

引用:孙雄星,曾珊珊,吴玲应,林仕高,胡腾辉,王释亮,伍大华,谢乐.基于突触可塑性探讨养脑柔筋方对脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠运动功能障碍的影响[J].中医药导报,2025,31(8):17-23.

基于突触可塑性探讨养脑柔筋方对脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠运动功能障碍的影响*

孙雄星^{1,2},曾珊珊²,吴玲应^{1,2},林仕高^{1,2},胡腾辉^{1,2},王释亮²,伍大华²,谢乐²

(1.湖南中医药大学研究生院,湖南长沙 410208;

2.湖南省中西医结合医院/湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006)

[摘要] 目的:探讨养脑柔筋方对脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠梗死灶周围突触可塑性相关蛋白表达的影响。方法:将雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药组及中药组。采用线栓改良法建立大鼠永久性脑梗死模型,通过多通道电生理仪对各组大鼠进行H反射检测,第7、14、21、28天对各组大鼠进行改良神经功能缺损评分(mNSS)、转棒疲劳实验。末次给药后,采集脑组织样本进行HE染色及免疫荧光染色后分析评估大鼠梗死周围区域与突触可塑性相关的突触素(SYN)、突触后致密蛋白95(PSD-95)和突触后支架蛋白1(Homer1)的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠运动能力下降,mNSS评分升高,Hmax/Mmax比值增加,SYN、PSD-95、Homer1蛋白表达显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与模型组比较,中药组大鼠运动能力显著增加($P<0.01$),mNSS评分显著降低($P<0.01$)、Hmax/Mmax比值显著下降($P<0.05$),且SYN、PSD-95、Homer1蛋白表达均明显增加($P<0.001$)。结论:养脑柔筋方可能通过调控脑梗死后痉挛性瘫痪突触可塑性相关蛋白SYN、PSD-95、Homer1,从而改善大鼠的运动功能障碍。

[关键词] 脑梗死后痉挛性瘫痪;突触可塑性;养脑柔筋方;SYN;PSD-95;Homer1;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)08-0017-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.004

Effects of Yangnao Roujin Formula (养脑柔筋方) on Motor Dysfunction in Rats with Post-Stroke Spasticity: A Study Based on Synaptic Plasticity

SUN Xiongxing^{1,2}, ZENG Shanshan², WU linying^{1,2}, LIN Shigao^{1,2}, HU Tenghui^{1,2}

WANG Shiliang², WU Dahua², XIE Le²

(1. Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine/The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha Hunan 410006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Yangnao Roujin formula (YNRJF) on the expression of synaptic plasticity-related proteins in the peri-infarct region of rats with post-stroke spasticity (PSS). Methods: Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham surgery group, model group, positive control group (baclofen) and YNRJF group. A permanent cerebral infarction model was established using the modified thread-occlusion method. H-reflex testing was performed using a multi-channel electrophysiological system. Modified Neurological Severity Score (mNSS) and rotarod fatigue test were assessed on days 7, 14, 21, and 28. After the final administration, brain tissues were collected for hematoxylin-eosin (HE) staining and immunofluorescence to analyze the expression levels of synaptic plasticity-related proteins [synapsin (SYN), postsynaptic density-95 (PSD-95) and Homer1] in the peri-infarct region. Results: Compared with the sham group, the

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(8237153821);国家自然科学基金青年科学基金项目(82104831);湖南省科技创新计划项目(2023RC3215);湖南省自然科学基金面上项目(20241J5236)

通信作者:谢乐,男,副主任医师,研究方向为中医药防治脑病

model group exhibited reduced motor function, increased mNSS scores, elevated Hmax/Mmax ratio, and decreased expression of SYN, PSD-95, and Homer1 ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the model group, the YNRJF group showed improved motor function ($P<0.01$), reduced mNSS scores ($P<0.01$), decreased Hmax/Mmax ratio ($P<0.05$), and markedly increased expression of SYN, PSD-95 and Homer1 ($P<0.001$). Conclusion: YNRJF may ameliorate motor dysfunction in PSS rats by regulating synaptic plasticity-related proteins (SYN, PSD-95 and Homer1).

[Keywords] post-stroke spasticity; synaptic plasticity; Yangnao Roujin formula; SYN; PSD-95; Homer1; rat

脑梗死后痉挛性瘫痪(post-stroke spasticity, PSS)是脑卒中后常见的致残性并发症,常因牵张反射过度兴奋引起^[1],可导致患者运动控制能力下降、疼痛、痉挛及姿势异常,严重损害患者肢体功能及生活质量^[2]。脑卒中后2周内约25%的患者出现PSS,而12个月后发生率增至38%^[1],大约15%的中风后患者患有严重或致残性痉挛,常常给患者、家庭及社会带来沉重的负担。PSS的临床治疗以口服药物治疗(如口服巴氯芬、丹曲林等抗痉挛药物)、注射治疗(如肉毒杆菌毒素局部注射)及物理康复治疗等为主^[3]。目前西药治疗PSS主要通过调节中枢神经或外周肌肉功能缓解症状,虽有一定疗效,但存在加重运动功能障碍、肝损伤、全身肌无力及药物依赖等副作用和局限性^[4],而越来越多的研究表明,中药对改善PSS有潜在益处^[5]。为了探索养脑柔筋方改善PSS的可能机制,本研究采用线栓法构建脑梗死后痉挛性瘫痪的动物模型,并通过HE染色、免疫荧光染色分析梗死区域突触可塑性相关蛋白的表达水平,旨在为PSS的治疗提供新的治疗策略。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级雄性sprague dawley(SD)大鼠48只,体质量220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。大鼠生产许可证号:SCXK(湘)20210002,质量合格证号:ZS-202206140002。大鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心SPF级屏障系统内,室温(25±2)℃,湿度40%~50%,光照/黑暗循环12 h/12 h,自由进食和饮水,所有大鼠适应性喂养至少3 d,待体质量增长至280 g以上时进行下一步操作。所有动物护理和实验程序均经湖南中医药大学动物研究伦理委员会批准,伦理批件编号:LLBH-202203070003。

1.2 药物与试剂 突触素(dynaptophysin, SYN)抗体(批号:ab32127)、突触后致密蛋白95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)抗体(批号:ab18258)、突触后支架蛋白Homer1抗体(批号:ab211415)、山羊抗兔IgG抗体(批号:ab150077)、山羊抗兔IgG抗体(批号:ab150080)均购自英国Abcam公司;4%多聚甲醛(Biosharp公司,批号:B1539A);无水乙醇(批号:10009218)、二甲苯(批号:10023418)、柠檬酸钠(批号:39476466)均购自国药集团化学试剂有限公司;戊巴比妥(德国Merck KGaA公司,批号:2209116);巴氯芬片(福安药业集团宁波天衡制药有限公司,批号:240904001)。

1.3 主要仪器 大鼠线栓(北京西浓科技有限公司,AAAA级);大鼠转棒疲劳仪(型号:ZS-RDM-DS)、多道电生理仪(型号:MadLab-4C)均购自北京众实迪创科技发展有限公司;切片机(德国Leica公司,型号:Leica UC7);倒置显微镜(日本Olympus公司,型号:TH4-200)。

1.4 药物制备 养脑柔筋方由白芍30 g、桂枝10 g、制吴茱萸6 g、当归10 g、川芎10 g、党参15 g、酒萸肉10 g、络石藤30 g、鸡血藤30 g、建曲10 g组成。全方共161 g生药。所有中药饮片均购自湖南省中医药研究院附属医院,由吴劲松主任中药师鉴定为正品。取8倍总中药饮片体积的水浸泡30 min后,大火沸腾后改为小火煎煮40 min,纱网过滤,药渣加入没过药面1 cm的水煎煮20 min,纱网过滤,合并煎液蒸发浓缩成含生药量4.887 g/mL药液(高剂量),于4℃冷藏备用。

1.5 动物造模 雄性SD大鼠48只,体质量280~320 g。将大鼠随机分为4组:假手术组(12只)、模型组(12只)、阳性药组(巴氯芬片)(12只)、中药组(12只)。根据LONGA E Z等^[6]的研究,采用线栓法构建大鼠脑梗死模型,并根据Zea-Longa法进行模型的筛选和评分。首先,用1%戊巴比妥钠(0.04 g/kg)腹腔注射麻醉,并使其处于仰卧位固定。随后,进行皮肤准备和消毒,沿颈部中线切开,钝性分离皮下组织,暴露右侧颈动脉系统,包括颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA)。使用显微手术针和镊子仔细分离这些血管。接着,使用4-0缝合线在ECA起始处和CCA近心端进行结扎,而CCA远心端则用线悬挂。ICA暂时用血管夹夹闭。在距CCA分叉处5 mm的位置以45°角剪一小口,通过该切口插入特制的MCAO线栓至CCA内,轻轻系紧CCA远心端的悬挂线以防止出血,并移除ICA上的血管夹。继续将MCAO线栓缓慢推入ICA,直至线栓标记处到达CCA分叉处,随即停止推进。之后,将CCA远心端的悬挂线扎紧,并剪除血管外多余的线栓,对手术部位进行清洁和消毒,最后逐层缝合肌肉和皮肤。假手术组大鼠仅进行CCA、ICA和ECA的结扎,不进行线栓插入。

1.6 动物分组及给药 在模型复制过程中,大鼠意外死亡情况如下:模型组1只、阳性药组2只、中药组1只。造模大鼠苏醒后立即进行Zea-Longa评分,1~3分为造模成功。将造模成功的大鼠纳入后续实验。0分和4分表示造模失败,予以剔除。剔除的大鼠如下:模型组1只、中药组1只。最终用于实验的各组大鼠数量如下:假手术组(10只)、模型组(10只)、阳性药组(10只)、中药组(10只)。模型建立后第3天开始对各组进行药物治疗。药物剂量的换算基于徐叔云主编的《药理实验方法学》^[7],按照成人体质量60 kg的标准进行换算,养脑柔筋方的临床处方用量为161 g生药,换算成大鼠剂量为161 g/60 kg×60 kg×0.018/0.2 kg=14.49 g/kg。巴氯芬片用量=60 mg/60 kg×60 kg×0.018/0.2 kg=5.4 mg/kg。中药及巴氯芬片均按照大鼠体质量1 mL/100 g灌胃给药,假手术组和模型组接受等体积生理盐水灌胃处理,连续治疗28 d。通过多通道电生理仪对各组大鼠进行H反射检测评估大鼠的痉挛程度,第7、14、21、28天对各组大鼠

进行改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评估神经功能缺损程度,转棒疲劳实验测试大鼠的运动协调能力及肌肉耐力。末次给药后,采集脑组织样本进行HE染色观察脑组织病理变化,以及免疫荧光染色检测梗死灶周围突触可塑性相关SYN、PSD-95及Homer1蛋白的表达。

1.7 观察指标

1.7.1 mNSS评分评估大鼠的神经功能缺损程度 应用mNSS评分评估MCAO后第7、14、21、28天大鼠的神经行为,评价内容包括运动、感觉、平衡、反射实验等,总分为18分,评分越高提示神经功能缺损程度越严重。

1.7.2 H反射检测评估大鼠的痉挛程度 H反射作为一项神经电生理检测技术,能够客观反映中枢神经系统的功能状态,也是痉挛评定的可靠指标。脑血管病后数周到数月,H_{max}/M_{max}比值呈现上升趋势,与肌张力增加、腱反射亢进、病理征阳性等上运动神经元体征在时间上相关联。本研究,采用多通道电生理仪对各组大鼠进行H反射检测,以此作为评估痉挛程度的重要指标。

1.7.3 转棒疲劳实验测试大鼠的运动协调能力及肌肉耐力 运用大鼠转棒疲劳仪测试造模第7、14、21、28天后大鼠的运动协调能力及肌肉耐力。操作者手持大鼠身体,将前爪和后爪轻放于旋转棒上,背向杆旋转的方向。记录大鼠从登上旋转棒开始的时间,并在大鼠掉下来或完成满足条件的时间后停止计时。重复测量3次每个大鼠的时间来确定平均值,同时记录大鼠在棒上的速度。研究通过记录大鼠在棒上停留的时间(s)来比较其四肢的运动协调性及肌肉疲劳耐力。

1.7.4 HE染色观察脑组织病理变化 大鼠处死后迅速取脑组织,浸入4%多聚甲醛。固定后依次经70%、80%、95%、100%乙醇脱水。再放入二甲苯透明2~3次,15~30 min/次,随后在56~58℃融化石蜡中浸蜡2~3次,1~2 h/次。用切片机切成4~6 μm切片,贴在载玻片后,60℃烘烤1~2 h。先二甲苯脱蜡,再经梯度乙醇水化。接着,苏木精染细胞核5~10 min,自来水冲洗10~15 min,1%盐酸乙醇分化3~5 s,再冲洗返蓝。然后伊红染细胞质3~5 min,自来水冲洗。最后,经95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察脑组织病理变化。

1.7.5 免疫荧光染色法检测梗死灶周围突触可塑性相关SYN、PSD-95及Homer1蛋白的表达 大鼠处死后,将脑组织样本浸入4%多聚甲醛固定。接着进行常规脱水、透明、浸蜡与包埋,切片厚度4~6 μm。把切片置于60℃烘箱烘烤1~2 h,随后用二甲苯脱蜡3次,10~15 min/次,再用梯度乙醇清洗,每级5~8 min,完成水化。将切片放入pH6.0柠檬酸缓冲液,用500~700 W微波加热至沸腾,持续10~15 min进行抗原修复,冷却至室温后,用5%BSA-PBS溶液室温封闭30~60 min,封闭非特异性结合位点。倾去封闭液,直接滴加针对SYN(1:500)、PSD-95(1:500)及Homer1(1:500)蛋白的一抗,湿盒中4℃孵育过夜。次日用PBS洗3次,5~8 min/次,去除未结合一抗,滴加荧光二抗(1:200),室温避光孵育45~60 min,之后再用PBS洗3次。滴加DAPI染液室温避光孵育5~10 min标记细胞核,快速PBS冲洗后,用抗荧光淬灭封片剂封片,4℃冰箱避光保存。在

荧光显微镜下依荧光素波长选滤光片观察,用Image-Pro Plus 6.0软件分析荧光强度。

1.8 统计学方法 使用SPSS 25.0软件进行数据分析。计量资料用“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示。对于不同时间点的重复测量数据,采用重复测量方差分析(Repeated Measures ANOVA),评估时间主效应、分组主效应及交互效应;当违反球形假设(Mauchly's test, $P<0.05$)时采用Greenhouse-Geisser校正。若交互效应显著,进行简单效应分析(Bonferroni校正)。非重复测量的组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA):方差齐时用Dunnett's或Bonferroni's多重比较;方差不齐时用Tamhane's T2检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠mNSS评分比较 干预14 d后,各组大鼠mNSS评分均呈现下降趋势,其中中药组神经功能缺损程度低于模型组($P<0.01$)。进一步观察显示,干预28 d后,中药组mNSS评分进一步下降($P<0.01$),表明中药干预对脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠的长期神经功能恢复具有持续促进作用。(见表1、图1~2)

表1 各组大鼠不同时间点mNSS评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

| 组别 | n | 干预7 d后 | 干预14 d后 | 干预21 d后 | 干预28 d后 |
|------|----|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 模型组 | 10 | 10.67 ± 1.58 | 9.22 ± 0.66 | 8.33 ± 1.00 | 6.56 ± 1.01 |
| 阳性药组 | 10 | 11.00 ± 1.73 | 8.00 ± 0.71 | 7.21 ± 0.93 | 5.44 ± 0.53 |
| 中药组 | 10 | 10.78 ± 1.39 | 8.12 ± 1.05 ^a | 7.00 ± 1.00 ^a | 5.11 ± 0.78 ^b |

注: F 时间主效应=832.513, P 时间主效应=0.000; F 分组主效应=3 611.081, P 分组主效应=0.000; F 交互效应=102.532, P 交互效应=0.000;与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

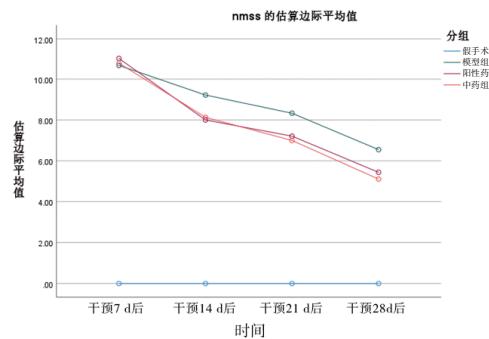


图1 各组大鼠不同时间点mNSS评分比较交互效应轮廓图

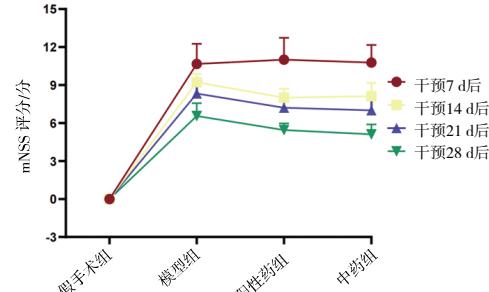


图2 各组大鼠不同时间点mNSS评分折线图

2.2 大鼠的运动协调能力及肌肉耐力 干预7 d后,与假手术组比较,模型组大鼠在转棒实验中的运动持续时间显著减少($P<0.001$),而中药干预可明显提升模型大鼠的运动表现($P<0.001$)。进一步分析显示,在连续干预14 d及28 d后,中药组大

鼠的停留时间仍呈持续性增长趋势。说明中药治疗能够有效改善脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠的长期运动功能,增强其肢体协调性及肌肉持久力。(见表2、图3~4)

表2 各组大鼠转棒实验跌落时间比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

| 组别 | n | 干预7 d后 | 干预14 d后 | 干预21 d后 | 干预28 d后 |
|------|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 假手术组 | 10 | 91.71 ± 18.78 | 92.21 ± 35.47 | 92.27 ± 15.91 | 83.67 ± 24.22 |
| 模型组 | 10 | 22.95 ± 11.55 ^a | 42.60 ± 19.53 ^a | 35.54 ± 14.53 ^a | 34.76 ± 19.31 ^a |
| 阳性药组 | 10 | 60.16 ± 10.26 | 79.95 ± 21.29 | 61.84 ± 18.93 | 65.06 ± 7.464 |
| 中药组 | 10 | 81.38 ± 21.28 ^c | 87.41 ± 22.03 ^c | 74.81 ± 26.08 ^b | 76.98 ± 19.65 ^b |

注: F 时间主效应=27.169, P 时间主效应=0.000; F 分组主效应=17.883, P 分组主效应=0.000; F 交互效应=6.816, P 交互效应=0.000; 与假手术组比较, ^a P <0.001; 与模型组比较, ^b P <0.01, ^c P <0.001。

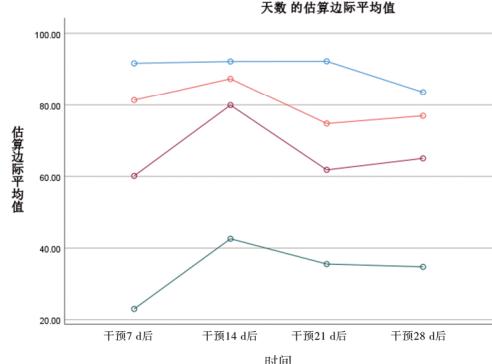


图3 各组大鼠转棒实验跌落时间比较交互效应轮廓图

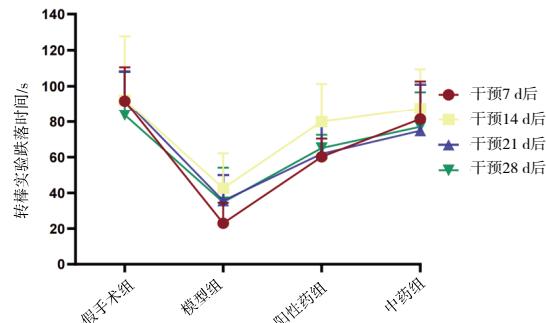


图4 各组大鼠不同时间点转棒实验跌落时间折线图

2.3 大鼠的痉挛程度 模型组Hmax/Mmax比值较假手术组显著升高(P <0.001),而中药干预后该比值较模型组明显降低(P <0.05)。进一步分析表明,中药可缓解脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠的异常痉挛状态。(见图5~6)

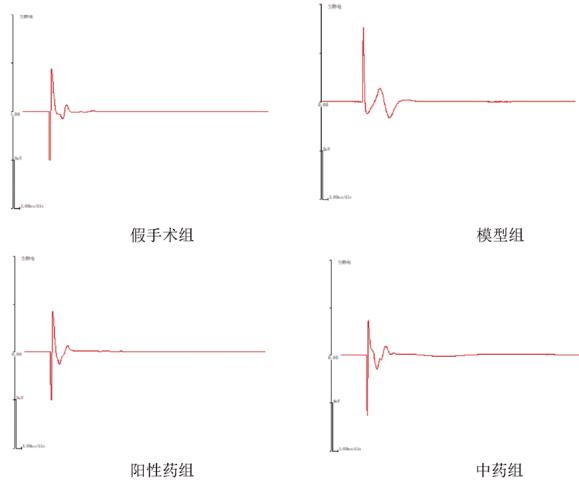
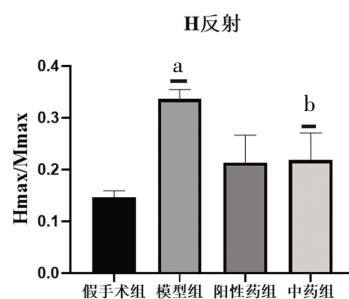


图5 各组大鼠H反射波形图



注:与假手术组比较, ^a P <0.001;与模型组比较, ^b P <0.05。

图6 各组大鼠Hmax/Mmax比值比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.4 脑组织病理变化 假手术组大鼠脑皮质区细胞形态完整,排列整齐,边缘清晰,细胞核与间质着色均匀。模型组大鼠脑皮质区细胞形态破坏,呈空泡样坏死,细胞间隙增大,染色变浅,残存细胞体积缩小,细胞核固缩、深染,细胞边界不清。各给药组脑组织病理形态均得到了不同程度的改善,坏死灶明显减少,细胞排列趋于整齐,其中中药组缺血侧脑组织结构改善更为明显,细胞排列更为整齐。(见图7)

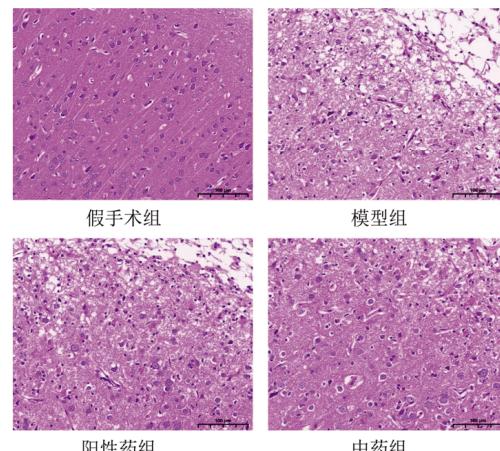


图7 各组大鼠梗死灶周围组织HE染色比较 ($\times 400$)

2.5 免疫荧光染色法检测梗死灶周围突触可塑性相关SYN、PSD-95及Homer1蛋白的表达

2.5.1 SYN免疫荧光染色 模型组大鼠SYN的平均阳性面积值明显低于假手术组(P <0.001),而中药组SYN的平均阳性面积明显高于模型组(P <0.001)。说明中药可提高突触可塑性相关蛋白SYN的表达,发挥神经保护作用。(见图8、表3)

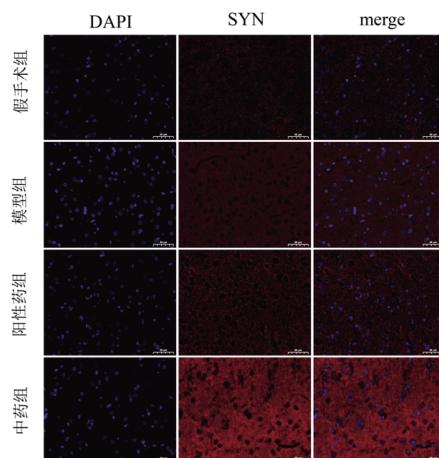


图8 各组大鼠梗死灶周围组织SYN免疫荧光染色图 ($\times 400$)

表3 各组大鼠SYN免疫荧光染色平均荧光密度比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 平均阳性面积 |
|------|----|--------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.469±0.041 |
| 模型组 | 10 | 0.309±0.022 ^a |
| 阳性药组 | 10 | 0.408±0.013 |
| 中药组 | 10 | 0.505±0.031 ^b |
| F | | 25.998 |
| P | | 0.001 |

注:与假手术组比较,^aP<0.001;与模型组比较,^bP<0.001。

2.5.2 PSD-95免疫荧光染色 模型组PSD-95的平均荧光强度明显低于假手术组($P<0.001$),而中药组PSD-95的平均荧光强度值明显高于模型组($P<0.001$)。说明中药可提高突触可塑性相关蛋白PSD-95的表达,发挥神经保护作用。(见图9、表4)

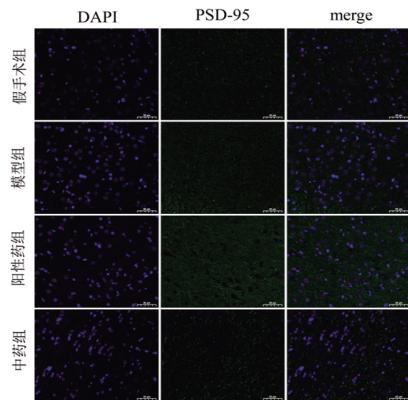


图9 各组大鼠梗死灶周围组织PSD-95免疫荧光染色图($\times 400$)

表4 各组大鼠PSD-95免疫荧光染色平均荧光密度比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 平均荧光强度 |
|------|----|--------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.661±0.008 |
| 模型组 | 10 | 0.515±0.008 ^a |
| 阳性药组 | 10 | 0.464±0.024 |
| 中药组 | 10 | 0.638±0.036 ^b |
| F | | 54.743 |
| P | | 0.000 |

注:与假手术组比较,^aP<0.001;与模型组比较,^bP<0.001。

2.5.3 Homer1免疫荧光染色 模型组Homer1的平均荧光强度明显低于假手术组($P<0.001$),而中药组Homer1的平均荧光强度值明显高于模型组($P<0.001$)。说明中药可提高突触可塑性相关蛋白Homer1的表达,发挥神经保护作用。(见图10、表5)

表5 各组大鼠Homer1免疫荧光染色平均荧光密度比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 平均荧光强度 |
|------|----|--------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.916±0.025 |
| 模型组 | 10 | 0.769±0.017 ^a |
| 阳性药组 | 10 | 0.873±0.033 |
| 中药组 | 10 | 0.952±0.054 ^b |
| F | | 15.117 |
| P | | 0.001 |

注:与假手术组比较,^aP<0.001;与模型组比较,^bP<0.001。

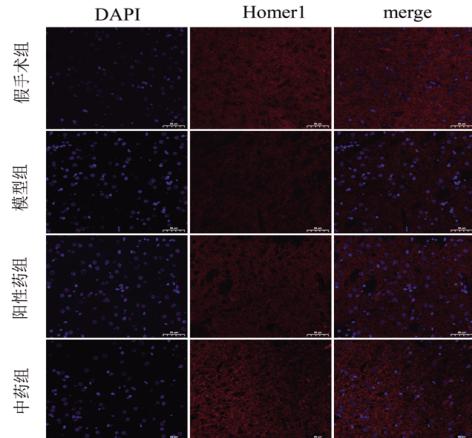


图10 各组大鼠梗死灶周围组织Homer1免疫荧光染色图($\times 400$)

3 讨论

中风是全世界残疾和死亡的第二大原因,我国卒中现患率高居世界首位⁹。脑梗死是脑卒中的主要类型,占比69.6%~72.8%^[9]。脑梗死后由于运动功能缺陷导致的活动减少,会引起肌肉控制协调丧失,最终造成肌肉萎缩或挛缩^[10]。PSS是脑梗死的常见并发症,脑梗死患者的发病率为30%~80%^[11]。PSS严重影响患者的生活质量,给患者及其家庭带来沉重负担。目前对于PSS的病理机制尚未明确,西医尚无治疗PSS安全有效的药物,因此研究PSS的发病机制并开展防治已迫在眉睫。

中医学认为PSS属于“中风”“筋病”范畴,其病位在肝与筋,其基本病机在于肝血亏损、络脉瘀阻、筋脉失养。其中肝血亏损为本,络脉瘀阻为标^[12-13]。课题组前期研究^[14]表明,“乙癸同源”理论强调肝肾同调以濡养筋脉,为PSS治疗提供了核心指导。基于历代文献分析,唐宋至明清医家善用白芍、当归等药物调和营卫、活血通络^[15-17]。现代临床则注重补肝血与化瘀通络并举,形成“柔肝温筋、活血通络”的治法框架^[18]。养脑柔筋方是在国医大师刘祖贻指导下拟定的治疗PSS的临床经验方,基于柔肝温肝、活血通络治则组方,在改善患者神经症状及运动功能障碍方面显示出显著临床疗效。方中白芍、桂枝为君药,白芍养血敛阴柔肝,以濡养肝筋;桂枝辛温,温煦筋脉。二者互相配伍,发挥柔筋温筋之功效。制吴茱萸温肝止痛,当归、川芎养肝血活血,党参益气健脾,酒萸肉温补肝肾,共为臣药。络石藤、鸡血藤通经活络,共为佐药。建曲调和诸药,健脾和中。诸药合用,共奏柔肝温肝、健脾益肾、活血通络之效。全方养血柔肝与温煦肝阳并用,凉温并用,散收结合。本研究结果表明,养脑柔筋方能够显著改善PSS大鼠的运动能力,降低神经缺损功能评分,缓解肢体痉挛程度,同时能提高脑梗死病灶周围与突触可塑性相关的SYN、PSD-95、Homer1蛋白水平。

突触可塑性在神经系统发育、学习记忆及损伤修复过程中发挥着关键作用。其中,SYN是突触囊泡膜的主要成分,为突触前终末的特异性标记物,可用来检测突触的密度和分布,也可检测突触的重建;PSD-95是谷氨酸能突触信号传导的中心,与神经发育障碍中的突触功能障碍有关,是突触强度的有效调节因子;Homer1是一种突触后密度支架蛋白.SYN、

PSD-95及Homer1蛋白表达的改变是引起神经元树突棘密度和形态变化的基础,对突触可塑性和神经功能有重要影响。

SYN作为突触囊泡膜的特异性标记物,其表达水平直接影响突触前终末的囊泡循环效率。KOKOTOS A C等^[19]研究发现,SYN通过维持突触囊泡中synaptobrevin-II的水平,保障神经递质的正常释放。PAN R H等^[20]研究证明,中药复方可通过上调SYN表达增强脑缺血后突触可塑性。本研究中,模型组大鼠梗死灶周围SYN阳性面积显著降低($P<0.001$),而养脑柔筋方干预后其表达显著回升($P<0.001$),提示该方可能通过修复突触前终末的囊泡功能,促进突触前终末的重塑,从而缓解PSS运动功能障碍。

PSD-95是谷氨酸能突触后信号传导的核心支架蛋白,其功能与突触强度和稳定性密切相关。DORE K等^[21]证实,PSD-95可通过保护突触免受 β -淀粉样蛋白毒性,维持突触完整性。此外,LIANG X S等^[22]发现,抑制N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA受体)过度激活可减轻突触损伤,而PSD-95的恢复可能协同调节谷氨酸能突触的平衡。AYUSO-DOLADO S等^[23]研究中,在缺血性兴奋性毒性条件下,PSD-95可被calpain蛋白酶异常切割,加剧突触后结构崩解,而靶向抑制PSD-95切割的干预策略能显著改善运动功能。PSD-95过表达可阻断不依赖离子流的长期抑制(LTD),提示其在突触可塑性形式调控中的新角色进一步研究需关注^[24]。同时,PSD-95在脑缺血后可通过促进钙调蛋白激酶II(CaMKII)磷酸化调控突触可塑性^[25]。本研究中,模型组PSD-95荧光强度显著降低($P<0.001$),而中药组干预后其表达明显恢复($P<0.001$)。这一结果提示,养脑柔筋方可能通过上调PSD-95的表达,稳定突触后NMDA受体簇,或通过抑制calpain活性和直接稳定PSD-95结构,减少其病理性降解,从而保护突触后信号整合能力。

Homer1作为突触后支架蛋白,不仅参与维持突触结构,还可通过抑制坏死性凋亡减轻神经元损伤。LV W H等^[26]研究表明,Homer1过表达可显著减少缺血后神经元坏死性凋亡和神经炎症,改善神经功能。本研究中,模型组Homer1表达显著降低($P<0.001$),而中药组干预后其表达恢复至接近正常水平($P<0.001$)。这一结果提示,养脑柔筋方可能通过上调Homer1,抑制坏死性凋亡通路,从而保护神经元和突触结构。此外,Homer1a(Homer1的剪接变体)被证实可通过抑制内质网应激相关PERK通路,减轻缺血再灌注损伤后的线粒体功能障碍^[27]。

本研究采用线栓法建立脑梗死后痉挛性瘫痪大鼠模型,并予以养脑柔筋方干预。结果表明,养脑柔筋方可显著上调梗死灶周围突触可塑性相关蛋白SYN、PSD-95及Homer1表达,改善大鼠运动功能并降低痉挛程度。研究结果为养脑柔筋方的潜在治疗价值提供了新的见解,并为其作为PSS潜在治疗策略的应用奠定了基础。然而,尽管本研究揭示了养脑柔筋方调控突触可塑性相关蛋白的作用,其具体作用通路仍需深入解析,同时应进一步分析养脑柔筋方的量-效关系。未来研究可结合基因编辑或信号通路抑制剂,明确养脑柔筋方中活性成分(如白芍苷、川芎嗪)对SYN、PSD-95及Homer1的上游调控网络;或通过蛋白质互作组学分析,揭示上述蛋白在

突触微环境中的协同作用。这些深入的机制研究,可以更全面地理解养脑柔筋方的治疗效果,并为将其开发成PSS治疗药物提供科学依据。

参考文献

- [1] BAVIKATTE G, SUBRAMANIAN G, ASHFORD S, et al. Early identification, intervention and management of post-stroke spasticity: Expert consensus recommendations[J]. J Cent Nerv Syst Dis, 2021, 13: 11795735211036576.
- [2] MORONE G, BARICICH A, PAOLUCCI S, et al. Long-term spasticity management in post-stroke patients: Issues and possible actions—a systematic review with an Italian expert opinion[J]. Healthcare, 2023, 11(6): 783.
- [3] SUPUTTITADA A, CHATROMYEN S, CHEN C P C, et al. Best practice guidelines for the management of patients with post-stroke spasticity: A modified scoping review[J]. Toxins, 2024, 16(2): 98.
- [4] KHAN F, AMATYA B, BENSMAIL D, et al. Non-pharmacological interventions for spasticity in adults: An overview of systematic reviews[J]. Ann Phys Rehabil Med, 2019, 62(4): 265–273.
- [5] CAI Y Y, ZHANG C S, LIU S N, et al. Add-on effects of Chinese herbal medicine for post-stroke spasticity: A systematic review and meta-analysis[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 734.
- [6] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84–91.
- [7] 徐叔云.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社, 2002.
- [8] Report on Stroke Center in China Writing Group.《中国卒中中心报告2022》概要[J].中国脑血管病杂志, 2024, 21(8): 565–576.
- [9] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 彭斌, 等.中国急性缺血性卒中诊治指南2023[J].中华神经科杂志, 2024, 57(6): 523–559.
- [10] GBD 2021 STROKE RISK FACTOR COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. Lancet Neurol, 2024, 23(10): 973–1003.
- [11] KUO C L, HU G C. Post-stroke spasticity: A review of epidemiology, pathophysiology, and treatments[J]. Int J Gerontol, 2018, 12(4): 280–284.
- [12] 谢乐, 伍大华, 曹思佳, 等.中风后痉挛性瘫痪病因病机及治法[J].中医学报, 2019, 34(9): 1850–1854.
- [13] 谢乐, 伍大华, 曹思佳.中风后痉挛性瘫痪病名病位源流探析[J].中医药导报, 2019, 25(15): 9–12.
- [14] 钟双玉, 李映辰, 伍大华, 等.伍大华教授基于“乙癸同源”

- 理论治疗中风后痉挛性瘫痪经验[J].时珍国医国药,2021,32(9):2282-2284.
- [15] 谢乐,伍大华,曹思佳,等.中风后痉挛性瘫痪历代文献用药规律分析[J].中医药导报,2021,27(1):163-166,170.
- [16] 谢乐,曹思佳,毛果,等.中风后痉挛性瘫痪明清时期文献用药规律分析[J].中国民族民间医药,2020,29(9):1-4.
- [17] 谢乐,曹思佳,伍大华,等.唐宋时期文献关于中风后痉挛性瘫痪的用药规律分析[J].亚太传统医药,2020,16(5):130-133.
- [18] 谢乐,曹思佳,伍大华,等.中风后痉挛性瘫痪现代文献用药规律分析[J].云南中医学院学报,2019,42(2):78-82.
- [19] KOKOTOS A C, HARPER C B, MARLAND J R K, et al. Synaptophysin sustains presynaptic performance by preserving vesicular synaptobrevin-II levels[J]. J Neurochem, 2019, 151(1):28-37.
- [20] PAN R H, CAI J, ZHAN L C, et al. Buyang Huanwu decoction facilitates neurorehabilitation through an improvement of synaptic plasticity in cerebral ischemic rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):173.
- [21] DORE K, CARRICO Z, ALFONSO S, et al. PSD-95 protects synapses from β -amyloid[J]. Cell Rep, 2021, 35(9):109194.
- [22] LIANG X S, SHI L R, WANG M, et al. Folic acid ameliorates synaptic impairment following cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting excessive activation of NMDA receptors[J]. J Nutr Biochem, 2023, 112:109209.
- [23] AYUSO-DOLADO S, ESTEBAN-ORTEGA G M, VIDAURRE O G, et al. A novel cell-penetrating peptide targeting calpain-cleavage of PSD-95 induced by excitotoxicity improves neurological outcome after stroke[J]. Theranostics, 2021, 11(14):6746-6765.
- [24] DORE K, MALINOW R. Elevated PSD-95 blocks ion-flux independent LTD: A potential new role for PSD-95 in synaptic plasticity[J]. Neuroscience, 2021, 456:43-49.
- [25] SONG B, YAN X B, ZHANG G Y. PSD-95 promotes CaMKII-catalyzed serine phosphorylation of the synaptic RAS-GTPase activating protein SynGAP after transient brain ischemia in rat hippocampus[J]. Brain Res, 2004, 1005(1-2):44-50.
- [26] LV W H, ZHANG Q Q, LI Y M, et al. Homer1 ameliorates ischemic stroke by inhibiting necroptosis-induced neuronal damage and neuroinflammation [J]. InflammRes, 2024, 73(1):131-144.
- [27] WEI J L, WU X Q, LUO P, et al. Homer1a attenuates endoplasmic reticulum stress-induced mitochondrial stress after ischemic reperfusion injury by inhibiting the PERK pathway[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13:101.

(收稿日期:2025-02-05 编辑:罗英姣)

- (上接第4页)揭牌[J].中医药管理杂志,2022,30(21):155.
- [11] 王昆,姜庆丹.中医药国际化发展的策略研究[J].中医药导报,2025,31(1):1-7.
- [12] 程蝶,胡珊,刘成,等.江西中医药文化对外传播路径研究[J].传媒论坛,2023,6(19):74-77.
- [13] 王乐鹏,李怡,王印螺,等.“情感共同体”传播路径加快中医药文化对外传播[J].中医药导报,2023,29(11):215-218,223.
- [14] 顾文俊.中医针灸推拿在毛里求斯深入人心[N].文汇报,2024-10-09(5).
- [15] 周阳乐.“他们是中国带给津巴布韦人民的礼物”[N].湖南日报,2024-09-07(6).
- [16] 邓凯尹,王欢.中医药助力巴基斯坦传统医药发展[N].经济参考报,2023-08-09(5).
- [17] 马骏.中奥中医药合作中心成立[N].中国中医药报,2007-09-17(1).
- [18] 王欣彤,蒋辰雪.“一带一路”倡议助推白俄罗斯中医药的新发展[J].世界中医药,2019,14(9):2533-2536.

- [19] 胡容容,张小凡,章德林.“一带一路”倡议下江苏海外中医药中心发展研究[J].中医药导报,2020,26(7):98-102.
- [20] 杜晓萍.“一带一路”倡议下瑞士中医药教育发展路径探析[J].现代职业教育,2018(25):146-147.
- [21] 邹东梅,孙迪,郭力铭,等.中医药服务贸易水平视阈下留学研究生思政教育“四位一体”实践与研究:以辽宁中医药大学与新加坡同济医药研究院合作项目为例[J].湖北开放职业学院学报,2023,36(21):83-85.
- [22] 邱崖.“一带一路”视域下中医药在东盟的传播研究:以福建省为例[J].中医药管理杂志,2022,30(3):1-3.
- [23] 左媛媛,孙永林,赵少钦,等.中医药海外中心在中医药文化国际传播中的创新与实践[J].南京中医药大学学报(社会科学版),2024,25(1):1-6.
- [24] 刘海舟,蔡莹莹,李涛安.澳大利亚和新西兰中医药立法的比较及启示[J].产业与科技论坛,2025,24(2):58-60.
- [25] 仇逸,龚雯,袁全.上海援摩医疗队探索更多援外新模式[N].经济参考报,2023-05-10(5).

(收稿日期:2025-02-10 编辑:时格格)