

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241031.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241031.1748.004>

天麻钩藤饮通过 PI3K/AKT 信号通路介导细胞凋亡改善高血压合并血管性认知障碍作用机制

张红晓¹, 李纳川¹, 赵凡莹¹, 刘子旺^{1,2}✉

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100007)

[摘要] **目的:**探讨天麻钩藤饮对高血压合并血管性认知障碍模型大鼠的干预作用, 观察该方对磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)信号通路的影响, 揭示其潜在的功能机制。**方法:**36 只雄性 SHR 大鼠采用严格的随机数字表法进行分组, 分为假手术组、模型组、尼莫地平组(9.375 mg/kg)和天麻钩藤饮低、中、高剂量组(5.938 g/kg、11.875 g/kg、23.750 g/kg), 另取 6 只 Wistar 大鼠作为空白对照组, 采用单侧颈总动脉阻断加高盐饮食方法建立高血压合并血管性认知障碍大鼠模型, 随后应用尼莫地平和不同剂量的天麻钩藤饮连续治疗 28 d。Morris 水迷宫实验测试各组大鼠学习阶段的逃避潜伏期及测试阶段的目标象限停留时间、穿越平台次数, 每周检测各组大鼠血压, 尼氏(Nissl)染色观察大鼠海马 CA1 区神经元的病理改变及尼氏小体, 原位末端标记法(TUNEL)染色用来评估对大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响, 蛋白质印迹法(Western Blotting)检测各组大鼠海马组织内 AKT 和 PI3K 的蛋白表达及磷酸化水平, 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测各组大鼠海马组织内 Caspase-3、Bcl-2、Bax 的蛋白表达及血清中 ET-1 的蛋白表达。**结果:**与空白组、假手术组相比, 模型组大鼠血压持续升高、平均逃避潜伏期延长、目标象限停留时间和穿越平台次数减少($P<0.01$); 海马 Caspase-3、Bax 蛋白表达明显上升($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达下降($P<0.01$); 大鼠海马细胞计数减少($P<0.01$), 尼氏小体减少, TUNEL 阳性细胞增加($P<0.01$); AKT、PI3K 蛋白磷酸化水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比, 天麻钩藤饮高、中剂量组和尼莫地平组大鼠收缩压和舒张压降低、平均逃避潜伏期减少、目标象限停留时间延长、穿越平台次数增加($P<0.01$); 天麻钩藤饮高、中、低剂量组及尼莫地平组大鼠 Caspase-3、Bax 蛋白表达均下降($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达上升($P<0.01$); 大鼠海马细胞计数增加($P<0.01$), 尼氏小体增多, TUNEL 阳性细胞降低($P<0.01$); AKT、PI3K 蛋白磷酸化水平显著升高($P<0.01$)。**结论:**天麻钩藤饮可能通过促进 AKT、PI3K 蛋白磷酸化, 抑制 Caspase-3、Bax 蛋白表达, 升高 Bcl-2 蛋白的表达, 减轻海马神经元凋亡, 从而改善高血压合并 VCI 大鼠的认知功能。

[关键词] 天麻钩藤饮; 高血压; 血管性认知障碍; 神经元凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 丝氨酸/苏氨酸激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)15-1141-12

Mechanism of apoptosis mediated through PI3K/AKT signaling pathway by Tianma Gouteng decoction to improve spontaneous hypertension combined with vascular cognitive impairment

ZHANG Hongxiao¹, LI Nachuan¹, ZHAO Fanying¹, LIU Ziwan^{1,2}✉

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China)

[Foundation Project]: Hospital level cultivation of the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine (BZYSY-2022-PYMS-10)

[Author]: ZHANG Hongxiao, E-mail: zhx2201872089@163.com.

[Correspondence to]: LIU Ziwan, Chief Physician, Doctoral Supervisor, E-mail: liuziwan@163.com.

Received: 2024-06-29

Revised: 2024-10-23

JHMu, 2025;31(15):1141-1152

[基金项目] 北京中医药大学第三附属医院院级培育(BZYSY-2022-PYMS-10)

[作者简介] 张红晓, E-mail: zhx2201872089@163.com。

[通讯作者] 刘子旺, 主任医师, 博士生导师, E-mail: liuziwan@163.com。

[收稿日期] 2024-06-29 **[修回日期]** 2024-10-23 **网络出版时间:** 2024-11-01 10:54:34

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the interventional effects of Tianma Gouteng Decoction on rats with spontaneous hypertension combined with vascular cognitive impairment model, and to observe the effects of this formula on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/serine/threonine kinase (AKT) signaling pathway, and to reveal its potential functional mechanism. **Methods:** Thirty-six male SHR rats were randomly grouped into sham operation group, model group, nimodipine group (9.375 mg/kg) and high, medium and low dose groups of Tianma Gouteng Decoction (23.750 g/kg, 11.875 g/kg and 5.938 g/kg) by strict randomized numerical table method. Six wistar rats were taken as a blank control group, and were treated with unilateral common carotid artery occlusion plus high salt diet. A rat model of spontaneous hypertension combined with vascular cognitive impairment was established by the method, followed by continuous treatment with nimodipine and different doses of Tianma Gouteng Decoction for 28d. Morris water maze test was used to test the escape latency, target quadrant residence time and the number of crossing platforms in each group of rats, Nissl staining was used to observe the pathological changes of neurons in rat hippocampal CA1 area and Nissl vesicles, TUNEL staining was used to evaluate the effect on neuronal apoptosis in rat hippocampal CA1 area, Western blotting was used to detect the protein expression of AKT, PI3K, p-AKT and p-PI3K in hippocampal tissues of each group of rats. Detection of protein expression and phosphorylation levels of AKT and PI3K in hippocampal tissues of rats in various groups by Western Blotting, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the protein expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in the hippocampal tissues of rats in each group as well as the protein expression of ET-1 in serum. **Results:** Compared with the blank group and sham operation, rats in the model group had increased blood pressure, prolonged evasion latency, decreased target quadrant residence time, and decreased number of crossing platforms ($P<0.01$); hippocampal expression of Caspase-3 and Bax proteins increased significantly ($P<0.01$), and expression of Bcl-2 proteins decreased ($P<0.01$); hippocampal cell counts in the model group decreased ($P<0.01$), decrease in Nitrosomes, increase in TUNEL-positive cells ($P<0.01$), and significant decrease in phosphorylation levels of AKT and PI3K proteins ($P<0.01$). Compared with the model group, rats in the high, medium and nimodipine dose groups of Tianma Gouteng Decoction and the model group had lower blood pressure, reduced evasion latency, prolonged residence time in the target quadrant, and increased number of crossings of the plateau ($P<0.01$); protein expression of Caspase-3 and Bax decreased in the high, medium and low dose groups of Tianma Gouteng Decoction and the nimodipine group ($P<0.01$) and Bcl-2 protein expression rose ($P<0.01$); hippocampal cell counts increased ($P<0.01$), nitrosomes increased, and TUNEL-positive cells decreased ($P<0.01$) in the rat. protein expression rose ($P<0.01$); hippocampal cell counts increased in rats ($P<0.01$), Nitrosomes increased, and TUNEL-positive cells decreased ($P<0.01$); and AKT and PI3K protein phosphorylation levels were significantly elevated ($P<0.01$). **Conclusion:** Tianma Gouteng Decoction may improve the cognitive function of SHR combined with VCI rats by promoting the phosphorylation of AKT and PI3K proteins, inhibiting the expression of Caspase-3 and Bax proteins, elevating the expression of Bcl-2 proteins, and attenuating the apoptosis of hippocampal neurons.

[Key words] Tianma Gouteng Decoction; Hypertension; Vascular cognitive impairment; Neuronal apoptosis; PI3K; AKT

高血压是认知功能障碍的重要危险因素^[1-4],高血压合并血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是一种高致残率、高致死率的心脑血管疾病^[5],但目前对于该病的现代化治疗尚存在许多局限,远期疗效欠佳^[6]。近年来对高血压病合并血管性认知障碍的研究越来越多,中医学按其症状可归入为“痴呆”、“呆病”范畴。《医学心悟》指出:“肾主智,肾虚则智不足。”目前对本病致病原因的认识较为复杂,病位在心脑、脉络,病性为本虚标实,本虚多由肾精亏虚、心脾不足引起,久病耗损以致病情证候错杂,气、血、痰、瘀、郁、毒等致病因素互结为患,渐致脑髓空虚,脑元失养,令人健忘^[7,8]。许多医家认为本病的病位在脑窍,病机为肾精亏虚,肝失所养,肝阳上亢,风阳内动,髓海失养^[9,10]。肝阳上亢,络脉阻滞是高血压病降低认知功能的病机关键,故本实验选用天麻钩藤饮平肝益肾、清热活血

以求达到标本兼治之效。

天麻钩藤饮是现代应用于高血压病的经典方剂,同时现代在治疗脑供血不足、脑梗死、失眠、阿尔茨海默病、帕金森病等一系列脑神经疾病中都具有一定疗效^[11-14]。本研究观察该方对高血压合并VCI大鼠认知功能及海马神经元凋亡的影响,探讨其治疗原发性高血压合并VCI的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性SHR大鼠36只,SPF级雄性Wistar大鼠6只,体质量200~220 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,公司实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0006。实验动物饲养于北京中医药大学实验中心,按常规要求定期清洁、消毒,通风良好,4只/笼,室温20~25℃,湿度50%~70%,12h昼夜间断照明,适应性饲养1周后用于本次实验研

究。本研究实验过程中对动物的所有处理均通过北京中医药大学实验动物伦理审批(伦理审批号:BUUCM-2023022003-1098)。

1.2 药物

天麻钩藤饮:由北京中医药大学第三附属医院中药房及煎药房提供,按原方组成:天麻9 g,钩藤(后下)12 g,石决明(先煎)18 g,山栀子9 g,黄芩9 g,川牛膝12 g,杜仲9 g,益母草9 g,桑寄生9 g,夜交藤9 g,朱茯神9 g。尼莫地平片:规格30 mg/片,商品名:尼莫同,批号:国药准字H20003010,厂家:拜耳医药保健有限公司。注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:43211108);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:WS20050411)。

1.3 主要试剂与仪器

Caspase-3、Bcl-2、Bax、ET-1的ELISA试剂盒购自深圳优品生物科技有限公司; β -Actin抗体(天德悦,货号:TDY051);p-PI3K抗体(affbiotech,货号:AF3242);PI3K抗体(CST,货号:#4257);p-AKT抗体(CST,货号:#4060);AKT抗体(CST,货号:#4691);HRP-Goat anti Rabbit二抗(ASPEN,货号:AS1107);HRP-Goat anti Rabbit二抗(ASPEN,货号:AS1106);HRP-Goat anti Rabbit二抗(ASPEN,货号:AS1108);HRP-Goat anti Rabbit二抗(ASPEN,货号:AS1093);HRP-Goat anti Rabbit二抗(ASPEN,货号:AS1245);磷酸化蛋白酶抑制剂(AS1008, ASPEN);甲苯胺蓝染液(北京中科万邦生物科技有限公司,货号:RY-0004);日粮型高盐模型饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司, LAD0011HF8)。

Morris水迷宫(北京众实迪创公司);酶标仪(Cmax plus, Molecular公司);台式离心机(TGL-16c,上海安亭科学仪器厂);扫描仪(9000F MarkII, Canon);病理切片机(RM2016,上海徕卡仪器有限公司);正置荧光显微镜(NIKON ECLIPSE C1,日本尼康);BP-98A型智能无创血压计(北京软隆生物技术公司);MINI shaker(MH-1, kylin-Bell Lab Instruments QILINBEIER)。

1.4 分组、造模及给药

6只Wistar大鼠作为空白对照组,将36只SHR大鼠随机分出6只假手术组(Sham),其余30只造模成功的大鼠随机分为模型组(Model),尼莫地平组(Nimodipine),天麻钩藤饮低(TM-L)、中(TM-M)、高(TM-H)剂量组,每组6只。30只SHR大鼠采用单侧颈总动脉阻断加高盐喂养法制备高血压合并

血管性认知障碍模型^[15],6只SHR大鼠采用单侧颈总动脉与迷走神经分离法以制备假手术组。预造模大鼠术前12 h禁食,腹腔注射4%的戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉后,将大鼠以仰卧位固定于鼠板上,备皮后75%乙醇常规消毒,食指探知颈总动脉搏动位置,在其颈部正中行一1 cm切口,方向同气管,钝性分离皮下脂肪和肌肉,直至暴露气管右侧的颈总动脉,将与颈总动脉伴行的迷走神经使用玻璃分针分离,避免牵拉及金属触碰,以免损伤神经,不可吸收手术线分别结扎颈总动脉的近心端和远心端,伤口撒敷适量青霉素粉末,间断缝合皮下组织及皮肤。术后连续3 d腹注青霉素,每日8万单位,防止伤口感染,保持饲养笼恒温干燥清洁。造模后第4天行Morris水迷宫实验以作模型评价,造模成功标准:大鼠造模后平均逃避潜伏期 $\geq$ 造模前平均逃避潜伏期 $\times 120\%$ 。

参照动物与人的每千克体重剂量折算系数进行人与大鼠间的药物剂量换算^[16],换算后的中药中剂量组给药量设为 $114(\text{g})/60(\text{kg}) \times 6.25 = 11.875 \text{ g/kg}$,TM-H组、TM-M组、TM-L组按4:2:1的比例每日给药量分别为 23.750 g/kg 、 11.875 g/kg 、 5.938 g/kg 。尼莫地平片换算为大鼠给药量为: $9.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,取尼莫地平片加入纯水,震荡使溶解,配为 0.938 mg/mL ,溶液置于4℃冰箱储存备用。Model组和Wistar组、Sham组给予等体积生理盐水灌胃,灌胃体积为 10 mL/kg ,每日1次,连续28 d。

1.5 检测指标与方法

所有组别大鼠于水迷宫测试结束后取材。将大鼠腹部“V”形剪开,暴露腹主动脉,用采血针在腹主动脉取全血5 mL,静置1 h后, $3\ 000 \text{ r/min}$ 离心15 min,取上清液,保存于 -80°C 冰箱中,用于ELISA检测。每组大鼠随机选取2只进行灌注,开胸后将灌注针扎进心尖穿入左心室,剪开右心耳,先用4℃生理盐水150 mL先快后慢冲洗至大鼠皮肤血色退去,然后用350 mL的4%多聚甲醛进行灌注固定,灌注结束后快速开颅取出大脑,放入装有4%多聚甲醛的50 mL离心管中常温保存,用于染色。其余大鼠于冰板上快速取出海马组织,装入2 mL冻存管,标号后迅速放到液氮中进行速冻,保存于 -80°C 冰箱,用于Western blot、ELISA检测。

1.5.1 大鼠的一般状况 观察大鼠饮食,大小便,活动量,精神状态,皮毛色泽,舌象等。

1.5.2 行为学检测大鼠空间学习记忆水平 给药达4周后进行,实验期间持续给药。实验时,系统将

直径 150 cm 的圆形水池按方位分成 4 个象限,平台放置在 NE 象限的中心(分析区 1)。水池中注入水温(22 ± 1)℃的清水,水位以没过平台 2 cm 为宜,适量加入黑色食品添加剂以掩盖平台位置。Morris 水迷宫测试包含定位航行(学习阶段)和空间探索(测试阶段),定位航行实验用于检测大鼠的空间学习能力,N 点、E 点、NW 中点、SE 中点列为入水点,每次打乱顺序从此 4 个入水点将大鼠放入池中,记录大鼠在 120 s 内找到平台的时间,若找不到平台,以 120 s 计并加以引导,持续训练 5 d。空间探索实验用于检测大鼠的空间记忆能力,在第 6 天撤离平台,大鼠从 SW 中点放入,观察 120 s 内大鼠穿越平台的次数和在 SW 象限停留的总时间。实验以平均逃避潜伏期、通过平台的次数、目标象限停留时间作为评价大鼠学习和记忆的能力。

1.5.3 大鼠尾动脉血压测量 采用全自动无创血压测量系统测量大鼠尾动脉收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(AP)。测量方法:将大鼠置于 37℃ 环境下预热 5 min,在大鼠安静、清醒状态下,每天重复测量 3 次血压值,每次间隔约 1 min,最终血压取其平均值。在每周六由固定专人按照同样测量顺序测压。

1.5.4 海马组织病理学检查 取固定于 4% 多聚甲醛溶液中的大鼠脑组织,石蜡包埋后制作常规石蜡切片(4 μm),按照常规 Nissl 染色及 TUNEL 染色步骤进行染色、脱水、透明、中性树胶封片并在光学显微镜下观察采集图像。

1.5.5 ELISA 法检测海马中凋亡因子表达水平 将余下大鼠的海马组织置于研钵中匀浆,离心后取上清液(4 000 r/min, 10 min)后按照 Bcl-2、Bax、Caspase-3 试剂盒说明书检测组织蛋白含量。

1.5.6 ELISA 法检测血清中 ET-1 的含量 将大鼠的腹主动脉血离心取上清液(4 000 r/min, 10 min)后按照 ET-1 试剂盒说明书检测组织蛋白含量。

1.5.7 Western blot 检测海马中 PI3K/AKT 通路蛋白表达 用裂解液将海马裂解后离心(12 000 r/min, 5 min)取蛋白上清液,提取总蛋白进行蛋白定量,以 40 μg/孔的上样量进行电泳,转膜、脱脂奶粉封闭(5%)后添加一抗,4℃ 过夜后添加二抗(1:5 000)孵育 1 h,电化学发光试剂显色,在成像仪中观察,Image J 软件分析 PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT 蛋白灰度值,计算蛋白含量。

1.6 统计学分析

利用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计学软件对整理完成后的数据进行统计学分析。方差

齐的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;对于方差不齐的独立样本以中位数 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况

实验过程中观察可见空白组、假手术组状态良好,皮毛自然有光泽,活动量未见异常,饮食、饮水量正常,大便正常,舌质淡红。造模组大鼠造模过程中饮食减少,饮水量增加,皮毛暗淡无光泽,精神萎靡,活动量减少,小便量多、气味浓烈,大便偏干,舌质紫暗等;中药中、高剂量组、尼莫地平组大鼠饮水量明显增加,饮水量减少,活动量增多,精神状态明显好转,小便量多,舌质偏暗;中药低剂量组大鼠饮水量稍增加,饮水量减少,活动量增多,精神状态未见明显好转,小便量多,舌质暗。

2.2 各组药物对高血压合并 VCI 大鼠空间学习记忆的影响

各组大鼠在 5 d 的定位航行训练中(图 1)寻找平台的平均逃避潜伏期有明显的变化,随着训练次数的增加,其潜伏期均有不同程度的缩短。各组大鼠在训练后第 3 天趋于平稳,训练后 3 d 各组平均潜伏期见表 1。模型组潜伏期明显长于假手术组、空白组($P<0.01$),天麻钩藤饮中、高剂量组和尼莫地平组潜伏期明显短于模型组($P<0.01$)。

空间探索实验中,与假手术组比较,模型组平台象限进入次数、平台象限进入时长、分析区 1 进入次数、分析区 1 进入时长均显著减少($P<0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和天麻钩藤饮中、高剂量组平台象限进入次数、平台象限进入时长、分析区 1 进入次数、分析区 1 进入时长均明显增加($P<0.01$),天麻钩藤饮低剂量组逃逸平台进入次数显著增加($P<0.01$),平台象限进入次数、平台象限进入时长、分析区 1 进入次数、分析区 1 进入时长可见增加,但无统计学差异。见表 1 和图 1、2。

2.3 各组药物对高血压合并 VCI 大鼠血压的影响

模型组的收缩压和舒张压均较假手术组显著升高($P<0.05$);在用药 1 周后中、高剂量中药组、尼莫地平组的收缩压、舒张压均较模型组显著下降($P<0.05$);第 3 周低、中、高剂量中药组与尼莫地平组的收缩压和中、高剂量中药组与尼莫地平组的舒张压均较模型组显著下降($P<0.05$);第 4 周中、高剂量中药组与尼莫地平组的收缩压和舒张压均较模型组显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结

表 1 天麻钩藤饮对高血压合并 VCI 大鼠定位航行及空间探索实验的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of Tianma Gouteng Decoction on positioning navigation experiment and spatial search experiment of SHR with VCI rats (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期 (秒)	平台象限进入次数 (次)	平台象限进入时间 (秒)	分析区 1 进入次数 (次)	分析区 1 进入时间 (次)
Wistar	24.31±6.32 ^a	9.83±1.84 ^c	7.96±3.25 ^a	3.33±1.37 ^c	2.11±1.26 ^a
Sham	19.66±3.79 ^a	12.00±1.90 ^{ab}	7.40±3.02 ^a	6.00±2.83 ^{abc}	3.25±1.66 ^a
Model	36.91±5.06 ^{bc}	9.17±1.72 ^c	3.27±1.33 ^{bc}	1.33±1.03	0.51±0.32 ^{bc}
Nimodipine	21.30±4.87 ^a	13.50±1.05 ^{ab}	4.23±1.73 ^a	5.00±1.67 ^a	2.51±1.22 ^a
TM-L	29.56±8.02 ^{ac}	12.50±1.98 ^{ab}	9.60±3.92 ^a	5.17±1.84 ^a	2.65±1.53 ^a
TM-M	21.31±4.87 ^a	12.17±1.47 ^{ab}	3.54±1.44 ^{ab}	7.50±3.39 ^{ab}	3.66±1.22 ^{ab}
TM-H	20.01±3.06 ^a	11.33±1.97 ^a	7.18±2.93 ^a	6.50±0.55 ^{ab}	2.99±0.51 ^a

注:和 Model 组相比, ^aP<0.05;和 Wistar 组相比, ^bP<0.05;和 Sham 组相比, ^cP<0.05。

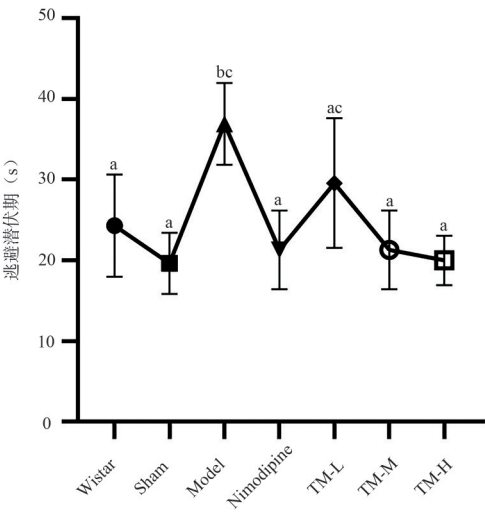


图 1 定位航行实验大鼠逃避潜伏期均值对比图

Fig 1 Comparison of mean values of escape latency of rats in space exploration experiments

果见表 2、3。

2.4 各组大鼠海马病理学变化

2.4.1 各组药物对高血压合并 VCI 大鼠海马 CA1 区神经元尼氏小体的影响 从切片整体看 SHR 大

鼠海马呈现萎缩形态,与皮质之间出现空洞区。尼氏染色可见,空白组海马 CA1 区的神经元细胞排列较为密集、整齐,胞浆内富含尼氏小体,胞浆呈深蓝紫色,背景为淡紫色,轴突明显,无核固缩现象;模型组海马 CA1 区的神经元排列稀疏、杂乱,神经细胞肿胀变性,损伤严重,核仁固缩,大量神经元缺失,胞浆中尼氏小体含量明显减少;假手术组海马 CA1 区的神经元细胞排列较为密集,尼氏小体丢失较少;天麻钩藤饮高剂量组和尼莫地平组海马 CA1 区的神经元细胞排列结构较为整齐,尼氏小体丰富,损伤程度较轻,核仁清晰可见;天麻钩藤饮中剂量组海马 CA1 区含较多的尼氏小体,细胞核固缩较少,神经元排列较整齐;天麻钩藤饮低剂量组与模型组比损伤减轻,但不明显。见图 3、4。

2.4.2 各组药物对高血压合并 VCI 大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响 通过 TUNEL 法检测大鼠海马 CA1 区神经元的凋亡情况,在荧光显微镜下神经元细胞核显示为蓝色,阳性凋亡神经元细胞核显示为红色,凋亡神经元呈散在或成群分布(图 5)。模型组红色荧光标记明显多于空白组、假手术组;相对于模型组,天麻钩藤饮低、中、高剂量组大鼠海马 CA1 区红色荧光标记的阳性细胞数量呈现逐渐减

表 2 给药后各组收缩压 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Systolic blood pressure in each group after administration (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	1nd week(mmHg)	2th week(mmHg)	3th week(mmHg)	4th week(mmHg)
Wistar	124.67±12.24 ^{ac}	122.50±4.76 ^{ac}	115.33±7.66 ^{ac}	115.50±7.71 ^{ac}
Sham	204.83±6.91 ^{bc}	202.83±10.91 ^{ab}	196.67±6.59 ^{ab}	193.33±8.66 ^{ab}
Model	196.00±3.10 ^b	222.67±4.13 ^{bc}	227.50±5.68 ^{bc}	233.83±6.21 ^{bc}
Nimodipine	172.00±8.30 ^{abc}	178.17±7.39 ^{abc}	167.00±7.13 ^{abc}	175.00±3.03 ^{abc}
TM-L	204.83±6.91 ^b	184.00±9.45 ^{abc}	191.67±5.39 ^{ab}	191.83±8.28 ^{ab}
TM-M	161.67±7.99 ^{abc}	181.67±5.72 ^{abc}	173.83±6.18 ^{abc}	167.50±7.89 ^{abc}
TM-H	184.33±7.47 ^{abc}	178.50±5.86 ^{abc}	178.33±9.29 ^{abc}	171.33±5.16 ^{abc}

注:和 Model 组相比, ^aP<0.05;和 Wistar 组相比, ^bP<0.05;和 Sham 组相比, ^cP<0.05。

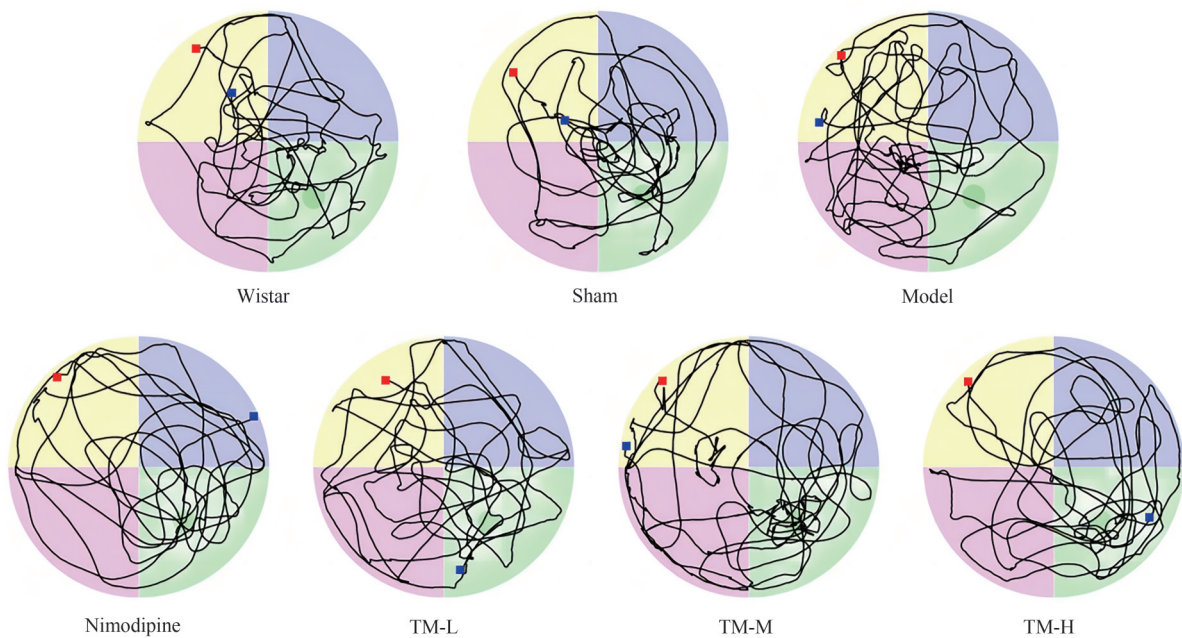


图2 空间探索实验大鼠活动轨迹图

Fig 2 Activity trajectory diagram of rats in space exploration experiments

表3 给药后各组舒张压($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Diastolic blood pressure in each group after administration($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	1nd week(mmHg)	2th week(mmHg)	3th week(mmHg)	4th week(mmHg)
Wistar	76.33±10.10 ^{ac}	81.17±9.52 ^{ac}	73.17±6.77 ^{ac}	76.00±5.29 ^a
Sham	135.00±14.59 ^b	132.83±4.67 ^b	125.83±8.75 ^{ab}	123.83±14.69 ^{ab}
Model	134.00±13.59 ^b	135.00±13.55 ^b	147.83±13.98 ^{bc}	144.17±17.08 ^b
Nimodipine	121.83±7.63 ^b	129.00±9.38 ^b	122.33±6.06 ^{ab}	127.67±3.78 ^{ab}
TM-L	135.00±14.59 ^b	125.83±9.13 ^b	130.83±6.49 ^{ab}	126.33±8.21 ^{ab}
TM-M	120.83±8.54 ^{bc}	110.33±8.80 ^{abc}	114.33±7.45 ^{abc}	119.33±10.29 ^{ab}
TM-H	128.83±8.68 ^b	121.67±10.86 ^{ab}	111.50±5.21 ^{abc}	121.00±9.63 ^{ab}

注:和Model组相比,^a $P<0.05$;和Wistar组相比,^b $P<0.05$;和Sham组相比,^c $P<0.05$ 。

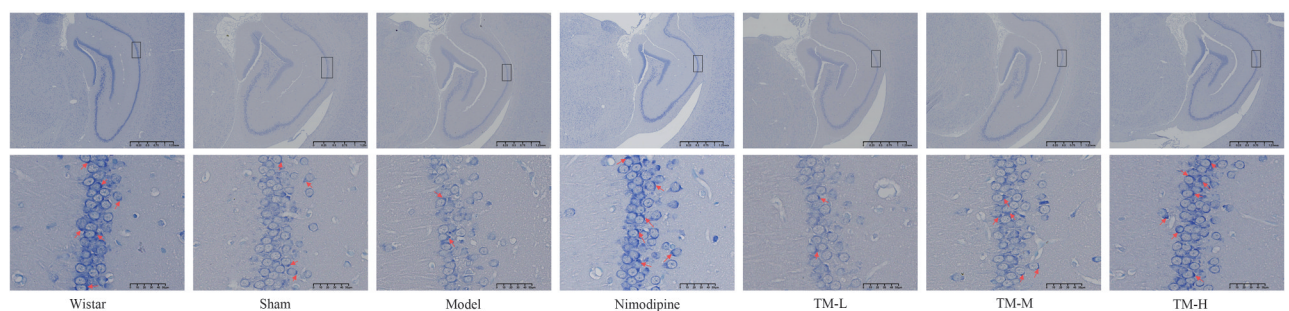


图3 天麻钩藤饮对SHR合并VCI大鼠海马区尼氏小体的影响(尼氏染色,×20,×400)

Fig 3 Effect of Tianma Gouteng Decoction on Nissl bodies in hippocampal region of SHR with VCI rats(Nissl staining,×20,×400)

少趋势,尼莫地平组阳性标记也显著低于模型组。见表4、图5。

2.5 各组药物对大鼠海马中凋亡因子含量的影响

与空白组、假手术组相比,模型组 Bax、Cas-

pase-3 含量显著增加,而 Bcl-2 含量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,给药组海马组织中 Bcl-2 含量显著增加,而 Bax、Caspase-3 含量显著降低($P<0.01$);TM-L、TM-M、TM-H 组、尼莫地平组海马组织中 Bcl-2 含量显著增加,而 Bax、Caspase-3 含量显

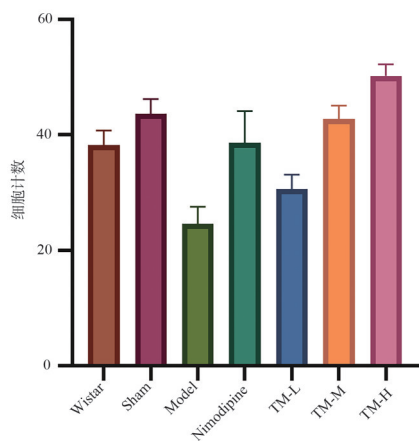


图4 大鼠海马CA1区神经细胞计数

Fig 4 Neuronal cell count in the CA1 region of rat hippocampus

表4 各组大鼠海马CA1区细胞计数及凋亡神经元荧光强度($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

分组	细胞计数	阳性细胞荧光强度
Wistar	38.20 ± 2.59^{ac}	0.173 ± 0.109^a
Sham	43.60 ± 2.61^{ab}	0.079 ± 0.026^a
Model	24.60 ± 2.97^{bc}	1.576 ± 1.970
Nimodipine	38.60 ± 5.51^{ac}	0.250 ± 0.144^a
TM-L	30.60 ± 2.51^{abc}	0.323 ± 0.130^a
TM-M	42.80 ± 2.28^{ab}	0.062 ± 0.036^a
TM-H	50.20 ± 2.05^{abc}	0.044 ± 0.016^a

注:和Model组相比,^a $P<0.05$;和Wistar组相比,^b $P<0.05$;和Sham组相比,^c $P<0.05$ 。

著降低($P<0.05$);与尼莫地平组相比, TM-M、TM-H组 Bax、Caspase-3 含量显著降低,而 Bcl-2 含量显著增加($P<0.05$);与 TM-L 组相比, TM-M、TM-H 组 Bax、Caspase-3 含量显著降低,而 Bcl-2 含量显著增加($P<0.05$)。见表5、图6。

表5 各组大鼠海马组织中Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白含量表达(ng/mL , $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein contents in hippocampal tissues of rats in each group(ng/mL , $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 (ng/mL)	Bax (ng/mL)	Caspase-3 (ng/mL)
Wistar	0.36 ± 0.01^{ac}	0.05 ± 0.02^{ac}	9.70 ± 0.53^{ac}
Sham	0.33 ± 0.00^{ab}	0.13 ± 0.02^{ab}	12.43 ± 0.13^{ab}
Model	0.11 ± 0.00^{bc}	0.21 ± 0.02^{bc}	13.76 ± 0.47^{bc}
Nimodipine	0.30 ± 0.01^{abc}	0.12 ± 0.02^{ab}	11.44 ± 0.38^{abc}
TM-L	0.17 ± 0.01^{abc}	0.12 ± 0.03^{ab}	11.44 ± 0.39^{abc}
TM-M	0.26 ± 0.01^{abc}	0.08 ± 0.02^{abc}	9.87 ± 0.52^{ac}
TM-H	0.37 ± 0.00^{ac}	0.06 ± 0.01^{ac}	9.79 ± 0.25^{ac}

注:和Model组相比,^a $P<0.05$;和Wistar组相比,^b $P<0.05$;和Sham组相比,^c $P<0.05$ 。

2.6 各组药物对大鼠血清中ET-1含量的影响

TM-M、TM-H组大鼠血清ET-1水平显著低于Model、TM-L组($P<0.05$),见表6、图7。

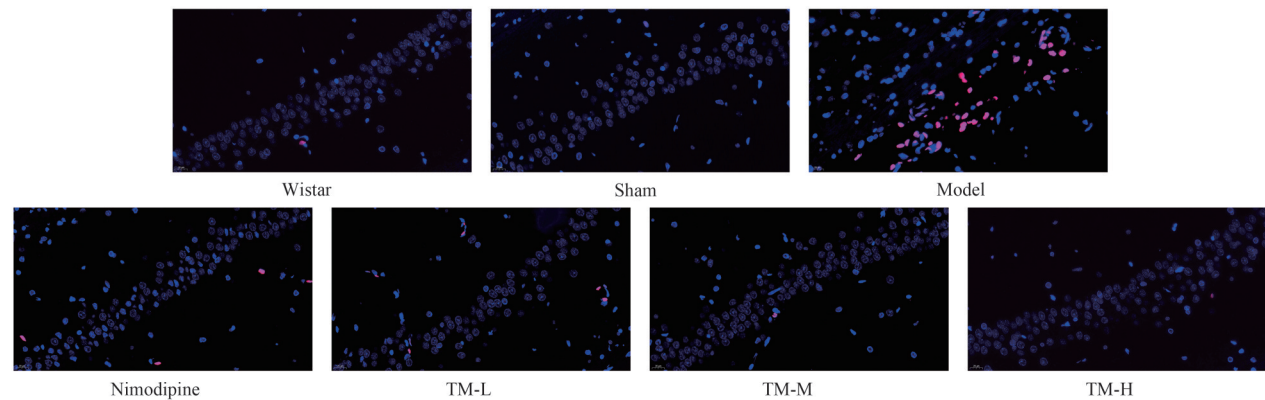


图5 各组大鼠海马组织神经元凋亡(TUNEL染色, $\times 400$)

Fig 5 Neuronal apoptosis in hippocampal tissues of rats in each group(TUNEL, $\times 400$)

2.7 各组药物对大鼠海马组织中PI3K/AKT通路蛋白含量的影响

与假手术组和空白组相比,模型组大鼠海马组

织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);尼莫地平组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平显著高于 TM-L、

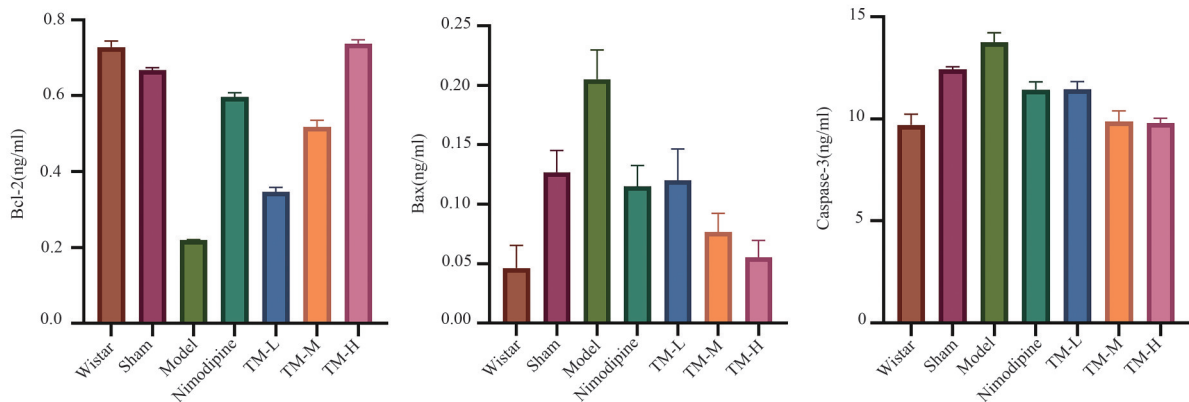


图6 各组大鼠海马组织中Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白含量表达

Fig 6 Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein contents in hippocampal tissues of rats in each group

表6 各组大鼠血清中ET-1蛋白含量表达[pg/mL, P_{50} ($P_{25} \sim P_{75}$), $n=6$]

Tab 6 Expression of ET-1 protein content in serum of rats in each group[pg/mL, P_{50} ($P_{25} \sim P_{75}$), $n=6$]

组别	ET-1
Wistar	0.41(0.40~0.44)
Sham	0.42(0.38~0.44)
Model	2.36(2.34~2.38) ^{cd}
Nimodipine	0.83(0.78~0.88)
TM-L	1.03(0.94~1.13) ^{cd}
TM-M	0.28(0.25~0.31) ^{ab}
TM-H	0.27(0.25~0.31) ^{ab}

注：和Model组相比，^a $P<0.05$ ；和Wistar组相比，^b $P<0.05$ ；和Sham组相比，^c $P<0.05$ 。

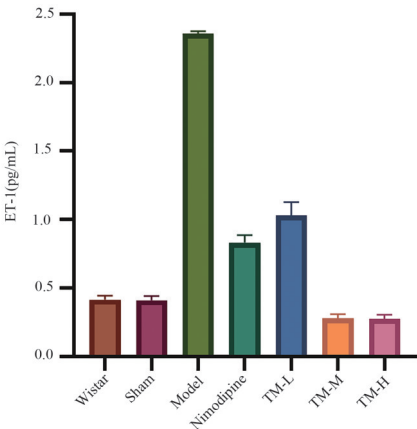


图7 各组大鼠血清中ET-1蛋白含量表达

Fig 7 Expression of ET-1 protein content in serum of rats in each group

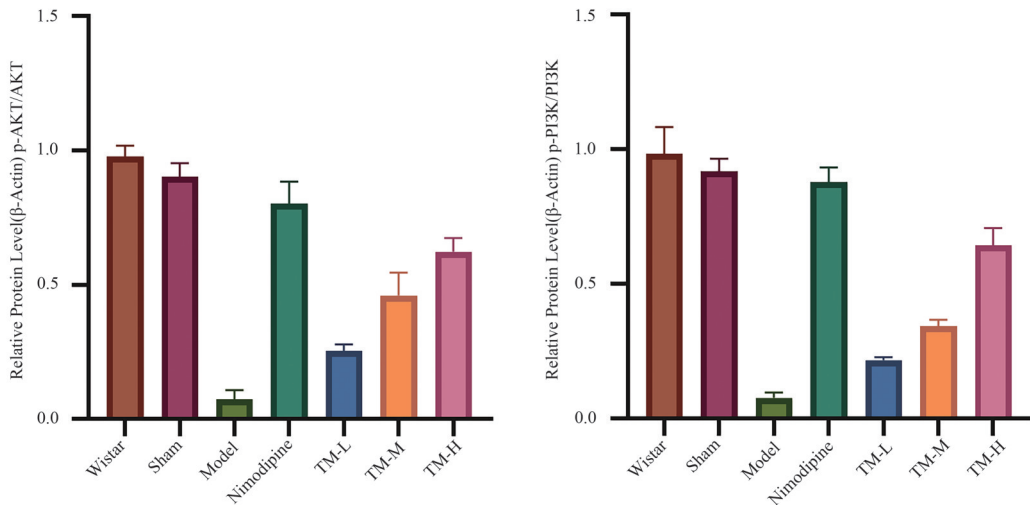


图8 各组大鼠海马组织中PI3K、AKT蛋白磷酸化水平

Fig 8 Phosphorylation levels of PI3K and AKT proteins in hippocampal tissues of rats in each group

TM-M、TM-H 组 ($P<0.01$); TM-H 组大鼠海马组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平显著高于 TM-L、TM-M 组 ($P<0.01$); TM-M 组大鼠海马组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平显著高于 TM-L 组 ($P<0.01$)。见表 7、图 8、9。

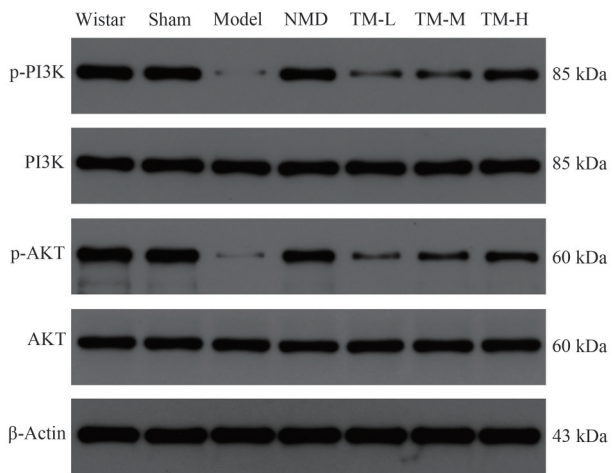


图 9 各组大鼠海马 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、 β -Actin 蛋白电泳表达

Fig 9 Electrophoresis of expression levels of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT and β -Actin proteins in hippocampal of rats in each group

表 7 各组大鼠海马组织中 PI3K、AKT 蛋白磷酸化水平 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 7 Phosphorylation levels of PI3K and AKT proteins in hippocampal tissues of rats in each group ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Wistar	0.98 ± 0.10^a	0.98 ± 0.04^a
Sham	0.92 ± 0.04^a	0.90 ± 0.05^a
Model	0.07 ± 0.02^{bc}	0.07 ± 0.03^{bc}
Nimodipine	0.88 ± 0.05^{ab}	0.80 ± 0.08^{ab}
TM-L	0.22 ± 0.01^{abc}	0.25 ± 0.03^{abc}
TM-M	0.34 ± 0.02^{abc}	0.46 ± 0.08^{abc}
TM-H	0.64 ± 0.06^{abc}	0.62 ± 0.05^{abc}

注:和 Model 组相比, ^a $P<0.05$;和 Wistar 组相比, ^b $P<0.05$;和 Sham 组相比, ^c $P<0.05$ 。

3 讨论

目前自发性高血压大鼠实验研究对照组多选用与 SHR 大鼠呈近交系的 WKY 大鼠。但结合 WKY 品系特征、相关文献^[17,18]及前期预实验行为学等结果表明, Wistar 大鼠比 WKY 大鼠更适合作为高血压合并血管性认知障碍模型的对照,故在该实验中改用 Wistar 大鼠作为空白对照组。关于血管性认知障碍的研究西药对照药物常选用盐酸多奈

哌齐^[19,20],高血压合并血管性认知障碍作为一种合病,治疗中两种病症需要兼顾,结合文献研究^[21],兼具降压与改善认知作用的尼莫地平进入大众视野,也逐渐被动物实验研究所应用。从中药方的选择上看,天麻钩藤饮也是能做到二症兼顾的方剂。

VCI 的发生、发展是涉及多个病理环节的过程^[22-24],迄今其病因及发病机制尚未完全阐明,目前慢性脑灌注不足被认为是导致 VCI 的主要原因^[25]。基于慢性脑灌注不足是导致血管性认知障碍的主要驱动因素,研究人员开发建立的脑缺血或缺血再灌注模型主要有 4 种:四血管阻塞法、二血管阻塞法、双侧颈总动脉狭窄和大脑中动脉闭塞模型^[26]。高盐饮食会造成认知功能的损害^[27]和血压的升高,更高的血压也影响大鼠认知功能^[28],单侧颈总动脉永久性闭塞加高盐饮食的造模方式已被应用于血管性认知障碍的研究中^[15]。

海马体是边缘系统中与空间定位及学习记忆功能关系最密切的区域,对低灌注的反应高度敏感^[29,30]。海马结构中的 CA1 区作为人类学习记忆功能首要的功能亚区,在短暂、严重的脑缺血发生时,引起海马 CA1 区的锥体细胞的迟发性死亡,可导致严重的学习记忆障碍^[31-33]。病理学上 SHR 海马整体萎缩出现空洞,可见高血压本身对海马形态有一定的影响,海马 CA1 区病理学显示, Model 组的病理形态与其它各组相比,细胞结构层次紊乱,尼氏小体减少,神经元凋亡更加严重。Morris 实验显示 Model 组大鼠空间学习和记忆的功能明显障碍,再结合病理结果,提示海马神经元的损伤与凋亡是高血压合并 VCI 大鼠形成认知障碍的可能机制,这在其它认知相关的研究中也曾被提出^[34]。干预后, TM-H、TM-M 组大鼠海马的病理改变较 Model 组有明显的改善,空间学习记忆障碍也有明显减轻趋势,说明天麻钩藤饮对于高血压合并 VCI 大鼠的海马损伤具有延缓作用,可促进高血压合并 VCI 大鼠空间记忆和学习能力的恢复。

应用天麻钩藤饮后, PI3K/AKT 信号通路蛋白上调,神经细胞形态、神经元丢失情况得到明显改善,表明大鼠神经元损伤的改善可能与天麻钩藤饮上调 PI3K/AKT 信号通路有关。有研究显示,脑血管阻塞后脑细胞表现出较低的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达水平,药物治疗可调高其表达水平^[35,36]。PI3K/AKT 信号通路是细胞存活的关键通路,当机体受到刺激后,激活 PI3K,底物磷脂酰肌醇 2 磷酸被催化转变成磷脂酰肌醇 3 磷酸,参与下游 AKT 的活化,调控下游不同靶点发挥抗氧化、

抗炎、抗内质网应激、细胞凋亡等生物学功能^[37-40]。目前研究表明 AKT 磷酸化后发挥抗凋亡作用,即通过促进 Pro-Caspase-9 的磷酸化使 Ser196 位点失活,抑制凋亡执行者 Caspase-3 的活性,从而减少细胞的凋亡^[41]。而又有研究发现 Caspase-3 是受 PI3K/AKT 通路转录调节的下游靶蛋白之一,参与神经元凋亡的调控与执行,在正常情况下 Caspase-3 表达含量极低,外源性病理性的刺激可增加其表达,在脑灌注不足后的过高表达可介导神经元的凋亡途径启动^[42-44]。高玲等^[45]的研究显示抑制 Caspase-3 的表达可以减轻缺血缺氧诱导的海马神经元凋亡,进而改善痴呆大鼠的认知障碍。因此,在 VCI 的预防与治疗中,有效遏制 Caspase-3 相关通路的活化显得尤为关键。同时,当 AKT 磷酸化后,激活下游的蛋白,产生抗凋亡因子如 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 和 B 细胞淋巴瘤-xL (Bcl-xL)^[46]。Bcl-2 作为一种抗凋亡蛋白,是程序性细胞死亡的关键调节剂。其作为生物标志物和治疗靶点阻断创伤性脑损伤后神经元凋亡的效用被提出^[47],说明 Bcl-2 的表达影响着神经元凋亡从而影响神经功能。Bax 是一种促凋亡蛋白,研究表明,神经元内源性凋亡的诱导完全依赖于 Bax 的表达和激活^[48,49]。在许多体外和体内的神经退行性变的模型中,Bax 的缺乏和抑制确实可以防止神经元的异常死亡^[50,51]。因此,研究神经元的凋亡与 Bcl-2、Bax 的表达能够互相验证。

本实验研究结果显示,天麻钩藤饮能够改善高血压合并血管性认知障碍大鼠认知功能,其机制可能与抑制海马神经细胞凋亡、改善脑灌注、降低血压有关,但针对神经血管单元以及神经元具体各组分作用机制及作用靶点仍有待进一步研究。

作者贡献度说明:

张红晓:实验设计、实验实施、数据分析、文章撰写;李纳川:实验实施;赵凡莹:实验设计及文章审校;刘子旺:实验设计及文章修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Rundek T, Tolea M, Arikio T, et al. Vascular cognitive impairment (VCI) [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19 (1): 68-88.
- 2 Badji A, Youwakim J, Cooper A, et al. Vascular cognitive impairment - past, present, and future challenges [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 90: 102042.
- 3 Xu R, He Q, Wang Y, et al. Therapeutic potential of remote ischemic conditioning in vascular cognitive impairment [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 706759.
- 4 Sachdeva R, Nightingale TE, Krassioukov AV. The blood pressure pendulum following spinal cord injury: Implications for vascular cognitive impairment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2464.
- 5 Yin Y, Tam HL, Quint J, et al. Epidemiology of dementia in china in 2010-2020: A systematic review and meta-analysis [J]. *Healthcare (Basel)*, 2024, 12(3): 334.
- 6 Akhter F, Persaud A, Zaokari Y, et al. Vascular dementia and underlying sex differences [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 720715.
- 7 焦丽艳, 刘勇. 经方天麻钩藤饮中单味药治疗高血压病及其心血管作用的药理研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(68): 62-63.
- Jiao LY, Liu Y. Pharmacological study on the treatment of hypertension and its cardiovascular effects by single herb in the sutra formula Tianma Gouteng decoction [J]. *World Latest Med Informat*, 2017, 17(68): 62-63.
- 8 张志慧, 周龙岗, 魏聪, 等. 从脑络论治老年性痴呆的研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(8): 1622-1623.
- Zhang ZH, Zhou LG, Wei C, et al. Research progress of treating Alzheimer's disease from brain complex theory [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2010, 37 (8): 1622-1623.
- 9 吕欢欢, 张娜, 宋军营, 等. 阿尔茨海默病炎症机制研究进展 [J]. *中医学报*, 2014, 29(11): 1671-1673.
- Lv HH, Zhang N, Song JY, et al. The research progress of inflammation mechanism of Alzheimer's disease [J]. *Acta Chin Med*, 2014, 29(11): 1671-1673.
- 10 赵雪莹, 徐丹. 补肾化痰法治疗阿尔兹海默病的实验研究进展 [J]. *中医药导报*, 2016, 22(2): 107-109.
- Zhao XY, Xu D. Research progress of the method of nourishing kidney and resolving phlegm in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Guiding J Tradit Chin Med*, 2016, 22(2): 107-109.
- 11 沈金亮, 崔文旺, 陈伟. 天麻钩藤饮加减治疗风阳上扰型急性脑梗死 [J]. *吉林中医药*, 2023, 43(3): 292-295.
- Shen JL, Cui WW, Chen W. Study on the clinical efficacy of Tianma Gouteng decoction in the treatment of acute cerebral infarction with the syndrome of wind-yang invading upward [J]. *Jilin J Chin Med*, 2023, 43 (3): 292-295.
- 12 刘美华, 李双. 天麻钩藤饮加减联合耳穴压豆治疗失眠症的效果 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(23): 146-149.
- Liu MH, Li S. Effect of modified Tianma Gouteng decoction combined with otopoint pellet-pressing in the treatment of insomnia [J]. *Chin Med Herald*, 2020, 17 (23): 146-149.

- 13 严志聪, 麦杞峰. 天麻钩藤饮与多巴丝肼片联合用药治疗帕金森病的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016,16(6): 778-780.
Yan ZC, Mai QF. Observation on efficacy of decoction of gastrodia combined with madopar in treatment of parkinson [J]. Evaluat Analysis Drug-Use Hospital Chin, 2016,16(6): 778-780.
- 14 朱霞, 范保军, 李慧敏, 等. 浮针再灌注联合天麻钩藤饮治疗中青年颈性颈椎病急性发作期的临床研究[J]. 中国中医急症, 2021,30(9): 1593-1597.
Zhu X, Fan BJ, Li HM, et al. Clinical efficacy and mechanism of floating needle reperfusion combined with Tianma Gouteng decoction in the treatment of middle-aged and young patients with cervical spondylopathy during the acute stage [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2021,30(9): 1593-1597.
- 15 Jalal FY, Yang Y, Thompson JF, et al. Hypoxia-induced neuroinflammatory white-matter injury reduced by minocycline in SHR/SP[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015,35(7): 1145-1153.
- 16 Jacob S, Nair AB, Morsy MA. Dose conversion between animals and humans: A practical solution[J]. Indian J Pharm Educ Res, 2022,56: 600-607.
- 17 任俊豪, 徐萍, 李双阳, 等. 通窍益智颗粒对血管性痴呆大鼠血脑屏障功能及血管新生的影响及机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2022,31(23): 3238-3245.
Ren JH, Xu P, Li SY, et al. Tongqiao Yizhi granule improves cognitive impairment *via* regulating blood-brain barrier barrier function and angiogenesis in rats with vascular dementia[J]. Mod J Int Tradit Chin West Med, 2022,31(23): 3238-3245.
- 18 Tchekalarova J, Krushovlieva D, Ivanova P, et al. Spontaneously hypertensive rats *vs* Wistar Kyoto and Wistar rats: An assessment of anxiety, motor activity, memory performance, and seizure susceptibility [J]. Physiol Behav, 2023,269: 114268.
- 19 Malouf R, Birks J. Donepezil for vascular cognitive impairment[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2004(1): CD004395.
- 20 Li R, Xu C, Zhong P, et al. Efficacy of acupuncture and pharmacological therapies for vascular cognitive impairment with no dementia: A network meta-analysis [J]. Front Aging Neurosci, 2023,15: 1181160.
- 21 陈应奇, 刘英莲, 梁薇, 等. 丹参-川芎药对干预大鼠血管性痴呆作用机制[J]. 陕西中医, 2024, 45(3): 297-301.
Chen YQ, Liu YL, Liang W, et al. Action mechanism of intervention Danshen Chuanxiong couplet medicines on vascular dementia rats [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2024,45(3): 297-301.
- 22 Poh L, Sim WL, Jo DG, et al. The role of inflammasomes in vascular cognitive impairment[J]. Mol Neurodegener, 2022,17(1): 4.
- 23 Johnson AC. Hippocampal vascular supply and its role in vascular cognitive impairment[J]. Stroke, 2023,54(3): 673-685.
- 24 Hosoki S, Hansra GK, Jayasena T, et al. Molecular biomarkers for vascular cognitive impairment and dementia [J]. Nat Rev Neurol, 2023,19(12): 737-753.
- 25 Lokshina AB, Grishina DA, Zakharov VV. Vascular cognitive impairment: Issues of diagnosis and treatment [J]. Neurol Neuropsychiatry Psychosomatics, 2023,15(2): 106-113.
- 26 牛雨晴, 秦合伟, 姬令山, 等. 血管性认知障碍和卒中后认知障碍动物模型初步评价[J]. 中国比较医学杂志, 2022,32(5): 121-127.
Niu YQ, Qin HW, Ji LS, et al. Preliminary evaluation of animal models of vascular and post-stroke cognitive impairments[J]. Chin J Comparat Med, 2022, 32(5): 121-127.
- 27 Liu S, Yang X, Yuan M, et al. High salt diet induces cognitive impairment and is linked to the activation of IGF1R/mTOR/p70S6K signaling[J]. Metab Brain Dis, 2024,39(5): 803-819.
- 28 Grigorova YN, Juhasz O, Long JM, et al. Effect of cardiotonic steroid marinobufagenin on vascular remodeling and cognitive impairment in young Dahl-S rats[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(9):4563.
- 29 Fritch HA, Spets DS, Slotnick SD. Functional connectivity with the anterior and posterior hippocampus during spatial memory [J]. Hippocampus, 2021, 31(7): 658-668.
- 30 王玮, 靳贺超, 耿秀超, 等. 血管性痴呆肾虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020,26(6): 748-752.
Wang W, Jin HC, Geng XC, et al. Establishment of rat model of vascular dementia combined with kidney deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2020,26(6): 748-752.
- 31 Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia[J]. Neuroscience, 1991,40(3): 599-636.
- 32 Wu MY, Zou WJ, Yu P, et al. Cranial irradiation impairs intrinsic excitability and synaptic plasticity of hippocampal CA1 pyramidal neurons with implications for cognitive function[J]. Neural Regen Res, 2022, 17(10): 2253-2259.
- 33 Sarkala HB, Jahanshahi M, Dolatabadi LK, et al.

- G-CSF improved the memory and dendritic morphology impairments in the hippocampal CA1 pyramidal neurons after brain ischemia in the male rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2023,38(8): 2573-2581.
- 34 向桂珍, 秦明凯, 孙毅红, 等. 黄芩苷通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase 3 凋亡细胞改善睡眠障碍诱导的认知功能障碍[J]. *海南医学院学报*: 1-18.
Xiang GZ, Qin MK, Sun YH. Baicalin improves cognitive dysfunction induced by sleep disorders by regulating the Bcl-2/Bax/Caspase 3 apoptosis pathway [J]. *J Hainan Med Univ*: 1-18.
 - 35 吴胜男, 张露, 樊红莲, 等. PI3K/Akt 通路在内吗啡肽-1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2021,41(6): 870-875.
Wu SN, Zhang L, Fan HL, et al. PI3K/Akt signaling pathway mediates the protective effect of endomorphin-1 post-conditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Southern Med Univ*, 2021,41(6): 870-875.
 - 36 白秀, 沈亚亭, 王明威, 等. PI3K/Akt 信号通路或缺血性中风的相关性研究进展[J]. *河北医药*, 2021,43(13): 2050-2054.
Bai X, Shen YT, Wang MW, et al. Research progress on the correlation between PI3K/Akt signaling pathway and ischemic cerebral stroke[J]. *Hebei Med J*, 2021,43(13): 2050-2054.
 - 37 Xie Y, Shi X, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2019,19(2): 783-791.
 - 38 Chu J, Yuan C, Zhou L, et al. JianPiTongLuo (JPTL) recipe regulates anti-apoptosis and cell proliferation in colorectal cancer through the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2024,10(15): e35490.
 - 39 Jia Y, Wang Y, Wang Z, et al. Neuroprotective effects of total phenolics from *hemerocallis citrina baroni* leaves through the PI3K/AKT pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2024,15: 1370619.
 - 40 Lv L, Li S, Kang J, et al. Inhibition of ABI2 ubiquitination-dependent degradation suppresses TNBC cell growth via down-regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2024,24(1): 222.
 - 41 Tu F, Yu G, Wu W, et al. Triiodothyronine enhances cardiac contractility in septic rats and probably through Akt-Caspase9 pathway to reduce septic-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Mol Cell Probes*, 2022, 66: 101852.
 - 42 Xu J, Li Y, Kang M, et al. Multiple forms of cell death: A focus on the PI3K/AKT pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2023,238(9): 2026-2038.
 - 43 Kumar M, Bansal N. Implications of phosphoinositide 3-kinase-akt (PI3K-Akt) pathway in the pathogenesis of alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59 (1) : 354-385.
 - 44 高玲, 赵建军, 胡亚男, 等. 基于 PI3K/Akt/Bad 信号通路探讨益髓解毒方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020,26(18): 58-63.
Gao L, Zhao JJ, Hu YN, et al. Effect of Yisui Jiedu prescription on apoptosis of hippocampal neurons based on pi3k/akt/bad signal pathway in rats with vascular dementia[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2020,26(18): 58-63.
 - 45 高玲, 赵建军, 王冰梅, 等. 益髓解毒法对血管性痴呆大鼠海马神经元 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12): 5656-5660.
Gao L, Zhao JJ, Wang BM, et al. Effects of the benefiting marrow and removing toxicity method on hippocampal neurons caspase-3, caspase-9 mRNA and protein expression in vascular dementia rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2019,34(12): 5656-5660.
 - 46 Wang B, Wang L, Qu Y, et al. Chitosan oligosaccharides exert neuroprotective effects *via* modulating the PI3K/Akt/Bcl-2 pathway in a Parkinsonian model [J]. *Food Function*, 2022,13(10):5838-5853.
 - 47 Deng H, Yue JK, Zusman BE, et al. B-Cell lymphoma 2 (Bcl-2) and regulation of apoptosis after traumatic brain injury: A clinical perspective [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020,56(6):300.
 - 48 Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, et al. Neuronal cell death[J]. *Physiol Rev*, 2018,98(2): 813-880.
 - 49 Goel P, Chakrabarti S, Goel K, et al. Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022,15: 937133.
 - 50 Moldoveanu T. Apoptotic mitochondrial poration by a growing list of pore-forming BCL-2 family proteins[J]. *Bioessays*, 2023,45(3): e2200221.
 - 51 Beigl TB, Paul A, Fellmeth TP, et al. BCL-2 and BOK regulate apoptosis by interaction of their C-terminal transmembrane domains[J]. *EMBO Rep*, 2024,25(9): 3896-3924.

[本文编辑] 雷燕 宋睿璞 朱昊