiangzhuo Formula), with 10 rats in each group. Rats in each group were gavaged with traditional Chinese medicine or saline once daily for 4 weeks. Morris water maze was used to detect the learning memory ability of the rats, and Nichols staining was used to observe the neuronal morphology and the number of Nichols′ vesicles. The expression levels of RhoA, ROCK2, myosin light chain (MLC) and myosin light chain phosphatase (MLCP) in rat hippocampus were detected by RT – PCR and Western blot. Results: Compared with the sham – operated group, the escape latency of rats in the model group was prolonged and the number of platform crossings was decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, the escape latency of rats in Wenfei Jiangzhuo Formula group, the shROCK2 group, and the combined group was shortened and the number of platform crossings was increased ($P < 0.05$); compared with Wenfei Jiangzhuo Formula group, the number of platform crossings was increased ($P < 0.05$); compared with Wenfei Jiangzhuo Formula group, the number of platform crossings was increased in the combined group, increased the number of crossing platforms ($P < 0.05$). Nissen staining showed that the number of hippocampal Nissen vesicles decreased in the model group compared with the sham – operated group ($P < 0.05$); the number of hippocampal Nissen vesicles increased in the warm – lung – reducing formula group, the shROCK2 group and the combined group compared with the model group ($P < 0.05$); the number of hippocampal Nissen vesicles increased in the combined group compared with Wenfei Jiangzhuo Formula group and the shROCK2 group ($P < 0.05$). RT – PCR and Western blot showed that the expression levels of hippocampal RhoA, ROCK2, MLC, and MLCP were elevated in the rat hippocampus of the model group compared with that of the sham – operated group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the hippocampal RhoA, ROCK2, MLC, MLCP expression levels of rats in Wenfei Jiangzhuo Formula group (except for the MLC gene), shROCK2 group and the combined group were decreased ($P < 0.05$). Compared with the ROCK2 interference group and Wenfei Jiangzhuo Formula group, the hippocampal expression levels of RhoA, ROCK2, MLC, and MLCP were reduced in the combined group of rats (except for the *MLC* gene) ($P < 0.05$). Conclusion: Wenfei Jiangzhuo Formula can improve the learning memory ability of VaD rats, and its action mechanism may be related to the inhibition of RhoA/ROCK2 signaling pathway.

Key words: vascular dementia; Wenfei Jiangzhuo Formula; RhoA/ROCK2 signaling pathway; hippocampus; neuron

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)的治疗是当前的难点问题[1]。研究发现,海马神经轴突生长分化、树突棘形成和维持与 VaD 的发生发展密切相关[2]。此外,多种蛋白与 VaD 的发展有关。其中,小 G 蛋白 RhoGTP 酶亚家族成员中的 RhoA 及其下游效应分子 Rho 相关蛋白激酶(Rho – associated protein kinase, ROCK),特别是 ROCK2 亚型,在调控认知功能与记忆形成中发挥着关键作用[3]。这一发现为认知障碍疾病的治疗提供了新的潜在靶点。有研究表明,在认知障碍患者的脑组织中,RhoA/ROCK2 信号通路相关蛋白活性显著升高[4]。因此,调控 RhoA/ROCK2 通路的活性,尤其是抑制 ROCK2 的过度激活,已成为改善认知障碍症状的策略之一。本课题组在相关领域的前期研究中也发现了 ROCK2 蛋白在 VaD 大鼠模型认知障碍发展中的关键作用[5]。该发现不仅进一步确立了 RhoA/ROCK2 通路在认知障碍病理机制中的核心地位,也为开发针对认知障碍的新型治疗药物或疗法奠定了坚实的理论基础。因此,深入研究调节 RhoA/ROCK2 通路的作用机制,有望成为 VaD 治疗的突破点。

本课题组数十年来致力于 VaD 的临床与基础研究,认为 VaD 的病理基础为“痰瘀”阴邪太过,病机本质为肺肾虚衰,阳化气不足而致阴邪堵塞脉络。因此,本课题组提出“从肺论治痴呆”的新观点,以及温肾益肺、祛瘀化痰(简称“温肺降浊法”)的治则治法,临床证实了温肺降浊方在改善认知障碍方面的有效性[6-8]。动物实验研究发现,该方具有抑制细胞凋亡,调控炎症因子的作用[9-10]。为了深入探讨温肺降浊方的药理机制,特别是其是否通过调控 RhoA/ROCK2 信号通路从而发挥神经保护作用,本研究拟采用腺相关病毒载体短发夹 RNA(adeno – associated virus – short hairpin RNA, AAV – shRNA)技术特异性下调 ROCK2 的表达,观察其对 VaD 大鼠模型认知功能的影响及作用机制。

1　材料

1.1　实验动物　SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,3 月龄,体质量(250 ± 50) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019 – 0004。大鼠饲养于广西中医药大学第一附属医院动物房,室温 20 ~ 25 ℃,湿度 60%。本研究已获得广西中

医药大学伦理委员会批准，批准文号：2019－55－1203，确保所有实验操作均符合动物福利及伦理原则。

1.2　药物与试剂　温肺降浊方（制附子 20 g，党参 15 g，干姜 10 g，酒大黄 10 g，田七 10 g，炙甘草 10 g，由广西中医药大学第一附属医院药剂科提供）；ROCK2 腺相关病毒及空载体腺相关病毒（上海吉满生物科技有限公司）；RhoA 抗体、ROCK2 抗体、肌球蛋白轻链（myosin light chain，MLC）抗体（美国 Abcam 公司，批号：ab40673、ab71598、ab92721）；肌球蛋白轻链磷酸酶（myosin light chain phosphatase，MLCP）抗体（北京 Bioss 公司，批号：23290R）；RIPA 蛋白裂解液（北京索莱宝科技有限公司，批号：20160307）。

1.3　仪器　MDF－382E 型超低温保存箱（日本三洋公司）；7500 型聚合酶链式反应仪（ABI 公司）；MT－200 型 Morris 水迷宫（成都泰盟科技有限公司）；HM－200 型电子天平（日本 A&D 有限责任公司）；1－15K 型高速冷冻离心机（美国 Sigma 公司）；S25 型电动玻璃匀浆机（德国 IKA 公司）。

2　方法

2.1　分组、造模及给药　适应性喂养 1 周后，从 60 只 SD 大鼠中随机选取 10 只作为假手术组，剩余大鼠采用双侧颈总动脉永久结扎法制备 VaD 模型[11]，具体方法为：大鼠腹腔注射 4% 戊巴比妥钠麻醉后固定，颈部备皮后消毒，于颈部中线偏左位置行 1～2 cm 纵向切口，充分暴露双侧颈总动脉，分离双侧颈总动脉和迷走神经，用 6－0 号丝线结扎双侧血管，消毒缝合后肌肉注射青霉素钠注射液。术后 1 周进行 Morris 水迷宫实验，当大鼠造模后平均逃避潜伏期≥造模前平均逃避潜伏期×120%，提示造模成功[12]。假手术组大鼠仅暴露颈总动脉而不进行结扎。

将造模成功的大鼠随机分为模型组、温肺降浊方组（2 g·kg^{-1}）、ROCK2 干扰组（AAV9－ROCK2－shRNA，shROCK2）、阴性对照组（空载体腺相关病毒）以及联合组（shROCK2＋温肺降浊方），每组 10 只。采用脑立体定位仪进行操作，ROCK2 干扰组与联合组大鼠在海马组织周围注射稀释后的病毒制剂（5.07×10^{12} VG·mL^{-1}），阴性对照组注射空载体病毒，每只 4 μL，持续 5 min。温肺降浊方组与联合组大鼠在术后首日以温肺降浊方（2 g·kg^{-1}）灌胃，其余大鼠以生理盐水代替，每日 1 次，持续 4 周。

2.2　Morris 水迷宫实验检测大鼠的学习记忆能力　定位航行实验：按照 Morris 水迷宫试验系统进行检测，整个实验持续 28 d。将水迷宫划为四个象限，在第四象限水下 2 cm 放入平台，各组大鼠每日依次放入水中自由搜寻 90 s，记录大鼠登上潜伏平台的时间，即逃避潜伏期，分别在干预前、术后第 1 周、术后第 4 周进行检测。

空间搜索实验：在完成定位航行实验后，撤掉平台，记录大鼠在 90 s 内跨越原平台区域的次数，即穿越平台次数。

2.3　尼氏染色法检测大鼠海马神经元形态　取海马组织进行石蜡包埋，晾干后石蜡切片脱蜡，入甲苯胺蓝染液 5 min，1% 冰醋酸稍分化，自来水洗终止反应，将切片放置于烤箱烤干，二甲苯透明 5 min，中性树胶透明封片。在显微镜下观察各组大鼠海马组织染色切片，主要观察 CA1 区神经元病理形态，每张切片随机采集 3 个视野，利用 Image J 软件测量缺血侧海马 CA1 区尼氏小体数量。

2.4　RT PCR 法检测大鼠海马 RhoA/ROCK2 通路相关基因表达情况　取－80 ℃冻存的海马组织，冰上解冻，匀浆。按照总 RNA 提取试剂盒的说明书操作，通过分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度（A260/A280 比值应接近 2.0）。经预变性、逆转录和酶失活等步骤后，循环重复变性、退火及延伸步骤，反应条件为：95 ℃ 15 s，60 ℃ 30s。采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算目的基因的相对表达量，引物由天根生物科技有限公司提供，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因名称	引物序列（5′－3′）
RhoA	F：AGGATTGGCGCTTTTGGGTA
	R：TTCACAAGATGA GGCACCCC
ROCK2	F：ACAAACCAAGCTAACTGCCT
	R：CTACGGGTGCGGTTCTTTCT
MLC	F：CTCGGACGAGTGAACGTGAA
	R：GAGAACCTCTCTGCTTGCGT
MLCP	F：CCCGAGGATG TGATCACTGG
	R：TGCGGCTACAAGCCTATCTG
β－actin	F：GCGCAAGTACTCTGTGTGG
	R：AGGGTGTAAAACGCAGCTCAG

2.5　Western blot 法检测大鼠海马 RhoA/ROCK2 通路相关蛋白表达情况　提取各组大鼠海马组织总

蛋白，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。制备 10% SDS－PAGE 凝胶，电泳（80 V，30 min；120 V，60 min），转膜（200 mA，2 h），5% 脱脂牛奶封闭 2 h。反复洗膜后加入 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 抗体（1∶1 000），4 ℃震荡孵育过夜（16～24 h）。反复洗膜，加入含有辣根过氧化物酶的二抗（1∶20 000）室温孵育 1 h。滴加配置好的 ECL 显色液，通过全自动化学发光图像分析仪扫描并保存图像。经 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值，以 β－actin 作为内参蛋白，目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值即为目的蛋白的相对表达量。

2.6　统计学方法　采用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据服从正态分布和方差齐性，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　各组大鼠学习记忆能力变化　Morris 水迷宫实验显示，干预前，与假手术组比较，各组大鼠的逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少（$P<0.05$），表明 VaD 模型复制成功。干预 1 周后，除假手术组外，各组大鼠的逃避潜伏期、穿越平台次数比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。干预 4 周后，与假手术组比较，模型组大鼠逃避潜伏期延长且穿越平台次数减少（$P<0.05$）；与模型组比较，温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠的逃避潜伏期缩短且穿越平台次数增加（$P<0.05$）；与温肺降浊方组、shROCK2 组比较，联合组大鼠的逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加（$P<0.05$）；温肺降浊方组与 shROCK2 组大鼠的逃避潜伏期、穿越平台次数比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2、表 3。

表 2　各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较　（$\bar{x} \pm s$，s）

组别	n	干预前	术后 1 周	术后 4 周
假手术组	10	23.24 ± 2.12	19.29 ± 3.41	11.71 ± 2.97
模型组	10	46.56 ± 5.19★	37.07 ± 5.67★	24.21 ± 4.48★
温肺降浊方组	10	44.43 ± 6.12★	36.49 ± 5.57	17.41 ± 4.15▲@
shROCK2 组	10	47.72 ± 3.57★	36.48 ± 2.71	17.52 ± 3.37▲@
阴性对照组	10	47.13 ± 5.27★	39.99 ± 3.12	32.67 ± 8.39
联合组	10	45.62 ± 5.98★	34.22 ± 6.93	11.07 ± 2.31▲

注：与假手术组比较，★$P<0.05$；与模型组比较，▲$P<0.05$；与联合组比较，@$P<0.05$。

表 3　各组大鼠 Morris 水迷宫穿越平台次数比较　（$\bar{x} \pm s$，次）

组别	n	干预前	术后 1 周	术后 4 周
假手术组	10	4.75 ± 0.82	5.96 ± 0.93	6.06 ± 1.13
模型组	10	2.16 ± 0.52★	2.35 ± 0.53★	2.93 ± 0.72★
温肺降浊方组	10	2.41 ± 0.63★	2.75 ± 0.83	4.32 ± 0.62▲@
shROCK2 组	10	2.30 ± 0.52★	2.86 ± 0.84	4.44 ± 0.63▲@
阴性对照组	10	2.56 ± 0.71★	2.29 ± 0.61	3.17 ± 0.72
联合组	10	2.96 ± 0.63★	2.91 ± 1.02	5.48 ± 0.30#

注：与假手术组比较，★$P<0.05$；与模型组比较，▲$P<0.05$；与联合组比较，@$P<0.05$。

3.2　各组大鼠海马神经元形态变化　尼氏染色显示，假手术组大鼠海马神经元排列整齐、结构完整，尼氏小体排列紧密整齐；模型组大鼠海马神经元排列散乱，尼氏小体稀疏；温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠海马神经元排列整齐、结构完整，可见较丰富的尼氏小体。与假手术组比较，模型组大鼠海马尼氏小体数量减少（$P<0.05$）；与模型组比较，温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠海马尼氏小体数量增加（$P<0.05$）；与温肺降浊方组、shROCK2 组比较，联合组大鼠海马尼氏小体数量增加（$P<0.05$）；温肺降浊方组与 shROCK2 组大鼠海马尼氏小体数量比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 4、图 1。

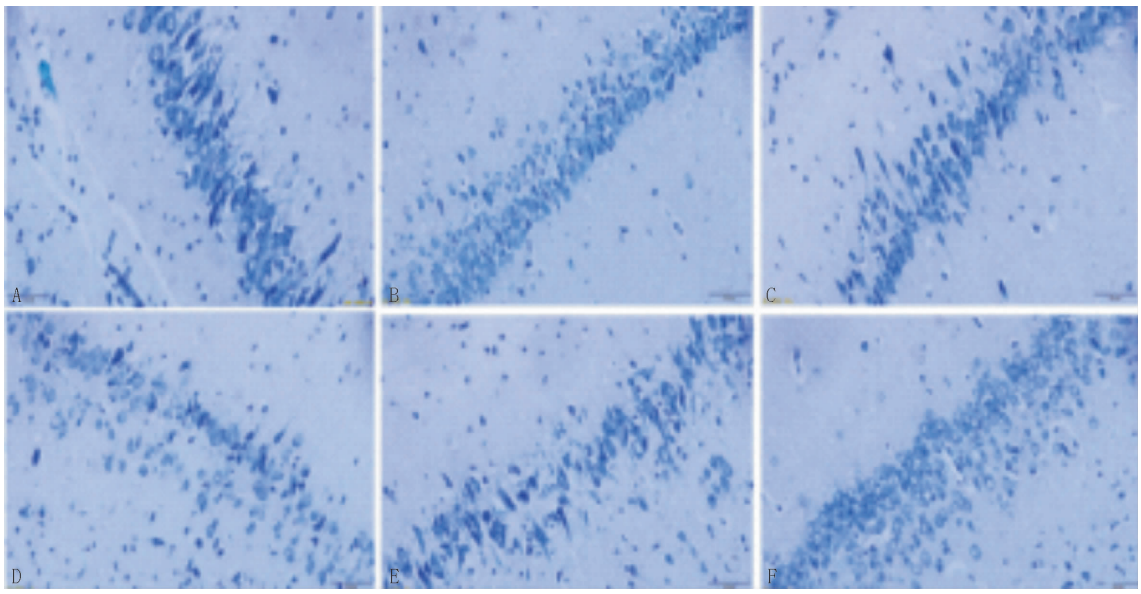
表 4　各组大鼠海马尼氏小体数量比较　（$\bar{x} \pm s$，个）

组别	n	尼氏小体数量
假手术组	5	24.40 ± 3.65
模型组	5	14.20 ± 3.26*
温肺降浊方组	5	17.00 ± 3.92▲#
shROCK2 组	5	17.20 ± 3.96▲#
阴性对照组	5	10.00 ± 2.65
联合组	5	24.20 ± 3.70▲

注：与假手术组比较，*$P<0.01$；与模型组比较，▲$P<0.05$；与联合组比较，#$P<0.05$。

3.3　各组大鼠海马 Rho/ROCK2 通路相关基因表达水平变化　RT－PCR 显示，与假手术组比较，模型组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLC*、*MLCP* 基因表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，shROCK2 组与联合组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLC*、*MLCP* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与模型组比较，温肺降浊方组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLCP* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与 ROCK2 干扰组与温肺降浊方组比较，联合组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLCP* 基因

表达水平降低（$P < 0.05$）。温肺降浊方组与 shROCK2 组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLC*、*MLCP* 基因表达水平比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 5。



注：A：假手术组；B：模型组；C：温肺降浊方组；D：shROCK2 组；E：阴性对照组；F：联合组。

图 1　各组大鼠海马组织尼氏染色图（×100）

表 5　各组大鼠海马 *RhoA*、*ROCK2*、*MLC*、*MLCP* 基因表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	*RhoA* mRNA	*ROCK2* mRNA	*MLC* mRNA	*MLCP* mRNA
假手术组	5	0.25 ± 0.18	0.34 ± 0.16	0.28 ± 0.15	0.41 ± 0.06
模型组	5	1.91 ± 0.33*	1.97 ± 0.45*	1.87 ± 0.17*	1.83 ± 0.38*
温肺降浊方组	5	1.14 ± 0.32▲#	1.13 ± 0.17▲#	1.32 ± 0.27	1.04 ± 0.19▲#
shROCK2 组	5	1.10 ± 0.37▲#	1.11 ± 0.16▲#	1.26 ± 0.41▲	1.05 ± 0.22▲#
阴性对照组	5	1.18 ± 0.39	1.88 ± 0.50	1.86 ± 0.30	1.65 ± 0.29
联合组	5	0.48 ± 0.19▲	0.50 ± 0.19▲	0.52 ± 0.23▲	0.65 ± 0.26▲

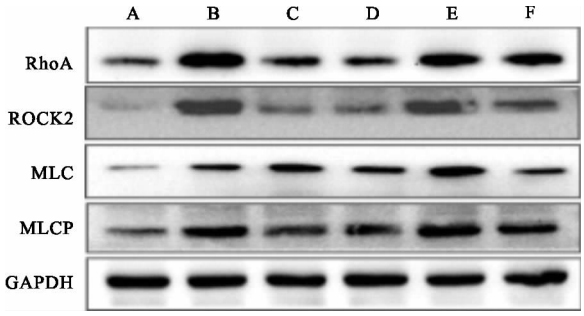
注：与假手术组比较，*$P < 0.01$；与模型组比较，▲$P < 0.05$；与联合组比较，#$P < 0.05$。

3.4　各组大鼠 RhoA/ROCK2 通路相关蛋白表达水平变化　Western blot 显示，与假手术组比较，模型组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，温肺降浊方组、shROCK2 组及联合组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平降低（$P < 0.05$）。与 ROCK2 干扰组、温肺降浊方组比较，联合组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平降低（$P < 0.05$）。温肺降浊方组与 shROCK2 组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 6、图 2。

表 6　各组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	RhoA	ROCK2	MLC	MLCP
假手术组	5	0.31 ± 0.16	0.24 ± 0.24	0.27 ± 0.19	0.41 ± 0.13
模型组	5	1.70 ± 0.32*	1.89 ± 0.39*	1.15 ± 0.41*	1.18 ± 0.16*
温肺降浊方组	5	0.89 ± 0.29▲#	1.32 ± 0.21▲#	0.90 ± 0.20▲#	0.73 ± 0.24▲#
shROCK2 组	5	0.90 ± 0.17▲#	1.36 ± 0.13▲#	0.89 ± 0.13▲#	0.74 ± 0.20▲#
阴性对照组	5	1.51 ± 0.50	1.92 ± 0.43	1.51 ± 0.51	1.17 ± 0.19
联合组	5	0.54 ± 0.25▲	0.76 ± 0.16▲	0.56 ± 0.19▲	0.54 ± 0.11▲

注：与假手术组比较，*$P < 0.01$；与模型组比较，▲$P < 0.05$；与联合组比较，#$P < 0.05$。



注：A：假手术组；B：模型组；C：温肺降浊方组；D：shROCK2 组；E：阴性对照组；F：联合组。

图 2　各组大鼠海马 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白条带图

4　讨论

众多研究证实，各类脑血管疾病均可造成 VaD，其潜在机制可能与神经可塑性损伤、轴－树突触信息处理与传递的关键突触环路损伤有关[13－14]。因此，近期研究侧重于海马神经病理损伤，揭示了 Rho/ROCK 信号通路在海马组织损伤中的作用。该通路不仅参与 VaD 的发生发展，而且在细胞迁移、树突发育及轴突延伸中发挥重要作用，已成为中枢神经损伤治疗药物研发的新兴靶点[15－16]。研究发现，病理状态下 RhoA/ROCK2 通路被激活，ROCK2 蛋白通过磷酸化其底物 MLCP，降低其下游 MLC 磷酸化水平，最终造成细胞骨架重排和轴突生长锥塌陷，抑制轴突生长[17－18]。因此，抑制 RhoA/ROCK2 通路的激活，可能有助于促进神经元轴突的生长[19－20]。

VaD 属于中医“痴呆”范畴，中医学对其病因病机的研究主要聚焦于五脏之本虚与瘀血、痰饮、浊毒等标实之证，尤重心肝脾肾，而肺肾之间的关联常被忽略[21]。经过长期研究，本课题组发现肺肾两虚及其功能失调在 VaD 进程中占据重要位置。依五行相生之理，肺（金）肾（水）相生，肺失宣降则肾封藏不足，肾精气不足则脑髓失养，进而引发痴呆。此外，大肠功能异常作为腑浊留滞的表现，亦与肺功能紧密相连，两者在病理上相互影响。因此，治疗 VaD 应侧重温补肺肾，辅以宣肺降浊之法，以恢复气机顺畅[22－23]。基于“金水相生”“肺肠相表里”的中医理论，本课题组创新性地提出“肺肾气虚”与“肠道浊毒蕴结”是 VaD 发展的关键，并据此创制了“温肺降浊方”[24]。该方以附子温肾阳为君，党参益肺气，三七化瘀血，大黄泻浊通便，干姜温肺散寒，炙甘草调和诸药。前期临床研究显示，温肺降浊方对 VaD 有显著疗效[25－28]。因此推测，温肺降浊方可能通过抑制 RhoA/ROCK2 通路，促进神经元保护与突触重构，从而改善认知功能。

本研究发现，VaD 大鼠 RhoA/ROCK2 通路激活后，MLC、MLCP 蛋白表达水平升高；反之，抑制 RhoA/ROCK2 通路后，MLC、MLCP 蛋白表达水平显著降低。另外，温肺降浊方与 AAV9－ROCK2－shRNA 均可通过影响 RhoA/ROCK2 通路，从而抑制 MLC、MLCP 蛋白表达，两种干预方法联用则效果更佳。由此推断，温肺降浊方治疗 VaD 的机制可能与抑制 RhoA/ROCK2 信号通路有关，其是否通过该通路的其他基因发挥神经保护作用，仍有待进一步研究。本研究在一定程度上为 VaD 的病理机制研究提供新靶点和新思路，且为神经退行性疾病的治疗开辟新途径。

参考文献：

[1]IADECOLA C，DUERING M，HACHINSKI V，et al. Vascular cognitive impairment and dementia：JACC scientific expert panel[J]. J Am Coll Cardiol，2019，73(25)：3326－3344.

[2]刘聪，位佳琳，刘忠义，等. 血管性痴呆致病机制及药物干预作用[J]. 中国老年学杂志，2023，43(14)：3580－3583.

[3]DING B J，MA W W，HE L L，et al. Soybean isoflavone alleviates β－amyloid 1－42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll－like receptor 4 expression and nuclear factor－κB activity in rats[J]. Int J Dev Neurosci，2011，29(5)：537－542.

[4]HENSEL N，RADEMACHER S，CLAUS P. Chatting with the neighbors：crosstalk between Rho－kinase (ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders[J]. Front Neurosci，2015，9：198.

[5]向军军，莫雪妮，杨璧璘，等. 温肺降浊方联合 ROCK2－shRNA 转染对血管性痴呆大鼠的神经保护作用[J]. 现代中西医结合杂志，2022，31(13)：1753－1758.

[6]唐农，黄立武. 对血管性痴呆从肺论治的思考[J]. 广西中医学院学报，2004，7(4)：1－3.

[7]赖菁菁，向军军，汪庭龙，等. 浅谈温补肺肾法治疗血管性痴呆的理论基础[J]. 湖南中医杂志，2015，31(12)：134－135.

[8]向军军，秦红玲，赖菁菁，等. 从精气学说谈温肾益肺法治疗血管性痴呆[J]. 四川中医，2015，33(9)：27－29.

[9]胡跃强,向军军,赖菁菁,等. 从线粒体相关凋亡蛋白表达探讨温肺降浊方对 VD 大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中医药通报,2017,16(2):59 - 62.
[10]胡跃强,赖菁菁,汪庭龙,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1804 - 1807.
[11]ZHANG Z H,SHI G X,LI Q Q,et al. Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia[J]. Int J Neurosci,2014,124(11):818 - 823.
[12]毕天威,徐子绚,宋杰,等. 基于 TLR - 4/MyD88/NF - κB 通路探讨针刺改善血管性痴呆大鼠认知功能的机制[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2023,25(12):4032 - 4038.
[13]DOLLEMAN - VAN DER WEEL M J,GRIFFIN A L,ITO H T,et al. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior[J]. Learn Mem,2019,26(7):191 - 205.
[14]CHONG C M,AI N N,LEE S M Y. ROCK in CNS:different roles of isoforms and therapeutic target for neurodegenerative disorders[J]. Curr Drug Targets,2017,18(4):455 - 462.
[15]LIU J,GAO H Y,WANG X F. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system[J]. Neural Regen Res,2015,10(11):1892 - 1896.
[16]张昆仑,李丽敏,赵迎春. Rho 激酶及其抑制剂在缺血性脑血管病的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2016,43(4):350 - 353.
[17]陈琪,贾瑞丹,陈霏霏,等. Rho/ROCK 信号通路与神经可塑性[J]. 生命的化学,2019,39(1):159 - 164.
[18]WEI X Y,LAN T,ZHOU Y Q,et al. Mechanism of α1 - adrenergic receptor - induced increased contraction of rat mesenteric artery in aging hypertension rats[J]. Gerontology,2021,67(3):323 - 337.
[19]SUNG J K,MIAO L Y,CALVERT J W,et al. A possible role of RhoA/Rho - kinase in experimental spinal cord injury in rat[J]. Brain Res,2003,959(1):29 - 38.
[20]SHIN H K,SALOMONE S,POTTS E M,et al. Rho - kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2007,27(5):998 - 1009.
[21]刘建军,汪庭龙,江丽平,等. 温肺降浊法治疗血管性痴呆探讨[J]. 浙江中医杂志,2018,53(11):815 - 816.
[22]赖菁菁,向军军,汪庭龙,等. 调理肺肾法治疗血管性痴呆的进展[J]. 中医药导报,2016,22(14):111 - 113.
[23]李晓琼,林荣清,杨璧璘,等. 温阳法治疗血管性痴呆概况[J]. 湖南中医杂志,2020,36(2):145 - 147.
[24]邓秋媚,胡跃强,潘能珍,等. 补肾活血法治疗血管性痴呆研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(11):100 - 105.
[25]胡跃强,唐农,吴林,等. 温肺降浊方联合盐酸多奈哌齐片治疗血管性痴呆的疗效及其机制[J]. 现代中西医结合杂志,2019,28(13):1378 - 1381.
[26]吴鹏,唐农,邢俊娥,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠认知功能及 VEGF 和 iNOS 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2017,12(2):200 - 202,205.
[27]王启芝,胡跃强,李媛媛,等. 温肺降浊汤对血管性痴呆患者扶阳自愈影响的临床观察[J]. 中国继续医学教育,2017,9(28):104 - 106.
[28]HU Y Q,CHEN W,WU L,et al. Clinical observation of the efficacy and mechanism of the Wenfei Jiangzhuo formula in lung and kidney deficiency - type vascular dementia[J]. Life,2020,13(1):144 - 150.

收稿日期:2024 - 11 - 15
作者简介:胡跃强(1973 -),男,湖南茶陵人,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治痴呆。
通信作者:向军军(1986 -),男,陕西安康人,医学博士,研究方向:中医药防治痴呆。E - mail:137463195@ qq. com
编辑:刘凯歌