

基于GRB2/ERK/CRLS1通路探讨益肺宣肺降浊方对血管性痴呆模型大鼠的改善作用机制^Δ

卓桂锋^{1*}, 陈炜², 朱小敏², 符钰岚², 张金枝³, 吴林^{3#}(1. 广西中医药大学基础医学院, 南宁 530022; 2. 广西中医药大学第一附属医院脑病科, 南宁 530022; 3. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530200)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)07-0877-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.07.09



摘要 目的 基于生长因子受体结合蛋白2(GRB2)/胞外信号调节激酶(ERK)/心磷脂合成酶1(CRLS1)通路,探讨益肺宣肺降浊方(YFXF)对血管性痴呆(VAD)模型大鼠的改善作用机制。方法 采用双侧颈总动脉永久性结扎法构建VAD大鼠模型,将48只造模成功的大鼠随机分为模型组(生理盐水)、盐酸多奈哌齐组(阳性对照组,0.2 g/kg)及YFXF低、高剂量组(12.18、24.36 g/kg,以生药总量计),另设假手术组(生理盐水),每组12只。每天灌胃给药/生理盐水1次,连续30 d。末次给药后,评估大鼠空间认知能力,观察其海马组织病理形态学变化,检测其血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素4(IL-4)含量,检测其海马组织中GRB2/ERK/CRLS1通路相关蛋白及GRB2、CRLS1、NADH脱氢酶亚基1(ND1)、Tafazzin(TAZ)、磷脂移位酶3(PLSCR3)mRNA表达水平,并检测其海马组织中腺苷三磷酸(ATP)含量。结果 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.05$),穿越平台次数显著减少($P<0.05$),并可见海马锥体细胞和尼氏小体数量锐减;血清中TNF- α 含量显著升高($P<0.05$),IL-4含量显著降低($P<0.05$);海马组织中GRB2蛋白表达水平、CRLS1蛋白表达水平、ERK蛋白的磷酸化水平以及GRB2、CRLS1、ND1、TAZ、PLSCR3 mRNA相对表达量和ATP含量均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠海马组织中上述病理改变均有所缓解,各定量指标均显著回调($P<0.05$)。结论 YFXF可能通过激活GRB2/ERK/CRLS1通路,维护心磷脂稳态,改善线粒体能量代谢,从而改善VAD模型大鼠海马神经元损伤。

关键词 益肺宣肺降浊方;血管性痴呆;神经元损伤;GRB2/ERK/CRLS1通路;线粒体;心磷脂

Study on the improving mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula on vascular dementia model rats based on the GRB2/ERK/CRLS1 pathway

ZHUO Guifeng¹, CHEN Wei², ZHU Xiaomin², FU Yulan², ZHANG Jinzhi³, WU Lin³(1. School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 2. Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 3. School of Graduate, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the improve mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula (YFXF) on vascular dementia (VAD) model rats based on the growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/cardiolipin synthase 1 (CRLS1) pathway. **METHODS** VAD rat model was established by permanent bilateral common carotid artery ligation. Forty-eight successfully modeled rats were randomly divided into the model group (normal saline), donepezil hydrochloride group (positive control group, 0.2 g/kg), and YFXF low- and high-dose groups (12.18 and 24.36 g/kg, calculated based on the total amount of crude drug), respectively. In addition, a sham operation group (normal saline) was set up. There were 12 rats in each group. Daily intragastric administration of drug or normal saline was performed for 30 consecutive days. After the last administration, the spatial cognitive ability of the rats was evaluated, the pathological morphology of the hippocampus was observed, the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-4 (IL-4) in serum were detected, the expression levels of GRB2/ERK/CRLS1 pathway-related proteins and the mRNA levels of GRB2, CRLS1, NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1), Tafazzin (TAZ), phospholipid scramblase 3 (PLSCR3) and the ATP content in hippocampal tissue were measured. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the escape latency of rats in the model group was significantly prolonged ($P<0.05$), and the number of crossing platform was significantly reduced ($P<0.05$), while the number of pyramidal cells and Nissl bodies in the hippocampus decreased sharply; the content of TNF- α in serum was significantly increased ($P<0.05$), and the content of IL-4 was significantly decreased ($P<0.05$); the expression levels of GRB2 and CRLS1 proteins, the phosphorylation level of ERK protein,

^Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82374387);广西自然科学基金项目(No.2025GXNSFAA069990);广西中医药大学引进博士科研启动基金项目(No.2024BS012)

* 第一作者 讲师,博士。研究方向:中医药防治脑系疾病。
E-mail: 12942105@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中医药防治脑系疾病。E-mail: 358304005@qq.com

the relative expression levels of GRB2, CRLS1, ND1, TAZ, and PLSCR3 mRNA, and the content of ATP in hippocampal tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the above pathological changes in the hippocampal tissue of each administration group were alleviated, and the quantitative indicators were significantly restored ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS YFXF may improve hippocampal neuron injury in VAD rats by activating the GRB2/ERK/CRLS1 pathway, maintaining cardiolipin homeostasis, and improving mitochondrial energy metabolism.

KEYWORDS Yifei xuanfei jiangzhuo formula; vascular dementia; neuron injury; GRB2/ERK/CRLS1 pathway; mitochondria; cardiolipin

血管性痴呆(vascular dementia, VAD)是由脑血管病变引起的认知功能障碍综合征,其病理机制涉及线粒体能量代谢紊乱、神经细胞凋亡等^[1-2]。近年来的研究发现,心磷脂作为线粒体内膜特有的磷脂成分,其稳态失衡可导致线粒体膜电位崩溃、活性氧蓄积及神经元死亡,在神经退行性疾病中起关键作用^[3]。临床证据显示,抗心磷脂抗体水平异常升高是VAD的危险因素^[4]。抗心磷脂抗体可与心磷脂特异性结合,阻断心磷脂外化至细胞线粒体外膜表面,导致神经元线粒体功能障碍^[5]。这提示心磷脂代谢与VAD病理进程密切相关。心磷脂生物合成的终末步骤由心磷脂合成酶1(cardiolipin synthase 1, CRLS1)催化完成,若CRLS1存在功能缺陷,将直接导致心磷脂含量减少及多系统线粒体肌病发生^[6]。因此,恢复CRLS1介导的心磷脂稳态可能为VAD治疗的新靶点。

生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound protein 2, GRB2)作为衔接蛋白,能通过激活下游胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路参与细胞存活与凋亡的调控^[7]。研究表明,在缺血性脑卒中模型小鼠中,GRB2功能抑制可诱发神经元自噬失调,导致认知功能障碍加重^[8]。值得注意的是,GRB2可调节ERK磷酸化级联反应,进而介导CRLS1启动子结合并增强其转录活性,从而维持心磷脂稳态^[9]。这提示GRB2/ERK/CRLS1通路在脑血管性认知障碍中具有重要地位。

中医药在VAD防治中具有悠久历史和多成分、多靶点、多途径的独特优势。益肺宣肺降浊方(后文简称为“YFXF”)是广西中医药大学第一附属医院的常用协定方,基于“从肺论治”理论拟定。该方含黄芪、人参等9味中药,具有益肺宣肺、祛痰降浊之效,用于治疗痴呆。临床证实该方可改善VAD患者认知功能,其机制与调控表皮生长因子受体介导的磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B-丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/ERK通路相关^[9-10]。鉴于MAPK/ERK通路与GRB2相关通路存在交互作用^[7],且YFXF的核心成分人参皂苷Rg₃被证实可通过调控GRB2表达恢复心磷脂稳态^[4],本课题组推测该方可能通过调节GRB2/ERK/CRLS1通路维护心磷脂代谢平衡,进而拮抗VAD神经元损伤。鉴于此,本研究拟整合心磷脂稳态调控与VAD中医治疗机制,通过体内实验探讨YFXF对GRB2/ERK/

CRLS1通路的靶向调节作用,为阐明该方改善VAD的作用机制提供新依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有DM IL LED型光学显微镜(德国Leica公司)、UNHOOD II型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)、Infinite[®] M200 Pro型全波长多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)、Axio Imager A2型荧光显微镜(德国Zeiss公司)、LightCycler[®] 480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(瑞士Roche公司)、Histocentre3型组织包埋机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、SE250型垂直电泳仪(美国GE公司)等。

1.2 主要药品与试剂

黄芪、人参、麦冬、桔梗、苦杏仁、三七、苏子、石菖蒲、酒大黄药材均购自广西中医药大学第一附属医院,经该院药学部主任中药师田元春鉴定均为真品。盐酸多奈哌齐片(规格5 mg/片,批号2203026)购自卫材(中国)药业有限公司。

苏木精、伊红染液(批号分别为BA-4041、BA-4024)均购自珠海贝索生物技术有限公司;腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒(批号E-BC-F002)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;RIPA裂解液、白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA试剂盒、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为G2002、GB300005、GER0004、GB11002)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠二抗(批号分别为926-32211、926-32210)均购自北京博奥森生物技术有限公司;鼠源ERK抗体(批号MA5-15227)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔源GRB2、磷酸化ERK(p-ERK)、CRLS1抗体(批号分别为10254-2-AP、28733-1-AP、14845-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;实时定量PCR试剂盒、逆转录试剂盒(批号分别为22204、22107)均购自上海吐露港生物科技有限公司。NADH脱氢酶亚基1(NADH dehydrogenase subunit 1, ND1)、Tafazzin(线粒体心磷脂代谢关键酶,后文简称为“TAZ”)、磷脂移位酶3(phospholipid scramblase 3, PLSCR3)等PCR引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

本研究所用动物为60只7周龄SPF级SD雄性大鼠,体重(220±20)g,购自湖南斯莱克星达实验动物有限公司[动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004],实验动物使用合格证号为SYXK(桂)2019-0001。所有大鼠均饲养于广西中医药大学实验动物中心SPF级屏障环境中,在恒温(24±1)℃、12h光/12h暗循环条件下进行标准化饲养。本实验中所有动物的操作均符合动物福利伦理相关规定,并经广西中医药大学动物实验伦理委员会审核通过(批准号:DW20240507-118-02)。

2 方法

2.1 药液的制备

按YFXF处方组成称取相应药材(黄芪、人参、麦冬、三七、苏子及石菖蒲各15g,桔梗、苦杏仁各10g,酒大黄6g),加2000mL水煎煮提取3次(2h/次),合并滤液,经45℃减压浓缩制成生药质量浓度为24.36g/mL的药液,于4℃条件下保存。另将盐酸多奈哌齐片研细,以蒸馏水溶解,配制成质量浓度为0.045mg/mL的阳性对照溶液。

2.2 造模、分组与给药

首先将SD大鼠随机分配至假手术组(SHAM, $n=12$)和造模组($n=48$)。在异氟烷吸入麻醉下,造模组大鼠采用双侧颈总动脉永久性结扎法构建VAD模型,SHAM组大鼠仅游离血管^[11]。术后3d,通过水迷宫实验评估大鼠认知功能,以SHAM组大鼠逃避潜伏期为参考值,计算两组大鼠(每组选6只)逃避潜伏期的差值与参考值之比,若该比值>20%,则评定VAD模型构建成功^[11]。

选取造模成功的48只大鼠随机分为模型组(MOD组),YFXF低、高剂量组(YFXF-L、YFXF-H组),盐酸多奈哌齐(DH)组(阳性对照组),每组12只。YFXF-L组、YFXF-H组大鼠分别灌胃12.18、24.36g/kg的YFXF药液(以生药总量计,分别为临床等效剂量的1、2倍),DH组大鼠灌胃0.2g/kg的阳性对照药溶液(为临床等效剂量),SHAM组和MOD组大鼠灌胃等体积生理盐水。每天给药/生理盐水1次,持续30d。

2.3 大鼠空间认知能力评估

药物干预结束后,通过Morris水迷宫实验评估大鼠的空间认知能力。实验分两个阶段进行:实验前5d为定位航行实验——记录大鼠从下水到爬上隐蔽平台(第2象限,水下3cm)所需的时间,即逃避潜伏期;未找到平台的大鼠由实验者引导上台并停留10s,其逃避潜伏期记为60s。实验第6天开展空间探索测试——撤去平台后,统计60s内大鼠穿越平台次数。

2.4 标本制备

Morris水迷宫实验结束后,腹腔注射20%乌拉坦麻醉大鼠,经腹主动脉采血,离心(3000r/min,15min)分离血清,置于-80℃冰箱保存。每组随机取9只大鼠,

分离其海马组织,-80℃冻存,用于后续实时荧光定量PCR、Western blot实验及ATP含量测定;每组剩余3只大鼠的脑组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋制片(厚度约5μm),后续行苏木精-伊红(HE)、尼氏及免疫荧光染色分析。

2.5 大鼠血清中TNF-α和IL-4含量测定

采用ELISA法检测。取“2.4”项下每组6只大鼠的血清,按ELISA试剂盒说明书操作,使用酶标仪在450nm波长下测定各孔吸光度。依据标准曲线回归方程,计算大鼠血清中TNF-α和IL-4的含量。

2.6 大鼠海马组织病理形态学观察

采用HE和尼氏染色法观察。取“2.4”项下脑组织石蜡切片,脱蜡复水后,常规行HE染色和尼氏染色,于光学显微镜下检视大脑海马组织病理形态学改变情况并采集图像。

2.7 大鼠海马组织中GRB2/ERK/CRLS1通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下每组3只大鼠的海马组织,经低温匀浆、RIPA裂解液提取总蛋白并离心后,取上清用BCA法测定蛋白浓度并变性处理。取10μg变性蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再转印至PVDF膜,随后以5%脱脂牛奶室温封闭2h。洗膜后,将膜与一抗(GAPDH、GRB2、ERK的稀释比例均为1:2000,p-ERK的稀释比例为1:500,CRLS1的稀释比例为1:1500)及二抗(稀释比例为1:10000)依次孵育。显影后获取图像,借助Image J软件测定条带灰度值,以p-ERK与ERK的条带灰度值比值表示ERK蛋白的磷酸化水平,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 大鼠海马组织中CRLS1蛋白表达检测

采用免疫荧光法检测。取“2.4”项下每组3只大鼠的脑组织石蜡切片,经抗原修复与血清封闭后,与CRLS1一抗(稀释比例为1:500)在4℃下孵育过夜,然后与相应荧光二抗(稀释比例为1:500)在室温下孵育2h。采用DAPI标记细胞核以进行定位,封片后利用荧光显微镜观察海马组织中CRLS1的红色荧光阳性表达情况,采用Image J软件计算CRLS1的平均荧光强度(荧光强度越强表明蛋白表达水平越高)。

2.9 大鼠海马组织中GRB2、CRLS1、TAZ、PLSCR3、ND1 mRNA表达检测

取“2.4”项下每组3只大鼠的海马组织,提取组织中总RNA,经浓度与纯度检测合格后,将RNA反转录为cDNA,并以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR扩增。扩增体系(总体积20μL)为:SYBR Green Master Mix 5μL,cDNA模板1μL,上、下游引物各0.4μL,无核酸酶水13.2μL。扩增条件为:95℃预变性30s;95℃变性10s,60℃退火/延伸30s,共40个循环。采集荧光信号,

以 GAPDH 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 GRB2、CRLS1、ND1、TAZ、PLSCR3 mRNA 的相对表达量。引物序列及扩增产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物长度

引物	序列(5'-3')	产物大小/bp
GAPDH	上游:GACATGCCCGCTGGAGAAAC	138
	下游:AGCCAGGATGCCCTTAGT	
GRB2	上游:TTCAAGGTGCTTCGTGACGG	139
	下游:CCTGTTCTATGTCGGGAGG	
CRLS1	上游:GGCTAACGGATTGTGGAT	159
	下游:TGTAAGTGAGTGGGACTGGAAT	
ND1	上游:GGTACATACAACACGCAAGGC	110
	下游:GTTAGGGGCGTATGGTTCT	
TAZ	上游:AAATGGGGAATTGGACGGCT	165
	下游:AGGGAGTGTACTGAAGGGCT	
PLSCR3	上游:TCGCCAACCTGTTCTACGAG	152
	下游:CATCTGTGAGGGCTTCTCGG	

2.10 大鼠海马组织中 ATP 含量检测

采用比色法检测。取“2.4”项下每组 3 只大鼠的海马组织,经磷酸盐缓冲液漂洗后,冰浴匀浆,低温离心(10 000×g, 10 min, 4 °C)获取上清液,经 10% 三氯醋酸沉淀后二次离心。参照试剂盒标准,将 ATP 检测工作液(按 1:9 稀释)与样本(50 μL)于检测孔中共孵育,采用比色法结合标准曲线测定海马组织中 ATP 含量。

2.11 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,并根据方差齐与否分别选用 LSD 法(方差齐)或 Games-Howell 法(方差不齐)进行两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠空间认知能力评估结果

与 SHAM 组比较,MOD 组大鼠的逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$),穿越平台次数显著减少($P < 0.05$)。与 MOD 组比较,各给药组大鼠的逃避潜伏期均显著缩短($P < 0.05$),穿越平台次数均显著增加($P < 0.05$)。结果见图 1、图 2。

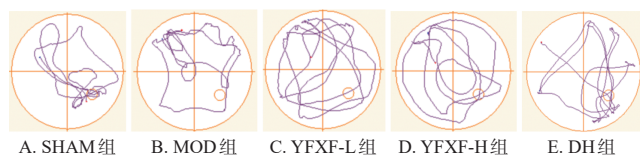


图 1 各组大鼠的空间探索测试运动轨迹图

3.2 大鼠血清中 TNF-α 和 IL-4 含量测定结果

与 SHAM 组比较,MOD 组大鼠血清中 TNF-α 含量显著升高($P < 0.05$),IL-4 含量显著降低($P < 0.05$)。与 MOD 组比较,各给药组大鼠血清中 TNF-α 含量均显著降低($P < 0.05$),IL-4 含量均显著升高($P < 0.05$)。结果见图 3。

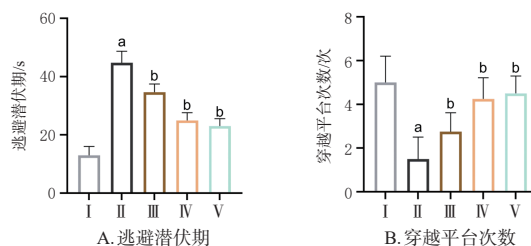


图 2 各组大鼠的逃避潜伏期及穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

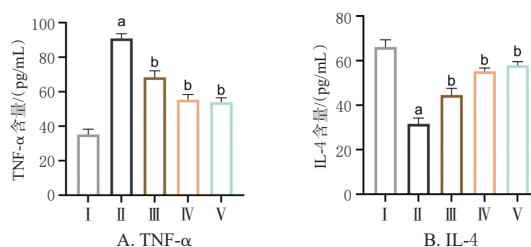
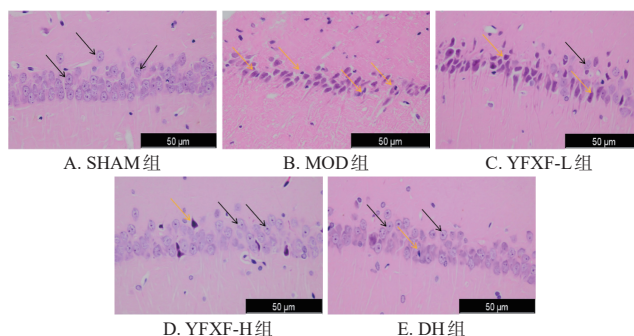


图 3 各组大鼠血清中 TNF-α 和 IL-4 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

3.3 大鼠海马组织病理形态学观察结果

SHAM 组大鼠海马组织形态结构完整,CA1 区锥体细胞排列规整致密,细胞核形态饱满、核仁清晰且染色均一,尼氏小体数量较为丰富,未见细胞凋亡、坏死及炎症细胞浸润。MOD 组大鼠海马组织呈现严重病理损伤,CA1 区细胞排列散乱,锥体细胞和尼氏小体数量锐减,大量神经元出现核固缩、深染现象。与 MOD 组相比,YFXF-L、YFXF-H 与 DH 组大鼠海马组织锥体细胞排列有序,尼氏小体数量较多,仅偶见少量固缩、深染细胞。结果见图 4、图 5。

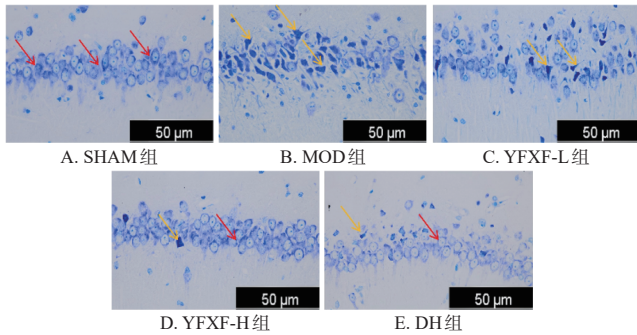


注:黑色箭头所指为锥体细胞,黄色箭头所指为固缩的神经元。

图 4 各组大鼠海马组织 HE 染色显微图

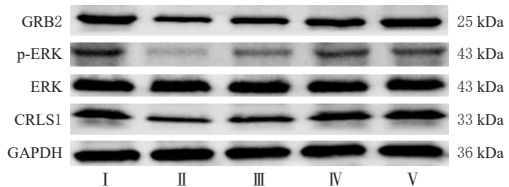
3.4 大鼠海马组织中 GRB2、p-ERK、ERK 和 CRLS1 蛋白表达检测结果

与 SHAM 组比较,MOD 组大鼠海马组织中 GRB2、CRLS1 蛋白表达水平及 ERK 蛋白的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$)。与 MOD 组比较,各给药组大鼠海马组织中 GRB2、CRLS1 蛋白表达水平及 ERK 蛋白的磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图 6、图 7、表 2。



注:黄色箭头所指为固缩的神经元,红色箭头所指为尼氏小体。

图5 各组大鼠海马组织尼氏染色显微图



I : SHAM组; II : MOD组; III : YFXF-L组; IV : YFXF-H组; V : DH组。

图6 各组大鼠海马组织中GRB2、p-ERK、ERK和CRLS1蛋白表达的电泳图

3.5 大鼠海马组织中GRB2、CRLS1、TAZ、PLSCR3、ND1 mRNA表达检测结果

与SHAM组比较,MOD组大鼠海马组织中GRB2、CRLS1、TAZ、PLSCR3、ND1 mRNA的相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。与MOD组比较,各给药组大鼠海马组织中GRB2、CRLS1、TAZ、PLSCR3、ND1 mRNA的相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。结果见表3。

3.6 大鼠海马组织中ATP含量检测结果

与SHAM组[(1.45 ± 0.15) mmol/L]比较,MOD组大鼠海马组织中ATP含量[(0.38 ± 0.04) mmol/L]显著降低($P < 0.05$);与MOD组比较,YFXF-L组、YFXF-H组、DH组大鼠海马组织中ATP含量[分别为(0.76 ± 0.05)、(0.92 ± 0.13)、(1.24 ± 0.20) mmol/L]均显著升高($P < 0.05$)。

4 讨论

VAD属中医学“痴呆”范畴,传统多从心肾论治。基于“肺-脑轴”调控假说,本团队提出肺金失养为VAD的核心病机。基于“从肺论治”拟定的YFXF以人参、黄芪为君,补益肺气;麦冬、桔梗、苦杏仁、苏子为臣,复肺宣降;佐以石菖蒲化痰、三七化瘀、酒大黄通腑;诸药合用,共奏益肺固本、宣降祛浊之效。本研究发现,与SHAM组比较,MOD组大鼠的逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少,并可见海马锥体细胞和尼氏小体数量锐减,血清中TNF- α 含量显著升高、IL-4含量显著降低;YFXF干预后,上述神经病理损伤、行为学指标和炎症指标均明显改善。这说明YFXF对VAD模型大鼠具有确切的保护神经、改善认知障碍作用。

心磷脂作为线粒体内膜特征性磷脂,对维持呼吸链超复合物稳定、嵴结构完整及线粒体自噬启动至关重要^[12]。临床研究发现,VAD患者可出现抗心磷脂抗体异常^[6]及CRLS1基因缺陷所致的线粒体功能障碍^[6]。本研究发现,VAD模型大鼠海马组织中心磷脂代谢相关基因CRLS1、TAZ、PLSCR3的mRNA表达下调趋势可被YFXF显著逆转。这提示,YFXF对VAD大鼠海马组织的心磷脂代谢有调控作用。值得注意的是,CRLS1作为心磷脂合成的关键限速酶,其表达缺陷可引发线粒体嵴结构解体^[13]和蛋白质合成障碍^[14],最终导致神经元能量危机。这一病理过程在脑血管病变中尤为突出——脑微血管内皮细胞的心磷脂缺失已被证实可损害呼吸储备能力^[15]。上述研究表明,心磷脂代谢与脑血管病变密切相关。

在分子机制层面,GRB2/ERK通路已被证实为调控CRLS1表达的上游关键“开关”。其中,GRB2作为一种多功能衔接蛋白,既可通过与七次跨膜受体结合,激活ERK信号转导通路,以促进细胞存活;也可通过与转录因子相互作用,直接调控下游基因表达^[16]。已有文献指出,GRB2的小泛素样修饰蛋白化修饰能够增强其与SOS1蛋白的结合能力,从而持续激活ERK通路^[17];而

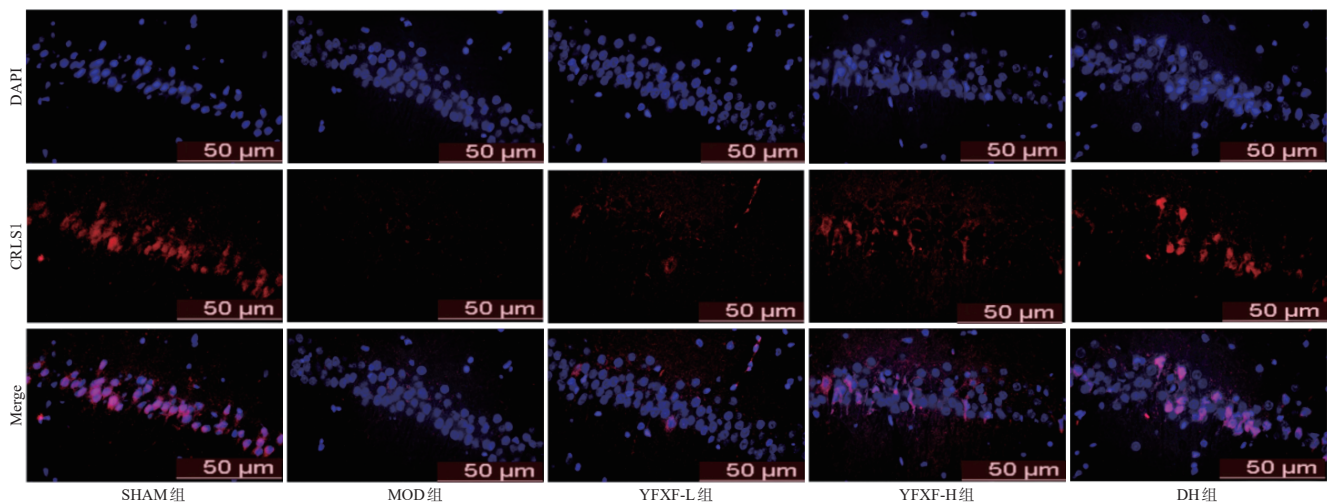


图7 各组大鼠海马组织中CRLS1表达的免疫荧光显微图

表2 各组大鼠海马组织中GRB2、CRLS1蛋白表达水平及ERK蛋白的磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GRB2/GAPDH	p-ERK/ERK	CRLS1	
			CRLS1/GAPDH	荧光强度
SHAM组	1.06±0.03	0.58±0.02	0.84±0.05	0.026±0.015
MOD组	0.67±0.04 ^a	0.22±0.02 ^a	0.49±0.03 ^a	0.001±0.000 ^a
YFXF-L组	0.79±0.04 ^a	0.36±0.01 ^b	0.64±0.03 ^b	0.007±0.001 ^b
YFXF-H组	0.89±0.06 ^a	0.51±0.02 ^b	0.69±0.02 ^b	0.010±0.006 ^b
DH组	0.96±0.04 ^a	0.50±0.03 ^b	0.71±0.02 ^b	0.015±0.002 ^b

a: 与SHAM组比较, $P < 0.05$; b: 与MOD组比较, $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠海马组织中GRB2、CRLS1、TAZ、PLSCR3、ND1 mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GRB2	CRLS1	TAZ	PLSCR3	ND1
SHAM组	1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.20
MOD组	0.22±0.02 ^a	0.21±0.02 ^a	0.48±0.04 ^a	0.28±0.08 ^a	0.15±0.01 ^a
YFXF-L组	0.46±0.05 ^b	0.52±0.06 ^b	0.67±0.05 ^b	0.67±0.02 ^b	0.52±0.03 ^b
YFXF-H组	0.60±0.04 ^b	0.72±0.05 ^b	0.81±0.03 ^b	0.87±0.03 ^b	0.67±0.17 ^b
DH组	0.67±0.11 ^b	0.79±0.10 ^b	0.85±0.02 ^b	0.91±0.04 ^b	0.70±0.08 ^b

a: 与SHAM组比较, $P < 0.05$; b: 与MOD组比较, $P < 0.05$ 。

ERK在磷酸化后可转位入核,进而升高CRLS1的转录水平^[18]。本研究发现,YFXF干预后可显著提高VAD模型大鼠海马组织中GRB2、CRLS1的蛋白表达水平及ERK蛋白的磷酸化水平,提升海马组织中ATP含量和GRB2、ND1 mRNA表达水平。其中,ATP含量的恢复直接反映了线粒体能量合成功能的改善,而ND1 mRNA表达上调则表明线粒体生物合成得到促进。这一结果提示,YFXF治疗VAD的作用机制可能与激活GRB2/ERK/CRLS1通路、维护心磷脂稳态与线粒体功能有关。

综上所述,YFXF可能通过激活GRB2/ERK/CRLS1通路维护心磷脂稳态,改善线粒体能量代谢,从而改善VAD模型大鼠海马神经元损伤。本研究为中药复方调控线粒体代谢防治VAD提供了新依据,但实验方面缺乏使用特异性的激动剂或抑制剂对通路各节点进行功能增益或阻断,有待后续进一步的深入研究。

参考文献

[1] HE Y Y, HE T T, LI H P, et al. Deciphering mitochondrial dysfunction: pathophysiological mechanisms in vascular cognitive impairment[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174:116428.

[2] MORGAN A E, MC AULEY M T. Vascular dementia: from pathobiology to emerging perspectives[J]. Ageing Res Rev, 2024, 96:102278.

[3] QI L F R, LIU S, FANG Q Y, et al. Ginsenoside Rg₃ restores mitochondrial cardiolipin homeostasis via GRB2 to prevent Parkinson's disease[J]. Adv Sci, 2024, 11(39):2403058.

[4] DE GODOY J M P, DE GODOY M R P, CIPULO J P, et al. Vascular dementia and anticardiolipin antibodies[J]. Med Sci Monit, 2005, 11(9):CR430-CR433.

[5] CHU C T, JI J, DAGDA R K, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimi-

nation signal for mitophagy in neuronal cells[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(10):1197.

[6] LEE R G, BALASUBRAMANIAM S, STENTENBACH M, et al. Deleterious variants in CRLS1 lead to cardiolipin deficiency and cause an autosomal recessive multi-system mitochondrial disease[J]. Hum Mol Genet, 2022, 31(21):3597-3612.

[7] NIZZARI M, VENEZIA V, REPETTO E, et al. Amyloid precursor protein and Presenilin 1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK 1, 2 signaling[J]. J Biol Chem, 2007, 282(18):13833-13844.

[8] LUO H C, YI T Z, HUANG F G, et al. Role of long non-coding RNA MEG3/miR-378/GRB2 axis in neuronal autophagy and neurological functional impairment in ischemic stroke[J]. J Biol Chem, 2020, 295(41):14125-14139.

[9] 陈炜,朱小敏,胡跃强,等. 益肺宣肺降浊方通过EGFR调节PI3K/Akt-MAPK/Erk通路改善血管性痴呆大鼠的记忆[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(8):46-50.

[10] 黄晓丹. 益肺宣肺降浊方联合多奈哌齐治疗痰浊阻窍型血管性痴呆的临床研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2019.

[11] 卓桂锋,陈炜,张金枝,等. 益肺宣肺降浊方抗血管性痴呆的作用机制研究[J]. 中国药房, 2024, 35(18):2207-2212.

[12] SUSTARSIC E G, MA T, LYNES M D, et al. Cardiolipin synthesis in brown and beige fat mitochondria is essential for systemic energy homeostasis[J]. Cell Metab, 2018, 28(1):159-174.e11.

[13] MATSUMURA A, HIGUCHI J, WATANABE Y, et al. Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology[J]. FEBS Lett, 2018, 592(2):209-218.

[14] LEE R G, GAO J J, SIIRA S J, et al. Cardiolipin is required for membrane docking of mitochondrial ribosomes and protein synthesis[J]. J Cell Sci, 2020, 133(14):jcs240374.

[15] NGUYEN H M, MEJIA E M, CHANG W G, et al. Reduction in cardiolipin decreases mitochondrial spare respiratory capacity and increases glucose transport into and across human brain cerebral microvascular endothelial cells[J]. J Neurochem, 2016, 139(1):68-80.

[16] PEDRO R P, DIAS R V R, MARTINS I B S, et al. Conformational flexibility of GRB2 as a key factor in the stability and regulation of its interaction with SOS1[J]. ACS Omega, 2025, 10(27):29119-29130.

[17] QU Y Y, CHEN Q, LAI X P, et al. SUMOylation of Grb2 enhances the ERK activity by increasing its binding with Sos1[J]. Mol Cancer, 2014, 13:95.

[18] LIU J L, DALAMAGA M. Targeting cardiolipin metabolism for Parkinson's disease therapy[J]. Metabol Open, 2024, 24:100327.

(收稿日期:2025-12-23 修回日期:2026-03-09)

(编辑:林静)