基于神经血管单元探讨填髓通络方对脑小血管病大鼠模型认知功能的影响及神经保护作用

尚鹏绘，王梦梦，高英贺，关东升*，刘雨旋，王靖，任翼菡
（河南中医药大学第二临床医学院，河南 郑州 450002）

摘要 目的：观察填髓通络方对脑小血管病大鼠的认知功能、脑组织结构及神经血管单元的调控作用，探讨脑小血管病的可能治疗机制。方法：从 50 只 8 周龄雄性 SD 大鼠中随机选取 7 只作为假手术组，分离双侧颈总动脉而不结扎，剩余大鼠实行永久性结扎双侧颈总动脉手术制备脑小血管病模型。造模合格的 35 只大鼠随机分为模型组，尼莫地平组，填髓通络方低、中、高剂量组，每组 7 只。填髓通络方低、中、高剂量组大鼠按照 7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}、14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}、28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}剂量灌胃。尼莫地平组大鼠按 6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}剂量灌胃。假手术组和模型组给予等量生理盐水灌胃。连续灌胃 30 d。通过 Morris 水迷宫实验判断大鼠认知功能，HE 染色判断大鼠脑组织病理损伤程度，免疫组织化学染色法检测 NeuN、GFAP 和 Iba1 阳性细胞表达数量，Western Blot 法检测大鼠 SYN、Caspase－3、VEGF、Iba1、MBP、Cx43 和 GFAP 蛋白表达情况。结果：水迷宫实验显示，与假手术组相比，模型组定位航行试验逃避潜伏期明显增加（$P<0.01$），模型组空间探索实验中穿越平台的次数和平台所在象限的停留时间比例明显减少（$P<0.01$）；与模型组相比，各剂量组逃避潜伏期均有不同程度的降低（$P<0.01$），各剂量组穿越平台的次数和平台所在象限的停留时间比例均不同程度增加（$P<0.01$）。HE 染色显示，与假手术组相比，模型组神经细胞数量减少明显，细胞空泡样变明显，细胞明显向一侧皱缩，细胞深染，核固缩，海马 CA1 区明显见到细胞分布疏松紊乱、数量减少，神经纤维稀疏，病理改变明显，与模型组相比，各剂量组皮质和海马区的病变有不同程度的减轻。免疫组织化学染色结果显示，与假手术组相比，模型组 NeuN 染色颗粒较少，黄染少，GFAP、Iba1 染色黄染颗粒较多，与模型组相比，各剂量组呈现不同程度的神经元损伤的改善及星形胶质细胞和小胶质细胞激活的抑制。WB 结果显示，相较于假手术组，模型组 SYN、VEGF 和 MBP 的蛋白表达显著减少（$P<0.01$），Caspase－3、GFAP、Iba1 和 Cx43 蛋白表达量升高（$P<0.01$）。而与模型组相比，各剂量组 SYN、VEGF、MBP、Caspase－3、GFAP、Iba1 和 Cx43 的蛋白表达量则不同程度回调（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：填髓通络方能改善脑小血管病大鼠的学习记忆能力、提升 SYN、VEGF 和 MBP 的蛋白表达，抑制 Caspase－3、GFAP、Iba1 和 Cx43 蛋白表达量，促进突触可塑性、抑制细胞凋亡和影响脑组织病理学改变，其作用机制可能与发挥对 NVU 功能的保护作用有关。

关键词 脑小血管病；神经血管单元；填髓通络方；认知功能
中图分类号：R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1002－2392(2025)09－0017－09
DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250181

脑小血管病（Cerebral small vessel disease，CSVD）是由于微动脉、小动脉、毛细血管和小静脉等脑部微血管结构发生改变所引发的颅内血管性疾病[1]。现阶段，CSVD 的发病率正急剧上升，全球至少有 7 亿人受到其困扰[2]，其发病率是大血管卒中的 6～10 倍[3]。CSVD 的患病率随着年龄的增长而增加，研究表明，CSVD 发病率由 60 岁患者的 6% 增加到 80 岁患者的约 28%，90 岁以上人群患有某种形式 CSVD 的比例几乎是 100%[4-5]。该病还是中风、血管性认知障碍和痴呆的主要原因，约 25% 的中风和 45% 痴呆是由 CSVD发展而来[4]。CSVD 的临床症状有很大异质性，主要包括认知能力下降、中风、血管性痴呆、精神疾病、步态异常、平衡障碍、情绪抑郁和尿失禁等[6]，并往往

收稿日期：2024－07－14 **修回日期**：2024－12－17
基金项目：河南省重点研发与推广专项（232102310444）；河南省高等学校重点科研项目（23A360021）
作者简介：尚鹏绘（1997－），女，硕士研究生，从事中医药治疗脑病的相关研究。
*通信作者：关东升（1980－），男，博士，教授，博士生导师，从事中医药治疗脑病的相关研究。

伴随巨大的社会和经济负担。

目前,由于对 CSVD 机制研究尚有不足,在治疗上也比较局限。CSVD 的治疗主要分为预防干预和药物干预两个方面[7],预防干预阶段主要采取对不良生活习惯的纠正和对危险因素的控制;药物治疗阶段则依据临床表现采取口服抗凝药物、神经保护剂、抗氧化制剂等。关于 CSVD 的发病机制,主要观点包括脑低灌注、血脑屏障通透性增高、神经元凋亡、脑白质脱髓鞘等病理过程[8-9]。这些过程的发生都受到神经血管单元(Neurovascularunit,NVU)的影响[10],NVU 是由神经元、神经胶质细胞,如星形胶质细胞(Astrocyte,AS)、小胶质细胞(Microglia,MG)和少突胶质细胞(Oligodendrocyte,OL)、血管内皮细胞和其他细胞成分等构成的结构单元[11],NVU 概念的提出将神经元、神经胶质细胞、血脑屏障作为神经系统的基本结构和功能单位进行研究[12]。有研究发现,大脑低灌注可引起 NVU 的结构和功能受损,进而加速 CSVD 的进展,保护 NVU 也成为治疗 CSVD 的重要干预措施[13],NVU 重塑在改善脑缺血损伤的研究中受到越来越多的关注。

CSVD 病性属本虚标实,以肝、脾、肾等脏腑亏虚为本,瘀血和痰浊为标。张锡纯认为“气血上逆,挟痰挟瘀,直冲犯脑,蒙蔽清窍”,气血不足无法充足髓海,脏腑虚损无以抗邪,以致五脏不合,功能失调,则夹痰、夹瘀上犯脑窍[14]。“虚”“瘀”“痰”互结贯穿 CSVD 始终。治以扶正祛邪之法,填髓通络方全方由黄芪、熟地黄、黄精、法半夏、石菖蒲、丹参、土鳖虫、当归、郁金、豨莶草、栀子组成,以补先天为主,兼补后天;以活血为主,兼以化痰,先后天同补,标本兼治,符合 CSVD 的发病机制。课题组前期研究发现,填髓通络方能够有效减轻脑血管疾病患者神经功能损伤,还能提高 CSVD 大鼠血脑屏障完整性改善 CSVD 大鼠认知功能,但对于填髓通络方对 CSVD 的治疗机制尚未有深入研究,因此本研究通过结扎双侧颈总动脉(2VO)建立 CSVD 大鼠模型,观察填髓通络方对 CSVD 大鼠脑组织 NVU 的影响作用,探讨填髓通络方治疗 CSVD 的潜在机制,以期为临床及后续深入研究提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 动物

本次实验选用了 50 只 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 280 ~ 320 g。实验动物均由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2020 - 0001。实验期间所有大鼠按 3 只/笼进行分笼饲养,控制饲养温度(23 ± 2)℃,湿度 40% ~ 50%,设置 12 h 光照和 12 h 黑暗的标准光照周期,为大鼠提供灭菌水和灭菌饲料。适应性喂养 7 d 后造模。此次实验动物均已经通过河南中医药大学实验动物伦理委员会的严格审查(IACUC - 202303017)。

1.2 主要药物

填髓通络方组方:熟地黄 20 g,黄精 15 g,黄芪 15 g,法半夏 15 g,石菖蒲 10 g,丹参 15 g,土鳖虫 10 g,当归 20 g,郁金 9 g,豨莶草 15 g,栀子 10 g。称取以上药物,以 10 倍水煎煮 1.5 h,纱布过滤药液,再以 8 倍水煎煮 1 h 浓缩,制成 3 g/mL 的浓缩液。将尼莫地平片(山西亚宝药业,规格:20 mg/片)溶解在生理盐水中,制成 2 mg/mL 的混悬液。以上药物 4 ℃保存备用。

1.3 实验试剂及仪器

抗 Cx 43 抗体(26980 - 1 - AP)、抗 VEGF 抗体(19003 - 1 - AP)、抗 MBP 抗体(10458 - 1 - AP)、抗 NeuN 抗体(26975 - 1 - AP)、抗 GFAP 抗体(16825 - 1 - AP)、抗 Iba1 抗体(10904 - 1 - AP)、抗 SYN 抗体(17785 - 1 - AP)、免疫组化试剂盒(KIHC - 1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;HE 染色试剂盒(20220609)购自北京索莱宝科技有限公司。

Morris 水迷宫(63031,深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);高通量组织研磨器(TissueLyserII,德国 QIAGEN 公司);超速低温离心机(SIGMA3 - 18K;美国 Sigma - Aldrich 公司);光学显微镜(BX61;奥林巴斯株式会社);倒置荧光显微镜(Ti - E,日本 Nikon 公司);蛋白垂直电泳仪(164 - 5070;美国 BIO - RAD 公司);电转仪(170 - 4070;美国 BIO - RAD 公司);凝胶图像系统(美国 BIO - RAD 公司:170 - 8265)。

1.4 模型制备与鉴定

称量大鼠体质量后通过腹腔注射给予大鼠 1% 的戊巴比妥钠,按 35 mg/kg 的剂量进行麻醉。将麻醉后的大鼠仰卧位固定在鼠板上,用碘伏对大鼠颈部中线及左右两侧位置进行细致消毒和备皮工作。在颈部正中切开 1.5 cm 左右切口,轻柔分离表皮并用止血钳固定在两侧,暴露皮下,运用眼科镊钝性分开皮下组织至打开颈动脉鞘,小心分离双侧颈总动脉,并用 6 - 0 号手术尼龙线施行结扎操作确保无血流通过。随后,缝合表皮制备双侧颈总动脉闭塞模型(Bilateral carotid artery occlusion,BCAO),整个过程在 15 min 内结束。手术结束,将大鼠移到 37 ℃恒温工作台上,等待苏醒。采用 Morris 水迷宫实验的逃避潜伏期筛选出造模合格的大鼠。

1.5 分组及给药

将筛选出造模合格的 35 只 BCAO 大鼠随机分为

模型组，尼莫地平组，填髓通络方低、中、高剂量组，连同假手术组一共分为 6 组，每组 7 只。根据人和动物等效剂量换算关系，将填髓通络方低、中、高剂量组大鼠按照 7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}、14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}、28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}灌胃治疗。尼莫地平组大鼠按 6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}剂量灌胃。假手术和模型组给予等量生理盐水灌胃治疗。连续灌胃 30 d。

1.6 观察指标及疗效判定标准

1.6.1 水迷宫

灌胃 30 d 后用 Morris 水迷宫评判各组大鼠记忆能力，整个实验持续 6 d。定位航行实验：前 5 d 为定位航行实验，随机选择第一象限设置隐藏平台，每只大鼠依次从 4 个象限池壁中央，面朝池壁释放入水，装置记录大鼠 60 s 内登上平台停留 5 s 的时间，这个时间则为逃避潜伏期。若 60 s 内大鼠未找到平台，则将大鼠引导至平台并停留 5 s 进行记忆，此时该象限的逃避潜伏期记为 60 s。根据大鼠逃避潜伏期评估大鼠学习能力。空间探索实验：第 6 天为空间探索实验，定位航行实验结束 24 h 后进行空间探索实验。撤去第一象限的隐藏平台，从第三象限释放大鼠。记录 60 s 内大鼠成绩，包括游泳轨迹、穿越平台次数及平台所在象限的停留时间比例，以评估其空间记忆能力。

1.6.2 样本采集

按照 35 mg/kg 的剂量给予大鼠腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠，麻醉后处死大鼠。采集各组大鼠全脑组织，将其分为两部分，一部分用 4% 的多聚甲醛固定后，进行脱水、包埋，制成石蜡切片。另一部分置于液氮冻存后于 -80 ℃冰箱保存备用。

1.6.3 HE 染色

将石蜡切片脱蜡、梯度复水后，苏木素染色 15 min，流水洗去浮色，用分化液进行分化后用伊红染色 1 min，之后进行二甲苯透明，中性树胶封片。显微镜观察大鼠脑皮质和海马组织的神经细胞形态和组织学改变。

1.6.4 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡至水，用 1×柠檬酸钠抗原修复液于微波炉中火进行抗原修复 2 次，5 min/次，两次修复间隔 10 min，冷却后滴加 3% H_2O_2 处理。滴加 5% 山羊血清，于 37 ℃恒温箱封闭 1 h。随后用山羊血清稀释一抗(1∶200)，加于切片组织上，4 ℃冰箱孵育过夜。PBS 洗净后滴加山羊抗兔 HRP，在 37 ℃恒温箱孵育 30 min，清洗干净后，加入 DAB 显色液显色、苏木素复染核、脱水、中性树胶封片后光学显微镜下观察摄片。

1.6.5 WB 法检测各蛋白表达水平

从 -80 ℃冰箱取出待测组织，取适量的各组海马组织样本于 2 mL EP 管中，加入 RIPA 裂解液，充分裂解后取上清，用 BCA 试剂盒进行蛋白定量并用 5×Buffer 配平各组蛋白浓度。随后 100 ℃煮蛋白10 min，冷却后，放 -20 ℃冰箱保存。用 10% SDS-PAGE 制胶，每个泳道加入各组样本，电泳后将其转膜至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉进行封闭 1.5 h。封闭完成后，加入一抗 4 ℃孵育过夜。洗膜完成后加入 HRP 偶联兔/鼠二抗(1∶2 000)中孵育 1.5 h，洗膜后蘸取发光液显出蛋白条带，ImageJ 分析灰度值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析，定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示。对实验数据进行正态和方差齐性检验，若满足，则用 One-way ANOVA(单因素方差分析)比较各个组间的差异，若不满足，则用非参数的秩和检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验比较

造模 28 d 后，与假手术组相比，造模组大鼠的游泳路径轨迹更复杂(如图 1)，定位航行实验逃避潜伏期明显延长($P<0.01$)，空间探索实验大鼠穿越平台的次数明显少于假手术组($P<0.01$)，且在平台所在象限的停留时间比例也显著缩小($P<0.01$)，见表 1、表 2。

给药结束后，各组大鼠代表游泳路径轨迹如图 2 所示。与假手术组相比，模型组逃避潜伏期明显增加($P<0.01$)，且穿越平台的次数和平台所在象限的停留时间比例明显减少($P<0.01$)；与模型组相比，各治疗组逃避潜伏期均有不同程度降低($P<0.01$)，各治疗组穿越平台的次数和平台所在象限的停留时间比例均不同程度增加($P<0.01$)，见表 3、表 4。

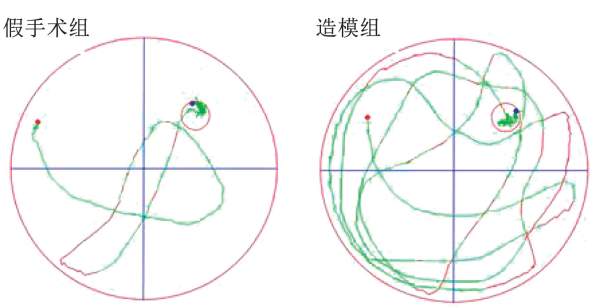

图 1 灌胃前大鼠代表游泳路径轨迹图

表 1　大鼠逃避潜伏期($\bar{x} \pm s$, s, $n=7$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	48.08 ±0.60	37.07 ±0.31	23.14 ±0.22	20.17 ±0.37	13.28 ±0.21
造模组	52.40 ±2.10##	44.71 ±1.91##	35.05 ±0.75##	31.67 ±1.70##	18.65 ±0.72##

注：与假手术组比较，##$P<0.01$。

表 2　大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间比($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	第 6 天	
	穿越平台次数/次	目标象限停留时间比/%
假手术组	3.20 ±0.98	42.99 ±6.52
造模组	0.63 ±0.62##	22.16 ±4.46##

注：与假手术组比较，##$P<0.01$。

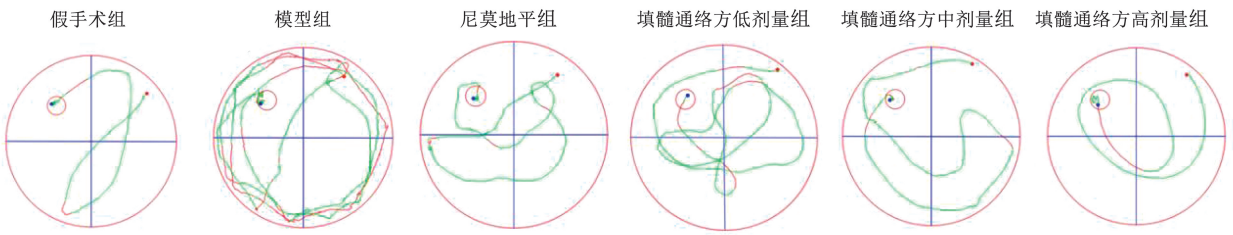

图 2　灌胃后各组大鼠代表游泳路径轨迹图

表 3　治疗后各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$, s, $n=7$)

组别	剂量	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	—	44.64 ±1.93	24.00 ±1.21	18.98 ±0.16	13.14 ±0.46	8.56 ±0.42
模型组	—	54.79 ±2.06##	43.53 ±1.14##	39.63 ±1.18##	30.77 ±0.59##	22.82 ±0.49##
尼莫地平组	6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}	46.18 ±1.53**	25.94 ±1.07**	25.80 ±0.46**	17.95 ±0.12**	15.39 ±0.44**
填髓通络方低剂量组	7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}	51.01 ±1.24**	34.08 ±0.84**	36.50 ±1.27**	27.21 ±0.45**	18.89 ±0.63**
填髓通络方中剂量组	14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}	50.33 ±1.49**	32.69 ±0.55**	29.20 ±0.90**	21.33 ±0.35**	16.55 ±1.72**
填髓通络方高剂量组	28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}	48.37 ±0.87**	27.57 ±1.11**	24.84 ±0.46**	16.74 ±0.50**	14.05 ±0.29**

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

表 4　治疗后各组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间比($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量	第 6 天	
		穿越平台次数/次	目标象限停留时间比/%
假手术组	—	4.86 ±0.64	41.97 ±5.62
模型组	—	0.29 ±0.45##	11.36 ±6.90##
尼莫地平组	6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}	2.14 ±0.83**	23.46 ±1.34**
填髓通络方低剂量组	7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.71 ±0.45	14.42 ±1.95
填髓通络方中剂量组	14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}	1.71 ±0.45**	21.01 ±4.14**
填髓通络方高剂量组	28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}	2.86 ±0.35**	28.97 ±4.13**

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

2.2　填髓通络方减轻 BCAO 大鼠脑组织损伤、促进突触可塑性和抑制细胞凋亡

HE 染色结果显示，与假手术组相比，模型组神经细胞数量减少明显，锥体细胞有明显的形态改变，细胞空泡样变明显，细胞明显向一侧皱缩，细胞深染，核固缩，海马 CA1 区明显见到细胞分布疏松紊乱、数量减少，神经纤维稀疏，病理改变明显；与模型组相比，各治疗组皮质和海马区的病变有不同程度的减轻，见图 3。WB 结果显示，与假手术组相比，模型组 SYN 含量明显减少（$P<0.01$），Caspase－3 蛋白含量升高（$P<0.01$），而治疗组 SYN 和 Caspase－3 表达量不同程度改善（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 4、表 5。

2.3　填髓通络方减少 BCAO 大鼠 NVU 中的神经元损伤和促进脑血管再生

免疫组化结果显示，与假手术组相比，模型组 NeuN 染色颗粒较少，黄染少，表明模型组存在神经元损伤和细胞减少的表现，与模型组相比，各治疗组不同程度地改善神经元损伤，见图 5。WB 结果显示，与假手术组相比，模型组 VEGF 的蛋白表达减少（$P<0.01$），与模型组相比，各治疗组均能提高 VEGF 的表达，但低剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$），填髓通络方中、高剂量组均显著提高 VEGF 表达（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 6、表 6。

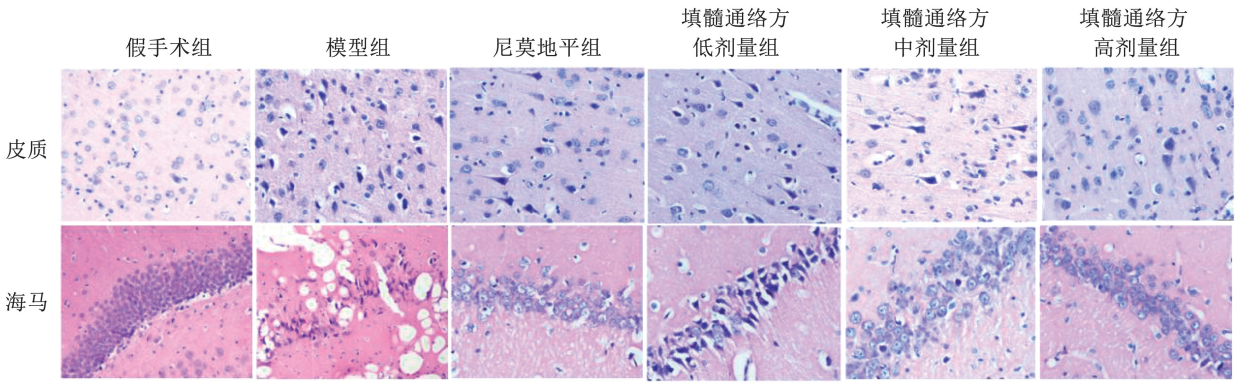

图 3 各组大鼠填脑皮质和海马区组织结构的病理变化(HE, ×400)

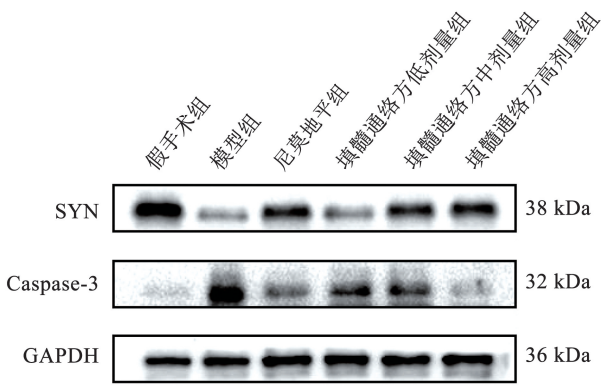

图 4 各组大鼠海马组织中 SYN、Caspase－3 蛋白表达印迹图

表 5 各组大鼠海马组织中 SYN、Caspase－3 表达量比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	SYN	Caspase－3
假手术组	—	1.24 ± 0.16	0.19 ± 0.06
模型组	—	0.45 ± 0.11$^{\#\#}$	0.97 ± 0.18$^{\#\#}$
尼莫地平组	6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}	0.78 ± 0.10**	0.53 ± 0.05**
填髓通络方低剂量组	7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.46 ± 0.06	0.66 ± 0.08*
填髓通络方中剂量组	14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.67 ± 0.05*	0.63 ± 0.10**
填髓通络方高剂量组	28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.72 ± 0.04*	0.27 ± 0.10**

注:与假手术组比较,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

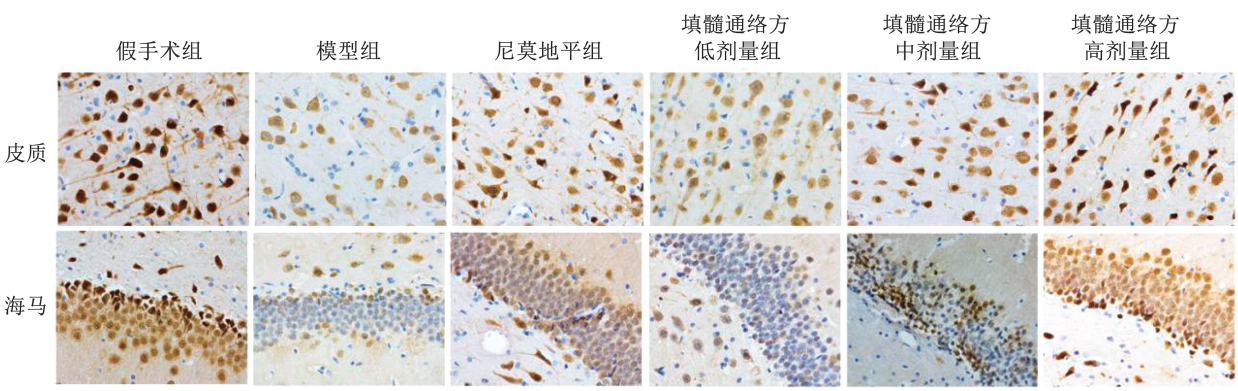

图 5 各组大鼠填脑皮质和海马区神经元标志物 NeuN 的蛋白表达(免疫组化, ×400)

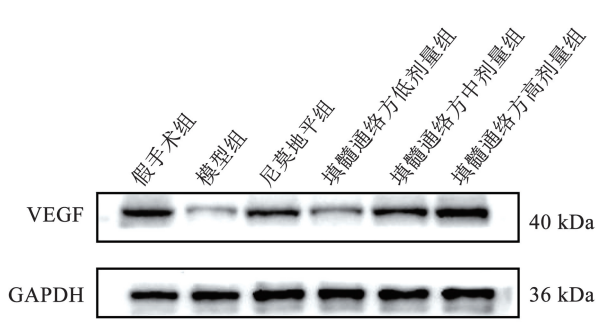

图 6 各组大鼠海马组织中 VEGF 蛋白表达印迹图

表 6 各组大鼠海马组织中 VEGF 表达表达量比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	VEGF
假手术组	—	1.12 ± 0.19
模型组	—	0.21 ± 0.09$^{\#\#}$
尼莫地平组	6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1}	0.60 ± 0.14*
填髓通络方低剂量组	7.2 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.31 ± 0.15
填髓通络方中剂量组	14.4 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.79 ± 0.21**
填髓通络方高剂量组	28.8 g·kg^{-1}·d^{-1}	0.94 ± 0.17**

注:与假手术组比较,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

2.4　填髓通络方对 NVU 中的神经胶质细胞的调控作用

免疫组化结果显示，与假手术组比胶，模型组 GFAP、Iba1 染色黄染颗粒多，蛋白表达量升高（$P<0.01$），见图 7。WB 结果显示，与假手术组比较，模型组 MBP 显著减少（$P<0.01$），GFAP、Iba1 和 Cx43 蛋白表达量增加（$P<0.01$），与模型组比较，各治疗组 MBP 蛋白含量增加（$P<0.01$），GFAP、Iba1 和 Cx43 蛋白含量不同程度下降（$P<0.05$，$P<0.01$）。见图 8、表 7。

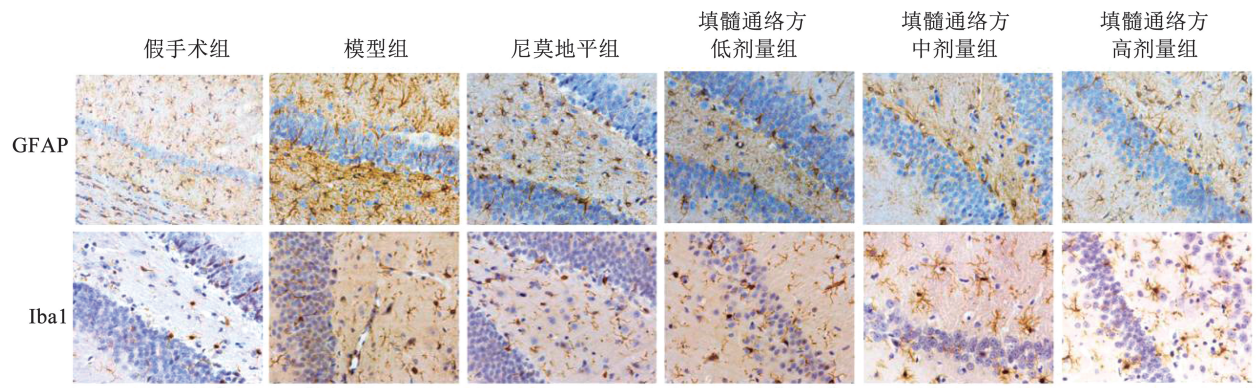

图 7　各组大鼠脑海马区 AS 和 MG 标志物 GFAP、Iba1 的蛋白表达（免疫组比，×400）

表 7　各组大鼠海马组织中 Iba1、MBP、Cx43、GFAP 表达表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	剂量	Iba1	MBP	Cx43	GFAP
假手术组	—	0.40 ± 0.10	1.14 ± 0.13	0.35 ± 0.10	0.56 ± 0.15
模型组	—	1.01 ± 0.07$^{\#\#}$	0.42 ± 0.07$^{\#\#}$	1.06 ± 0.16$^{\#\#}$	1.05 ± 0.15$^{\#\#}$
尼莫地平组	6.25 mg · kg^{-1} · d^{-1}	0.63 ± 0.11**	0.92 ± 0.05**	0.71 ± 0.03**	0.77 ± 0.07*
填髓通络方低剂量组	7.2 g · kg^{-1} · d^{-1}	0.78 ± 0.10*	0.53 ± 0.09	0.79 ± 0.10*	0.81 ± 0.13
填髓通络方中剂量组	14.4 g · kg^{-1} · d^{-1}	0.80 ± 0.05*	0.76 ± 0.11**	0.75 ± 0.02**	0.75 ± 0.11*
填髓通络方高剂量组	28.8 g · kg^{-1} · d^{-1}	0.54 ± 0.11**	0.92 ± 0.07**	0.52 ± 0.09**	0.55 ± 0.12**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

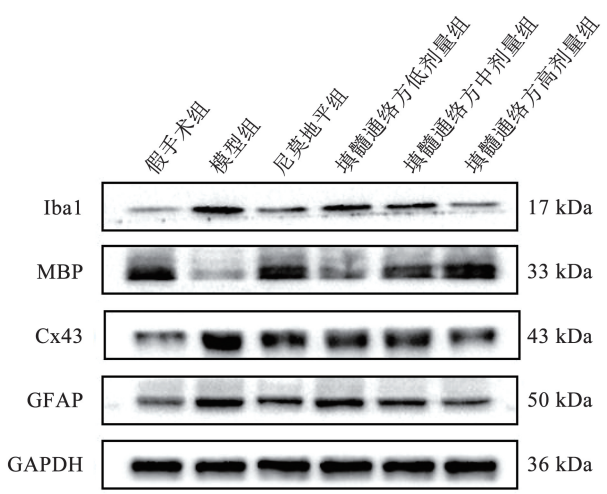

图 8　各组大鼠海马组织中 Iba1、MBP、Cx43、GFAP 蛋白表达印迹图

3　讨论

CSVD 具有高隐匿性、高发病率和高致残率等特点。临床表现复杂、临床识别率低，造成了防治措施的困惑。其发病机制主要涉及脑低灌注、内皮细胞屏障受损、炎症反应等病理过程[11]。国内外研究表明，2VO 法造成大脑慢性低灌注制备动物模型是国际上研究 CSVD 最常用的模型[15-17]。慢性低灌注是 CSVD 患者常见的病理状态，是由于多种因素引起脑血容量不足、管腔狭窄所致。大脑持续性低灌注会导致小血管周围脑组织长期处在缺血缺氧的状态，神经炎症因此发生，白细胞和炎症介质的渗透促进血脑屏障通透性，内皮细胞功能障碍，中枢神经系统受到损伤[18]。此时 MG 和 AS 也因此激活，一系列缺血级联反应启动[19]。濒死和死亡细胞释放出高浓度有毒物质可通过细胞膜通道扩散到周围细胞，导致大范围的神经细胞凋亡、血脑屏障损伤、OL 损伤介导髓鞘丢失最终引起神经功能障碍、脑部血管病变等[20]。在此过程中，神经元功能损伤、神经胶质细胞的激活以及神经元和胶质细胞之间进行信息传递的膜通道对缺血级联反应的发生和损伤的扩散发挥了重要的推动作用，这些是脑损伤最根本的原因[21]。这些因素会加速损伤学习记忆能力，加剧认知功能衰退和神经退行性改变过程甚至促进 CSVD 向血管性痴呆发展[16]。

大量相关文献证明[22]，慢性低灌注模型可导致大鼠全脑血流持久的降低，并能引起认知功能障碍、神经元损伤、脑白质髓鞘损伤、胶质细胞活化、神经元凋亡等。术后皮质脑血流立即下降超 70%，在 2 ~ 3 d 脑血流为正常大鼠 35% ~ 45%，随后进入慢性期血流逐渐恢复，造模 4 周内脑血流显著低于正常大鼠，4 周 ~ 3 个月期间持续低灌注至 6 个月才几乎恢复正常[23]。造模后 4 周会出现空间学习能力和记忆能力受损相关的认知障碍。术后 3 ~ 7 d，病理观察可见视神经和视束、侧脑室、胼胝体、内囊和尾壳纤维束出现白质病变[24]。在慢性期，该模型引起的大鼠脑低灌注状态与 CSVD 患者病程中慢性脑低灌注的病理过程相似，很好地模拟了 CSVD 的多种特征性病变。

NVU 是脑特有的一种功能复杂的多细胞结构，是脑神经活动和脑血流之间的耦连[25]。生理状态下，NVU 细胞相互作用，参与大脑免疫应答反应、调节液体和营养物质进入间质、管理血液供应、修复髓鞘、清除液体和废物、维持血脑屏障完整性，并为神经细胞提供稳定的间质环境，以实现正常的细胞功能[26]。AS 末端的一端连接神经元的树突，另一端包裹着内皮细胞，负责连接内皮细胞和神经元之间的信号传导，为神经元提供营养支持，在调节脑血流量、维持突触稳态及神经系统炎症调节中的有重要的作用[27-28]。MG 是大脑中重要的免疫细胞，MG 参与神经系统中抗原提呈和吞噬过程，具有调节大脑发育、维持神经元网络、分泌细胞因子和修复损伤等作用[29]，介导多种病理过程的发生发展。AS 和 MG 还能产生某些细胞因子促进 OPCs 和 OL 迁移和成熟来促进髓鞘的再生[30-31]。神经细胞的膜表面存在着广泛的缝隙连接，Cx43 是神经元和神经胶质细胞中表达最高的缝隙连接蛋白[32]。一个细胞膜上 6 个环绕的 Cx43 组成一个半通道缝隙连接，负责细胞内外环境之间的物质交换，两个半通道缝隙连接偶联形成缝隙连接通道，负责细胞之间的信息交流。一般情况下半通道缝隙连接处于关闭状态，在脑缺血、神经炎症或细胞外 Ca^{2+} 过高等刺激下会变为开放状态，允许信号分子双向自由交换[33]，在 NVU 中介导神经递质和营养物质的传递，也调控着 NVU 的自分泌和旁分泌途径。病理状态下，脑低灌注发生时，血管内的氧气和营养物质供应不足，星形胶质和 MG 激活，促进炎症损伤发生和神经元凋亡，NVU 的信息交流系统的平衡被破坏。AS 和 MG 释放补体成分、炎性因子和自由基等神经毒性因子，促进神经元和 OL 死亡。同时细胞内钙泵、钠泵失调，造成缝隙连接被破坏，Ca^{2+}、谷氨酸及其他有毒物质通过半通道缝隙连接迅速传递给周围细胞，最终导致脑白质损伤、髓鞘损伤、神经细胞凋亡等大面积伤害，造成 CSVD 患者的认知障碍。NVU 这一功能整体中细胞之间的相互动态作用都会影响脑组织的功能，对脑损伤后的组织修复、血管生成、神经功能恢复、突触可塑性增强具有至关重要的作用。

本研究发现，与模型组比较，填髓通络方组大鼠平均逃避潜伏期更短，穿越平台的次数和在平台象限停留的时间比例更高，HE 染色显示，其神经元数量更多，脑组织病理损伤更少，且 SYN 表达更多，Caspase-3 蛋白表达更少，说明填髓通络方可以改善 CSVD 大鼠的认知功能障碍和脑组织损伤程度，增加突触可塑性，降低神经细胞的凋亡来改善 CSVD 的病变。但是其作用机制尚未明确，又通过免疫组织化学染色法和 WB 检测了 NVU 相关蛋白，结果显示，填髓通络方组的 NeuN、VEGF 和 MBP 的表达增加，GFAP、Iba1 和 Cx43 的蛋白表达降低，说明填髓通络方能增加 NeuN 和 VEGF 的表达保护神经元和促进血管再生，MBP 表达增加说明 OL 产生髓鞘增多，AS 和 MG 的标志蛋白 GFAP 和 Iba1 表达下降，说明 AS 和 MG 的激活被抑制，下调 Cx43 介导神经细胞间的细胞缝隙连接，减少损伤细胞危险信号的传播，填髓通络方多靶点调控 NVU 多个环节，保护 NVU 功能整体来发挥治疗优势。

综上所述，填髓通络方可明显减轻 CSVD 大鼠的脑组织病理损伤、促进突触可塑性和抑制细胞凋亡，提高 CSVD 大鼠学习记忆能力。其作用机制可能与发挥对 NVU 功能的保护作用有关。CSVD 的病理过程极其复杂，若能从保护神经元的角度扩展到对 NVU 的保护，将有助于提高对疾病机制的理解，为疾病的防治提供新的思路。

参考文献：

[1] YANG Q, WEI X B, DENG B, et al. Cerebral small vessel disease alters neurovascular unit regulation of microcirculation integrity involved in vascular cognitive impairment [J]. Neurobiol Dis, 2022, 170: 105750.

[2] 潘锋. 影像学是脑小血管病主要诊断方法—访南京大学医学院附属鼓楼医院徐运教授[J]. 中国当代医药, 2020, 27(35): 1-3.

[3] PANTONI L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges [J]. Lancet Neurol, 2010, 9(7): 689-701.

[4] CANNISTRARO R J, BADI M, EIDELMAN B H, et al. CNS small vessel disease: a clinical review [J]. Neurology, 2019, 92(24): 1146-1156.

[5] CARUSO P, SIGNORI R, MORETTI R. Small vessel disease to subcortical dementia: a dynamic model, which interfaces aging, cholinergic dysregulation and the neurovascular unit [J]. Vasc Health Risk

Manag, 2019, 15: 259 – 281.
[6] 中国卒中学会脑小血管病专家联盟. 中国脑小血管病的临床研究优先发展战略规划[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14(11): 1075 – 1082.
[7] HAINSWORTH A H, MARKUS H S, SCHNEIDER J A. Cerebral small vessel disease, hypertension, and vascular contributions to cognitive impairment and dementia[J]. Hypertension, 2024, 81(1): 75 – 86.
[8] REN B D, TAN L, SONG Y B, et al. Cerebral small vessel disease: neuroimaging features, biochemical markers, influencing factors, pathological mechanism and treatment[J]. Front Neurol, 2022, 13: 843953.
[9] GAO Y, LI D, LIN J W, et al. Cerebral small vessel disease: pathological mechanisms and potential therapeutic targets[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 961661.
[10] SATO Y, FALCONE – JUENGERT J, TOMINAGA T, et al. Remodeling of the neurovascular unit following cerebral ischemia and hemorrhage[J]. Cells, 2022, 11(18): 2823.
[11] 洪靖舒, 韩登阳, 郭向阳. 神经血管单元在脑小血管病中的研究进展[J]. 中华脑血管病杂志(电子版), 2022, 16(1): 48 – 52.
[12] LIU Z, TANG Y H, ZHANG Z J, et al. Engineering neurovascular unit and blood – brain barrier for ischemic stroke modeling[J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(19): e2202638.
[13] ZHAO Y, YANG J H, LI C, et al. Role of the neurovascular unit in the process of cerebral ischemic injury[J]. Pharmacol Res, 2020, 160: 105103.
[14] 李歌, 代云, 冀梁, 等. 脑小血管病的中医病因病机及治法探讨[J]. 中医临床研究, 2021, 13(20): 91 – 93.
[15] XU H P, XIAO H, TANG Q Q. Lipopolysaccharide – induced intestinal inflammation on AIM2 – mediated pyroptosis in the brain of rats with cerebral small vessel disease[J]. Exp Neurol, 2024, 375: 114746.
[16] 王香元, 佘瑞宁, 方锐, 等. 脑小血管病实验动物模型及制备方法研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5851 – 5860.
[17] 孔倩倩, 黄浩, 骆翔. 血脑屏障与脑小血管病相关研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(11): 972 – 977.
[18] ZHANG L Y, PAN J J, MAMTILAHUN M, et al. Microglia exacerbate white matter injury via complement C3/C3aR pathway after hypoperfusion[J]. Theranostics, 2020, 10(1): 74 – 90.
[19] 祁林瑞, 耿新, 曾嵘, 等. 联合脑小血管病影像学总负担评分与血液炎症、代谢指标预测认知障碍的风险[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(8): 456 – 460.
[20] WANG M H, QIN C, LUO X, et al. Astrocytic connexin 43 potentiates myelin injury in ischemic white matter disease[J]. Theranostics, 2019, 9(15): 4474 – 4493.
[21] YIN X, FENG L S, MA D, et al. Roles of astrocytic connexin – 43, hemichannels, and gap junctions in oxygen – glucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanisms of salvianolic acid B and carbenoxolone[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 97.
[22] WASHIDA K, HATTORI Y, IHARA M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6176.
[23] 王紫月, 喻志源, 骆翔. 脑白质损伤动物模型研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(12): 800 – 803.
[24] 郭文娟, 张綦慧. 啮齿类慢性脑低灌注动物模型的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(6): 1032 – 1035.
[25] 马贺远, 李钦青, 楚世峰, 等. 神经血管单元结构和功能及其在脑缺血损伤发生机制中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(12): 885 – 894.
[26] WARDLAW J M, SMITH C, DICHGANS M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(7): 684 – 696.
[27] ZAREKIANI P, NOGUEIRA PINTO H, HOL E M, et al. The neurovascular unit in leukodystrophies: towards solving the puzzle[J]. Fluids Barriers CNS, 2022, 19(1): 18.
[28] 高昕, 杜冰滢, 陈晶晶, 等. 神经胶质细胞在血管性认知障碍发病机制中的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2022, 47(7): 753 – 757.
[29] COLONNA M, BUTOVSKY O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 441 – 468.
[30] LEE J, HAMANAKA G, LO E H, et al. Heterogeneity of microglia and their differential roles in white matter pathology[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(12): 1290 – 1298.
[31] KIRAY H, LINDSAY S L, HOSSEINZADEH S, et al. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination[J]. Exp Neurol, 2016, 283(Pt B): 541 – 549.
[32] CHEN Y Z, WANG L Z, ZHANG L L, et al. Inhibition of connexin 43 hemichannels alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury via the TLR4 signaling pathway[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 372.
[33] 王新月, 陈应柱, 于海龙, 等. 缝隙连接蛋白和泛连接蛋白在脑缺血中的作用[J]. 国际脑血管病杂志, 2020, 28(6): 472 – 476.

Study on the Effects of Tiansui Tongluo Formula on Cognitive Function and Neuroprotective Mechanism in a Rat Model of Cerebral Small Vessel Disease Based on the Neurovascular Unit

SHANG Penghui, WANG Mengmeng, GAO Yinghe, GUAN Dongsheng, LIU Yuxuan, WANG Jing, REN Yihan
(*The Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450002, *China*)

Abstract Objective: To observe the effects of Tiansui Tongluo Formula on cognitive function, brain tissue structure, and neurovascular unit (NVU) regulation in a rat model of cerebral small vessel disease, and explore the potential therapeutic mechanisms. Methods: Seventy – five 8 – week – old male SD rats were randomly divided into groups. Seven

rats underwent a sham surgery (bilateral common carotid arteries were isolated but not ligated) and served as the sham operation group. The remaining rats underwent permanent bilateral common carotid artery ligation to create a model of cerebral small vessel disease. After successful modeling, the 35 rats were randomly assigned to the model group, nimodipine group, and three Tiansui Tongluo Formula groups (low, medium, high doses), with 7 rats in each group. The Tiansui Tongluo Formula groups were treated by gavage with doses of 7.2 g · kg^{-1} · d^{-1}, 14.4 g · kg^{-1} · d^{-1}, and 28.8 g · kg^{-1} · d^{-1}, respectively. The nimodipine group was gavaged with 6.25 mg · kg^{-1} · d^{-1}. The sham and model groups were gavaged with an equal volume of saline. Treatment continued for 30 days. Cognitive function was assessed by the Morris water maze experiment. Brain tissue pathology was evaluated by HE staining. Immunohistochemistry was used to assess the expression of NeuN, GFAP, and Iba1 positive cells. Western blotting was used to detect the protein expression of SYN, Caspase - 3, VEGF, Iba1, MBP, Cx43, and GFAP. Results: In the Morris water maze experiment, compared to the sham operation group, the model group showed a significant increase in the escape latency during the navigation trial ($P < 0.01$) and a significant decrease in the number of platform crossings and the proportion of time spent in the platform quadrant during the spatial exploration trial ($P < 0.01$). Compared to the model group, all does groups showed a significant reduction in escape latency ($P < 0.01$) and a significant increase in the number of platform crossings and the proportion of time spent in the platform quadrant ($P < 0.01$). HE staining showed that compared to the sham operation group, the model group had significantly reduced neuronal numbers, vacuolar degeneration, cell shrinkage, and hyperchromasia. The hippocampal CA1 region showed disordered cell distribution, a decrease in cell numbers, and sparse nerve fibers. Compared to the model group, the cortical and hippocampal lesions in all does groups were alleviated to varying degrees. Immunohistochemical staining showed that compared to the sham operation group, the model group had fewer NeuN - positive cells and more GFAP and Iba1 - positive cells. In contrast, all does groups showed varying degrees of improvement in neuronal damage and inhibition of glial and microglial cell activation. Western blotting showed that compared to the sham operation group, the model group had significantly reduced expression of SYN, VEGF, and MBP ($P < 0.01$), and elevated expression of Caspase - 3, GFAP, Iba1, and Cx43 ($P < 0.01$). Compared to the model group, all does groups showed protein expression levels of SYN, VEGF, MBP, Caspase - 3, GFAP, Iba1, and Cx43. Conclusion: Tiansui Tongluo Formula can improve cognitive function in rats with cerebral small vessel disease, increase the expression of SYN, VEGF, and MBP proteins, inhibit the expression of Caspase - 3, GFAP, Iba1, and Cx43 proteins, promote synaptic plasticity, inhibit cell apoptosis, and influence brain tissue pathological changes. Its mechanisms may involve the protection of neurovascular unit (NVU) function.

Key words Cerebral small vessel disease; Neurovascular unit; Tiansui Tongluo Formula; Cognitive function