

脑震宁颗粒改善多重脑震荡模型大鼠学习记忆障碍的机制研究[△]

王心如*, 闫耀洲, 张春雪, 赵 乐#, 高 丽, 王永辉(山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619)

中图分类号 R289;R285.5;R338.64

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2026)11-1416-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.11.06



摘要 **目的** 研究脑震宁颗粒对多重脑震荡(MCC)模型大鼠学习记忆障碍的改善机制。**方法** 采用闭合式可控皮质撞击法制备MCC大鼠模型。实验设置空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、吡拉西坦组(阳性对照组, 0.324 g/kg)和脑震宁颗粒高、中、低剂量组(5.4、2.7、1.35 g/kg), 每组11只。每天灌胃给药/生理盐水1次, 连续28 d。实验期间监测大鼠一般情况和体重变化。测定大鼠糖水偏好率和新物体识别指数;检测大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量;观察脑皮层神经元病理变化;检测脑皮层中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、白细胞介素6(IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平以及AMP活化的蛋白激酶(AMPK)、糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β)、Tau蛋白磷酸化水平。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠精神状态变差, 对外界刺激反应迟缓, 摄食量、饮水量减少, 肢体灵活度下降, 皮毛杂乱;体重、糖水偏好率、新物体识别指数均显著降低($P<0.05$);脑皮层中伊文思蓝渗出量显著增加($P<0.05$);神经元损伤严重, Bax蛋白阳性面积比以及IL-6、TNF- α 水平和Tau蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);Bcl-2蛋白阳性面积比、IL-10水平和AMPK、GSK3 β 蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 脑震宁颗粒各剂量组大鼠的一般情况、病理损伤均有所改善, 定量指标均有所回调, 其中脑震宁颗粒高剂量组定量指标差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 脑震宁颗粒可有效改善MCC模型大鼠的学习记忆障碍;其作用机制可能与激活AMPK/GSK3 β 通路, 抑制炎症反应、降低Tau蛋白磷酸化水平, 进而修复神经元损伤有关。

关键词 脑震宁颗粒;多重脑震荡;学习记忆障碍;血脑屏障;AMPK/GSK3 β 通路;Tau蛋白

Study on the mechanism of Naozhenning granules in improving learning and memory impairment in multiple cerebral concussion model rats

WANG Xinru, YAN Yaozhou, ZHANG Chunxue, ZHAO Le, GAO Li, WANG Yonghui(College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism by which Naozhenning granules (NZN) improve learning and memory impairment in a rat model of multiple cerebral concussion (MCC). **METHODS** The MCC rat model was established using the closed controlled cortical impact method. The experiment was set up with a blank group (normal saline), a model group (normal saline), a piracetam group (positive control group, 0.324 g/kg), and high-, medium-, and low-dose NZN groups (5.4, 2.7, 1.35 g/kg), with 11 rats in each group. Drugs or normal saline were administered by gavage once daily for 28 consecutive days. General condition and body weight were monitored throughout the experiment. The sucrose preference rate and novel object recognition index were measured; Evans blue (EB) extravasation in the cerebral cortex was detected; pathological changes of cortical neurons were observed; the levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), interleukin-6 (IL-6), IL-10, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the cerebral cortex were determined; and the phosphorylation levels of AMP-activated protein kinase (AMPK), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), and Tau protein were detected. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group showed poor mental state, sluggish response to external stimuli, reduced food and water intake, decreased limb flexibility, and disheveled fur. Body weight, sucrose preference rate, and novel object recognition index were significantly decreased ($P<0.05$); EB extravasation in the cerebral cortex was significantly increased ($P<0.05$), with severe neuronal damage. The positive area ratio of Bax protein, IL-6 and TNF- α levels, and Tau protein phosphorylation level were all significantly increased ($P<0.05$), whereas the positive area ratio of Bcl-2 protein, IL-10 level, and AMPK and GSK3 β protein phosphorylation levels were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, all NZN dose groups showed improvements in general condition and pathological damage, with quantitative indices partially restored, and the differences in quantitative indices in high-dose NZN group were statistically significant ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** NZN can effectively improve learning and memory impairment in MCC model rats. The mechanism may be related to activating the AMPK/GSK3 β pathway, inhibiting inflammatory response, reducing Tau protein phosphorylation level, and then repairing the neuronal injury.

△ 基金项目 山西省基础研究计划项目(No.202403021211146);山西省中医药管理局中医药创新团队项目(No.zyytd2024027);山西省重点实验室建设项目(No.zyyys2024023);山西省教育厅2025年度研究生教育创新计划各类项目(No.2025TD21)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:方剂的现代药理作用及其物质基础。E-mail:xxrcy@163.com

通信作者 讲师,硕士生导师,博士。研究方向:方剂的现代药理作用及其物质基础。E-mail:zleva2012@126.com

KEYWORDS Naozhenning granules; multiple cerebral concussion; learning and memory impairment; blood-brain barrier; AMPK/GSK3 β pathway; Tau protein

轻度创伤性脑损伤(mild traumatic brain injury, mTBI)指头部受到撞击、打击等机械力作用所引起的暂时性脑功能障碍,包括脑组织结构性、功能性损伤。全球每年约有4 200万人经历包括脑震荡在内的mTBI,其已成为国际重要公共卫生问题^[1]。近年来,机动车交通事故、运动撞击等因素引发的mTBI病例数逐年递增;脑震荡作为mTBI最主要的类型,若多次发生可进展为多重脑震荡(multiple cerebral concussion, MCC),而约30%的MCC患者会出现头痛头晕、记忆力下降、注意力不集中等长期后遗症状,影响日常工作和生活^[2-3],同时MCC也可能是阿尔茨海默病、慢性创伤性脑病等神经退行性疾病的前期诱因^[4]。研究表明,大脑神经元主要依赖Tau蛋白结合微管来维持自身结构稳定,而脑损伤发生后,会引起颅脑微环境紊乱,进而诱导Tau蛋白发生异常磷酸化,使其丧失微管结合能力,形成神经原纤维缠结,最终引发神经元凋亡、轴突传导功能障碍,直接导致学习记忆等认知功能下降^[5]。

脑震宁颗粒是山西省名优中成药,具有活血化瘀、化痰通络、安神除烦等功效,多用于治疗脑外伤后引发的失眠、头痛、烦躁、健忘等症,在临床脑损伤治疗中应用广泛^[6-7]。本课题组前期研究结果表明,脑震宁颗粒可以减轻MCC模型大鼠的神经元损伤,改善模型大鼠的学习记忆能力^[8],但是其调控学习记忆能力的具体机制,以及与Tau蛋白在脑损伤后发生异常磷酸化之间的内在联系仍不明确。AMP活化的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是参与多种信号转导途径的关键蛋白,而糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)不仅是其主要下游调节因子之一,还是Tau蛋白磷酸化的重要激酶之一^[9-10]。研究发现,激活AMPK/GSK3 β 通路可能减少Tau蛋白磷酸化,对阿尔茨海默病样病理和记忆认知功能损伤具有改善作用^[11]。因此,本研究以MCC模型大鼠为研究对象,基于AMPK/GSK3 β 通路,深入研究脑震宁颗粒对模型大鼠神经元病理损伤、学习记忆功能的影响和调控机制,进一步为脑震宁颗粒在临床治疗MCC等轻型颅脑损伤提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:68099 II型精密脑立体打击器、R540IE型呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司),A51119600C型酶标仪、Megafuge 8R型低温高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),Image-Quant LAS 500型发光成像仪(美国Alpha Innotech公司),KZ-III-FP型研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司),KDC-160HR型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科

学仪器公司),LEiCA RM2016型病理切片机[徕卡显微系统(上海)有限公司],H36型病理切片扫描仪(宁波舜宇仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:脑震宁颗粒(山西振东安特生物制药有限公司,批号20240701001,规格10 g),吡拉西坦片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号6230423,规格0.4 g),蔗糖(天津市光复科技发展有限公司,批号20250410),伊文思蓝染液(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号E6135),肝素钠(北京索莱宝科技有限公司,批号2541011001),50%三氯乙酸(山东科源生化有限公司,批号C17535342),兔源B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号00118469),兔源Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号13CM400B),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号9300014001),白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号均为202509),兔源磷酸化AMPK(p-AMPK)、AMPK、磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)、GSK3 β 、磷酸化Tau(p-Tau)、Tau、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为3600002463、6100009389、5500037632、5500038186、5500032582、1152710101、3507443010),苏木精-伊红(HE)染液、柠檬酸抗原修复液(武汉博尔夫生物科技有限公司,货号分别为BH0001、B0034),DAB显色试剂盒(上海丹科医疗器械技术服务有限公司,货号K3468)。

1.3 实验动物

75只SPF级5周龄雄性Wistar大鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,体重150 g左右,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2024-0001。大鼠购入后,饲养于山西中医药大学动物房内,动物使用许可证号为SYXK(晋)2025-0009。动物房内温度为(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 $\pm$ 5)%,12 h规律光暗交替。饲养期间大鼠自由进食、饮水。本动物实验符合相关伦理要求,并通过山西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批准编号:AWE202403209)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为空白组($n=11$)和造模组($n=64$)。造模组大鼠采用闭合式可控皮质撞击法制备MCC模型,具体操作如下:使用

68099 II 型精密脑立体打击器击打大鼠额颞叶部(速度 5.6 m/s, 打击头直径 2.0 mm, 持续 3 s, 击打深度 3.5 mm), 隔日击打 1 次, 连续 7 d^[12-13]。根据文献[14]中造模成功标准(撞击后立刻出现一过性呼吸暂停, 但 20 s 内恢复; 出现短暂的角膜反射、针刺疼痛反应消失, 但 3 min 内恢复), 本研究共有 57 只大鼠造模成功。选取造模成功的 55 只大鼠按随机数字表法分为模型组、吡拉西坦组(阳性对照组, 0.324 g/kg)和脑震宁颗粒高、中、低剂量组(5.4、2.7、1.35 g/kg)^[14], 每组 11 只。各药物组大鼠灌胃相应药物, 空白组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续 28 d。

2.2 一般情况及体重监测

造模后, 每天观察大鼠的精神状态、饮食饮水量、活动情况。分别于造模前、造模后及给药干预 2 周后和干预结束后, 称定大鼠空腹体重。

2.3 行为学检测

2.3.1 糖水偏好实验

每组取 6 只大鼠进行实验。末次给药结束后的次日, 给予大鼠 2 瓶相同浓度(1%)的糖水, 自由饮用, 进行适应驯化; 24 h 后更换为 1 瓶 1% 糖水和 1 瓶清水, 让大鼠自由饮用, 并在 12 h 后交换 2 瓶水的位置; 持续 24 h 后撤除水瓶, 禁水、禁食 12 h。随后给予大鼠提前称重的 1% 糖水和清水各 1 瓶, 1 h 后交换 2 瓶水的位置; 2 h 后取出水瓶, 分别称定水瓶重量, 计算糖水/清水消耗量以及糖水偏好率[糖水偏好率=糖水消耗量/(糖水消耗量+清水消耗量)×100%]。每只大鼠单独测定, 并保持环境条件一致。

2.3.2 新物体识别实验

每组取 10 只大鼠分别于造模后及糖水偏好实验结束后进行新物体识别实验。适应期: 连续 2 d 将大鼠放入空实验箱(尺寸为 100 cm×100 cm×45 cm)自由活动 10 min, 以适应环境。训练期: 先在实验箱内放置 A、B 2 个大小、形状完全相同的圆柱体, 然后将大鼠放入实验箱, 让其自由探索, 记录 10 min 内大鼠对 2 个物体的探索时间。1 h 后进入测试期: 将实验箱中的圆柱体 B 换成圆锥体 C, 重新放入大鼠, 让其自由探索, 记录 10 min 内大鼠分别对旧物体 A 和新物体 C 的探索时间。新物体识别指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间)×100%。

2.4 脑皮层中伊文思蓝渗出量检测

末次新物体识别实验结束后, 每组取 3 只大鼠, 尾静脉注射 2% 伊文思蓝溶液(2 mL/kg); 1 h 后麻醉大鼠, 剪开胸腔、暴露心脏, 以含肝素钠的生理盐水进行心肺灌流, 直到流出液体颜色转为无色, 迅速收集脑组织, 按左、右大脑分离大鼠额颞叶区脑皮层后, 每只随机选取左、右大脑中其中一个脑皮层组织, 加入 50% 三氯乙酸研磨匀浆, 离心取上清液。采用酶标仪在 620 nm 处检测吸光度, 根据标准曲线计算脑皮层中伊文思蓝渗出量。

2.5 样本取材与处理

末次给药后, 每组取 3 只大鼠, 按“2.4”项下方法分离脑皮层组织, 于-80℃冰箱中保存, 用于 ELISA、Western blot 实验检测; 取每组剩余的 5 只大鼠, 经异氟烷麻醉和生理盐水、4% 多聚甲醛心肺灌流后, 取全脑于 4% 多聚甲醛中固定, 常规制备石蜡切片(厚 5 μm), 用于 HE、免疫组化染色实验。

2.6 脑皮层神经元病理变化观察

采用 HE 染色法观察。取“2.5”项下全脑组织石蜡切片, 常规进行 HE 染色后, 采用显微镜观察各组大鼠脑皮层区神经元病理变化。

2.7 脑皮层中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达检测

采用免疫组化染色法检测。取“2.6”项下全脑组织石蜡切片, 经脱水、脱蜡、高温抗原修复后, 加入山羊血清、0.3% H₂O₂ 封闭, 之后加入 Bax 和 Bcl-2 一抗(稀释比例分别为 1:200、1:500), 4℃孵育过夜; 次日室温复温后, 加入二抗(稀释比例为 1:500), 室温孵育 50 min; 常规 DAB 显色, 经苏木精复染、梯度无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后, 在显微镜下观察脑皮层区 Bax、Bcl-2 蛋白阳性表达情况(阳性表达呈棕黄色), 并统计脑皮层区凋亡蛋白阳性面积比。凋亡蛋白阳性面积比(%)=阳性染色区域总面积/所选视野组织总面积×100%。

2.8 脑皮层中炎症因子水平检测

采用 ELISA 法检测。取“2.5”项下冻存的脑皮层组织(每组取 3 份)进行匀浆, 离心取上清液。按试剂盒说明书方法操作, 测定脑皮层中 IL-6、IL-10、TNF-α 水平。

2.9 脑皮层中 AMPK、GSK3β、Tau 蛋白磷酸化水平检测

采用 Western blot 法检测。取“2.5”项下脑皮层组织(每组取 3 份), 加入 RIPA 裂解液充分研磨, 取上清液。使用 BCA 试剂盒测定上清液中总蛋白浓度后, 进行加热变性处理。取变性后蛋白, 上样进行电泳, 然后在电流 350 mA 下转膜 1 h, 以封闭液封闭; 将膜与 p-AMPK、AMPK、p-GSK3β、GSK3β、p-Tau、Tau(稀释比例均为 1:1 000)一抗和内参 GAPDH(稀释比例为 1:5 000)一起孵育, 14 h 后洗涤 3 次; 室温孵育二抗(稀释比例为 1:5 000), 2 h 后洗涤 3 次; 滴加 ECL 发光液显影成像, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以磷酸化蛋白与未磷酸化蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的磷酸化水平。

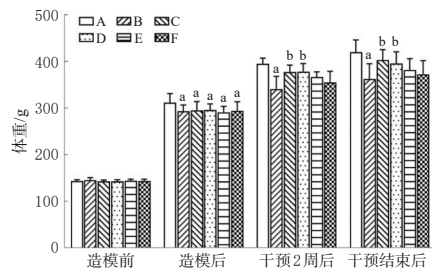
2.10 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 采用 Prism 软件绘制图表。计量资料符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 一般情况观察及体重监测结果

造模前,大鼠精神状态良好,对外界刺激反应敏捷,摄食量、饮水量稳定,肢体活动自如,皮毛顺滑;体重维持正常增长趋势,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后,与空白组比较,模型组大鼠精神状态变差,对外界刺激反应迟缓,摄食量、饮水量减少,肢体灵活度下降,皮毛杂乱,体重显著减少($P<0.05$);干预2周和干预结束后,与模型组比较,给药组大鼠精神状态逐步好转,对外界刺激的反应速度和摄食量、饮水量均有所改善,肢体活动灵活性提升,皮毛杂乱状况减轻,且吡拉西坦组和脑震宁颗粒高剂量组大鼠体重显著增加($P<0.05$)。结果见图1。



A: 空白组;B: 模型组;C: 吡拉西坦组;D: 脑震宁颗粒高剂量组;E: 脑震宁颗粒中剂量组;F: 脑震宁颗粒低剂量组;a: 与空白组比较, $P<0.05$;b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图1 实验不同时期各组大鼠的体重比较($\bar{x} \pm s, n=11$)

3.2 行为学检测结果

3.2.1 糖水偏好率测定结果

与空白组比较,模型组大鼠糖水偏好率显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠糖水偏好率均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠糖水偏好率和新物体识别指数比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	糖水偏好率($n=6$)	新物体识别指数($n=10$)	
		造模后	干预结束后
空白组	85.88 ± 3.10	69.12 ± 7.12	66.57 ± 8.41
模型组	65.47 ± 2.80^a	27.73 ± 5.31^a	40.85 ± 5.97^a
吡拉西坦组	82.19 ± 4.76^b	25.83 ± 4.14^a	52.45 ± 8.70^b
脑震宁颗粒高剂量组	79.52 ± 5.24^b	29.50 ± 5.96^a	51.14 ± 5.00^b
脑震宁颗粒中剂量组	74.06 ± 4.00^b	28.89 ± 5.81^a	46.92 ± 4.49^b
脑震宁颗粒低剂量组	70.60 ± 2.12^b	26.16 ± 5.75^a	41.42 ± 5.42

a: 与空白组比较, $P<0.05$;b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.2 新物体识别指数测定结果

造模后,与空白组比较,各组大鼠新物体识别指数均显著降低($P<0.05$)。干预结束后,与模型组比较,吡拉西坦组和脑震宁颗粒高、中剂量组大鼠新物体识别指数均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

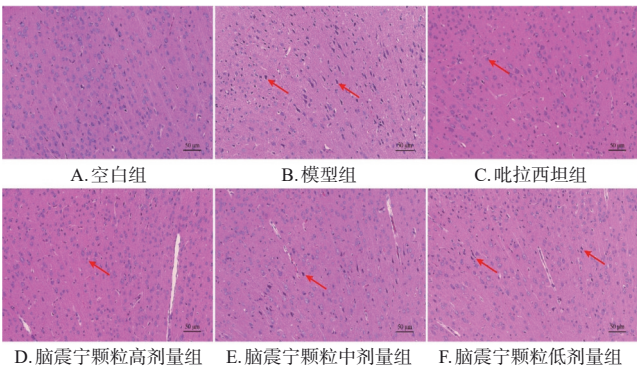
3.3 脑皮层中伊文思蓝渗出量检测结果

与空白组比较[(0.02 ± 0.00) $\mu\text{g/g}$ ($\bar{x} \pm s, n=3$, 下同)],模型组大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量[(0.46 ± 0.02) $\mu\text{g/g}$]显著增加($P<0.05$);与模型组比较,吡拉西坦组和脑震宁颗粒高、中剂量组大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量[分别为(0.09 ± 0.02)、(0.16 ± 0.02)、(0.25 ± 0.01) $\mu\text{g/g}$]

均显著减少($P<0.05$),而脑震宁颗粒低剂量组大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量[(0.44 ± 0.02) $\mu\text{g/g}$]差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.4 脑皮层神经元病理变化观察结果

空白组大鼠脑皮层区神经元形态完整、排列整齐,可见清晰的细胞核;模型组大鼠脑皮层区神经元形态不规则,排列紊乱,呈深染核固缩以及空泡变性,可见坏死神经元;吡拉西坦组大鼠脑皮层区神经元形态结构恢复,排列有序,分层清晰,细胞质和细胞核染色均匀,细胞间隙缩小,核凝缩显著减少;脑震宁颗粒各剂量组大鼠脑皮层区神经元损伤程度减轻,神经元细胞恢复增多,排列趋于整齐,且具有一定的剂量依赖性趋势。结果见图2。



注:红色箭头所指为固缩的神经元。

图2 各组大鼠脑皮层区神经元病理变化观察的显微图(HE染色)

3.5 脑皮层中Bax和Bcl-2蛋白表达测定结果

与空白组比较,模型组大鼠脑皮层中Bax蛋白阳性面积比显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白阳性面积比显著降低($P<0.05$);与模型组比较,吡拉西坦组和脑震宁颗粒高、中剂量组大鼠脑皮层中Bax蛋白阳性面积比均显著降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白阳性面积比均显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表2。

3.6 脑皮层中炎症因子水平测定结果

与空白组比较,模型组大鼠脑皮层中IL-6、TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$),IL-10水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,吡拉西坦组和脑震宁颗粒高、中剂量组大鼠脑皮层中IL-6、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$),IL-10水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

3.7 脑皮层中AMPK、GSK3 β 、Tau蛋白磷酸化水平测定结果

与空白组比较,模型组大鼠脑皮层中AMPK、GSK3 β 蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$),Tau蛋白磷酸化水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠脑皮层中AMPK蛋白磷酸化水平以及吡拉西坦组和脑震宁颗粒高、中剂量组大鼠脑皮层中GSK3 β 蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$),吡拉西坦组和脑震宁颗粒高剂量组大鼠脑皮层中Tau蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图4、表4。

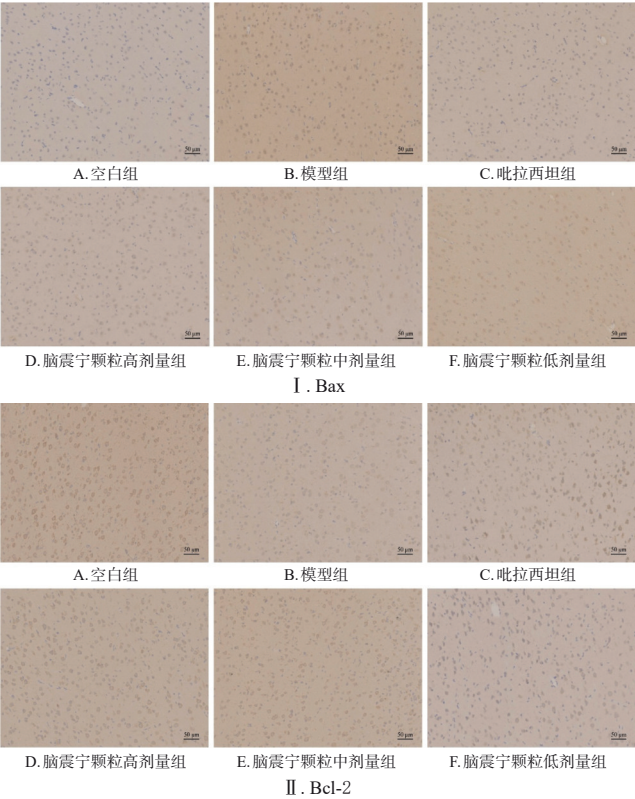


图3 各组大鼠脑皮层中Bax、Bcl-2蛋白表达的免疫组化染色结果(标尺:50 μm)

表2 各组大鼠脑皮层中Bax、Bcl-2蛋白阳性面积比较($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

组别	Bax蛋白阳性面积比	Bcl-2蛋白阳性面积比
空白组	0.25 ± 0.08	9.45 ± 0.69
模型组	3.01 ± 0.29 ^a	4.12 ± 0.29 ^a
吡拉西坦组	0.52 ± 0.11 ^b	7.63 ± 0.50 ^b
脑震宁颗粒高剂量组	0.71 ± 0.16 ^b	7.17 ± 0.26 ^b
脑震宁颗粒中剂量组	2.22 ± 0.27 ^b	4.91 ± 0.24 ^b
脑震宁颗粒低剂量组	2.67 ± 0.20	4.33 ± 0.33

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

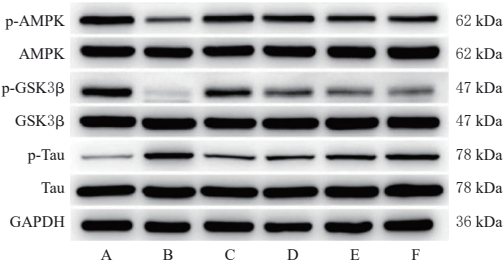
表3 各组大鼠脑皮层中IL-6、IL-10、TNF-α水平比较($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	IL-10	TNF-α
空白组	22.40 ± 1.29	42.19 ± 3.56	189.08 ± 12.52
模型组	54.70 ± 2.15 ^a	20.05 ± 1.78 ^a	355.60 ± 19.52 ^a
吡拉西坦组	31.08 ± 2.07 ^b	35.02 ± 0.56 ^b	229.06 ± 8.23 ^b
脑震宁颗粒高剂量组	37.16 ± 3.41 ^b	30.09 ± 2.21 ^b	270.62 ± 18.53 ^b
脑震宁颗粒中剂量组	44.98 ± 4.49 ^b	25.76 ± 2.38 ^b	304.47 ± 23.29 ^b
脑震宁颗粒低剂量组	52.10 ± 4.21	21.95 ± 3.32	339.22 ± 15.81

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

MCC的临床症状虽常呈一过性,但反复的机械性冲击会引起神经元轴突与小血管损伤,出现炎症反应、血脑屏障破坏等一系列累积性、进行性脑内病理改变,导致部分患者出现认知障碍、情绪紊乱等后遗症^[15]。中医认为,脑震荡归属“头晕”“头痛”范畴,核心病机为气滞血瘀。MCC患者头部反复遭受撞击,日久伤及气血,形成气虚血瘀、虚实夹杂之证,治宜活血化瘀通络。脑



A:空白组;B:模型组;C:吡拉西坦组;D:脑震宁颗粒高剂量组;E:脑震宁颗粒中剂量组;F:脑震宁颗粒低剂量组。

图4 各组大鼠脑皮层中AMPK、GSK3β、Tau蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠脑皮层中AMPK、GSK3β、Tau蛋白磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-AMPK/AMPK	p-GSK3β/GSK3β	p-Tau/Tau
空白组	0.71 ± 0.03	0.81 ± 0.08	0.04 ± 0.00
模型组	0.09 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.04 ^a
吡拉西坦组	0.59 ± 0.08 ^b	0.59 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.00 ^b
脑震宁颗粒高剂量组	0.53 ± 0.07 ^b	0.44 ± 0.04 ^b	0.24 ± 0.02 ^b
脑震宁颗粒中剂量组	0.33 ± 0.08 ^b	0.22 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.02
脑震宁颗粒低剂量组	0.25 ± 0.12 ^b	0.19 ± 0.03	0.38 ± 0.03

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

震宁颗粒具有行气活血化瘀功效,能缓解脑外伤后头痛、眩晕、失眠等症状^[7]。

本研究通过体重检测、糖水偏好实验与新物体识别实验,观察各组大鼠体重变化和行为学表现。结果显示,MCC模型大鼠体重增长显著慢于空白组,糖水偏好率、新物体识别指数明显下降;而脑震宁颗粒干预后,模型大鼠的体重增长趋势明显好转,糖水偏好率及新物体识别指数明显升高。结果表明,脑震宁颗粒可能改善脑创伤后机体代谢功能,减轻快感缺失,改善MCC引发的焦虑情绪和学习记忆功能减退。此外,由HE染色和免疫组化染色结果可知,MCC模型大鼠脑皮层神经元核固缩、排列紊乱、间隙增宽,促凋亡蛋白Bax表达上调,抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调;而脑震宁颗粒干预后,MCC模型大鼠神经元形态趋于正常,凋亡相关蛋白表达情况改善。结果提示,脑震宁颗粒可保护MCC模型大鼠神经元结构完整性,这也是缓解MCC模型大鼠学习记忆障碍的基础。

正常情况下,血脑屏障可以保护大脑免受外来物质的影响。发生MCC后,炎症因子、氧化应激相关因子等通过多种途径破坏血脑屏障完整性,这也是继发性脑损伤的诱因之一。脑损伤发生后,促炎/抗炎因子失衡引起脑内皮细胞功能障碍,导致血脑屏障通透性增加、炎症介质大量释放,形成恶性循环,加剧神经元损伤^[16-17]。伊文思蓝渗出量可反映血脑屏障损伤程度。本研究结果显示,MCC模型大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量显著增加,提示其血脑屏障通透性增加;而脑震宁颗粒干预后,MCC模型大鼠脑皮层中伊文思蓝渗出量明显减少,表示其可改善MCC模型大鼠血脑屏障结构、加固防御功能。此外,本研究ELISA检测结果显示,MCC模型大

鼠脑皮层中TNF- α 、IL-6水平升高,IL-10水平降低;而脑震宁颗粒干预后,MCC模型大鼠脑皮层中上述指标被不同程度逆转。这提示脑震宁颗粒能够抑制MCC模型大鼠的过度神经炎症反应,改善脑内炎症微环境以减轻继发性损伤。

Tau蛋白磷酸化水平异常升高是创伤性脑损伤后神经退变的重要标志之一^[18]。AMPK/GSK3 β 通路不仅与细胞稳态、神经元发育密切相关,还可能调节神经退行性病变的发生发展^[19]。Li等^[20]认为,激活AMPK/蛋白激酶B/GSK3 β 通路可以抑制凋亡蛋白表达,缓解脑卒中后的病理损伤。Tau蛋白的磷酸化受多种激酶调节,而GSK3 β 是其中的一种关键激酶——GSK3 β 通过Ser9位点发生去磷酸化而被激活,从而升高Tau蛋白磷酸化水平^[21]。本研究结果显示,MCC模型大鼠脑皮层中AMPK、GSK3 β 蛋白磷酸化水平均明显降低,Tau蛋白磷酸化水平明显升高;而脑震宁颗粒干预后,可不同程度逆转模型大鼠脑皮层中上述指标水平。这表明脑震宁颗粒可能通过激活AMPK/GSK3 β 通路,进而降低Tau蛋白磷酸化水平,改善神经元功能,减缓MCC导致的神经退行性疾病。

综上所述,脑震宁颗粒可有效改善MCC模型大鼠的学习记忆障碍;其作用机制可能与激活AMPK/GSK3 β 通路,进而修复神经元损伤有关,抑制炎症反应、降低Tau蛋白磷酸化水平相关。

参考文献

[1] GARDNER R C, YAFFE K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 66(Pt.B): 75-80.

[2] GAO G Y, WU X, FENG J F, et al. Clinical characteristics and outcomes in patients with traumatic brain injury in China: a prospective, multicentre, longitudinal, observational study[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(8): 670-677.

[3] SALGADO S, SAVER V, SÁENZ Á, et al. Biomarkers and clinical rules for the management of mild traumatic brain injury: a narrative review[J]. *Int J Emerg Med*, 2026, 19(1): 24.

[4] KONDO A, SHAHPASAND K, MANNIX R, et al. Antibody against early driver of neurodegeneration cis p-tau blocks brain injury and tauopathy[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 431-436.

[5] 吴琼,温咪咪,李娜,等.淀粉样前体蛋白生理功能研究进展[J]. *生理科学进展*, 2016, 47(2): 103-107.

[6] 范建新,刘艳之,刘海霞,等.脑震宁颗粒治疗脑外伤综合征的Meta分析[J]. *山西中医药大学学报*, 2020, 21(3): 157-160.

[7] 王学建,季炜鹏.脑震宁治疗脑外伤后头痛53例疗效观察[J/OL]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(5): 292-293. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=wdP5rvn-YoIw7QT-1BWtZmPmxAstGTcAn_zSB804dFVNROHw-ziB9t_5cPb7ObO6zIIh0gAFw3zr_rt1_ynNFJIHAVU53mv-LGtJ8RGsi0d0UUV7cyAvXE0h2eP_mk_WvK0K6P2_AhXKYGhJBuuncQOIIBqr7LyCzz427MVCzOJXOsk-](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=wdP5rvn-YoIw7QT-1BWtZmPmxAstGTcAn_zSB804dFVNROHw-ziB9t_5cPb7ObO6zIIh0gAFw3zr_rt1_ynNFJIHAVU53mv-LGtJ8RGsi0d0UUV7cyAvXE0h2eP_mk_WvK0K6P2_AhXKYGhJBuuncQOIIBqr7LyCzz427MVCzOJXOsk-Zxp03R6_A==&uniplatform=NZKPT&language=CHS)

Zxp03R6_A==&uniplatform=NZKPT&language=CHS. DOI:103877/cmajssn.2095-9141.2017.05.008.

[8] 王钱,谭贝西,冯忆,等.基于MAPK信号通路研究脑震宁对三重脑震荡模型大鼠海马神经元损伤的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3670-3679.

[9] 周小涛,杨梦艳,张继川.细胞自噬与阿尔茨海默病的关系[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2022, 31(5): 517-522.

[10] LAURETTI E, DINCER O, PRATICÒ D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118664.

[11] WANG L, LIU B J, CAO Y, et al. Deletion of type-2 cannabinoid receptor induces Alzheimer's disease-like tau pathology and memory impairment through AMPK/GSK3 β pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(6): 4731-4744.

[12] MYCHASIUK R, FARRAN A, ANGOA-PEREZ M, et al. A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats[J]. *J Vis Exp*, 2014(94): e51820.

[13] WU Y X, WU H J, ZENG J X, et al. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1): 74.

[14] 王恬恬,冯忆,任晓怡,等.脑震宁调控NLRP3/caspase1/GSDMD通路缓解MCC模型急性期氧化应激并逃脱神经元焦亡的研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(11): 2537-2544.

[15] GUILHAUME C F, MELENDES E J, YIN Y, et al. Repetitive mild traumatic brain injury disrupts learning and memory: a novel olfactory approach to detection[J]. *J Neurotrauma*, 2025, 42(21/22): 2030-2046.

[16] ARAGÓN-GONZÁLEZ A, SHAW P J, FERRAIUOLO L. Blood-brain barrier disruption and its involvement in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15271.

[17] ZHENG X Q, WAN J, TAN G. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1151185.

[18] ZHAO X Y, ZENG W, XU H, et al. A microtubule stabilizer ameliorates protein pathogenesis and neurodegeneration in mouse models of repetitive traumatic brain injury[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(713): eabo6889.

[19] QI D K, YOUNG L H. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(8): 422-429.

[20] LI Y T, LI X L, XU S L, et al. 1, 25-D₃ attenuates cerebral ischemia injury by regulating mitochondrial metabolism via the AMPK/AKT/GSK3 β pathway[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 1015453.

[21] QIU Q, LEI X, WANG Y Y, et al. Naringin protects against tau hyperphosphorylation in a β ₂₅₋₃₅-injured PC12 cells through modulation of ER, PI3K/AKT, and GSK-3 β signaling pathways[J]. *Behav Neurol*, 2023, 2023: 1857330.

(收稿日期:2026-03-01 修回日期:2026-05-18)

(本文责编:林 静)