

• 药理与临床 •

基于 Nrf2/GPX4 信号通路研究补阳还五汤对糖尿病认知障碍大鼠的改善作用及机制

赵博深¹, 安宇宇¹, 李樱楠¹, 孙泽莹¹, 史永恒^{1,2,3}, 韩朝军^{1,2,3}, 王川^{1,2,3}, 王斌^{1,2,3}, 米燕妮^{1,2,3,4}, 刘继平^{1,2,3,4*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西省中医药管理局 中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046

3. 中医药脑健康产业陕西省高校工程研究中心, 陕西 咸阳 712046

4. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 陕西 西安 710065

摘要:目的 基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 通路探究补阳还五汤改善糖尿病认知障碍 (diabetes cognitive impairment, DCI) 的作用机制。方法 采用高脂高糖饲料喂养联合小剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 注射法建立 DCI 大鼠模型, 将造模成功大鼠随机分为模型组及补阳还五汤低、高剂量 (7.125、28.500 g/kg) 组和二甲双胍 (0.2 g/kg) 组, 另设置对照组。给药 4 周后, 采用 Morris 水迷宫评价大鼠认知记忆能力; 苏木素-伊红染色观察大鼠海马组织病理变化; 生化法检测大鼠血清中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性及谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和脑组织中亚铁离子 (Fe^{2+}) 水平; 免疫组化法检测大鼠海马 CA1 区 Nrf2、GPX4 蛋白表达; Western blotting 检测大鼠海马组织 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、Nrf2、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、GPX4、转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR)、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1)、铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH) 蛋白表达。体外培养人神经母细胞瘤 SHSY-5Y 细胞并用 160 mmol/L 葡萄糖诱导建立损伤模型, 设置对照组、模型组及补阳还五汤低、高剂量含药血清组和补阳还五汤高剂量含药血清+Nrf2 抑制剂 ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组, 生化法检测细胞中 SOD、CAT 活性及 GSH、MDA 水平; JC-1 荧光探针检测细胞线粒体膜电位变化; Western blotting 检测细胞中 Keap1、Nrf2、HO-1、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达。结果 体内实验结果显示, 补阳还五汤能够延缓 DCI 大鼠体质量下降 ($P<0.05$), 降低空腹血糖 ($P<0.05$ 、 0.01); 缩短逃避潜伏期 ($P<0.05$ 、 0.01), 增加目标象限移动距离、停留时间及穿越平台次数 ($P<0.05$ 、 0.01); 减轻海马神经元细胞损伤; 降低血清中 MDA 及脑组织 Fe^{2+} 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 升高血清中 SOD、CAT 活性及 GSH 水平 ($P<0.05$ 、 0.01); 下调海马组织中 TFR、Keap1 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 上调 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4、FTH、FPN1 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01)。体外实验结果显示, 补阳还五汤含药血清能够显著提高高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞存活率 ($P<0.01$), 降低 MDA 水平 ($P<0.05$), 升高 SOD、CAT 活性及 GSH 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 升高线粒体膜电位, 下调 Keap1 蛋白表达 ($P<0.01$), 上调 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01); 与补阳还五汤高剂量含药血清组相比, 给予 ML385 后显著逆转上述指标变化 ($P<0.05$ 、 0.01)。结论 补阳还五汤能够改善 DCI 大鼠的认知功能障碍, 减轻氧化应激损伤并改善铁代谢紊乱, 其作用可能与激活 Nrf2/GPX4 信号通路、调控铁死亡相关过程有关。

关键词: 糖尿病; 认知障碍; 补阳还五汤; 铁死亡; 氧化应激; Nrf2/GPX4 信号通路; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)17-6793-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.012

收稿日期: 2026-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304504); 陕西省食品药品安全监测重点实验室开放课题资助项目 (SXKLFDM202502)

作者简介: 赵博深, 硕士研究生, 从事中药神经药理学研究。E-mail: zhaoboshen_0728@163.com

*通信作者: 刘继平, 博士, 教授, 从事中药神经药理学研究。E-mail: liwenjie780711@163.com

Improvement effect and mechanism of Buyang Huanwu Decoction on rats with diabetic cognitive impairment based on Nrf2/GPX4 signaling pathway

ZHAO Boshen¹, AN Yuyu¹, LI Yingnan¹, SUN Zexuan¹, SHI Yongheng^{1,2,3}, HAN Chaojun^{1,2,3}, WANG Chuan^{1,2,3}, WANG Bin^{1,2,3}, MI Yanni^{1,2,3,4}, LIU Jiping^{1,2,3,4}

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Chinese Medicine of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. Shaanxi Provincial University Engineering Research Center of Brain Health Industry of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

4. Shaanxi Key Laboratory for Safety Monitoring of Food and Drug, Xi'an 710065, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤) in ameliorating diabetes cognitive impairment (DCI) based on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods** A rat model of DCI was established by feeding a high-fat and high-sugar diet combined with low-dose streptozotocin (STZ) injection. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, Buyang Huanwu Decoction low-, high-dose (7.125, 28.500 g/kg) groups and metformin (0.2 g/kg) group, control group was set up separately. After four weeks of administration, the cognitive and memory abilities of rats were evaluated by Morris water maze. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of hippocampal tissue in rats. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) in serum and ferrous ions (Fe^{2+}) in brain tissue of rats were detected by biochemical methods. Immunohistochemistry was used to observe the expressions of Nrf2 and GPX4 proteins in CA1 region of hippocampus in rats. Western blotting was used to detect the expressions of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), GPX4, transferrin receptor (TFR), ferroportin 1 (FPN1) and ferritin heavy chain (FTH) proteins in hippocampal tissue of rats. Human neuroblastoma cells SHSY-5Y were cultured *in vitro* and a damage model was established by inducing with 160 mmol/L glucose. Control group, model group, Buyang Huanwu Decoction low-, high-dose drug containing serum groups and Buyang Huanwu Decoction high-dose drug containing serum + Nrf2 inhibitor ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) group were set up. Biochemical methods were used to detect the activities of SOD, CAT and levels of GSH, MDA in cells. JC-1 fluorescent probe was used to detect changes in mitochondrial membrane potential in cells. Western blotting was used to detect the expressions of Keap1, Nrf2, HO-1, SLC7A11 and GPX4 proteins in cells. **Results** The results of *in vivo* experiments showed that Buyang Huanwu Decoction could delay weight loss of DCI rats ($P < 0.05$), reduce fasting blood glucose ($P < 0.05, 0.01$), shorten the escape latency ($P < 0.05, 0.01$), increase the distance moved, dwell time and number of crossings in target quadrant ($P < 0.05, 0.01$), alleviate the damage of hippocampal neurons, reduce the levels of MDA in serum and Fe^{2+} in brain tissue ($P < 0.05, 0.01$), increase the activities of SOD, CAT and levels of GSH in serum ($P < 0.05, 0.01$), downregulate the expressions of TFR and Keap1 proteins in hippocampus ($P < 0.05, 0.01$), upregulate the expressions of Nrf2, HO-1, SLC7A11, GPX4, FTH and FPN1 proteins ($P < 0.05, 0.01$). The results of *in vitro* experiments showed that Buyang Huanwu Decoction drug-containing serum could significantly increase the survival rate of SHSY-5Y cells induced by high glucose ($P < 0.01$), reduce MDA level ($P < 0.05$), increase the activities of SOD, CAT and level of GSH ($P < 0.05, 0.01$), increase the mitochondrial membrane potential, downregulate the expression of Keap1 protein ($P < 0.01$), and upregulate the expressions of Nrf2, HO-1, SLC7A11 and GPX4 proteins ($P < 0.05, 0.01$). Compared with Buyang Huanwu Decoction high-dose drug containing serum group, the administration of ML385 significantly reversed the changes in the above indicators ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction could improve cognitive dysfunction, alleviate oxidative stress damage, and improve iron metabolism disorders in DCI rats. Its effects may be related to the activation of Nrf2/GPX4 signaling pathway and the regulation of ferroptosis processes.

Key words: diabetes; cognitive impairment; Buyang Huanwu Decoction; ferroptosis; oxidative stress; Nrf2/GPX4 signaling pathway; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; calycosin-7-glucoside; ononin; calycosin

糖尿病认知障碍 (diabetes cognitive impairment, DCI) 是糖尿病患者常见的并发症之一, 其特点是认知功能的逐渐下降, 尤其是记忆、注意力和执行功能

的受损^[1]。随着全球糖尿病患者数量的增加, DCI 的患病率呈上升趋势。流行病学数据和临床研究表明, 高达 50% 的 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus,

T2DM) 患者会在一定程度上出现认知功能障碍^[2]。DCI 的发病机制复杂, 涉及胰岛素抵抗、慢性高血糖引起的氧化应激、炎症反应以及脑血管病变等多种机制^[3]。而现有的治疗策略主要集中于血糖控制及改善认知, 针对 DCI 的特异性治疗手段仍然匮乏, 且疗效有限。因此, 开发新的治疗策略, 改善患者生活质量, 缓解医疗负担, 已成为迫切的医学需求。

铁死亡是一种与铁代谢紊乱相关的新型细胞死亡方式, 近年来被广泛研究并发现与多种神经退行性疾病和代谢性疾病密切相关^[4]。持续高糖状态可导致氧化还原稳态失衡、脂质过氧化增强及铁代谢异常, 进而诱导神经元损伤并促进认知功能下降^[5]。在铁死亡的调控中, 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) /谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 信号通路具有重要作用。Nrf2 作为细胞抗氧化应激反应的核心转录因子, 可通过调控多种抗氧化基因维持细胞氧化还原稳态, 同时在铁等金属代谢、脂质代谢及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成中也发挥关键作用。此外, GPX4 作为铁死亡的关键调控因子, 通过 GSH 依赖性清除脂质过氧化物、维持细胞膜的稳定性, 在抑制铁死亡中发挥核心作用, 并被认为是 Nrf2 相关抗氧化调控的潜在下游靶点^[6-8]。研究表明, 槲皮素通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路减轻氧化应激和脂质过氧化损伤, 有效抑制神经元铁死亡, 显著改善 db/db 小鼠的认知功能障碍^[9]。此外, 西格列汀等也可通过抑制铁过载和调控 Nrf2/GPX4 信号通路来抑制铁死亡, 改善 DCI^[10-11]。因此, 调控 Nrf2/GPX4 信号通路以抑制铁死亡, 可能成为治疗 DCI 的潜在策略。

补阳还五汤出自王清任的《医林改错》, 是活血化瘀的经典名方。补阳还五汤及其有效成分具有增强机体抗氧化水平、抑制炎症、调节糖脂代谢、减轻神经损伤等多种药理学作用^[12-13]。临床研究显示, 补阳还五汤可在一定程度上改善糖尿病伴轻度认知损害患者的认知功能^[14]。此外, 补阳还五汤可通过减轻氧化应激、调节铁死亡相关因子进而改善糖尿病肾损伤^[15]; 还可通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路, 改善脑卒中后认知功能障碍^[16]。上述研究证实补阳还五汤在改善糖尿病及其并发症与认知功能障碍方面具有突出潜力, 但在治疗 DCI 中的具体机制尚不明确。尤其是其能否通过调控 Nrf2/GPX4 抑制铁死亡进而发挥神经保护作用, 仍缺乏系统研究。因此, 本

研究通过建立 DCI 大鼠模型及高糖诱导的人神经母细胞瘤 SHSY-5Y 细胞损伤模型, 从体内外 2 个层面探讨补阳还五汤通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路, 减轻神经损伤, 改善认知功能障碍的作用机制, 以期为进一步为补阳还五汤防治 DCI 提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 86 只, 8 周龄, 体质量 (200±10) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物质量合格证号 5120350006228。56 只大鼠用于动物实验, 30 只大鼠用于细胞实验含药血清制备。所有动物饲养于陕西中医药大学中药药理实验动物房, 室温 20~25 °C, 相对湿度 50%~60%, 12 h/12 h 明暗循环, 自由进食饮水。动物实验经陕西中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 SUCMDL20240627001)。

1.2 药材

补阳还五汤由黄芪 120 g、当归 6 g、茯苓 4.5 g、赤芍 4.5 g、川芎 3 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g 组成, 饮片均购自陕西中医药大学附属医院, 经陕西中医药大学药学院中药鉴定教研室颜永刚教授分别鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体、蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 均符合《中国药典》2025 年版规定。

1.3 药品与试剂

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 20240402) 购自北京博奥拓达科技有限公司; 二甲双胍 (批号 A0202A24710)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 A137250724) 购自碧云天生物技术有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号分别为 20241113、20241115、20241114、20241113) 购自南京建成生物工程研究所; 亚铁离子 (Fe²⁺) 试剂盒 (批号 WE06P4463860) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

限公司; 血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 00168571)、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1) 抗体 (批号 00140462)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10028231) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 抗体 (批号 BD06244484)、Nrf2 抗体 (批号 BE03075304)、GPX4 抗体 (批号 BE09305893) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体 (批号 4000000753)、铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH) 抗体 (批号 3600010955)、转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR) 抗体 (批号 3600010833) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 BST18K21C19E54)、超敏 ECL 化学发光液 (批号 20H11B71S) 购自武汉博士德生物技术有限公司; DME/F12 培养基 (批号 AL30836673) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 2422334) 购自上海逍鹏生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 20250913) 购自苏州新赛美生物科技有限公司; Nrf2 抑制剂 ML385 (批号 281591) 购自美国 MCE 公司。

1.4 仪器

JLBehv-MWMG 型 Morris 水迷宫 (上海吉量软件科技有限公司); EPOCH2NS 型酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); Accu-Chek 卓越型罗氏血糖仪 (瑞士罗氏公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); Donatello 型脱水机 (意大利迪佩斯公司); RM2016 型组织切片机 (上海徕卡仪器有限公司); GC204005 型冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); UPHW-II-90T 型纯水仪 (成都超纯科技有限公司); DYY-5D 型电脑三恒多用电泳仪电源、DYCZ-TRANS2 型转印电泳仪、DYCZ-24DH 型双板垂直电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Crx53 型荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤的制备

取黄芪 120 g、当归 6 g、茯苓 4.5 g、赤芍 4.5 g、川芎 3 g、地龙 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h 后, 煮沸 40 min, 趁热滤过; 再加入 8 倍量蒸馏水, 煮沸 30 min, 趁热滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩即得补阳还五汤药液 2.85 g/mL (生药量), 常温冷却后 4 ℃ 保存备用。参照《中国药

典》2025 年版一部, 通过高效液相色谱进行含量测定, 补阳还五汤药液中羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮的质量分数分别为 0.33、0.65、0.79、0.15、0.69、0.09 mg/g。

2.2 动物实验

2.2.1 DCI 大鼠模型的建立、分组与给药 大鼠适应性饲养 7 d 后, 参考课题组前期造模方法^[17-18], 随机选取 8 只为对照组, 给予普通饲料喂养; 其余 48 只大鼠给予自制高脂高糖饲料喂养 4 周, 4 周后单次 ip STZ (35 mg/kg) 建立糖尿病模型。注射 3 d 后尾静脉取血检测大鼠空腹血糖, 大于 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型造模成功。造模成功后继续给予高脂高糖饲料喂养 8 周, 通过水迷宫实验筛选认知功能障碍大鼠。将对照组大鼠逃避潜伏期平均值设为参照值, 计算模型组逃避潜伏期平均值的相对增加比例。若该比例不低于 20%, 则认为造模成功^[19]。将符合标准的大鼠随机分为模型组及补阳还五汤低、高剂量 (7.125、28.500 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、2.0 倍) 组和二甲双胍 (0.2 g/kg) 组, 每组 8 只, 常规饲养。各给药组 ig 相应药物 (0.1 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 4 周, 每周检测各组大鼠体质量和空腹血糖。

2.2.2 Morris 水迷宫实验 给药结束后, 采用 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力。前 5 d 进行定位航行实验: 将象限边缘设置标记点, 第 1 象限里 (目标象限) 设置平台, 为确保大鼠不能看见平台, 水池中水面需没过平台。将大鼠分别从 4 个象限各放入水中 1 次, 记录大鼠寻找平台时间 (限时 90 s), 第 6 天进行空间探索实验: 撤去平台, 记录大鼠目标象限移动距离、停留时间及穿越平台区域次数。

2.2.3 取材及样本处理 水迷宫实验结束后, 各组大鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 进行腹主动脉取血, 4 ℃、3 500 r/min 离心, 分离血清, 于 -80 ℃ 冰箱保存。各组取 3 只大鼠全脑用 4% 多聚甲醛固定, 其余大鼠取完整脑和海马组织, 置于 -80 ℃ 冰箱保存。

2.2.4 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 观察大鼠海马组织病理变化 脑组织在 4% 组织固定液浸泡 24 h 后, 石蜡包埋, 切片脱蜡及水化, 随后 HE 染色, 洗涤切片, 脱水透明, 于显微镜下观察细胞损伤情况。

2.2.5 免疫组化法检测海马组织 Nrf2、GPX4 表达 取包埋后的大鼠脑组织样本制备切片, 依次完成脱

水与抗原修复处理。加入 3%牛血清白蛋白在室温下封闭 30 min, 随后加入 GPX4(1:100)、Nrf2(1:200)一抗, 4 ℃孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 50 min。PBS 漂洗 3 次后进行 DAB 显色, 复染返蓝, 二甲苯透明, 于显微镜下采集图像, 使用 Image J 软件量化结果, 统一调节图片阈值, 定量检测目标蛋白阳性区域面积与总视野面积, 计算阳性面积百分比。

2.2.6 大鼠血清中 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH 水平的检测 取大鼠血清样品, 置于冰上解冻。按照试剂盒说明书进行操作, 检测大鼠血清中 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH 水平。

2.2.7 脑组织 Fe²⁺水平检测 取冻存脑组织, 加入提取剂, 冰上研磨, 制备 10%组织匀浆, 离心取上清, 按照试剂盒说明书操作, 检测脑组织 Fe²⁺水平。

2.2.8 Western blotting 检测海马组织 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达 取冻存海马组织, 按照裂解液: 组织=100 μL: 10 mg 的比例加入 RIPA 裂解液, 用组织研磨仪研磨成匀浆, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, BCA 法测定上清液蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5%脱脂牛奶封闭 1 h。加入一抗, 4 ℃孵育过夜; TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 1 h; 洗膜后, 通过 ECL 化学发光法显色, 曝光后观察特定蛋白条带。以 GAPDH 作为内参, 使用 Image J 软件测定目标蛋白的相对表达量。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞培养 SHSY-5Y 细胞用含 10%胎牛血清的 DME/F12 培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

2.3.2 补阳还五汤含药血清的制备 将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组和补阳还五汤低、高剂量(7.125、28.500 g/kg)组, 每组 10 只。空白组 ig 蒸馏水, 其余各组 ig 补阳还五汤药液, 1 次/d, 连续给药 7 d。末次给药 2 h 后, 腹主动脉取血, 于室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集同组血清, 56 ℃水浴锅灭活 30 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, -80 ℃保存备用。

2.3.3 葡萄糖造模浓度筛选 将 SHSY-5Y 细胞以 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 加入含不同浓度(40、80、120、260、200 mmol/L)葡萄糖的培养基处理细胞, 对照组加入完全培养基, 空白组不接种细胞不给药, 每组 3 个复孔, 37 ℃孵育 24 h, 每孔

加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 ℃孵育 1 h 后, 采用酶标仪检测吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.4 细胞分组与给药 设置对照组、模型组及补阳还五汤低、高剂量含药血清组和补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组。对照组和模型组加入 10%空白大鼠血清, 补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组预先使用 Nrf2 抑制剂 ML385(10 μmol/L)处理 2 h^[20], 随后补阳还五汤低、高剂量含药血清组和补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组加入相应剂量含药血清处理 6 h。含药血清处理结束后, 除对照组加入完全培养基, 其余各组加入含 160 mmol/L 葡萄糖的培养基造模 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 ℃孵育 1 h 后, 采用酶标仪检测 A 值, 计算细胞存活率。

2.3.5 线粒体膜电位检测 SHSY-5Y 细胞以 5×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板中, 按照“2.3.4”项下方法进行分组和给药, PBS 洗涤后每孔加入 200 μL JC-1 荧光探针染液(1 μmol/L), 培养箱中避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.3.6 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH 水平的检测 SHSY-5Y 细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 24 孔板中, 按照“2.3.4”项下方法进行分组和给药, 按照试剂盒说明书进行操作, 检测细胞内 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH 水平。

2.3.7 Western blotting 检测 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达 按照“2.3.4”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 按“2.2.8”项下方法检测相关蛋白表达。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。Morris 水迷宫定位航行实验中逃避潜伏期采用重复测量方差分析, 空间探索实验及其他指标各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 若方差齐, 则采用 LSD 检验; 若方差不齐, 则采用非参数检验。

3 结果

3.1 补阳还五汤对 DCI 大鼠体质量及空腹血糖的影响

如表 1 所示, 对照组大鼠体质量整体呈缓慢上升趋势, 而模型组大鼠体质量则呈现明显下降趋势($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组及二甲双胍组大鼠体质量下降趋势均有所改善, 其中

表 1 补阳还五汤对 DCI 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on body weight of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	—	478.50 ± 46.85	484.88 ± 43.90	492.38 ± 38.84	501.75 ± 36.45
模型	—	363.63 ± 34.24 ^{##}	347.63 ± 41.36 ^{##}	332.63 ± 38.73 ^{##}	312.00 ± 33.81 ^{##}
补阳还五汤	7.125	370.38 ± 27.35	355.75 ± 22.64	353.00 ± 22.41	342.50 ± 16.05
	28.500	364.25 ± 20.16	360.50 ± 25.70	360.00 ± 19.41	351.50 ± 21.71*
二甲双胍	0.2	364.88 ± 35.78	358.63 ± 33.45	359.38 ± 29.43	361.88 ± 28.80*

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 表 2、3 同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as tables 2, 3.

给药第 4 周补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$), 表明补阳还五汤能够延缓 DCI 大鼠体质量下降速度。

如表 2 所示, 对照组大鼠空腹血糖水平整体保持相对稳定, 模型组大鼠空腹血糖持续升高 ($P < 0.01$), 且在后期升高更为明显; 与模型组比较, 自给药第 2 周各组大鼠空腹血糖水平均有所下降, 其中给药第 2 周二甲双胍组大鼠空腹血糖显著降低 ($P < 0.05$), 给药第 3 周补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组大鼠空腹血糖显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 给药第 4 周补阳还五汤各剂量组和二甲双胍组大鼠空腹血糖显著降低 ($P < 0.01$), 提示补阳还五汤具有一定降血糖作用。

3.2 补阳还五汤对 DCI 大鼠学习记忆的影响

采用 Morris 水迷宫评估大鼠的空间学习记忆能力, 结果如表 3 所示, 在定位航行实验中, 各组大鼠逃避潜伏期均随训练时间延长而呈下降趋势。与对照组比较, 模型组自第 3 天起逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$), 且至第 5 天仍维持较高水平 ($P <$

0.01), 提示模型组大鼠空间学习能力明显受损; 与模型组比较, 各给药组逃避潜伏期均有不同程度缩短, 至训练后期已接近对照组水平, 其中第 3 天补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组大鼠逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$), 第 4、5 天补阳还五汤各剂量组和二甲双胍组大鼠逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

空间探索实验结果如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠目标象限移动距离、停留时间及穿越平台次数明显减少 ($P < 0.01$), 表明其空间记忆保持能力下降; 与模型组比较, 各给药组大鼠目标象限移动距离、停留时间及穿越平台次数均明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明补阳还五汤可改善 DCI 大鼠的学习记忆能力。

3.3 补阳还五汤对 DCI 大鼠海马组织 CA1 区病理变化的影响

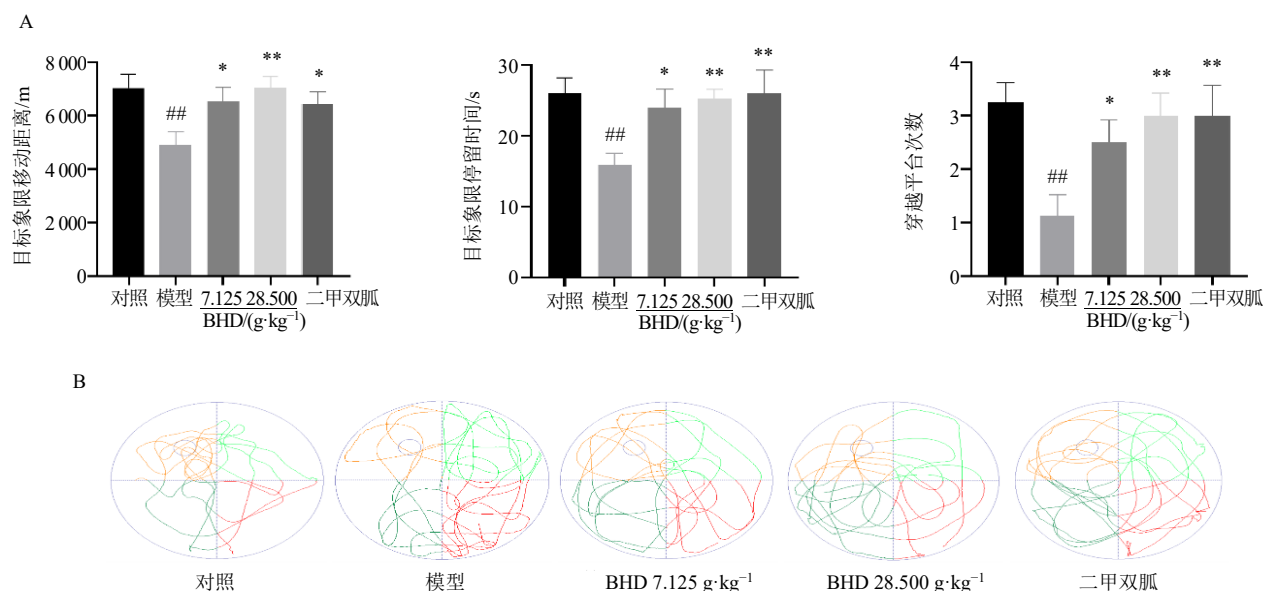
如图 2 所示, 对照组大鼠海马 CA1 区神经细胞排列紧密, 形态完整, 轮廓清晰, 细胞核清晰可见; 模型组细胞排列分散, 间隙增大, 边界模糊,

表 2 补阳还五汤对 DCI 大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effect of Buyang Huanwu Decoction on fasting blood glucose in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	—	5.60 ± 0.26	5.38 ± 0.24	5.86 ± 0.86	5.51 ± 0.65
模型	—	23.83 ± 2.43 ^{##}	25.39 ± 1.59 ^{##}	26.70 ± 2.16 ^{##}	29.71 ± 2.38 ^{##}
补阳还五汤	7.125	24.19 ± 1.81	24.46 ± 3.32	23.98 ± 2.36	21.78 ± 3.08**
	28.500	24.26 ± 1.37	22.80 ± 2.32	21.18 ± 2.19*	20.05 ± 1.96**
二甲双胍	0.2	23.86 ± 1.95	22.05 ± 2.86*	19.64 ± 1.94**	18.05 ± 0.95**

表 3 补阳还五汤对 DCI 大鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 3 Effect of Buyang Huanwu Decoction on escape latency in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

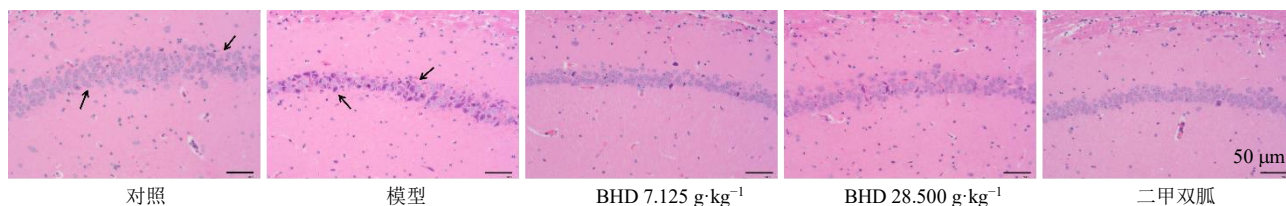
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照	—	76.59 ± 20.24	38.10 ± 24.67	28.58 ± 14.29	17.89 ± 10.52	20.15 ± 10.17
模型	—	75.58 ± 26.37	65.22 ± 30.79	62.92 ± 24.29 ^{##}	63.75 ± 21.66 ^{##}	57.54 ± 24.13 ^{##}
补阳还五汤	7.125	71.22 ± 26.90	49.24 ± 34.42	51.32 ± 25.02	37.38 ± 28.56*	29.23 ± 4.85*
	28.500	74.09 ± 18.19	47.72 ± 32.57	32.34 ± 33.90*	23.99 ± 24.71**	21.93 ± 10.82**
二甲双胍	0.2	83.10 ± 19.43	62.13 ± 20.61	32.75 ± 22.73*	26.94 ± 15.46*	25.97 ± 20.92**



BHD-补阳还五汤; 与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 3、4 同。
BHD-Buyang Huanwu Decoction; ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figs. 3, 4.

图 1 补阳还五汤对 DCI 大鼠空间探索实验中相关指标 (A) 和运动轨迹 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on relevant indicators (A) and movement trajectories (B) in spatial exploration experiments in DCI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)



黑色箭头表示海马 CA1 区神经细胞。
Back arrows indicate neurons in CA1 region of hippocampus.

图 2 补阳还五汤对 DCI 大鼠海马组织 CA1 区病理变化的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwu Decoction on pathological changes in hippocampal CA1 region of DCI rats (HE, $\times 400$)

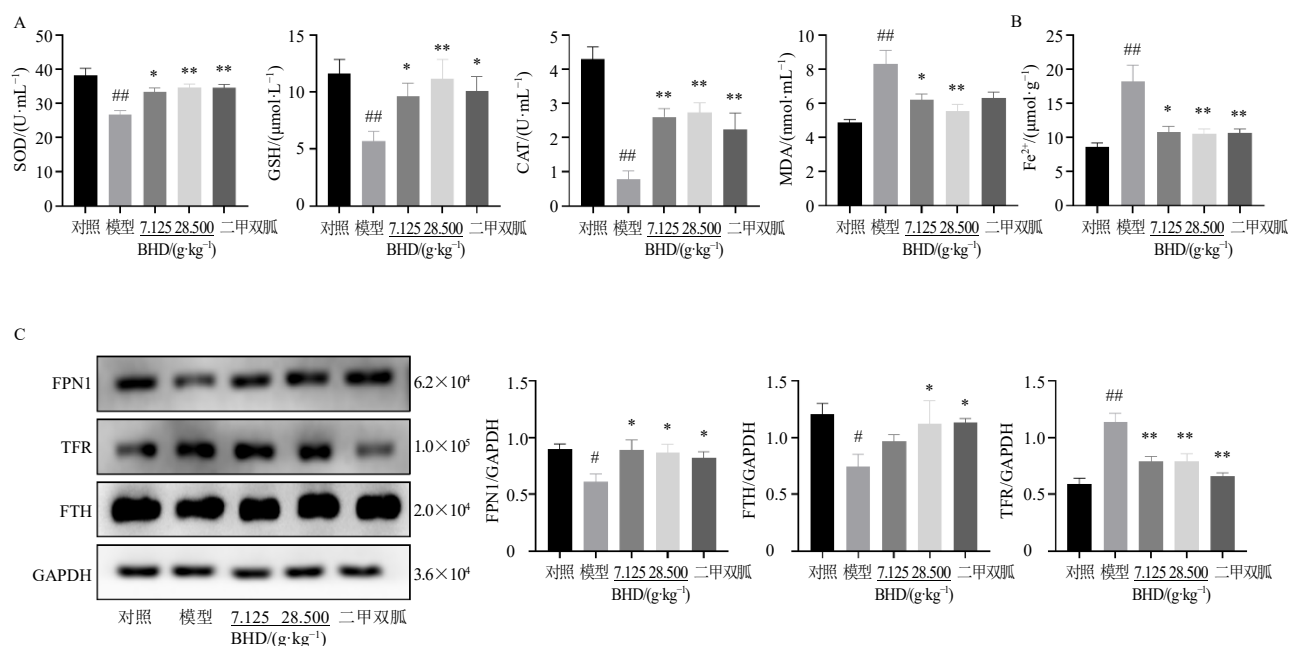
大量核固缩, 细胞坏死增多; 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组和二甲双胍组神经细胞病理损伤有明显改善, 细胞死亡减少, 排列较为紧凑, 形态较为圆润, 其中补阳还五汤高剂量组改善作用更为明显。

3.4 补阳还五汤对 DCI 大鼠氧化应激、Fe²⁺水平及铁代谢相关蛋白表达的影响

如图 3-A 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 补阳还五汤低、高剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示

补阳还五汤可减轻 DCI 大鼠氧化应激损伤。

如图 3-B 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠脑中 Fe²⁺水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 Fe²⁺水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 3-C 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织 TFR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), FPN1、FTH 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠海马组织 TFR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), FPN1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组 FTH 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。上述结果提示补阳还五汤可改善 DCI 大鼠铁代谢紊乱。



A-各组大鼠血清中氧化应激相关指标比较 ($n=8$); B-各组大鼠脑组织 Fe^{2+} 含量比较 ($n=8$); C-各组大鼠海马组织铁代谢相关蛋白表达 ($n=3$)。A-comparison of oxidative stress-related indicators in serum of rats in each group ($n=8$); B-comparison of Fe^{2+} content in brain tissue of rats in each group ($n=8$); C-expressions of iron metabolism-related proteins in hippocampal tissue of rats in each group ($n=3$).

图3 补阳还五汤对 DCI 大鼠氧化应激、 Fe^{2+} 水平及铁代谢相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwu Decoction on levels of oxidative stress, Fe^{2+} and expressions of iron metabolism-related proteins in DCI rats ($\bar{x} \pm s$)

3.5 补阳还五汤对 DCI 大鼠海马组织 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达的影响

免疫组化结果如图 4-A、B 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马 CA1 区 Nrf2 和 GPX4 蛋白阳性表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组大鼠海马 CA1 区 Nrf2 蛋白阳性表达显著升高 ($P<0.05$),各给药组大鼠海马 CA1 区 GPX4 蛋白阳性表达显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

Western blotting 结果如图 4-C 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马组织 Keap1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$),Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,补阳还五汤高剂量组和二甲双胍组大鼠海马组织 Keap1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),Nrf2、GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01);各给药组 SLC7A11 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$);补阳还五汤低、高剂量组 HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 葡萄糖干预 SHSY-5Y 细胞浓度确定

如图 5 所示,随着葡萄糖浓度的增加,SHSY-

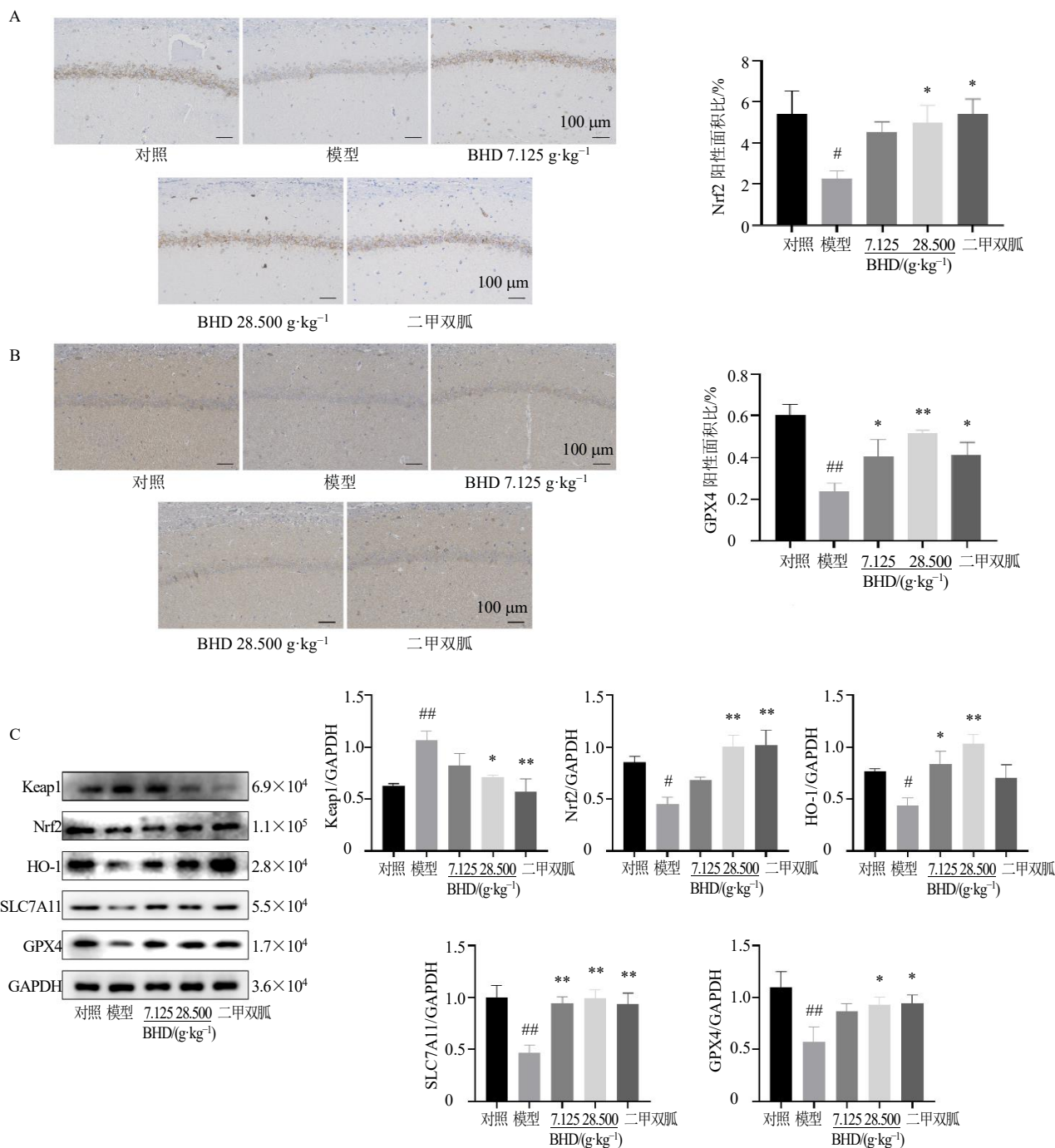
5Y 细胞存活率逐渐下降。当葡萄糖浓度为 160 mmol/L 时,显著抑制 SHSY-5Y 细胞增殖 ($P<0.01$),因此选用 160 mmol/L 作为葡萄糖造模浓度。

3.7 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞增殖的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤低、高剂量含药血清组细胞存活率显著升高 ($P<0.01$);与补阳还五汤高剂量含药血清组比较,补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组细胞存活率显著降低 ($P<0.05$)。

3.8 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞氧化应激水平及线粒体膜电位的影响

如图 7-A 所示,与对照组比较,模型组 SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著降低 ($P<0.01$),MDA 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤低、高剂量含药血清组 SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),补阳还五汤高剂量含药血清组 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$);与补阳还五汤高剂量含药血清组比较,补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组 SOD、CAT 活性及 GSH 水



A、B-各组大鼠海马组织中 Nrf2、GPX4 免疫组化代表图及阳性面积比定量分析 (×200); C-Western blotting 检测各组大鼠海马组织 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达。

A、B-representative immunohistochemical images of Nrf2 and GPX4 in hippocampal tissues of rats in each group and quantitative analysis of positive area ratio (×200); C-expressions of Nrf2/GPX4 signaling pathway-related proteins in hippocampal tissues of rats in each group detected by Western blotting.

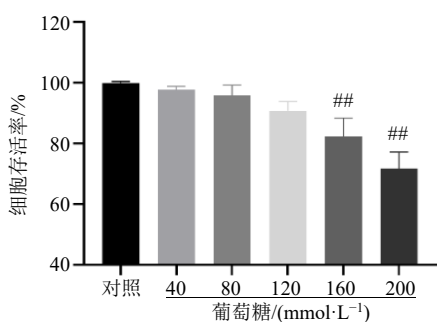
图 4 补阳还五汤对 DCI 大鼠海马组织 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Buyang Huanwu Decoction on expressions of Nrf2/GPX4 signaling pathway related proteins in hippocampal tissue of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

如图 7-B 所示, 与对照组比较, 模型组红色荧

光减弱、绿色荧光增强, 提示高糖诱导可导致 SHSY-5Y 细胞线粒体膜电位降低并引起线粒体功能异常; 与模型组比较, 给予补阳还五汤含药血清干预后细



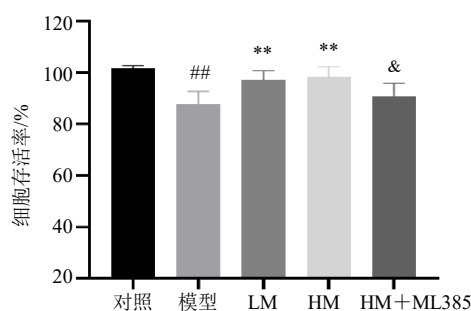
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group.

图 5 不同浓度葡萄糖对 SHSY-5Y 细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of glucose on survival rate of SHSY-5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞红色荧光增强, 绿色荧光减弱, 表明补阳还五汤能够在一定程度上改善高糖诱导的线粒体膜电位下降, 减轻线粒体功能损伤。而加入 ML385 后, 细胞红色荧光减弱、绿色荧光增强, 较补阳还五汤高剂量含药血清组有所下降, 提示 ML385 可部分削弱补阳还五汤对线粒体膜电位的改善作用。



LM-补阳还五汤低剂量含药血清组; HM-补阳还五汤高剂量含药血清组; 与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与补阳还五汤高剂量含药血清组比较: [&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.01$, 图 7、8 同。

LM-Buyang Huanwu Decoction low-dose medicated serum group; HM-Buyang Huanwu Decoction high-dose medicated serum group; ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.01$ vs Buyang Huanwu Decoction high-dose medicated serum group, same as figs. 7, 8.

图 6 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Buyang Huanwu Decoction on proliferation of SHSY-5Y cells induced by high glucose
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

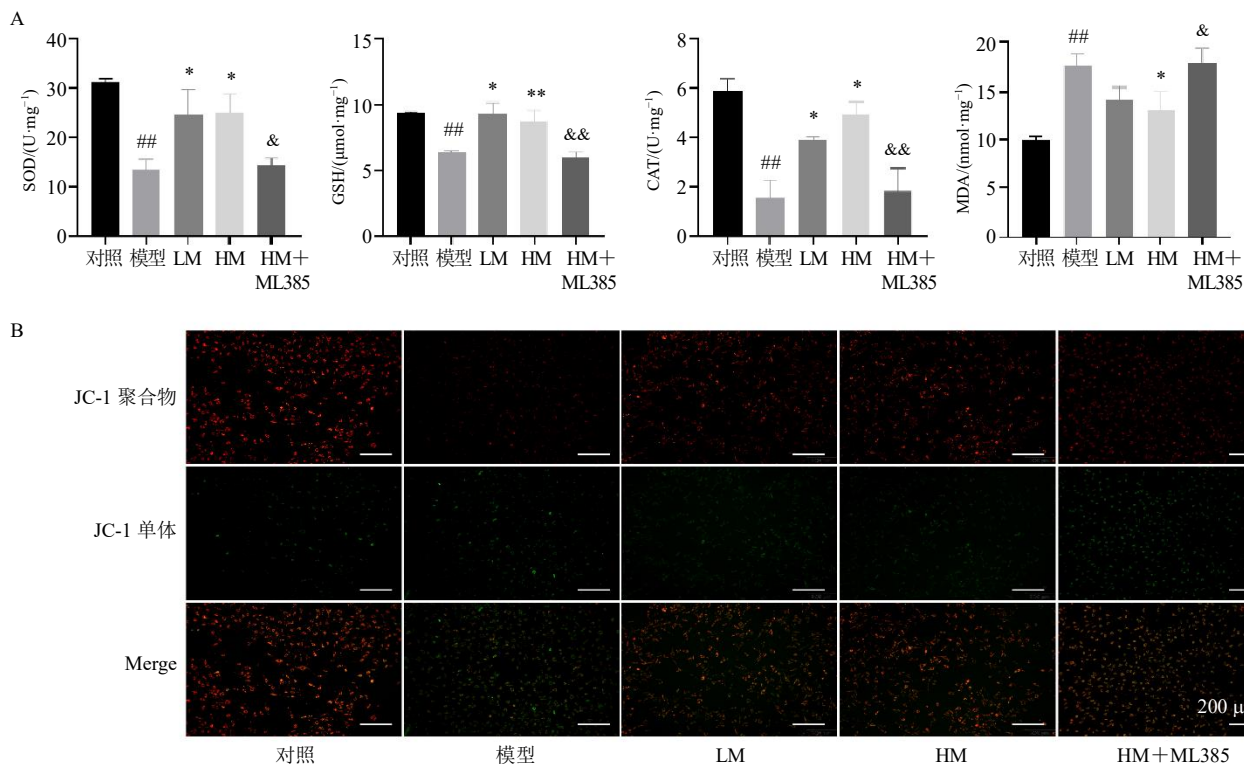


图 7 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞氧化应激 (A) 及线粒体膜电位 (B, ×100) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Buyang Huanwu Decoction on oxidative stress (A) and mitochondrial membrane potential (B, ×100) of SHSY-5Y cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 8 所示,与对照组比较,模型组 Keap1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01);与模型组比较,补阳还五汤各剂量含药血清组 Keap1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), Nrf2、

HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$),补阳还五汤高剂量含药血清组 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01);与补阳还五汤高剂量含药血清组比较,补阳还五汤高剂量含药血清+ML385 组 Keap1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

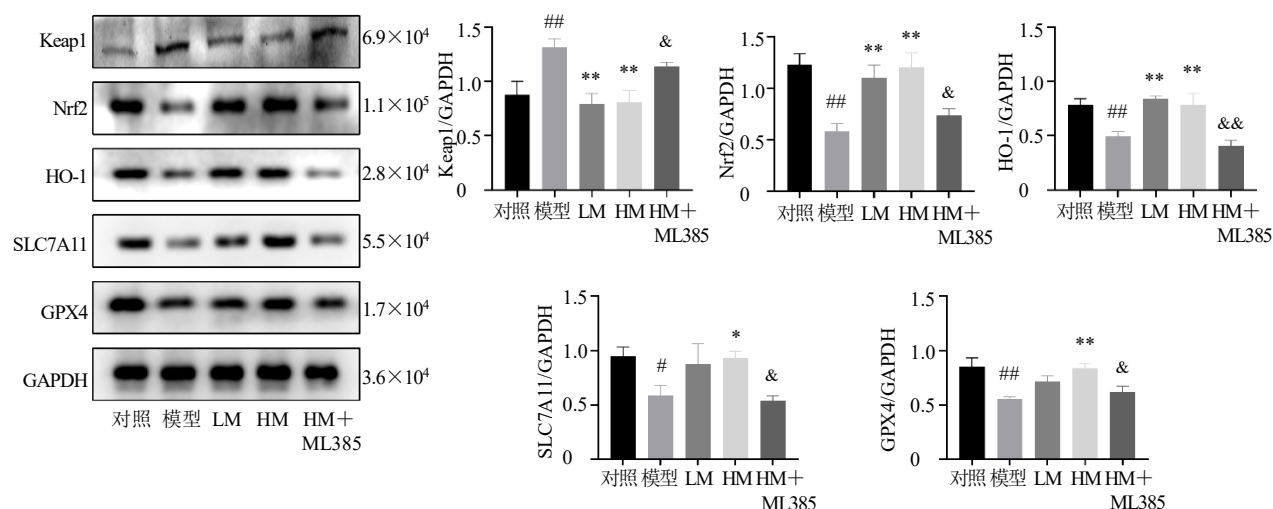


图 8 补阳还五汤对高糖诱导的 SHSY-5Y 细胞 Nrf2/GPX4 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of Buyang Huanwu Decoction on expressions of Nrf2/GPX4 signaling pathway-related proteins of SHSY-5Y cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

中医学上对于 DCI 无明确记载,认为 DCI 属于“消渴”合并“痴呆、健忘”等范畴。研究发现 DCI 的中医证型以瘀血阻络为多^[21]。《医林改错》中记载,所谓“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,即血瘀的产生是因为气虚,因此在治疗血瘀证时,侧重“补气活血”。《血证论》言:“瘀血发渴者,以津液升之……有瘀血,则气为血阻,水津因不能随气上布”。消渴日久,内热炽盛,伤津耗气,气为血之帅,气行则血行,气虚则导致气推动血液功能失常,久而血液运行不畅,瘀血困于脑,瘀血不去则新血不生,阻滞脑络,脑失所养,遂发为脑病,故导致 DCI 的发生^[22]。可见瘀血作为主要病理产物贯穿 DCI 始终。长期高血糖状态可导致血液黏稠度与聚集性升高、血液流变性下降,血液出现“黏、浓、凝、聚”的状态,血流缓慢导致瘀血内存,血液运行不畅并引发微循环障碍,最终引起脑组织灌溉不足及缺血缺氧^[23]。瘀血不去则新血难生,组织因而失于濡养。长期高血糖可使神经细胞处于持续代谢应激状态,线粒体电子传递链

负荷增加,活性氧大量生成,从而损伤神经细胞膜、蛋白质及 DNA,破坏神经元微环境稳态^[24]。同时,脑部微循环障碍、慢性脑灌注不足、线粒体功能异常及氧化应激等改变也被认为与认知功能下降密切相关,这一过程与“久瘀令喜忘”所揭示的瘀滞于内、神失所居而致呆病的病理认识相契合^[25]。在此基础上,持续氧化应激可进一步打破氧化-抗氧化平衡,使脂质过氧化产物大量积聚,同时铁代谢紊乱导致游离 Fe^{2+} 增加,激活铁死亡相关信号通路,放大脂质过氧化损伤,并在 GPX4 等抗氧化防御功能不足时诱发神经元铁死亡^[26-27]。

中医药在治疗疾病具有整体观念、辨证论治的优势,通过益气养阴、补肾填精、活血化瘀、化痰开窍等治法治疗 DCI^[28-30]。补阳还五汤中黄芪大补元气,气旺以促血行,则瘀去络通,为君药,当归活血通络而不伤血为臣药,赤芍、川芎、桃仁、红花使活血祛瘀之力大增,地龙力专善走,共为佐使,诸药合用,可有补气、活血、散瘀、通络之效^[31]。羟基红花黄色素 A 为红花中代表性活性成分,已有研究表明其可在糖尿病相关血管损伤模型中调控

SLC7A11、GPX4 等抗铁死亡相关分子,减轻氧化应激和铁死亡^[32]。芍药苷为赤芍中的主要单体成分,可通过激活相关信号通路抑制氧化应激,改善帕金森小鼠的运动功能障碍及神经元死亡^[33]。阿魏酸为当归、川芎等药材中的重要酚酸类成分,具有清除自由基、抑制脂质过氧化的作用,研究显示其可上调 Nrf2 相关抗氧化反应并抑制铁死亡诱导剂 erastin 诱导的铁死亡^[34]。此外,黄芪来源的异黄酮类成分如毛蕊异黄酮,亦被报道具有抗氧化、保护线粒体功能及调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路减轻神经元铁死亡的潜力^[35-36]。因此,补阳还五汤并非单一成分发挥作用,而可能通过其中多类活性成分协同调控,共同发挥抗氧化和抗铁死亡作用。

本研究通过高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 注射法构建 DCI 大鼠模型,大鼠造模后出现体质量下降、血糖升高及多饮、多食、多尿等典型 T2DM 特征,并且表现出认知记忆能力的下降^[37]。海马是大脑参与认知和记忆的重要区域,对高血糖非常敏感,其损伤可引发认知障碍。HE 结果显示,模型组大鼠海马 CA1 区神经细胞损伤明显,细胞皱缩,细胞核深染。上述结果提示,持续的高血糖可导致大鼠学习及记忆功能受损。而经补阳还五汤干预后,各组大鼠血糖下降,逃避潜伏期缩短,穿越平台次数、目标象限移动距离及停留时间增加,海马 CA1 区神经细胞形态恢复,排列整齐,提示补阳还五汤能够改善 DCI 大鼠的认知功能及神经损伤。

已有研究表明,铁死亡参与 DCI 及多种中枢神经系统疾病发生^[38-39]。铁死亡的本质特征包括铁离子依赖性的脂质过氧化积聚及细胞氧化还原稳态失衡,因此调控细胞氧化还原稳态的关键分子可能在铁死亡过程中发挥重要作用^[40]。Nrf2 是氧化应激反应中的重要因子,生理条件下, Nrf2 与 Keap1 特异性结合并处于相对失活状态。当细胞受氧化应激刺激时, Nrf2 从 Keap1 解离并转位入核,进而激活 HO-1、SOD 等抗氧化基因的表达,从而增强组织抗氧化能力^[41]。Nrf2 基因敲除小鼠表现出氧化应激标志物的增加并伴有空间学习和记忆的缺陷,也可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路有效抑制 DCI 大鼠体内氧化应激损伤^[42-43]。上述研究均提示 Nrf2 在抑制氧化应激及改善认知功能发挥了重要作用。除调控氧化应激外, Nrf2 还可调节多种铁死亡相关基因表达并参与铁死亡过程,其活性升高可降低细胞对铁死亡的敏感性,并减轻神经元损伤^[44]。SLC7A11 与

GPX4 被认为是 Nrf2 的潜在下游靶点,上调两者表达可增强细胞抗铁死亡能力^[45]。其中, SLC7A11 负责将胱氨酸转运入胞,为 GSH 合成提供底物。GSH 作为重要的非酶性抗氧化物质,可清除活性氧并维持细胞氧化还原稳态。而 GPX4 为 GSH 依赖性抗氧化酶,能够将脂质过氧化物还原为无毒脂质醇,从而抑制脂质过氧化^[46]。已有研究指出,通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路可减轻铁死亡并改善阿尔茨海默病动物模型的认知障碍^[47]。本研究结果显示,补阳还五汤干预能够降低大鼠海马组织和 SHSY-5Y 细胞中 MDA 水平和 Keap1 蛋白表达,上调 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达,并且升高线粒体膜电位,改善线粒体功能异常。以上结果提示其可能通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路,改善抗氧化系统失衡、降低脂质过氧化物产生并保护线粒体功能,从而减轻神经元损伤。加入 Nrf2 抑制剂 ML385 后,补阳还五汤的改善作用被明显削弱甚至部分抵消,提示该信号通路可能是其发挥神经保护效应的重要分子基础。

铁是维持脑功能活动的重要微量元素,现有的研究表明,铁代谢紊乱与认知损伤密切相关,而铁的摄取、储存与输出等过程都会影响铁沉积^[48]。体内游离的 Fe^{3+} 与转铁蛋白结合后,经 TFR 识别以复合物的形式进入到细胞内,并被还原成 Fe^{2+} 随后被转运至细胞质。 Fe^{2+} 可通过 Fenton 反应促进脂质过氧化物生成并放大氧化损伤。而 FTH 作为铁蛋白的组成部分,通过储存过量的 Fe^{2+} 以维持铁池的平衡^[49]。研究发现,敲除 FTH 后小鼠皮质铁代谢稳态被打破,并且能够加重创伤性脑损伤,促进神经元铁死亡^[50]。FPN1 作为输出蛋白,可将 Fe^{2+} 转运至胞外。细胞通过吸收、转运、储存、排泄等环节共同维持铁稳态,从而降低铁过载相关损伤并增强对铁死亡的抵抗能力^[51]。陈娟等^[52]研究发现,补阳还五汤能够调控铁转运相关蛋白的表达,促进脑铁代谢平衡进而改善脑缺血再灌注所致的神经损伤。本研究结果显示,补阳还五汤可以降低 DCI 大鼠脑组织中 Fe^{2+} 蓄积,下调海马组织中 TFR 的表达并上调 FPN1、FTH 的蛋白表达,提示其可能通过改善铁代谢紊乱来缓解 DCI 大鼠脑内铁过载,从而减轻神经损伤。

本研究通过体内外实验,初步验证了补阳还五汤通过调控 Nrf2/GPX4 信号通路改善 DCI 的作用机制,并结合铁代谢等相关指标提示其可能参与铁

死亡调控。然而,铁死亡的发生涉及复杂分子网络,本研究仅在细胞水平采用 Nrf2 抑制剂 ML385 进行干预,尚未使用铁死亡的激动剂或抑制剂以及动物水平反向验证的证据进一步证实其因果关系。此外,本研究体外高糖诱导模型未设置甘露醇等渗对照组,不能完全排除渗透压变化对细胞活力的潜在影响。因此,未来将通过设置等渗对照、建立铁死亡相关模型并结合技术干预手段,进一步探究补阳还五汤在调控铁死亡过程中的具体作用。

综上,补阳还五汤可改善 DCI 大鼠学习记忆能力,减轻海马组织病理损伤,缓解氧化应激和铁代谢紊乱,其神经保护作用可能与激活 Nrf2/GPX4 信号通路并调控铁死亡相关过程有关。本研究为补阳还五汤防治 DCI 提供了实验依据,也为靶向铁死亡的 DCI 干预策略提供了新的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang W L, Yan Y J, Yi C M, *et al.* Targeting ferroptosis in the neurovascular unit: A promising approach for treating diabetic cognitive impairment [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142: 113146.
- [2] Chatterjee S, Peters S A E, Woodward M, *et al.* Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: A pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100 000 cases of dementia [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(2): 300-307.
- [3] Kan W, Qu M J, Wang Y Y, *et al.* A review of type 2 diabetes mellitus and cognitive impairment [J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1624472.
- [4] Ma M, Jing G C, Tian Y, *et al.* Ferroptosis in cognitive impairment associated with diabetes and Alzheimer's disease: Mechanistic insights and new therapeutic opportunities [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(2): 2435-2449.
- [5] An J R, Su J N, Sun G Y, *et al.* Liraglutide alleviates cognitive deficit in db/db mice: Involvement in oxidative stress, iron overload, and ferroptosis [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(2): 279-294.
- [6] 黄伟, 李倩, 朱继田. 基于 Nrf2/GPX4 通路研究枸杞多糖对缺氧/复氧诱导的心肌细胞铁死亡的影响 [J]. *中草药*, 2025, 56(10): 3568-3576.
- [7] Zhan Y Y, Su F Z, Zhu E L, *et al.* A systematical review on traditional Chinese medicine treating chronic diseases via regulating ferroptosis from the perspective of experimental evidence and clinical application [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 246-260.
- [8] Wang Y L, Yan S, Liu X M, *et al.* PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(10): 1982-1995.
- [9] Shi Y S, Chen J C, Lin L, *et al.* Dendrobine rescues cognitive dysfunction in diabetic encephalopathy by inhibiting ferroptosis via activating Nrf2/GPX4 axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154993.
- [10] Meng H, Xie Z Y, Xu T, *et al.* Sitagliptin inhibits neuronal ferroptosis to alleviate cognitive dysfunction by activating Nrf2-SLC7A11-GPX4 axis in diabetic mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 167: 115672.
- [11] Hua W, Sun Y L, Sun M Z, *et al.* Exogenous hydrogen sulphide alleviates diabetes-associated cognitive decline by inhibiting ferroptosis through Nrf2/GPX4 signalling pathway [J]. *Life Sci*, 2026, 388: 124220.
- [12] Qin Y Y, Hu S L, Mawen S M, *et al.* Neuroprotective mechanisms of Buyang Huanwu Decoction in ischemic stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1620533.
- [13] 李海英, 贺鹏, 李文姣, 等. 补阳还五汤化学成分、药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. *中草药*, 2024, 55(13): 4575-4587.
- [14] Cui X M, Wang S, Xu S J, *et al.* The therapeutic effect of Buyang Huanwu Decoction on mild cognitive impairment (MCI) in patients with diabetes [J]. *Int J Neurosci*, 2025, 135(7): 827-835.
- [15] 郑琳琳. 补阳还五汤调控 Nrf2/HO-1 通路抑制铁死亡改善糖尿病肾病的机制研究 [D]. 石家庄: 河北中医药大学, 2024.
- [16] 饶政清, 梅志刚, 葛金文, 等. 脑泰方调控细胞铁转运抑制铁死亡保护脑卒中缺血损伤的机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6552-6560.
- [17] 孙泽萱, 张雨涵, 石勇, 等. 黄芪-知母对大鼠糖尿病认知功能障碍及海马组织 JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. *中南药学*, 2024, 22(10): 2643-2649.
- [18] 张瑞华, 石勇, 曹珊珊, 等. 基于 Ghrelin 水平调控探讨玉液汤对 2 型糖尿病大鼠认知障碍的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16): 35-41.
- [19] 邓畅, 邹莹洁, 张泓, 等. 电针对血管性痴呆大鼠血脑屏障及海马促炎细胞因子的影响 [J]. *针刺研究*, 2022, 47(10): 885-890.
- [20] Malojirao V H, Vasquez V, Kodavati M, *et al.* Hemin-induced transient senescence via DNA damage response: A neuroprotective mechanism against ferroptosis in intracerebral hemorrhage [J]. *Commun Biol*, 2025, 8: 622.
- [21] 刘晓歌, 王旭. 基于气血理论探讨糖尿病认知障碍 [J]. *中医药学报*, 2021, 49(6): 5-8.
- [22] 孙大伟, 冯丽莎, 吴晓翠, 等. 基于 Sirt1 探讨糖尿病脑病“瘀毒阻络”中医病机及治法 [J]. *中医学报*, 2019, 34(8): 1621-1624.
- [23] 周吉, 王海燕, 王子晨, 等. 基于“脉络学说”和“瘀血理论”探讨糖尿病大血管病变氧化应激机制 [J]. *河北中医*, 2024, 46(3): 485-488.
- [24] 陆梦兰. 固肾泄浊和络方对糖尿病肾病大鼠肾脏的保

- 护作用及对 Wnt/ β -catenin 通路的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [25] 唐杰, 赵峰, 虞鹤鸣. 基于“脾肾”脏腑理论探讨缺血性脑白质病变的病机及中医药治疗 [J]. 内蒙古中医药, 2024, 43(6): 144-146.
- [26] 李顺意, 梁永林, 白敏, 等. 基于脂质过氧化物蓄积诱发神经元铁死亡探讨认知障碍“毒损脑络”的病机本质 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2026, 32(4): 730-734.
- [27] 高利娜, 巩婷, 胡亮亮, 等. 基于“瘀血”探讨铁代谢失衡与卒中后认知障碍的相关性 [J]. 现代中西医结合杂志, 2024, 33(8): 1091-1095.
- [28] 张梦婷, 谭爱华, 戴新华. 基于代谢重编程探讨“肾虚髓减”型糖尿病认知功能障碍的机理 [J]. 中医药导报, 2025, 31(1): 158-163.
- [29] 姚文强, 王旭, 张擎. 王旭“瘀致消变”诊疗思想探赜 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(9): 1540-1543.
- [30] 李全, 贾斯婷, 关慧波. 地黄饮子辅助治疗肾虚髓减型 2 型糖尿病合并轻度认知功能障碍的临床疗效观察 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2): 410-412.
- [31] 郑琳琳, 边东, 郭登洲. 补阳还五汤对糖尿病肾病小鼠 Nrf2/HO-1 通路的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(4): 42-47.
- [32] Rong J J, Li C Y, Zhang Q, *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits endothelial cell ferroptosis in diabetic atherosclerosis mice by regulating miR-429/SLC7A11 [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 404-415.
- [33] Zhang J Y, Bai Q Y, Wen Q T, *et al.* Paeoniflorin protects 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mice by inhibiting oxidative stress and neuronal apoptosis through activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *NeuroReport*, 2023, 34(5): 255-266.
- [34] Kose T, Sharp P A, Latunde-Dada G O. Upregulation of Nrf2 signalling and the inhibition of erastin-induced ferroptosis by ferulic acid in MIN6 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15886.
- [35] Li Q, He B H, Xiong Y. Calycosin attenuates neuronal ferroptosis in Alzheimer's disease mice by activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Gpb*, 2025, 44(5): 363-375.
- [36] Han Q C, Shi J L, Yu Y D, *et al.* Calycosin alleviates ferroptosis and attenuates doxorubicin-induced myocardial injury via the Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1497733.
- [37] 石勇, 曹珊珊, 张瑞华, 等. 手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2023, 21(12): 3179-3185.
- [38] Wang F, Liu X Z, Chen M Y, *et al.* Neuroprotective role of CHCHD2 in Parkinson's disease: Insights into the GPX4-related ferroptosis pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 226: 348-363.
- [39] 安继仁, 刘天宇, 石岩, 等. 中药复方益糖康对 db/db 小鼠认知障碍的改善及铁死亡的作用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(6): 2309-2318.
- [40] Wang B, Zhu S, Guo M, *et al.* Artemisinin ameliorates cognitive decline by inhibiting hippocampal neuronal ferroptosis via Nrf2 activation in T2DM mice [J]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 35.
- [41] 公艳霞, 白敏, 闫丰喆, 等. 参七糖络丸调控 Keap1/Nrf2/GPX4 轴抑制铁死亡改善 2 型糖尿病认知障碍的机制 [J]. 中药药理与临床, 2025, 41(12): 18-23.
- [42] Singh A K, Ruiz D, Pandey V K, *et al.* Targeted activation of Nrf2 at sites of oxidative stress reverses doxorubicin-induced cognitive impairments in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2025, 129: 547-556.
- [43] Zhang L, Ma Q H, Zhou Y L. Strawberry leaf extract treatment alleviates cognitive impairment by activating Nrf2/HO-1 signaling in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 201.
- [44] Abdalkader M, Lampinen R, Kanninen K M, *et al.* Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 466.
- [45] 吴爱英, 刘锦洪, 贾沛芝, 等. 基于 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路探讨清解扶正颗粒诱导结直肠癌细胞铁死亡的实验研究 [J]. 中医药信息, 2026, 43(4): 24-29.
- [46] 刘健, 陈莹, 梁亚杰, 等. 原花青素 B₂ 通过 Nrf2/HO-1/xCT/GPX4 轴抑制氧化应激减轻 H₂O₂ 诱导的人少突胶质细胞的损伤 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(9): 1735-1743.
- [47] 樊赟, 窦润鹏, 胡久略, 等. 茯苓酸通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路调控铁死亡改善阿尔茨海默病大鼠认知障碍的研究 [J]. 中国全科医学, 2024, 27(2): 177-183.
- [48] Jamrus P, Pholngam N, Kiatpakdee B, *et al.* Iron induces blood-brain barrier alteration contributing to cognitive impairment in β -thalassaemia mice [J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 533.
- [49] Jung H Y, Kim W, Hahn K R, *et al.* Pyridoxine deficiency exacerbates neuronal damage after ischemia by increasing oxidative stress and reduces proliferating cells and neuroblasts in the gerbil hippocampus [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5551.
- [50] Rui T Y, Wang H C, Li Q Q, *et al.* Deletion of ferritin H in neurons counteracts the protective effect of melatonin against traumatic brain injury-induced ferroptosis [J]. *J Pineal Res*, 2021, 70(2): e12704.
- [51] Galy B, Conrad M, Muckenthaler M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(2): 133-155.
- [52] 陈娟, 暴军, 张颖, 等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织铁转运相关蛋白的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5231-5236.