

# 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

刘港<sup>1</sup>, 曾杰<sup>2</sup>, 赵亚林<sup>3</sup>, 邓博文<sup>1</sup>, 蒋昇源<sup>1</sup>, 张亚奇<sup>1</sup>, 赵毅<sup>1</sup>, 任敬佩<sup>1</sup>, 胡传宇<sup>1</sup>, 徐林<sup>1</sup>, 穆晓红<sup>1</sup>

https://doi.org/10.12307/2024.396

投稿日期: 2023-06-12

采用日期: 2023-07-17

修回日期: 2023-08-02

在线日期: 2023-08-15

中图分类号:

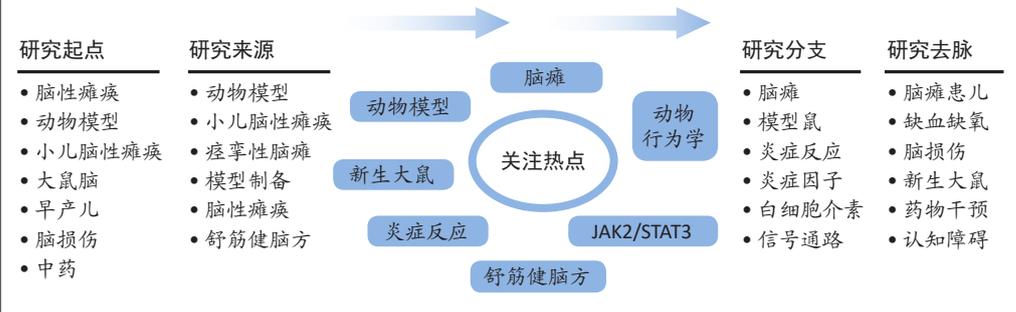
R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)23-03674-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 舒筋健脑方治疗脑性瘫痪的可能作用机制



文题释义:

舒筋健脑方: 由补阳还五汤加减化裁而来, 由黄芪、益智仁、杜仲、当归、牛膝、赤芍、钩藤、伸筋草、透骨草等9味中药组成, 共奏补益脾肾、熄风通络之功。

JAK2/STAT3: 是中枢神经系统介导炎症和免疫反应的关键信号通路, 参与神经细胞存活、增殖、分化、凋亡的过程。

摘要

背景: 舒筋健脑方是北京中医药大学东直门医院治疗脑瘫的经验方剂, 临床疗效明确, 但具体作用机制有待阐明。

目的: 探讨舒筋健脑方治疗脑性瘫痪的可能作用机制。

方法: 64只7 d龄SD大鼠随机分为正常组12只和造模组52只。造模组幼鼠采用Rice-Vannucci法建立模型, 造模成功的52只幼鼠随机分为模型组12只、米诺环素组及舒筋健脑方低、中、高剂量组各10只。米诺环素组大鼠给予40 mg/(kg·d)盐酸米诺环素灌胃; 舒筋健脑方低、中、高剂量组分别给予舒筋健脑方颗粒4, 8, 16 g/(kg·d)灌胃; 正常组及模型组给予等剂量生理盐水灌胃。各组每日灌胃1次, 连续干预1周。各组大鼠采用悬吊实验、不自主动作评分、Bederson评分进行行为学评价; 苏木精-伊红染色观察大鼠皮质组织病理改变; Elisa法检测大鼠皮质组织炎症相关因子水平; 免疫组化检测大鼠皮质组织酪氨酸激酶2(Janus kinase 2, JAK2)、磷酸化酪氨酸激酶2(Phosphorylated Janus kinase 2, p-JAK2)及磷酸化信号转导子和转录激活子3(Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)阳性表达; Western blot检测JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平。

结果与结论: ①与正常组比较, 模型组大鼠悬吊实验得分、不自主动作得分降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ); 神经细胞结构破坏, 大量空泡形成, 细胞肿胀, 细胞间隙增大; 大鼠皮质组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 水平显著升高( $P < 0.01$ ), 白细胞介素10水平降低( $P < 0.05$ ); 大鼠皮质组织JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。②与模型组比较, 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组大鼠行为学指标改善( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ); 缺血缺氧性病理改变减轻, 仅有少量神经细胞坏死及少量空泡形成, 细胞间隙减小; 大鼠皮质组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 水平降低( $P < 0.05$ ); 大鼠皮质组织JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ); 舒筋健脑方高剂量各指标改善最明显。③结果说明, 舒筋健脑方能够抑制缺血缺氧脑损伤模型大鼠皮质组织炎症反应, 其作用机制可能与调节JAK2/STAT3信号通路有关。

关键词: 脑性瘫痪; 舒筋健脑方; 炎症反应; JAK2/STAT3信号通路

## Shujin Jiannao Prescription alleviates inflammation in the cerebral cortex of rats with hypoxic-ischemic cerebral palsy

Liu Gang<sup>1</sup>, Zeng Jie<sup>2</sup>, Zhao Yalin<sup>3</sup>, Deng Bowen<sup>1</sup>, Jiang Shengyuan<sup>1</sup>, Zhang Yaqi<sup>1</sup>, Zhao Yi<sup>1</sup>, Ren Jingpei<sup>1</sup>, Hu Chuanyu<sup>1</sup>, Xu Lin<sup>1</sup>, Mu Xiaohong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China; <sup>2</sup>Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400011, China; <sup>3</sup>Fengtai Rehabilitation Hospital of Beijing Municipality, Beijing 100161, China

Liu Gang, MD candidate, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China

Corresponding author: Mu Xiaohong, MD, Professor, Chief physician, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China

Abstract

BACKGROUND: Shujin Jiannao Prescription is an empirical formula for the treatment of cerebral palsy in Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, with clear clinical efficacy, but the specific mechanism needs to be elucidated.

<sup>1</sup>北京中医药大学东直门医院, 北京市 100007; <sup>2</sup>重庆市中医院, 重庆市 400011; <sup>3</sup>北京市丰台康复医院, 北京市 100161

第一作者: 刘港, 男, 1997年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 北京中医药大学在读博士, 主要从事中医药促神经修复的研究。

通讯作者: 穆晓红, 博士, 教授, 主任医师, 北京中医药大学东直门医院, 北京市 100007

https://orcid.org/0000-0002-6014-7261(刘港)

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7222281), 项目负责人: 穆晓红

引用本文: 刘港, 曾杰, 赵亚林, 邓博文, 蒋昇源, 张亚奇, 赵毅, 任敬佩, 胡传宇, 徐林, 穆晓红. 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.



**OBJECTIVE:** To explore the possible mechanism of *Shujin Jiannao* Prescription in treating cerebral palsy.

**METHODS:** Sixty-four 7-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group ( $n=12$ ) and a model group ( $n=52$ ). An animal model was established by the Rice-Vannucci method. After successful modeling, 52 model rats were randomly divided into control model group ( $n=12$ ), minocycline group, and the low-, medium-, and high-dose groups of the *Shujin Jiannao* Prescription ( $n=10$  per group). Rats in the minocycline group were given 40 mg/kg·d minocycline by gavage; rats in the low-, medium, and high-dose groups were given 4, 8, and 16 g/kg·d *Shujin Jiannao* Prescription granules by gavage, respectively; and rats in the normal group and control model group were given an equal dose of normal saline by gavage. Medication in each group was given once a day for 1 week. The rats in each group were evaluated behaviorally using suspension test, abnormal involuntary movement score, and Bederson score. The pathological changes of the cerebral cortex were observed by hematoxylin-eosin staining. The levels of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin  $1\beta$ , and interleukin 10 in the cerebral cortex were determined using ELISA. The positive expressions of Janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) in the cerebral cortex were detected using immunohistochemistry. The protein expression levels of JAK2, p-JAK2, and p-STAT3 were detected using western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the normal group, the suspension test score and involuntary movement score were decreased in the control model group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The pathological results showed structural disruption of nerve cells, formation of large numbers of vacuoles, cell swelling, and increased intercellular space in the control model group. In addition, the expressions of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  in the cerebral cortex were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the expression of interleukin 10 was decreased ( $P < 0.05$ ), and the protein expressions of JAK2, p-JAK2, and p-STAT3 in the cerebral cortex were significantly increased ( $P < 0.01$ ) in the control model group compared with the normal group. Compared with the model group, minocycline and *Shujin Jiannao* Prescription at each dose could improve the behavioral indexes of rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) and ischemic-hypoxic pathological changes were attenuated, with only a small amount of necrotic nerve cells and a few vacuoles, and reduced intercellular space. Moreover, the expressions of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  in the cerebral cortex were decreased in each drug group compared with the control model group ( $P < 0.05$ ), while the protein expressions of JAK2, p-JAK2, and p-STAT3 in the cerebral cortex were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The most obvious improvement was observed in the high-dose *Shujin Jiannao* Prescription group. To conclude, *Shujin Jiannao* Prescription can inhibit inflammation in the cerebral cortex of rats with hypoxic-ischemic brain injury. The mechanism may be related to the regulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway.

**Key words:** cerebral palsy; *Shujin Jiannao* Prescription; inflammation; JAK2/STAT3 signaling pathway

**Funding:** the Natural Science Foundation of Beijing (General Program), No. 7222281 (to MXH)

**How to cite this article:** LIU G, ZENG J, ZHAO YL, DENG BW, JIANG SY, ZHANG YQ, ZHAO Y, REN JP, HU CY, XU L, MU XH. *Shujin Jiannao* Prescription alleviates inflammation in the cerebral cortex of rats with hypoxic-ischemic cerebral palsy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(23):3674-3679.

## 0 引言 Introduction

脑性瘫痪 (cerebral palsy, CP) 简称脑瘫, 是指大脑发育未成熟阶段, 因早产、难产、窒息、黄疸等因素导致的不可逆性脑组织损伤, 主要表现为姿势异常及运动障碍<sup>[1]</sup>。据统计, 中国脑瘫患病率为 0.246%, 全国累计 600 余万例<sup>[2]</sup>。脑瘫具有高致残性, 极大地限制了患者活动范围, 降低了生活质量。随着中国传统医学的进步, 中医对脑瘫认识的逐步深入, 中医药治疗脑瘫的临床及基础研究工作广泛开展, 主要包括中药内服、针灸、推拿、中药外敷等。中医药治疗脑瘫具有多靶点、多途径的优势, 且具备“简、便、廉、验”的特点, 已成为脑瘫治疗的关键方式<sup>[3]</sup>。

缺血缺氧性脑损伤是脑组织因部分或完全缺氧、脑血流减少或暂停而引起的脑组织病变, 是脑瘫主要病理特征<sup>[4]</sup>。在缺血缺氧脑损伤过程中, 神经炎症反应扮演了重要的角色, 通过释放大量促炎因子及脂质过氧化产物, 诱发神经元死亡、脑细胞分化和髓鞘形成延迟, 最终发展为脑瘫<sup>[5-6]</sup>。因此, 寻求有效手段抑制缺血缺氧后脑组织炎症反应, 促进神经功能恢复是治疗脑瘫的关键。

舒筋健脑方由补阳还五汤加减化裁而来, 由黄芪、益智仁、杜仲、当归、牛膝、赤芍、钩藤、伸筋草、透骨草等 9 味中药组成, 共奏补益脾肾、熄风通络之功。近年来, 中医药治疗脑损伤研究被广泛开展, 如黄芪有效成分黄芪多糖能有效改善脑缺血缺氧损伤后微环境, 发挥脑保护作用<sup>[7]</sup>; 益智仁能抑制大鼠海马区神经细胞凋亡, 减轻神经炎症反应<sup>[8]</sup>。此次研究拟通过构建脑瘫大鼠模型, 探讨舒筋健脑方对脑组织的保护作用, 并从酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路探索其作用机制, 为临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。对结果数据进行单因素方差分析和 LSD 法两两比较或非参数检验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 9 月至 2021 年 9 月在中医科学院中医基础理论研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 动物 6 只定时妊娠的 SD 母鼠, SPF 级, 购买于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0010。实验动物饲养于中国中医科学院基础理论研究所实验动物中心, 日光灯照明时长为每日 12 h, 温度 22–24 °C, 湿度 40%–60%, 自由食水。母鼠分娩当日记为产后第 1 天, 以 7 d 龄 SD 大鼠 64 只为实验动物, 体质量 13–21 g。该实验经北京中医药大学东直门医院伦理委员会批准, 符合实验动物伦理委员会指导原则, 批准号为 DZMEC-KY-2019-85。

1.3.2 药物及试剂 舒筋健脑方由黄芪 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 组成, 上述药物均为颗粒剂, 购买于北京康仁堂药业股份有限公司; 盐酸米诺环素 (瀚晖制药有限公司); 异氟烷 (河北一品制药股份有限公司); 肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$ 、白细胞介素 10 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 苏木精 - 伊红试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 兔抗 JAK2 抗体、兔抗 p-JAK2 抗体、兔抗 p-STAT3 抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (英国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物科技有限公司)。

1.3.3 实验器材 小动物吸入麻醉机 (美国 MATRX 公司); 氧气检测仪 AR8100 (香港希玛仪器仪表有限公司); 电子天平 (德国赛多利斯公司); 4 °C 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司); 常温高速离心机 (德国艾本德公司); 脱水机、包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机 (德国徕卡公司);

倒置显微镜、凝胶成像系统(日本尼康公司); 稳压稳流电泳仪、垂直电泳槽(美国伯乐公司); 计算机图像分析仪(美国 Media Cybernetics 公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 造模方法 使用体积分数 3.0% 异氟烷对 7 d 龄 SD 大鼠吸入麻醉, 待麻醉后固定于手术台, 将异氟烷浓度调整为体积分数 1.5% 持续低剂量麻醉。消毒颈部皮肤, 正中切口分离左侧颈总动脉, 双重结扎后剪断血管, 缝合皮肤。待术后 1 h, 将大鼠放入自制密闭缺氧箱中, 通入混合气体模拟缺氧条件(体积分数 92% 氮气和 8% 氧气), 2.5 h 后取出, 放回母鼠笼中继续哺乳<sup>[9-10]</sup>。正常组大鼠麻醉下取颈部正中切口, 暴露颈总动脉后缝合, 不做颈总动脉结扎及缺氧处理。

#### 组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨舒筋健脑方治疗脑性瘫痪的可能作用机制
模型与所研究疾病的关系	Rice-Vannucci 模型是目前最为常用的模拟脑瘫的动物模型, 该方法通过结扎幼鼠单侧颈总动脉构建缺血条件, 通过外部低氧环境构建脑缺氧条件, 使幼鼠在大脑发育的关键时期受到缺血缺氧损伤
动物品系	妊娠的 SD 母鼠, 购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司
造模技术描述	建立缺血缺氧脑损伤大鼠模型: 将幼鼠麻醉后, 正中切口分离左侧颈总动脉, 双重结扎后剪断血管, 缝合皮肤。待术后 1 h, 将大鼠放入自制密闭缺氧箱中模拟缺氧条件(体积分数 92% 氮气和 8% 氧气), 2.5 h 后取出
动物数量及分组方法	将 64 只大鼠随机分为 6 组: 正常组、模型组各 12 只, 米诺环素组、舒筋健脑方低、中、高剂量组各 10 只
造模成功评价指标	造模后 24 h, 大鼠同时具备行为学悬吊实验异常、不自主动作异常、Bederson 评分 $\geq 1$ 分, 评定为脑瘫大鼠造模成功
造模后实验观察指标	①大鼠行为学评分; ②大脑左侧皮质组织形态结构; ③脑组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 10 表达; ④脑组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达
造模后动物处理	干预 1 周后, 麻醉各组大鼠取大脑左侧皮质组织
伦理委员会批准	实验经北京中医药大学东直门医院伦理委员会批准, 审批编号: DZMEC-KY-2019-85

1.4.2 模型鉴定方法 术后 24 h 根据行为学观察判断模型构建是否成功<sup>[11-12]</sup>。

(1) 悬吊实验: 大鼠双前肢在距离地面 45 cm 高度, 抓握一水平放置木棒, 木棒直径 0.1 cm, 记录大鼠掉落时间并评分。掉落时间  $\leq 10$  s 记为 1 分; 10-30 s 记为 2 分;  $> 30$  s-2 min 记为 3 分;  $> 2-5$  min 记为 4 分;  $> 5$  min 记为 5 分。

(2) 不自主运动: 不自主动作包括震颤、徐动、抽搐、痉挛扭动、舞动。正常为 0 分, 出现上述任何一项加 1 分, 具备任何一项即可定义为异常。

(3) Bederson 评分: 大鼠神经功能评分分为 4 个等级, 0 级: 无神经功能缺损, 记 0 分; I 级: 将大鼠尾巴提起, 瘫痪侧前肢收回并屈曲于腹部下方, 健侧前肢向地面伸展, 记 1 分; II 级: 除 I 级体征外, 俯卧于地面向瘫痪侧推动大鼠时阻力较健侧降低, 同时大鼠无转圈行为, 记 2 分; III 级: 除上述体征外, 大鼠行走时向瘫痪侧旋转, 记 3 分。

鉴定为脑瘫的大鼠, 必须同时具备行为学评估中悬吊试验异常、不自主动作异常、Bederson 评分  $\geq 1$  分, 选取缺血

缺氧性脑损伤模型大鼠进行后续实验<sup>[13-14]</sup>。

1.4.3 分组及给药 64 只大鼠随机分为正常组 12 只, 模型组 12 只, 米诺环素组及舒筋健脑方低、中、高剂量组各 10 只。除正常组外, 其余各组在模型构建成功后开展后续研究。参考既往研究<sup>[15]</sup>, 米诺环素组大鼠予以 40 mg/(kg·d) 盐酸米诺环素灌胃; 舒筋健脑方低、中、高剂量组大鼠分别予舒筋健脑方颗粒 4, 8, 16 g/(kg·d) 灌胃; 正常组及模型组予等剂量生理盐水灌胃。大鼠每日灌胃 1 次, 连续干预 1 周。

1.4.4 行为学评价 干预 1 周后再次按照 1.4.2 描述进行行为学检测。

1.4.5 大脑皮质组织形态学检测 干预 1 周后, 所有大鼠禁食 12 h, 麻醉后, 取各组大鼠大脑左侧皮质组织, 使用多聚甲醛固定后进行苏木精-伊红染色, 封固后于光学显微镜下扫描观察。

1.4.6 Elisa 法检测大脑皮质组织炎症相关因子的水平 干预 1 周后, 取各组大鼠大脑左侧皮质组织 50 mg, 加入 1 mL 匀浆缓冲液, 用匀浆器充分匀浆, 3 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清。采用 ELISA 试剂盒检测肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 10 水平, 检测均按照试剂盒说明严格操作。

1.4.7 免疫组化检测大脑皮质组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 的表达 干预 1 周后, 取各组大鼠大脑左侧皮质组织, 石蜡切片, 脱蜡至水, 使用缓冲液及体积分数 3% 过氧化氢室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 分别滴加一抗(JAK2 按 1 : 200 稀释; p-JAK2 按 1 : 100 稀释; p-STAT3 按 1 : 100 稀释), 4 °C 条件下过夜, PBS 冲洗, 滴加二抗稀释, 室温孵育 20 min, PBS 冲洗, 加入 ABC 复合物, 室温孵育 20 min, PBS 冲洗后加入 0.03% DAB 显色, 苏木素复染, 乙醇梯度浓度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶制片, 于 400 倍光学显微镜观察。使用 Image J 软件分析蛋白阳性表达面积。

1.4.8 Western blot 检测大脑皮质组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白的表达 干预 1 周后, 取各组大鼠大脑左侧皮质组织制成匀浆, 装入预冷的 EP 管中, 加入细胞裂解液 50  $\mu$ L, 冰上静置 20 min, 充分裂解后将组织匀浆于 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至新的预冷 EP 管中, BCA 法对蛋白浓度进行测定。加入 5 $\times$ loading buffer, 95 °C 蛋白变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳, 15 V 电转 25 min, 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗相关抗体(JAK2 按 1 : 2 000 稀释; p-JAK2 按 1 : 2 000 稀释; p-STAT3 按 1 : 1 000 稀释; GAPDH 按 1 : 5 000 稀释), 封口, 4 °C 中过夜孵育, TBST 洗膜 3 次, 对应的二抗(JAK2、p-JAK2、p-STAT3 均按 1 : 2 000 稀释; GAPDH 按 1 : 3 000 稀释) 孵育 1 h 后洗膜显影, 以 GAPDH 为内参计算各蛋白的表达, 利用 Image J 图像处理软件进行灰度值测定。

1.5 主要观察指标 ①大鼠行为学评分; ②大脑左侧皮质组织形态结构; ③大脑左侧皮质组织肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 10 表达; ④大脑左侧皮质组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 的蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计分析软件对数据进行统计分析, 连续变量用  $\bar{x} \pm s$  表示。对具有正态分布及符合方差齐性检验的连续数据进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法; 对非正态分布的连续数据进行非参数检验。  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。该文章的统计学方法已经北京中医药大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用新生大鼠 64 只, 分为 6 组, 实验过程无脱失, 64 只大鼠进入了结果分析。

2.2 各组大鼠行为学评分 见表 1。干预 1 周后与正常组相比, 模型组大鼠悬吊实验得分显著降低 ( $P < 0.01$ )、不自主动作得分升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组大鼠悬吊实验得分升高 ( $P < 0.05$ ), 舒筋健脑方高剂量组大鼠不自主动作得分显著降低 ( $P < 0.01$ ); 各组大鼠 Bederson 评分无显著差异。

表 1 | 各组大鼠行为学评分结果

( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 | Behavioral scores in rats

组别	n	悬吊实验得分	不自主动作得分	Bederson 评分
正常组	12	2.89±0.78	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	12	1.67±0.71 <sup>b</sup>	0.88±0.35 <sup>a</sup>	1.88±0.84
米诺环素组	10	2.56±0.73 <sup>c</sup>	0.50±0.53 <sup>a</sup>	1.63±0.70
舒筋健脑方低剂量组	10	2.22±0.44 <sup>c</sup>	0.50±0.53 <sup>a</sup>	1.38±0.52
舒筋健脑方中剂量组	10	2.56±0.73 <sup>c</sup>	0.38±0.52	1.25±0.46
舒筋健脑方高剂量组	10	2.56±0.53 <sup>c</sup>	0.33±0.50 <sup>c</sup>	1.56±0.53

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

2.3 各组大鼠大脑左侧皮质组织形态学观察 见图 1。正常组神经细胞形态正常, 细胞结构完整, 排列有序, 胞核淡蓝色, 呈圆形, 核膜清晰, 核仁形态正常, 胞质淡红色; 模型组神经细胞结构破坏, 大量空泡形成, 大量神经细胞坏死, 细胞肿胀, 细胞间隙增大, 细胞核固缩, 体积减小, 轮廓不清楚; 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组缺血缺氧性改变减轻, 细胞间隙减小, 少量神经细胞坏死及少量空泡形成, 部分细胞核固缩变小。

2.4 各组大鼠大脑左侧皮质组织炎症相关因子 Elisa 检测结果 见表 2。

表 2 | 各组大鼠大脑左侧皮质肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 10 检测结果

( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

Table 2 | Levels of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 10 in the rat left cerebral cortex tissue

组别	n	肿瘤坏死因子 $\alpha$	白细胞介素 1 $\beta$	白细胞介素 10
正常组	4	43.63±14.46	819.32±127.30	87.00±9.11
模型组	4	89.36±12.48 <sup>b</sup>	1 439.34±112.74 <sup>b</sup>	55.78±25.15 <sup>a</sup>
米诺环素组	3	63.52±9.59 <sup>bc</sup>	1 145.07±75.52 <sup>b</sup>	68.23±15.03 <sup>a</sup>
舒筋健脑方低剂量组	3	77.04±2.40 <sup>bc</sup>	1 128.03±158.57 <sup>b</sup>	62.07±10.10 <sup>b</sup>
舒筋健脑方中剂量组	3	70.54±9.75 <sup>bc</sup>	1 060.19±77.70 <sup>bc</sup>	77.49±24.74 <sup>a</sup>
舒筋健脑方高剂量组	3	72.39±11.52 <sup>bc</sup>	953.50±107.01 <sup>c</sup>	73.90±5.47 <sup>a</sup>

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

与正常组比, 模型组肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  质量浓度显著升高 ( $P < 0.01$ ), 白细胞介素 10 质量浓度降低

( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组肿瘤坏死因子  $\alpha$  质量浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 舒筋健脑方中、高剂量组白细胞介素 1 $\beta$  质量浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组白细胞介素 10 质量浓度差异无显著性意义, 但均值均高于模型组。

2.5 各组大鼠大脑左侧皮质组织免疫组化染色 见图 2-4, 表 3。正常组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白少量表达, 染色为棕黄色或棕褐色, 细胞核及细胞质中均可见表达; 与正常组相比, 模型组中 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且随中药浓度增加, 表达逐渐降低。

表 3 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织免疫组化定量分析结果

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , 相对表达量)

Table 3 | Immunohistochemical quantitative analysis of the rat left cerebral cortex tissue

组别	JAK2	p-JAK2	p-STAT3
正常组	0.059±0.005	0.054±0.003	0.054±0.004
模型组	0.141±0.004 <sup>a</sup>	0.099±0.003 <sup>a</sup>	0.108±0.003 <sup>a</sup>
米诺环素组	0.067±0.003 <sup>ab</sup>	0.083±0.003 <sup>ab</sup>	0.052±0.004 <sup>b</sup>
舒筋健脑方低剂量组	0.105±0.003 <sup>ab</sup>	0.076±0.002 <sup>ab</sup>	0.081±0.005 <sup>ab</sup>
舒筋健脑方中剂量组	0.092±0.003 <sup>ab</sup>	0.076±0.003 <sup>ab</sup>	0.073±0.003 <sup>ab</sup>
舒筋健脑方高剂量组	0.073±0.003 <sup>ab</sup>	0.071±0.003 <sup>ab</sup>	0.065±0.004 <sup>ab</sup>

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.6 各组大鼠大脑左侧皮质组织 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白印迹检测结果 见表 4, 图 5。与正常组相比, 模型组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 米诺环素组、舒筋健脑方各剂量组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。

表 4 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织蛋白印迹定量分析结果

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , 相对表达量)

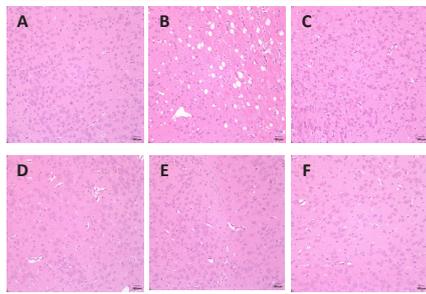
Table 4 | Western blot quantitative analysis of the rat left cerebral cortex tissue

组别	n	JAK2/GAPDH	p-JAK2/GAPDH	p-STAT3/GAPDH
正常组	4	0.38±0.05	0.47±0.06	0.60±0.14
模型组	4	0.93±0.15 <sup>b</sup>	1.22±0.13 <sup>b</sup>	1.13±0.08 <sup>a</sup>
米诺环素组	3	0.71±0.18 <sup>bc</sup>	0.81±0.19 <sup>bc</sup>	0.72±0.13 <sup>a</sup>
舒筋健脑方低剂量组	3	0.71±0.46 <sup>bc</sup>	0.76±0.13 <sup>b</sup>	0.68±0.18 <sup>b</sup>
舒筋健脑方中剂量组	3	0.67±0.11 <sup>bc</sup>	0.79±0.13 <sup>bc</sup>	0.71±0.16
舒筋健脑方高剂量组	3	0.65±0.14 <sup>bc</sup>	0.83±0.06 <sup>c</sup>	0.91±0.06 <sup>a</sup>

表注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论 Discussion

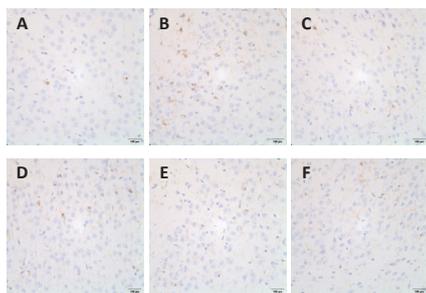
脑瘫属于中医“五迟五硬”的范畴, 小儿先天精血亏损, 后天气血不足, 脾肾亏虚; 加之脑络损伤, 气血瘀滞, 筋骨失养, 出现生长发育迟缓、肌肉痿软、关节活动不利。故其基本病机为脾肾不足、血瘀风动, 治则为补益脾肾、熄风通络<sup>[16]</sup>。舒筋健脑方中黄芪善补诸虚不足、补气升阳, 气旺则血行, 功大力宏; 益智仁温补肾气、暖脾固精, 共为君药。杜仲补肝肾、强筋骨; 当归养血柔肝, 化瘀而不伤血; 牛膝活血祛瘀、滋补肝肾、祛风除湿, 共为臣药。赤芍入肝经血分,



图注：图 A 为正常组；B 为模型组；C 为米诺环素组；D-F 分别为舒筋健脑方低、中、高剂量组

图 1 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织形态 (苏木精 - 伊红染色, ×200)

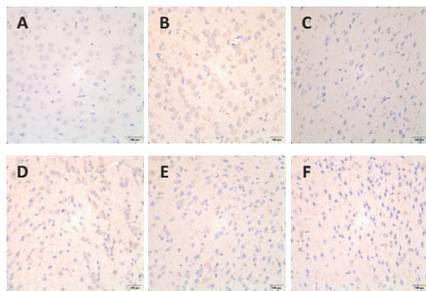
Figure 1 | Morphology of the rat left cerebral cortex tissue (hematoxylin-eosin staining, ×200)



图注：图 A 为正常组；B 为模型组；C 为米诺环素组；D-F 分别为舒筋健脑方低、中、高剂量组。JAK2 蛋白染色为棕黄色或棕褐色。与模型组相比，米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组 JAK2 蛋白表达降低

图 2 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织 JAK2 免疫组化结果 (×400)

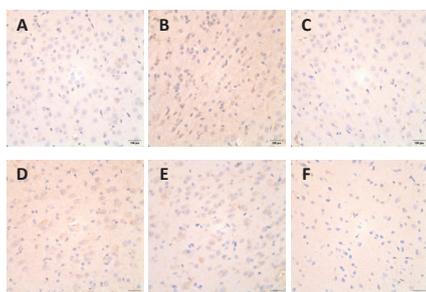
Figure 2 | Immunohistochemical staining (JAK2) of the rat left cerebral cortex tissue (×400)



图注：图 A 为正常组；B 为模型组；C 为米诺环素组；D-F 分别为舒筋健脑方低、中、高剂量组。p-JAK2 蛋白染色为棕黄色或棕褐色。与模型组相比，米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组 p-JAK2 蛋白表达降低

图 3 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织 p-JAK2 免疫组化结果 (×400)

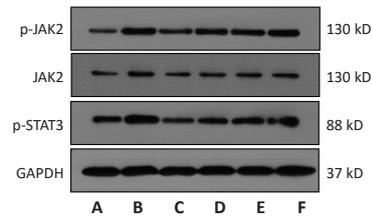
Figure 3 | Immunohistochemical staining (p-JAK2) of the rat left cerebral cortex tissue (×400)



图注：图 A 为正常组；B 为模型组；C 为米诺环素组；D-F 分别为舒筋健脑方低、中、高剂量组。p-STAT3 蛋白染色为棕黄色或棕褐色。与模型组相比，米诺环素组及舒筋健脑方各剂量组 p-STAT3 蛋白表达降低

图 4 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织 p-STAT3 免疫组化结果 (×400)

Figure 4 | Immunohistochemical staining (p-STAT3) of the rat left cerebral cortex tissue (×400)



图注：图中 A 为正常组，B 为模型组，C 为米诺环素组，D-F 分别为舒筋健脑方低、中、高剂量组。与模型组相比，米诺环素组、舒筋健脑方各剂量组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 相对表达量降低

图 5 | 各组大鼠左侧大脑皮质组织蛋白印迹结果

Figure 5 | Western blot detection of the rat left cerebral cortex tissue

长于活血散瘀、清肝泻火；钩藤清热平肝、熄风止痉，兼具甘凉清解、疏泄透达的特性，共为佐药。伸筋草活血舒筋、祛风除湿，透骨草活血化瘀、通经透骨，共为使药。诸药配伍，共奏补益脾肾、熄风通络之功。

Rice-Vannucci 模型是目前最为常用的模拟脑瘫的动物模型，该方法通过结扎幼鼠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，使幼鼠在大脑发育的关键时期受到缺血缺氧损伤<sup>[9]</sup>。此次研究发现，Rice-Vannucci 模型大鼠表现出反应迟钝、四肢肌张力增高、站立不稳等表现，这与脑瘫的典型特征相符合，并通过行为学评价确定实验用模型鼠造模成功。此次研究选择米诺环素作为阳性对照药物，研究发现，米诺环素能抑制小胶质细胞活化，减轻脑组织炎症及氧化应激反应，发挥脑保护作用<sup>[17]</sup>。

炎症反应是脑瘫关键机制之一，脑瘫患儿大脑细胞供血不足，血氧含量低，大量自由基、炎症因子释放，诱发一系列级联反应，最终导致神经元坏死及凋亡<sup>[18]</sup>。小胶质细胞是介导炎症反应的重要参与者，在维持中枢神经系统微环境稳态中扮演着重要角色<sup>[19-21]</sup>。小胶质细胞属单核巨噬细胞系，定植于中枢神经系统，激活后可极化为 M1 及 M2 两种不同表型。M1 型分泌促炎细胞因子，如白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  等，加剧炎症反应。M2 型分泌抑炎细胞因子，如白细胞介素 10 等，发挥神经保护作用。当缺血缺氧脑损伤发生后，M1 型小胶质细胞明显升高，直至 2 周后仍持续上升<sup>[22-23]</sup>。临床研究发现促炎因子在脑瘫患儿血清中持续高表达<sup>[24]</sup>。临床和基础研究都证明炎症反应在脑瘫发生过程中可能持续存在。此次研究发现，舒筋健脑方能有效地抑制缺血缺氧后大脑皮质组织促炎因子白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达，促进抑炎因子白细胞介素 10 表达，具有不亚于米诺环素的效果。

JAK2/STAT3 信号通路是中枢神经系统介导炎症和免疫反应的关键信号通路，参与神经细胞存活、增殖、分化、凋亡的过程<sup>[25-26]</sup>。JAK 家族中，JAK2 能特异性激活 STAT3。细胞因子与细胞膜上的受体结合促进跨膜受体多聚化，JAK2 靠近膜受体并磷酸化酪氨酸残基，形成 p-JAK2，继而招募 STAT3 并促使其磷酸化，形成 p-STAT3。p-STAT3 进入细胞核识别特定 DNA 序列，调控相关基因转录<sup>[27]</sup>。JAK2 磷酸化过程在脑损伤中存在，抑制 JAK2 磷酸化可减少神经元死亡，保护受

损脑组织<sup>[28]</sup>。也有研究表明缺血缺氧条件下能显著促进未成熟大脑 STAT3 表达,被激活的 STAT3 与炎症反应关系密切<sup>[29]</sup>。通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路,能有效减少促炎因子表达,减轻脑损伤<sup>[30-31]</sup>。因此,JAK2/STAT3 信号通路可能是治疗脑瘫的有效靶点。此次研究发现,模型组大鼠 p-JAK2 和 p-STAT3 显著提升,这表明缺血缺氧下,JAK2/STAT3 通路被激活。而舒筋健脑方干预后能显著抑制该通路蛋白表达,以高剂量组作用最为明显。

综上所述,舒筋健脑方能减轻大脑皮质组织炎症反应,其作用机制可能与其抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。但此次研究未设计回复实验,无法证明舒筋健脑方对 JAK2/STAT3 信号通路的特异性调控作用,有待今后实验进一步补充。

**作者贡献:** 实验设计为刘港、曾杰,实验实施为曾杰、赵亚林、邓博文、蒋昇源,数据分析为张亚奇、赵毅,论文撰写为刘港、任敬佩、胡传宇,实验评估为徐林、穆晓红。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- 中国康复医学会儿童康复专业委员会,中国残疾人康复协会小儿脑性瘫痪康复专业委员会,中国医师协会康复医师分会儿童康复专业委员会等. 中国脑性瘫痪康复指南(2022)第三章: ICF-CY 框架下的儿童脑瘫评定[J]. 中华实用儿科临床杂志,2022,37(15):1121-1141.
- 封玉霞,庞伟,李鑫,等. 中国 0~6 岁儿童脑瘫患病率的 Meta 分析[J]. 中国全科医学,2021,24(5):603-607.
- 中国康复医学会儿童康复专业委员会,中国残疾人康复协会小儿脑性瘫痪康复专业委员会,中国医师协会康复医师分会儿童康复专业委员会等. 中国脑性瘫痪康复指南(2022)第四章: 康复治疗(下)[J]. 中华实用儿科临床杂志,2022,37(17):1281-1309.
- LI B, CONCEPCION K, MENG X, et al. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol.* 2017;159:50-68.
- WU G, CHEN Z, WANG P, et al. Hydrogen inhalation protects hypoxic-ischemic brain damage by attenuating inflammation and apoptosis in neonatal rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(12):1017-1027.
- PEEPLES ES, GENARO-MATTOS TC. Ferroptosis: A Promising Therapeutic Target for Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7420.
- 袁巧,谢丽英,陈朝俊. 黄芪多糖减轻大鼠中动脉闭塞模型大鼠的血脑屏障损伤: 基于抑制 P2X7R 通道[J]. 南方医科大学学报,2022,42(11):1705-1711.
- LI J, DU Q, LI N, et al. *Alpinia oxyphylla* Fructus and Alzheimer's disease: An update and current perspective on this traditional Chinese medicine. *Biomed Pharmacother.* 2021;135:111167.
- RICE JE 3RD, VANNUCCI RC, BRIERLEY JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9(2):131-141.

- TAI WC, BURKE KA, DOMINGUEZ JF, et al. Growth deficits in a postnatal day 3 rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Behav Brain Res.* 2009;202(1):40-49.
- 宋红花,吴允佳,李海英. 新生大鼠缺血缺氧性脑损伤模型的早期鉴定[J]. 南通大学学报(医学版),2017,37(5):452-455.
- 陈刚,王伟哲,陈明钊,等. 新生幼鼠缺血缺氧性脑损伤模型的实验研究[J]. 中国康复理论与实践,2012,18(7):612-614.
- 付许伟. 成年大鼠痉挛型脑瘫模型构建与评估的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2018.
- ASGARI TAEI A, DARGAHI L, NASOOHI S, et al. The conditioned medium of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviates neurological deficits and improves synaptic recovery in experimental stroke. *J Cell Physiol.* 2021;236(3):1967-1979.
- 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- 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.
- CELORRIO M, SHUMILOV K, PAYNE C, et al. Acute minocycline administration reduces brain injury and improves long-term functional outcomes after delayed hypoxemia following traumatic brain injury. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):10.
- BALLABH P, DE VRIES LS. White matter injury in infants with intraventricular haemorrhage: mechanisms and therapies. *Nat Rev Neurol.* 2021;17(4):199-214.
- HEMONNOT AL, HUA J, ULMANN L, et al. Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:233.
- SILVIN A, UDERHARDT S, PIOT C, et al. Dual ontogeny of disease-associated microglia and disease inflammatory macrophages in aging and neurodegeneration. *Immunity.* 2022;55(8):1448-1465.
- YIN XY, WANG CC, DU P, et al. Muse cells decrease the neuroinflammatory response by modulating the proportion of M1 and M2 microglia in vitro. *Neural Regen Res.* 2023;18(1):213-218.
- LIDDELOW SA, GUTTENPLAN KA, CLARKE LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-487.
- LUKENS JR, EYO UB. Microglia and Neurodevelopmental Disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2022;45:425-445.
- 刘洪俊. IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  参与脑性瘫痪患儿脑损伤的相关性研究[D]. 新乡:新乡医学院,2017.
- HAO N, ZHOU Z, ZHANG F, et al. Interleukin-29 Accelerates Vascular Calcification via JAK2/STAT3/BMP2 Signaling. *J Am Heart Assoc.* 2023;12(1):e027222.
- DAI XY, LIU L, SONG FH, et al. Targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway for chronic pain. *Aging Dis.* 2023. doi:10.14336/AD.2023.0515.
- YU L, ZHANG Y, CHEN Q, et al. Formononetin protects against inflammation associated with cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2022;149:112836.
- ZHONG Y, GU L, YE Y, et al. JAK2/STAT3 Axis Intermediates Microglia/Macrophage Polarization During Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Neuroscience.* 2022;496:119-128.
- ZHONG Y, YIN B, YE Y, et al. The bidirectional role of the JAK2/STAT3 signaling pathway and related mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Exp Neurol.* 2021;341:113690.
- LONG QH, WU YG, HE LL, et al. Suan-Zao-Ren Decoction ameliorates synaptic plasticity through inhibition of the A $\beta$  deposition and JAK2/STAT3 signaling pathway in AD model of APP/PS1 transgenic mice. *Chin Med.* 2021;16(1):14.
- 曾杰,赵亚林,邓博文,等. JAK2/STAT3 信号通路在大鼠缺血缺氧后小胶质细胞活化中的作用[J]. 中国骨伤,2020,33(2):190-194.

(责任编辑: WL, WZH, ZN, LWJ)