

引用:黄铃格,赵红霞,冯敏,刘叶倩,陈蕾,刘检,王志琪,任卫琼.钩藤降压解郁方通过抑制p38 MAPK信号分子改善高血压并发抑郁症大鼠海马神经元损伤[J].中医药导报,2025,31(5):38-44.

钩藤降压解郁方通过抑制p38 MAPK信号分子改善高血压并发抑郁症大鼠海马神经元损伤^{*}

黄铃格¹,赵红霞²,冯 敏¹,刘叶倩¹,陈 蕾³,刘 检¹,王志琪⁴,任卫琼¹

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;

2.广州中医药大学第二临床医学院,广东 广州 510000;

3.重庆市万州食品药品检验所,重庆 404000;

4.湖南中医药大学药学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨钩藤降压解郁方(GTJYJYF)改善高血压并发抑郁症大鼠海马神经元损伤的作用机制。方法:将40只自发性高血压(SHR)大鼠按照体质量和尾动脉压随机分为模型组、阳性药组及中药低、中、高剂量组,每组8只,另取8只SD大鼠作为空白组。采用慢性应激联合孤养的方法复制高血压并发抑郁症大鼠模型。造模同时灌胃给药,中药低、中、高剂量组予不同剂量GTJYJYF(6.35、12.69、25.38 g/kg)灌胃,阳性药组灌胃临床等效剂量的苯磺酸左旋氨氯地平(0.45 mg/kg)与盐酸氟西汀(1.80 mg/kg),模型组和空白组予等体积蒸馏水灌胃,连续6周。用无创血压计测量尾动脉收缩压;通过Morris水迷宫、旷场实验检测大鼠抑郁行为;HE染色观察大鼠CA1区海马神经元的形态结构变化;透射电镜观察大鼠海马神经元突触的超微结构;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清炎性因子白介素-4(IL-4)、白介素-1β(IL-1β)的水平;RT-qPCR法检测大鼠海马p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)mRNA含量;Western blotting法检测大鼠海马p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠尾动脉收缩压升高($P<0.01$),穿过目标平台次数、目标象限停留时间、跨格次数及水平运动总路程均减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);模型组大鼠海马CA1区神经元数量减少,神经元排列紊乱,胞体皱缩深染,海马神经元突触小泡减少,突触间隙模糊;模型组大鼠血清IL-4水平降低,IL-1β水平升高($P<0.01$),p38 MAPK mRNA及p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠收缩压均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);阳性药组及中药高剂量组大鼠穿过原平台次数增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各给药组目标象限停留时间、跨格次数及水平运动总路程均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各给药组海马CA1区神经元数量增多,神经元排列有序,神经元损伤程度减轻;阳性药组及中药中、高剂量组海马神经元的突触小泡数量上升,突触前致密结构丰富,突触后膜厚度增大,海马神经元突触超微结构损伤程度减轻;各给药组大鼠血清IL-4含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-1β含量均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各给药组海马组织p38 MAPK mRNA含量及p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达均减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:GTJYJYF可能通过抑制p38 MAPK信号分子,调控血清炎性因子水平,改善海马神经元损伤。

[关键词] 高血压并发抑郁症;钩藤降压解郁方;海马神经元损伤;p38丝裂原活化蛋白激酶;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)05-0038-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.05.007

Gouteng Jiangya Jieyu Formula (钩藤降压解郁方) Improves Hippocampal Neuron Damage in Rats with Hypertension Complicated with Depression through p38 MAPK Signaling Molecules

HUANG Lingge¹, ZHAO Hongxia², FENG Min¹, LIU Yeqian¹, CHEN Lef², LIU Jian¹,
WANG Zhiqu⁴, REN Weiqiong¹

(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China;

2.The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510000, China; 3.Chongqing Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing 404000, China;

*基金项目:湖南省自然科学基金项目(2025JJ80071);湖南省中医药科研课题项目(A2023019,B2024043);湖南省卫生健康委员会科研计划课题项目(C202313056551,W20243136);湖南省“十四五”第二批中医药人才培养项目(湘中医药[2024]3号)

通信作者:任卫琼,女,主任药师,研究方向为中药防治心脑血管疾病

4.School of Pharmacy,Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China.)

[Abstract] Objective: To explore the effect and possible mechanism of Gouteng Jiangya Jieyu formula (GTJYJYF) on improving hippocampal neuron injury in rats with hypertension complicated with depression. Methods: Totally 40 spontaneously hypertensive rats (SHR) rats were randomly assigned into model group, positive medicine group, low dose Chinese medicine group, medium dose Chinese medicine group and high dose Chinese medicine group, and another 8 SD rats were taken as blank group. The method of chronic unpredictable mild stress combined with solitary raising was used to intervene SHR to replicate the model of hypertension complicated with depression. At the same time of modeling, low dose Chinese medicine group, medium dose Chinese medicine group and high dose Chinese medicine group were given different doses of GTJYJYF (6.35, 12.69 and 25.38 g/kg), and the positive drug group was given Levamlodipine Besylate (0.45 mg/kg) and Fluoxetine Hydrochloride (1.80 mg/kg). The model group and blank group received interventions using identical distilled water for 6 weeks. Tail artery systolic blood pressure was measured by non-invasive sphygmomanometer. The depression-like behavior of rats was evaluated by Morris water maze and open field test. HE staining was used to observe the morphological and structural changes in hippocampal neurons in the CA1 region of rats. Synapse ultrastructure in hippocampus neurons was observed under electron propagation microscopy. The levels of serum inflammatory factors interleukin-4 (IL-4) and IL-1 β in rats were detected by ELISA. The content of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) mRNA in hippocampus was detected by RT-qPCR. The expression of p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) in hippocampus was detected by Western blotting. Results: Compared with the blank group, the systolic blood pressure of the tail artery increased in model group ($P<0.01$), while the number of crossings through the target platform, the duration of stay in the target area, the number of crossings, and the total distance traveled decreased in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of neurons in hippocampal CA1 area decreased and the arrangement of residual neurons was disordered in model group. The synaptic vesicles of hippocampal neurons decreased, and the synaptic space was blurred in model group. Compared with the blank group, the level of serum inflammatory factor IL-4 decreased in model group, while the level of IL-1 β increased in model group ($P<0.01$). The expression of p38 MAPK mRNA and p38 MAPK, p-p38 MAPK protein increased in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to with the model group, the systolic blood pressure of the tail artery decreased in each dosing group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of rats crossing the target platform increased in positive medicine group and high dose Chinese medicine group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the duration of stay in the target area, the number of crossings, and the total traveled distance increased in each dosing group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of neurons in the hippocampal CA1 region increased in each dosing group, and the arrangement of neurons was orderly. The degree of ultrastructural damage was reduced in each dosing group. The synaptic vesicles increased in positive medicine group, medium dose Chinese medicine group and high dose Chinese medicine group, and presynaptic density increased. The postsynaptic membrane thickened and the damage degree of synaptic ultrastructure of hippocampal neurons was reduced in positive medicine group, medium dose Chinese medicine group and high dose Chinese medicine group. The levels of serum IL-4 increased in each dosing group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the levels of IL-1 β decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The content of p38 MAPK mRNA and levels of p38 MAPK and p-p38 MAPK protein in the hippocampus decreased in each dosing group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion: Gouteng Jiangya Jieyu formula may regulate the level of serum inflammatory factors and improve the damage of hippocampal neurons by inhibiting p38 MAPK signaling molecules.

[Keywords] hypertension complicated with depression; Gouteng Jiangya Jieyu formula; hippocampal neuron injury; p38 mitogen-activated protein kinase; rats

高血压被认为是全球最常见的慢性疾病之一,由于其对患者身体功能和情绪控制产生多方面影响,抑郁症在高血压患者中的患病率达26%~42%^[1]。高血压并发抑郁症(hypertension complicated with depression,HD)患者的死亡风险显著高于单独患有高血压或抑郁症的患者^[2]。研究表明神经炎症在HD的发生发展中起着重要作用^[3]。p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路是MAPK通路的分支之一,能直接介导神经胶质细胞内炎症因子释放,引发慢性中枢神经系统炎症反应^[4];其作为细胞外信号调节

应激蛋白,在学习和记忆的关键脑区集中表达,可被多种促炎和应激刺激所激活,对炎症的形成和发展具有调控作用^[5-6]。研究证实,抑制p38 MAPK信号轴,可抑制慢性应激诱导的抑郁模型大鼠海马区神经胶质细胞活化,通过降低白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、 γ 干扰素(interferon- γ ,IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)等促炎因子的水平,减少神经元凋亡,发挥神经保护的作用^[7]。p38 MAPK也是Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)的下游蛋白,TLR4通过激活p38 MAPK信号轴参与产生TNF- α 、IL-6等

炎症介质的释放^[8-9]。本课题组前期研究^[10]发现,钩藤降压解郁方(GTJYJYF)能缓解HD大鼠海马神经元的损伤,其机制与抑制TLR4/核因子κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)通路调控小胶质细胞的极化表型,抑制海马炎症反应有关。基于此,本研究以TLR4下游的p38 MAPK信号分子为切入点,探究该方是否能够通过抑制p38 MAPK信号分子,调节血清中炎性因子水平,从而发挥保护海马神经元损伤的作用。

1 材料

1.1 实验动物 SPF级自发性高血压(spontaneous hypertension, SHR)雄性大鼠40只,6周龄,体质量100~130 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物质量合格证号:No.110011231111652874。SPF级SD雄性大鼠8只,6周龄,体质量100~130 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2021-0002。动物质量合格证号:No.430727231103365536。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院医学创新中心实验动物中心SPF房,灯光12 h循环,温度(23±1)℃,湿度(60±5%),大鼠自由摄取食物与水,使用许可证号:SYXK(湘)2020-0010。本研究经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准,伦理批号:ZYFY20220615-43。

1.2 主要试剂 苏木精-伊红(HE)染色液(武汉皮诺飞生物科技有限公司,批号:S191003);大鼠IL-4酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:202406)、IL-1β ELISA试剂盒(批号:202406)均购自江苏菲亚生物有限公司;NovoStart SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix(江苏Novoprotein公司,批号:E099-01A);p38 MAPK抗体(批号:A5049)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)抗体(批号:AP0526)均购自武汉ABclonal公司;β-actin抗体(武汉Servicebio公司,批号:GB11001)。

1.3 主要仪器 智能无创血压计(北京软隆生物技术有限公司,型号:BP-98A);动物行为学分析系统(北京众实迪创科技发展有限责任公司,型号:LabMaze);酶标仪(美国Thermo Fisher公司,型号:MK-3);数字切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司,型号:Pannoramic SCAN II);透射电子显微镜(美国FEI公司,型号:Tecnai G2 F20 S-Twin);超灵敏化学发光成像系统(杭州申花科技有限公司,型号:SH-Focus523)。

1.4 药物 GTJYJYF由钩藤(批号:20231101,产地陕西)、天麻(批号:2023081801,产地安徽)、川芎(批号:20231204,产地四川)、地龙(批号:20231105,产地上海)、杜仲(批号:231211,产地湖南)、桑寄生(批号:231218,产地辽宁)、葛根(批号:2023120401,产地湖南)、丹参(批号:231218,产地山东)、白芍(批号:2023122601,产地安徽)、贯叶连翘(批号:230862,产地河北)按12:10:9:9:10:10:12:10:3比例组成,饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,经该院药学部左亚杰主任药师鉴定为正品。提取水煎剂时,按此剂量加倍按需提取,提取液蒸发浓缩为2.538 g/mL水煎液^[11],4 ℃冷藏备用。苯磺酸左旋氨氯地平片(吉林施慧达药业集团有限公司,2.5 mg/片,批号:211012)与盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,20 mg/粒),使用纯水制备成苯磺酸左氨氯地平片(0.041 mg/mL)、盐酸氟西汀胶囊(0.165 mg/mL)混悬液,置于4 ℃冰箱中保存。

1.5 动物分组、造模及给药 按随机数字法,根据体质量和尾动脉压将SHR大鼠分为模型组、阳性药组及中药低、中、高剂量组,每组8只,另设同等数量的SD大鼠作为空白组。根据本课题组前期基础^[12],采用慢性应激联合孤养复制HD大鼠模型,应激因素包括4 ℃冰水浴4 min、夹尾1 min、昼夜颠倒24 h、禁水24 h、禁食24 h、45°倾笼24 h、噪声1 h。连续造模6周。大鼠尾动脉收缩压>130 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),并在旷场实验中跨格次数和水平运动总路程减少,水迷宫实验穿越平台次数减少或强迫游泳实验不动次数增加等抑郁样行为的相关指标变化则提示造模成功^[12]。空白组大鼠正常群养。造模同时灌胃给药,中药低、中、高剂量组分别给予人临床等效剂量0.75、1.50、3.00倍的GTJYJYF(6.34、12.69、25.38 g/kg),阳性药组给予人临床等效剂量的苯磺酸左旋氨氯地平和盐酸氟西汀(0.45、1.80 mg/kg),以上均按照标准人体质量70 kg计算。空白组和模型组按体质量给予蒸馏水(10 mL/kg),1次/d,连续给药6周。

1.6 观察指标

1.6.1 大鼠尾动脉压检测 以序贯法灌胃给药,给药1 h后,将大鼠用鼠套固定并加温,将加压尾套调整到鼠尾合适的位置,采用BP-98A型智能无创血压计检测各组大鼠尾动脉压,取连续3次的平均值为当周血压。

1.6.2 大鼠抑郁样行为学检测 造模与给药共计42 d,在实验第39~43天进行Morris水迷宫实验。Morris水迷宫水池为直径180 cm圆柱形容器,内盛有自来水[(23±1)℃],分为A1、A2、A3、A4四个象限,将平台置于A1象限中。第39~42 d为定位航行训练期,按照A4、A3、A2、A1象限入水位顺序将大鼠放入水池,若120 s内未找到平台,则引导其找到平台,并让其停留15 s,该过程保持平台位置固定不变。在第43天进行空间探索实验,记录3 min内大鼠的穿过原平台次数及目标象限停留时间。

在实验第44天进行旷场实验。旷场箱的底部与周围环境为黑色,装置底部被划分为25个等面积的正方形区域,将中心的9个区域定义为中央区,摄像头安装在中央区的正上方。所有大鼠从旷场箱正中放入,适应1 min后,记录4 min内大鼠跨格次数及水平运动总路程。

1.6.3 HE染色观察海马神经元形态结构 水迷宫实验完成后,大鼠禁食不禁水12 h,采用1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,待大鼠完全麻醉后,从心尖处注入生理盐水,待流出液体基本无色时,换4%多聚甲醛进行灌注,待大鼠四肢明显僵硬时,取全脑组织,以4%多聚甲醛溶液固定,脑组织经包埋、切片、漂片、37 ℃烘片常规处理后,常温条件下,放入二甲苯I、二甲苯II内脱蜡,乙醇中复水后用HE染色,梯度酒精脱水,中性树脂封片,在光学显微镜下观察各组大鼠海马CA1区神经元形态结构。

1.6.4 透射电镜观察海马神经元突触超微结构 取大鼠海马组织约50 mg,投入电镜固定液4 ℃固定4 h,0.1 mol/L磷酸缓冲液PBS(pH值为7.4)漂洗3次后,放入1%锇酸固定液中室温固定2 h,0.1 mol/L的磷酸缓冲液漂洗3次,4 ℃条件下,乙醇梯度脱水,放入比例为1:1的不完全包埋液中,在室温条件下过夜,后放入完全包埋液中,将标本放置于60 ℃的温箱内,包埋48 h,用超薄切片机制作超薄切片(70 nm),醋酸铀、枸橼酸铅染色,透射电子显微镜观察海马神经元突触超微结构。

1.6.5 血清炎性因子IL-4、IL-1β水平 取各组大鼠血清,4 ℃

条件下,4 500 r/min离心10 min(离心半径10 cm),取上清液,参照内置说明书顺序,依次加样、孵育、洗涤、加入酶标抗体、显色,避光条件下终止反应,置于酶标仪检测各孔吸光度(OD值),计算各组大鼠血清中炎性因子IL-4、IL-1 β 含量。

1.6.6 RT-qPCR法检测mRNA表达 称取50 mg大鼠海马组织置于无RNase的离心管内,加入Trizol试剂提取总RNA。紫外分光光度计测定RNA浓度以及在260 nm和280 nm的吸光度,OD_{260/280}在1.8~2.0范围内时,认为其浓度和纯度合格。通过逆转录试剂盒合成cDNA,逆反应条件为50 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。SYBR Green法进行进行PCR反应。扩增反应条件为95 ℃预变性1 min,95 ℃变性20 s,60 ℃延伸1 min,40个循环。选择β-actin为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算p38 MAPK mRNA的相对表达量。(见表1)

表1 PCR引物序列

基因名称	引物序列	产物长度/bp	设计/合成公司
p38 MAPK	F:TGGACTCGATAAGAGGAT R:AAGGACTGCTATAAGGGT	109	长沙市雅尔生物科技有限公司
β-actin	F:CCCATCTATGAGGCTTACCC R:TTAACATGTCACGCACGATTTC	150	长沙市雅尔生物科技有限公司

1.6.7 Western blotting法检测蛋白表达 取各组大鼠海马组织,经裂解、离心后提取总蛋白,用Western blotting法检测p38 MAPK(1:10 000)、p-p38 MAPK(1:10 000)的蛋白表达水平;采用XPAGE蛋白预制胶电泳、转膜、封闭后分别加入兔多克隆抗体p38 MAPK(1:2 000)、p-p38 MAPK(1:10 000),常温摇床震荡1 h后4 ℃摇床孵育过夜;次日加入二抗(1:15 000),室温孵育1 h,加入超敏ECL显色液,在化学发光系统下显影。ImageJ软件处理系统分析p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白相对表达量。

1.7 统计学方法 通过SPSS 27.0软件进行处理,符合正态分布的计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD-t检验,方差不齐则采用Tamhane's T2检验;重复测量资料采用重Mauchly球形检验,若不成立则使用Greenhouse-Geisser校正,使用重复测量方差分析评估时间点对测量值的主效应,若主效应显著则进行事后比较,采用配对样本t检验和Bonferroni校正。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血压检测结果 重复测量方差分析结果显示,组别与时

间的交互作用差异有统计学意义($F=4.263, P<0.001$)。与空白组比较,模型组大鼠在1~6周的收缩压均明显上升($P<0.01$),提示高血压模型复制成功。与模型组相比,阳性药组及各中药组大鼠在1~6周的收缩压均有所下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示,GTJYJYF可有效降低HD大鼠的尾动脉收缩压。(见表2)

2.2 行为学检测结果 与空白组比较,模型组大鼠在水迷宫实验中穿过原平台次数及目标象限停留时间均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),在旷场实验中跨格次数、水平运动总路程均降低($P<0.01$),表明大鼠显示出抑郁样行为,提示HD大鼠模型复制成功。与模型组比较,阳性药组和中药高剂量组大鼠穿过原平台次数上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而中药低、中剂量组大鼠穿过原平台次数无明显差异($P>0.05$),阳性药组及各中药组大鼠目标象限停留时间、跨格次数及水平运动总路程均上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示GTJYJYF可有效改善HD大鼠抑郁样行为。(见图1~2)

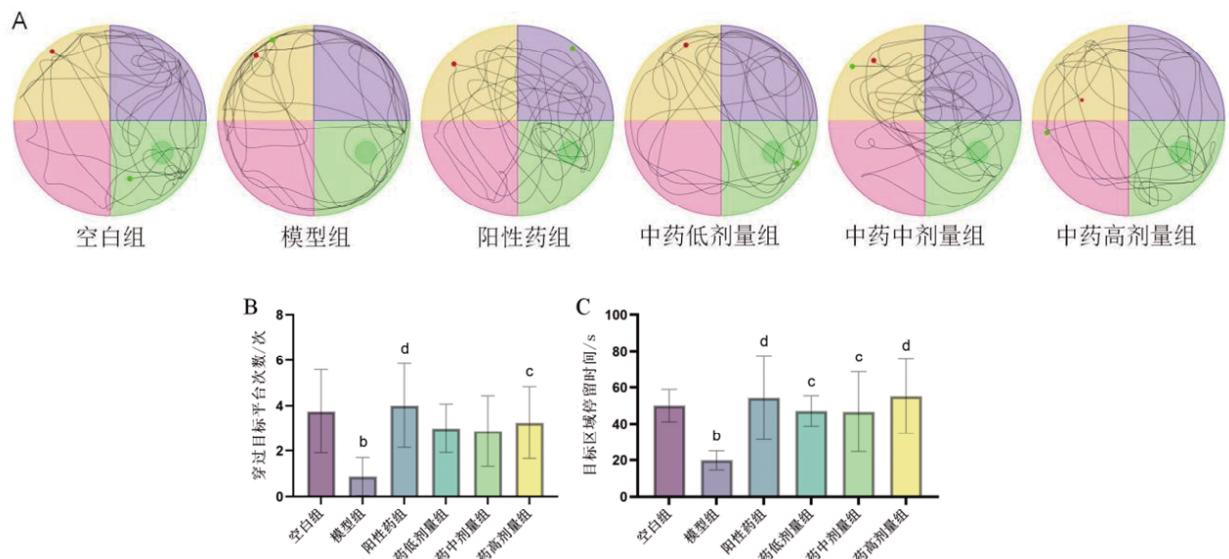
2.3 海马组织形态观察结果 空白组海马区的神经元数量丰富,排列整齐且有序,细胞形态规则,轮廓清晰,未观察到明显的变性现象。与空白组相比,模型组的海马结构出现严重的异常,神经元数量显著减少,残存的神经元排列紊乱,发生广泛变性,胞体出现皱缩和深染,形状不规则,同时细胞出现水肿和间隙增大的现象。与模型组比较,阳性药组损伤程度明显改善,海马神经元排列更加有序,仅有少量神经元变性;各剂量中药组细胞损伤情况均有所缓解,神经元数量增多,神经元排列有序,凋亡的细胞数量减少,其中中药高剂量组治疗效果最佳。提示GTJYJYF能有效修复HD大鼠海马神经元形态结构损伤。(见图3)

2.4 海马神经元突触超微结构观察结果 空白组结构较为致密紧凑,突触数量丰富,其突触前后的结构清晰可辨,轮廓完整无缺;突触前区域可以观察到大量的突触小泡,突触前后结构清晰,轮廓完整;突触前可观察到大量突触小泡,分布密集均匀,大部分为圆形清亮小泡。与空白组比较,在模型组大鼠海马神经元的结构呈现出疏松状态,突触间隙不够清晰,突触前膜与后膜的界限模糊,同时突触小泡的数量也有所减少,突触小泡破裂、部分融合,突触超微结构明显受损。与模型组比较,阳性药组突触结构较清晰,突触小泡数量增多,突触损伤减轻;中药中、高剂量组海马神经元的突触小泡数量上升,突触前致密结构丰富,突触后膜厚度增大,海马神经元突触超微结构损伤有不同程度的改善。提示GTJYJYF对HD大鼠海马神经元突触损伤具有改善作用。(见图4)

表2 各组大鼠收缩压比较 ($\bar{x}\pm s$, mm Hg)

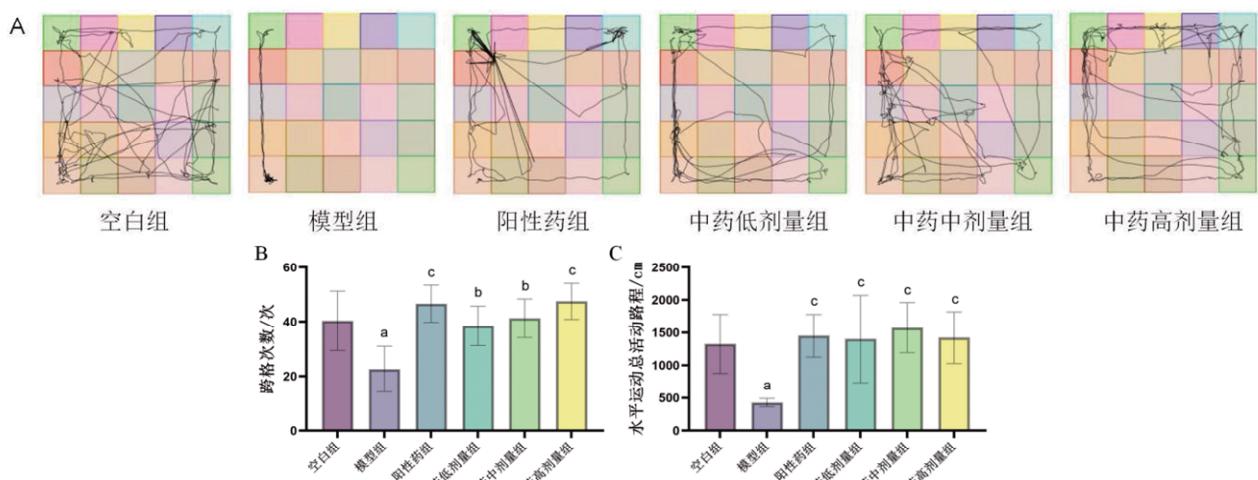
组别	n	0周	1周	2周	3周	4周	5周	6周
空白组	8	120.38±17.70	118.25±8.76	123.00±9.47	117.00±5.07	117.00±5.83	118.63±6.23	117.13±5.06
模型组	8	156.50±12.34 ^a	187.88±5.08 ^a	185.88±8.76 ^a	189.50±8.93 ^a	194.88±6.18 ^a	196.75±4.53 ^a	196.63±12.02 ^a
阳性药组	8	159.63±14.01 ^a	152.63±9.29 ^c	155.50±11.54 ^c	163.50±8.40 ^c	163.50±9.29 ^c	158.75±5.52 ^c	157.13±7.30 ^c
中药低剂量组	8	159.25±14.30 ^a	159.00±9.47 ^c	169.00±6.09 ^b	170.13±6.64 ^b	173.63±8.37 ^c	172.25±8.88 ^c	166.25±10.15 ^c
中药中剂量组	8	158.13±12.54 ^a	162.75±8.65 ^c	164.62±5.32 ^c	175.00±6.59 ^b	170.38±7.71 ^c	167.25±10.47 ^c	168.75±8.63 ^c
中药高剂量组	8	157.75±13.75 ^a	161.13±5.79 ^c	165.25±6.39 ^c	169.38±7.50 ^b	181.38±7.62 ^b	176.88±5.54 ^b	177.75±6.65 ^c
F		9.514	621.719	51.743	91.457	98.584	105.530	76.530
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: $F_{\text{交互效应}}=4.263, P<0.001$;与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。



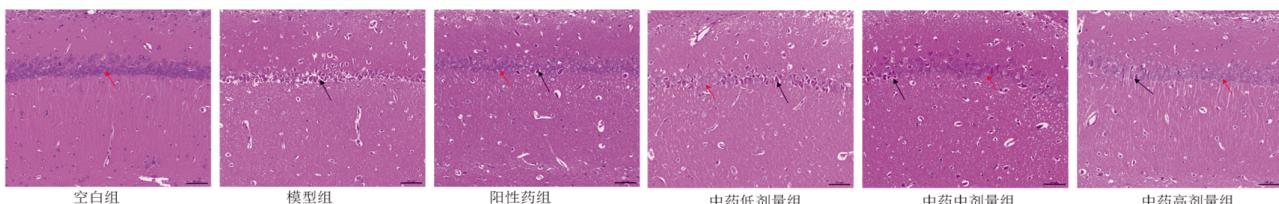
注:A.Moris水迷宫实验轨迹图;B.穿过原平台次数比较;C.目标象限停留时间比较。与空白组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与模型组比较,^cP<0.05,^dP<0.01。

图1 各组大鼠水迷宫实验中行为比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)



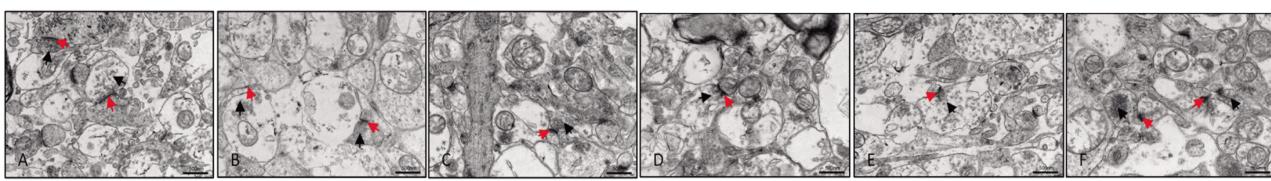
注:A.旷场实验大鼠行为轨迹图;B.跨格次数比较;C.水平运动总路程比较。与空白组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01。

图2 各组大鼠旷场实验中行为比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)



注:红色箭头指示正常形态的海马神经元,黑色箭头指示凋亡固缩的海马神经元。

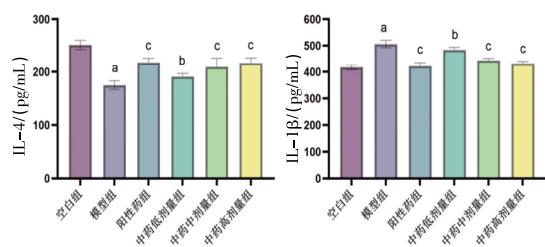
图3 各组大鼠海马组织CA1区形态结构变化 (HE染色, $\times 200$)



注:红色箭头指示突触间隙,黑色箭头指示突触小泡。

图4 各组大鼠海马神经元突触超微结构 (透射电镜, $\times 15000$)

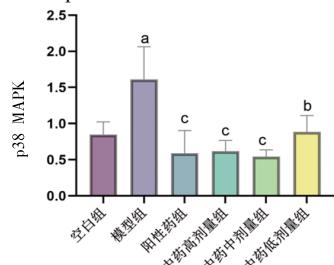
2.5 炎性因子的含量 与空白组比较,模型组大鼠血清中IL-4含量显著降低($P<0.01$),IL-1 β 含量明显升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组及各中药组大鼠血清中IL-4含量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-1 β 含量降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示GTJYJYF具有一定的抗炎作用,能改善HD模型大鼠炎症反应。(见图5)



注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠血清炎性因子水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

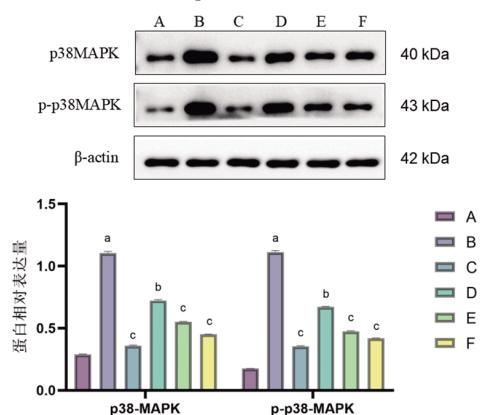
2.6 p38MAPK mRNA表达 与空白组比较,模型组p38 MAPK mRNA表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,阳性药组及各中药组大鼠p38 MAPK mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果表明GTJYJYF对p38 MAPK具有抑制作用。(见图6)



注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠p38 MAPK mRNA表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.7 p38 MAPK、p-p38 MAPK的蛋白表达 与空白组比较,模型组p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达水平均明显提高($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组及各中药组大鼠p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示GTJYJYF能抑制海马p38 MAPK信号分子激活。(见图7)



注:A.空白组;B.模型组;C.阳性药组;D.中药低剂量组;E.中药中剂量组;F.中药高剂量组。与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨论

HD属中医学“眩晕”合并“郁证”范畴,具有“虚、瘀、风、郁”的病机特点。针对该病机,本课题组在天麻钩藤饮基础上化裁而成的GTJYJYF,具有养阴平肝、化瘀解郁的功效^[13]。GTJYJYF中钩藤与天麻为君药,具有滋阴潜阳、平肝息风的功效;川芎活血祛瘀,行气通络,丹参活血化瘀,清心安神,地龙息风通络,葛根解肌退热,共同作为臣药;杜仲和桑寄生滋补肝肾,白芍可养阴柔肝,贯叶连翘则疏肝解郁,四者作为佐药。以上10味药合用,使阴虚得补,阳亢得平,眩晕得止,抑郁得除。研究证实,盐酸氟西汀可降低抑郁模型大鼠p38 MAPK的mRNA表达水平^[14]。苯磺酸左旋氨氯地平片和盐酸氟西汀胶囊联合使用,可抑制HD大鼠p38 MAPK的上游蛋白TLR4的表达,故本实验选用这两种药物联用作为阳性药^[10]。本研究结果显示,GTJYJYF可有效降低HD大鼠的尾动脉收缩压,改善其抑郁样行为,促进抗炎介质IL-4的生成,抑制促炎介质IL-1 β 的表达,有较强的抗炎效果。

认知功能障碍是抑郁症的特性症状^[14],学习记忆功能下降也是抑郁样行为认知功能损害的表现之一,HD患者的记忆能力的减退程度相较于单纯高血压患者更为显著^[10]。Morris水迷宫可评估HD大鼠空间学习和记忆能力^[15];旷场实验可评估HD大鼠在新异环境中的探索行为、自主活动以及焦虑水平^[16]。海马区是大脑处理记忆和情绪的关键区域,其结构和功能异常与抑郁样行为密切相关^[17]。在外部刺激影响下,突触超微结构会发生变化,表现为突触间隙宽度的改变、突触后致密厚度的调整及突触小泡数量的增减等方面,是神经可塑性的主要体现。本研究通过行为学实验结果显示,中药组大鼠目标象限停留时间、跨格次数、水平运动总路程均有所增加,中药高剂量组大鼠的穿过原平台次数增加,GTJYJYF可改善HD大鼠的抑郁样行为;通过结合海马CA1区病理学和海马神经元突触超微结构观察发现,中药组HD大鼠海马神经元数量增多,神经元排列有序,凋亡细胞数量有所减少,海马神经元突触小泡增多,突触前致密物增加,突触后膜增厚;该方对HD大鼠病理学变化有改善,能起到保护神经元和突触的作用。

炎症反应是高血压和抑郁症共病的关键因素之一^[18]。p38 MAPK是MAPK家族中调控炎症反应的关键成员,通过级联的方式活化,上游信号通过磷酸化过程逐级传达至下游的应答分子,从而发挥其生物学功能,p-p38 MAPK是其活化的核心指标^[19]。研究^[20]表明,炎症因子如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和过度激活的胶质细胞是促使p38 MAPK蛋白磷酸化的关键因素。p38 MAPK信号途径在细胞应激反应、细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡等方面起到介导作用,参与多种信号传递,在炎症反应和细胞凋亡等方面发挥着重要作用^[21-22]。IL-1 β 通过激活p38 MAPK途径下调脑源性神经营养因子(BDNF),抑制长时程增强(LTP),造成海马神经元突触可塑性损伤,进而导致神经元损伤^[23]。本研究结果显示,中药组HD大鼠血清抗炎因子IL-4含量均升高,促炎因子IL-1 β 含量均降低,p38 MAPK mRNA表达均降低,p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达均降低。

综上所述,GTJYJYF具有降低HD大鼠尾动脉收缩压,改善其抑郁样行为,及改善海马神经元损伤的效果。这可能与

其通过抑制p38 MAPK信号分子,提高抗炎因子IL-4含量,降低促炎因子IL-1 β 含量有关。

参考文献

- [1] WEN K Y, NIE Y X, LAI Y L, et al. A predictive model for depression risk in individuals with hypertension: Evidence from NHANES 2007–2020[J]. BMC Public Health, 2025, 25(1):98.
- [2] XU Z X, WU X Y, XIAO C F, et al. Observational and genetic analyses of the bidirectional relationship between depression and hypertension[J]. J Affect Disord, 2024, 348:62–69.
- [3] MENG L, BAI X X, ZHENG Y, et al. Altered expression of norepinephrine transporter participate in hypertension and depression through regulated TNF- α and IL-6[J]. Clin Exp Hypertens, 2020, 42(2):181–189.
- [4] BHAT N R, FEINSTEIN D L, SHEN Q, et al. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33):29584–29592.
- [5] FALCICCHIA C, TOZZI F, ARANCIO O, et al. Involvement of p38 MAPK in synaptic function and dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16):5624.
- [6] YONG H Y, KOH M S, MOON A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(12):1893–1905.
- [7] ZHAO Y X, SHANG P, WANG M J, et al. Neuroprotective effects of fluoxetine against chronic stress-induced neural inflammation and apoptosis: Involvement of the p38 activity[J]. Front Physiol, 2020, 11:351.
- [8] 方军,董庆永,刘志东,等.羟考酮通过TLR4/p38MAPK通路抑制小胶质细胞的活化缓解大鼠骨癌痛[J].中国免疫学杂志,2023,39(11):2355–2360.
- [9] 冯慧聪,高娜娜,宋小峰.小檗碱调控TLR4/p38MAPK通路促进脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复[J].锦州医科大学学报,2024,45(3):19–24.
- [10] 马丹凤,张传香,陈蕾,等.钩藤降压解郁方抑制TLR4/NF- κ B信号通路对高血压并发抑郁症大鼠海马小胶质细胞极化的影响[J].中药新药与临床药理,2024,35(2):174–182.
- [11] 赵红霞,刘叶倩,陈蕾,等.钩藤降压解郁方对高血压并发抑郁症大鼠学习记忆能力及海马自噬相关蛋白表达的
影响[J].中药新药与临床药理,2024,35(5):646–655.
- [12] 陈蕾,刘叶倩,赵红霞,等.钩藤降压解郁方对高血压并发抑郁症大鼠血压及抑郁样行为的改善作用[J].中成药,2023,45(6):1831–1838.
- [13] 陈春茗,刘叶倩,陈蕾,等.复方钩藤降压解郁方对高血压并发抑郁症大鼠的药效作用及物质基础[J].中医药导报,2022,28(7):11–19.
- [14] 李皓月.温阳益心法治疗冠心病抑郁症作用与机制实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.
- [15] 王文文,吴萌昕,赵林,等.细胞因子水平与抑郁临床症状及认知功能的研究进展[C]//榆林市医学会.全国医药研究论坛论文集,2023:425–429.
- [16] 郑利平,李雪,高伟,等.啮齿类实验动物学习记忆能力的行为学检测方法[J].辽宁中医杂志,2025,52(3):178–182.
- [17] 卢宇佳,张珊,赵谦,等.啮齿类动物抑郁相关行为学评价[J].实验动物学,2023,40(6):87–93.
- [18] LI W P, SU X H, HU N Y, et al. Astrocytes mediate cholinergic regulation of adult hippocampal neurogenesis and memory through M₁ muscarinic receptor[J]. Biol Psychiatry, 2022, 92(12):984–998.
- [19] 李敏,毕洪生,翟亮,等.海马及其神经环路在抑郁症发生机制中的研究进展[J].神经疾病与精神卫生,2024,24(12):890–895.
- [20] 王静,陈洁.高血压合并焦虑、抑郁患者血清炎症因子和单胺类递质水平的变化[J].中华高血压杂志,2023,31(8):769–772.
- [21] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update[J]. Physiol Rev, 2012, 92(2):689–737.
- [22] YU Y P, WANG M, YU X, et al. Targeting Forkhead box O1-aquaporin 5 axis mitigates neuropathic pain in a CCI rat model through inhibiting astrocytic and microglial activation[J]. Bioengineered, 2022, 13(4):8567–8580.
- [23] 郝志成,田旭升.p38MAPK信号通路在抑郁症中的作用研究进展[J].精神医学杂志,2023,36(5):534–538.
- [24] REZATABAR S, KARIMIAN A, RAMESHKNAI V, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9):14951–14965.
- [25] TONG L Q, PRIETO G A, KRAMAR E A, et al. Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Neurosci, 2012, 32 (49):17714–17724.

(收稿日期:2025-01-03 编辑:李海洋)