

# 通脉开窍丸对血管性认知障碍大鼠血管生成及 JAK2/STAT3/VEGF 信号通路的影响

刘娟<sup>1,2</sup>, 李彦杰<sup>1,2\*</sup>, 张志鑫<sup>2</sup>, 刘昊源<sup>2</sup>, 白艳杰<sup>3</sup>

(1. 河南中医药大学康复医学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中医院, 河南 郑州 450046; 3. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 目的 探讨通脉开窍丸对血管性认知障碍 (VCI) 大鼠血管生成及 JAK2/STAT3/VEGF 信号通路的作用。

**方法** 72只雄性SD大鼠随机选取10只作为假手术组, 剩余大鼠采用颈总动脉分次结扎法制备VCI大鼠模型。将造模成功后的大鼠随机分为模型组、通脉开窍丸低、高剂量组(13.8、27.6 g/kg)、尼莫地平组(10 mg/kg)和通脉开窍丸高剂量+AG490(JAK2抑制剂)组(通脉开窍丸27.6 g/kg+AG490 3 mg/kg), 各组给予相应剂量药物4周后取材。HE染色观察海马区病理学变化; 尼氏染色观察海马区神经元丢失情况; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织p-JAK2、p-STAT3、VEGF蛋白表达; 透射电镜观察海马组织神经元超微结构; 免疫荧光染色法检测CD34表达并计算缺血半暗区皮层微血管密度(MVD)。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期延长( $P<0.01$ ), 穿越平台次数减少( $P<0.01$ ); 海马区神经元结构疏松, 排列紊乱; 尼氏小体数量减少, 丢失严重; 线粒体嵴溶解消失, 线粒体损伤加重; 海马组织p-JAK2、p-STAT3、VEGF蛋白表达升高( $P<0.05$ ); 海马区MVD数量增加( $P<0.01$ )。与模型组比较, 通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组大鼠逃避潜伏期缩短( $P<0.01$ ), 穿越平台次数增加( $P<0.01$ ); 海马神经元细胞数量增多, 形态正常, 紊乱程度改善; 尼氏小体丰富, 丢失减少; 线粒体损伤减轻, 逐渐恢复正常形态; 海马组织p-JAK2、p-STAT3、VEGF蛋白表达升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 海马区MVD数量增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。而AG490逆转了通脉开窍丸高剂量的作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 通脉开窍丸可能通过激活JAK2/STAT3/VEGF信号通路, 促进血管生成, 减少神经元损伤, 促进脑功能的恢复, 从而发挥对VCI大鼠的改善作用。

**关键词:** 通脉开窍丸; 血管性认知障碍; 血管生成; JAK2/STAT3/VEGF信号通路

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2025)11-3622-08

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.013

## Effects of Tongmai Kaiqiao Pills on angiogenesis and JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway in rats with vascular cognitive impairment

LIU Juan<sup>1,2</sup>, LI Yan-jie<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Zhi-xin<sup>2</sup>, LIU Hao-yuan<sup>2</sup>, BAI Yan-jie<sup>3</sup>

(1. School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the effect of Tongmai Kaiqiao Pills on angiogenesis and JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway in rats with vascular cognitive impairment (VCI). **METHODS** Ten of seventy-two male SD rats were randomly selected as sham operation group, and the remaining rats were made VCI rat model by ligation of common carotid artery in stages. Rats after successful modeling were randomly divided into model group, low and high dose groups of Tongmai Kaiqiao Pills (13.8 g/kg, 27.6 g/kg), nimodipine group (10 mg/kg) and high dose

收稿日期: 2025-01-02

**基金项目:** 国家中医药管理局“张仲景传承与创新专项”专项课题(GZY-KJS-2022-043-3); 2024河南省自然基金项目(242300420111)

**作者简介:** 刘娟(1999—), 女, 硕士生, 从事神经系统疾病引起功能障碍的康复治疗研究。Tel: 18326617834, E-mail: 1319651329@qq.com

\*通信作者: 李彦杰(1969—), 女, 硕士, 主任医师, 从事中西医结合治疗神经系统疾病的研。Tel: 15838039999, E-mail: yanjieli2008@126.com

of Tongmai Kaiqiao Pills+AG490 (JAK2 inhibitor) group (Tongmai Kaiqiao Pills 27.6 g/kg+AG490 3 mg/kg). The samples were taken after 4 weeks of corresponding dose of drugs. Pathological changes in hippocampus were observed by HE staining. Nissl staining was used to observe the loss of neurons in hippocampus. Western blot was used to detect the protein expressions of p-JAK2, p-STAT3 and VEGF in hippocampus. The ultrastructure of neurons in hippocampus was observed by transmission electron microscope. The expression of CD34 was detected by immunofluorescence staining and the microvessel density (MVD) of ischemic penumbra was calculated.

**RESULTS** Compared with the sham operation group, the escape latency of the model group was prolonged ( $P < 0.01$ ), and the times of crossing the platform were reduced ( $P < 0.01$ ); neurons in hippocampus were loose in structure and disordered in arrangement; the number of Nissl bodies decreased and the loss was serious; mitochondrial crista dissolved and disappeared, and mitochondrial damage was aggravated; the protein expressions of p-JAK2, p-STAT3 and VEGF in hippocampus increased ( $P < 0.05$ ); the number of MVD in hippocampus increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the escape latency of rats in each dose group of Tongmai Kaiqiao Pills and nimodipine group were shortened ( $P < 0.01$ ), and the times of crossing the platform were increased ( $P < 0.01$ ); the number of hippocampal neurons increased, the morphology was normal, and the disorder degree improved; Nissl's corpuscles were abundant and the loss is reduced; mitochondrial damage was reduced and gradually returned to normal shape; the protein expressions of p-JAK2, p-STAT3 and VEGF in hippocampus increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the number of MVD in hippocampus increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). AG490 reversed the high-dose effect of Tongmai Kaiqiao Pills ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Tongmai Kaiqiao Pills may promote angiogenesis, reduce neuronal damage and promote the recovery of brain function by activating JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway, thus playing an improving role in VCI rats.

**KEY WORDS:** Tongmai Kaiqiao Pills; vascular cognitive impairment; angiogenesis; JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway

血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是指主要由脑血管病及其危险因素导致的认知功能障碍，包括从轻度认知障碍到痴呆的整个过程<sup>[1]</sup>，其患病率较高，特别是在老年人群中，是降低患者生活质量的关键因素<sup>[2]</sup>。目前，临幊上针对 VCI 的治疗药物选择较为有限，在提升患者整体疗效上并不理想<sup>[3]</sup>。

越来越多的证据表明，通过密集的微血管网络维持脑灌注对于维持正常的大脑认知功能至关重要<sup>[4-5]</sup>。当缺血性损伤发生后，促血管生成因子表达增加，促进血管内皮细胞增殖，同时形成新生血管和侧支循环，将氧气和营养物质带到受损组织<sup>[6]</sup>。Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) 及其下游蛋白信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription3, STAT3) 信号通路作为细胞中重要的信号转导通路之一，血管内皮生长因子 (vascular endothelia growth factor, VEGF) 是 JAK2/STAT3 途径的重要下游效应分子，其在促进脉管新生中发挥着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。

通脉开窍丸为河南省中医院院内制剂，临床效果显著，但其具体的作用机制尚未清晰，这在一定

程度上限制了其广泛推广和应用。因此，本研究通过构建 VCI 大鼠模型，深入研究通脉开窍丸对 VCI 大鼠的改善作用，以期为其临床应用提供科学依据。

## 1 材料

1.1 实验动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只，体质量  $(180 \pm 20)$  g，购于济南朋悦实验动物繁育有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 2022-0006]，饲养在河南中医药大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (豫) 2021-0015]，饲养室温度  $(20 \pm 25)$  °C，相对湿度 50% ~ 60%，自然照明，自由获取水和食物，根据《国家实验动物管理条例》(2017 年第三次修订) 严格规范对动物的处置标准。本研究实验方案中对动物的所有处理均经过河南中医药大学实验动物伦理委员会审核通过 (伦理审批号 IACUC-202310005)。

1.2 药物 通脉开窍丸 (豫药制备字 Z20210137000) 购于河南省中医院，其原方组成为制远志 18 g、赤芍 18 g、丹参 18 g、郁金 15 g、茯神 18 g、石菖蒲 18 g、三七 12 g、浙贝 15 g。尼莫地平 (国药准字 H10910081)，购于山东新华制药股份有限公司。

**1.3 试剂** 苏木精-伊红染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL Plus 超敏发光液（北京索莱宝科技有限公司，货号 G1120、PC0020、PE0010）；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、尼氏染色液、CD34 抗体（武汉赛维尔生物科技有限公司，货号 G2043、G1036、GB15013）；JAK2、p-JAK2 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司，货号 3230、3771）；STAT3、p-STAT3 抗体（美国 Immunoway 公司，货号 YT4443、YP0250）；VEGFA 抗体、GAPDH 抗体、HRP 二抗（武汉三鹰生物技术有限公司，货号 66828-1-Ig、10494-1-AP、SA00001-2）；JAK2 抑制剂 AG490（美国 MCE 公司，货号 HY-12000）。

**1.4 仪器** 中型大鼠水迷宫（上海欣软信息科技有限公司）；HP300 型生物组织脱水机、MT1 型轮转式切片机（深圳达科为医疗科技有限公司）；PBM-C 型石蜡包埋机、TPJ-A 型摊片机、PPJ-A 型漂片机〔普瑞斯星（常州）医疗器械有限公司〕；SDS-PAGE 凝胶电泳系统、转膜仪、KZ-III-FP 型高速低温研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；Ts2R-FL 型倒置荧光显微镜、Ts2 型倒置相差显微镜（日本 Nikon 公司）；Infinitr F50 型酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；FUSION FX6. EDGE 型化学发光成像系统（法国 Vilber GmbH 公司）。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 大鼠经过 1 周适应性喂养后，采用分次结扎颈总动脉（改良 2-VO 法）构建 VCI 大鼠模型<sup>[9]</sup>。造模大鼠术前禁食不禁水 12 h，腹部注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉，碘伏消毒手术区域，于颈部正中切开一个纵行切口，充分暴露双侧颈总动脉、分离迷走神经，将大鼠左侧颈总动脉用缝线结扎，术后局部滴注庆大霉素 2 mL 预防感染后缝合。整个过程中，将大鼠置于加热台上，保持肛门温度 36.5~37.5 ℃。1 周后用同样的方法实施右侧颈总动脉结扎。假手术组仅切开皮肤，分离双侧颈总、颈内和颈外动脉，不进行颈总动脉的结扎。造模后进行水迷宫实验，以假手术组大鼠逃避潜伏期的平均值作为参考标准值，计算造模组每只大鼠逃避潜伏期的平均值与参考标准之差占该大鼠逃避潜伏期的比值，若比值>20%，则视为造模成功<sup>[10]</sup>。

**2.2 分组和给药** 72 只大鼠中随机选取 10 只作为假手术组，其余大鼠按照“2.1”项下方法造模，在造模过程中死亡 8 只，剔除造模失败 2 只，

造模成功 52 只。将造模成功的大鼠依据随机数字表法分为模型组 10 只、通脉开窍丸低剂量组 10 只、通脉开窍丸高剂量组 10 只、通脉开窍丸高剂量+AG490 组 11 只、尼莫地平组 11 只。其中在干预期间通脉开窍丸高剂量组死亡 1 只，最后成功入组 51 只。通脉开窍丸高、低剂量组灌胃给予 27.6、13.8 g/kg 通脉开窍丸药液；尼莫地平组灌胃给予 10 mg/kg 尼莫地平溶液（加纯水振荡溶解，于 4 ℃ 冰箱保持备用<sup>[11]</sup>，临用时复温）；通脉开窍丸高剂量+AG490 组灌胃给予 27.6 g/kg 通脉开窍丸药液的同时腹腔注射 3 mg/kg AG490；假手术组和模型组灌胃给予等体积蒸馏水。造模后第 2 周开始给药，每天 1 次，持续 4 周。

**2.3 Morris 水迷宫实验** 采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠学习记忆障碍情况。测试区域被划分为四个象限，逃生平台放置在水下约 2 cm 处，水温维持在 22 ℃ 左右。大鼠被放入迷宫中自由探索 2 min 以适应环境。从每个象限分别放入大鼠，头部面向墙壁，记录它们在 90 s 内找到并爬上平台所需的时间，即逃避潜伏期。若大鼠在 90 s 内未能找到平台，则将其引导至平台并适应 10 s，此时逃避潜伏期记为 90 s。连续训练 5 d，在第 6 天，移除平台，将大鼠放置在原平台所在象限的对侧，记录并分析其在 90 s 内的行动轨迹，以及穿越原平台所在象限的次数。

**2.4 苏木精-伊红染色和尼氏染色** 在完成水迷宫实验后收集大鼠脑组织，置于多聚甲醛固定液中固定 24 h，脱水，石蜡包埋后制作石蜡切片（5 μm），按照常规苏木精-伊红（HE）染色和尼氏（Nissl）染色步骤进行脱蜡、复水、染色、透明、中性树胶封片，将处理好的切片置于光学显微镜下观察，采集图像并分析。

**2.5 免疫荧光染色检测 CD34 表达** 取各组脑组织石蜡切片，脱蜡至水，抗原修复，自然冷却至室温，滴加 3% BSA 封闭 30 min，滴加 CD34 一抗（1:500）4 ℃ 孵育过夜，加入对应的二抗（1:300）室温避光孵育 50 min，滴加 DAPI 染液室温避光孵育 10 min，滴加荧光淬灭剂 5 min，流水冲洗 10 min，稍晾干后滴加抗荧光淬灭封片剂封片。于荧光显微镜下观察并采集图像。用 Image J 软件进行分析，每组选 3 只大鼠，每只大鼠取 1 张切片，在 400 倍光学显微镜下随机选取 3 个视野进行计数，记录每张切片 3 个视野的 CD34 阳性细胞数，其平均值即为微血管密度（microvessel densit，

MVD) 值(个/HP)。

2.6 透射电镜观察海马组织超微结构 取1 mm×1 mm×1 mm新鲜海马组织样本后立即浸入电镜固定液,充分固定4 h,然后进行脱水、包埋,制作超薄切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后,于透射电子显微镜下观察其超微结构特征

2.7 Western blot法检测海马组织p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、VEGFA蛋白表达 称取各组海马组织,加入适量的RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,研磨匀浆,冰上裂解30 min,4 ℃、12 000 r/min离心10 min,提取总蛋白溶液,BCA蛋白浓度测定后,100 ℃金属浴加热变性10 min。电泳分离蛋白后,电转至PVDF膜上,放置于脱脂奶粉溶液中室温封闭2 h,分别加入一抗p-JAK2、JAK2、GADPH、p-STAT3、STAT3、VEGFA,4 ℃孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育1 h,洗膜后滴加ECL超敏发光液,显影、曝光,最后采用Image J软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析 通过SPSS 25.0和GraphPad

Prism 9.0软件进行处理,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,若数据符合正态分布且方差齐,各组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较采并LSD法;若数据非正态或方差不齐,则选择非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 通脉开窍丸对VCI大鼠学习记忆障碍的影响 与假手术组比较,模型组大鼠游泳轨迹明显紊乱,逃避潜伏期时间延长( $P<0.01$ ),穿越平台次数减少( $P<0.01$ ),表明造模后大鼠出现明显的认知功能损害;与模型组比较,通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组大鼠游泳轨迹紊乱程度改善,逃避潜伏期有所缩短( $P<0.01$ ),穿越平台次数有所增加( $P<0.01$ ),表明通脉开窍丸能够促进VCI大鼠认知能力恢复;与通脉开窍丸高剂量组比较,通脉开窍丸高剂量+AG490组大鼠逃避潜伏期时间延长( $P<0.01$ ),穿越平台次数减少( $P<0.01$ ),见表1、图1。

表1 各组大鼠逃避潜伏期和穿越平台次数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 1 Comparison of escape latency and crossing platform times of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数/只	逃避潜伏期/s					穿越平台次数/次
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	
假手术组	10	50.38±3.33	39.63±3.82	26.46±2.29	24.63±0.66	17.91±3.43	8.30±0.95
模型组	10	84.28±3.06 <sup>**</sup>	73.25±1.83 <sup>**</sup>	53.65±3.47 <sup>**</sup>	44.58±5.63 <sup>**</sup>	34.18±2.39 <sup>**</sup>	2.50±0.85 <sup>**</sup>
通脉开窍丸低剂量组	10	74.21±1.10 <sup>##</sup>	64.23±4.77 <sup>##</sup>	45.68±1.71 <sup>##</sup>	37.13±2.13 <sup>##</sup>	29.38±2.97 <sup>##</sup>	4.70±1.34 <sup>##</sup>
通脉开窍丸高剂量组	9	59.45±2.13 <sup>##</sup>	49.37±1.81 <sup>##</sup>	38.15±1.16 <sup>##</sup>	31.21±3.64 <sup>##</sup>	21.25±2.38 <sup>##</sup>	7.78±1.39 <sup>##</sup>
通脉开窍丸高剂量+AG490组	11	70.17±2.28 <sup>△△</sup>	62.37±4.55 <sup>△△</sup>	50.82±2.47 <sup>△△</sup>	43.10±2.89 <sup>△△</sup>	35.28±2.67 <sup>△△</sup>	2.64±1.12 <sup>△△</sup>
尼莫地平组	11	58.55±11.56 <sup>##</sup>	48.04±10.24 <sup>##</sup>	36.71±2.20 <sup>##</sup>	29.14±3.25 <sup>##</sup>	20.94±2.49 <sup>##</sup>	7.82±1.66 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与通脉开窍丸高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

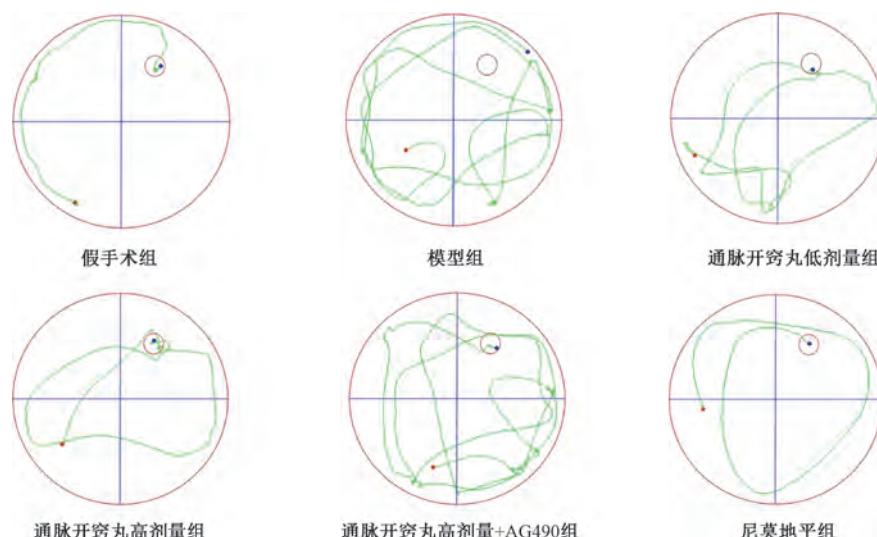
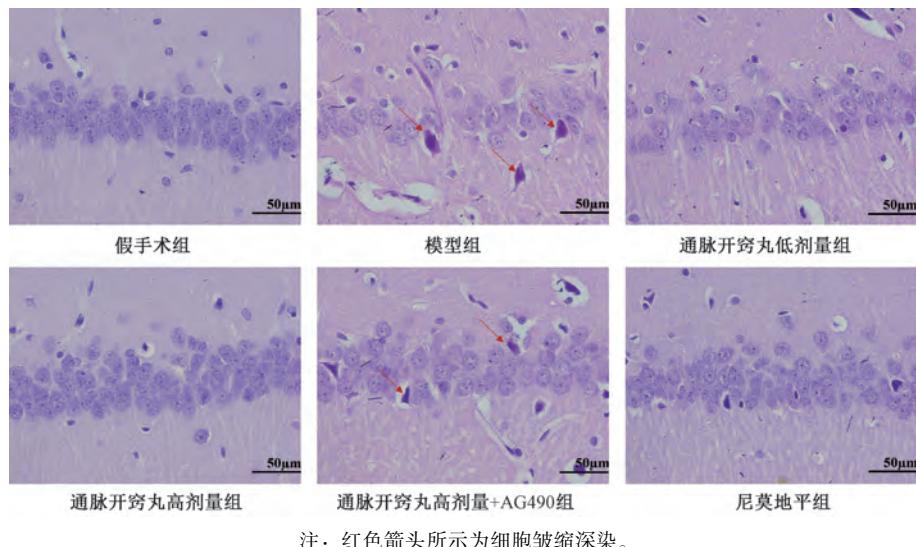


图1 Morris水迷宫实验大鼠运动轨迹图

Fig. 1 Movement trajectory of rats in the Morris water maze experiment

**3.2 通脉开窍丸对VCI大鼠神经元形态的影响** 假手术组神经元细胞形态结构完整，排列紧密，细胞核呈圆形或椭圆形，未见明显的细胞核固缩和细胞坏死、凋亡现象；模型组神经元数量减少，排列分散，形状不规则，出现明显的细胞核萎缩和细胞空泡坏死；通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组大鼠神

经元丢失情况、细胞形态排列情况以及深染程度均较模型组有不同程度好转，且高剂量组对神经元的改善情况优于低剂量组；通脉开窍丸高剂量+AG490组大鼠海马神经元部分细胞坏死明显，神经元数量减少，细胞形态不规则，排列松散无序，组织受损程度较为严重，见图2。



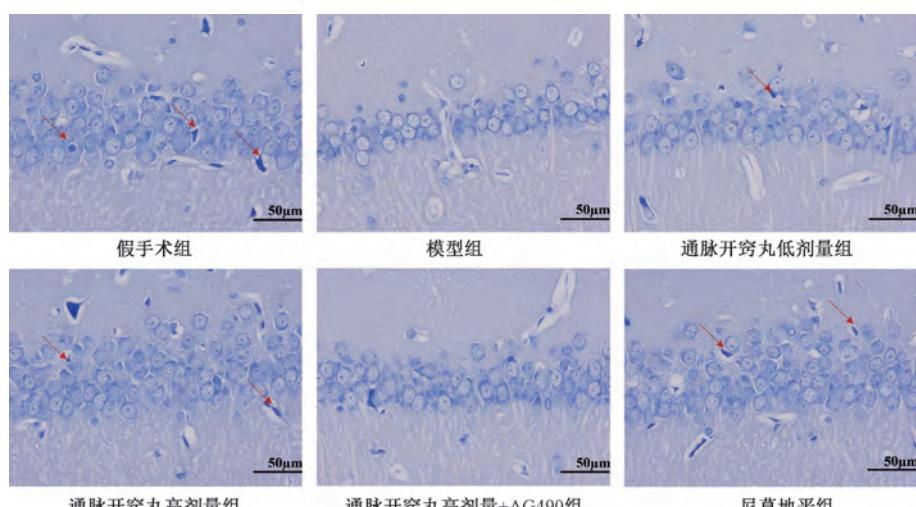
注：红色箭头所示为细胞皱缩深染。

图2 各组大鼠神经元形态 (HE染色,  $\times 400$ )

Fig. 2 Morphology of rat neurons in each group (HE staining,  $\times 400$ )

**3.3 通脉开窍丸对VCI大鼠神经元尼氏小体的影响** 假手术组海马神经元形态正常，细胞结构完整，排列紧密，核仁清晰，尼氏小体数量丰富；模型组海马神经元排列紊乱，大小不一，核仁消失，细胞坏死现象明显，尼氏小体丢失严重；与模型组

比较，通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组尼氏小体损伤缓解，海马神经元排列也更为整齐；通脉开窍丸高剂量+AG490组神经元细胞大小不一、结构异常，尼氏小体数量减少，表明海马区病理损伤有所加重，见图3。



注：红色箭头所示为尼氏小体。

图3 各组大鼠神经元尼氏小体形态 (尼氏染色,  $\times 400$ )

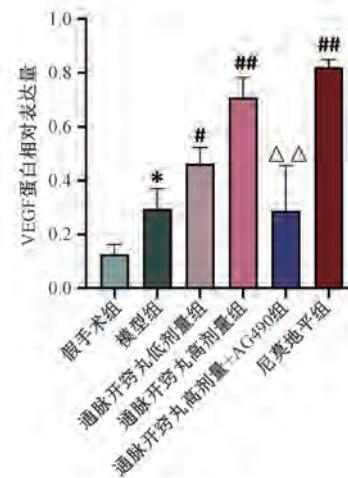
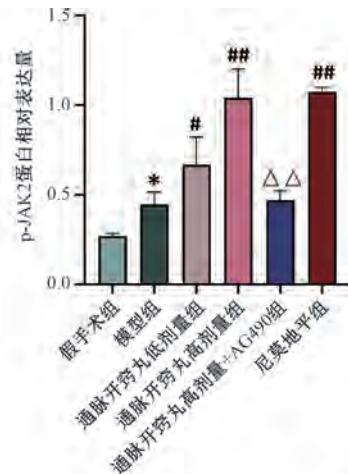
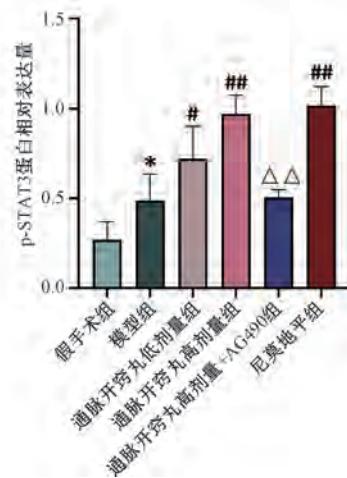
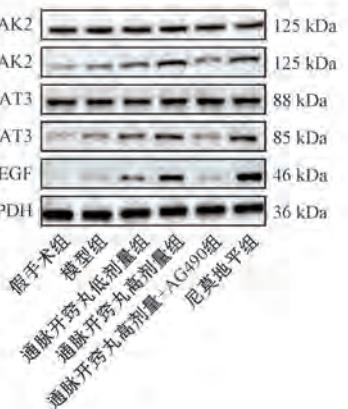
Fig. 3 Morphology of Nissl bodies in neurons of rats in each group (Nissl staining,  $\times 400$ )

**3.4 通脉开窍丸对VCI大鼠海马组织JAK2/STAT3/VEGF信号通路蛋白表达的影响** 与假手术

组比较，模型组大鼠海马组织p-JAK2、p-STAT3、VEGF蛋白表达均升高 ( $P < 0.05$ )；与模型组比

较,通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组大鼠海马组织 p-JAK2、p-STAT3、VEGF 蛋白表达均升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) ;与通脉开窍丸高剂量组比较,通脉开窍丸高剂量+AG490 组大鼠海马组织 p-JAK2、

p-STAT3、VEGF 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ),表明通脉开窍丸通过促进该信号通路的激活来刺激血管生成的发生,见图 4。



注:与假手术组比较, \*  $P<0.05$ ; 与模型组比较, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ ; 与通脉开窍丸高剂量组比较, △△  $P<0.01$ 。

图 4 各组大鼠海马组织 p-JAK2、p-STAT3、VEGF 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Comparison of p-JAK2, p-STAT3 and VEGF protein expressions in hippocampus of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

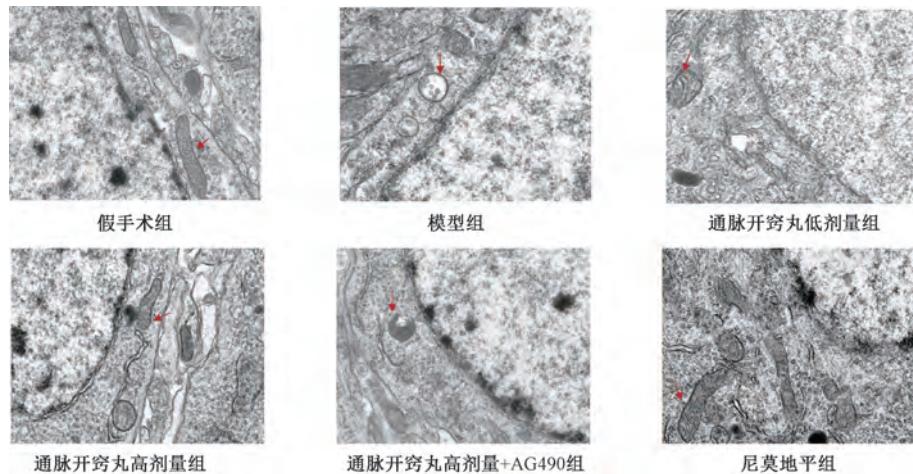
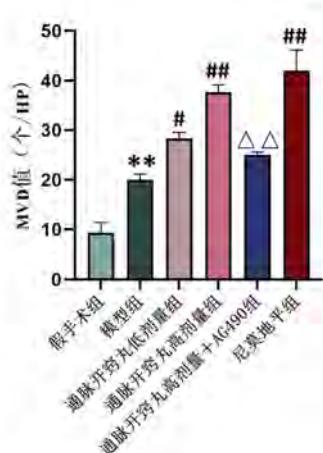
3.5 通脉开窍丸对 VCI 大鼠海马神经元超微结构的影响 假手术组神经元结构完整,线粒体形态正常,结构清晰,嵴排列整齐,染色质均匀分布,胞质内细胞器结构清晰,内皮细胞未见水肿。模型组神经元可见不同程度的水肿,线粒体嵴断裂或消失,结构不清,有的高度空泡化。与模型组比较,通脉开窍丸低剂量组核膜双层结构不明显,部分线粒体嵴断裂,结构模糊,未见明显高度空泡化的线粒体;通脉开窍丸高剂量组和尼莫地平组大鼠神经元形态恢复明显,结构较完整,细胞排列较规则、紧密,基膜基本正常,水肿减轻,已接近正常状态。与通脉开窍丸高剂量组比较,尼莫地平组海马神经元细胞形态及数量改善情况无明显差异;通脉

开窍丸高剂量+AG490 组大鼠神经元水肿,核膜断裂,核仁不清晰,可见少量线粒体空泡变性,但损伤程度低于模型组大鼠。结果见图 5。

3.6 通脉开窍丸对 VCI 大鼠海马 MVD 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马 CA1 区 MVD 值升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,通脉开窍丸各剂量组和尼莫地平组大鼠海马 CA1 区 MVD 值升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与通脉开窍丸高剂量组比较,通脉开窍丸高剂量+AG490 组大鼠海马 CA1 区 MVD 值降低 ( $P<0.01$ ),见图 6。

#### 4 讨论

毛德西教授认为血管性认知障碍在中医上属“愚痴”“呆病”“痴呆”等病证的范畴,其病位

图5 各组大鼠海马神经元超微结构(透射电镜,  $\times 20\,000$ )Fig. 5 Ultrastructure of hippocampal neurons in each group of rats (transmission electron microscope,  $\times 20\,000$ )

注: 与假手术组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与通脉开窍丸高剂量组比较, △△  $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠海马MVD比较(免疫荧光,  $\times 400$ , n=3)Fig. 6 Comparison of MVD in hippocampus of rats in each group (immunofluorescence,  $\times 400$ , n=3)

在心在脑, 痰瘀阻窍是对本病病机的高度概括。故祛痰化瘀、开窍增智的观点贯穿于中医论治血管性认知障碍的全过程。“通脉开窍丸”由丹参、石菖蒲、远志、赤芍、郁金、三七、茯神、浙贝组成, 方中以丹参、石菖蒲作为君药, 能豁痰祛瘀, 开窍醒神; 赤芍、三七共为臣药, 能活血祛瘀, 疏通血脉; 郁金、远志、茯神、浙贝共为佐药, 可解郁宁心, 醒神增志。诸药合用共奏化痰开窍、祛瘀通脉、醒神增智之功。

VCI是一类由脑血管疾病及其危险因素引起的认知功能下降综合征, 发病机制复杂<sup>[12-13]</sup>。血管生成是构成复杂血管网络的关键环节, 大脑依靠持

续血液供应来维持其结构和功能完整性<sup>[14-15]</sup>。而脑血管病变时会出现血管新生不足, 损害神经元正常功能。因此, 血管生成是通脉开窍丸治疗VCI的一个重要机制, 新血管的生成可改善缺血区脑血流量, 为受损神经细胞提供营养支持, 促进神经功能恢复和认知能力改善。

PI3K/Akt/mTOR信号通路在促进细胞周期、增殖和血管生成中起重要作用, 激活该通路可上调VEGF和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达, 改善缺血性卒中后血管生成<sup>[16]</sup>。脑缺血损伤也可以激活血管内的Wnt信号通路, 促进血管内皮细胞新生<sup>[17]</sup>。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)通路在缺氧条件下被激活, 通过上调VEGF等因子的表达促进血管生成<sup>[18]</sup>, 在这些复杂的信号通路网络中, JAK2/STAT3信号通路在脑损伤后的血管生成和神经修复过程中也发挥关键作用。

JAK2/STAT3通路参与细胞生长、代谢、分化、降解和血管生成等多个基因的转录和表达<sup>[19]</sup>。JAK2是一类广泛分布于细胞内的非交叉型酪氨酸激酶, 细胞因子受体激活JAK2后, 磷酸化STAT3蛋白, 磷酸化后的STAT3会发生构象变化, 形成二聚体并转移到细胞核内, 促进多种与细胞分化、凋亡及血管生成等生物过程相关的下游基因表达<sup>[20]</sup>。VEGF是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂源, 能诱导新血管的形成, 并提升血管通透性<sup>[21]</sup>。研究表明, 缺血状态下血管生成有助于神经功能损伤恢复, 这一过程主要是由VEGF表达水平升高引起<sup>[22-23]</sup>。

本实验通过双侧颈总动脉分次结扎建立大鼠

VCI模型，探究通脉开窍丸对VCI的干预作用及其对JAK2/STAT3/VEGF信号通路的影响，结果显示通脉开窍丸能激活该信号通路，提升p-JAK2、p-STAT3及VEGF蛋白表达，促进VCI后的血管生成，并能减轻海马神经元线粒体损伤。此外，该药还能缩短VCI大鼠的逃避潜伏期，增加穿越平台次数，减轻大鼠海马CA1区病理学损伤，有效改善血管性认知障碍大鼠认知功能。这一发现初步揭示了通脉开窍丸治疗VCI的分子机制，不仅为中医药治疗VCI提供了新靶点，也为后续的临床研究和药物研发奠定了重要基础。

## 参考文献：

- [1] Skrobot O A, Black S E, Chen C, et al. Progress toward standardized diagnosis of vascular cognitive impairment: Guidelines from the Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(3): 280-292.
- [2] Rundek T, Tolea M, Arikot T, et al. Vascular cognitive impairment (VCI) [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(1): 68-88.
- [3] 中国医师协会神经内科分会认知障碍专业委员会，《中国血管性认知障碍诊治指南》编写组. 2019年中国血管性认知障碍诊治指南[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(35): 2737-2744.
- [4] Zanon Zotin M C, Sveikata L, Viswanathan A, et al. Cerebral small vessel disease and vascular cognitive impairment: from diagnosis to management[J]. *Curr Opin Neurol*, 2021, 34(2): 246-257.
- [5] Yang Q, Wei X, 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.
- [6] Zhang X, Zhang Y, Zhang L, et al. Overexpression of ACE2 ameliorates A $\beta$ -induced blood-brain barrier damage and angiogenesis by inhibiting NF- $\kappa$ B/VEGF/VEGFR2 pathway [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(3): 237-244.
- [7] Yan Z, Gibson S A, Buckley J A, et al. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases[J]. *Clin Immunol*, 2018, 189: 4-13.
- [8] Apté R S, Chen D S, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [9] 王建婷, 谭子虎, 周剑杰, 等. 基于Cx43/Glu/AMPAR通路探讨加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马髓鞘损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 38-46.
- [10] Luo X Q, Li A, Yang X, et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects by modulating the M1/M2 subset polarization of microglia/macrophages in the hippocampal CA1 region of vascular dementia rats via cannabinoid receptor 2[J]. *Chin Med*, 2018, 13: 14.
- [11] 丁慧敏, 李彦杰, 秦合伟, 等. 基于HIF-1 $\alpha$ /BNIP3信号通路调控线粒体自噬探讨通脉开窍丸治疗血管性痴呆大鼠的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(21): 52-60.
- [12] van der Flier W M, Skoog I, Schneider J A, et al. Vascular cognitive impairment[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18003.
- [13] Rajeev V, Chai Y L, Poh L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 93.
- [14] Chung A S, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 563-584.
- [15] Linh T T D, Hsieh Y C, Huang L K, et al. Clinical trials of new drugs for vascular cognitive impairment and vascular dementia[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11067.
- [16] Lee J H, Kim C, Um J Y, et al. Casticin-induced inhibition of cell growth and survival are mediated through the dual modulation of Akt/mTOR signaling cascade[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(2): 254.
- [17] 牛雨晴, 秦合伟, 郭宁, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在脑梗死后血管新生中作用机制的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(7): 1787-1791.
- [18] Liang C, Ni G X, Shi X L, et al. Astragaloside IV regulates the HIF/VEGF/Notch signaling pathway through miRNA-210 to promote angiogenesis after ischemic stroke[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2020, 38(3): 271-282.
- [19] Xin P, Xu X, Deng C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106210.
- [20] Zhong Y, Yin B, Ye Y, et al. The bidirectional role of the JAK2/STAT3 signaling pathway and related mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113690.
- [21] Yu W, Jin H, Sun W, et al. Connexin43 promotes angiogenesis through activating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway under chronic cerebral hypoperfusion[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(10): 2656-2675.
- [22] Song T, Zhang Y, Zhu L, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury and the therapeutic effect of traditional Chinese medicine: a narrative review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(46): e35890.
- [23] Wang W, Hu W. Salvianolic acid B recovers cognitive deficits and angiogenesis in a cerebral small vessel disease rat model via the STAT3/VEGF signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3146-3151.