智脑胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及其抗凋亡机制

张晶鑫[1,2],王春格[1,2],李文龙[1,2],胡可欣[1,2],程婷[3],胡希[1,2]

(1.安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;2.国家转化医学科学中心<上海>合肥分中心,安徽 合肥 230012;
3.安徽中医药大学第一附属医院,安徽 合肥 230031)

摘要:目的 探讨智脑胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤(CIRI)的神经保护作用及其抗凋亡机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组及智脑胶囊低、中、高剂量组(0.234、0.468、0.936 g·kg^{-1})。除假手术组外,其余各组采用右侧大脑中动脉阻塞法建立CIRI模型,并于造模前连续7 d灌胃给药。术后评估脑损伤程度、脑组织病理改变、氧化应激指标及炎性因子水平,并检测凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 与模型组相比,智脑胶囊中、高剂量组脑梗死面积缩小,神经功能改善($P<0.05$),脑组织病理损伤减轻,微管相关蛋白2(MAP2)表达增强。各剂量组丙二醛(MDA)含量降低,超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性升高,炎性因子水平下降($P<0.05$)。智脑胶囊能够剂量依赖性地上调脑组织中磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和磷酸化蛋白激酶B(Akt)蛋白表达水平,并下调糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)表达;同时上调B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)表达,下调Bcl-2相关X蛋白(Bax)及半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)表达,并减少末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记(TUNEL)阳性细胞数($P<0.05$)。**结论** 智脑胶囊可减轻大鼠CIRI并保护神经元,其机制涉及缓解氧化应激、抑制神经炎症以及调控PI3K/Akt/GSK-3β凋亡相关信号通路。

关键词:脑缺血再灌注损伤;智脑胶囊;神经保护;氧化应激;抗凋亡

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-5375(2026)09-0975-08

doi:10.13506/j.cnki.jpr.2026.09.003

Neuroprotective effects of Zhinao Capsules against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its anti-apoptotic mechanisms

ZHANG Jingxin[1,2], *WANG Chunge*[1,2], *LI Wenlong*[1,2], *HU Kexin*[1,2], *CHENG Ting*[3], *HU Xi*[1,2]

(*1.School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2.Hefei Branch, National Center for Translational Medicine Science <Shanghai>, Hefei 230012, China; 3.The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China*)

Abstract: Objective To investigate the preventive neuroprotective effects of Zhinao Capsules on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) in rats and to explore its anti-apoptotic mechanisms. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham-operated group, a model group, and low-, medium-, and high-dose Zhinao Capsules groups (0.234, 0.468 and 0.936 g·kg^{-1}). Except for the sham group, a CIRI model was established by right middle cerebral artery occlusion. Zhinao Capsules were administered by gavage for 7 consecutive days prior to model induction. Following the establishment of the CIRI model, the degree of cerebral injury, histopathological alterations, oxidative stress profiles, and inflammatory cytokine levels, and apoptosis-related protein expression were comprehensively evaluated. **Results** Compared with model group, medium-and high-dose Zhinao Capsules groups showed significantly reduced cerebral infarct areas and improved neurological function scores ($P < 0.05$), accompanied by alleviated histopathological damage and enhanced microtubule-associated protein 2 (MAP2) expression. Malondialdehyde (MDA) levels decreased, while superoxide dismutase

基金项目:安徽中医药大学"基础-临床融合"专项面上项目(No.JCLCA2025010)

作者简介:张晶鑫,女,硕士生,研究方向:创新药物制剂,E-mail:2023205227044@ stu.ahtcm.edu.cn

通信作者:胡希,女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:创新药物制剂,E-mail:huxi@ ahtcm.edu.cn

(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) activities significantly increased across all treatment groups,and inflammatory cytokine levels were markedly reduced ($P<0.05$). The expression levels of phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and phosphorylated protein kinase B(Akt) proteins were upregulated in all dosage groups,while glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β) expression was downregulated. Concurrently, apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) expression increased, whereas Bcl-2-related X protein (Bax) and cysteine aspartate protease-3 (caspase-3) expression decreased,and the number of TUNEL-positive cells was significantly reduced($P<0.05$).**Conclusion** Zhinao Capsules can alleviate CIRI in rats and protect damaged neurons,likely by reducing oxidative stress,suppressing neuroinflammation,and activating the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway.

Key words:Cerebral ischemia-reperfusion injury;Zhinao Capsules;Neuroprotection;Oxidative stress;Anti-apoptosis.

随着社会老龄化程度的不断加剧,缺血性脑卒中的发病率持续攀升,且其高致死率与高致残率始终维持在较高水平,对公众生命健康构成了严重威胁[1]。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury,CIRI)是缺血性脑卒中治疗过程中的关键病理环节,严重限制了血管再通治疗的临床疗效[2]。目前,静脉注射阿替普酶或机械取栓术虽能有效实现血管再通[3],但对 CIRI 这一常见且严重的并发症,仍缺乏能够在早期有效阻断其发生的保护策略[4]。因此,探索安全、有效的神经保护药物,以在不可逆神经损伤发生前对缺血性脑卒中高危人群实施早期干预,仍是当前防治缺血性脑血管病的重要策略和研究方向。

智脑胶囊是由安徽中医药大学第一附属医院杨文明教授基于长期临床实践与中医经典理论研制而成的院内经验方[5]。研究表明“脾肾亏虚为本,痰瘀阻闭、清窍被蒙为标”是相关脑病发病的关键病机[6]。据此,智脑胶囊全方配伍党参、黄芪、酒黄精、肉苁蓉以益气补肾、扶正固本,联用郁金、石菖蒲、川芎、地龙以化痰开窍、活血通络,共奏“益气活血、化痰开窍”之功[7]。作为具有深厚临床应用基础的经验方,智脑胶囊在改善急性脑损伤及慢性神经退行性疾病中具有显著疗效[8]。临床研究表明,智脑胶囊可改善轻中度阿尔茨海默病患者的认知功能评分及神经功能缺损程度,且长期用药安全性良好[9-10]。本研究选择智脑胶囊用于改善 CIRI 的研究,主要考虑以下 2 个方面:①疾病关联性:阿尔茨海默病患者发生脑缺血的风险高于健康人群,二者在病理机制上存在深层交汇,慢性脑低灌注、脑微血管病变及血脑屏障功能受损等血管相关异常,与神经炎症持续激活共同构成重要的致病环节[11];②药理学基础:智脑胶囊在阿尔茨海默病模型中能通过抗凋亡、抗氧化及抗炎等多重途径发挥神经保护作用[12],而这些机制同为脑缺血损伤的核心防治机制。然而,其在脑缺血损伤模型中的作用尚缺乏明确报道,仍有待进一步研究验证。因此,本研究拟通过建立大鼠 CIRI 模型,在造模前给予不同剂量的智脑胶囊灌胃预处理,以验证其是否对 CIRI 具有防治效用,并系统阐明其在抗凋亡等方面的药理学机制。研究成果不仅有望为缺血性脑血管病的早期神经保护药物提供新的实验依据,也将为阿尔茨海默病患者的综合治疗中高发的脑缺血并发症提供重要的神经保护策略和潜在干预方案。

1　材料

1.1　动物　SPF 级健康雄性 SD 大鼠 35 只,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(辽)2025-0002。饲养条件为:20 ~24 ℃,相对湿度 50%~60%,采用 12 h 明暗交替光照循环,所有大鼠均自由摄食饮水,动物使用许可证号:SYXK(皖)2025-004。所有体内实验均经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:AHUCM-rats-2024054)。

1.2　药物与试剂　智脑胶囊(批号:20250110,每粒 0.4 g),安徽中医药大学第一附属医院药剂科研制;氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride,TTC)染色试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号:20625479D);苏木精-伊红染色液(hematoxylin and eosin,HE,北京索莱宝科技有限公司,批号:20251103A);尼氏染色液(Nissl,安徽科兔生物技术有限公司,批号:20251101D);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量检测试剂盒(批号:100)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒(批号:A441251022)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒(批号:A287A251009)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)检测试剂盒(批号:A307A251008)均购自上海碧云天生物技术有限公司;大鼠白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β;批号:202511)、大鼠白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6;批号:202511)、大鼠肿

瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α;批号:202511)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司。

1.3 主要仪器 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:SpectraMax Plus 384);高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:HT165R);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);正置光学显微镜(日本尼康公司,型号:NIKON ECLIPSE E100)。

2 方法

2.1 大鼠 CIRI 模型的建立 大鼠经异氟烷麻醉后仰卧固定,颈部消毒,沿颈前正中偏右纵行切开约 1 cm,钝性分离暴露右侧颈总动脉及其分支。结扎颈外动脉,暂时夹闭颈内动脉。于颈总动脉近心端剪口,插入硅胶包被尼龙线栓,沿颈内动脉缓慢推进,阻塞大脑中动脉起始部,120 min 后拔出线栓实现再灌注,缝合切口。假手术组仅分离血管,不插栓。术后保温,观察呼吸与意识恢复。

2.2 动物分组与给药 将 35 只 SPF 级健康大鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为假手术组、模型组、低剂量智脑胶囊组(0.234 $g\cdot kg^{-1}$)、中剂量组(0.468 $g\cdot kg^{-1}$)和高剂量组(0.936 $g\cdot kg^{-1}$),每组 7 只。剂量设置依据智脑胶囊在安徽中医药大学第一附属医院的临床成人日用量(3.6~6.0 g),结合大鼠/人等效剂量比 6.3 折算确定[13-14]。假手术组与模型组每天给予等体积生理盐水灌胃,各给药组分别灌胃相应剂量的智脑胶囊水分散液,连续给药 7 d;末次给药后,除假手术组外,其余各组均采用线栓法建立 CIRI 模型。

2.3 神经功能评分 再灌注 24 h 后,采用 Zea Longa 五级评分法对大鼠神经功能缺损程度进行评分。0 分,无神经功能缺损,活动自如;1 分,提尾悬空时对侧前肢自发性屈曲;2 分,自主行走时向健侧转圈;3 分,站立或移动时向对侧倾倒,平衡能力明显障碍;4 分,无法自主行走,伴有意识障碍。采用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。

2.4 TTC 染色 取 3 只大鼠全脑,置于-20 ℃条件下短暂冷冻。沿冠状面连续切成 1 mm 厚切片,将脑片迅速浸入 2% TTC 溶液中,37 ℃避光孵育。染色结束后用 4%多聚甲醛溶液固定,并拍照记录图像。使用 Image J 软件(v.2.16.0)计算脑梗死面积百分比[脑梗死面积百分比(%)=(梗死区面积/各切面面积之和)×100%],使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析。

2.5 HE 与 Nissl 染色 大鼠麻醉后行心脏灌注,各组随机取 1 只大鼠全脑置于 4%多聚甲醛中固定,常规制备石蜡切片。分别参照相应试剂盒说明书步骤进行 HE 染色与 Nissl 染色,在显微镜下观察缺血侧脑组织病理变化,并采集图像。每只大鼠随机选取 3 个非重叠高倍视野,采用 Image J 软件(v.2.16.0)进行定量分析,使用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。

2.6 免疫组化法检测微管相关蛋白 2(microtubule associated protein 2,MAP2)表达 取“2.5”项下大鼠脑组织切片后,脱蜡至水,抗原修复后阻断内源性过氧化物酶。5%牛血清白蛋白封闭 1 h,加入鼠抗 MAP2 一抗,4 ℃孵育过夜;磷酸缓冲液(PBS)洗片后,辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗 37 ℃孵育 1 h,用核染液(DAPI)复染封片后于显微镜下观察缺血侧脑组织 MAP2 表达。每只大鼠随机选取 3 个非重叠高倍视野,采用 Image J 软件(v.2.16.0)进行定量分析,使用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。

2.7 脑组织中氧化应激与炎性因子水平 各组取 3 只大鼠脑组织,精密称重后按 1∶9(W/V)加入 RIPA 裂解液,使用组织研磨仪制成 10%组织匀浆,1 000 $r\cdot min^{-1}$离心 10 min,取上清液。按照试剂盒说明书测定 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量;根据 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。采用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。

2.8 免疫组化与免疫荧光法检测脑组织凋亡水平 取“2.5”项下各组大鼠脑组织切片经抗原修复与封闭后,分别加入 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(bcl-2-associated X protein,Bax)及半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine-aspartic acid protease-3,caspase-3)一抗,4 ℃孵育过夜,HRP 标记二抗室温孵育 30 min,于光学显微镜下观察并采集图像。末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)染色按试剂盒说明书操作,DAPI 复染细胞核,荧光显微镜下观察凋亡细胞,拍照记录。每只大鼠选取 3 个非重叠高倍视野,采用 Image J 软件(v.2.16.0)进行定量分析,使用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。

2.9 蛋白质免疫印迹法分析脑组织中凋亡相关蛋白表达水平 称取“2.7”项下大鼠脑组织,加入裂解液,放入冷冻研磨仪;随后在预冷的离心机中,12 000 g

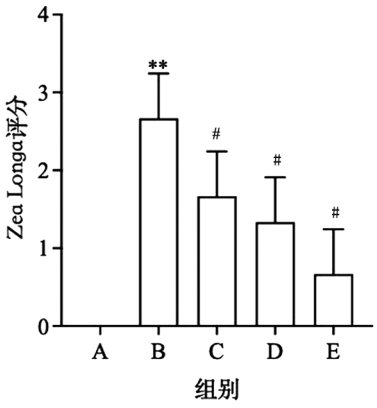
离心 20 min,取上清作为总蛋白提取液。测定蛋白浓度,制样,变性,进行电泳、转膜、封闭后,加入磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase,p-PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB/Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B,p-PKB/p-Akt)、糖原合酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)、磷酸化糖原合酶激酶-3β(phosphorylated glycogen synthase kinase-3β,p-GSK-3β)及内参蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)一抗,于 4 ℃孵育过夜。次日洗膜 3 次后,加入 HRP 标记的二抗室温孵育,再次洗膜后采用化学发光法显色,使用化学发光成像仪进行图像采集。Western blotting 实验独立重复 3 次,采用 Image J 软件(v.2.16.0)进行灰度值分析,使用 GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。。

2.10 统计学分析 计量资料以"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示。神经功能评分与生化指标检测均采用 GraphPad Prism 10.0统计软件对实验数据进行处理与分析。上述染色及 Western blotting 图像先采用 Image J 软件(v.2.16.0)进行定量分析,再采用 GraphPad Prism 10.0统计软件进行数据处理与统计分析。独立样本 t 检验进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 智脑胶囊对大鼠神经功能的影响 如图 1 所示,假手术组大鼠行为活动正常,未见明显神经功能异常。与假手术组相比,模型组大鼠出现典型神经功能障碍,表现为自发活动时向健侧偏转、悬空状态下肢体无力、站立失衡等,且 Zea Longa 评分升高($P<0.01$),提示造模成功。造模前给予不同剂量的智脑胶囊进行提前干预,可不同程度地改善大鼠的神经症状。其中,高剂量组对运动协调性的改善效果较好。同时,中、高剂量组大鼠的神经功能缺损评分较模型组降低。

3.2 智脑胶囊对大鼠脑梗死面积的影响 TTC 染色结果如图 2 所示,假手术组大鼠脑组织染色均匀,呈鲜红色。与假手术组相比,模型组大鼠脑组织出现大面积苍白色梗死区域,梗死体积增加($P<0.01$);而与模型组相比,经智脑胶囊各剂量组(低、中、高)干预后,大鼠脑组织苍白病灶范围均不同程度缩小;其中,中、高剂量组的梗死面积减小更为显著($P<0.05$)。



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

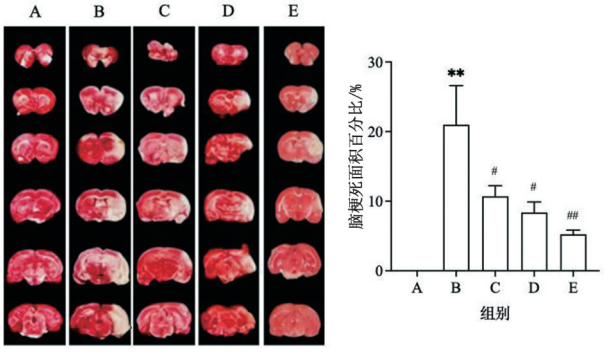
图 1 不同组别大鼠神经功能评分($n=3$)

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

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.1 Neurological function scores in rats from different groups($n=3$)

Note: Compared with sham group, $^{**}P<0.01$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$.



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 2 不同组别大鼠脑组织 TTC 染色切片(左)及梗死面积百分比统计图(右)($n=3$)

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

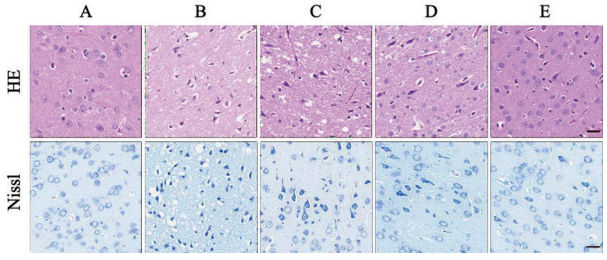
A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.2 TTC-stained brain sections of rats from different groups(left) and quantitative analysis of cerebral infarct area(right)($n=3$)

Note: Compared with sham group, $^{**}P<0.01$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

3.3 智脑胶囊对大鼠脑组织病理改变的影响 结果如图 3 和图 4 所示,假手术组大鼠脑组织形态规则,胞体完整,细胞核大而清晰,尼氏体丰富,组织形态正常。与假手术组相比,模型组大鼠脑组织结构破坏,胞体皱缩,可见核固缩现象,间质疏松,尼氏体

数量减少且染色加深;与模型组相比,智脑胶囊中剂量组神经元形态有所改善,排列趋于整齐,细胞核结构清晰,尼氏体数量增多。高剂量组脑组织病理改变减轻,改善神经元形态损伤。综上所述,智脑胶囊对 CIRI 大鼠脑组织具有神经保护作用,能有效维持神经元结构的完整性,抑制缺血再灌注诱导的病理损伤级联反应。

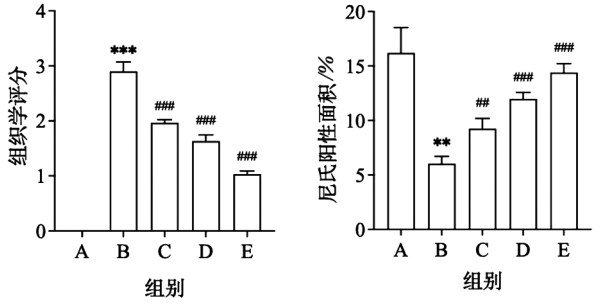


A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 3 不同组别大鼠脑皮质神经元病理形态学变化(HE 染色和 Nissl 染色,标尺=20 μm)

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.3 Histopathological changes of cortical neurons in rats from different groups(HE staining and Nissl staining, scale bar=20 μm)



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 4 不同组别大鼠脑皮质神经元的组织学评分(左)及尼氏阳性面积百分比(右)统计分析(n=3)

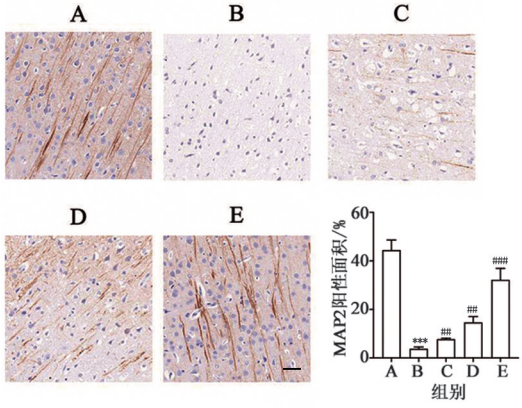
注:与假手术组比较,** P<0.01,*** P<0.001;与模型组比较,## P<0.01,### P<0.001。

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.4 Histological scores of cortical neurons(left) and percentage of Nissl-positive area(right) in different groups of rats(n=3)

Note: Compared with sham group, ** P<0.01, *** P<0.001; Compared with model group, ## P<0.01, ### P<0.001.

3.4 智脑胶囊对大鼠脑组织 MAP2 免疫组化染色的影响 MAP2 是一类主要在神经元胞体和树突中表达的耐热磷蛋白家族,在维持神经元极性结构与形态中发挥重要作用[15-16]。结果如图 5 所示,假手术组脑组织神经元 MAP2 免疫阳性信号较强,主要分布于胞体及树突,分布密集,网络结构连续且完整。模型组阳性信号减弱,着色浅淡,树突形态稀疏、断裂,神经网络结构不连续。与模型组相比,智脑胶囊各剂量组(低、中、高)阳性信号均有不同程度增强,树突结构紊乱程度减轻,神经网络连接性改善;其中,中、高剂量组改善效果较好,且高剂量组的神经保护作用突出。



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 5 不同组别大鼠缺血区 MAP2 免疫组化染色图(标尺=20 μm)和阳性面积统计图(n=3)

注:与假手术组比较,*** P<0.001;与模型组比较,## P<0.01,### P<0.001。

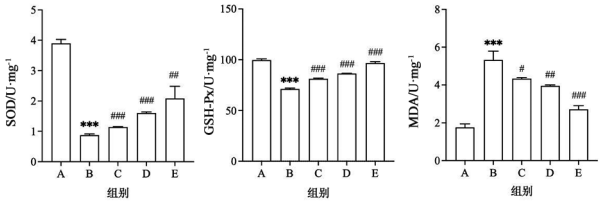
A.Sham surgery group; B.Model group; C.Low-dose Zhinao Capsules group; D.Medium-dose Zhinao Capsules group; E.High-dose Zhinao Capsules group

Fig.5 Immunohistochemical staining of MAP2 in ischemic regions of rat brains from different groups(scale bar=20 μm) and corresponding quantitative analysis of the positive area(n=3)

Note: Compared with sham group, *** P<0.001; Compared with model group, ## P<0.01, ### P<0.001.

3.5 智脑胶囊对大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响 如图 6 所示,与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧脑组织 SOD 及 GSH-Px 活力降低,MDA 含量升高(P<0.001)。与模型组相比,智脑胶囊各剂量组(低、中、高)SOD 与 GSH-Px 活力均升高,MDA 含量下降(P<0.05)。其中,高剂量组在提升 CIRI 模型大鼠脑组织中的 SOD 与 GSH-Px 活力、降低 MDA 水平方面的作用较突出。

3.6 智脑胶囊对大鼠脑组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响 如图 7 所示,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达水平均升高(P<0.01)。与模型组相比,低、中、高剂量组炎性因子的表达水平均降低,且中、高剂量组降低更为显著。上述结果表明,高剂量智脑胶囊具有更好的抗炎作用。



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

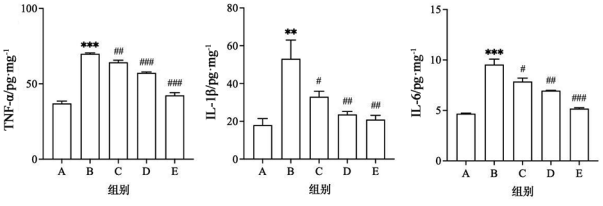
图 6 不同组别大鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量($n=3$)

注:与假手术组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$。

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.6 SOD and GSH-Px activities, and MDA levels in brain tissues of rats from different groups($n=3$)

Note: Compared with sham group, *** $P<0.001$; Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 7 不同组别大鼠脑组织炎性因子水平($n=3$)

注:与假手术组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$。

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.7 Inflammatory cytokine levels in brain tissues of rats from different groups($n=3$)

Note: Compared with sham group, *** $P<0.001$; Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

3.7 智脑胶囊对大鼠脑组织细胞凋亡水平的影响

如图 8 和图 9 所示,假手术组 Bcl-2 免疫阳性信号较强,阳性细胞在神经元胞质中密集分布;Bax 与 caspase-3 阳性细胞较少,TUNEL 染色偶见阳性细胞。模型组 Bcl-2 表达下降,阳性细胞分布稀疏;Bax 和 caspase-3 阳性区域扩大,分布密集;TUNEL 阳性细胞数量增多,呈典型凋亡形态。与模型组相比,智脑胶囊各剂量组(低、中、高)Bcl-2 表达增强,Bax 及 caspase-3 阳性信号范围和强度均有所减弱,TUNEL 阳性细胞密度降低($P<0.05$)。其中,智脑胶囊高剂量组对 CIRI 大鼠脑组织的神经保护效果较好。

3.8 智脑胶囊调控PI3K/Akt/GSK-3β信号通路蛋白的抗凋亡机制分析

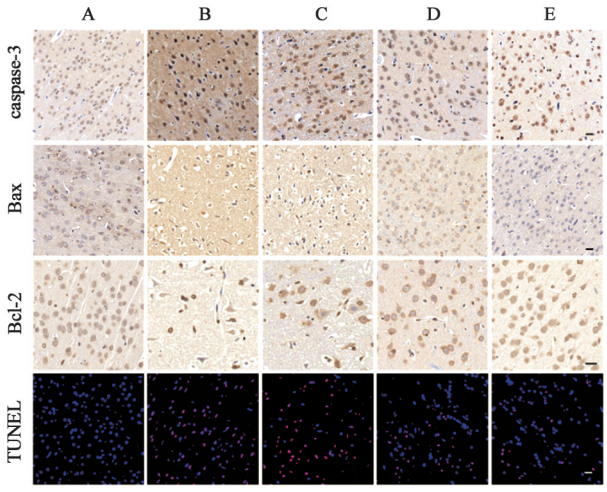
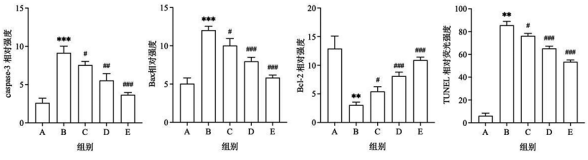


图 8 不同组别大鼠脑组织中 caspase-3、Bax、Bcl-2 和 TUNEL 染色图(标尺=20 μm)

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.8 Expression of caspase-3, Bax, Bcl-2 and TUNEL staining in brain tissues of rats from different groups(scale bar=20 μm)



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 9 不同组别大鼠脑组织中 caspase-3、Bax、Bcl-2 的表达水平和 TUNEL 染色水平统计分析($n=3$)

注:与假手术组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$。

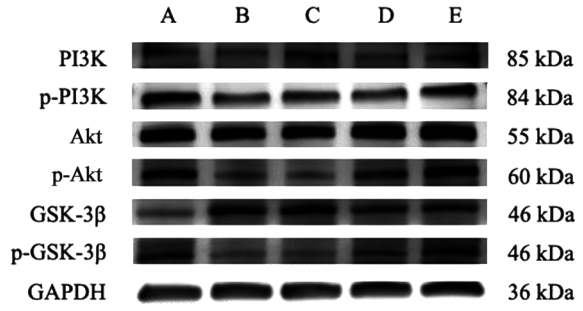
A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.9 Quantitative analysis of caspase-3, Bax, and Bcl-2 expression levels and TUNEL-positive cells in brain tissues of rats from different groups($n=3$)

Note: Compared with sham group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路是调控细胞存活与凋亡的核心通路之一,在 CIRI 中常受抑制,导致 GSK-3β 异常激活并加剧神经元凋亡[15]。如图 10~11 所示,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、p-GSK-3β 蛋白表达降低($P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$),GSK-3β 蛋白表达升高($P<0.05$);而智脑胶囊各组呈剂量依赖性地逆转上述蛋白表达变化。由此表明,智脑胶囊可能通过调控 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路,抑制 GSK-

3β 的异常激活,从而发挥抗凋亡作用,为 CIRI 的神经保护治疗提供了实验依据。

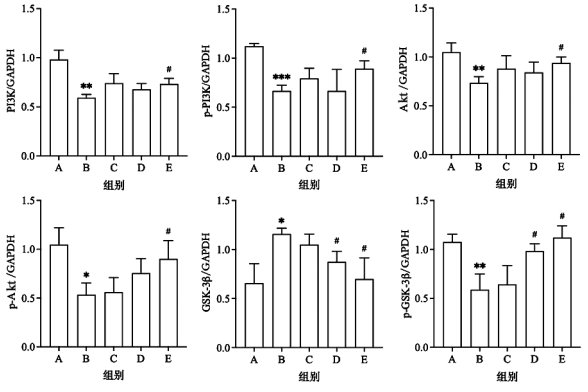


A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 10 不同组别大鼠脑组织中 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路的蛋白表达情况

A. Sham surgery group; B. Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.10 Protein expression of the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway in brain tissues of rats in different groups



A.假手术组;B.模型组;C.智脑胶囊低剂量组;D.智脑胶囊中剂量组;E.智脑胶囊高剂量组

图 11 不同组别大鼠脑组织中 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路的蛋白表达统计分析($n=3$)

注:与假手术组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$。

A. Sham surgery group; B Model group; C. Low-dose Zhinao Capsules group; D. Medium-dose Zhinao Capsules group; E. High-dose Zhinao Capsules group

Fig.11 Statistical analysis of protein expression of the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway in brain tissues of rats across different groups($n=3$)

Note: Compared with sham group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$.

4 讨论

CIRI 的病程具有显著的时相性特征,其病理过程可大致分为早期、中期和恢复期 3 个阶段,各阶段的核心病理机制依次递进、相互关联[17]。在 CIRI 早期,氧化应激反应占据主导地位。再灌注后,大量的活性氧(reactive oxygen species,ROS)的生成导致细胞内抗氧化防御系统失衡,表现为 SOD 和 GSH-Px 等关键抗氧化酶活性降低,同时脂质过氧化终产物 MDA 水平升高[19-20]。进入中期,炎症反应被广泛激活,并成为推动神经元死亡的关键环节[21]。值得注意的是,CIRI 与阿尔茨海默病在氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等病理机制方面存在共病基础与交互作用[22-25]。因此,针对上述关键环节的干预策略,可能在两类疾病中均具有潜在的神经保护作用。智脑胶囊由党参、黄芪、石菖蒲等组成,党参中的棕榈酸、月桂酸等可增强免疫与抗损伤能力[26];黄芪中多糖及黄酮类化合物能抑制炎症反应,维持免疫稳态[27];石菖蒲所含的 β-细辛醚能改善线粒体功能、抑制神经元凋亡,其挥发油组分亦可减轻氧化应激与神经炎症,协同发挥神经保护效应[28]。上述配伍在中医“扶正祛邪”理念下,兼具对凋亡通路与神经微环境的调控潜力。

本研究证实,智脑胶囊(剂量 0.234、0.468、0.936 $g\cdot kg^{-1}$)连续灌胃干预 7 d,可对大鼠 CIRI 产生神经保护作用。研究发现,智脑胶囊减轻神经元的病理损伤,表现为抑制尼氏体溶解,减轻胞体萎缩,并有效缓解 MAP2 的表达下调,从而保护神经元树突网络的致密性与完整性。进一步探究机制:在氧化应激层面,智脑胶囊能有效提高大鼠脑组织中 SOD 与 GSH-Px 等关键抗氧化酶的活性,降低脂质过氧化产物 MDA 的生成,从而缓解氧化应激损伤;在炎症反应方面,智脑胶囊抑制 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等关键促炎因子的释放,发挥抗炎效应;进一步,在凋亡调控机制方面,智脑胶囊可激活 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路,促进 Akt 的磷酸化并诱导其下游 GSK-3β 发生磷酸化而失活;该级联反应进而上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调促凋亡蛋白 Bax,恢复 Bcl-2/Bax 平衡,并抑制 caspase-3 过度活化,进而阻断线粒体介导的凋亡通路,减少神经元凋亡。综上所述,智脑胶囊通过抗氧化、抗炎及调控 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路介导的抗凋亡机制等多维度发挥对 CIRI 的神经保护作用。本研究不仅为智脑胶囊防治 CIRI 提供了药理学依据,也为进一步开发针对阿尔茨海默病合并血管风险患者等高危人群的早期干预策略提供了可行的探索方向和思路。

参考文献:

[1] Lu H, Zeng H, Wei W, et al. A fluorogenic ROS-triggered

hydrogen sulfide donor for alleviating cerebral ischemia - reperfusion injury [J]. Theranostics, 2024, 14 (19): 7589-7603.

[2] Liu W, Liu L, Li H, et al. Targeted pathophysiological treatment of ischemic stroke using nanoparticle - based drug delivery system [J]. J Nanobiotechnol, 2024, 22 (1):499.

[3] Lee J J, Prag H A, Chary K, et al. Local arterial administration of acidified malonate as an adjunct therapy to mechanical thrombectomy in ischemic stroke [J]. Cardiovasc Res,2025,121(9):1407-1418.

[4] Yang M, Liu B, Chen B, et al. Cerebral ischemia - reperfusion injury: mechanisms and promising therapies [J].Front Pharmacol,2025(16):1613464.

[5] Fang S, Xi H, Zhang K, et al. Zhinao Capsule improves learning and memory impairment in APP/PS1 mice through gut-brain axis-mediated inhibition of neuroinflammation[J]. Front Microbiol,2026(17):1735765.

[6] 陈溪,彭雅琪,李炜,等.从"脑与脾肾相关"浅析孤独症谱系障碍的病机与辨证论治要点[J].中国中西医结合儿科学,2024,16(1):88-92.

[7] 田丽伟,董婷.智脑胶囊通过调控 CDKN1A 介导铁死亡治疗轻度认知障碍脾肾亏虚证的疗效及机制分析[J].中华中医药杂志,2025,40(11):5370-5374.

[8] 姜辉,凡畅,汪永忠,等.智脑胶囊调控 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路诱导阿尔茨海默病模型细胞增殖的研究[J].中国医院药学杂志,2022,42(24):2612-2617.

[9] 宣巧玉,花代平,孙兰婷,等.基于临床试验和网络药理学探讨智脑胶囊治疗帕金森轻度认知障碍的机制[J].世界科学技术-中医药现代化,2025,27(10):3075-3084.

[10] 王岩,滕晶晶,杨同金,等.智脑胶囊长期毒性研究[J].中国药物警戒,2024,21(8):878-883.

[11] Yu S P, Jiang M Q, Shim S S, et al. Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: Implications for preventive treatments of ischemic stroke and late - onset Alzheimer's disease[J].Mol Neurodegener,2023,18(1):43.

[12] 余郭芳,田丽伟,赵晨玲,等.基于网络药理学和分子对接探讨智脑胶囊改善阿尔茨海默病的作用机制[J].山东科学,2023,36(1):34-40.

[13] 赵倩.基于新安医派固本培元理论探讨智脑胶囊治疗脾肾亏虚型平台期轻中度 AD 临床疗效及论治特色[D].合肥:安徽中医药大学,2022.

[14] 宣巧玉.智脑胶囊治疗 PD-MCI 伴睡眠障碍临床疗效及 PSG 指标变化分析[D].合肥:安徽中医药大学,2024.

[15] Shafit-Zagardo B, Kalcheva N. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron [J].Mol Neurobiol,1998,16(2):149-62.

[16] 杨琼英,冯晋,宁珑,等.脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织缺血半暗带病理进程研究[J].药学研究,2021,40(8):491-496.

[17] Han Y, Sun Y, Peng S, et al. PI3K/AKT pathway: A potential therapeutic target in cerebral ischemia - reperfusion injury [J]. Eur J Pharmacol, 2025 (998):177505.

[18] Menon B,Ramalingam K,Kumar R.Evaluating the role of oxidativestress in acute ischemic stroke [J]. J Neurosci Rural Pract,2020,11(1):156-159.

[19] Perkins G D, Neumar R, Hsu C H, et al. Improving outcomes after post - cardiac arrest brain injury: A scientific statement from the international liaison committee on resuscitation [J]. Resuscitation, 2024 (201):110196.

[20] Zhang H,Feng Y,Si Y,et al.Shank3 ameliorates neuronal injury after cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. Redox Biol, 2024 (69):102983.

[21] Zhou H,Yan L,Huang H,et al.Tat-NTS peptide protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via ANXA1 SUMOylation in microglia [J]. Theranostics, 2023,13(15):5561-5583.

[22] Pluta R,Czuczwar S J.Ischemia-reperfusion programming of Alzheimer's disease-related genes-a new perspective on brain neurodegeneration after cardiac arrest[J].Int J Mol Sci,2024,25(2):1291.

[23] Lyu Y,Meng Z,Hu Y,et al.Mechanisms of mitophagy and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion,vascular dementia, and Alzheimer' s disease [J]. Front Mol Neurosci,2024(17):1394932.

[24] Das T K,Ganesh B P,Fatima-Shad K.Common signaling pathways involved in Alzheimer's disease and stroke:Two faces of the same coin[J].J Alzheimers Dis Rep,2023,7 (1):381-398.

[25] Eskandari S, Sajadimajd S, Alaei L, et al. Targeting common signaling pathways for the treatment of stroke and Alzheimer's: A comprehensive review[J].Neurotox Res, 2021,39(5):1589-1612.

[26] 张鼎,向军军,李方存,等.温阳复元方对脑缺血再灌注损伤大鼠的治疗机制[J].陕西中医,2023,44(3):279-284.

[27] 宋章波,张欢欢,雍文兴,等.黄芪有效成分防治肺癌的作用机制研究进展[J].中华中医药杂志,2025,40(1):326-330.

[28] 周高水,吴树宏,郑新卉,等.石菖蒲的临床应用与现代药理学研究[J].中医学,2024,13(10):2592-2599.

(收稿日期:2026-01-31)