本文引用: 周佳丽, 卢晋, 李文艳, 彭瀛娴, 张谦, 苏维, 刘晓丹. 黄芪多糖通过Sonic hedgehog通路调控脑微血管周细胞定向分化抗脑缺血再灌注髓鞘损伤[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(10): 2008-2018.

黄芪多糖通过Sonic hedgehog通路调控脑微血管周细胞定向分化抗脑缺血再灌注髓鞘损伤

周佳丽[1,2],卢晋[1,2],李文艳[1,2],彭瀛娴[1,2],张谦[1,2],苏维[1]*,刘晓丹[1,2]*

1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.中西医结合心脑疾病防治湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208

〔**摘要**〕**目的** 探讨黄芪多糖(APS)通过音猬因子(Shh)信号通路调控脑微血管周细胞(BMPCs)增殖活化,并促进少突胶质前体细胞(OPCs)介导的髓鞘修复,从而减轻脑缺血再灌注后髓鞘损伤的作用机制。**方法** 采用大脑中动脉栓塞/再灌注(MCAO/R)法建立脑缺血再灌注大鼠模型,将100只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、APS低、中、高剂量组(30、60、120 mg·kg^{-1})及丁苯酞组(80 mg·kg^{-1})。连续给药2 d后,采用Longa神经功能缺损评分评估神经损伤程度;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色法评估模型建立情况;Morris水迷宫实验检测学习记忆能力;转棒实验检测运动协调能力;HE染色和尼氏染色观察脑组织病理改变;劳克坚牢蓝(LFB)染色观察脑组织髓鞘损伤情况;免疫荧光法观察BMPCs标志物血小板衍生生长因子受体-β(PDGFR-β)与少突胶质细胞(OLs)标志物髓鞘碱性蛋白(MBP)的共定位表达,以及OPCs标志物神经元胶质抗原2(NG2)与OLs标志物MBP的共定位表达;Western blot检测脑组织中NG2、PDGFR-β、胶质瘤相关癌基因同源蛋白1(Gli1)、Shh、MBP的蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠逃逸潜伏期显著延长($P<0.05$),穿越平台次数显著减少($P<0.01$),在棒持续时间显著降低($P<0.01$),脑组织病理损伤和髓鞘损伤显著加重($P<0.01$),BMPCs增殖率降低($P<0.05$),PDGFR-β/MBP及NG2/MBP共定位水平降低($P<0.05$,$P<0.01$),NG2、PDGFR-β、Gli1、Shh及MBP蛋白表达水平降低($P<0.05$,$P<0.01$)。与模型组比较,APS低、中、高剂量组及丁苯酞组逃逸潜伏期缩短($P<0.05$,$P<0.01$),穿越平台次数显著增加($P<0.05$,$P<0.01$),在棒持续时间显著升高($P<0.01$),脑组织病理损伤和髓鞘脱失减轻($P<0.05$,$P<0.01$),BMPCs增殖率升高($P<0.05$,$P<0.01$),PDGFR-β/MBP及NG2/MBP共定位水平升高($P<0.05$,$P<0.01$),NG2、PDGFR-β、Gli1、Shh及MBP蛋白表达水平升高($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** APS可减轻脑缺血再灌注髓鞘损伤,改善神经、学习记忆、运动功能缺损,其作用机制可能与激活Shh信号通路、调控BMPCs增殖活化并协同促进OPCs介导的髓鞘再生有关。

〔**关键词**〕脑缺血;髓鞘损伤;黄芪多糖;周细胞;Sonic hedgehog通路

〔**中图分类号**〕R285.5 〔**文献标志码**〕A 〔**文章编号**〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.10.005

Astragalus polysaccharides protect against cerebral ischemia-reperfusion-induced myelin damage by regulating the directed differentiation of brain microvascular pericytes via the Sonic hedgehog pathway

ZHOU Jiali[1,2], LU Jin[1,2], LI Wenyan[1,2], PENG Yingxian[1,2], ZHANG Qian[1,2], SU Wei[1], LIU Xiaodan[1,2]**

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Integrated Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Heart and Brain Diseases, Changsha, Hunan 410208, China

〔**Abstract**〕 **Objective** To investigate the mechanism of action by which *Astragalus* polysaccharides (APS) regulate the proliferation and activation of brain microvascular pericytes (BMPCs) through the Sonic hedgehog (Shh) signaling pathway and

〔**收稿日期**〕2026-08-05

〔**基金项目**〕湖南省自然科学基金项目(2025JJ90037);湖南省教育厅重点项目(24A0270);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2025CX070);湖南省大学生创新训练计划项目(S202410541026);湖南中医药大学本科生科研创新基金项目(2024BKS043)。

〔**通信作者**〕* 刘晓丹,女,硕士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:xiaodanliu@hnucm.edu.cn;苏维,女,博士,E-mail:suwei0310@163.com。

promote oligodendrocyte precursor cells (OPCs)-mediated myelin repair, thereby alleviating myelin damage after cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** A rat model of cerebral ischemia-reperfusion was established via middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). A total of 100 SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, low-, medium-, and high-dose APS groups (30, 60, and 120 mg·kg^{-1}, respectively), and butylphthalide group (80 mg·kg^{-1}). After two days of continuous administration, the degree of neurological impairment was assessed using the Longa neurological deficit score; model establishment was evaluated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; learning and memory ability was tested by the Morris water maze; motor coordination was assessed by the rotarod test; pathological changes in brain tissue were observed by HE staining and Nissl staining; myelin damage in brain tissue was observed by Luxol fast blue (LFB) staining; immunofluorescence was used to observe the co-localized expression of the BMPC marker platelet-derived growth factor receptor-β (PDGFR-β) with the oligodendrocyte (OL) marker myelin basic protein (MBP), and the co-localized expression of the OPC marker neuron-glial antigen 2 (NG2) with the OL marker MBP; Western blot was used to determine the protein expression levels of NG2, PDGFR-β, glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli1), Shh, and MBP in brain tissue. **Results** Compared with the sham-operated group, rats in the model group showed prolonged escape latency (P<0.05), reduced number of platform crossings (P<0.01), decreased time on the rod (P<0.01), aggravated brain pathological injury and myelin demyelination (P<0.01), a reduced BMPCs proliferation rate (P<0.05), decreased PDGFR-β/MBP and NG2/MBP co-localization levels (P<0.05, P<0.01), and decreased protein expression levels of NG2, PDGFR-β, Gli1, Shh, and MBP (P<0.05, P<0.01). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose APS groups and the butylphthalide group showed shortened escape latency (P<0.05, P<0.01), increased number of platform crossings (P<0.05, P<0.01), increased time on the rod (P<0.01), alleviated brain pathological injury and myelin demyelination (P<0.05, P<0.01), an increased BMPC proliferation rate (P<0.05, P<0.01), increased PDGFR-β/MBP and NG2/MBP co-localization levels (P<0.05, P<0.01), and increased protein expression levels of NG2, PDGFR-β, Gli1, Shh, and MBP (P<0.05, P<0.01). **Conclusion** APS can ameliorate myelin damage and neurological, learning and memory, and motor function deficits after cerebral ischemia-reperfusion. The mechanism of action may be related to activating the Shh signaling pathway, regulating the proliferation and activation of BMPCs, and synergistically promoting OPC-mediated myelin regeneration.

〔**Keywords**〕 cerebral ischemia; myelin damage; *Astragalus* polysaccharides; pericytes; Sonic hedgehog pathway

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是我国居民主要死亡原因之一及成年人致残的首要病因[1]。缺血后脑白质损伤引发的轴突脱髓鞘,是导致卒中后神经元丢失与神经功能障碍的重要病理基础[2]。然而,内源性髓鞘再生效率低下,其核心原因在于少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs)趋化迁移与分化能力不足,无法充分补充成熟少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)[2-4]。因此,髓鞘修复和再生是脑缺血后神经可塑性和神经功能恢复的关键。脑微血管周细胞(brain microvascular pericytes, BMPCs)是神经血管单元的关键组成细胞[5],除参与维持血管稳定性、调控脑血流量外,近年研究还证实其具有显著的神经可塑性与修复潜能[6-7]。缺血损伤后活化的 BMPCs 可获得干细胞样特性,通过旁分泌或直接转分化方式参与 OLs 谱系调控,但其具体分化机制及调控靶点尚未明确[8-9]。

音猬因子(sonic hedgehog, Shh)信号通路是调控中枢神经系统发育与再生的核心通路之一[10]。在生理状态下,Shh 通路通过激活下游转录因子 Gli 家族蛋白,驱动 OPCs 分化为成熟 OLs 并促进髓鞘形成。脑缺血后,Shh 通路活性显著下调,导致 OPCs 分化阻滞及髓鞘修复障碍[11-12]。然而,Shh 通路在缺血后髓鞘修复中的具体调控机制尚不清楚。

中药在缺血性脑病治疗中具有多靶点、整体调控的独特优势[13]。黄芪为“益气通痹”的经典药物,其核心活性成分黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharide, APS)具有显著的神经保护和脑缺血损伤改善作用[14-15]。研究表明,APS 可通过抑制氧化应激、调节炎症反应及促进血管新生等多途径改善脑缺血损伤[14]。此外,APS 还能激活 Shh 信号通路,上调胶质瘤相关癌基因同源蛋白 1(glioma-associatedoncogene1, Gli1)、帕奇同源蛋白 1(patched1, Ptch1)等关键分子表达,促进神经干细胞向 OLs 分化,并增强髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)合成[15],这与黄芪“补气升阳、生津养血、行滞通痹”的传统功效高度契合。基于此,本研究采用大脑中动脉栓塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)法建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型,探讨 APS 是否通过调控 Shh 信号通路促进 BMPCs 向 OLs 分化,进而减轻髓鞘损伤、改善神经功能及学习记忆运动能力,为 APS 治疗IS 后白质损伤提供实验依据和新靶点。

1 材料

1.1 动物

8 周龄健康的 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 100 只,体质量 240~280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物

有限公司,许可证号:SYXK(湘)2019-0009。所有动物饲养在湖南中医药大学动物实验中心,温度 23~25 ℃,相对湿度 50%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗循环的无特定病原体级标准动物房中,自由摄食饮水。本研究动物实验经湖南中医药大学伦理委员会批准(伦理编号 HNUCM21-2503-39)。实验前大鼠适应性饲养 5~7 d,并于造模前禁食 12 h。

1.2 主要药物及试剂

APS(纯度 70%,上海源叶生物科技有限公司,货号:S27818);丁苯酞(石药集团恩必普药业有限公司,批号:H20052099,规格:0.2 g/片);RIPA 裂解液(上海万生昊天生物技术有限公司,批号:260426);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-BC-K318-M);超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海伟寰生物科技有限公司,批号:25003S0369)。Shh、MBP、Gli1、NG2、β-actin 多克隆抗体(杭州华安生物有限公司,货号:ET1610-6、ET1702-15、ET1702-85、ET1703-16、HA601585H);PDGFR-β 兔单克隆抗体(美国 Immunoway 公司,货号:PT0604R);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(成都正能生物技术有限责任公司,货号:511203、511103)。

1.3 主要仪器

倒置荧光显微镜、正置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司,型号:Axio Vert.A1、Axio scope 5);全景扫描仪(匈牙利 3D HISTECH 公司,型号:Pannoramic MI-DI);电泳槽、转印槽、Gel DocXR+凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:1658001、1703930、Chemi DocTM XRS+)。

2 方法

2.1 大鼠 MCAO/R 模型建立、分组及给药

将 100 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、丁苯酞组(80 $mg\cdot kg^{-1}$)及 APS 低、中、高剂量组(30、60、120 $mg\cdot kg^{-1}$)[16]。造模后,剔除死亡及不符合标准者 10 只,最终每组 15 只大鼠纳入研究。采用 10%水合氯醛(3.0 $mL\cdot kg^{-1}$)腹腔注射麻醉,参照 Longa 改良法[17]建立 MCAO/R 模型,行颈正中切口,依次分离右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。结扎右侧颈总动脉近心端、颈外动脉及其分支,于颈总动脉分叉处切口,向颈内动脉插入栓线,推进 17~20 mm 遇阻力后固定,缝合皮肤,构建大脑中动脉闭塞模型,缺血 2 h 后拔出栓线,完成 MCAO/R 模型,以术后 Longa 神经功能缺损评分为 1~3 分判定为造模成功[17]。假手术组仅暴露分离血管,不结扎、不插栓线。术后各组大鼠麻醉苏醒后开始灌胃给药,每日 1 次,连续给药 2 d。之后停药常规饲养,于再灌注后第 7 天统一取材进行各项指标检测。

2.2 Longa 神经功能缺损评分法测定大鼠神经功能缺损情况

大鼠造模苏醒后采用双盲法进行 Longa 神经功能缺损评分[17]:无神经功能缺陷,计 0 分;瘫痪侧前爪不能完全伸展,计 1 分;行走时向瘫痪侧转圈,计 2 分;行走时向瘫痪侧倾倒,计 3 分;不能行走,存在意识丧失现象,计 4 分。筛选评分为 1~3 分的造模成功大鼠纳入后续实验,剔除死亡及无神经功能缺损大鼠。术后连续观察大鼠神经行为状态,结合后续行为学实验综合评价 MCAO/R 模型大鼠神经功能损伤程度。

2.3 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色测定大鼠脑梗死面积

各组大鼠术后 7 d 麻醉后取脑组织,放入脑切片模具中,置于-20 ℃冰箱中冰冻 35 min,待脑组织硬化后取出,沿冠状位将大脑中动脉区域每隔 2 mm 切 1 片,共切 5 片,去除额叶、枕叶、小脑、脑干部分,加入 TTC 染色液,用锡纸包裹,防止光线进入,放入 37 ℃恒温箱显色。缺血梗死后脑组织呈白色,正常脑组织呈鲜红色。PBS 冲洗脑组织,放入 4 ℃冰箱,多聚甲醛固定 24 h,拍照后图片导入 ImageJ 软件分析。脑梗死面积=(梗死面积/全脑片面积)×100%。

2.4 Morris 水迷宫与转棒实验评估大鼠运动协调能力

术后第 2~7 天开展Morris 水迷宫实验,前 5 d为定位航行训练,每天将大鼠从 4 个不同象限面向池壁入水,记录 120 s 内找到水下隐藏平台的逃避潜伏期,超时未找到则记为 120 s。第 7 天撤除平台,进行空间探索实验,记录 120 s 内大鼠穿越原平台区域次数,评价其空间学习记忆能力[18]。术后第 5~7 天进行转棒实验,适应性训练分两天梯度提速训练,正式测试时 6 min 内转速由 4 r/min 匀速加速至 40 r/min,记录大鼠跌落潜伏期,每组重复测试 3 次,取平均值,评估大鼠运动协调能力。

2.5 HE 染色、尼氏染色观察脑组织病理形态改变

术后 7 d 取大鼠损伤侧脑组织,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋切片。HE 染色:经常规脱蜡、水化、HE 染色、梯度脱水、透明、中性树胶封片,显微镜下观察海马 CA2 区脑组织病理结构、神经元形态及炎性

浸润情况。尼氏染色:脑组织切片脱蜡水化后,1%甲苯胺蓝室温染色40 min,脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察海马 CA2 区神经元尼氏体形态[19],每张切片随机选取 5 个视野,统计尼氏体阳性神经元数量,评价神经元损伤程度。神经细胞损伤率(%)=(损伤神经细胞数/总神经细胞数)×100%。

2.6　劳克坚牢蓝(luxol fast blue, LFB)染色观察脑组织髓鞘损伤程度

脑组织石蜡切片 60 ℃烘片 1 h,常规脱蜡至 95%乙醇,置于 0.1% LFB 染色液中 37 ℃避光孵育过夜。次日取出切片,纯水清洗后经 0.05%碳酸锂溶液分化,70%乙醇梯度脱色,显微镜下动态观察,直至脑白质呈蓝绿色清晰、灰质接近透明终止分化。经脱水、透明、中性树胶封片,通风橱晾干后,倒置相差显微镜下观察各组脑组织髓鞘完整度及脱髓鞘损伤情况。采集图像并随机选取 3 个视野,导入 ImageJ 软件分析。髓鞘组织表达面积百分比=髓鞘组织面积/视野面积(像素面积)[20]。

2.7　免疫荧光双染检测 BMPCs 增殖率

取各组大鼠损伤侧脑组织,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后制备 4 μm 连续切片。切片经脱蜡水化、枸橼酸钠缓冲液微波抗原修复、3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶、3% BSA 封闭后,滴加兔抗 PDGFR-β一抗(1∶200),4 ℃孵育过夜;次日孵育HRP-山羊抗兔 IgG 50 min,TSA-488 荧光染色 10 min,TBST 洗涤后微波处理以解离一抗二抗复合物。再次封闭后滴加小鼠抗 BrdU 一抗(1∶100),4 ℃孵育过夜,孵育对应 HRP 标记二抗后行 TSA-594 荧光染色。经 DAPI 染核、自发荧光淬灭后封片。激光共聚焦显微镜下成像,每张切片随机选取 5 个视野,统计PDGFR-β/BrdU 双阳性细胞数量,计算 BMPCs增殖率。BMPCs 增殖率=PDGFR-β/BrdU 双阳性细胞数/PDGFR-β阳性细胞总数×100%。

2.8　免疫荧光双染检测 BMPCs、OPCs 定位及髓鞘相关蛋白表达

采用脑组织免疫荧光双染检测大鼠纹状体组织中靶蛋白的共定位表达,实验前处理、抗原修复、封闭、显色及封片流程同“2.7”。设置两组双染体系:(1)山羊抗 NG2(标记未成熟 OPCs)与小鼠抗 MBP(标记成熟髓鞘),观察 OPCs 增殖活化、髓鞘再生;(2)兔抗 PDGFR-β(标记 BMPCs)与小鼠抗 MBP,观察 BMPCs 与髓鞘的共定位关系。激光共聚焦显微镜下采集图像,每张切片随机选取 5 个视野,以Manders 共定位系数、Pearson 相关系数量化 OPCs、BMPCs 与髓鞘的结合程度。

2.9　Western blot 检测 PDGFR-β、NG2、MBP、Shh、Gli1 蛋白表达水平

取各组大鼠损伤侧脑组织,提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度并统一上样量。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离、转印至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;分别加入 PDGFR-β、NG2、MBP、Shh、Gli1(1∶1 000)及 β-actin(1∶5 000)一抗,4 ℃孵育过夜;TBST 充分洗涤后加入对应种属二抗室温孵育 2 h,再次洗涤后采用 ECL 化学发光试剂显影曝光,采集蛋白条带,分析各目标蛋白相对内参蛋白β-actin 的表达水平。

2.10　统计学分析

研究采用 ImageJ 软件处理图像,并用 SPSS 26.0 软件对所得数据进行统计学分析,数据符合正态分布,用“$\bar{x}\pm s$”表示,多组间比较满足正态、方差齐时采用单因素方差分析,不符合者采用非参数 *Kruskal-Wallis H* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　APS 对大鼠 Longa 神经功能的影响

假手术组大鼠未见明显神经功能缺损。与假手术组比较,模型组 Longa 神经功能缺损评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组 Longa 神经功能缺损评分降低($P<0.05$,$P<0.01$)。详见表 1。

表 1　各组 Longa 神经功能缺损评分比较($\bar{x}\pm s$,n=10)

Table 1　Comparison of Longa neurological deficit scores among the groups ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	Longa 神经功能缺损评分/分
假手术组	0.00±0.00
模型组	1.88±0.83#
APS 低剂量组	1.25±0.89*
APS 中剂量组	0.71±0.49*
APS 高剂量组	1.13±0.64**
丁苯酞组	1.14±0.69**

注:与假手术组比较,#$P<0.05$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

3.2　APS 对 TTC 染色梗死面积百分比的影响

假手术组大鼠脑组织呈红色,无梗死区域。与假手术组比较,模型组大鼠左侧脑组织呈红色,损伤侧出现较大白色区域,缺血梗死面积显著升高($P<0.01$);

与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组梗死面积降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；与 APS 中剂量组比较，APS 高剂量组和丁苯酞组梗死面积降低（$P<0.05$）。详见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠梗死面积比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 2 Comparison of infarct area in rats among groups ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	梗死面积/%
假手术组	0.00±0.00
模型组	40.82±0.07##
APS 低剂量组	16.36±0.08**
APS 中剂量组	28.41±0.07*
APS 高剂量组	10.29±0.08**@
丁苯酞组	8.56±0.04**@

注：与假手术组比较，##$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 APS 中剂量组比较，@$P<0.05$。

3.3 APS 对大鼠运动行为的影响

3.3.1 Morris 水迷宫实验 定位航行实验中，从实验第 2 天起，随着训练次数增加，各组大鼠平均逃逸潜伏期总体呈下降趋势。取各组第 5 天逃逸潜伏期进行统计分析，结果显示：与假手术组比较，模型组大鼠逃逸潜伏期时间显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组大鼠逃逸潜伏期时间显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。空间探索实验结果显示：与假手术组比较，模型组大鼠穿越平台次数及在目标象限停留时间显著减少（$P<0.01$）；与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组大鼠穿越平台次数及在目标象限停留时间均升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。详见图 2、表 3。

3.3.2 转棒实验 与假手术组比较，模型组在棒持续时间和掉落时转速显著降低（$P<0.01$）。与模型组

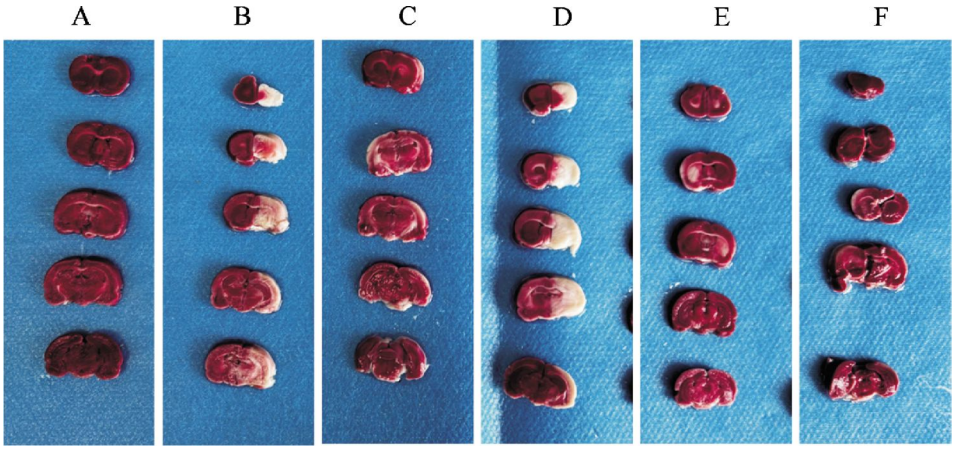


图 1 各组大鼠 TTC 染色结果（$n=5$）

Fig.1 TTC staining results of rats in each group ($n=5$)

注：A.假手术组；B.模型组；C.APS 低剂量组；D.APS 中剂量组；E.APS 高剂量组；F.丁苯酞组。

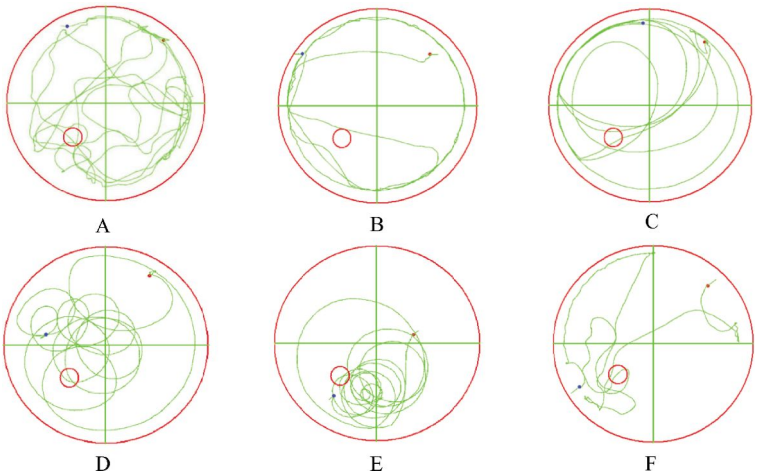


图 2 各组大鼠 Morris 水迷宫实验运动轨迹图（$n=10$）

Fig.2 Locomotor trajectory plots of rats in the Morris water maze test among groups ($n=10$)

注：A.假手术组；B.模型组；C.APS 低剂量组；D.APS 中剂量组；E.APS 高剂量组；F.丁苯酞组。

表 3　各组大鼠 Morris 水迷宫认知功能比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 3　Comparison of cognitive function in rats among groups in the Morris water maze test ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	逃逸潜伏时间/s	穿越平台次数/次	在目标象限停留时间/s
假手术组	15.58±7.47	4.20±0.45	29.33±8.52
模型组	88.95±3.86$^{\#}$	0.40±0.55$^{\#\#}$	6.00±3.91$^{\#\#}$
APS 低剂量组	33.80±1.28*	2.20±0.84*	24.89±3.96**
APS 中剂量组	37.76±9.09*	2.40±0.89*	19.11±1.08*
APS 高剂量组	37.83±2.39**	2.60±1.14**	26.22±3.44**
丁苯酞组	40.45±4.70**	3.00±1.00**	20.18±1.78*

注：与假手术组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组大鼠展现出显著改善的运动平衡能力，表现为在棒持续时间和掉落时转速显著升高(P<0.01)。与 APS 低剂量组比较，APS 中剂量组掉落时转速升高(P<0.05)，丁苯酞组在棒持续时间延长(P<0.05)。与 APS 中剂量组比较，APS 高剂量组掉落时转速升高(P<0.05)，丁苯酞组在棒持续时间和掉落时转速显著升高(P<0.01)。详见表 4。

表 4　各组大鼠转棒时间比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 4　Comparison of rotarod time in rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	在棒持续时间/s	掉落时转速/s
假手术组	225.00±9.17	30.33±1.16
模型组	104.70±8.51$^{\#\#}$	16.00±1.00$^{\#\#}$
APS 低剂量组	175.30±7.10**	25.33±1.16**
APS 中剂量组	158.00±6.00**	22.33±0.58**$^{\&}$
APS 高剂量组	168.00±13.11**	23.67±1.53**$^{@}$
丁苯酞组	189.70±12.86**$^{\&@@}$	26.33±1.16**$^{@@}$

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P$<0.01；与模型组比较，**P<0.01；与 APS低剂量组比较，$^{\&}P$<0.05；与 APS 中剂量组比较，$^{@}P$<0.05，$^{@@}P$<0.01。

3.4　APS 对大鼠脑缺血海马 CA2 区病理变化及尼氏体分布情况的影响

HE 染色结果显示，假手术组大鼠海马 CA2 区组织结构完整，神经元胞体饱满，细胞核居中、核仁清晰，细胞排列致密规整。模型组神经元胞体皱缩变形，胞核固缩、着色加深，部分细胞出现核溶解，组织内可见大量空泡样变性，细胞排列疏松紊乱，细胞间隙明显增宽。与假手术组比较，模型组神经元损伤率显著升高(P<0.01)。与模型组比较，APS 中、高剂量组及丁苯酞组神经元损伤率降低(P<0.05，P<0.01)；APS 低剂量组仅见下降趋势，差异无统计学意义(P>0.05)。尼氏染色结果显示，假手术组可见细胞染色均匀，轮廓清晰，排列整齐紧密，形态未见明显异常，尼氏体完整且丰富。模型组海马区神经细胞出现空泡现象，细胞着色变浅，排列稀疏散乱，细胞核出现溶解、碎裂等现象。与假手术组比较，模型组尼氏体数量显著降低(P<0.01)。与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组尼氏体数量升高(P<0.05，P<0.01)。详见表 5 和图 3。

表 5　各组大鼠脑组织病理损伤程度比较($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 5　Comparison of the degree of brain pathological injury in rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	HE 染色神经细胞损伤率%	尼氏体数量/个
假手术组	0.12±0.01	49.00±8.00
模型组	0.52±0.08$^{\#\#}$	28.67±1.53$^{\#\#}$
APS 低剂量组	0.31±0.08	40.00±1.00*
APS 中剂量组	0.22±0.06**	42.00±2.00**
APS 高剂量组	0.24±0.05**	42.33±1.53**
丁苯酞组	0.26±0.07*	41.67±1.53**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P$<0.01；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

3.5　APS 对大鼠脑缺血纹状体髓鞘损伤的影响

假手术组纹状体髓鞘染色致密、着色均匀，髓鞘结构完整、排列规整，无明显空泡化及破损溶解等病理性改变。模型组大鼠纹状体髓鞘蓝染程度显著降低，髓鞘结构疏松紊乱，纤维连续性中断，表现为髓鞘空泡化、局部髓鞘缺失等脱髓鞘损伤。与假手术组比较，模型组脱髓鞘病理损伤明显升高(P<0.01)。与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组大鼠纹状体髓鞘着色程度加深，髓鞘结构完整性得到改善，髓鞘空泡化及脱髓鞘病理损伤降低(P<0.05，P<0.01)。与 APS 中剂量组相比，APS 高剂量组髓鞘空泡化程度降低(P<0.05)。详见图 4 和表6。

3.6　APS 对大鼠脑缺血 BMPCs 增殖率的影响

与假手术组比较，模型组纹状体PDGFR-β/BrdU 双阳性区域占 PDGFR-β 阳性区域的比例降低(P<0.05)。与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组 BMPCs 增殖率升高(P<0.05，P<0.01)。与 APS 低剂量组比较，APS 中、高剂量组和丁苯酞组 BMPCs 增殖率显著升高(P<0.05，P<0.01)。详见图 5 和表 7。

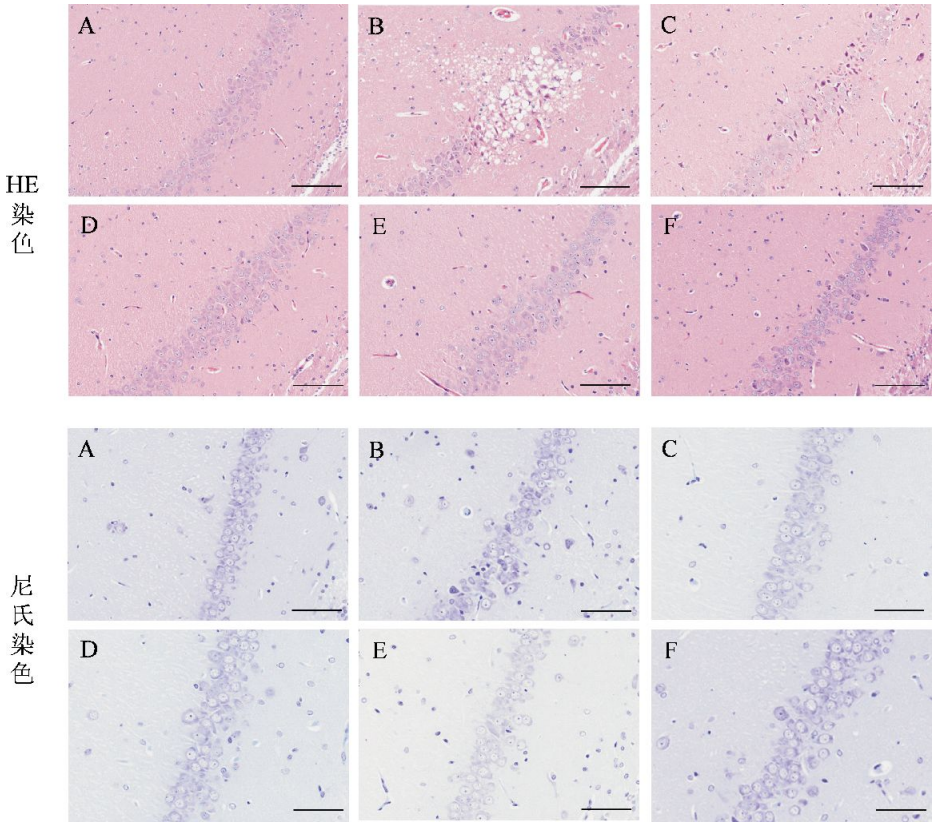


图 3　大鼠脑缺血海马 CA2 区 HE 染色和尼氏小体分布(×200,n=5,比例尺=50 μm)

Fig.3　HE staining and Nissl body distribution in the hippocampal CA2 region of rats with cerebral ischemia (×200, n=5, Scale bar=50 μm)

注:A.假手术组;B.模型组;C.APS 低剂量组;D.APS 中剂量组;E.APS 高剂量组;F.丁苯酞组。

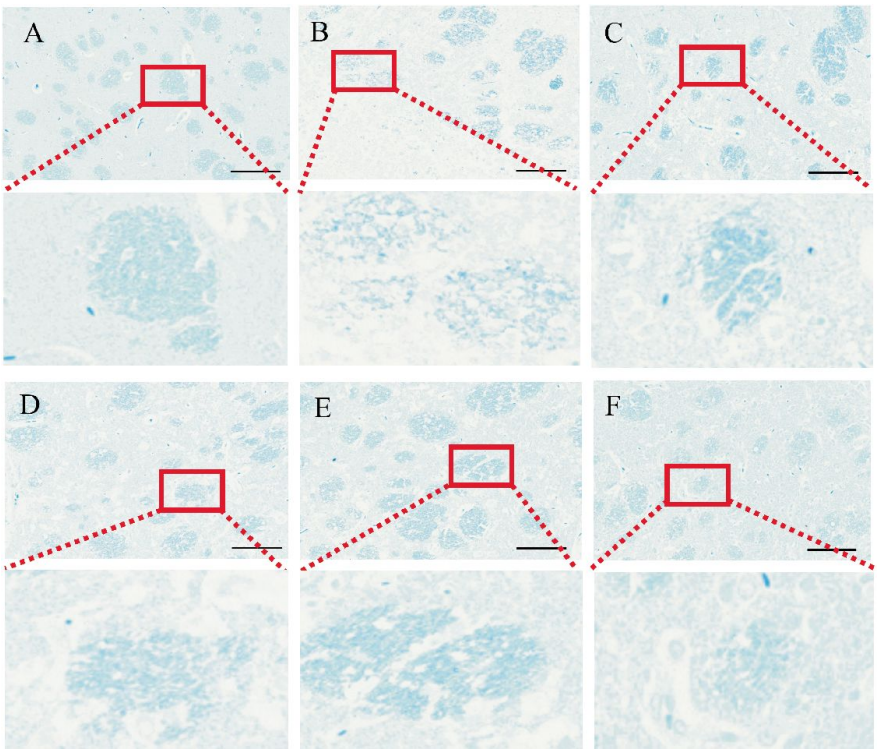


图 4　各组大鼠纹状体髓鞘损伤程度比较(×200,n=5,比例尺=50 μm)

Fig.4　Comparison of the degree of myelin damage in the striatum of rats among groups (×200, n=5, Scale bar=50 μm)

注:A.假手术组;B.模型组;C.APS 低剂量组;D.APS 中剂量组;E.APS 高剂量组;F.丁苯酞组。红色方框标示用于高倍镜观察髓鞘的目标区域。

表 6　各组大鼠纹状体髓鞘损伤程度比较($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 6　Comparison of the degree of myelin damage in the striatum of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	脱髓鞘率/%
假手术组	4.51±2.08
模型组	55.82±5.31##
APS 低剂量组	32.76±6.47*
APS 中剂量组	36.07±6.04*
APS 高剂量组	35.67±11.80*@
丁苯酞组	24.33±7.07**

注：与假手术组比较，##P<0.01；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01；与 APS 中剂量组比较，@P<0.05。

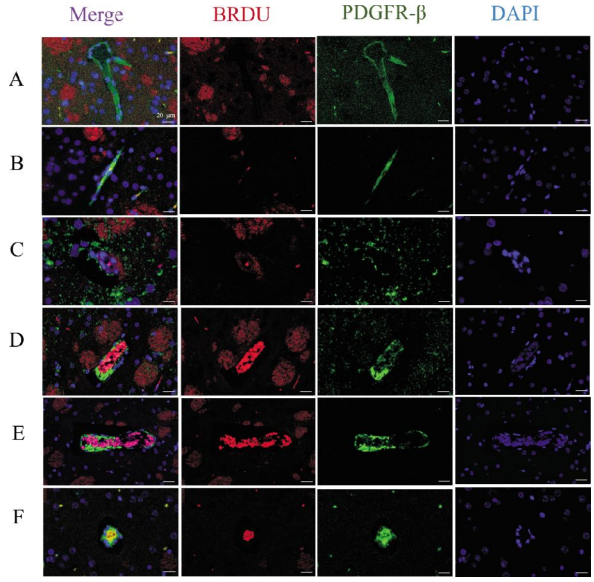


图 5　各组大鼠纹状体 BMPCs 增殖率比较(×200，n=5，比例尺=20 μm)

Fig.5　Comparison of the BMPC proliferation rate in the striatum of rats among groups (×200, n=5, Scale bar=20 μm)

注：A.假手术组；B.模型组；C.APS 低剂量组；D.APS 中剂量组；E.APS 高剂量组；F.丁苯酞组。

表 7　各组大鼠脑组织纹状体 BMPCs 增殖率比较($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 7　Comparison of the BMPCs proliferation rate in the striatum of brain tissue of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	BMPCs 增殖率/%
假手术组	9.53±0.05
模型组	2.20±0.01#
APS 低剂量组	39.52±0.07*
APS 中剂量组	58.33±0.12**&&
APS 高剂量组	53.29±0.13**&&
丁苯酞组	48.40±0.08*&

注：与假手术组比较，#P<0.05；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01；与 APS 低剂量组比较，&P<0.05，&&P<0.01。

3.7　APS 对大鼠脑缺血 BMPCs、OPCs 迁移定位与髓鞘修复的影响

与假手术组比较，模型组 NG2/MBP、PDGFR-β/MBP 的 Manders 系数及 Pearson 相关系数均降低(P<0.05，P<0.01)。与模型组比较，APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组 NG2/MBP、PDGFR-β/MBP 的 Manders 系数及 Pearson 相关系数升高(P<0.05，P<0.01)。与 APS 低剂量组比较，APS 中剂量组 NG2/MBP 的 Manders 系数升高(P<0.05)。与 APS 中剂量组比较，APS 高剂量组 PDGFR-β/MBP 的 Manders 系数升高(P<0.05)。详见图 6 和表 8—9。

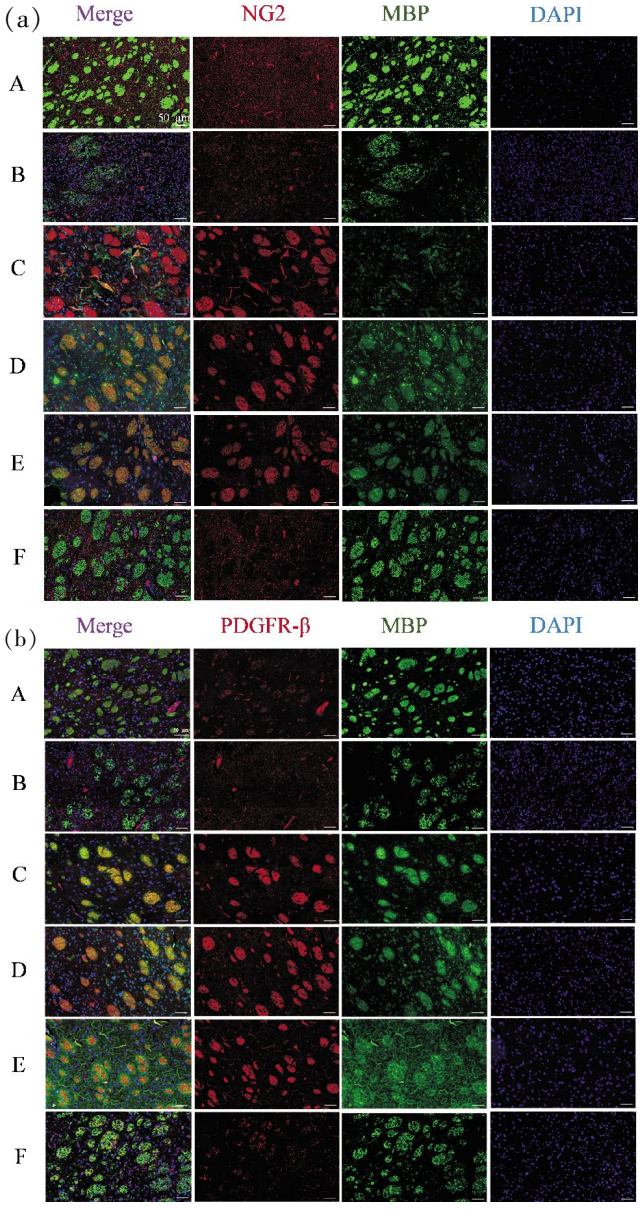


图 6　各组大鼠纹状体 BMPCs 分化及 OPCs 成熟程度的比较(×200，n=5，比例尺=50 μm)

Fig.6　Comparison of BMPCs differentiation and OPCs maturation in the striatum of rats among groups (×200, n=5, Scale bar=50 μm)

注：(a).NG2/MBP 共定位情况；(b).PDGFR-β/MBP共定位情况。A.假手术组；B.模型组；C.APS 低剂量组；D.APS 中剂量组；E.APS 高剂量组；F.丁苯酞组。

表 8 各组大鼠纹状体 BMPCs 分化程度的比较($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 8 Comparison of the degree of BMPCs differentiation in the striatum of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	PDGFR-β/MBP (Manders´M1/M2)	PDGFR-β/MBP (Pearson 相关系数)
假手术组	0.33±0.02	0.26±0.06
模型组	0.12±0.09$^{\#}$	0.08±0.07$^{\#\#}$
APS 低剂量组	1.11±0.06**	0.67±0.02**
APS 中剂量组	1.01±0.09**	0.65±0.02**
APS 高剂量组	1.17±0.04**$^{@}$	0.59±0.03**
丁苯酞组	0.37±0.14**	0.61±0.04**

注:与假手术组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01;与模型组比较,**P<0.01;与 APS 中剂量组比较,$^{@}P$<0.05。

表 9 各组大鼠纹状体 OPCs 成熟程度的比较($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 9 Comparison of the degree of OPCs maturation in the striatum of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	NG2/MBP (Manders´M1/M2)	NG2/MBP (Pearson 相关系数)
假手术组	0.62±0.13	0.42±0.04
模型组	0.24±0.04$^{\#}$	0.27±0.03$^{\#}$
APS 低剂量组	1.02±0.05*	0.65±0.02**
APS 中剂量组	1.21±0.12**$^{\&}$	0.67±0.03**
APS 高剂量组	1.09±0.06*	0.62±0.06**
丁苯酞组	1.01±0.13*	0.52±0.07**

注:与假手术组比较,$^{\#}P$<0.05;与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;与 APS 低剂量组比较,$^{\&}P$<0.05。

3.8 APS 对 NG2、PDGFR-β、Gli1、Shh、MBP 蛋白表达水平的影响

与假手术组比较,模型组 PDGFR-β、NG2、MBP 蛋白表达水平均降低(P<0.05,P<0.01),Shh、Gli1 通路蛋白表达水平降低(P<0.05)。与模型组比较,APS 低、中、高剂量组及丁苯酞组 PDGFR-β、NG2、MBP蛋白表达水平升高(P<0.05,P<0.01),Shh、Gli1 通路蛋白表达水平升高(P<0.05,P<0.01)。与 APS 低剂量组比较,APS 高剂量组 NG2 蛋白表达水平升高(P<0.05)。详见图 7 和图 8。

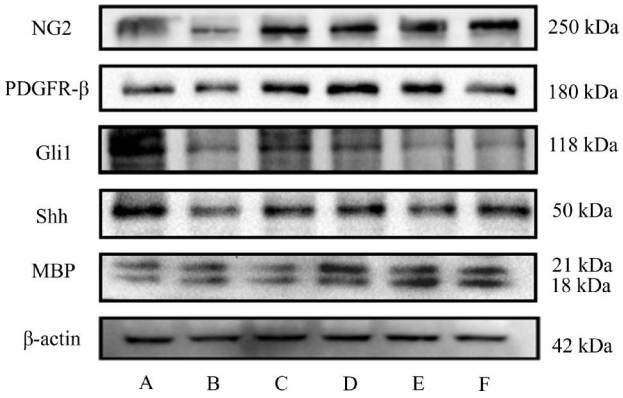


图 7 各组大鼠脑组织中 NG2、PDGFR-β、Gli1、Shh、MBP 蛋白表达电泳图

Fig.7 Electrophoretograms of NG2, PDGFR-β, Gli1, Shh, and MBP protein expression in brain tissue of each group

4 讨论

中医学将 IS 继发白质脱髓鞘损伤归属于“中风”范畴,核心病机为气虚血瘀、髓海失充,临床表现为突然昏仆、半身不遂、言语謇涩、肢体麻木、口舌歪斜[21]。《灵枢·海论》谓“脑为髓之海……髓海不足,则脑转耳鸣”,《医林改错·脑髓说》进一步指出“脑髓一时无气,不但无灵机,必死一时”。传统脑髓-神-气理论认为,脑髓为脑功能结构根基,脑神主司认知运动,脑气维系气血输布,三者协同维持大脑正常生理功能[22]。脑缺血损伤后元气亏虚,精微化生不足、脑髓生化乏源,瘀血阻滞致使气血运行不畅、脑髓失于濡养,最终出现髓鞘破损脱落、神机失用,这与现代医学中缺血后白质损伤和髓鞘修复障碍的认识高度契合。

黄芪为补气第一要药,APS 是其重要活性成分

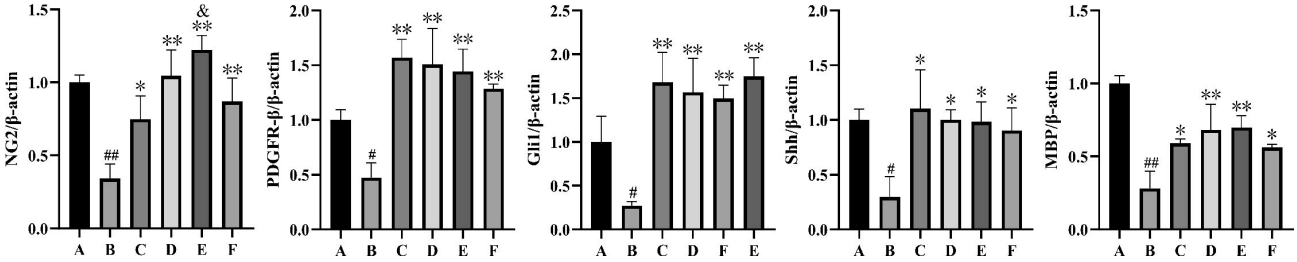


图 8 APS 对大鼠各组脑组织中 NG2、PDGFR-β、Gli1、Shh、MBP 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, n=5)

Fig.8 Effects of APS on the protein expression levels of NG2, PDGFR-β, Gli1, Shh, and MBP in brain tissue of each group ($\bar{x}\pm s$, n=5)

注:A.假手术组;B.模型组;C.APS 低剂量组;D.APS 中剂量组;E.APS 高剂量组;F.丁苯酞组。与假手术组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01;与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;与 APS 低剂量组比较,$^{\&}P$<0.05。

之一，具有抗炎、抗肿瘤、抑制氧化反应、降血脂、降血糖、免疫调节等广泛药理作用[15]。何佳等[23]研究发现，APS 能提高大鼠清除氧自由基和抗氧化能力，降低 DNA 和细胞损伤，且浓度越高效果越明显。研究表明，APS 可稳定脑缺血缺氧下的内环境，改善血脑屏障通透性[24]。上述结果表明，APS 具有神经保护与心脑血管保护效应。Shh 信号通路是调控神经再生与髓鞘修复的重要通路，Shh 配体可促进神经干细胞向少突胶质细胞定向分化[25]；通路激活后 Gli1 入核，启动下游增殖与分化相关基因转录[26]。BMPCs 作为神经血管单元与髓鞘再生之间的桥梁细胞[8-9,11-12]；既往研究显示其可表达 Ptch1 响应 Shh 信号，提示其可能是连接 Shh 信号与髓鞘修复之间的关键节点。基于此，本研究通过构建大鼠 MCAO/R 模型，从神经功能、组织病理、细胞定位及关键蛋白表达层面，系统探究 APS 改善脑缺血髓鞘损伤、促进髓鞘再生的潜在作用机制。

本研究发现，MCAO/R 模型大鼠存在持续性学习记忆与运动协调障碍，纹状体区域髓鞘纤维松散、空泡化明显，呈现典型脱髓鞘改变。缺血后 BMPCs 增殖活性受到抑制，BMPCs、OPCs 与髓鞘结构的三者空间共定位相关性降低，APS 干预可逆转上述改变，为后续机制探讨提供了可靠的药效学基础。传统髓鞘修复研究多聚焦于 OPCs 单一胶质细胞谱系，难以完整回应中医整体辨证的治疗理念。本研究将髓鞘修复的效应细胞从 OPCs 拓展至 BMPCs，表明 APS 的修复效应并非局限于单一细胞类型，而是涉及神经血管单元多组分之间的协同响应。

机制检测结果表明，MCAO/R 模型大鼠缺血脑组织中 Shh 与 Gli1 蛋白表达水平明显下降，并伴有 OPCs 标志物 NG2 及成熟髓鞘标志物 MBP 水平降低，说明脑缺血再灌注后 Shh/Gli1 信号通路受到抑制，继而引起 OPCs 分化成熟异常和髓鞘再生受限。APS 干预能显著提高 Shh、Gli1、NG2、MBP 蛋白表达水平，有效扭转缺血导致的通路抑制与髓鞘修复障碍，证明APS 可通过激活 Shh/Gli1 信号通路，促进 OPCs 介导的髓鞘再生修复，改善脑白质损伤。本研究结果与既往研究结论一致[25,27]。现有部分研究显示，脑缺血早期 Shh 信号可出现应激性升高[28-29]，与本研究结果存在差异，原因可能与本研究模型的再灌注及取材时间点及纹状体白质特异性检测脑区相关，同时不排除经典与非经典 Shh 通路共同参与、动态调控脑缺血损伤修复过程，不同损伤模式、时间窗口下的通路激活规律仍有待进一步验证。

综上所述，APS 可改善脑缺血再灌注后髓鞘损伤及神经功能、学习记忆、运动功能缺损，其机制可能与激活 Shh/Gli1 通路、调控 BMPCs 功能并协同促进 OPCs 介导的髓鞘再生有关。本研究仍存在一定局限性。本研究仅采用免疫荧光共定位，确认了BMPCs 激活及其与髓鞘结构的空间关联；但 BMPCs 是否借助旁分泌、微环境调控、调节 OPCs 功能或直接转分化来参与髓鞘修复，仍需要联合细胞谱系追踪、共培养等实验予以进一步验证。同时，本工作仅说明 Shh/Gli1 通路活性与 BMPCs 激活、髓鞘修复之间存在联系，其靶向关系仍有待通过通路特异性阻断、基因干预等手段进一步证实。

参考文献

[1] Goyal M, Ospel J M, Ganesh A, et al. Endovascular treatment of stroke due to medium-vessel occlusion[J]. The New England Journal of Medicine, 2025, 392(14): 1385-1395.

[2] Cheng Y J, Wang F, Feng J, et al. Prolonged myelin deficits contribute to neuron loss and functional impairments after ischaemic stroke[J]. Brain, 2024, 147(4): 1294-1311.

[3] Sandset E C, Goldstein L B. Advances in stroke: treatments-preventive[J]. Stroke, 2022, 53(2): 608-610.

[4] 庄雨明, 杨乐, 欧阳俊摇, 等. 延龄草皂苷对脑缺血大鼠梗死灶周围皮层少突胶质细胞 GSK-3/β-catenin/CRMP2 信号表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(10): 108-115.

[5] 宣天福, 吴媚, 张晶晶. 神经血管单元对脑血管新生的调控研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(12): 756-760.

[6] Nakata M, Nakagomi T, Maeda M, et al. Induction of perivascular neural stem cells and possible contribution to neurogenesis following transient brain ischemia/reperfusion injury[J]. Translational Stroke Research, 2017, 8(2): 131-143.

[7] 孙攀喜, 张重阳, 张景荣, 等. 周细胞在缺血性脑卒中治疗中作用的相关研究[J]. 中国心血管杂志, 2022, 27(5): 499-502.

[8] Rajbhandari S, Beppu M, Takagi T, et al. Ischemia-induced multipotent stem cells isolated from stroke patients exhibit higher neurogenic differentiation potential than bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells and Development, 2020, 29(15): 994-1006.

[9] Courtney J M, Sutherland B A. Harnessing the stem cell prop-

erties of pericytes to repair the brain[J]. Neural Regeneration Research, 2020, 15(6): 1021-1022.

[10] 黄鑫. 周细胞 YAP 基因缺失导致血脑屏障通透性变化和认知功能障碍的机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2023.

[11] Baldassarro V A, Brassart Q, Fraulob V, et al. RXR gamma enables oligodendrocyte differentiation by suppressing sonic hedgehog signaling[J]. Glia, 2026, 74(6): e70151.

[12] Zhao H, Gao X Y, Wu X J, et al. The Shh/Gli1 signaling pathway regulates regeneration via transcription factor Olig1 expression after focal cerebral ischemia in rats[J]. Neurological Research, 2022, 44(4): 318-330.

[13] 范晓迪, 张业昊, 刘建勋. 益气活血法在缺血性中风后神经修复中的生物学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 216-222.

[14] Shi Y S, Ma P. Pharmacological effects of Astragalus polysaccharides in treating neurodegenerative diseases[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1449101.

[15] Ye N, Cruz J, Peng X Y, et al. Remyelination is enhanced by Astragalus polysaccharides through inducing the differentiation of oligodendrocytes from neural stem cells in cuprizone model of demyelination[J]. Brain Research, 2021, 1763: 147459.

[16] 黄宗涛, 苏韫, 颜春鲁, 等. 黄芪多糖对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD、MDA 及脑指数的影响[J]. 甘肃医药, 2015, 34(6): 418-420.

[17] 唐佳欣, 耿佳庆, 严彩霞, 等. 姜黄素改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期神经行为缺陷的机制[J]. 疑难病杂志, 2024, 23(7): 861-865.

[18] 张梦杰. 星形胶质细胞膜受体 GPER 通过调控 STAT3-Hepcidin 信号抑制缺血性脑卒中恢复期神经元铁死亡[D]. 赣州: 赣南医科大学, 2025.

[19] Tang B, She X, Deng C Q. Effect of the combination of astragaloside IV and Panax notoginseng saponins on pyroptosis and necroptosis in rat models of cerebral ischemia-reperfusion[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2021, 22(4): 1123.

[20] 王思思. 迷走神经电刺激下调 SPP1 改善急性脑梗死大鼠继发性脱髓鞘的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2025.

[21] 张娟, 段美志, 邓超, 等. 刮痧联合四海之腧取穴针刺法治疗中风后肩手综合征的临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 674-679.

[22] 薛静. 脑髓-神-气的古文献梳理及在多系统萎缩和帕金森病的多模态 MRI 临床验证研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.

[23] 何佳, 鄢波, 宋晓征, 等. 黄芪多糖缓解急性脑缺血再灌注损伤的氧化应激反应和免疫功能紊乱[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1443-1447, 1452.

[24] Jia X, Xie L Y, Liu Y, et al. Astragalus polysaccharide (APS) exerts protective effect against acute ischemic stroke (AIS) through enhancing M2 micoglia [microglin] polarization by regulating adenosine triphosphate (ATP)/purinergic receptor (P2X7R) axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 4468-4480.

[25] Wang L C, Almazan G. Role of sonic hedgehog signaling in oligodendrocyte differentiation[J]. Neurochemical Research, 2016, 41(12): 3289-3299.

[26] Rimkus T K, Carpenter R L, Qasem S, et al. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothened and GLI inhibitors[J]. Cancers, 2016, 8(2): 22.

[27] Cao W, Zhang C, Chen R, et al. A novel cerebroprotein hydrolysate, CH1, ameliorates chronic focal cerebral ischemia injury by promoting white matter integrity via the shh/ptch-1/gli-1 signaling pathway[J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2020, 16: 3209-3224.

[28] Jin Y M, Raviv N, Barnett A, et al. The shh signaling pathway is upregulated in multiple cell types in cortical ischemia and influences the outcome of stroke in an animal model[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124657.

[29] 肖光旭, 吕明, 杜红霞, 等. 音猬因子信号通路在缺血性脑卒中不同病期中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(7): 622-628.

(本文编辑 田梦妍)