

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.10.011

舒筋健脑方对脑性瘫痪模型大鼠脑组织神经修复及 PI3K-AKT-mTOR 通路的影响

于睿钦, 莫岩君, 张厚君, 刘港, 周卓萃, 阮泽辰, 徐林, 穆晓红✉

北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700

[摘要] **目的** 探讨舒筋健脑方治疗脑性瘫痪的可能作用机制。**方法** 将 30 只 7 日龄 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和舒筋健脑方组, 每组 10 只。模型组与舒筋健脑方组采用经典 Rice-Vannucci 模型方法建立脑性瘫痪模型。造模成功后舒筋健脑方组大鼠予舒筋健脑方 16 g/(kg·d) 灌胃, 正常组与模型组予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次。干预 1 周后检测大鼠体质量, 进行 Zea-Longa 评分及翻身实验、后肢悬吊实验评估; HE 染色和尼氏染色观察脑组织病理形态, 并计算尼氏染色阳性神经元数量; ELISA 法检测脑组织炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量; 免疫荧光法检测脑组织神经丝蛋白 200 (NF200)、髓鞘碱性蛋白 (MBP) 水平; Western Blot 法检测脑组织磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 蛋白水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠 Zea-Longa 评分升高, 后肢悬吊实验评分降低 ($P<0.01$); 病理结果显示脑组织大脑皮层结构松散、海马萎缩, 脑细胞损伤, IL-1 β 、TNF- α 含量升高, 皮层及海马 CA1 区尼氏染色阳性神经元数量减少, NF200、MBP 免疫荧光强度及 PI3K、mTOR 蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 舒筋健脑方组大鼠 Zea-Longa 评分降低, 后肢悬吊实验评分升高 ($P<0.05$); 舒筋健脑方组脑组织病理损伤有所改善, IL-1 β 、TNF- α 含量降低, 皮层及海马 CA1 区尼氏染色阳性神经元数量增多, NF200、MBP 免疫荧光强度及 PI3K、mTOR 蛋白水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠体质量、翻身时间、脑组织 AKT 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 舒筋健脑方可改善脑性瘫痪模型大鼠的神经功能, 发挥神经修复作用, 其作用机制可能与降低脑组织炎症反应和激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

[关键词] 脑性瘫痪; 脑损伤; 神经修复; 舒筋健脑方; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

脑性瘫痪 (cerebral palsy, CP) 简称脑瘫, 是患儿在围产期脑发育未成熟阶段受到损害, 形成以运动障碍和姿势异常为主的综合征^[1]。脑瘫是导致儿童肢体致残的主要疾病之一, 也是伴随终身的疾病, 严重影响患者身心健康和生活质量^[2]。因此, 研究脑瘫发病机制以及干预措施, 延缓和减轻脑瘫患者肢体残疾的发生和发展至关重要。脑瘫可归属于中医学“五迟”“五硬”范畴。舒筋健脑方是本

团队临床治疗脑瘫的经验方, 由补阳还五汤加减化裁而来, 具有补益肝肾、祛风通络之功。前期临床研究表明, 舒筋健脑方可以改善脑瘫患者的运动能力与认知功能^[3-4]。缺血缺氧脑损伤是脑瘫的重要成因之一, 炎症反应与氧化应激产生大量促炎因子 [如白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等] 及脂质过氧化产物, 导致神经元死亡、脑细胞分化和髓鞘损伤^[5]。前期实验研究发现, 舒筋健脑方可以减轻缺血缺氧脑瘫大鼠模型海马细胞损伤, 抑制炎症因子表达, 从而减轻脑组织缺血缺氧损伤和大脑皮质的组织炎症反应^[6-7]。另外, 本团队通过基因生物信息学分析和网络药理学

基金项目: 国家自然科学基金 (82305282); 北京市自然科学基金 (7222281); 北京中医药大学东直门医院临床研究和成果转化能力提升试点项目 (DZMG-XZYY-23007)

✉ 通讯作者: muxiaohong@163.com

分析发现, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (AKT) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路是脑瘫治疗的重要靶点^[8]。PI3K/AKT/mTOR 通路在神经修复 (尤其是脑瘫) 中的作用近年来受到广泛关注, 其调控机制与抑制细胞凋亡、调节炎症反应等途径有关^[9]。因此, 本研究从神经修复及 PI3K/AKT/mTOR 通路方面探究舒筋健脑方治疗脑瘫的可能作用机制, 为其临床应用提供客观依据。本实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心伦理审查委员会审批 (批号: IBTCMCACMS21-2304-01)。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只, 7 日龄, 体质量 11~14 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2023-0006。所有大鼠饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级环境下, 温度 22 ℃, 湿度 40%~50%, 12 h 光/暗循环, 标准饲料喂养, 自由活动。

1.2 药物

舒筋健脑方组成: 黄芪 9 g, 杜仲 6 g, 牛膝 6 g, 益智仁 6 g, 当归 9 g, 赤芍 9 g, 伸筋草 12 g, 透骨草 12 g, 钩藤 6 g。颗粒剂由北京同仁堂 (集团) 有限责任公司生产, 3.5 g/袋, 货号: 20240627。

1.3 主要试剂与仪器

异氟烷 (货号: R510-22-10), 瑞沃德生命科技股份有限公司; 戊巴比妥钠 (货号: 57330), 德国默克公司; IL-1 β (货号: JM-01454R2)、TNF- α (货号: JM-01587R1) ELISA 测定试剂盒, 江苏晶美生物科技有限公司; 苏木精-伊红染液试剂盒 (货号: B1002)、牛血清白蛋白 (BSA, 货号: B0018)、CY3 标记山羊抗兔二抗 (货号: B100802)、DAPI (货号: B0011), 武汉百仟度生物科技有限公司; 活性蛋白提取试剂盒 (货号: KGP10100), 江苏凯基生物技术股份有限公司; RIPA 裂解缓冲液 (货号: C1053), 北京普利莱基因技术有限公司; PI3K 抗体 (货号: 20584-1-AP)、AKT 抗体 (货号: 10176-2-AP)、mTOR 抗体 (货号: 66888-1-Ig), 武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (货号: 7054), 美国 CST 公司; 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (货号: ab8245), 英国 Abcam 公司; 神经丝蛋白 200 (NF200) 抗体 (货号: bs-10680R), 北京博奥森生物技术有限公

司; 髓鞘碱性蛋白 (MBP) 抗体 (货号: GB12226), 武汉赛维尔生物科技有限公司。

JE1001 型电子天平, 杭州恒仪仪表科技有限公司; RB-200 型智能热板仪, 成都泰盟科技有限公司; R500IE 通用型小动物吸入麻醉机, 瑞沃德生命科技股份有限公司; AR8100 型氧气检测仪, 香港希玛仪器仪表有限公司; RM2016 型病理切片机, 上海徕卡仪器有限公司; Eclipse-CI 型荧光显微镜、DS-U3 型凝胶成像系统, 日本尼康公司; PowerPac Basic 型稳压稳流电泳仪, 美国伯乐公司。

1.4 分组、造模及给药

将 30 只 7 日龄 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、舒筋健脑方组, 每组 10 只。模型组、舒筋健脑方组大鼠采用经典 Rice-Vannucci 模型^[10-11]建立脑瘫模型: 采用异氟烷吸入麻醉 (诱导麻醉浓度为 3.0 vol%), 持续低剂量麻醉 (维持麻醉浓度为 1.5 vol%); 颈前路正中入路消毒, 分离皮下组织筋膜, 显露左侧颈总动脉, 采用两端结扎中间切断的方式阻断颈动脉血供, 止血缝合, 再次消毒切口, 保暖复苏大鼠后, 放入密闭缺氧箱, 密闭箱中气体组成为 92% 氮气和 8% 氧气, 将密闭箱放入 39 ℃ 水浴中保持恒温, 2.5 h 结束缺氧环境, 将大鼠放回饲养笼。正常组除不进行颈动脉结扎外, 其余操作同模型组。造模 24 h 后采用 Zea-Longa 评分^[12]进行模型评价, 评分 1~3 分为造模成功。

所有大鼠均造模成功, 按照动物与人体表面积剂量体积换算法^[13], 并根据前期研究结果^[6-7], 舒筋健脑方组大鼠给予舒筋健脑方溶液 (将 3.73 g 舒筋健脑方颗粒充分溶于 50 ml 生理盐水中以配制溶液) 16 g/(kg·d) 灌胃, 正常组与模型组大鼠予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 持续干预 1 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 体质量、Zea-Longa 评分及行为学指标比较 最后一次灌胃后次日, 检测各组大鼠体质量, 进行 Zea-Longa 评分以评估大鼠神经功能损伤的严重程度。Zea-Longa 评分标准^[12]: 正常表示无神经功能缺损, 计 0 分; 左侧前爪不能完全伸展表示轻度神经功能缺损, 计 1 分; 行走时向瘫痪侧转圈表示中度神经功能缺损, 计 2 分; 行走时向瘫痪侧倾倒表示重度神经功能缺损, 计 3 分; 不能自发行走表示有意识丧失, 计 4 分。重复评分 3 次, 取平均值。行为学指标: 1) 采用翻身实验评估大鼠的原始反射^[14]: 将大鼠背靠在棉布垫上, 保持该姿势 5 s 后释放大鼠, 记录大鼠回到俯卧位置所需的时

间, 每只大鼠重复 3 次取平均值。2) 采用后肢悬吊实验评估大鼠后肢力量^[15]: 使用 50 ml 的锥形离心管, 用湿棉球填充, 将大鼠面朝下放入离心管内, 使其后肢悬挂在离心管的边缘上, 放开大鼠, 观察其后肢姿势并进行评分。评分标准^[15]: 后肢分离正常, 尾巴抬起, 计 4 分; 后肢虚弱且靠得较近, 但很少接触, 计 3 分; 后肢相互靠近, 经常接触, 计 2 分; 后肢明显虚弱, 几乎总是抱在一起, 尾巴翘起, 计 1 分; 后肢不断抓紧, 尾巴放低, 或在任何一段时间内都抓不住管子, 计 0 分。

1.5.2 ELISA 法检测脑组织炎症因子含量 行为学检测结束后, 各组大鼠予腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 麻醉, 经 4% 多聚甲醛心脏灌注, 取大鼠脑组织, 采用随机数字表法选取 3 只用于 HE 染色和尼氏染色; 剩余 7 只再采用随机数字表法选取 3 只用于免疫荧光法和 Western Blot 法检测, 最后 4 只用于 ELISA 法检测。

取大鼠脑组织 50 mg, 加入 1 ml 匀浆缓冲液, 用匀浆器充分匀浆, 4℃、3000 r/min 离心 15 min (离心半径 13.5 cm) 后取上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.3 HE 染色、尼氏染色观察脑组织病理形态

取大鼠脑组织, 长度为 1 cm。采用全自动脱水机脱水后进行石蜡包埋, 制作石蜡切片, 厚 4 μ m, 进行 HE 染色、尼氏染色, 封片后于光学显微镜下扫描观察。使用 ImageJ 1.8.0 软件统计尼氏染色阳性的神经元数量 (只计入形态结构正常的神经元, 视野四周未完整截取到的神经元不计入)。

1.5.4 免疫荧光法检测脑组织 NF200、MBP 水平 取大鼠脑组织进行切片脱蜡、乙醇梯度脱水后, EDTA 修复液抗原修复。切片甩干后加入自发荧光淬灭剂 5 min, 流水冲洗 10 min, 3% BSA 孵育封闭 30 min。去除封闭液后, 滴加 NF200 (稀释比例为 1:100)、MBP (稀释比例为 1:1000) 一抗, 4℃孵育过夜。PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 滴加对

应二抗 (稀释比例为 1:200), 避光室温孵育 1 h。PBS 漂洗后滴入 DAPI 复染细胞核, 避光室温孵育 10 min。甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片, 激光共聚焦显微镜下观察并采集图像, 并通过 Image J 1.8.0 软件半定量分析蛋白阳性表达荧光强度。

1.5.5 Western Blot 法检测脑组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平 取大鼠脑组织研磨后加入适量 RAPI 裂解液裂解, 提取组织总蛋白上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。每组取等量蛋白上样, 电泳转膜后, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别滴加一抗 (PI3K、AKT、mTOR 稀释浓度均为 1:1000), 过夜后 TBST 冲洗, 加入相应二抗 (稀释浓度为 1:4000) 室温孵育 1 h, ECL 发光法行胶片曝光, 使用 Image J 1.8.0 软件测定蛋白灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软进行统计分析。计量资料均符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 满足方差齐性多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法检验; 方差不齐采用 Dunnett- T^3 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、Zea-Longa 评分及行为学指标比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠 Zea-Longa 评分升高, 后肢悬吊实验评分降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 舒筋健脑方组大鼠 Zea-Longa 评分降低, 后肢悬吊实验评分升高 ($P<0.05$)。各组大鼠体质量及翻身时间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α 含量均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 舒筋健脑方组大鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α 含量均降低 ($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠体质量、Zea-Longa 评分、翻身时间、后肢悬吊实验评分比较

Table 1 Comparison of body mass, Zea-Longa score, body-turning time, and scores of hind limb suspension experiment

in rats of each group					
组别	鼠数	体质量/g	Zea-Longa 评分/分	翻身时间/s	后肢悬吊实验评分/分
正常组	10	25.89 $\pm$ 2.82	0	1.92 $\pm$ 0.19	4.00 $\pm$ 0.00
模型组	10	25.41 $\pm$ 3.07	1.30 $\pm$ 0.67 ^{a)}	1.91 $\pm$ 0.24	3.00 $\pm$ 0.82 ^{a)}
舒筋健脑方组	10	25.94 $\pm$ 2.89	0.80 $\pm$ 0.79 ^{b)}	1.94 $\pm$ 0.18	3.30 $\pm$ 0.67 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α 含量比较
Table 2 Comparison of IL-1β and TNF-α content in brain tissue of rats in each group (pg·ml⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1β	TNF-α
正常组	4	19.42±2.16	41.73±4.21
模型组	4	71.79±6.08 ^{a)}	102.93±15.12 ^{a)}
舒筋健脑方组	4	43.12±4.21 ^{b)}	63.49±4.72 ^{b)}

注：IL-1β，白细胞介素 1β；TNF-α，肿瘤坏死因子 α。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

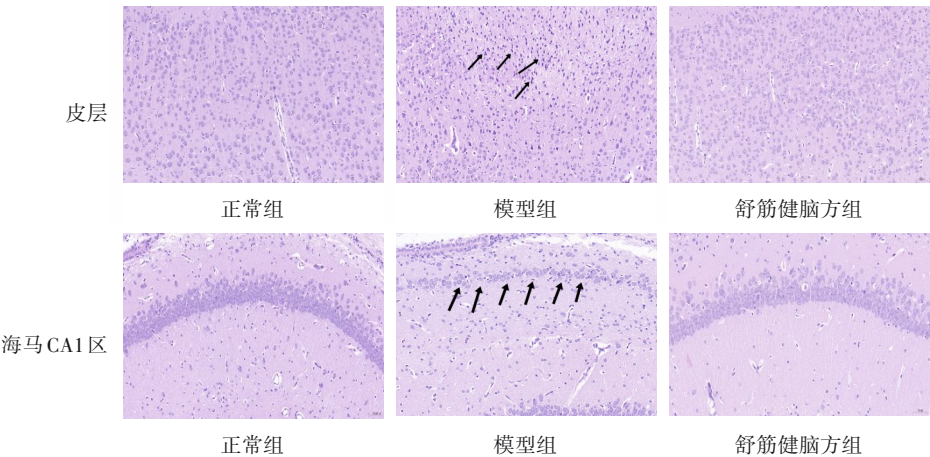
2.3 各组大鼠脑组织 HE 染色结果比较

图 1 示，正常组大鼠的大脑皮层与海马结构整齐，细胞排列紧密，细胞密度较高，染色较均匀，细胞核清晰，无明显的细胞损伤迹象。模型组大鼠的大脑皮层结构松散、海马萎缩，细胞分布稀疏，细胞密度下降，细胞间隙增大，细胞核固缩，轮廓不清楚，细胞变性较多，神经元数目显著减少。舒

筋健脑方组大鼠大脑皮层与海马结构接近正常，细胞排列较整齐，少量细胞核固缩，但较模型组程度轻，病理损伤有一定程度的改善。

2.4 各组大鼠脑组织尼氏染色结果比较

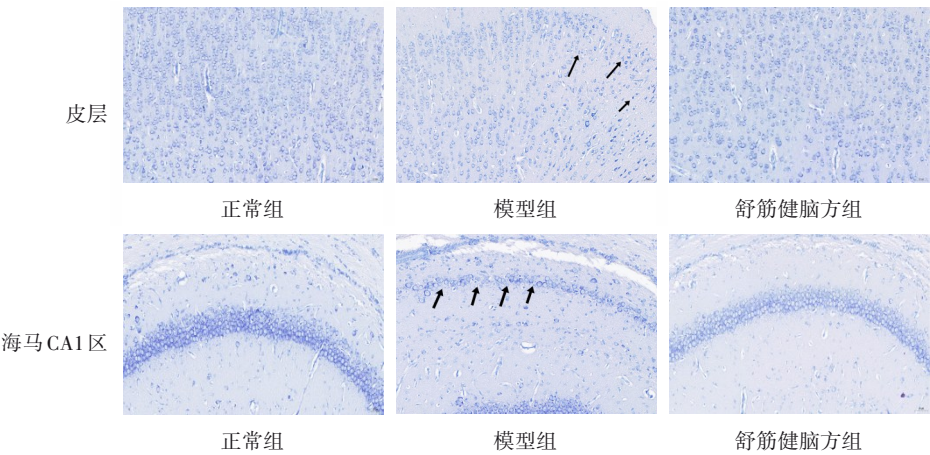
图 2 示，正常组大鼠大脑皮层与海马神经元排列均匀整齐，形态结构完整，尼氏染色阳性神经元数量丰富；模型组大鼠大脑皮层与海马神经元排列紊乱，形态不规则，尼氏染色阳性神经元数量较少；与模型组比较，舒筋健脑方组大鼠大脑皮层与海马神经元排列较为密集，尼氏染色阳性神经元数量较多。表 3 示，与正常组比较，模型组大鼠脑组织皮层及海马 CA1 区尼氏染色阳性神经元数量减少 ($P<0.01$)。与模型组比较，舒筋健脑方组大鼠脑组织皮层及海马 CA1 区尼氏染色阳性神经元数量增多 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注：皮层中黑色箭头指示为细胞变性；海马 CA1 区中黑色箭头指示为神经元数目显著减少。

图1 各组大鼠脑组织 HE 染色图 (×200)

Figure 1 HE staining of rat brain tissue in each group (×200)



注：黑色箭头指示为神经元。

图2 各组大鼠脑组织尼氏染色图 (×200)

Figure 2 Nissen staining of rat brain tissue in each group (×200)

表3 各组大鼠脑组织尼氏染色阳性神经元数量比较
Table 3 Comparison of the number of Niehl's staining positive neurons in rat brain tissue of each group (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	皮层	海马CA1区
正常组	3	437.00±29.82	335.67±16.04
模型组	3	313.33±14.53 ^{a)}	172.33±11.93 ^{a)}
舒筋健脑方组	3	366.33±21.13 ^{b)}	298.33±10.07 ^{c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.5 各组大鼠脑组织NF200、MBP免疫荧光强度比较

表4示，与正常组比较，模型组大鼠脑组织NF200、MBP免疫荧光强度均降低（ $P<0.01$ ）。与

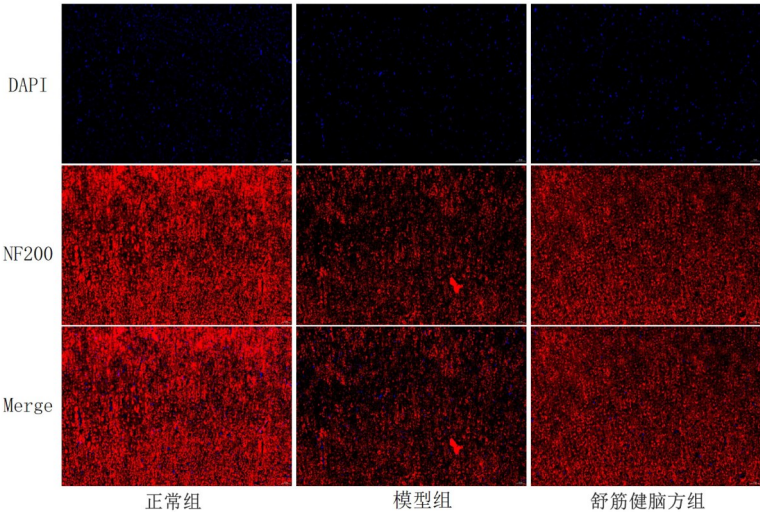
模型组比较，舒筋健脑方组大鼠脑组织NF200、MBP免疫荧光强度均升高（ $P<0.01$ ）。各组大鼠脑组织NF200、MBP免疫荧光染色图分别见图3、图4。

表4 各组大鼠脑组织NF200、MBP免疫荧光强度比较
Table 4 Comparison of the intensity of NF200 and MBP immunofluorescence in rat brain tissue of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NF200	Mbp
正常组	3	82.18±1.67	78.21±2.77
模型组	3	52.38±3.53 ^{a)}	49.97±4.48 ^{a)}
舒筋健脑方组	3	70.05±2.61 ^{b)}	68.93±2.24 ^{b)}

注：NF200，神经丝蛋白200；MBP，髓鞘碱性蛋白。

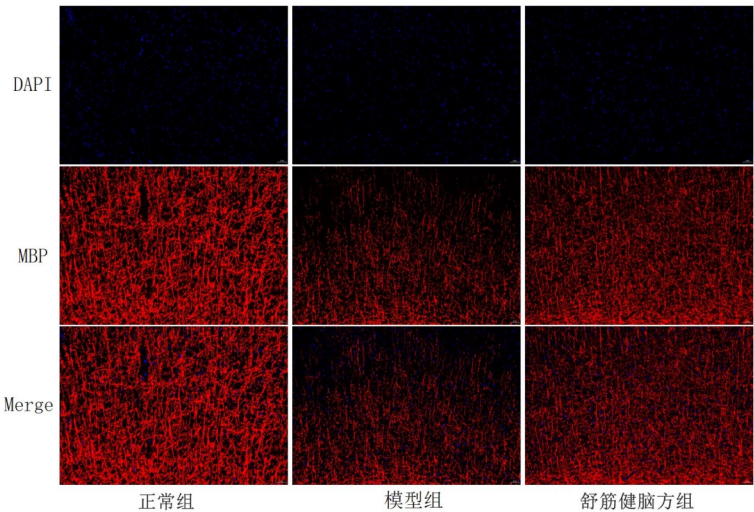
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。



注：NF200，神经丝蛋白200；红色荧光为NF200阳性表达，蓝色为DAPI。

图3 各组大鼠脑组织NF200免疫荧光染色图（×200）

Figure 3 Immunofluorescence staining of NF200 in rat brain cortex in each group (×200)



注：MBP，髓鞘碱性蛋白；红色荧光为MBP阳性表达，蓝色为DAPI。

图4 各组大鼠脑组织MBP免疫荧光染色图（×200）

Figure 4 Immunofluorescence staining of MBP in rat brain cortex in each group (×200)

2.6 各组大鼠脑组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平比较

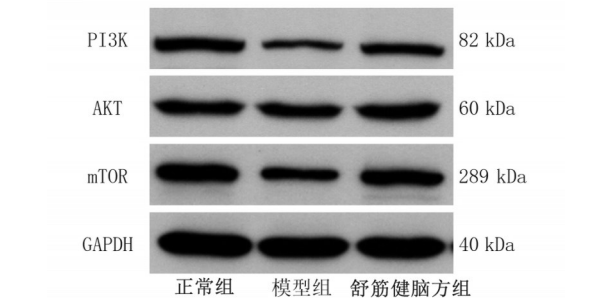
表 5 示，与正常组比较，模型组大鼠脑组织 PI3K、mTOR 蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，舒筋健脑方组大鼠脑组织 PI3K、mTOR 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。各组大鼠脑组织 AKT 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠脑组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白电泳图见图 5。

表 5 各组大鼠脑组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平比较
Table 5 Comparison of PI3K, AKT and mTOR protein levels in rat brain tissue between groups (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PI3K	AKT	mTOR
正常组	3	0.46±0.07	0.49±0.09	0.42±0.07
模型组	3	0.22±0.09 ^{a)}	0.46±0.05	0.20±0.07 ^{b)}
舒筋健脑方组	3	0.36±0.13 ^{c)}	0.51±0.07	0.35±0.03 ^{c)}

注：PI3K，磷脂酰肌醇 3-激酶；AKT，蛋白激酶 B；mTOR，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：PI3K，磷脂酰肌醇 3-激酶；AKT，蛋白激酶 B；mTOR，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。

图 5 各组大鼠脑组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白电泳图
Figure 5 Electrophoresis of PI3K, AKT, and mTOR proteins in rat brain tissue of each group

3 讨论

脑瘫作为一种神经系统伤残综合征，其病因病机及证候较为复杂。中医学认为，脑瘫多由先天禀赋不足，肝肾亏虚，后天失养，脾胃虚弱，气血化源不足，不能荣养五脏，脏腑功能失调，加上感染、产伤等因素导致患儿脑络损伤，或者毒素蓄积，脑部气血运行受阻，最终导致患儿骨脉不强、肌肉痿弱、发育迟缓^[16]。脑瘫虚损主要为肝肾、脑髓不足，治疗以补为主，兼以祛邪，标本兼顾。舒筋健脑方具有补益肝肾、祛风通络之功，方中大量补气药与少量活血化瘀药同用，体现了益气活血法，使气虚得补，经络得通，补气而不壅滞。黄芪

补气升阳，使气旺血行；益智仁温补肾气，暖脾固精健脑；当归、赤芍、杜仲养血活血，化瘀而不伤血；钩藤擅长清热平肝，熄风止痉；牛膝、伸筋草、透骨草活血舒筋，祛风通经。

本研究采用的 Rice-Vannucci 模型是最常用的脑瘫动物模型，通过结扎单侧颈总动脉构建脑缺血条件，通过外部低氧环境构建脑缺氧条件，使大鼠在大脑发育的关键时期受到脑损伤从而模拟脑瘫的缺血缺氧脑损伤状态^[11]。本团队前期研究显示，舒筋健脑方高剂量 [16 g/(kg·d)] 对保护大鼠脑组织细胞疗效不亚于米诺环素^[6-7]。因此，本实验采用 16 g/(kg·d) 剂量进行干预，未设计不同的舒筋健脑方剂量组及西药组，仅探讨舒筋健脑方对神经修复和 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响。本研究结果显示，脑瘫模型大鼠 Zea-Longa 评分较正常大鼠升高，后肢悬吊实验评分则降低，而舒筋健脑方干预后 Zea-Longa 评分降低、后肢悬吊实验评分升高，说明舒筋健脑方可改善脑瘫模型大鼠神经功能损伤和后肢运动能力。各组大鼠体质量比较差异无统计学意义，可能是由于干预周期较短（7 天）而未充分显现体质量的变化。翻身实验反映了大鼠的原始反射情况，在出生后大约 5 天出现^[14]。本研究中各组大鼠翻身时间比较差异无统计学意义，原因可能涉及神经系统代偿调节，促使大鼠翻身反射在短期内得以恢复，后续研究可增设多个观测时间点以进一步揭示行为学差异。

神经修复是改善脑瘫患者运动功能，治疗该疾病的突破点。近年来，国内外研究者进行了多种神经修复策略，包括干细胞治疗、物理治疗和功能性电刺激等^[17]，这些方法旨在促进神经再生和功能重建，但突破性的临床应用尚未出现。研究^[18]表明，损伤神经的再生需要使受损神经元活跃，进入轴突易生长状态，并促进轴突跨越损伤区域，完成轴突再生过程中的髓鞘重组。脑瘫患者中枢和周围神经纤维均有明显脱髓鞘表现，使神经异常放电、动作电位准确，轴突髓鞘的重组是此过程的关键^[19]。NF200 与 MBP 是神经损伤和神经修复的重要标志物。NF200 作为神经细胞的骨架蛋白主要成分，为轴突提供结构支持，与髓鞘密切相关，是神经系统的重要物质成分，也是轴突损伤的生物标志物^[20]。MBP 是一种重要的髓鞘蛋白，起到维持髓鞘结构和功能的关键作用，髓鞘损伤时 MBP 在脑组织内的表达降低^[21]。PI3K/AKT/mTOR 是神经修复的重要通路，参与缺血缺氧脑损伤后抑制炎症反

应、调控细胞凋亡和减轻氧化应激等过程^[9], 并且还参与神经元的增殖、分化、存活, 调控突触形成和再生等过程^[22]。mTOR 是通路中关键的下游效应分子, 其受到 PI3K 和 AKT 的调控, 并与 PI3K、AKT 协同作用^[23]。mTOR 主要通过调控 mTOR 复合体 1 (mTORC1) 和 mTOR 复合体 2 (mTORC2) 的表达以及上调生长因子, 从而促进神经炎症后的受损组织修复; 并且在突触后部位的调节中起着关键作用, 影响突触可塑性和神经递质的释放^[24]。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠脑组织皮层及海马区存在细胞损伤、神经元数量减少, 炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 含量升高, 神经修复相关的标志物 NF200、MBP 降低, PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平降低; 而舒筋健脑方干预后, 上述各指标及脑组织病理损伤均明显改善, 说明舒筋健脑方可以减轻脑瘫模型大鼠脑组织炎症反应, 促进神经修复, 其作用机制可能与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

综上所述, 舒筋健脑方可促进脑瘫模型大鼠的神经元存活、轴突修复与髓鞘重组, 改善其神经功能, 发挥修复与神经保护作用, 其作用机制可能是通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的。本研究的不足之处在于未设计体外实验, 后续我们将进行更深入的实验探究。

参考文献

- [1] 李晓捷, 唐久来, 马丙祥, 等. 脑性瘫痪的定义、诊断标准及临床分型[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(19): 1520.
- [2] 曾杰, 徐林, 邓博文, 等. 脑性瘫痪的外科与康复一体化治疗进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30(7): 635-638, 643.
- [3] 曾杰. 舒筋健脑方应用于痉挛型脑瘫术后康复的临床疗效和实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [4] 赵亚林. 舒筋健脑方对脑瘫患者认知功能影响及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [5] 徐林. 脑性瘫痪现代外科治疗与康复[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 13.
- [6] 姜煜, 徐林, 赵亚林, 等. 舒筋健脑方对缺血缺氧脑瘫模型大鼠细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(28): 4477-4483.
- [7] 刘港, 曾杰, 赵亚林, 等. 舒筋健脑方干预脑瘫模型大鼠减轻大脑皮质的组织炎症反应[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23): 3674-3679.
- [8] 曾杰, 徐林, 赵亚林, 等. 脑瘫差异表达基因生物信息学分析及脑瘫核心驱动基因筛选[J]. 山东医药, 2021, 61(9): 19-23.
- [9] ZHANG J, JIANG H, LIU DH, et al. Effects of dexmedetomidine on myocardial ischemia-reperfusion injury through PI3K-Akt-mTOR signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(15): 6736-6743.
- [10] RICE JE 3RD, VANNUCCI RC, BRIERLEY JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.
- [11] CLOWRY GJ, BASUODAN R, CHAN F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? [J]. Front Neurol, 2014, 5: 258. doi: 10.3389/fneur.2014.00258.
- [12] 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1356-1360.
- [13] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1997, 37(4): 41.
- [14] FEATHER-SCHUSSLER DN, FERGUSON TS. A battery of motor tests in a neonatal mouse model of cerebral palsy[J]. J Vis Exp, 2016, 117: 53569. doi: 10.3791/53569.
- [15] MO Y, ZENG Y, HUO L, et al. Early-stage effect of HIBD on neuro-motor function and organic composition of neurovascular units in neonatal rats[J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1242936. doi: 10.3389/fnins.2023.1242936.
- [16] 曾杰, 赵亚林, 徐林, 等. 基于“五迟五硬”探讨益肾健脾调肝法治疗痉挛型脑瘫的思路[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5071-5073.
- [17] SMITH MJ, PATON MCB, FAHEY MC, et al. Neural stem cell treatment for perinatal brain injury: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. Stem Cells Transl Med, 2021, 10(12): 1621-1636.
- [18] SMITH MJ, FINCH-EDMONDSON M, MILLER SL, et al. Acceptability of neural stem cell therapy for cerebral palsy: survey of the Australian cerebral palsy community[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 18.
- [19] MANOUKIAN OS, RUDRAIAH S, ARUL MR, et al. Biopolymer-nanotube nerve guidance conduit drug delivery for peripheral nerve regeneration: in vivo structural and functional assessment[J]. Bioact Mater, 2021, 6(9): 2881-2893.
- [20] YUAN A, RAO MV, VEERANNA, et al. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(4): a018309.
- [21] ZHOU W, LI W, QU LH, et al. Relationship of plasma

- S100B and MBP with brain damage in preterm infants [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9):16445-16453.
- [22]王静欢. 梓醇调控 microRNA124 调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导细胞活性促轴突生长研究[D]. 重庆:西南大学, 2017.
- [23]曹靖兰,陈婷,张霞,等. PI3K/Akt/mTOR 通路在脑缺血再灌注损伤的分子机制及治疗干预研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2023, 39(16):2812-2816.
- [24]SAXTON RA, SABATINI DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 168(6):960-976.

Effects of *Shujin Jiannao Formula* (舒筋健脑方) on Neural Repair and PI3K-Akt-mTOR Pathway of Brain Tissue in Cerebral Palsy Model Rats

YU Ruiqin, MO Yanjun, ZHANG Houjun, LIU Gang, ZHOU Zhuoluo, RUAN Zechen, XU Lin, MU Xiaohong
Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanisms of *Shujin Jiannao Formula* (舒筋健脑方) for cerebral palsy. **Methods** Thirty 7-day-old SD rats were randomly divided into normal group, model group, and *Shujin Jiannao Formula* group, with 10 rats in each group. The model group and *Shujin Jiannao Formula* group established a cerebral palsy model by the classic Rice-Vannucci method. After successful modeling, rats in *Shujin Jiannao Formula* group were given *Shujin Jiannao Formula* 16 g/(kg·d) by gavage, while the normal group and model group were given normal saline 10 ml/(kg·d) by gavage once a day. After one week of intervention, the rats' body weight was measured, and Zea-Longa scores, the righting reflex test, and the hindlimb suspension test were conducted for assessment; hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe pathological changes in brain tissue, and the number of Nissl-positive neurons was counted; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure levels of inflammatory cytokines in the brain tissue, specifically interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α); immunofluorescence was used to detect the expression levels of neurofilament protein 200 (NF200) and myelin basic protein (MBP) in brain tissue; Western Blot analysis was conducted to determine the protein levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt/PKB/Rac), and mammalian target of rapamycin (mTOR) in brain tissue. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group showed significantly higher Zea-Longa scores and lower scores in the hindlimb suspension test ($P < 0.01$); pathological findings revealed loose structure in the cerebral cortex, hippocampal atrophy, and neuronal damage in brain tissue. Levels of IL-1 β and TNF- α elevated, and the number of Nissl-stained positive neurons in the cortex and hippocampal CA1 region reduced, and immunofluorescence intensity of NF200 and MBP, as well as protein expression levels of PI3K and mTOR, significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, rats in *Shujin Jiannao Formula* group showed decreased Zea-Longa scores and increased hindlimb suspension test scores ($P < 0.05$); pathological damage in brain tissue alleviated, levels of IL-1 β and TNF- α reduced, the number of Nissl-stained positive neurons in the cortex and hippocampal CA1 region increased, and the immunofluorescence intensity of NF200 and MBP, as well as the protein levels of PI3K and mTOR, significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no statistically significant differences among the groups in body weight, body-turning time, or AKT protein levels in brain tissue ($P > 0.05$). **Conclusion** *Shujin Jiannao Formula* can improve the neurological function of rats with cerebral palsy, exert neurorestorative effects, and its mechanism of action may be related to the reduction of inflammatory response in brain tissue and the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords cerebral palsy; brain injury; neural repair; *Shujin Jiannao Formula* (舒筋健脑方); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); protein kinase B (Akt/PKB/Rac); mammalian target of rapamycin (mTOR)

(收稿日期: 2024-12-09; 修回日期: 2025-02-19)

[编辑: 邓媛]