

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.01.012

加味涤痰汤对慢性间歇低氧模型大鼠认知功能及大脑静息态功能磁共振成像的影响

陈乃洁¹, 王小婷², 徐峰圣³, 沈双宏¹, 李钻芳⁴, 陈沁², 陈进¹, 吴润华¹✉

1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建省福州市闽侯上街邱阳路1号, 350122; 2. 福建中医药大学临床技能中心; 3. 福建中医药大学附属人民医院; 4. 福建中医药大学科技创新与转化中心

[摘要] **目的** 探讨加味涤痰汤对慢性间歇低氧认知功能的影响及可能作用机制。**方法** 24只SD大鼠随机分为正常组、模型组、加味涤痰汤组, 每组8只。加味涤痰汤组大鼠予加味涤痰汤14.8 ml/(kg·d)灌胃, 正常组及模型组予相同剂量生理盐水灌胃。每日灌胃后30 min将3组大鼠放入间歇低氧箱内, 模型组和加味涤痰汤组通过电脑程序设定调控氧浓度造模, 每天8 h, 正常组通入相同流量的空气。连续干预12周建立慢性间歇低氧大鼠模型。采用Y迷宫测试评估大鼠空间工作记忆能力; 静息态功能磁共振成像(rs-fMRI)检测大鼠全脑局部一致性(ReHo)及基于种子点的功能连接(FC); 选取rs-fMRI中具有统计学差异的脑区, 采用免疫荧光法检测 β 淀粉样蛋白(A β)沉积与小胶质细胞标记物离子钙结合适配器分子1(IBA1)阳性细胞数量, 免疫组化法检测突触体素(SYP)、兴奋性突触标记物囊泡谷氨酸转运体1(Vglut1)和抑制性突触标记物囊泡 γ 氨基丁酸转运体(VGAT)的表达。**结果** 与正常组比较, 模型组Y迷宫自发交替率降低, 左侧内嗅皮层平滑后的Z值标准化的局部一致性(SzReHo)值显著升高, 以此为种子点至左侧基底前脑的FC值显著降低, 左侧内嗅皮层A β 荧光强度及Iba1阳性率显著升高, SYP、Vglut1、VGAT表达降低, Vglut1/VGAT比值升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 加味涤痰汤组自发交替率升高, 左侧内嗅皮层SzReHo值显著降低, 以此为种子点至左侧基底前脑的FC值显著升高, 左侧内嗅皮层A β 荧光强度和Iba1阳性率显著降低, SYP、Vglut1、VGAT水平升高, Vglut1/VGAT比值降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 加味涤痰汤可重建慢性间歇低氧状态下左侧基底前脑至内嗅皮层的投射, 进而减轻左侧内嗅皮层A β 聚集和小胶质细胞的过度活化, 改善突触重塑引起的兴奋/抑制失衡, 从而改善慢性间歇低氧大鼠认知功能。

[关键词] 慢性间歇低氧; 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征; 认知功能; 静息态功能磁共振成像; 内嗅皮层; β 淀粉样蛋白; 小胶质细胞; 加味涤痰汤

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS)为最常见的睡眠呼吸障碍疾病, 是由多种原因导致睡眠状态下反复出现低通气和/或呼吸中断, 引起慢性间歇低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)伴高碳酸血症以及睡眠结构紊乱, 进而导致神经认知功能障碍等一系列病理生理改变的临床综合征^[1]。中医学将OSAHS归于“鼾症”范畴, 认为OSAHS合

并认知功能障碍是以气虚为本、痰瘀阻塞为标的本虚标实之证^[2]。加味涤痰汤为课题组基于多年对OSAHS中医药防治的研究, 在《奇效良方》涤痰汤基础上自拟的经验方, 具有益气活血、化痰通窍的功效, 可改善OSAHS认知损害^[3-4], 但其具体作用机制尚不明确。

静息态功能磁共振成像(resting state functional magnetic resonance imaging, rs-fMRI)是通过局部耗氧量和脑血流量的变化来观察和评价神经元活动的方法, 近年来被广泛应用于神经认知领域的研究中^[5]。本研究通过建立CIH大鼠模型, 模拟OSAHS

基金项目: 国家自然科学基金(82305139); 福建省自然科学基金(2023J01826)

✉ 通讯作者: wu_runhua@126.com

核心病理改变,采用rs-fMRI检测CIH大鼠全脑局部一致性(regional homogeneity, ReHo)及基于种子点的功能连接(functional connectivity, FC),并观察脑区中 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)含量、小胶质细胞及兴奋/抑制平衡等变化,旨在探究加味涤痰汤改善OSAHS认知损害的可能机制。本实验经福建中医药大学动物伦理中心审核通过,批件号:2022008。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级成年健康雄性SD大鼠24只,体质量210~230 g,购自杭州医学院,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。饲养于福建中医药大学动物实验中心SPF级动物实验室,温度21~27℃,湿度45%~55%,明暗循环各12 h,自由进食饮水。大鼠适应性饲养1周后进行实验。

1.2 药物

加味涤痰汤组成:黄芪30 g,党参30 g,茯苓12 g,胆南星6 g,法半夏12 g,陈皮9 g,石菖蒲15 g,当归9 g,川芎12 g,枳实9 g,竹茹9 g,甘草3 g。所有药材均由福建中医药大学附属第三人民医院提供,药物浸泡30 min后大火煮沸转小火再煎30 min,重复煎煮2次,药液经纱布过滤后蒸发浓缩成含生药浓度为1 g/ml的浓缩液。

1.3 主要试剂及仪器

A β 抗体(货号:GB111197)、离子钙结合适配器分子1(Iba1)抗体(货号:GB113502)、突触体素(SYP)抗体(货号:GB15553)、囊泡谷氨酸转运体1(Vglut1)抗体(货号:GB11821)、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(货号:GB25303)、CY5标记山羊抗兔IgG(货号:GB27303)、HRP标记山羊抗小鼠IgG(货号:GB23301)、HRP标记山羊抗兔IgG(货号:GB23303)、4%多聚甲醛(货号:G1101)、DAB显色剂(货号:G1212),武汉赛维尔生物科技有限公司;囊泡 γ 氨基丁酸转运体(VGAT)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:14471-1-AP);20%乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,货号:30191228);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,货号:R510-22-10)。

间歇低氧箱(上海塔望智能科技有限公司,型号:ProOx-100);Y迷宫检测系统(上海欣软信息

科技有限公司,型号:63005);7.0T小动物核磁共振仪(德国Bruker公司,型号:BioSpec 70/20 USR);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);全景切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH公司,型号:Pannoramic MIDI)。

1.4 动物分组与干预

将24只SD大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组和加味涤痰汤组,每组8只。加味涤痰汤组给药剂量依据临床等效剂量换算^[6],予以加味涤痰汤浓缩液14.8 ml/(kg·d)灌胃,模型组及正常组予相同剂量生理盐水灌胃,每天1次。灌胃后30 min将3组大鼠放进间歇低氧箱,模型组和加味涤痰汤组通过电脑程序设定往箱中循环充入氮气和氧气,50 s内将氧浓度由常氧水平降至5.0%,维持20 s后,30 s内将氧浓度回升至常氧水平,并维持20 s,反复循环,正常组同时向间歇低氧箱中通入相同流量的空气,每天持续8 h后取出,连续干预12周^[7]。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Y迷宫测试评估大鼠空间工作记忆能力

干预结束后次日行Y迷宫测试^[8]。Y迷宫由3个彼此成120°角的等长臂组成。大鼠于任意一臂末端进入迷宫,任其自由探索8 min,记录总进臂次数(大鼠四肢均进入臂计为1次)、交替次数(依次连续探索完3个臂计为1次)和最大交替次数(总进臂次数-2),算得自发交替率=交替次数/最大交替次数 $\times 100\%$ 。75%酒精擦拭清理活动痕迹后放入下一只大鼠。

1.5.2 大鼠全脑rs-fMRI图像采集及数据处理

Y迷宫测试后行全脑rs-fMRI扫描。各组大鼠予3%~4%异氟烷吸入麻醉,俯卧固定于定制支架上,予1.5%~2%异氟烷维持麻醉,采用核磁共振扫描仪采集图像。T2_TurboRARE序列:回波时间(TE)/重复时间(TR)33/2500 ms,视野大小(FOV)30 mm $\times$ 30 mm,层数21,层厚1 mm,平均次数4。复制T₂WI参数中的扫描层数和图框,b₀匀场。血氧水平依赖功能磁共振成像(BOLD-fMRI)采用T2star_FID_EPI序列:TE/TR28/2000 ms,FOV=30 mm $\times$ 30 mm,层数21,层厚1 mm,平均次数1,重复次数180。

基于MATLAB 2022b(美国The MathWorks公司)平台的CAT12、SPM12、xjview软件进行图像

数据预处理。步骤如下：1) 图像格式转换；2) 去除前 10 个时间点；3) 层面时间校正；4) 头动校正；5) 将图像配准到大鼠脑标准空间，并将体素重采样为 3 mm×3 mm×3 mm；6) 回归协变量(Friston-24 头部运动参数、线性趋势、脑白质和脑脊液信号)和 0.01~0.08 Hz 带通滤波处理。

使用 SPM12 工具包对预处理后的影像数据进行 ReHo 分析。步骤如下：1) 利用 Kendall 一致性系数 (KCC) 计算目标体素与其相邻 26 个体素在时间序列上的相似性，得出 ReHo 图；2) ReHo 图中单个体素 KCC 值除以全脑总体素的 KCC 均值，得出标准化 ReHo 图；3) 运用半高宽为 6 mm 的高斯核进行空间平滑处理，得出平滑后的 Z 值标准化的局部一致性 (S_zReHo) 值。将 ReHo 有显著差异的脑区作为感兴趣区 (ROI)，即种子点，分析基于种子点的功能连接 (FC)。步骤如下：1) 提取 ROI 的时间序列，并计算 ROI 的平均时间序列；2) 计算 ROI 与全脑其他体素时间序列的 Pearson 相关系数；3) 将相关系数进行 Fisher-Z 变换，转化为 Z 值使其标准化，最终获得 FC 值及脑功能相关图像。

1.5.3 免疫荧光检测筛选出差异脑区的 Aβ 沉积与小胶质细胞标记物 Iba1 阳性细胞的数量 每组采用随机数字表法选取 6 只大鼠，予 20% 乌拉坦 5 ml/kg 腹腔注射麻醉后，断头取脑组织，放入 4% 多聚甲醛中固定，后行石蜡包埋和组织切片。石蜡切片脱蜡至水，经抗原修复、封闭后，于切片上滴加 Iba1 抗体 (1:3000) 孵育过夜，再用 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (1:400) 避光室温孵育，然后 Aβ 抗体 (1:200) 孵育过夜，再以 CY5 标记山羊抗兔 IgG (1:400) 避光室温孵育，最后染核封片。使用 PANNORAMIC 全景切片扫描仪扫描组织信息，CaseViewer2.4 软件 (匈牙利 3DHISTECH 公司) 读取后通过 Halo v3.0.311.314 分析软件 (美国 Indica labs 公司) 中 Indica Labs-HighPlex FL v3.1.0 模块进行半定量分析，计算每张切片感兴趣区内 Aβ 的荧光强度及 Iba1 阳性率 (Iba1 阳性细胞数/总细胞数×100%)。

1.5.4 免疫组化检测脑组织 SYP、兴奋性突触标记物 Vglut1 和抑制性突触标记物 VGAT 的表达 取上述石蜡切片脱蜡至水，经抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭后，加入 SYP (1:500)、VGAT (1:200)、Vglut1 (1:1000) 一抗孵育，后滴加 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 或 HRP 标记山羊

抗兔 IgG (1:200) 孵育，经 DAB 显色、复染细胞核后脱水封片。使用 PANNORAMIC 全景切片扫描仪扫描组织信息，CaseViewer2.4 软件观察并采集图像，以棕黄色颗粒染色为阳性表达，运用 Image J 1.53 软件分析平均光密度值。

1.6 统计学方法

rs-fMRI 数据统计分析采用 SPM12 二阶分析的单因素方差分析，结果采用高斯随机场 (体素水平 $P<0.001$ 或 $P<0.01$ ，簇水平 $P<0.05$) 进行校正，将有显著性差异的区域叠加到 Paxinos 空间的大鼠 T2 标准脑图像中。其余数据采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析，计量资料均符合正态分布以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐时组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法；方差不齐时采用 Welch 检验，两两比较采用 Games-Howell 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠空间工作记忆能力比较

表 1 示，各组大鼠总进臂次数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较，模型组自发交替率降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，加味涤痰汤组自发交替率升高 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠 Y 迷宫测试结果

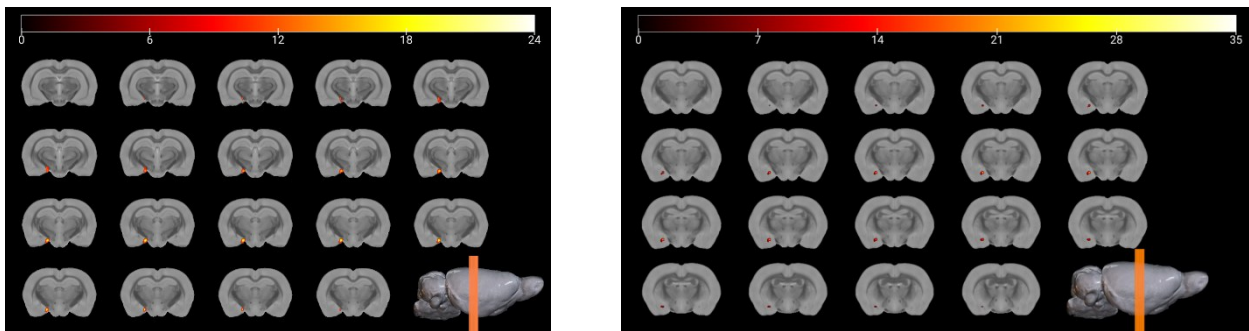
Table 1 Y-maze test results of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	总进臂次数/次	自发交替率/%
正常组	8	20.38±4.63	29.15±2.56
模型组	8	19.75±3.77	26.09±3.01 ^{a)}
加味涤痰汤组	8	18.13±1.96	29.30±2.46 ^{b)}

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

2.2 各组大鼠全脑 rs-fMRI 分析结果比较

对 S_zReHo 值进行分析，各组存在显著差异，差异峰值出现在左侧内嗅皮层 (峰值坐标：X=-2.7，Y=-2.1，Z=-3；体素=33， F 值=22.7538)，见图 1A。表 2 示，与正常组比较，模型组左侧内嗅皮层 S_zReHo 值显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，加味涤痰汤组左侧内嗅皮层 S_zReHo 值显著降低 ($P<0.01$)。

选取左侧内嗅皮层为种子点，分析其到全脑的 FC 值，3 组存在显著差异，差异峰值出现在左侧基底前脑 (峰值坐标：X=-2.1，Y=-3.6，Z=-1.8；体素=13， F 值=35.1525)，见图 1B。表 2 示，与正常组比较，模型组和加味涤痰汤组左侧基底前脑的 FC 值显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组



A 大鼠SzReHo值存在显著差异的脑区

B 基于种子点的FC存在显著差异的脑区

注：SzReHo，平滑后的Z值标准化的局部一致性；FC，功能连接。

将有显著性差异的区域叠加到Paxinos空间的大鼠T2标准脑图像上实现可视化，右下角为全脑切面定位，上方彩条代表F值大小。

图1 各组大鼠全脑SzReHo值存在显著差异的脑区及基于种子点的FC存在显著差异的脑区

Figure 1 Brain regions with significant differences in whole-brain SzReHo values and seed-based functional connectivity among the groups

比较，加味涤痰汤组左侧基底前脑的FC值显著升高 ($P<0.01$)。

表2 各组大鼠左侧内嗅皮层SzReHo值和以左侧内嗅皮层为种子点到左侧基底前脑的FC值比较

Table 2 Comparison of SzReHo values in the left entorhinal cortex and seed-based functional connectivity values from the left entorhinal cortex to the left basal forebrain among the groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SzReHo 值	FC 值
正常组	8	-1.1567±0.1112	0.2398±0.0688
模型组	8	-0.6776±0.1456 ^{a)}	-0.0083±-0.0568 ^{a)}
加味涤痰汤组	8	-1.0702±0.1612 ^{c)}	0.0676±0.0615 ^{b) c)}

注：SzReHo，平滑后的Z值标准化的局部一致性；FC，功能连接。

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

2.3 各组大鼠左侧内嗅皮层Aβ沉积、Iba1阳性细胞数免疫荧光检测结果比较

表3示，与正常组比较，模型组大鼠左侧内嗅皮层Aβ荧光强度和Iba1阳性率显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，加味涤痰汤组大鼠左侧内嗅皮层Aβ荧光强度和Iba1阳性率显著降低 ($P<$

0.05)。各组大鼠左侧内嗅皮层Aβ、Iba1表达免疫荧光图见图2。

表3 各组大鼠左侧内嗅皮层Aβ沉积、Iba1阳性细胞数比较

Table 3 Expression of Aβ deposition and Iba1-positive cell expression in the left entorhinal cortex of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Aβ 荧光强度	Iba1 阳性率/%
正常组	6	62.4556±4.2009	3.5019±0.6530
模型组	6	75.1882±7.6714 ^{a)}	5.2372±0.9882 ^{a)}
加味涤痰汤组	6	65.7705±5.5172 ^{b)}	4.1912±0.8625 ^{b)}

注：Aβ，β淀粉样蛋白；Iba1，离子钙结合适配器分子1。

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

2.4 各组大鼠左侧内嗅皮层SYP、Vglut1、VGAT表达免疫组化检测结果比较

表4示，与正常组比较，模型组左侧内嗅皮层SYP、Vglut1、VGAT表达降低，Vglut1/VGAT值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，加味涤痰汤组左侧内嗅皮层SYP表达亦降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，加味涤痰汤组左侧内嗅皮层SYP、Vglut1、VGAT表达升高，Vglut1/VGAT值降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠左侧内嗅皮层SYP、Vglut1、VGAT表达免疫组化图见图3。

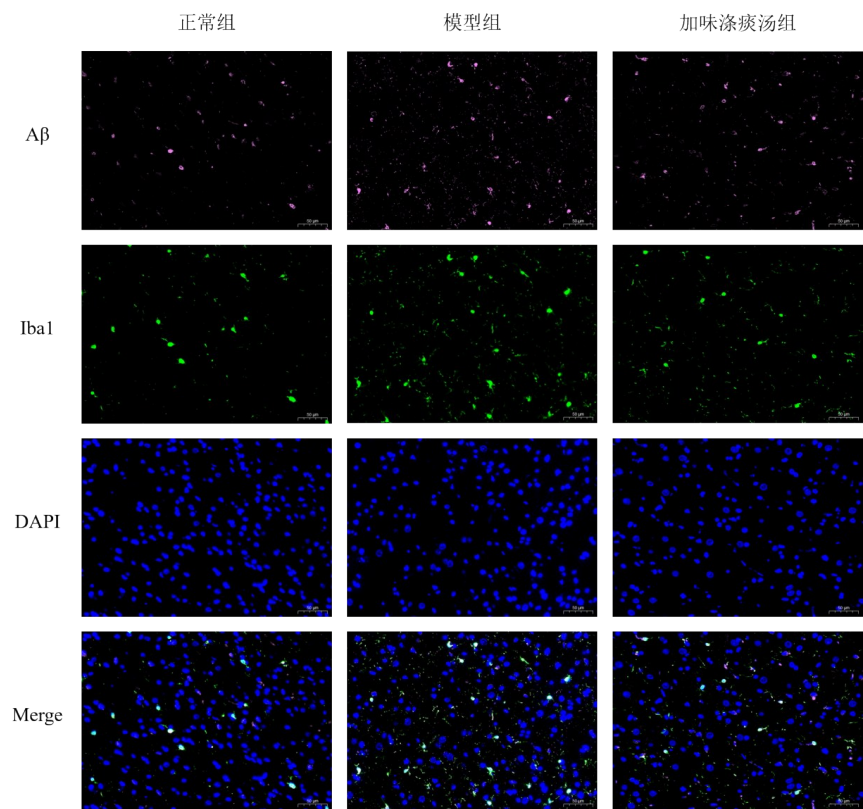
表4 各组大鼠左侧内嗅皮层SYP、Vglut1、VGAT的表达及Vglut1/VGAT值比较

Table 4 Expressions of SYP, Vglut1, and VGAT and Vglut1/VGAT ratio in the left entorhinal cortex of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SYP平均光密度/%	Vglut1平均光密度/%	VGAT平均光密度/%	Vglut1/VGAT
正常组	6	16.03±2.03	7.87±1.26	11.25±1.70	70.1±6.31
模型组	6	11.48±1.49 ^{a)}	5.33±1.04 ^{b)}	6.23±1.33 ^{a)}	86.16±7.55 ^{b)}
加味涤痰汤组	6	13.96±1.25 ^{b) c)}	7.73±2.04 ^{c)}	12.97±1.80 ^{d)}	60.12±16.73 ^{d)}

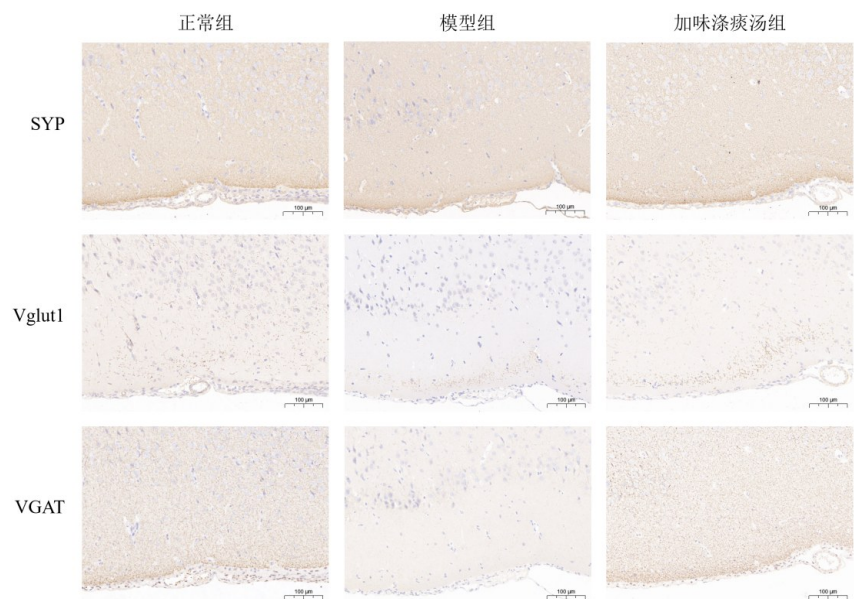
注：SYP，突触素；Vglut1，囊泡谷氨酸转运体1；VGAT，囊泡γ氨基丁酸转运体。

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



注：Aβ，β 淀粉样蛋白；Iba1，离子钙结合适配器分子 1；Aβ 以粉色荧光标记，Iba1 以绿色荧光标记，DAPI 以蓝色荧光标记。

图 2 各组大鼠左侧内嗅皮层 Aβ 沉积和 Iba1 阳性细胞表达结果（免疫荧光，×200）
Figure 2 Aβ deposition and Iba1-positive cell expression in the left entorhinal cortex of rats in each group（Immunofluorescence，×200）



注：SYP，突触体素；Vglut1，囊泡谷氨酸转运体 1；VGAT，囊泡γ氨基丁酸转运体；棕黄色颗粒染色为阳性表达。

图 3 各组大鼠左侧内嗅皮层 SYP、Vglut1、VGAT 表达结果（免疫组化，×100）
Figure 3 Expression of SYP, Vglut1, and VGAT in the left entorhinal cortex of rats in each group（Immunohistochemistry，×100）

3 讨论

认知功能障碍是 OSAHS 常见的合并症, 约 37%~48% 的 OSAHS 患者可并发轻度认知障碍, 导致患阿尔兹海默病 (alzheimer's disease, AD) 的风险显著增加^[9-10]。中医学认为, OSAHS 多因肺脾气虚, 水谷精微运化输布失常, 痰浊内生, 留滞经脉, 阻碍气血运行, 渐而气滞血瘀, 痰瘀互结, 脑脉痹阻, 脑失所养, 导致认知功能障碍^[11-12]。加味涤痰汤中黄芪升阳补气, 党参补肺健脾, 两者共为君药; 茯苓、胆南星、陈皮、枳实、竹茹、法半夏理气化痰散结, 共为臣药; 石菖蒲、当归、川芎醒神开窍, 活血化痰, 共为佐药; 甘草调和诸药, 为使药。全方共奏益气活血、化痰通窍之效, 符合 OSAHS 认知损害的中医基本治法。本研究通过 Y 迷宫测试发现 CIH 模型自发交替率降低, 提示慢性间歇低氧对大鼠参考学习和空间记忆能力的损害; 加味涤痰汤可有效提高模型大鼠自发交替率, 证实了加味涤痰汤具有改善 CIH 模型大鼠认知损害的功效。

rs-fMRI 基于不同脑区 BOLD 信号的相似性研究大脑功能连接, 其扫描的最小体积单位称为体素^[13], ReHo 侧重于描述相邻体素之间的局部功能连接, 反映静息状态下脑细胞的自发活动^[14]; 基于种子点的 FC 则描述兴趣种子区与全脑每个体素之间的功能连接, 反映距离较远的不同脑区之间神经元活动的连接程度^[15]。本研究中 CIH 模型大鼠左侧内嗅皮层 SzReHo 值异常增高, 以该区为种子点进一步分析基于种子点的 FC 值, 发现模型大鼠左侧内嗅皮层与左侧基底前脑间 FC 值异常降低。内嗅皮层在解剖学上位于新皮质和海马体之间, 其主要作用是在两个区域之间架起空间等信息交换的桥梁, 内嗅皮层神经元活动异常是引起 AD 初始阶段记忆障碍和空间导航缺陷的关键^[16]。基底前脑被认为是 AD 临床前阶段结构退化的早期起源, 并于早期扩散至内嗅皮层^[17-18]。内嗅皮层接收来自基底前脑的胆碱能纤维, 胆碱能兴奋可促进淀粉样前体蛋白被切割成不具有神经毒性的片段, 从而减少 A β 合成^[19]。研究发现, 基底前脑萎缩变性可预测皮质 A β 负荷, 胆碱能神经元损失或投射异常可导致其支配的皮层区域 A β 斑块沉积增加, 伴选择性的纤维损伤^[20-21]。A β 沉积可激活小胶质细胞, 吞噬突触, 影响兴奋性和抑制性信号的平衡, 引起神经网络异常^[22-23]。神经网络内兴奋和抑制性信号间的平衡对认知记忆至关重要, 主要通过保持兴奋性

和抑制性突触输入的恰当比例或调节兴奋性和抑制性回路间的相互作用来维持^[24]。谷氨酸能系统过度兴奋和/或 γ 氨基丁酸 (GABA) 能系统抑制障碍引起的兴奋/抑制失衡, 可导致 AD 临床前患者及动物模型中皮质和海马神经元过度活跃, 从而损害认知^[25-26]。GABA 作为主要的抑制性神经递质, 可通过前馈和反馈抑制, 塑造锥体细胞放电的空间和时间特征, 对神经元兴奋性和网络振荡施加强大的控制, 对信息处理至关重要, 因此 GABA 能系统功能障碍被视为认知障碍的重要机制^[27-28]。本研究通过免疫荧光检测发现, CIH 模型大鼠左侧内嗅皮层存在显著的 A β 沉积, 伴小胶质细胞增多。免疫组化检测显示模型大鼠左侧内嗅皮层区 SYP、Vglut1、VGAT 表达降低, 以 VGAT 降低更加显著, 故 Vglut1/VGAT 比值升高, 说明局部突触丰度降低, 以 GABA 能减少为甚, 导致兴奋/抑制失衡。由此可以推断, CIH 模型可能通过抑制左侧基底前脑与左侧内嗅皮层间的胆碱能信号, 导致左侧内嗅皮层中 A β 沉积, 进而激活小胶质细胞, 吞噬突触, 由于对抑制性突触的破坏更显著, 引发兴奋/抑制失衡, 致使左侧内嗅皮层过度激活, 从而影响认知功能。

本研究观察到加味涤痰汤可有效抑制 CIH 模型大鼠左侧内嗅皮层 SzReHo 值的异常增高, 逆转大鼠左侧内嗅皮层与左侧基底前脑间 FC 值的异常降低; 免疫荧光检测提示加味涤痰汤干预可使 CIH 模型大鼠左侧内嗅皮层 A β 斑块减少, 伴较少的小胶质细胞活化; 同时, 免疫组化检测显示加味涤痰汤组大鼠左侧内嗅皮层 SYP、Vglut1、VGAT 表达较模型组明显升高, Vglut1/VGAT 比值降低至正常水平。以上说明加味涤痰汤可重建 CIH 模型状态下左侧基底前脑至左侧内嗅皮层的投射, 进而减轻左侧内嗅皮层的 A β 聚集和小胶质细胞的过度活化, 改善突触重塑引起的兴奋/抑制失衡, 从而抑制左侧内嗅皮层异常增高的兴奋性, 恢复神经网络稳态, 改善 CIH 模型大鼠认知功能。

本研究揭示了加味涤痰汤改善 OSAHS 认知功能障碍的可能机制, 为该方防治 OSAHS 认知功能障碍提供了实验依据。本研究的实验方法无法直接测量神经元的电生理信号, 在实时或连续监测神经元电活动方面尚存在一定局限性, 后续可进一步采取光遗传学、钙离子成像、膜片钳等技术更深入地探究其疗效机制。

参考文献

- [1] PATEL SR. Obstructive sleep apnea [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 171(11): ITC81-ITC96.
- [2] 赵洋, 杨胜昌, 吉恩生. 阻塞性睡眠呼吸暂停的中医药治疗研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(3): 531-534.
- [3] 陈沁, 林劲榕, 洪旭初, 等. 加味涤痰汤对老年阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者氧化应激和炎症反应的干预作用 [J]. *中华老年医学杂志*, 2015, 34(7): 715-719.
- [4] 陈乃洁, 王小婷, 徐峰圣, 等. 加味涤痰汤对慢性间歇性缺氧大鼠认知功能影响及作用机制研究 [J]. *福建中医药*, 2023, 54(2): 20-25.
- [5] WEI Z, YUE J, LI X, et al. A mini-review on functional magnetic resonance imaging on brain structure of vascular cognitive impairment [J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1249147. doi: 10.3389/fneur.2023.1249147.
- [6] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 209-210.
- [7] CHEN J, ZHU H, CHEN Q, et al. The role of ferroptosis in chronic intermittent hypoxia-induced lung injury [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 488.
- [8] HUGHES RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28(5): 497-505.
- [9] DONG J, YU X, WANG Y, et al. Obstructive sleep apnea and cognition: insights gleaned from bibliometric analysis [J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1259251. doi: 10.3389/fpsy.2023.1259251.
- [10] MARCHI NA, SOLELHAC G, BERGER M, et al. Obstructive sleep apnoea and 5-year cognitive decline in the elderly [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61(4): 2201621.
- [11] 宁云红, 王仁忠, 孟伟. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨儿童鼾症的证治 [J]. *中医药导报*, 2023, 29(1): 177-179, 184.
- [12] 李然, 张海滨, 王振裕. 阻塞性睡眠呼吸暂停患者中医证型分布规律及特征分析 [J]. *北京中医药*, 2022, 41(11): 1287-1290.
- [13] RAIMONDO L, LAFOLIVEIRA, HEIJ J, et al. Advances in resting state fMRI acquisitions for functional connectomics [J]. *Neuroimage*, 2021, 243: 118503. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118503.
- [14] NI S, GAO S, LING C, et al. Altered brain regional homogeneity is associated with cognitive dysfunction in first-episode drug-naïve major depressive disorder: a resting-state fMRI study [J]. *J Affect Disord*, 2023, 343: 102-108. doi: 10.1016/j.jad.2023.10.003.
- [15] CHEN G, CHEN P, YANG Z, et al. Increased functional connectivity between the midbrain and frontal cortex following bright light therapy in subthreshold depression: A randomized clinical trial [J]. *Am Psychol*, 2023, 79(3): 437-450.
- [16] DESIKAN S, KOSER DE, NEITZ A, et al. Target selectivity of septal cholinergic neurons in the medial and lateral entorhinal cortex [J]. *Proc National Acad Sci U S A*, 2018, 115(11): E2644-E2652.
- [17] MIELING M, GÖTTLICH M, YOUSUF M, et al. Basal forebrain activity predicts functional degeneration in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease [J]. *Brain Comm*, 2023, 5(5): ead262.
- [18] IGARASHI KM. Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(2): 124-136.
- [19] GERMAN-CASTELAN L, SHANKS HRC, GROS R, et al. Sex-dependent cholinergic effects on amyloid pathology: a translational study [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(2): 995-1012.
- [20] NIZARI S, WELLS JA, CARARE RO, et al. Loss of cholinergic innervation differentially affects eNOS-mediated blood flow, drainage of A β and cerebral amyloid angiopathy in the cortex and hippocampus of adult mice [J]. *Acta neuropathol Commun*, 2021, 9(1): 12.
- [21] CAMPOS-PEÑA V, PICHARDO-ROJAS P, SÁNCHEZ-BARBOSA T, et al. Amyloid β , lipid metabolism, basal cholinergic system, and therapeutics in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12092.
- [22] SOOD A, PREETI K, FERNANDES V, et al. Glia: a major player in glutamate-GABA dysregulation-mediated neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(12): 3148-3189.
- [23] MIYANISHI K, SATO A, KIHARA N, et al. Synaptic elimination by microglia and disturbed higher brain functions [J]. *Neurochem Int*, 2021, 142: 104901. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104901.
- [24] GHATAK S, TALANTOVA M, MCKERCHER SR, et al. Novel therapeutic approach for excitatory/inhibitory imbalance in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 701-721. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-032320-015420.
- [25] KAZIM SF, SEO JH, BIANCHI R, et al. Neuronal network excitability in Alzheimer's disease: the puzzle of similar versus divergent roles of amyloid β and tau [J]. *eNeuro*, 2021, 8(2): ENEURO.0418-20.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0418-20.2020.
- [26] SCADUTO P, LAUTERBORN JC, COX CD, et al. Functional excitatory to inhibitory synaptic imbalance and loss of cognitive performance in people with Alzheimer's

disease neuropathologic change [J]. *Acta Neuropathol*, 2023, 145(3): 303–324.

[27]BI D, WEN L, WU Z, et al. GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(9): 1312–1329.

[28]CAPSONI S, ARISI I, MALERBA F, et al. Targeting the cation-chloride co-transporter nkcc1 to re-establish GABAergic inhibition and an appropriate excitatory/inhibitory balance in selective neuronal circuits: a novel approach for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Brain Sci*, 2022, 12(6):783.

The Effect of Modified *Ditan Decoction* (涤痰汤) on Cognitive Function and Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain in Chronic Intermittent Hypoxia Model Rats

CHEN Naijie¹, WANG Xiaoting², XU Fengsheng³, SHEN Shuanghong¹, LI Zuanfang⁴, CHEN Qin², CHEN Jin¹, WU Runhua¹

1. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122; 2. Clinical Skill Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 3. Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 4. Science and Technology Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect of modified *Ditan Decoction* (涤痰汤) on chronic intermittent hypoxia cognitive function and the potential function mechanism. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal group, a model group, and a modified *Ditan Decoction* group, with eight rats in each group. Rats in the modified *Ditan Decoction* group were administered the decoction by gavage at 14.8 ml/(kg·d), while the normal group and the model group received the same dose of normal saline. Thirty minutes after daily gavage, the rats in all three groups were placed in an intermittent hypoxia chamber. The oxygen concentration for the model group and the modified *Ditan Decoction* group was adjusted daily for 8 hours using a computer program to establish the model, while the normal group was exposed to the same airflow rate of ambient air. The intervention was continued for 12 weeks to establish a chronic intermittent hypoxia rat model. The Y-maze test was used to evaluate spatial working memory in the rats. Resting-state functional magnetic resonance imaging (rs-fMRI) was performed to detect whole-brain regional homogeneity (ReHo) and seed-based functional connectivity (FC). Brain regions showing significant differences in rs-fMRI were selected for further analysis. Immunofluorescence was used to detect β -amyloid (A β) deposition and the number of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1)-positive microglial cells. Immunohistochemistry was employed to assess the expression of synaptophysin (SYP), the excitatory synapse marker vesicular glutamate transporter 1 (Vglut1), and the inhibitory synapse marker vesicular γ -aminobutyric acid transporter (VGAT). **Results** Compared with the normal group, the model group showed a reduced spontaneous alternation rate in the Y-maze test. The smoothed Z-score standardized regional homogeneity (SzReHo) value in the left entorhinal cortex significantly increased, and the FC value from this seed point to the left basal forebrain significantly reduced. Additionally, the model group exhibited significantly higher A β fluorescence intensity and Iba1 positivity in the left entorhinal cortex, decreased expression of SYP, Vglut1, and VGAT, along with an increased Vglut1/VGAT ratio ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, the modified *Ditan Decoction* group demonstrated an increased spontaneous alternation rate, a significantly reduced SzReHo value in the left entorhinal cortex, and a significantly increased FC value from this region to the left basal forebrain. Furthermore, this group showed significantly lower A β fluorescence intensity and Iba1 positivity in the left entorhinal cortex, increased levels of SYP, Vglut1, and VGAT, and a decreased Vglut1/VGAT ratio ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Modified *Ditan Decoction* can reconstruct the projection from the left basal forebrain to the entorhinal cortex in chronic intermittent hypoxia, thereby reducing A β aggregation and excessive microglial activation in the left entorhinal cortex. This process improves the excitation/inhibition imbalance caused by synaptic remodeling, ultimately enhancing cognitive function in rats of chronic intermittent hypoxia.

Keywords chronic intermittent hypoxia; obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; cognitive function; resting-state functional magnetic resonance imaging; entorhinal cortex; β -amyloid; microglia; modified *Ditan Decoction* (涤痰汤)

(收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-05-29)

[编辑: 邓媛]