

基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路探讨同仁牛黄清心丸治疗轻度认知障碍大鼠作用机制

陈霞, 刘丹, 张思玉, 朱晓光, 李晋生, 王帅强, 徐意*, 杜莹洁*

北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079

摘要: 目的 基于 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 信号通路, 探讨同仁牛黄清心丸治疗轻度认知障碍 (MCI) 大鼠的作用及潜在机制。方法 采用 *D*-半乳糖联合亚硝酸钠 (NaNO₂) ip 构建 MCI 大鼠模型。将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、吡拉西坦组 (阳性药, 0.48 g·kg⁻¹) 及同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组 (2.4、1.2、0.6 g·kg⁻¹), 每组 10 只。除对照组 ip 等量 0.9% 氯化钠溶液外, 其余各组均每日 ip *D*-半乳糖 120 mg·kg⁻¹ 与 NaNO₂ 90 mg·kg⁻¹, 连续 40 d 完成造模。自造模第 11 天起, 各给药组 ig 给予对应药物, 连续干预 30 d; 对照组与模型组则 ig 等体积纯化水。药物干预结束后, 通过 Morris 水迷宫检测大鼠认知能力; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察大脑海马组织病理变化; 免疫组化法检测脑组织中 β-淀粉样蛋白 (Aβ) 表达; ELISA 法检测脑脊液中神经丝蛋白 (AD7c-NTP) 及脑组织中乙酰胆碱酯酶 (AChE)、乙酰胆碱转移酶 (ChAT)、丙二醛 (MDA) 水平; WST-1 法检测脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; Western blotting 法检测脑组织中 Keap1、Nrf2、NADPH 氧化还原酶 1 (NQO1)、血红素加氧酶 1 (HO-1)、过氧化物酶 6 (PRDX6) 和谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GSH-Px1) 蛋白表达。结果 与模型组相比, 同仁牛黄清心丸各剂量组大鼠在测试象限的游泳路径长度百分比显著提高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 低剂量组测试象限游泳时间百分比显著提高 ($P < 0.01$); 大脑皮质及海马区神经元减少、变性坏死等病理损伤明显改善; 脑脊液中 AD7c-NTP 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 脑组织中 Aβ 表达显著降低 ($P < 0.01$); 脑组织中 ChAT 含量显著升高、AChE 含量显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性显著升高、MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$); 中、低剂量组脑组织中 Keap1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 高、中剂量组 Nrf2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 各剂量组 NQO1、HO-1、GSH-Px1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 中、低剂量组 PRDX6 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 同仁牛黄清心丸可不同程度改善 MCI 大鼠认知功能, 发挥神经保护作用, 其核心机制可能在于调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路活化, 抑制氧化应激损伤。

关键词: 同仁牛黄清心丸; 轻度认知障碍; 氧化应激; Keap1/Nrf2/ARE 信号通路; 神经保护作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)10-2766-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.10.005

Exploring mechanism of Tongren Niu Huang Qingxin Pills in treating mild cognitive impairment in rats based on Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway

CHEN Xia, LIU Dan, ZHANG Siyu, ZHU Xiaoguang, LI Jinsheng, WANG Shuaiqiang, XU Yi, DU Yingjie

Science Research Institute of Beijing Tong Ren Tang Co., Ltd., Beijing 100079, China

Abstract: Objective To Explore the mechanism of Tongren Niu Huang Qingxin Pills in treating mild cognitive impairment based on the the Kelch-like epoxychloropropane-related protein 1 (Keap1)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway. **Methods** The MCI rat model was established by ip injection of *D*-galactose combined with sodium nitrite (NaNO₂). SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the piracetam group (positive drug, 0.48 g·kg⁻¹), and the high-, medium-, and low-dose groups of Tongren Niu Huang Qingxin Pills (2.4, 1.2, and 0.6 g·kg⁻¹), with 10 rats in each group. Except for the control group which was intraperitoneally injected with an equal volume of 0.9% sodium chloride solution, the other groups were intraperitoneally injected with 120 mg·kg⁻¹ *D*-galactose and 90 mg·kg⁻¹ NaNO₂ daily for 40 days to complete the

收稿日期: 2025-05-19

基金项目: 北京市中医药科技发展资金资助项目 (BJZYB-2023-51)

作者简介: 陈霞, 女, 硕士研究生, 研究员, 从事中药药理学研究。E-mail: jiumeionlyone@163.com

*通信作者: 徐意, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药新药开发与评价。E-mail: xy706@sina.com

杜莹洁, 女, 本科, 工程师, 从事中药药理学研究。E-mail: foliumflos@vip.163.com

modeling. From the 11th day of modeling, the drug administration groups were administered the corresponding drugs for 30 consecutive days; the control group and the model group were administered the same volume of purified water. After the drug intervention, the cognitive ability of the rats was detected by the Morris water maze; the pathological changes of the hippocampus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; the expression of β -amyloid protein ($A\beta$) in brain tissue was detected by immunohistochemistry; the levels of neurofilament protein (AD7c-NTP) in cerebrospinal fluid and acetylcholinesterase (AChE), choline acetyltransferase (ChAT), and malondialdehyde (MDA) in brain tissue were detected by ELISA; the activity of superoxide dismutase (SOD) in brain tissue was detected by the WST-1 method; and the protein expressions of Keap1, Nrf2, NADPH oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase 1 (HO-1), peroxiredoxin 6 (PRDX6), and glutathione peroxidase 1 (GSH-Px1) in brain tissue were detected by western blotting. **Results** Compared with the model group, the swimming path length percentage of rats in each dose group of Tongren Niu Huang Qingxin Pills in the test quadrant was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and the swimming time percentage in the test quadrant of the low-dose group was significantly increased ($P < 0.01$); the pathological damages such as reduction and degeneration of neurons in the cerebral cortex and hippocampus were significantly improved; the level of AD7c-NTP in cerebrospinal fluid was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the expression of $A\beta$ in brain tissue was significantly reduced ($P < 0.01$); the content of ChAT in brain tissue was significantly increased, and the content of AChE was significantly decreased ($P < 0.01$), the activity of SOD was significantly increased, and the content of MDA was significantly decreased ($P < 0.01$); the expression of Keap1 protein in brain tissue of the medium and low-dose groups was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of Nrf2 protein in the high and medium-dose groups was significantly increased ($P < 0.01$); the expression of NQO1, HO-1, and GSH-Px1 proteins was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$) in each dose group, and the expression of PRDX6 protein was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$) in the medium and low-dose groups. **Conclusion** Tongren Niu Huang Qingxin Pills can improve the cognitive function of MCI rats to varying degrees and exert neuroprotective effects. The underlying mechanism may lie in regulating the activation of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway, inhibiting oxidative stress damage.

Key words: Tongren Niu Huang Qingxin Pills; mild cognitive impairment; oxidative stress; Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway; neuroprotective effects

随着我国人口老龄化进程的加快,阿尔茨海默病的发病率呈快速增长趋势,已成为严重威胁老年人健康的公共卫生问题,同时也是导致老年人失能、生活依赖他人的主要原因之一^[1]。鉴于中晚期阿尔茨海默病治疗效果有限,其防治研究已逐步转向早期诊断与干预,这已成为应对社会人口老龄化挑战的重要需求。

轻度认知障碍(MCI)是介于正常衰老与痴呆之间的临床前过渡阶段,以轻度认知功能下降但未达到痴呆诊断标准为特征。目前美国国家老龄化研究所-阿尔茨海默病协会(NIA-AA)已将MCI明确界定为阿尔茨海默病的前驱阶段^[2]。因此,加强对阿尔茨海默病前驱症状(即MCI)的早期识别、诊断与干预研究,对延缓MCI向阿尔茨海默病的转化进程、降低阿尔茨海默病整体发生率具有重要的临床与社会意义。氧化应激是MCI发病的关键驱动因素^[3],在其疾病发生发展中发挥核心作用,因此针对MCI的抗氧化治疗策略也备受关注。已有研究证实, Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 信号通路是机体调节氧化应激的核心通路^[4-5],同时

也被广泛视为神经退行性疾病的潜在药物干预靶点^[6]。例如, Nrf2 基因敲除小鼠的神经元内氧化损伤标志物显著升高,线粒体功能异常受损,且伴随明显的认知功能障碍^[7];在 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病模型小鼠中, Nrf2/ARE 通路下游效应蛋白的表达水平也显著降低^[8]。这些研究均提示, Keap1/Nrf2/ARE 信号通路在认知功能障碍的发病过程中具有不可忽视的调控作用。

随着认知功能障碍病情进展, Nrf2 活性呈进行性下降趋势,这会导致小胶质细胞对氧化应激的敏感性显著增加,并通过激活核因子(NF)- κ B 信号通路诱导小胶质细胞向促炎表型极化。而促炎表型小胶质细胞会进一步释放神经毒性一氧化氮(NO)及促炎介质,加剧突触损伤、磷酸化 tau 蛋白异常聚集及神经元丢失;反之,在小胶质细胞中恢复 Nrf2 活性可有效抑制促炎表型小胶质细胞的激活,并显著阻断脑内 tau 蛋白的异常集聚^[9]。此外,激活 Nrf2 相关信号通路还可抑制活性氧(ROS)生成及丙二醛(MDA)积累,提升线粒体膜电位稳定性,并减少 β -淀粉样蛋白($A\beta$)沉积^[10]。因此,直接抑制 Keap1 与 Nrf2 的相互作用、激活 Nrf2 通路,可

有效抑制 A β 沉积及 tau 蛋白相关病理进程,改善突触功能,进而延缓甚至阻止 MCI 向阿尔茨海默病的转化,是潜在的 MCI 干预策略。

本课题组前期研究已证实,同仁牛黄清心丸可显著改善血管性 MCI 模型大鼠的学习记忆能力,减轻脑组织损伤,并能有效降低模型大鼠的氧化应激水平^[11-12]。然而,同仁牛黄清心丸对 MCI 的治疗作用是否通过调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路介导的氧化应激反应实现,目前尚不清楚。基于此,本研究采用 D-半乳糖联合亚硝酸钠诱导的 MCI 大鼠模型,探讨同仁牛黄清心丸是否通过调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路改善 MCI 大鼠的学习记忆能力,旨在为同仁牛黄清心丸的临床应用拓展及深入开发提供参考。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 180~210 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。生产许可证编号 SYXK(京)2022-0052。实验动物饲养于 SPF 级动物室内, 日光灯照明, 12 h 明暗周期, 自由饮水、饮食, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%。本实验经北京同仁堂研究院实验动物福利伦理委员会审批通过, 编号 YJY-2024-0729017。

1.2 药物与试剂

同仁牛黄清心丸(规格每丸 3 g, 批号 23010805), 北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂; 吡拉西坦片(规格每片 0.4 g, 批号 20230712), 华中药业股份有限公司。

D-半乳糖(批号 G0750), 美国 Sigma 公司; 亚硝酸钠(NaNO₂, 批号 C16353168), 山东科源生化有限公司; ADTC-NTP ELISA 检测试剂盒(货号 ml059112)、乙酰胆碱转移酶(ChAT) ELISA 检测试剂盒(批号 ml059346)、MDA ELISA 检测试剂盒(批号 ml077384), 上海酶联生物科技有限公司; 乙酰胆碱酯酶(AChE) ELISA 检测试剂盒(批号 Z01025441): 武汉华美生物工程有限公司; SOD 试剂盒(批号 20250228), 南京建成生物工程研究所; 多聚甲醛固定液(批号: 24101933), biosharp 公司; BCA 蛋白质定量试剂盒(批号 092822230414), 上海碧云天生物技术有限公司; RIPA 组织/细胞裂解液(批号 2024ZOF1053), 北京普利莱基因技术有限公司; 过氧化物酶 6 (PRDX6) 多克隆抗体(批号 00124126)、谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GSH-Px1)

多克隆抗体(批号 00123651)、NADPH 氧化还原酶 1 (NQO1) 单克隆抗体(批号 10041811), 武汉三鹰生物技术有限公司; 血红素加氧酶 1 (HO-1)(批号 43966s)、Nrf2(批号 33649s)、 β -actin 抗体(批号 4970s), 美国 Cell Signaling Technology 公司; Keap1 抗体(批号 XA283BP6860), 武汉博士德生物工程有限公司; IRDye 680RD Goat anti-Mouse 抗体(批号 D40227-05)、IRDye 680RD Goat anti-Rabbit 抗体(批号 D40109-05), 美国 LI-COR 公司。

1.3 仪器

Morris 水迷宫, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司; Epoch2 酶标仪, 美国 BioTek 公司; Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统, 美国 LICOR 公司; Bio-Rad 小型垂直电泳转印系统, 美国伯乐公司。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

实验动物适应性饲养后, 大鼠随机分为对照组、模型组、吡拉西坦(阳性药, 0.48 g·kg⁻¹)组、和同仁牛黄清心丸高、中、低剂量 [(2.4、1.2 (临床等效剂量)、0.6 g·kg⁻¹)] 组。参照文献方法^[8], 除对照组 ip 等量 0.9%氯化钠溶液外, 其余各组均每天 ip D-半乳糖 120 mg·kg⁻¹ 和 NaNO₂ 90 mg·kg⁻¹, 连续 40 d, 构建 MCI 大鼠模型。各给药组在造模第 11 天 ig 给予相应的药物, 共给药 30 d, 对照组和模型组给予等体积的纯化水。

2.2 行为学测试

ig 给药第 4 周进行 Morris 水迷宫实验。将注满 25 °C 温水的水迷宫水池均匀分为 4 个象限, 于第 1 象限正中放 1 个暗色平台, 使其低于水面 2 cm, 然后将大鼠面向第 4 象限池壁放入水中, 引导训练其尽量在 2 min 内找到平台停留 5 s, 连续训练 4 d 加深大鼠记忆, 在第 5 天撤去平台, 再次将大鼠面向第 4 象限池壁放入水中, 记录并分析其游泳轨迹, 得到 120 s 内大鼠穿越原平台的次数、测试象限内游泳路径长度百分比和停留时间百分比。

2.3 脑脊液中神经丝蛋白(AD7c-NTP)含量的测定

行为学测试结束后, 采用异氟烷吸入麻醉大鼠, 将头部固定于脑立体定位仪上, 剃除大鼠颈背部毛发, 用 1 mL 注射器从枕骨大孔直接抽取脑脊液, 离心取上清, ELISA 法检测脑脊液中 AD7c-NTP 含量。

2.4 脑组织病理学检查

取完脑脊液后, 迅速断头取脑, 冰上分离脑组

织, 右侧大鼠脑组织在 4%组织细胞固定液中固定后, 逐级酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋、切片(厚度 0.4 μm)。切片脱蜡、水化、HE 染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 拍照采集图像, 观察模型大鼠海马病理组织学变化。

2.5 免疫组化检测脑组织 A β 表达

大鼠脑组织常规切片脱蜡至水后进行抗原修复、用 BSA 封闭, 加入 A β 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 进行 DAB 显色、苏木素复染、中性树胶封固。在海马区选择 4 个不同的视野($\times 200$)进行拍照采集图像, 棕黄色为阳性表达, 采用 IPP 软件分析所选阳性区域的光密度值。

2.6 脑组织中胆碱能指标和氧化应激指标测定

左侧大鼠脑组织冻存于 -80°C 冰箱保存备用。测定前, 称适量脑组织, 按照 1:9 比例加入 0.9%氯化钠注射液制成匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, BCA 法进行蛋白浓度定量后, 按试剂盒说明书方法检测样本中 AChE (样本按 2 倍稀释, 标曲检测范围: 7.8~500.0 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、ChAT (样本未稀释, 标曲检测范围: 12.5~400.0 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、SOD (样本按 25 倍稀释, 标曲检测范围: 2~50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、MDA (样本未稀释, 标曲检测范围: 0.15~4.80 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 含量。

2.7 Western blotting 法检测脑组织中 Keap1、Nrf2、NQO1、HO-1、PRDX6、GSH-Px1 蛋白表达

取一部分脑组织用 RIPA 组织/细胞裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将各个样本蛋

白浓度调整一致。10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质的样品, 然后按电流 250 mA, 转膜 45 min, 将蛋白转移到 NC 膜上。脱脂牛奶室温封闭 30 min, 洗膜, 随后加入 Keap1 (1:1 000)、Nrf2 (1:500)、NQO1 (1:500)、HO-1 (1:100)、PRDX6 (1:2 000)、GSH-Px1 (1:3 000)、 β -actin (1:2 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后加入带荧光的二抗室温孵育 1 h, 洗膜, 运用 Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统分析图像, 检测时以 β -actin 为内参。

2.8 统计学方法

运用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据先进行方差齐性检验。方差齐选用 One-Way ANOVA 法进行各组间比较; 方差不齐选用 Kruskal-Wallis H 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 大鼠行为学测试结果

与对照组相比, 模型组大鼠在测试象限内游泳路径长度百分比和停留时间百分比以及穿越平台次数均明显降低 ($P < 0.05$); 模型组大鼠到达平台潜伏期有所延长, 但无显著性差异, 由此可见, 模型造成大鼠明显的记忆损伤。与模型组相比, 同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组大鼠在测试象限内游泳的路径长度百分比明显提高 ($P < 0.05, 0.01$); 同仁牛黄清心丸低剂量组大鼠在测试象限内游泳时间百分比明显提高 ($P < 0.01$), 由此可见, 同仁牛黄清心丸对 MCI 模型大鼠的记忆能力有明显的提高作用。结果见图 1。

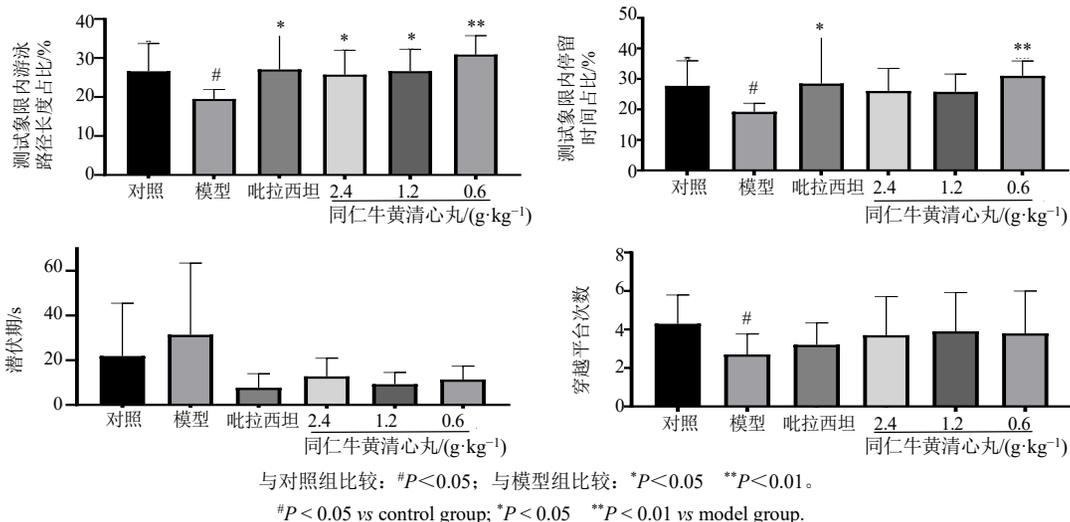


图 1 同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on behavior of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.2 对模型大鼠脑组织病理学改变的影响

与对照组比较,模型组大鼠皮质和海马组织神经元数目减少,细胞大小不一致、空间排列紊乱、部分神经元空泡样变性、白质轻度疏松。与模型组比较,同仁牛黄清心丸各剂量组可以明显缓解模型大鼠大

脑组织病理损伤,主要表现为大鼠大脑皮质及海马神经元减少情况较模型组明显改善;神经元变性、坏死减少程度及大脑皮层和海马组织结构与模型组相比均有改善。提示同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠脑组织损伤具有一定的保护作用。结果见图 2。

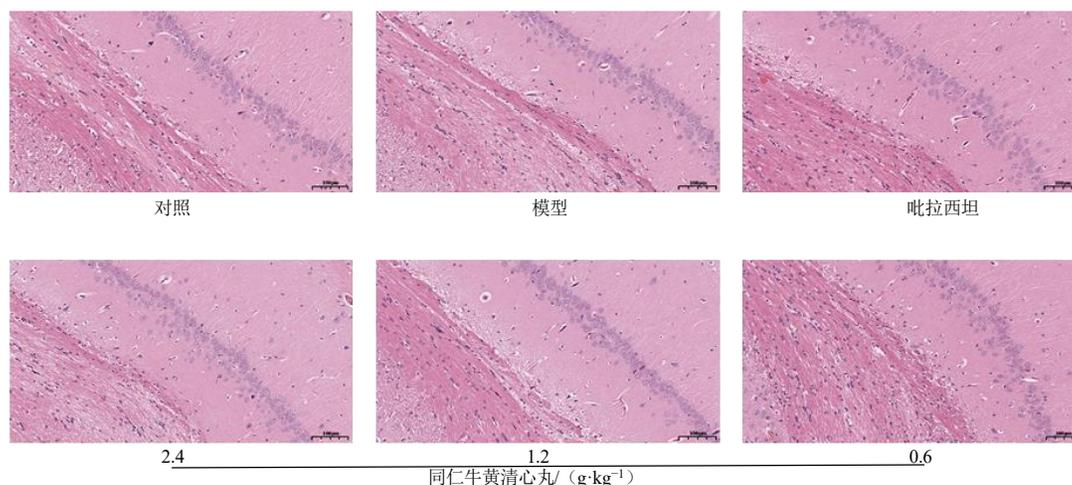


图 2 同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠脑组织海马区病理学形态的影响 (×200)

Fig. 2 Effects of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on pathological morphology of hippocampus in MCI rats (×200)

3.3 各组大鼠脑脊液 AD7c-NTP 含量的测定

与对照组相比,模型组大鼠脑脊液中 AD7c-NTP 表达水平明显升高 ($P < 0.01$),说明该模型大鼠存在神经元或突触功能退化。与模型组相比,同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组大鼠脑脊液中 AD7c-NTP 表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明同仁牛黄清心丸能改善 MCI 引起的神经元或突触功能退化。结果见图 3。

3.4 对 MCI 大鼠海马中 Aβ 表达水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠海马组织内存在大量 Aβ 免疫染色阳性反应产物,染色强度显著增大

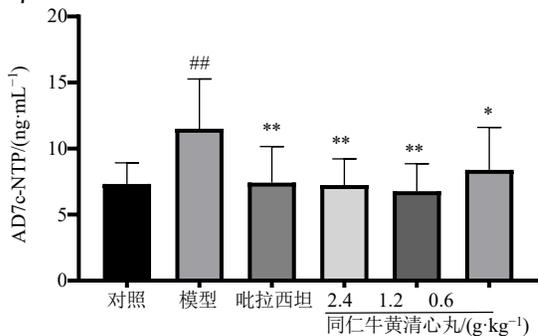
($P < 0.01$)。与模型组相比,同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组大鼠海马组织中 Aβ 免疫染色阳性染色强度明显降低 ($P < 0.01$)。说明同仁牛黄清心丸能抑制海马内 Aβ 的生成。结果见图 4。

3.5 各组大鼠脑组织中 ChAT、AChE 含量的测定

与对照组相比,模型组大鼠脑组织中 AChE 含量明显增加,ChAT 明显降低 ($P < 0.01$),说明模型大鼠脑中胆碱能功能受损。与模型组相比,同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组脑组织中 ChAT 含量明显增加 ($P < 0.01$),AChE 含量明显降低 ($P < 0.01$),说明同仁牛黄清心丸通过增加 ChAT,减少 AChE 含量从而改善模型大鼠脑中胆碱能功能,而发挥改善模型大鼠学习记忆能力损伤的作用。结果见图 5。

3.6 对模型大鼠脑组织中 SOD 活力和 MDA 含量的影响

与对照组相比,模型组大鼠脑组织中 SOD 活力明显降低、MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$),说明该模型大鼠脑组织中存在氧化和抗氧化失衡。与模型组比较,同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组大鼠脑组织中 SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$),MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$),说明同仁牛黄清心丸具有明显的抗氧化作用,能显著改善 MCI 的氧化损伤。结果见图 6。

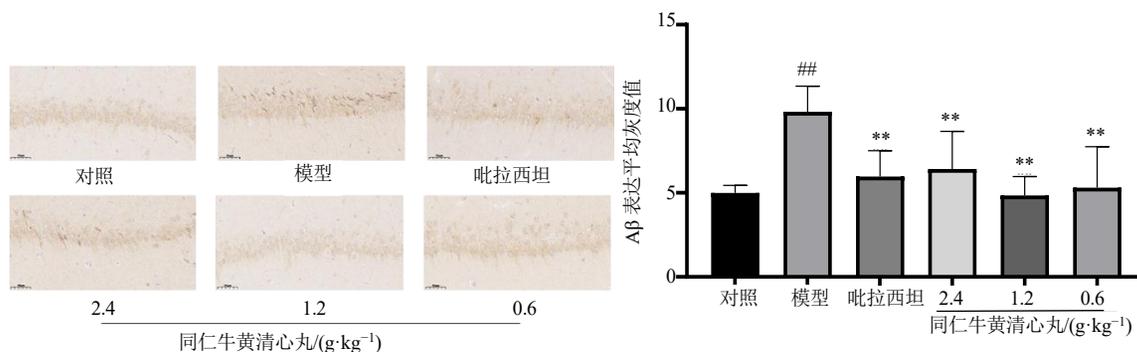


与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 3 MCI 大鼠脑脊液中 AD7c-NTP 含量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

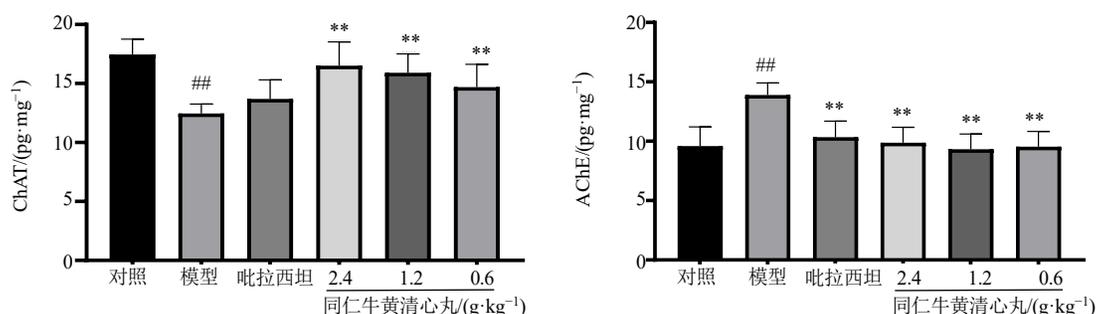
Fig. 3 Content of AD7c-NTP in cerebrospinal fluid of MCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 4 同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠海马组织中 Aβ 表达水平的影响 ($\times 200 \bar{x} \pm s, n=10$)

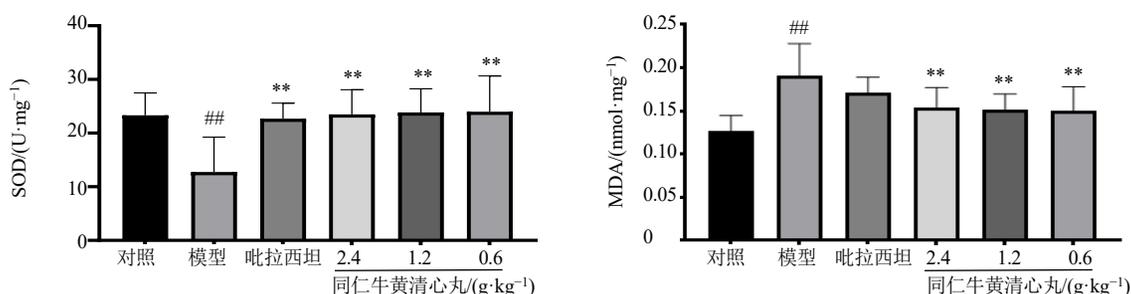
Fig. 4 Effects of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on expression level of Aβ in brain tissue of MCI rats ($\times 200 \bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 5 同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠脑组织中 ChAT 和 AChE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effects of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on content of ChAT and AChE in brain tissue of MCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 6 同仁牛黄清心丸对 MCI 大鼠脑组织中 SOD 活力和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effects of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on SOD activity and MDA content in brain tissue of MCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.7 Western blotting 法检测 MCI 大鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、NQO1、HO-1、PRDX6、GSH-Px1 的蛋白表达

与对照组相比,模型组大鼠脑组织中 Keap1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), Nrf2、NQO1、HO-

1、PRDX6、GSH-Px1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明模型大鼠脑组织中 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路被抑制, 促进氧化应激反应的发生。与模型组比较, 同仁牛黄清心丸中、低剂量组大鼠脑组织中 Keap1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 同

仁牛黄清心丸高、中剂量组大鼠脑组织中 Nrf2 表达明显升高 ($P < 0.01$); 同仁牛黄清心丸高、中、低剂量组大鼠脑组织中 NQO1、HO-1、GSH-Px1 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 同仁牛黄清心丸中、

低剂量组大鼠脑组织中 PRDX6 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 说明同仁牛黄清心丸可通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路, 抑制氧化应激反应而保护脑组织。见图 7。

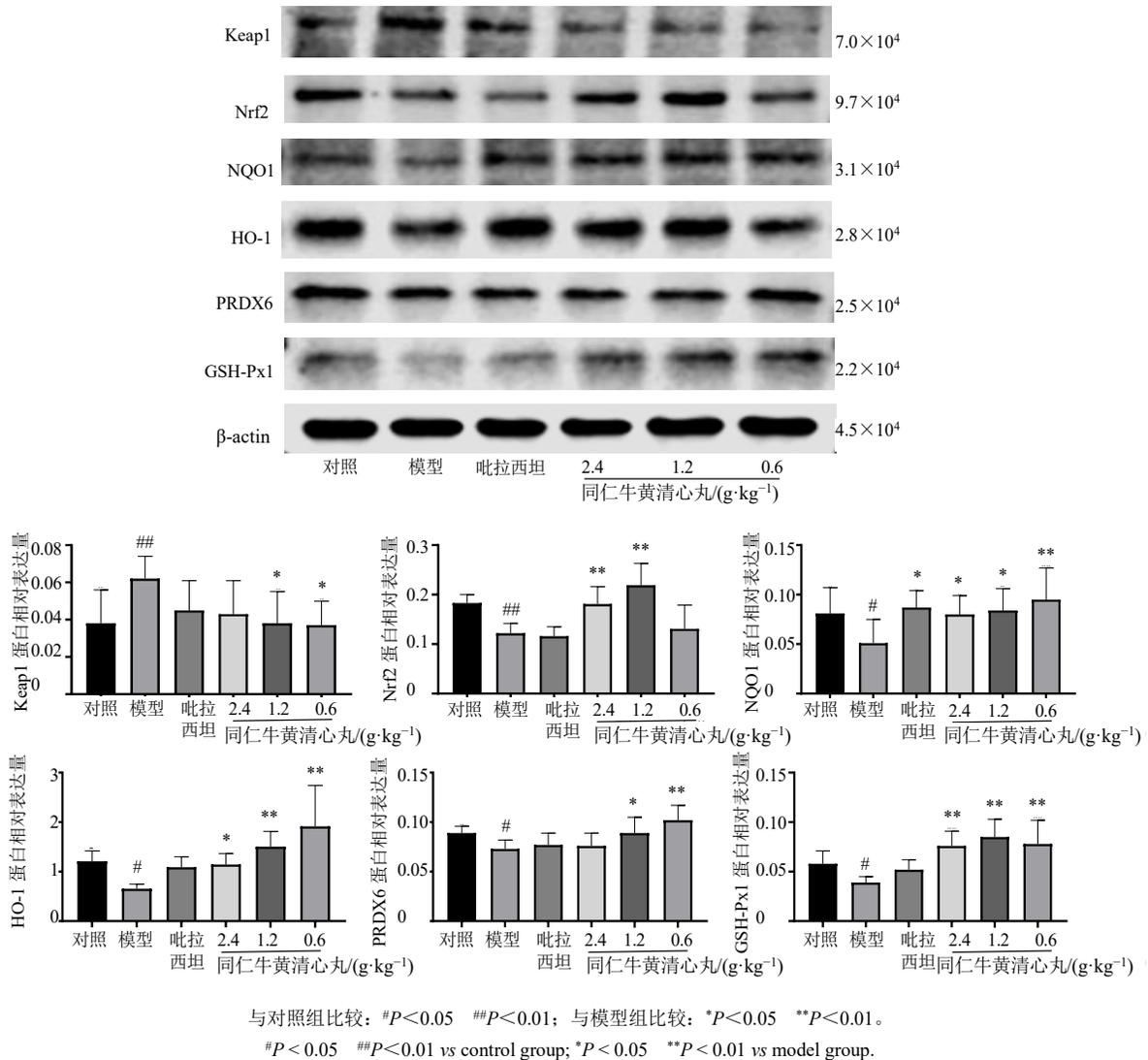


图 7 同仁牛黄清心丸对模型大鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、NQO1、HO-1、PRDX6、GSH-Px1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effect of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on protein expression levels of Keap1, Nrf2, NQO1, HO-1, PRDX6 and GSH-Px1 in brain tissue of model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

中医古籍中并无 MCI 这一现代病名, 但对类似认知减退症状的论述由来已久, 如“呆病”“健忘”“善忘”等。结合 MCI 以轻度认知功能下降为核心的临床表现, 多数医家将其归属于中医“健忘”“善忘”范畴^[13]。在病机认识上, 形成了“痰瘀致病”与“肾精脑髓”两大核心学说^[14]: 前者认为痰浊、瘀血阻滞脑络是发病关键, 后者强调肾精亏虚、脑

髓失养为根本病机。因此, 临床干预多围绕“补肾益心”“健脾填精”“化痰通脉”“补气活血”“滋补肾阴”等治则展开, 针对性改善 MCI 患者的病理状态^[15]。

基于中医对 MCI 的认知及治疗思路, 同仁牛黄清心丸作为经典方剂, 源自宋代《太平惠民和剂局方》^[16], 具有益气养血、镇静安神、化痰熄风之功效, 其组方精妙, 共含当归、川芎、甘草、山药、

黄芩、白芍、麦冬、白术（麸炒）、六神曲（麸炒）、蒲黄（炒）、大枣（去核）、阿胶、茯苓、人参、防风、干姜、柴胡、肉桂、白蒺、桔梗、大豆黄卷、苦杏仁（炒）、人工牛黄、人工麝香、水牛角浓缩粉、羚羊角、冰片 27 味药。从方解来看，山药专功健脾益胃、补中益气，人参、白术、茯苓、甘草（四君子汤核心）合干姜、大枣、六神曲共奏健脾祛湿、益气和中之效，为气血生化之源奠定基础；当归、川芎、白芍（四物汤要义）配麦冬、阿胶可养阴养血、活血化瘀，改善脑络失养；柴胡、防风祛风清热，大豆黄卷清热利湿，杏仁、桔梗、白蒺降气开郁，黄芩、蒲黄清泄邪热，共除体内郁滞之邪；肉桂以热制热、引火归元，平衡方中寒凉之性，人工牛黄清心安神、解热镇静、抗惊厥，羚羊角、水牛角浓缩粉平肝熄风、清热凉血，人工麝香与冰片合用则辛香走窜、通利诸窍，强化神志调摄作用。整体而言，该药“益气养血、化痰通脉、健脾和胃”的核心功效与中医治疗 MCI 的核心治则高度契合，且已有研究证实，其组方中人参（人参皂苷）、黄芩（黄芩素）、甘草（异甘草素）、六神曲（含青蒿素等）可激活 Keap1/Nrf2/ARE 通路发挥抗氧化作用，蒲黄、柴胡、白蒺、桔梗中的槲皮素也能激活该通路并实现神经保护作用^[10]，据此推测其治疗 MCI 的机制可能与调控该信号通路密切相关。

为进一步验证同仁牛黄清心丸的干预效果，需选择贴合 MCI 病理特征动物模型。氧化应激损伤是公认的 MCI 核心发病机制之一，大脑因高耗氧、抗氧化系统薄弱，易受过量活性氧（ROS）损伤，进而诱导神经元凋亡、引发学习记忆障碍；过量 D-半乳糖可诱导体内 ROS 异常蓄积，引发神经毒性与记忆缺陷，且注射后可模拟人类大脑衰老特征，如神经元变性、线粒体损伤等^[17-18]；NaNO₂ 作为氧化剂，可诱导高铁血红蛋白形成导致组织缺氧，进一步引发细胞内 Ca²⁺ 超载与自由基激增，加剧氧化应激^[19]。因此，D-半乳糖联合 NaNO₂ 建立的 MCI 模型可稳定呈现胆碱能系统损伤、氧化应激增强等病理特征，且造模简便、重复性高^[20]，本研究遂采用该方案构建 MCI 大鼠模型，以观察药物干预效果并探讨机制。

要明确同仁牛黄清心丸对 MCI 的干预机制，需先解析 MCI 相关病理指标与氧化应激的关联。AD7c-NTP 是神经轴突损伤的特异性标志物，神经元或轴突退行时会释放至脑脊液与血液，可作为认

知障碍进展的评估指标^[21]；A β 沉积是 MCI 病理的始发因素，其异常聚集会引发神经毒性损伤^[22]；乙酰胆碱（ACh）是调控学习记忆的关键神经递质，其合成依赖 ChAT、水解依赖 AChE，A β 可通过损伤胆碱能神经元导致 ChAT 活性下降、AChE 异常，最终引发 ACh 减少与认知障碍，且 A β 沉积与氧化应激间存在“相互促进”的恶性循环——A β 诱导氧化应激，氧化应激又加剧 A β 聚集与毒性^[23-24]。本研究通过 Morris 水迷宫实验证实，MCI 模型大鼠存在明显学习记忆损伤，同时伴随脑脊液 AD7c-NTP 升高、脑组织 A β 聚集增多、AChE 活性升高、ChAT 活性降低，以及 SOD 活性、MDA 含量异常；而给予同仁牛黄清心丸后，模型大鼠学习记忆能力显著改善，大脑皮质及海马区神经元损伤减轻，脑脊液 AD7c-NTP 水平下降，脑组织 A β 聚集受抑，ChAT 活性上调、AChE 活性下调，且 SOD 活性升高、MDA 含量降低，提示该药可通过多靶点干预延缓 MCI 进展，并通过抑制氧化应激实现神经保护。

从分子机制层面看，Keap1/Nrf2/ARE 通路是机体核心的抗氧化防御系统，也是维持细胞稳态的关键途径^[25]。静息状态下，Nrf2 被 Keap1 束缚于细胞质，无法激活；当遭遇氧化应激时，Keap1 对 Nrf2 的抑制减弱，Nrf2 转位至细胞核并结合 ARE，启动 HO-1、NQO1、GSH-Px1、Prxd6 等抗氧化酶与解毒酶的转录^[26-29]。本研究结果显示，同仁牛黄清心丸可促进 MCI 模型大鼠脑内 Keap1 与 Nrf2 的解离，激活 ARE 及下游 HO-1、NQO1、GSH-Px1、Prxd6 的表达，最终抑制氧化应激、减轻脑组织损伤。

本研究结果表明，同仁牛黄清心丸可改善 MCI 大鼠的认知功能，发挥确切的神经保护作用，其机制核心在于通过调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路活化，增强机体抗氧化能力、抑制氧化应激损伤，这一发现为该药的临床应用拓展与深入开发提供了重要理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 何晴, 王静, 周晓丽. 轻度认知障碍干预策略的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2025, 23(8): 38-41.
He Q, Wang J, Zhou X L. Research progress of intervention strategies for mild cognitive impairment [J]. Guide China Med, 2025, 23(8): 38-41.
- [2] Albert M S, DeKosky S T, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease:

- Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 270-279.
- [3] Al-Rawaf H A, Alghadir A H, Gabr S A. Molecular changes in circulating microRNAs expression and oxidative stress in adults with mild cognitive impairment: A biochemical and molecular study [J]. *Clin Interv Aging*, 2021, 16: 57-70.
- [4] 王剑, 韩书清, 周晓飞. Keap1/Nrf2/ARE 途径通过抗氧化对大鼠脑缺血再灌注神经元损伤的作用机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(12): 3038-3042.
- Wang J, Han S Q, Zhou X F. Mechanism of Keap1/Nrf2/ARE pathway on neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats through antioxidation [J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(12): 3038-3042.
- [5] 郭中华, 史栋梁, 曹玉举, 等. 柴胡皂苷 A 通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路对骨质疏松症大鼠发挥保护作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(22): 2500-2506.
- Guo Z H, Shi D L, Cao Y J, et al. Influences of saikosaponin A on oxidative stress injury in osteoporotic rats by activating Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, 43(22): 2500-2506.
- [6] 张晓莉, 董娇, 宁秋芬, 等. 番茄红素调节 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路对精神分裂大鼠认知障碍和氧化应激反应的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(11): 2437-2443.
- Zhang X L, Dong J, Ning Q F, et al. Effects of lycopene on cognitive impairment and oxidative stress response in schizophrenia rats by regulating Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Drugs Clin*, 2022, 37(11): 2437-2443.
- [7] 汤莉, 沈云龙, 彭德健, 等. 阿尔茨海默病中氧化应激相关信号通路及抗氧化治疗 [J/OL]. *生物化学与生物物理进展*, 2025: 1-15. (2025-07-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20250724.1854.004.html>.
- Tang L, Shen Y L, Peng D J, et al. Oxidative stress-related signaling pathways and antioxidant therapy in Alzheimer's disease [J/OL]. *Prog Biochem Biophys*, 2025: 1-15. (2025-07-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20250724.1854.004.html>.
- [8] 李珊珊, 陈忠云, 李婧, 等. Keap1/Nrf2/ARE 信号通路在中枢神经系统疾病中的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2014, 17(30): 3641-3644.
- Li S S, Chen Z Y, Li J, et al. Research progress on the role of Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in central nervous system diseases [J]. *Chin Gen Pract*, 2014, 17(30): 3641-3644.
- [9] Kang Y J, Hyeon S J, McQuade A, et al. Neurotoxic microglial activation via IFN γ -induced Nrf2 reduction exacerbating Alzheimer's disease [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(20): e2304357.
- [10] 孙兴华, 曲阳, 刘冬雪, 等. 中药天然产物调控 Nrf2 信号通路防治阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(12): 2924-2936.
- Sun X H, Qu Y, Liu D X, et al. Research advancement of natural products of traditional Chinese medicine in regulating Nrf2 signaling pathway for prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(12): 2924-2936.
- [11] 陈霞, 张思玉, 刘丹, 等. 同仁牛黄清心丸对血管性认知障碍大鼠学习记忆能力的影响及机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(15): 2078-2082, 2087.
- Chen X, Zhang S Y, Liu D, et al. Effects and Mechanism of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on learning and memory ability of rats with vascular cognitive impairment [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2024, 33(15): 2078-2082, 2087.
- [12] 陈霞, 徐意, 张思玉, 等. 同仁牛黄清心丸通过 NLRP3/Caspase1/IL-1 β 信号通路对血管性认知障碍模型大鼠脑组织保护作用的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(3): 537-542.
- Chen X, Xu Y, Zhang S Y, et al. Effect of Tongren Niu Huang Qingxin Pills on the brain tissue protective effect in vascular cognitive impairment model rats via the NLRP3/Caspase1/IL-1 β signal pathway [J]. *Drugs Clin*, 2025, 40(3): 537-542.
- [13] 朱士森, 张阳普. 中医治疗轻度认知障碍的临床研究进展 [J]. *中医研究*, 2024, 37(11): 88-92.
- Zhu S S, Zhang Y P. Clinical research progress of treating mild cognitive impairment with traditional Chinese medicine [J]. *Tradit Chin Med Res*, 2024, 37(11): 88-92.
- [14] 孙晴晴, 谢芳, 姚莉, 等. 轻度认知障碍的中医治疗研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2023, 46(3): 127-130.
- Sun Q Q, Xie F, Yao L, et al. Research progress in TCM treatment of mild cognitive impairment [J]. *J Shaanxi Univ Chin Med*, 2023, 46(3): 127-130.
- [15] 吕茹, 詹向红, 刘永. 轻度认知功能障碍的中西医研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2017, 7(3): 48-49.
- Lü R, Zhan X H, Liu Y. Research progress of mild cognitive impairment in traditional Chinese and western medicine [J]. *Acta Neuropharmacol*, 2017, 7(3): 48-49.
- [16] 岳春梅, 肖延龄, 龙晓华, 等. 同仁牛黄清心丸治疗痰热上扰型高血压性眩晕临床观察 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2024, 22(1): 76-79.

- Yue C M, Xiao Y L, Long X H, et al. Tongren Niu Huang Qingxin pills in treating hypertensive Vertigo of phlegm-heat invading upward type [J]. *Chin Med Mod Distance Educ China*, 2024, 22(1): 76-79.
- [17] Liu C C, Zhao N, Fu Y, et al. ApoE4 accelerates early seeding of amyloid pathology [J]. *Neuron*, 2017, 96(5): 1024-1032.e3.
- [18] Kloske C M, Wilcock D M. The important interface between apolipoprotein E and neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 754.
- [19] 魏玉婷, 朱田田, 苏明莉, 等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 846-856.
- Wei Y T, Zhu T T, Su M L, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2022, 30(6): 846-856.
- [20] 朱云峰. 固本健脑法对 MCI 大鼠学习记忆功能及海马 A β 表达的影响 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2010.
- Zhu Y F. Effect of Guben-Jiannao methods on learning-memory ability and A β expression in hippocampal formation of MCI rats [D]. Enshi: Hubei University for Nationalities, 2010.
- [21] 王静雯, 赵红东, 时建铨, 等. 神经丝蛋白轻链和磷酸化的神经丝蛋白重链作为肌萎缩侧索硬化生物标志物的研究进展 [J]. *临床神经病学杂志*, 2021, 34(4): 307-310.
- Wang J W, Zhao H D, Shi J Q, et al. Research progress of neurofilament light chain and phosphorylated neurofilament heavy chain as biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Clin Neurol*, 2021, 34(4): 307-310.
- [22] 李晓丹, 李珉珉. 阿尔茨海默病生物标志物 AD7c-NTP 的研究现状 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(20): 3056-3058.
- Li X D, Li M M. Research status of AD7c-NTP, a biomarker of Alzheimer's disease [J]. *Lab Med Clin*, 2021, 18(20): 3056-3058.
- [23] 朱才丰, 孙健健, 韩为, 等. 通督调神灸法抗轻度认知功能障碍大鼠海马 β -淀粉样蛋白过度表达的机制研究 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(2): 131-137.
- Zhu C F, Sun J J, Han W, et al. Effect of moxibustion on learning-memory ability and hippocampal amyloid β protein overexpression in mild cognitive impairment rats [J]. *Acupunct Res*, 2016, 41(2): 131-137.
- [24] 李泽, 尹芳, 杨苗, 等. 基于 CREB/Bcl-2 信号通路探究当归芍药散改善 A β 诱导的胆碱能神经元凋亡的作用机制 [J]. *中草药*, 2022, 53(8): 2376-2382.
- Li Z, Yin F, Yang M, et al. Mechanism of Danggui Shaoyao San on ameliorating A β -induced apoptosis of cholinergic neurons based on CREB/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(8): 2376-2382.
- [25] 潘馨苗, 李倩, 赵培均, 等. 白藜芦醇靶向调控 A β 蛋白改善认知功能障碍的研究进展 [J/OL]. *食品工业科技*, 2025: 1-16. (2025-07-31). <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2025040116>.
- Pan X M, Li Q, Zhao P J, et al. Research advances on resveratrol targeted modulation of A β protein in improving cognitive dysfunction [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*, 2025: 1-16. (2025-07-31). <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2025040116>.
- [26] Yang H, Tang C Y, Luo C, et al. Resveratrol attenuates the cytotoxicity induced by amyloid- β 1-42 in PC12 cells by upregulating heme oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(2): 297-305.
- [27] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [28] Deng C H, Cao J, Han J Q, et al. Liraglutide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects brain nerve cells against cerebral ischemia in diabetic rats [J]. *Comput Intell Neurosci*, 2018, 2018: 3094504.
- [29] 马晓轩, 刘毅, 蔡羽, 等. 基于 Keap1/Nrf2/HO-1 通路探讨虎杖苷对衰老小鼠学习认知障碍的作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(7): 1287-1295.
- Ma X X, Liu Y, Cai Y, et al. Exploration of mechanism of polydatin in learning and cognitive impairment in aging mice based on Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(7): 1287-1295.

[责任编辑 孙英杰]