

• 药理与临床 •

补阳还五汤通过小窝蛋白 1 调控 Shh 信号通路促进脑缺血后星形胶质细胞转分化

陈博威¹, 欧阳银², 曾繁佐², 刘英飞², 田丰铭², 徐雅倩¹, 易健¹, 刘柏炎^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006

摘要: 目的 基于小窝蛋白 1 (caveolin-1, Cav1) / 刺猬因子 (sonic hedgehog, Shh) 信号通路探讨补阳还五汤对脑缺血后星形胶质细胞转分化的作用机制。方法 雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组及补阳还五汤低、中、高剂量 (9.25、18.50、39.00 g/kg) 组和丁苯酞 (54 mg/kg) 组, 除假手术组外, 其余各组采用大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 法复制脑缺血模型, 给予药物干预 21 d 后, 采用神经行为学评分、苏木素-伊红染色及免疫组化评估补阳还五汤疗效。随后将雄性野生 (WT) 小鼠及 Cav1^{-/-} (KO) 小鼠分别随机分为假手术组、模型组和补阳还五汤 (18.5 g/kg) 组, 造模前 7 d 予以脑内注射 GFAP-EGFP 腺相关病毒, 采用 MCAO 法制备脑缺血模型, 给予药物干预 21 d。采用免疫荧光检测缺血侧皮质区星形胶质细胞转分化情况, Western blotting 法检测缺血侧皮质区 Shh、平滑同源物 (smoothed, Smo) 及神经胶质瘤关联癌基因同源物 1 (glioma associated oncogene homolog 1, Gli1) 的蛋白表达, qRT-PCR 法检测神经分化因子 acoete-scute 同系物 1 (achaete-scute complex homolog 1, Ascl1)、神经源性分化因子 1 (neurogenic differentiation 1, NeuroD1)、神经源性分化因子 2 (neurogenic differentiation 2, NeuroD2)、神经元素 1 (neurogenin-1, Ngn1)、神经元素 2 (neurogenin-2, Ngn2) 及配对盒基因 2 (paired box gene 2, Pax2) 的表达。结果 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组及丁苯酞组的神经行为学评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 缺血侧皮质区病理损伤明显改善, NeuN 表达明显上升 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 补阳还五汤低剂量组和补阳还五汤中剂量组的神经行为学评分及 NeuN 的表达有显著差异 ($P < 0.01$), 而补阳还五汤中、高剂量组及丁苯酞组之间无明显差异。与同基因型模型组比较, WT、KO 补阳还五汤组小鼠缺血侧皮质区 EGFP-NeuN 共定位明显增加 ($P < 0.01$), Shh、Smo 及 Gli1 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$ 、 0.01), 神经分化因子 Ascl1、NeuroD1、NeuroD2、Ngn1、Ngn2 及 Pax2 表达明显上升 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 WT 模型组及 WT 补阳还五汤组比较, KO 模型组及 KO 补阳还五汤组小鼠缺血侧皮质 EGFP-NeuN 共定位明显下降 ($P < 0.01$), Shh、Smo 及 Gli1 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), 神经分化因子 Ascl1、NeuroD1、NeuroD2、Ngn1、Ngn2 及 Pax2 表达明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 补阳还五汤能够促进脑缺血后星形胶质细胞向神经元转分化, 其作用机制可能与通过 Cav1 调控 Shh 信号通路, 上调各神经分化因子的表达有关。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血; 星形胶质细胞; 转分化; 小窝蛋白 1; Shh 信号通路; 黄芪甲苷 IV; 芒柄花素; 阿魏酸; 芍药内酯苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0811-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.012

Buyang Huanwu Decoction promotes astrocyte trans-differentiation after cerebral ischemia by regulating Shh signaling pathway via Caveolin-1

CHEN Bowei¹, OUYANG Yin², ZENG Fanzuo², LIU Yingfei², TIAN Fengming², XU Yaqian¹, YI Jian¹, LIU Baiyan^{1,2,3}

收稿日期: 2023-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074251); 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ30357); 湖南省研究生创新课题 (CX20220805, CX20220815)

作者简介: 陈博威 (1994—), 男, 医学博士, 医师, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病。Tel: (0731)88536925 E-mail: clewaychan@163.com

*通信作者: 刘柏炎 (1970—), 男, 医学博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病。

Tel: (0731)88536925 E-mail: liubaiyan@126.com

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese medicine, Changsha 410007, China
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: Objective To examine the mechanism of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤, BHD) on astrocyte trans-differentiation after cerebral ischemia based on caveolin-1 (Cav1)/sonic hedgehog (Shh) signaling pathway. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into sham group, model group, BHD low-, medium-, high-dose (9.25, 18.50, 39.00 g/kg) groups and butylphthalide (54 mg/kg) group. Except the sham group, the other groups were treated with middle cerebral artery occlusion (MCAO) to replicate the cerebral ischemia model. Following 21 d of drug intervention, the efficacy of BHD was evaluated using neurological behavior scoring, hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry. Subsequently, male wild type (WT) mice and *Cav1*^{-/-} (KO) mice were randomly divided into sham group, model group and BHD (18.5 g/kg) group. The brain was injected with GFAP-EGFP adeno-associated virus 7 d prior to the operation, and the MCAO method was employed to establish a model of cerebral ischemia. Drug intervention was administered for a duration of 21 d. Immunofluorescence was utilized to examine the trans-differentiation of astrocytes in the ischemic cortex, Western blotting was employed to assess the protein expressions of Shh, smooth homolog (Smo), and glioma associated oncogene homolog 1 (Gli1) in the ischemic cortex. The expression of nerve differentiation factors, including achaete-scute complex homolog 1 (*Ascl1*), neurogenic differentiation 1 (*NeuroD1*), neurogenic differentiation 2 (*NeuroD2*), neurogenin-1 (*Ngn1*), neurogenin-2 (*Ngn2*), and paired box gene 2 (*PAX2*) were detected using qRT-PCR. **Results** Compared with model group, the neurobehavioral scores were significantly decreased in BHD each dose group and butylphthalide group ($P < 0.05, 0.01$). Additionally, the pathological injury of the ischemic cortex showed significant improvement, and the expression of NeuN was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Furthermore, there were significant differences in neurobehavioral scores and NeuN expression between the low-dose group and medium-dose group of BHD ($P < 0.01$), while no significant differences were observed among the medium-, high-dose groups of BHD and butylphthalide groups. Compared with model group of the same genotype, the co-localization of EGFP-NeuN in the ischemic cortex of mice in WT and KO BHD groups were significantly increased ($P < 0.01$), the protein expressions of Shh, Smo and Gli1 were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and the expressions of neural differentiation factors *Ascl1*, *NeuroD1*, *NeuroD2*, *Ngn1*, *Ngn2* and *Pax2* were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with WT model group and WT BHD group, the co-localization of EGFP-NeuN in the ischemic cortex of the KO model group and KO BHD group exhibited a significant decrease ($P < 0.01$). Additionally, there was a significant decrease in the expressions of Shh, Smo, and Gli1 proteins ($P < 0.05$), while the expressions of neural differentiation factors *Ascl1*, *NeuroD1*, *NeuroD2*, *Ngn1*, *Ngn2* and *Pax2* showed a significant decrease ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** BHD has the potential to induce the trans-differentiation of astrocytes into neurons following cerebral ischemia. Its mechanism is likely associated with the regulation of the Shh signaling pathway through Cav1, as well as the upregulation of nerve differentiation factors.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; cerebral ischemia; astrocytes; trans-differentiation; Caveolin-1; Shh signaling pathway; astragaloside IV; mangostensin; ferulic acid; paeoniflorin

脑缺血是一种常见的中枢神经系统疾病，脑缺血患者在发病后经常出现肢体瘫痪、语言障碍等各类后遗症，严重影响了患者的生活质量^[1]。因此，寻找到能够减轻脑缺血损伤、促进脑缺血患者神经功能重建的有效药物或途径是目前医学领域的普遍关注点。星形胶质细胞是大脑中枢神经系统中分布最广泛、数量最多的胶质细胞类型，在清除有害物质、维持脑微环境稳态和保护病理性脑损伤等方面发挥着重要作用^[2-3]。最新的研究表明，星形胶质细胞能在转录因子、小分子化合物或外泌体等的诱导下，进行细胞重编程，从而转分化为神经元或神经母细胞，促进神经网络的重建，给脑缺血的治疗带来了

新希望^[4-6]。

补阳还五汤是治疗缺血性脑卒中的经典方剂，其疗效已得到循证医学的证实^[7]。课题组前期研究发现，补阳还五汤能够通过小窝蛋白1 (caveolin-1, Cav1) 调控线粒体质量控制^[8]、促进血管新生^[9]、影响 *N*⁶-甲基腺苷 (*N*⁶-methyladenosine, m⁶A) 修饰^[10]等途径发挥抗脑缺血损伤的作用，提示 Cav1 可能是补阳还五汤治疗脑缺血的潜在靶点。音猬因子 (sonic hedgehog, Shh) 信号通路是一条参与调控细胞的增殖分化以及神经发育的重要通路，近期研究表明 Shh 信号通路在星形胶质细胞转分化的过程中可能具有重要的调控作用^[11]。然而，Cav1 调控 Shh

信号通路对脑缺血后星形胶质细胞转分化的影响还未见报道。本研究严格参照国际公认的民族药理学研究共识^[12-13]，首先采用多剂量干预的方式探寻补阳还五汤治疗脑缺血小鼠的理想剂量。随后以 *Cav1* 基因敲除 (*Cav1*^{-/-}) 小鼠为研究对象，并借助腺相关病毒脑内注射标记原位星形胶质细胞，观察补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-} 小鼠脑缺血后 Shh 信号通路及星形胶质细胞转分化的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只，6~8 周龄，体质量 23~28 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004，动物合格证号 2023000268。*Cav1*^{-/-} (KO) 小鼠与同源野生型 (WT) C57BL/6 小鼠各 40 只，6~8 周龄，体质量 23~28 g。*Cav1*^{-/-} 小鼠引种自江苏集萃药康生物科技股份有限公司，动物合格证号 202111473，由课题组长期饲养在湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房，小鼠子代经 PCR 鉴定为 KO 小鼠与同源 WT 小鼠后纳入实验^[14]。本动物实验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 (批准号 ZYFY20201215-1)。

1.2 药材

黄芪饮片 (批号 CK20122902)、赤芍饮片 (批号 NG20112502)、川芎饮片 (批号 20091001120)、桃仁饮片 (批号 2020050402)、当归饮片 (批号 TH20122201)、地龙饮片 (批号 2020090902) 及红花饮片 (批号 2020062001) 购自湖南中医药大学第一附属医院。以上中药饮片经湖南中医药大学第一附属医院龙红萍副研究员分别鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus mongholicus* Bunge 的干燥根、毛茛科植物川赤芍 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的干燥根、蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、钜蚓科环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的动物全体及菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

1.3 药品与试剂

HBAAV9-GFAP-EGFP 腺相关病毒由上海汉恒生物定制；丁苯酞软胶囊 (0.1 g/粒，批号 H20050299) 购自石家庄恩必普药业有限公司；动脉栓线 (货号 2432A2) 购自北京西浓科技有限公司；

RNA wait 非冻型组织保存液 (批号 20220417) 购自大连美仑生物技术有限公司；Shh 兔抗 (批号 D-B1-07G07A)、平滑同源物 (smoothered, Smo) 兔抗 (批号 XA4802BP11397)、神经胶质瘤关联癌基因同源物 1 (glioma associated oncogene homolog 1, Gli1) 兔抗 (批号 ZP663BP63)、HRP 标记的羊抗兔二抗 (批号 BST18F26C18G54) 购自武汉博士德公司； β -actin 兔抗 (批号 10025487) 购自武汉三鹰公司；神经元核心抗原 (neuronal nucleus, NeuN) 兔抗 (批号 AC230312006)、胶质原纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 兔抗 (批号 AC230823018) 购自武汉塞维尔公司；PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 仪器

68025 型脑立体定位仪 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司)；600 系列微量注射器 (美国 Hamilton 公司)；SH01D 型高速离心机 (上海知信实验仪器技术有限公司)；DT5-2 型低速离心机 (北京时代北利离心机有限公司)；DYY-7C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)；Tanon5200 型全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)；SCIENTZ-24 型组织匀浆机 (宁波新芝生物科技有限公司)；SK-O180-E 型摇床 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]；9700 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司)；Vectra3 智能组织切片成像系统 (美国 PerkinElmer 公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤的制备

补阳还五汤由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花按 120:6:4.5:3:3:3:3 比例混合，常规浸泡、煎煮后，使用旋转蒸发器将药液浓缩至原药材质量浓度 2 g/mL。浓缩液经 UPLC-Q-TOF-MS 检测，黄芪甲苷 IV、芒柄花素、阿魏酸、芍药内酯苷质量浓度分别为 78.1、46.7、45.6、468.4 $\mu\text{g/mL}$ ^[15]。

2.2 脑缺血模型的制备

采用大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 法复制脑缺血模型。小鼠 ip 0.3% 戊巴比妥钠麻醉后固定，取颈正中切口，钝性分离左侧颈总、颈内、颈外动脉，将线栓经颈总动脉送入颈内动脉，当线栓上黑色标记点恰好位于颈总动脉分叉时固定线栓，消毒并缝合皮肤。假手术组小鼠仅切开皮肤游离血管，随后缝合皮肤。术后 2 h 参照 Longa 法^[16]对小鼠进行神经行为学评分，评分 1~3 分为模型复制成功。

2.3 动物分组与给药

首先将小鼠按随机数字表法随机分为假手术组、模型组及补阳还五汤低、中、高剂量(9.25、18.50、39.00 g/kg, 分别为临床剂量的0.5、1、2倍)组和丁苯酞(54 mg/kg, 相当于临床等效剂量)组。除假手术组外, 其余组采用MCAO法复制脑缺血模型, 术后6 h首次ig药物(10 mL/kg), 假手术组和模型组ig等体积蒸馏水, 1次/d, 连续21 d。

筛选出补阳还五汤理想剂量后, 将KO小鼠和WT小鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和补阳还五汤(18.5 g/kg)组, 每组12只, 造模方式、给药剂量和时间同上。

2.4 脑立体定位仪注射

鉴于腺相关病毒注射后需要21~28 d才能自发绿色荧光, 因此在造模前7 d分别给KO小鼠和WT小鼠进行脑立体定位后注射腺相关病毒以标记原生星形胶质细胞。依据文献方法^[5], 小鼠ip 0.3%戊巴比妥钠麻醉后固定在脑立体定位仪上, 剪开头皮, 根据坐标(囟门前0.5 mm, 左侧旁开0.8 mm, 深度2.5 mm), 钻一小孔后, 进针予以微量注射, 注射量为0.8 μ L, 每次持续10 min, 注射后留针15 min, 随后缓慢移除微量注射器, 消毒并缝合皮肤。术后小鼠被单独饲养, 自由获得常规饮食和水。

2.5 神经行为学评分

在术后第21天末次给药2 h后, 采用Clark等^[17]报道的28分神经功能评分法评定各组小鼠神经功能。分数越高, 小鼠神经功能缺损越严重。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色

神经行为学评分后, 小鼠ip 0.3%戊巴比妥钠麻醉, 断头取脑, 全脑于4%多聚甲醛中固定, 常规脱水、透明、包埋及切片, HE染色, 选取缺血侧皮质区400倍放大图像。

2.7 免疫组化染色

取全脑石蜡切片, 依次脱蜡、抗原修复及封闭, 加入兔抗NeuN(1:2 000)一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 滴加二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS冲洗后室温下与SABC孵育30 min。PBS冲洗后用DAB和苏木素染色, 最后用甘油封片。选取缺血侧皮质区400倍放大图像。根据课题组前期研究^[8], 运用Image J软件分析图像, 使用组织化学评分(H评分)评估NeuN的表达情况。

H评分=弱强度细胞的百分比+中等强度细胞的百分比 \times 2+强强度细胞的百分比 \times 3

2.8 免疫荧光染色

GFAP用来标记星形胶质细胞, 首先通过EGFP/GFAP双荧光评估腺相关病毒是否能够成功标记星形胶质细胞。此外, NeuN常用来标记成熟的神经元, 而EGFP绿光标记原生星形胶质细胞, 因此, EGFP/NeuN能够代表星形胶质细胞向神经元转分化的情况。取冰冻切片, 依次晾干、PBS浸泡和通透后, 加入兔抗GFAP(1:500)和NeuN(1:500)一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 滴加荧光二抗, 避光孵育1 h, PBS冲洗后滴加DAPI染色液, 继续孵育10 min, PBS冲洗后甘油封片。选取缺血侧皮质区400倍放大图像, 运用Image J软件Colocalization Finder插件对EGFP-NeuN共定位进行分析, 依据Pearson's R值进行定量^[18]。

2.9 Western blotting 测定缺血侧皮质中Shh、Smo和Gli1蛋白表达

取100 mg缺血侧皮质脑组织样本, 剪碎后加入细胞裂解液提取总蛋白。测定蛋白浓度后将蛋白变性后上样, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至PVDF膜, 封闭2 h后分别加入兔抗Shh(1:1 000)、兔抗Smo(1:800)和兔抗Gli1(1:800), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育2 h。扫描胶片, 并计算各蛋白的相对光密度值。用Image J软件分析各条带灰度值。

2.10 qRT-PCR 检测缺血侧皮质中神经分化因子的表达

取30 mg缺血侧皮质脑组织置于1.5 mL离心管中, 严格参照试剂盒步骤抽提RNA。将RNA反转录为cDNA, 进行PCR扩增, 引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成, 引物序列见表1。以

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp
<i>β-actin</i>	F: GCAGATGTGGATCAGCAAGC R: AGGGTGTAACCGCAGCTCAG	70
<i>Ascl1</i>	F: GACTTTGGAAGCAGGATGG R: CATCTTAGTGAAGGTGCC	152
<i>NeuroD1</i>	F: CCAGGGTTATGAGATCGTC R: GGTCATGTTCCACTTCCTG	61
<i>NeuroD2</i>	F: CGAGAAGATTCTCTCTCTCCC R: CTCCACGAAGAGACACTGG	271
<i>Ngn1</i>	F: TTTCTCCTTTCTGGCCTG R: GTATGGGATGAAACAGGGC	60
<i>Ngn2</i>	F: CTGACTGACAGACACCAC R: TTTGACGAACATCCTACGC	247
<i>Pax2</i>	F: AGAACCCGACTATGTTTCGC R: CGGATGATCCTGTTGATGGA	105

β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算神经分化因子 acoete-scute 同系物 1 (achaete-scute complex homolog 1, *Ascl1*)、神经源性分化因子 1 (neurogenic differentiation 1, *NeuroD1*)、神经源性分化因子 2 (neurogenic differentiation 2, *NeuroD2*)、神经元素 1 (neurogenin-1, *Ngn1*)、神经元素 2 (neurogenin-2, *Ngn2*) 及配对盒基因 2 (paired box gene 2, *Pax2*) 的 mRNA 相对表达量, 每个标本均设置 1 个复孔。

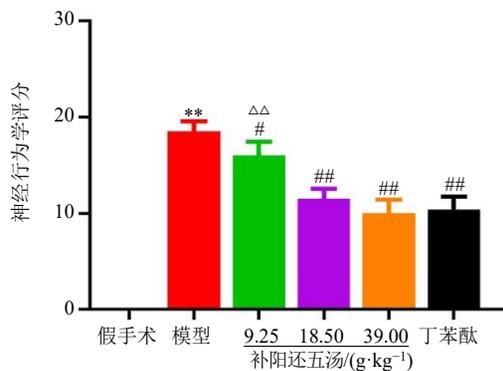
2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布组间比较根据实验设计分别采用单因素或多因素方差分析。

3 结果

3.1 补阳还五汤对脑缺血小鼠神经行为学评分的影响

如图 1 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠神



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与补阳还五汤中剂量比较: ΔΔ $P < 0.01$, 图 3 同。
** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; ΔΔ $P < 0.01$ vs Buyang Huanwu Decoction medium-dose group, same as fig. 3.

图 1 补阳还五汤对脑缺血小鼠神经行为学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on neurobehavioral score in mice with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

经行为学评分明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组小鼠神经行为学评分显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。补阳还五汤中剂量组和补阳还五汤低剂量组的神经行为学评分有显著差异 ($P < 0.01$), 而补阳还五汤中、高剂量组和丁苯酞组之间无明显差异。

3.2 补阳还五汤对脑缺血小鼠缺血侧皮质区病理学损伤的影响

如图 2 所示, 假手术组小鼠脑组织细胞结构完整, 胞质丰富, 胞核清晰; 与假手术组比较, 模型组小鼠缺血侧皮质区神经元排列不规整, 细胞间隙增宽, 存在明显的空泡, 细胞核出现固缩; 与模型组比较, 补阳还五汤各量组和丁苯酞组小鼠缺血侧皮质区病理损伤均有不同程度的改善, 神经元排列相对规整, 细胞间隙减小, 核仁较清晰, 空泡明显减少。

3.3 补阳还五汤对脑缺血小鼠神经元损伤的影响

如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠脑组织 NeuN 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组小鼠 NeuN 的表达明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。此外, 补阳还五汤中剂量组和补阳还五汤低剂量组小鼠 NeuN 的表达有显著差异 ($P < 0.01$), 而补阳还五汤中、高剂量组和丁苯酞组之间无明显差异。

3.4 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区星形胶质细胞转分化的影响

首先, 免疫荧光染色显示 EGFP 与 GFAP 荧光基本共定位 (图 4), 表明腺相关病毒能够有效标记星形胶质细胞。随后, 基于上述神经行为学评分、病理学和免疫组化结果, 选择补阳还五汤中剂量组进行接下来的研究。如图 5 所示, 与 WT 假手术组比较, KO 假手术组 EGFP-NeuN 共定位无明显变化。与同基因型假手术组比较, WT、KO 模型组小

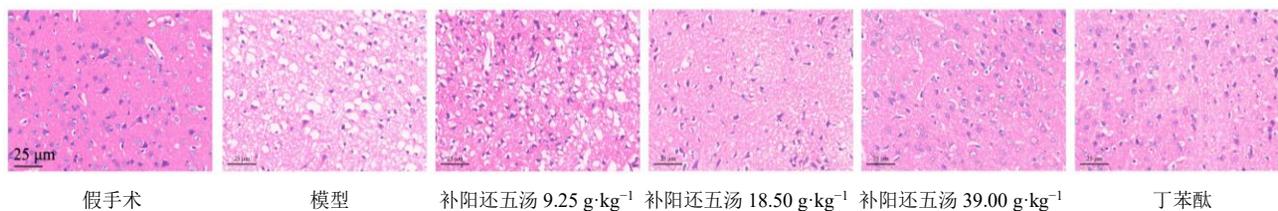


图 2 补阳还五汤对脑缺血小鼠缺血侧皮质区病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwu Decoction on pathological changes in ischemic cortex of mice with cerebral ischemia (HE, ×400)

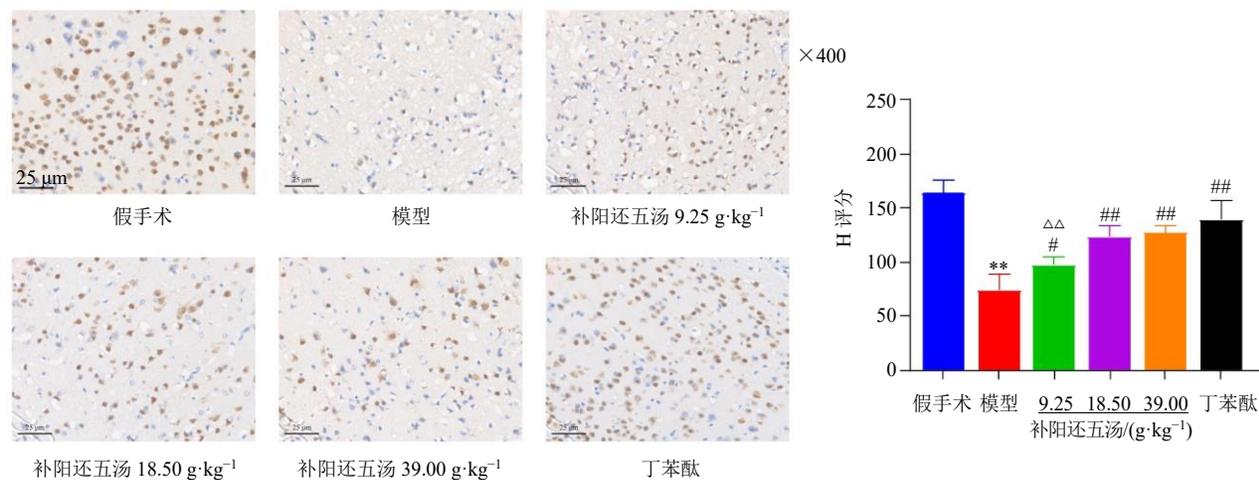


图3 补阳还五汤对脑缺血小鼠缺血侧皮质区神经元损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwu Decoction on neuronal injury in ischemic cortex of mice with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

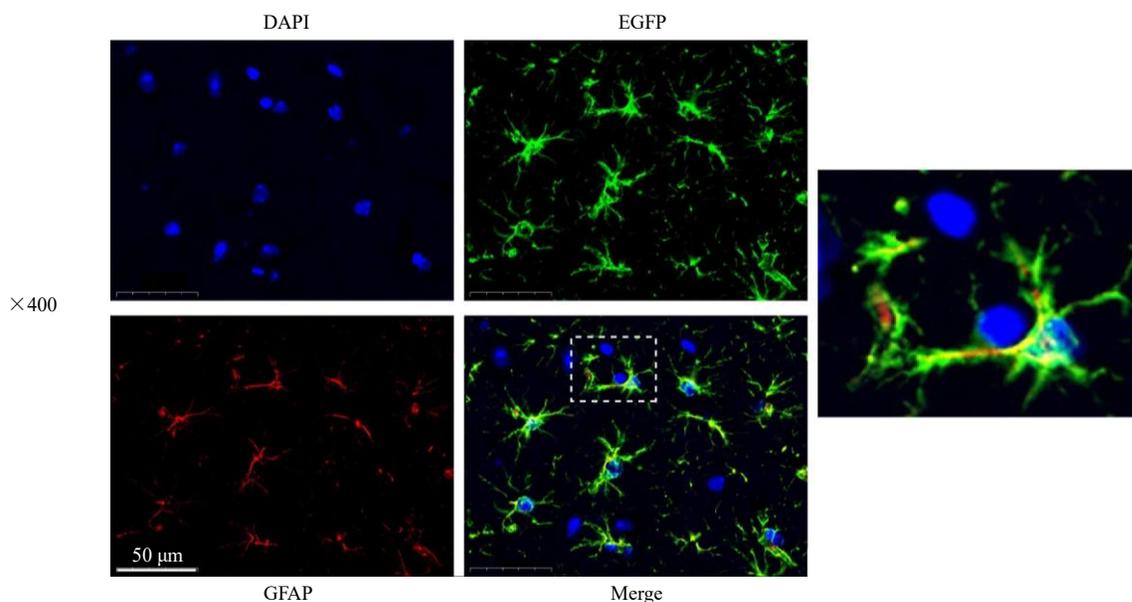


图4 腺相关病毒注射成功标记星形胶质细胞

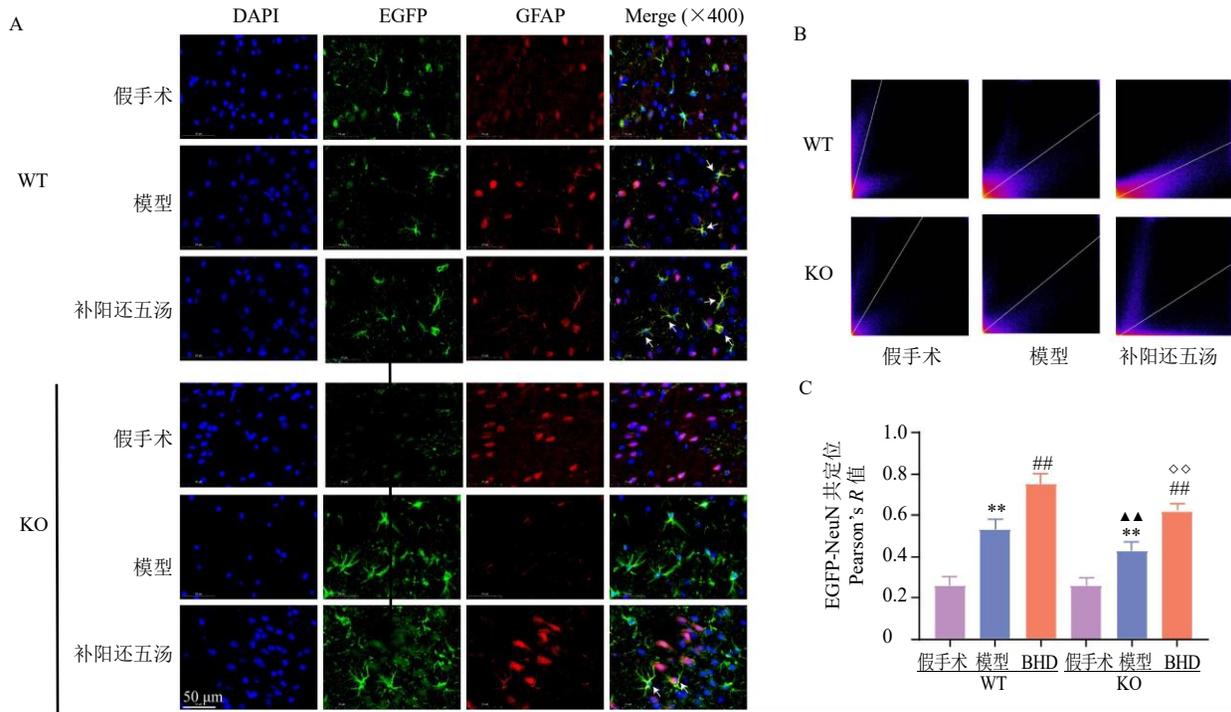
Fig. 4 Adeno associated virus injection successfully labeled astrocytes

鼠缺血侧皮质区 EGFP-NeuN 共定位明显增强 ($P < 0.01$); 与同基因型模型组比较, WT、KO 补阳还五汤组小鼠缺血侧皮质区的 EGFP-NeuN 共定位明显增强 ($P < 0.01$); 与 WT 模型组比较, KO 模型组小鼠缺血侧皮质区 EGFP-NeuN 共定位明显降低 ($P < 0.01$); 与 WT 补阳还五汤组比较, KO 补阳还五汤组缺血侧皮质区 EGFP-NeuN 共定位明显降低 ($P < 0.01$)。

3.5 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区 Shh 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与 WT 假手术组比较, KO 假手

术组 Shh、Smo 和 Gli1 的蛋白表达无明显变化。与同基因型假手术组比较, WT、KO 模型组小鼠缺血侧皮质区 Shh、Smo 和 Gli1 的蛋白表达菌明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与同基因型模型组比较, WT、KO 补阳还五汤组小鼠缺血侧皮质区的 Shh、Smo 和 Gli1 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与 WT 模型组比较, KO 模型组小鼠缺血侧皮质区 Shh、Smo 和 Gli1 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与 WT 补阳还五汤组比较, KO 补阳还五汤组缺血侧皮质区 Shh、Smo 和 Gli1 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。



A-EGFP/NeuN 免疫荧光图; B-EGFP 与 NeuN 共定位散点图; C-EGFP 与 NeuN 共定位定量分析; BHD-补阳还五汤 (18.5 g·kg⁻¹); 与同基因型假手术组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与同基因型模型组比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01; 与 WT 模型组比较: ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01; 与 WT BHD 组比较: ◇*P*<0.05 ◇◇*P*<0.01, 下图同。

A-EGFP/NeuN immunofluorescence image; B-EGFP and NeuN co-localization scatter diagram; C-EGFP and NeuN co-localization quantitative analysis; BHD-Buyang Huanwu Decoction (18.5 g·kg⁻¹); **P* < 0.05 ***P* < 0.01 vs same genotype sham group; #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01 vs same genotype model group; ▲*P* < 0.05 ▲▲*P* < 0.01 vs WT model group; ◇*P* < 0.05 ◇◇*P* < 0.01 vs WT BHD group, same as below figures.

图 5 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区星形胶质细胞转分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Buyang Huanwu Decoction on trans-differentiation of astrocytes in ischemic cortex of *Cav1*^{-/-} mice after cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

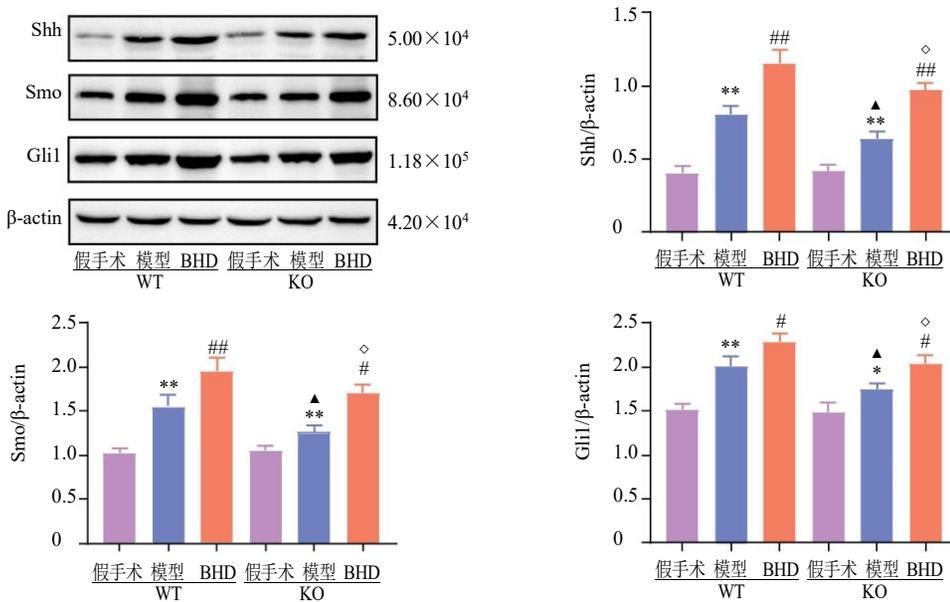


图 6 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区 Shh 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Buyang Huanwu Decoction on Shh signaling pathway related-protein expressions in ischemic cortex of *Cav1*^{-/-} mice after cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区神经分化因子基因表达的影响

如图 7 所示, 与 WT 假手术组比较, KO 假手术组小鼠缺血侧皮质区 *Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1*、*Ngn2* 及 *Pax2* 的 mRNA 表达水平无明显变化。与同基因型假手术组比较, WT、KO 模型组小鼠缺血侧皮质区 *Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1*、*Ngn2* 及 *Pax2* 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与同基因型模型组比较, WT、KO 补阳还五

汤组小鼠缺血侧皮质区的 *Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1*、*Ngn2* 及 *Pax2* 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 WT 模型组比较, KO 模型组小鼠缺血侧皮质区 *Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1*、*Ngn2* 及 *Pax2* 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 WT 补阳还五汤组比较, KO 补阳还五汤组小鼠缺血侧皮质区 *Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1*、*Ngn2* 及 *Pax2* 的 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)。

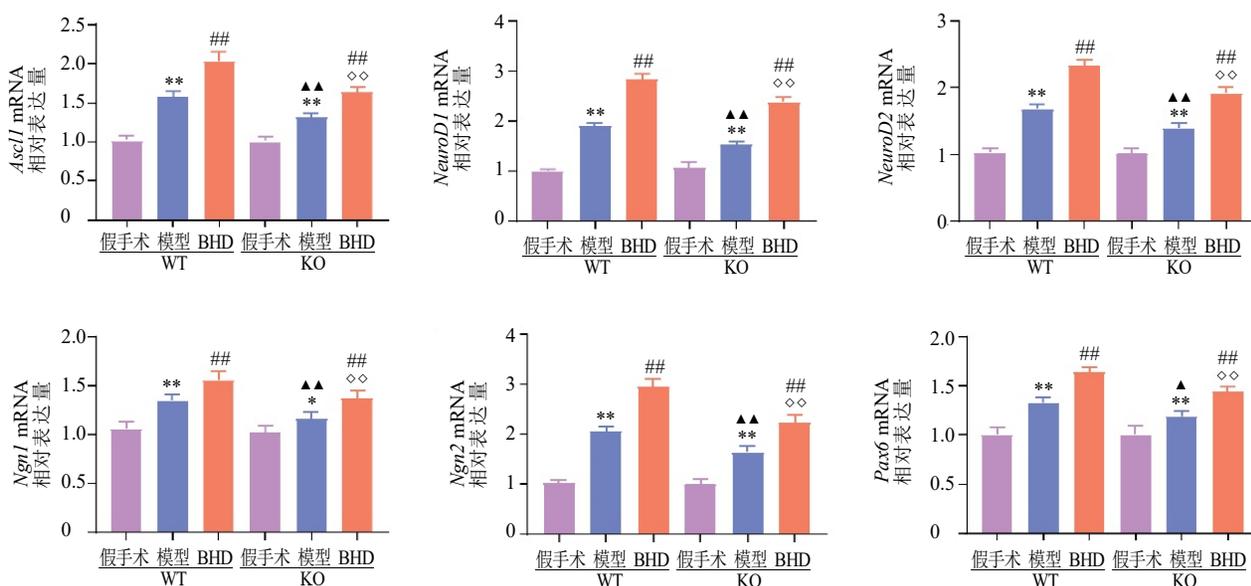


图 7 补阳还五汤对 *Cav1*^{-/-}小鼠脑缺血后缺血侧皮质区神经分化因子基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Buyang Huanwu Decoction on gene expressions of neurodifferentiation factors in ischemic cortex of *Cav1*^{-/-} mice after cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中医学将脑缺血归纳于“中风”范畴, 并认为气虚血瘀为卒中病的基本证候之一^[19]。补阳还五汤由清代著名医家王清任所创, 专用于卒中气虚血瘀证的诊治^[20]。本研究进一步证实了补阳还五汤对脑缺血小鼠的治疗作用, 发现补阳还五汤能够改善脑缺血小鼠的神经行为学评分, 降低缺血侧皮质区病理损伤, 修复缺血侧神经元损伤, 并且发现补阳还五汤可能需要达到一定的剂量才能完全发挥抗脑缺血损伤的作用, 而补阳还五汤中剂量可能是治疗脑缺血小鼠的理想剂量。此外, 本研究还发现补阳还五汤能够促进脑缺血后星形胶质细胞向神经元的转分化, 其具体机制可能与通过 *Cav1* 调控 *Shh* 信号通路的活性, 上调各类神经分化因子的表达有关。

大脑中动脉闭塞是脑缺血的常见原因, 会导致缺血侧神经元的缺氧及能量供应障碍, 造成难以逆

转的神经功能损伤^[21]。大量研究表明, 脑缺血可以诱导反应性星形胶质细胞原位转分化为功能成熟的神经元, 这些神经元可以在功能上与原始神经回路整合以取代受损的神经元^[22]。本研究首先采用腺相关病毒感染原位星形胶质细胞, 结果显示, 星形胶质细胞均可自发 EGFP 的高密度及高强度绿色荧光, 提示腺相关病毒能够成功的标记星形胶质细胞。此外, 目前的研究表明星形胶质细胞转分化的过程需要 21~28 d 的时间^[23]。因此, 在这项研究中, 首先在术后第 21 天观察小鼠缺血侧皮质区是否存在星形胶质细胞的转分化现象。结果表明, 在脑缺血后缺血侧皮质区域存在少量的星形胶质细胞转分化现象, 这与之前的报道一致^[24]。而补阳还五汤治疗后 EGFP-NeuN 共定位明显增强, 说明补阳还五汤能够增强脑缺血后星形胶质细胞向神经元的转分化现象。

洞穴是细胞膜上的特殊凹陷，其中积累了各种细胞信号分子。Cav1 是洞穴中重要的功能结构和核心蛋白，它不仅参与神经系统的发育，还能通过调节血脑屏障通透性，炎症，血管生成和神经再生，参与脑缺血损伤的调控，被认为是治疗脑缺血的新靶点^[25]。Cav1 最初被认为仅限存在于血管内皮细胞，然而随着研究的深入，Cav1 已被证实与星形胶质细胞的形态结构及功能密切相关^[26]。如有学者已发现 Cav1 敲除小鼠在脑缺血后相比正常小鼠，有更多的神经胶质细胞增殖和瘢痕形成^[27]，并且星形胶质细胞末端脚呈现明显肿胀^[28]。此外，研究表明 Cav1 沉默会加重糖氧剥夺损伤星形胶质细胞的谷氨酸摄取及能量代谢，而过表达 Cav1 会激活有丝分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路，并抑制细胞凋亡^[29]。综上，Cav1 是星形胶质细胞的重要调节因子，但截至目前还没有 Cav1 通过调节星形胶质细胞转分化对脑缺血后神经修复的影响的报道。与此同时，课题组在之前的研究中发现补阳还五汤能够促进脑缺血后 Cav1 的表达，提示 Cav1 可能是补阳还五汤治疗脑缺血的靶点之一^[15,30]。在本研究中，课题组发现虽然补阳还五汤能够增强脑缺血后星形胶质细胞的转分化，但相应 KO 组与相应 WT 组相比，其星形胶质细胞转分化现象被一定程度的抑制，提示 Cav1 的缺失抑制了星形胶质细胞的转分化，补阳还五汤可能是通过 Cav1 促进脑缺血后的星形胶质细胞转

分化。

Shh 信号通路被认为参与了大脑内神经系统的建立与维持，并与神经胶质细胞密切相关^[31]。目前已有学者在体外实验中，通过对星形胶质细胞向神经元转分化过程进行持续追踪，发现 Shh 信号通路的激活伴随了星形胶质细胞转分化的全过程，而随着 Shh 信号通路的激活，*Ascl1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*、*Ngn1* 及 *Ngn2* 等神经分化因子的表达量亦呈现出级联上调^[11]。目前的研究表明，*Ascl1* 的过表达增加了星形胶质细胞向神经祖细胞的局部转化并改善了脑缺血小鼠的神经功能恢复^[5]。而过表达 *NeuroD1* 同样可以将反应性星形胶质细胞转化为功能性神经元^[32]。此外，亦有学者证实过表达 *Ngn2* 可以将皮质区星形胶质细胞诱导为特异性功能神经元^[33]。上述研究表明，Shh 信号通路及各类神经分化因子能够影响细胞命运的决定，诱导星形胶质细胞直接重编程为神经元。本研究发现，脑缺血后 Shh 信号通路被激活，各类神经分化因子表达上升，补阳还五汤能够增强此效应并促进星形胶质细胞转分化。但值得注意的是 Cav1 敲除后会抑制该现象，提示 Cav1 可能在脑缺血后调控 Shh 信号通路的活性，影响各类神经分化因子的表达，参与星形胶质细胞的转分化调控。补阳还五汤可能是通过 Cav1 调控 Shh 信号通路的活性，上调各类神经分化因子的表达，最终促进脑缺血后星形胶质细胞向神经元的转分化（图 8）。

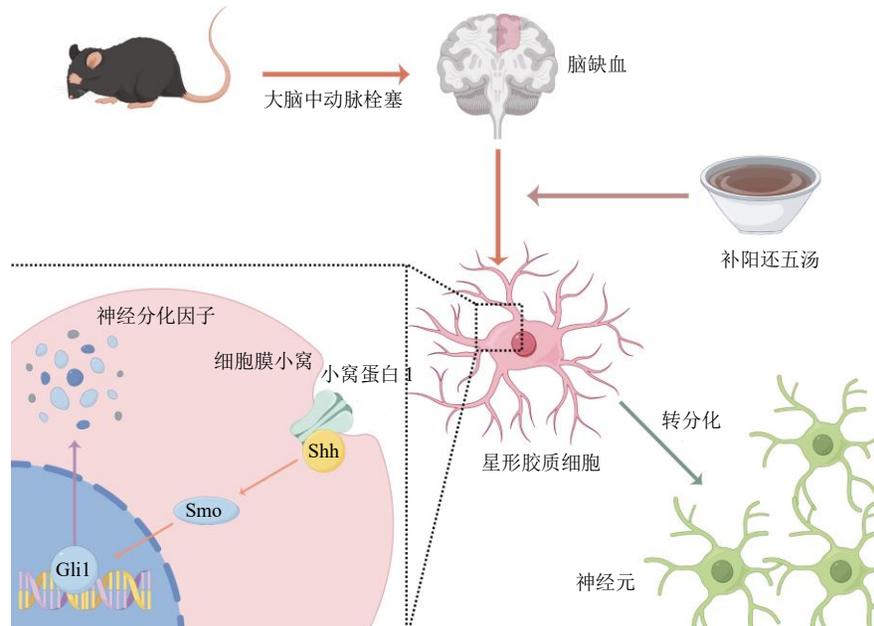


图 8 补阳还五汤促进脑缺血后星形胶质细胞转分化的机制图

Fig. 8 Mechanisms of BHD promoting astrocyte trans-differentiation after cerebral ischemia

不可否认的是,当前关于星形胶质细胞是否可以转分化为神经元一直存在争议^[34]。有研究表明,当星形胶质细胞转分化为神经元时,星形胶质细胞的身份将丧失,EGFP的表达无法被激活,导致一些成功转分化为神经元的细胞不会自发EGFP的绿色荧光^[35]。而目前基于GFAP启动子设计的腺相关病毒,暂时不能完全避免其荧光标记物在内源性神经元中的泄露表达,从而误被认为是被转分化形成的新生神经元^[36]。此外,本研究虽然表明补阳还五汤能够通过Cav1促进星形胶质细胞向神经元的转分化,但应进一步通过神经电生理学以验证其是否具有类神经元的生物学功能。后续课题组将在体外细胞实验层面对其潜在机制进行下一步探索。

综上,本研究发现补阳还五汤能够改善脑缺血小鼠的神经行为学评分,降低缺血侧皮质区病理损伤,其潜在机制可能与通过Cav1调控Shh信号通路的活性,上调各类神经分化因子的表达,最终促进脑缺血后星形胶质细胞向神经元的转分化有关。但仍需在未来以更严格的实验设计来证实这项研究的结果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mendelson S J, Prabhakaran S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(11): 1088-1098.
- [2] Allen N J, Barres B A. Neuroscience: Glia-more than just brain glue [J]. *Nature*, 2009, 457(7230): 675-677.
- [3] Brandao M, Simon T, Critchley G, et al. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment [J]. *Glia*, 2019, 67(5): 779-790.
- [4] Leib D, Chen Y H, Monteys A M, et al. Limited astrocyte-to-neuron conversion in the mouse brain using NeuroD1 overexpression [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(3): 982-986.
- [5] Li W L, Mandeville E T, Durán-Laforet V, et al. Endothelial cells regulate astrocyte to neural progenitor cell trans-differentiation in a mouse model of stroke [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7812.
- [6] Lei Y, Chen X, Mo J L, et al. Vascular endothelial growth factor promotes transdifferentiation of astrocytes into neurons via activation of the MAPK/Erk-Pax6 signal pathway [J]. *Glia*, 2023, 71(7): 1648-1666.
- [7] Shao L, She Y, Yong S N, et al. An evidence-based evaluation of Buyang Huanwu Decoction for the treatment of the sequelae of stroke: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154312.
- [8] Xu Y Q, Chen B W, Yi J, et al. Buyang Huanwu Decoction alleviates cerebral ischemic injury through modulating caveolin-1-mediated mitochondrial quality control [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1137609.
- [9] 刘柏炎, 陈博威, 周胜强, 等. 补阳还五汤调控Caveolin1-VEGF信号对脑缺血小鼠血管新生的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12): 7350-7354.
- [10] 徐雅倩, 陈博威, 田丰铭, 等. 补阳还五汤对Cav1^{-/-}小鼠脑缺血后m-6A修饰和血管新生的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(7): 68-73.
- [11] Ma N X, Yin J C, Chen G. Transcriptome analysis of small molecule-mediated astrocyte-to-neuron reprogramming [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 82.
- [12] Heinrich M, Appendino G, Efferth T, et al. Best practice in research-overcoming common challenges in phytopharmacological research [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112230.
- [13] Heinrich M, Jalil B, Abdel-Tawab M, et al. Best practice in the chemical characterisation of extracts used in pharmacological and toxicological research-The ConPhyMP-Guidelines [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 953205.
- [14] 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等. Caveolin-1基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 228-232.
- [15] 陈博威, 唐荣梅, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠海马组织circRNA-miRNA-mRNA转录网络的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 143-153.
- [16] 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.
- [17] Clark W M, Lessov N S, Dixon M P, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. *Neurol Res*, 1997, 19(6): 641-648.
- [18] Dunn K W, Kamocka M M, McDonald J H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(4): C723-C742.
- [19] 孙艺凡, 蔡明阳, 陈香云, 等. 基于中医处方方法与模型图理解补阳还五汤治疗缺血性中风的配伍思想 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(8): 1318-1322.
- [20] 樊启猛, 杨岩涛, 肖美凤, 等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4200-4208.
- [21] Bajaj D, Agrawal A, Gupta S, et al. Recreational nitrous oxide abuse causing ischemic stroke in a young patient: A rare case report [J]. *Cureus*, 2018, 10(12): e3761.

- [22] Das G, Gupta V, Ghosh S. Glial-neuron transformation by chemical cocktail [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(1): 42-43.
- [23] Chen Y C, Ma N X, Pei Z F, *et al.* A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(1): 217-234.
- [24] Ma R, Lu D N, Xie Q, *et al.* L-Borneol and D-borneol promote transdifferentiation of astrocytes into neurons in rats by regulating Wnt/Notch pathway to exert neuroprotective effect during recovery from cerebral ischaemia [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154583.
- [25] Huang Q Y, Zhong W, Hu Z P, *et al.* A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 348.
- [26] Ikezu T, Ueda H, Trapp B D, *et al.* Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: Differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types [J]. *Brain Res*, 1998, 804(2): 177-192.
- [27] Blochet C, Buscemi L, Clément T, *et al.* Involvement of caveolin-1 in neurovascular unit remodeling after stroke: Effects on neovascularization and astrogliosis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(1): 163-176.
- [28] Guérit S, Fidan E, Macas J, *et al.* Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 199: 101937.
- [29] Xu L L, Wang L M, Wen Z Y, *et al.* Caveolin-1 is a checkpoint regulator in hypoxia-induced astrocyte apoptosis via Ras/Raf/ERK pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(11): C903-C910.
- [30] 刘柏炎, 沈剑刚, 蔡光先, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内 caveolin1、2 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(1): 22-24.
- [31] Traiffort E, Angot E, Ruat M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain [J]. *J Neurochem*, 2010, 113(3): 576-590.
- [32] Guo Z Y, Zhang L, Wu Z, *et al.* *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2): 188-202.
- [33] Heinrich C, Blum R, Gascón S, *et al.* Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(5): e1000373.
- [34] Wang L L, Serrano C, Zhong X L, *et al.* Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing *in vivo* [J]. *Cell*, 2021, 184(21): 5465-5481.
- [35] Dennison R, Usuga E, Chen H, *et al.* Direct cell reprogramming and phenotypic conversion: An analysis of experimental attempts to transform astrocytes into neurons in adult animals [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 618.
- [36] Xie Y, Zhou J, Wang L L, *et al.* New AAV tools fail to detect Neurod1-mediated neuronal conversion of Müller glia and astrocytes *in vivo* [J]. *EBio Med*, 2023, 90: 104531.

[责任编辑 李亚楠]