

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.20.012

实验研究

脑泰方对脑小血管病模型大鼠脑白质病变及胼胝体 Wnt/ β -catenin 通路的影响

王香元¹, 梅志刚^{1,2}✉, 葛金文^{1,3}✉

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南省长沙市岳麓区学士路300号, 410208; 2. 三峡大学健康医学院; 3. 湖南省中医药研究院

[摘要] **目的** 从无翅型 MMTV 整合位点家族成员 (Wnt)/ β 连环蛋白 (β -catenin) 通路探讨脑泰方对脑小血管病白质病变的作用及其机制。**方法** 将 10 只 WKY 大鼠作为假手术组, 30 只自发性高血压大鼠 (SHR) 随机分为模型组、脑泰方低剂量组、脑泰方高剂量组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组大鼠采用 D-半乳糖背部皮下注射 56 天造模, 并在造模第 29 天进行双侧颈总动脉狭窄术低灌注 28 天构建复合危险因素脑小血管病大鼠模型。脑泰方低、高剂量组大鼠手术当天分别给予脑泰方 9、27 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组给予 10 ml/(kg·d) 纯水灌胃, 各组大鼠灌胃 4 周。给药前及给药后每周监测大鼠的血压; 造模第 50 天开始连续 6 天进行水迷宫实验; 术前及术后、给药后激光散斑检测脑血流量变化。最后一次灌胃次日取材, 卢卡斯快蓝 (LFB) 和透射电镜观察大鼠胼胝体髓鞘损伤程度, ELISA 法检测大鼠胼胝体白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 10 (IL-10)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β) 水平, 免疫荧光法检测大鼠胼胝体中髓鞘碱性蛋白 (MBP) 表达水平和离子化钙结合适配分子 1 (IBA1)、神经胶质抗原 2 (NG2)、细胞增殖标志物 Ki67 抗原 (Ki67)/NG2、2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶 (CNPase) 表达; Western Blot 法检测胼胝体中 MBP、无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3a (Wnt3a)、磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (p-GSK-3 β)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、磷酸化 β 连环蛋白 (p- β -catenin)、 β -catenin 表达, RT-qPCR 法检测胼胝体中 GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠各时间点收缩压升高, 水迷宫实验中穿越平台次数、目标象限停留时间百分比减少, 第 4 天和第 5 天逃避潜伏期明显延长, 术后及给药后大鼠脑血流量下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); LFB 染色及透射电镜观察可见胼胝体髓鞘损伤明显; 胼胝体中 TNF- α 和 IL-1 β 含量增加, TNF- β 含量降低, MBP 荧光强度和蛋白表达降低, IBA1 阳性细胞数增加, Wnt3a 和 p-GSK-3 β /GSK-3 β 升高, p- β -catenin/ β -catenin 降低, GSK-3 β mRNA 表达降低, β -catenin mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 脑泰方高剂量组大鼠胼胝体髓鞘损伤明显改善, 上述各指标均显著改善 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与脑泰方低剂量组比较, 脑泰方高剂量组胼胝体髓鞘损伤改善, 收缩压降低, 脑血流量及胼胝体中 MBP 荧光强度及蛋白表达, NG2、CNPase 阳性细胞数, p- β -catenin/ β -catenin、GSK-3 β mRNA 表达均升高, Wnt3a 表达、p-GSK-3 β /GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 高剂量脑泰方可显著改善脑小血管病白质病变, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 减轻脑内炎性微环境, 促进少突胶质前体细胞分化成为少突胶质细胞有关。

[关键词] 脑小血管病; 脑白质病变; 髓鞘损伤; 脑泰方; 少突胶质细胞; Wnt/ β -catenin 通路

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2018YFC1704904); 国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目
✉ 通讯作者: 梅志刚, meizhigang@hnuem.edu.cn; 葛金文, 001267@hnuem.edu.cn

脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)是一种脑微血管紊乱导致的病变,影像学上典型的CSVD病变是血管起源的脑白质高信号、腔隙、微出血、血管周围间隙扩大和微梗死^[1]。脑白质特别是脑室周围的脑白质高信号的程度和体积与认知能力下降呈正相关^[2]。由低灌注/缺血引起的脑白质病变是CSVD的核心特征^[3],其病理改变为髓鞘和轴突损伤或丢失,神经纤维稀疏从而导致神经传导减慢影响大脑功能^[4]。研究发现,无翅型MMTV整合位点家族成员(Wnt)/ β 连环蛋白(β -catenin)通路对神经系统的发育和稳态至关重要,其失调可能会导致神经退行性疾病^[5],Wnt/ β -catenin通路激活会阻碍少突胶质细胞系细胞的分化和成熟,加重脱髓鞘损伤^[6]。因此,改善脱髓鞘损伤可能是防治CSVD脑白质病变的有效途径。

脑泰方是本团队研发的专利处方(专利号:ZL201110178359.4),具有益气活血、化瘀通络之功效。前期研究发现,脑泰方治疗高血压脑小血管病,可显著改善患者认知功能和中医证候^[7-9],然其作用机制尚不清楚。因此,本研究从Wnt/ β -catenin通路和脑白质脱髓鞘角度探讨脑泰方治疗CSVD的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究经过湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审批号LL2022120702)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性正常WKY大鼠10只、自发性高血压大鼠(SHR)30只,14周龄,体质量280~300 g,均购自北京维通利华有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009。动物饲养在湖南中医药大学实验动物中心,环境温度20~25℃,湿度60%~70%,12 h明暗循环,自由进食饮水。

1.2 药物

脑泰方组成:黄芪40 g,川芎10 g,地龙15 g,僵蚕15 g。药物颗粒剂由四川新绿色药业科技发展有限公司生产,批号0143432738。每剂脑泰方颗粒溶于蒸馏水30 ml中,配成2.67 g/ml的脑泰方溶液。

1.3 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(货号:p3761),Merck KGaA公司;青霉素(国药准字H23021439),哈药集团股份有限公司;D-半乳糖(货号:V900922),Sigma公司;卢卡斯快蓝(LFB)染液、山羊抗大鼠、山

羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(货号分别为:S191030、PN0052、PN0051、PN0086),皮诺飞生物科技有限公司;预染蛋白Marker(货号:26616),赛默飞公司;逆转录试剂盒(货号:E047)、qPCR扩增试剂盒(货号:E099),近岸蛋白质科技股份有限公司;RNA提取试剂盒(货号:ER501),全式金生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号:CW0014S),康为世纪生物有限公司;白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β)ELISA试剂盒(货号分别为:ZC36391、ZC37624、ZC36379、ZC37625),上海茁彩生物科技有限公司;髓鞘碱性蛋白(MBP,货号:AF4085)、神经胶质抗原2(NG2,货号:DF2589),Affinity公司;磷酸化糖原合成酶激酶3 β (p-GSK3 β ,货号:AB75814),Abcam公司;糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β ,货号:22104-1-AP)、磷酸化 β 连环蛋白(p- β -catenin,货号:80067-1-RR)、 β -actin(货号:20536-1-AP),Proteintech公司;无翅型MMTV整合位点家族成员3a(Wnt3a,货号:HA500193),华安生物有限公司;细胞增殖标志物Ki67抗原(Ki67,货号:10205-2-AP),PTG公司;离子化钙结合适配分子1(IBA1,货号:CY7217),Abways生物公司;钼酸(货号:18456),Ted Pella公司;醋酸铀(货号:02624),SPI公司;枸橼酸铅(货号:512-26-5),武汉贝乐叶生物医药科技有限公司;2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶(CNPase)、DAPI、电镜固定液、RIPA裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂(货号分别为:GB112623、G1012、G1102、G2002、G2007、G2008),Servicebio公司。

电泳仪(型号:153BR90552)、转膜仪(型号:VE-186)、T100TM Thermal Cycler型Real-time PCR扩增仪(型号:621BR25450)、酶标仪(型号:Cytation3)、凝胶成像分析仪(型号:712BR12725),美国BioTek公司;激光散斑成像仪(型号:Moor FLPI),英国Moor公司;大鼠无创血压仪(型号:BP2010AUL),北京软隆生物技术有限公司;病理切片机(型号:RM2016),徕卡公司;脑立体定位仪(型号:ZS-FDC),北京众实科技有限公司;透射电子显微镜(型号:Spectra Ultra S/TEM),赛默飞世尔科技公司。

1.4 分组、造模及给药

将30只SHR采用随机数字表法分为模型组及脑泰方低、高剂量组,每组10只。10只WKY大鼠

作为假手术组。SHR 适应性饲养 7 天后建立 CSVD 大鼠模型^[10]：D-半乳糖 400 mg/(kg·d) 背部皮下注射，每天 1 次，共注射 56 天。于造模第 29 天，对 SHR 进行双侧颈总动脉狭窄手术：2% 戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉后，颈部脱毛，碘伏消毒，沿下巴中线剪开颈部皮肤，钝性分离筋膜、肌肉，剥离出两侧颈总动脉，以 0.45 mm 注射器针头为支撑，用 4-0 缝合线将动脉与针头一起，在近心端和远心端各打一个结，然后抽出针头，缝合颈部皮肤，碘伏消毒；假手术组大鼠仅剥离双侧颈总动脉，不进行其他处理。各组大鼠术后当日开始肌肉注射青霉素 5 天（80 万单位用 4 ml 生理盐水稀释，每日肌肉注射 1 次，每次 0.5 ml）预防感染。造模大鼠出现脑血流量减少，脑组织 LFB 染色及透射电镜检测显示大鼠脑胼胝体髓鞘密度降低、肿胀，神经纤维稀疏，板层结构分离、松散，具有空泡样结构改变，证明造模成功^[10]。

脑泰方低、高剂量组大鼠手术当天开始给予脑泰方颗粒剂 9、27 g/(kg·d) 灌胃，其中低剂量为临床等效剂量，剂量参照《中药药理研究方法学》^[11] 换算。假手术组及模型组予以纯水 10 ml/(kg·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次，共 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 鼠尾血压监测 给药前及给药 1、2、3、4 周后采用抽签法每组随机选择 6 只大鼠用于测量血压，采用无创血压计测量大鼠鼠尾收缩压，测量时间相对固定（11:00—17:00），在 5 min 内，重复测量 5 次，舍去离群值，取剩余数值均数作为血压测量值。

1.5.2 水迷宫实验 造模第 50 天采用抽签法在每组中随机选择 7 只大鼠进行水迷宫实验。前 5 天为定位航行实验，第 1 天水面对平台 1.5 cm，后 4 天平台隐藏于水面下 1 cm，平台固定在第 4 象限，将大鼠从第 1 象限到第 4 象限依次面壁放入水中游泳，记录大鼠登上平台所需时间，即逃避潜伏期，若 90 s 后大鼠未找到平台，则逃避潜伏期记录为 90 s，再将其引导至平台，并在平台上停留 20 s。每天每只大鼠每象限训练 1 次。第 6 天撤掉平台进行空间探索实验，检测动物对空间位置的记忆能力，将大鼠从第 2 象限面壁放入水池中，记录大鼠在 120 s 内穿越原平台位置的次数。

1.5.3 脑血流量检测 行双侧颈总动脉狭窄术前及术后、最后一次灌胃后次日（给药后）取材前测脑血流量。每组采用抽签法随机选取 5 只大鼠，将

麻醉大鼠俯卧位固定在脑立体定位仪上，碘伏消毒头皮，暴露颅骨，用电钻磨薄颅骨直至能在激光散斑成像仪下明显看见血管血流成像，记录脑血流图像（磨薄颅骨不会造成大鼠死亡，也不会对其他指标产生影响，可重复测量）。

1.5.4 LFB 染色评估胼胝体部位髓鞘组织学变化 最后一次灌胃后次日采用抽签法每组随机取 4 只大鼠心脏灌注后断头，取全脑脱水包埋，胼胝体切片用于 LFB 染色、电镜观察和免疫荧光检测；每组剩余 6 只取胼胝体用于 Western Blot 检测，再抽签法每组选取 5 只用于 ELISA 检测、3 只用于 RT-qPCR 检测。石蜡切片脱水脱蜡后置于 LFB 染色液 1 中 4 h（65℃ 提前预热 30 min，并用保鲜膜置于 65℃ 孵育），自来水冲洗至无色，依次入 LFB 染色液 2 和染液 3 中分化 3~5 s，自来水冲洗 2 或 3 次，至神经髓鞘清晰呈蓝色而其他成分为淡蓝色甚至无色，切片脱水透明封片。

1.5.5 透射电镜观察胼胝体髓鞘损伤程度 胼胝体切成 1 mm 厚的组织切片。样本在电镜固定液中 4℃ 浸泡过夜，4℃ 1% 锇酸中固定 2 h，在 1% 醋酸铀酰中染色 1 h，用一系列分级的乙醇脱水，然后包埋在环氧树脂中。用超显微切割机切割样品，醋酸铀酰和柠檬酸铅染色，在透射电子显微镜中观察。

1.5.6 免疫荧光法检测胼胝体内 MBP、IBA1、NG2、Ki67/NG2、CNPase 表达 石蜡切片脱水脱蜡，2×柠檬酸（pH6.0）抗原修复，采用与二抗相同来源的血清进行封闭，37℃ 孵育 30 min。一抗（MBP，1:500；Ki67/NG2，1:200；CNPase，1:200；IBA1，1:200）4℃ 孵育过夜。根据一抗种属选择相应二抗（1:200），37℃ 孵育 1 h。DAPI 染核，封片。MBP 荧光染色结果用荧光强度表示，NG2、Ki67/NG2、CNPase、IBA1 表达采用 Image J（版本号：1.8.0.345）软件根据胼胝体内阳性细胞数目计算。

1.5.7 ELISA 法检测胼胝体炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10、TNF-β 水平 胼胝体匀浆取上清液备用，根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作，在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值。绘制标曲，计算出各样本浓度。

1.5.8 Western Blot 法检测胼胝体中 MBP 及 Wnt/β-catenin 通路蛋白表达 Wnt/β-catenin 通路蛋白包括 Wnt-3a、p-GSK-3β、GSK-3β、p-β-catenin、β-catenin。取胼胝体加入裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂匀浆后取上清。制备蛋白样品，电泳，转膜，封

闭,加入一抗MBP(1:800)、Wnt3a (1:700)、p-GSK-3 β (1:3000)、GSK-3 β (1:6000)、p- β -catenin (1:5000)、 β -catenin (1:4000)。4℃孵育过夜,二抗(1:5000)室温孵育2h,显影,采用Image Lab(版本号:6.0.1.34)对条带灰度值进行分析,MBP、Wnt3a蛋白表达以 β -actin为内参,GSK-3 β 表达以p-GSK-3 β /GSK-3 β 值表示, β -catenin表达以p- β -catenin/ β -catenin值表示。

1.5.9 RT-qPCR法检测胼胝体中GSK-3 β 和 β -catenin mRNA表达 采用全式金RNA提取试剂盒提取胼胝体总RNA,测定样本RNA浓度,以总mRNA为模板,逆转录cDNA,荧光定量扩增,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式对结果进行分析。以 β -actin为内参基因,各引物序列见表1。

表1 大鼠胼胝体中GSK-3 β 和 β -catenin引物序列
Table 1 Primer sequences of GSK-3 β and β -catenin in corpus callosum of rats

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp
GSK-3 β	正向 AGCTGATCTTTGGAGCCACC	563
	反向 AGAAGCGGCGTTATTGCTCT	
β -catenin	正向 ACCATCGAGAGGGCTTGTTG	377
	反向 AGACAGCACCTTCAGCACTC	
β -actin	正向 AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA	575
	反向 AATGCTCGGTACATGGTGG	

注:GSK-3 β ,糖原合成酶激酶3 β ; β -catenin, β 连环蛋白。

1.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行数据分析,计量资料均符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐时多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 法;方差不齐时多组间比较采用Welch检验,组间两两比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。多次重复测量计量资料比较采用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间收缩压比较

表2示,与假手术组同时间比较,其余各组大鼠收缩压均显著升高($P<0.01$)。给药1、2、3、4周,与模型组同时间比较,脑泰方高剂量组收缩压显著降低($P<0.01$),脑泰方低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),且同时间点脑泰方高剂量组收缩压低于脑泰方低剂量组($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠水迷宫实验结果比较

表3示,与假手术组比较,模型组大鼠空间探索实验中穿越平台次数、目标象限停留时间百分比减少,定位航行实验第4天和第5天逃避潜伏期延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,脑泰方高剂量组大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间百分比增加,第4天和第5天逃避潜伏期缩短($P<0.05$);脑泰方低剂量组各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

表2 各组大鼠不同时间收缩压比较

Table 2 Comparison of systolic blood pressure in each group of rats (mmHg, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
假手术组	6	132.50 $\pm$ 5.00	127.97 $\pm$ 5.07	130.03 $\pm$ 7.78	131.40 $\pm$ 7.47	128.20 $\pm$ 4.34
模型组	6	211.90 $\pm$ 5.48 ^{a)}	206.81 $\pm$ 2.77 ^{a)}	211.93 $\pm$ 2.88 ^{a)}	203.43 $\pm$ 8.21 ^{a)}	203.53 $\pm$ 8.39 ^{a)}
脑泰方低剂量组	6	212.30 $\pm$ 7.28 ^{a)}	204.50 $\pm$ 7.77 ^{a)}	203.70 $\pm$ 3.74 ^{a)}	199.20 $\pm$ 8.56 ^{a)}	195.70 $\pm$ 12.99 ^{a)}
脑泰方高剂量组	6	204.60 $\pm$ 9.82 ^{a)}	174.20 $\pm$ 9.77 ^{a) b) c)}	173.87 $\pm$ 11.24 ^{a) b) c)}	172.40 $\pm$ 16.50 ^{a) b) c)}	170.73 $\pm$ 9.20 ^{a) b) c)}

注:a)与假手术组同时间比较, $P<0.01$;b)与模型组同时间比较, $P<0.01$;c)与脑泰方低剂量组同时间比较, $P<0.01$ 。

表3 各组大鼠水迷宫实验结果比较

Table 3 Comparison of indexes related to water maze of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	空间探索实验		定位航行实验逃避潜伏期/s				
		穿越平台次数 /次	目标象限停留时间百分比/%	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术组	7	6.57 $\pm$ 1.62	33.41 $\pm$ 4.60	36.76 $\pm$ 13.62	34.19 $\pm$ 13.29	17.26 $\pm$ 7.09	17.54 $\pm$ 5.25	10.98 $\pm$ 2.85
模型组	7	4.14 $\pm$ 1.77 ^{a)}	25.11 $\pm$ 4.03 ^{a)}	36.69 $\pm$ 8.95	25.14 $\pm$ 8.10	24.03 $\pm$ 8.22	26.37 $\pm$ 12.61 ^{b)}	26.79 $\pm$ 10.30 ^{a)}
脑泰方低剂量组	7	4.43 $\pm$ 1.81	27.30 $\pm$ 4.20	28.04 $\pm$ 13.23	23.82 $\pm$ 14.57	20.14 $\pm$ 14.61	18.15 $\pm$ 5.15	19.26 $\pm$ 13.98
脑泰方高剂量组	7	6.29 $\pm$ 2.21 ^{c)}	31.40 $\pm$ 4.50 ^{c)}	33.99 $\pm$ 8.43	22.19 $\pm$ 5.45	19.30 $\pm$ 7.14	17.72 $\pm$ 4.69 ^{c)}	15.31 $\pm$ 9.80 ^{c)}

注:a)与假手术组比较, $P<0.01$;b)与假手术组比较, $P<0.05$;c)与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠不同时间脑血流量比较

表4示,与假手术组同时间比较,术后及给药后其余各组大鼠脑血流量下降 ($P<0.01$)。给药后与模型组比较,脑泰方低、高剂量组脑血流量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且脑泰方高剂量组脑血流量高于脑泰方低剂量组 ($P<0.01$)。与本组术后比较,给药后脑泰方高、低剂量组脑血流量显著升高 ($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠脑胼胝体LFB染色及透射电镜结果比较

LFB染色结果可见,假手术组大鼠脑胼胝体蓝色最深,髓鞘结构清晰,密度均匀,神经纤维排列整齐,偶见空泡样改变。与假手术组比较,模型组大鼠脑胼胝体髓鞘蓝色变浅,髓鞘密度降低,神经纤维稀疏,伴大量空泡样结构改变。与模型组比较,脑泰方低剂量组胼胝体髓鞘蓝色加深,髓鞘密度增加,神经纤维稀疏程度降低,空泡样结构改变减少;脑泰方高剂量组大鼠脑髓鞘蓝色明显加深,髓鞘密度明显增加,空泡样结构改变明显减少,髓鞘损伤改善程度优于脑泰方低剂量组。详见图1。

透射电镜观察,假手术组大鼠脑胼胝体髓鞘结

构完整、厚度均匀,边缘规则,呈同心圆状排列,有髓神经纤维排列整齐,髓鞘板层结构致密。与假手术组比较,模型组大鼠脑胼胝体髓鞘肿胀,板层结构分离、松散,间断性脱失。与模型组比较,脑泰方低剂量组髓鞘肿胀和板层结构分离程度减轻;脑泰方高剂量组髓鞘肿胀、板层结构分离明显减轻,改善程度优于脑泰方低剂量组。详见图1。

2.5 各组大鼠胼胝体MBP、IBA1、NG2、Ki67/NG2、CNPase表达比较

表5示,与假手术组比较,模型组MBP荧光强度显著降低、IBA1阳性细胞数显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,脑泰方低、高剂量组MBP荧光强度增高、IBA1阳性细胞数降低,脑泰方高剂量组NG2、CNPase阳性细胞数升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与脑泰方低剂量组比较,脑泰方高剂量组MBP荧光强度及NG2、CNPase阳性细胞数均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠Ki67/NG2阳性细胞数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 各组大鼠胼胝体炎症因子含量比较

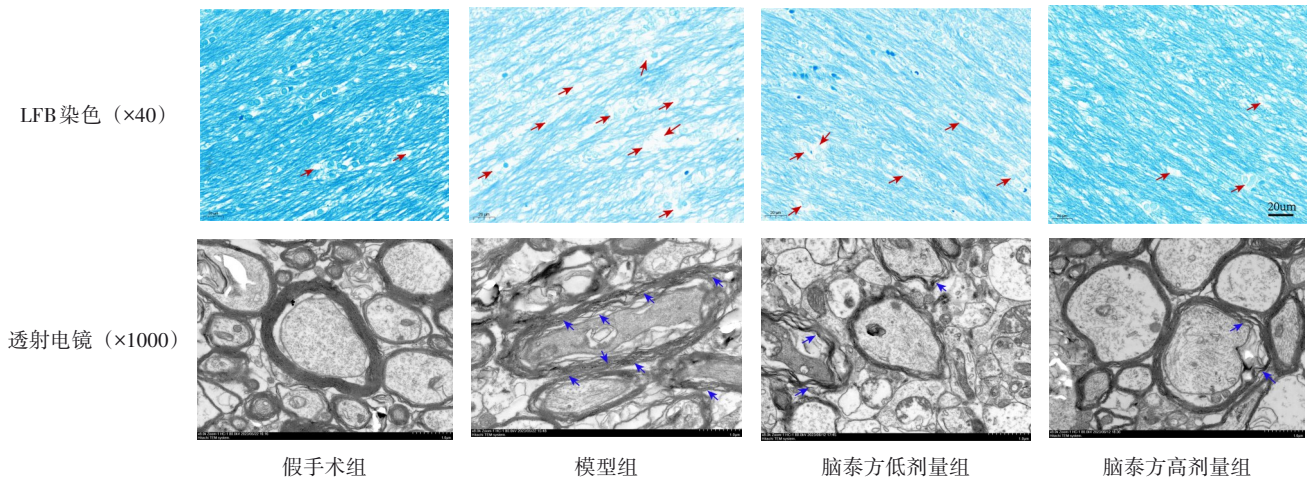
表6示,与假手术组比,模型组促炎因子TNF- α

表4 各组大鼠不同时间脑血流量比较

Table 4 Comparison of cerebral blood flow in each group of rats (PU, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	术前	术后	给药后
假手术组	5	1036.70±65.03	989.00±45.01	1017.85±47.23
模型组	5	1046.70±37.65	842.90±81.89 ^{a)}	818.60±27.98 ^{a)}
脑泰方低剂量组	5	960.44±80.21	709.34±107.60 ^{a)}	879.21±27.10 ^{a) b) c)}
脑泰方高剂量组	5	1000.15±37.03	733.60±40.94 ^{a)}	958.75±47.79 ^{a) c) d) e)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与脑泰方低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与本组术后比较, $P<0.01$ 。



注: 红色箭头指示为空泡样改变, 蓝色箭头指示为髓鞘板层结构分离; LFB, 卢卡斯快蓝。

图1 各组大鼠脑胼胝体髓鞘损伤病理形态图

Figure 1 Pathological morphology of myelin damage in corpus callosum of rats in each group

表5 各组大鼠胼胝体 MBP、IBA1、NG2、Ki67/NG2、CNPase 表达比较

Table 5 Comparison of MBP, IBA1, NG2, Ki67/NG2, and CNPase expression in the corpus callosum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MBP 荧光强度	阳性细胞数/个 $\cdot 0.15 \text{ mm}^{-2}$			
			IBA1	NG2	Ki67/NG2	CNPase
假手术组	4	85.08 $\pm$ 7.79	5.33 $\pm$ 1.53	6.23 $\pm$ 2.55	2.23 $\pm$ 1.68	47.75 $\pm$ 9.74
模型组	4	18.70 $\pm$ 1.59 ^{a)}	12.00 $\pm$ 1.00 ^{a)}	12.20 $\pm$ 7.71	2.48 $\pm$ 1.54	67.25 $\pm$ 13.50
脑泰方低剂量组	4	39.18 $\pm$ 14.29 ^{b)}	7.00 $\pm$ 1.00 ^{c)}	14.23 $\pm$ 2.10	2.80 $\pm$ 0.44	71.00 $\pm$ 9.09
脑泰方高剂量组	4	69.07 $\pm$ 12.95 ^{c) d)}	6.00 $\pm$ 1.00 ^{c)}	26.80 $\pm$ 12.96 ^{c) e)}	3.08 $\pm$ 0.70	101.00 $\pm$ 18.49 ^{c) e)}

注: MBP, 髓鞘碱性蛋白; IBA1, 离子化钙结合适配分子 1; NG2, 神经胶质抗原 2; Ki67, 细胞增殖标志物 Ki67 抗原; CNPase, 2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与脑泰方低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与脑泰方低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

表6 各组大鼠胼胝体 TNF- α 、IL- β 、IL-10、TNF- β 含量比较Table 6 Comparison of the contents of TNF- α , IL- β , IL-10, TNF- β in the corpus callosum of rats in each group ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β	IL-10	TNF- β
假手术组	5	43.11 $\pm$ 4.41	4.43 $\pm$ 1.02	9.44 $\pm$ 0.66	30.33 $\pm$ 3.11
模型组	5	53.39 $\pm$ 6.21 ^{a)}	5.98 $\pm$ 0.54 ^{a)}	10.40 $\pm$ 1.24	26.57 $\pm$ 1.64 ^{b)}
脑泰方低剂量组	5	48.72 $\pm$ 3.30	5.46 $\pm$ 0.29	10.80 $\pm$ 1.98	29.05 $\pm$ 2.76
脑泰方高剂量组	5	46.13 $\pm$ 6.15 ^{c)}	5.01 $\pm$ 0.43 ^{c)}	12.62 $\pm$ 1.26 ^{c)}	32.01 $\pm$ 3.38 ^{d)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL- β , 白细胞介素 1 β ; IL-10, 白细胞介素 10; TNF- β , 肿瘤坏死因子 β 。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与假手术组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

和 IL-1 β 含量升高, 抗炎因子 TNF- β 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比, 脑泰方高剂量组 TNF- α 和 IL-1 β 含量降低, IL-10 和 TNF- β 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脑泰方低剂量组各指标差异无统计意义 ($P > 0.05$)。

2.7 各组大鼠胼胝体中 MBP 及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达比较

表7示, 与假手术组比较, 模型组 MBP 蛋白表达及 p- β -catenin/ β -catenin 降低, Wnt3a、p-GSK-3 β /GSK-3 β 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 脑泰方低、高剂量组 MBP 蛋白表达增高、Wnt3a 表达降低, 脑泰方高剂量组 p-GSK-3 β /GSK-3 β 降低、p- β -catenin/ β -catenin 升高 ($P < 0.01$)。与脑泰方

低剂量组比较, 脑泰方高剂量组 MBP 蛋白表达及 p- β -catenin/ β -catenin 升高, Wnt3a 表达及 p-GSK-3 β /GSK-3 β 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.8 各组大鼠胼胝体中 GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 表达比较

表8示, 与假手术组比较, 模型组 GSK-3 β mRNA 表达降低、 β -catenin mRNA 表达增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 脑泰方低、高剂量组 β -catenin mRNA 表达降低, 脑泰方高剂量组 GSK-3 β mRNA 表达增加 ($P < 0.01$)。与脑泰方低剂量组比较, 脑泰方高剂量组 GSK-3 β mRNA 表达升高、 β -catenin mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表7 各组大鼠胼胝体 MBP 及 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达比较Table 7 Comparison of the expression of MBP and Wnt/ β -catenin pathway-related proteins in the corpus callosum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MBP/ β -actin	Wnt3a/ β -actin	p-GSK-3 β /GSK-3 β	p- β -catenin/ β -catenin
假手术组	6	1.38 $\pm$ 0.29	0.16 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.22	0.70 $\pm$ 0.14
模型组	6	0.20 $\pm$ 0.11 ^{a)}	0.30 $\pm$ 0.08 ^{a)}	1.17 $\pm$ 0.36 ^{b)}	0.50 $\pm$ 0.14 ^{b)}
脑泰方低剂量组	6	0.68 $\pm$ 0.21 ^{c)}	0.20 $\pm$ 0.03 ^{c)}	0.91 $\pm$ 0.34	0.59 $\pm$ 0.13
脑泰方高剂量组	6	1.00 $\pm$ 0.33 ^{c) d)}	0.13 $\pm$ 0.03 ^{c) d)}	0.55 $\pm$ 0.23 ^{c) d)}	0.83 $\pm$ 0.11 ^{c) e)}

注: MBP, 髓鞘碱性蛋白; Wnt, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员; β -catenin, β 连环蛋白; Wnt3a, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3a; p-GSK-3 β , 磷酸化糖原合成酶激酶 3 β ; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; p- β -catenin, 磷酸化 β 连环蛋白。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与假手术组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与脑泰方低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与脑泰方低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

表 8 各组大鼠胼胝体 GSK-3β 和 β-catenin mRNA 表达比较
Table 8 Comparison of GSK-3β and β-catenin mRNA expres-
sion in the corpus callosum of rats in each group (x̄±s)

组别	鼠数	GSK-3β	β-catenin
假手术组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	0.69±0.09 ^{a)}	1.16±0.06 ^{a)}
脑泰方低剂量组	3	0.83±0.11	0.90±0.10 ^{b)}
脑泰方高剂量组	3	1.24±0.14 ^{b) c)}	0.76±0.12 ^{b) d)}

注: GSK-3β, 糖原合成酶激酶 3β; β-catenin, β 连环蛋白。
a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;
c) 与脑泰方低剂量组比较, $P<0.01$; d) 与脑泰方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

研究发现, CSVD 可伴有轻度认知功能障碍^[12], 而患者的中医体质类型主要是气虚质, 其次为血瘀质、痰湿质、阳虚质^[13], 可见气虚血瘀、痰瘀阻络在 CSVD 病机演变中发挥重要作用。临床上 CSVD 起病隐匿, 衰老和高血压是本病的重要危险因素^[14-15], 低灌注/缺血引起的白质异常是 CSVD 的核心特征^[3]。在我们构建的低灌注联合高血压和衰老的 CSVD 模型中可见大鼠脑白质病变, 胼胝体神经纤维稀疏并伴有空泡样改变, 髓鞘松散肿胀, MBP 表达降低, 同时在水迷宫中实验中表现出认知功能下降, 与既往研究结果^[10]一致, 因此该模型是理想的复合因素 CSVD 大鼠模型。

脑泰方中以黄芪为君药, 补益脾气, 行血通痹祛瘀, 川芎为臣药, 活血行气, 上行头目, 僵蚕、地龙二者共为佐药, 通经活络, 化痰散结, 合方用之, 可益气活血、化瘀通络。前期研究^[16]显示, 脑泰方能一定程度地延缓 CSVD 脑白质病变, 改善患者临床症状和认知功能。长期高血压会导致血管脂质透明化和血管壁增厚, 促进大脑皮层和脑膜下小动脉和小穿支动脉管腔狭窄, 导致滋养深部白质的功能受损^[17]。已有研究^[18-19]证明, 收缩压强化降低到 120 mmHg 能减慢脑白质高信号进展, 减轻轻度认知障碍和痴呆。此外, 较低的基线脑血流量水平也预示着认知能力下降, 特别是在高血压和白质病变严重的患者中更明显^[20]。本研究结果发现, 脑泰方高剂量组治疗后大鼠收缩压明显下降, 脑血流量明显恢复, 脑白质脱髓鞘程度明显减轻且认知功能明显改善, 而脑泰方低剂量改善效果不显著。

慢性脑低灌注诱导中枢神经系统慢性炎症, 炎症可能是慢性脑低灌注诱导脑白质病变的中介物^[21]。中枢神经系统炎症由胶质细胞及其分泌的

炎症因子介导。少突胶质细胞 (OL) 是一种神经胶质细胞, 负责髓鞘的形成和维持^[22]。在炎症微环境中, OL 会大量凋亡, 导致髓鞘和轴突损伤严重, 脱落堆积的髓鞘碎片又能加重炎症反应, 形成恶性循环, 导致髓鞘修复过程无法完成^[23]。IBA1 诱发的炎症级联反应会使 OL 的功能受到损伤并损害轴突传导, 还能释放促炎细胞因子如 IL-1β 和 TNF-α 参与白质损伤^[21]。IL-1β 能减少少突胶质前体细胞的招募^[24]。TNF-α 对少突胶质前体细胞数量和分化以及 OL 存活有负向调节作用^[25]。本实验结果发现, 脑泰方高剂量组胼胝体中 IBA1 阳性细胞数明显减少, 促炎因子 TNF-α 和 IL-1β 浓度明显降低, 抗炎因子 IL-10 和 TNF-β 浓度明显增加, 说明脑泰方能减轻脑内炎症微环境, 保护脑白质的完整性。

当髓鞘受损后, 少突胶质前体细胞被激活, 增殖、迁移和分化为成熟的 OL 修复髓鞘^[26]。OL 是中枢神经系统中重要的髓鞘生成细胞, OL 成熟可分为四个阶段: 少突胶质前体细胞、前少突胶质细胞 (或晚期少突胶质前体细胞)、未成熟 OL 和成熟 OL (或髓鞘形成)^[27]。每个阶段都有特异性表达的标志物, 少突胶质前体细胞特异性表达 NG2^[28], 前少突胶质细胞表达 OL, 持续整个不成熟 OL 阶段, 成熟的 OL 有序表达髓鞘蛋白如 MBP、蛋白脂蛋白、髓鞘相关糖蛋白, 最后是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白^[27]。NG2 在发育过程中和成年期具有自我更新或产生新的 OL 的能力^[29]。Ki67/NG2 双染用于观察少突胶质前体细胞增殖情况。CNPase 存在于髓磷脂中, 为非致密髓鞘中含量最丰富的蛋白质, 占髓鞘总蛋白的 4%, 其在 OL 中表达被认为是髓鞘形成细胞的标志^[30-31]。本研究结果发现, 与假手术组比较, 模型组 NG2 阳性细胞增多, 脑泰方高剂量组 NG2 阳性细胞较模型组升高, 但各组 Ki67/NG2 双染结果差异不明显, 提示脑泰方高剂量治疗能促进 CSVD 模型大鼠胼胝体中少突胶质前体细胞的招募, 但不影响少突胶质前体细胞的增殖。此外, 脑泰方高、低剂量组均能提高 MBP 荧光强度和蛋白表达, 脑泰方高剂量组 CNPase 数量明显增多, 表明高剂量脑泰方治疗能促进少突胶质前体细胞分化为成熟的 OL。上述结果表明高剂量脑泰方能促进 CSVD 模型大鼠胼胝体中少突胶质前体细胞的招募和分化, 修复受损髓鞘从而改善脑白质病变。

现代研究表明, 经典 Wnt/β-catenin 信号通路对 OL 生成、分化和成熟以及髓鞘形成具有抑制作

用^[32-33]。Wnt 的抑制作用是由 β -catenin 入核引起的, 它与转录因子 TCF4 结合可以上调分化抑制因子 Id2/4 的表达, 从而抑制 MBP 的表达^[34]。 β -catenin 作为转录激活剂, 可通过调控抗炎基因的表达来调节炎症过程^[35]。Wnt3a 对少突胶质前体细胞分化和髓鞘形成有抑制作用^[36]。GSK-3 β 是少突胶质细胞分化的一种关键的正调节因子, 通过调节少突胶质前体细胞分化相关转录因子促进少突胶质前体细胞的分化, Ser9 位点的 GSK-3 β 磷酸化是衡量 GSK-3 β 活性的关键, 激活 GSK-3 β 能促进 β -catenin 的泛素化和降解, 从而抑制 Wnt/ β -catenin 的信号传导^[33, 37]。因此, 本研究采用 p-GSK-3 β /GSK-3 β 和 p- β -catenin/ β -catenin 的变化观察相关蛋白激活情况, 结果发现, 与假手术组比较, 模型组大鼠 Wnt3a 蛋白表达、p-GSK-3 β /GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 表达升高, p- β -catenin/ β -catenin、GSK-3 β mRNA 表达降低; 脑泰方高剂量组干预后各指标均有改善, 而脑泰方低剂量组仅 Wnt3a 蛋白、 β -catenin mRNA 表达降低。以上结果表明, 高剂量脑泰方可通过抑制 Wnt3a 蛋白表达、减少 GSK-3 β 磷酸化进而调节 Wnt/ β -catenin 信号通路。

综上, 高剂量脑泰方可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路减轻脑内炎症微环境, 促进少突胶质前体细胞招募和分化为少突胶质细胞, 改善 CSVD 相关白质病变及认知功能障碍。由于目前尚未有公认的治疗 CSVD 的药物, 故本研究未设置阳性对照组; 此外, 本研究未使用 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂及激动剂进行干预, 故尚不能确定 Wnt/ β -catenin 信号通路是脑泰方调控脑白质病变的关键通路, 有待后续深入研究进一步阐明。

参考文献

- [1] WARDLAW JM, SMITH C, DICHGANS M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(5): 483-497.
- [2] DE HAVENON A, SHETH KN, YEATTS SD, et al. White matter hyperintensity progression is associated with incident probable dementia or mild cognitive impairment [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2022, 7(4): 364-366.
- [3] HASE Y, HORSBURGH K, IHARA M, et al. White matter degeneration in vascular and other ageing-related dementias [J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5): 617-633.
- [4] JOUTEL A, CHABRIAT H. Pathogenesis of white matter changes in cerebral small vessel diseases: beyond vessel-intrinsic mechanisms [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(8): 635-651.
- [5] SERAFINO A, GIOVANNINI D, ROSSI S, et al. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in neurodegenerative diseases: recent approaches and current challenges [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(7): 803-822.
- [6] AZIM K, BUTT AM. GSK3 β negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination in vivo [J]. *Glia*, 2011, 59(4): 540-553.
- [7] 余瑞宁, 方锐, 周月, 等. 葛金文教授基于“血实宜决, 气虚宜掣”运用脑泰方治疗高血压脑小血管病临证撷萃 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(3): 445-448.
- [8] 刘佳. 脑泰方胶囊防治高血压脑小血管病脑血管周围间隙扩大(气虚血瘀、风痰阻络证)的临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [9] 张雅妮. 脑泰方胶囊治疗高血压脑小血管病脑微出血(气虚血瘀、风痰阻络证)的临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [10] MENG P, LIU T, ZHONG Z, et al. A novel rat model of cerebral small vessel disease based on vascular risk factors of hypertension, aging, and cerebral hypoperfusion [J]. *Hypertens Res*, 2018, 41(8): 2195-2210.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [12] 张弘菁, 赵虹, 刘慧瑛, 等. 脑白质病变与认知障碍的研究进展[J]. *老年医学与保健*, 2021, 27(4): 865-867.
- [13] 刘芳辰. 脑小血管病脑白质病变患者中医体质分型与氯吡格雷 CYP2C19 基因多态性及其预后相关性研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [14] LIU Y, DONG YH, LYU PY, et al. Hypertension-induced cerebral small vessel disease leading to cognitive impairment [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(5): 615-619.
- [15] DE SILVA TM, FARACI FM. Contributions of aging to cerebral small vessel disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 275-295. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034338.
- [16] 汤哲雅. 基于 Fazekas 评分、FIB、Hcy 变化探讨脑泰方治疗高血压脑小血管病(脑白质病变)的疗效特点[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [17] PANTONI L, GARCIA JH. The significance of cerebral white matter abnormalities 100 years after Binswanger's report: a review [J]. *Stroke*, 1995, 26(7): 1293-1301.
- [18] NASRALLAH IM, PAJEWSKI NM, AUCHUS AP, et al. Association of intensive vs standard blood pressure control with cerebral white matter lesions [J]. *JAMA*, 2019, 322(6): 524-534.
- [19] WILLIAMSON JD, PAJEWSKI NM, AUCHUS AP, et al. Effect of intensive vs standard blood pressure control

- on probable dementia: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2019, 321(6): 553–561.
- [20] WOLTERS FJ, ZONNEVELD HI, HOFMAN A, et al. Cerebral perfusion and the risk of dementia: a population-based study [J]. Circulation, 2017, 136(8): 719–728.
- [21] DUNCOMBE J, KITAMURA A, HASE Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia [J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(19): 2451–2468.
- [22] 宋聖姣, 李娟, 吴文成, 等. 少突胶质细胞的功能与脱髓鞘疾病 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19): 3108–3116.
- [23] BERGLUND R, GUERREIRO-CACAIS AO, ADZEMOVIC MZ, et al. Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation [J]. Sci Immunol, 2020, 5(52): eabb5077. doi: 10.1126/sciimmunol.abb5077.
- [24] ZHOU Y, ZHANG J, WANG L, et al. Interleukin-1 β impedes oligodendrocyte progenitor cell recruitment and white matter repair following chronic cerebral hypoperfusion [J]. Brain Behav Immun, 2017, 60: 93–105. doi: 10.1016/j.bbi.2016.09.024.
- [25] CAMMER W, ZHANG H. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes [J]. J Neuroimmunol, 1999, 97(1/2): 37–42.
- [26] CRAWFORD AH, CHAMBERS C, FRANKLIN RJ. Remyelination: the true regeneration of the central nervous system [J]. J Comp Pathol, 2013, 149(2/3): 242–254.
- [27] BARATEIRO A, FERNANDES A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(9): 1917–1929.
- [28] NISHIYAMA A, LIN XH, GIESE N, et al. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF [J]. J Neurosci Res, 1996, 43(3): 315–330.
- [29] TIMMERMAN A, TASCIO D, JABS R, et al. Dysfunction of NG2 glial cells affects neuronal plasticity and behavior [J]. Glia, 2023, 71(6): 1481–1501.
- [30] MASHAYEKHI F, SALEHI Z. Administration of vitamin D3 induces CNPase and myelin oligodendrocyte glycoprotein expression in the cerebral cortex of the murine model of cuprizone-induced demyelination [J]. Folia Neuropathol, 2016, 54(3): 259–264.
- [31] RAASAKKA A, KURSULA P. The myelin membrane-associated enzyme 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: on a highway to structure and function [J]. Neurosci Bull, 2014, 30(6): 956–966.
- [32] FANCY S P, BARANZINI SE, ZHAO C, et al. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS [J]. Genes Dev, 2009, 23(13): 1571–1585.
- [33] GUO F, LANG J, SOHN J, et al. Canonical Wnt signaling in the oligodendroglial lineage: puzzles remain [J]. Glia, 2015, 63(10): 1671–1693.
- [34] YE F, CHEN Y, HOANG T, et al. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(7): 829–838.
- [35] VALLÉE A, VALLÉE JN, GUILLEVIN R, et al. Interactions between the canonical WNT/Beta-Catenin pathway and PPAR Gamma on neuroinflammation, demyelination, and remyelination in multiple sclerosis [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(4): 783–795.
- [36] LIE DC, COLAMARINO SA, SONG HJ, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis [J]. Nature, 2005, 437(7063): 1370–1375.
- [37] ZHOU L, SHAO CY, XU SM, et al. GSK3 β promotes the differentiation of oligodendrocyte precursor cells via β -catenin-mediated transcriptional regulation [J]. Mol Neurobiol, 2014, 50(2): 507–519.

Effects of *Naotai Formula* (脑泰方) on Cerebral White Matter Lesions and Wnt/ β -Catenin Pathway in Corpus Callosum of Rats with Cerebral Small Vessel Disease Model

WANG Xiangyuan¹, MEI Zhigang^{1,2}, Ge Jinwen^{1,3}

1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. College of Medical and Health Science, China Three Gorges University; 3. Hunan Scientific Academy of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effects and mechanisms of *Naotai Formula* (脑泰方) against white matter lesions associated with cerebrovascular disease via Wnt/ β -catenin pathway. **Methods** Ten WKY rats were used as sham surgery group, and 30 spontaneously hypertensive rats (SHRs) were randomly divided into model group, low- and high-dose *Naotai Formula* group, with 10 rats in each group. In addition to the sham surgery group, rats in each

group were modelled by dorsum subcutaneous injection of D-galactose for 56 days, by performing bilateral common carotid artery stenosis on the 29th day of modelling with low perfusion for 28 days to construct the rat models of cerebral small-vessel disease with composite risk factors. The rats in the low- and high-dose *Naotai Formula* groups were given 9 and 27 g/(kg·d) of *Naotai Formula* by gavage on the day after surgery, and 10 ml/(kg·d) of pure water by gavage in the sham surgery group and the model group, with all rats in each group gavaged for 4 weeks. Blood pressure of rats was monitored weekly before and after medication administration; water maze experiments were performed for 6 consecutive days from the 50th day of modelling; and changes in cerebral blood flow were detected by laser scattering preoperatively, postoperatively, and after medication administration. The samples were taken on the next day after the last gavage, and the extent of myelin damage in the rat corpus callosum was observed by Lucas fast blue (LFB) and transmission electron microscopy, and the levels of interleukin 1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukin 10 (IL-10), and tumour necrosis factor β (TNF- β) were detected by ELISA, and the levels of expression of myelin basic protein (MBP) and ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1), neuroglial antigen 2 (NG2), cell proliferation marker Ki67 antigen (MBP), and cell proliferation marker Ki67 antigen (Ki67A)/NG2, 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) expression were measured by immunofluorescence. MBP in the corpus callosum, wingless MMTV integration site family member 3a (Wnt3a), phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (p-GSK-3 β), glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), phosphorylated β -catenin (p- β -catenin), β -catenin expression were detected by western blotting, and GSK-3 β , β -catenin mRNA expression in the corpus callosum were detected by RT-qPCR. **Results** Compared with the sham surgery group, rats in the model group had elevated systolic blood pressure at all time points, decreased the number of traversing platforms and the percentage of time spent in the target quadrant in the water maze experiments, significantly prolonged the evasion latency on days 4 and 5, and decreased cerebral blood flow in the postoperative period and after medication administration ($P<0.05$ or $P<0.01$); significant myelin sheath damage in the corpus callosum was seen by LFB staining and transmission electron microscopy; the callus had significantly higher levels of TNF- α and IL-1 β content increased, TNF- β content decreased, MBP fluorescence intensity and protein expression decreased, the number of IBA1-positive cells increased, Wnt3a and p-GSK-3 β /GSK-3 β values increased, p- β -catenin/ β -catenin values decreased, GSK-3 β mRNA expression decreased, and β -catenin mRNA expression increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the myelin sheath damage of corpus callosum in rats in the high-dose *Naotai Formula* groups was significantly improved, and all of the above indexes were significantly improved ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the low-dose *Naotai Formula* group, myelin damage in the corpus callosum of the high-dose *Naotai Formula* group was improved, systolic blood pressure reduced, cerebral blood flow and MBP fluorescence intensity and protein expression in the corpus callosum, the number of positive cells for NG2 and CNPase, the values of p- β -catenin/ β -catenin and GSK-3 β mRNA expression increased, and the expression of Wnt3a, p-GSK-3 β /GSK-3 β values and β -catenin mRNA expression decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** High-dose *Naotai Formula* can significantly improve white matter lesions in cerebral small vessel disease, and the mechanism may be related to the inhibition of the Wnt/ β -catenin signalling pathway, reducing the inflammatory microenvironment in the brain, and promoting the differentiation of oligodendrocyte precursor cells into oligodendrocytes.

Keywords cerebral small vessel disease; white matter lesion; demyelination; oligodendrocyte; *Naotai Formula* (脑泰方); Wnt/ β -catenin pathway

(收稿日期: 2024-06-10; 修回日期: 2024-08-15)

[编辑: 邓媛]