

·实验研究·

## 肝郁对围绝经期大鼠脑老化的影响及机制研究

陈惠芳<sup>1,2,3</sup>, 王培芳<sup>1</sup>, 林 玥<sup>1</sup>, 俞白帆<sup>1,2</sup>, 龚 琳<sup>1,2</sup>, 张凌媛<sup>1,2</sup>, 梁文娜<sup>1,2</sup>, 沈建英<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建中医药大学中医证研究基地, 福建 福州 350122;

2. 福建省中医健康状态辨识重点实验室, 福建 福州 350122;

3. 福建省妇幼保健院/福建中医药大学妇儿临床医学院, 福建 福州 350001)

**摘要:** 目的 探讨肝郁对围绝经期大鼠脑老化的影响及其内在机制。方法 通过动情周期和糖水偏好实验筛选出应激敏感的13月龄围绝经期SD大鼠14只,按体质量分层采用随机数字表法分为对照组和模型组各7只,模型组大鼠接受为期8周的慢性不可预测温和刺激(CUMS)。造模前后测量大鼠体质量和摄食量;造模后通过糖水偏好实验、强迫游泳实验、旷场实验观察大鼠肝郁情况,新物体识别实验和水迷宫实验观察大鼠认知功能,尼氏染色观察内侧前额叶皮质(mPFC)区病理改变;TUNEL染色检测mPFC区细胞凋亡情况;Western blot检测mPFC组织脑源性神经营养因子(BDNF)和cAMP反应元件结合蛋白(CREB)蛋白表达水平;免疫荧光染色观察mPFC区B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)、裂解型半胱氨酸蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)蛋白表达水平。结果 与对照组比较,模型组大鼠体质量、摄食量和糖水偏好率均下降( $P<0.05$ );强迫游泳实验游泳速度和静止潜伏期下降( $P<0.05$ ),静止不动时间延长( $P<0.05$ );旷场实验水平运动总距离、进入中心区域次数、中心区域停留时间以及中心区域运动距离均下降( $P<0.05$ ),新物体识别实验熟悉物体花费时间占比升高( $P<0.05$ ),新物体花费时间占比和对新物体的鉴别指数均下降( $P<0.05$ );水迷宫实验第2、3、4天逃避潜伏期均延长( $P<0.05$ ),进入目标象限次数、穿越平台次数、目标象限停留时间均下降( $P<0.05$ );mPFC区神经元尼氏小体染色较浅且数目减少( $P<0.05$ );TUNEL阳性细胞增多( $P<0.05$ );CREB和BDNF蛋白表达水平均降低( $P<0.05$ );mPFC区Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3蛋白阳性表达均升高( $P<0.05$ ),Bcl-2蛋白阳性表达降低( $P<0.05$ )。结论 肝郁可能通过调控凋亡相关因子表达,促进mPFC区神经元凋亡,加速脑老化,引起围绝经期大鼠认知功能减退。

**关键词:** 围绝经期;肝郁;脑老化;内侧前额叶皮质;认知功能;凋亡

围绝经期是女性在绝经前后必经的生理变化时期,有研究发现围绝经期女性不仅可能出现抑郁症状,还可能出现注意力不集中、学习和记忆能力减退等轻度认知障碍<sup>[1]</sup>。大量流行病学研究发现,抑郁症和焦虑症等长期情绪调节不良是认知功能减退和前瞻记忆下降的重要因素<sup>[2-3]</sup>,女性在围绝经期发生记忆力减退的概率高达76.54%,其发生率从绝经过渡期早期开始上升,在晚期达到高峰<sup>[4]</sup>。研究发现认知控制是内侧前额叶皮质(mPFC)的主要功能,抑郁症认知障碍背后的神经机制可能和mPFC激活异常相关<sup>[5]</sup>。

慢性不可预测温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型通过让实验动物经历多种慢性不可预知、低强度的刺激,使动物产生抑郁情绪,其病理机制接近人类的抑郁症,广泛应用于抗抑郁药物作用的研究<sup>[6]</sup>。肝郁是围绝经期综合征的主要病机<sup>[7]</sup>,课题组前期研究发现,自然衰老结

合CUMS模型能较好地模拟围绝经期肝郁证<sup>[8]</sup>,本研究进一步利用该模型探讨肝郁对围绝经期脑老化的影响及其内在机制。

### 1 实验材料

**1.1 实验动物** 8月龄SPF级雌性SD大鼠18只,体质量300~450 g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0009。大鼠于福建中医药大学实验动物中心正常饲养至13月龄,动物使用许可证号:SYXK(闽)2023-0004。本研究已通过福建中医药大学动物实验伦理委员会审查(审批号:FJTCM IACUC 2022191)。

**1.2 实验试剂** 尼氏染色液(上海源叶生物科技有限公司,货号:R20626-3);DeadEnd™ TUNEL比色法检测系统[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号:G7130];甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:60004-1-Ig)、HRP-conjugated Affini-pure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(货号:SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(货号:GB25303)、抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)(货号:G1407-25ML)均购自武汉赛维尔生物技术有限公司;RIPA强裂解液(货号:MA0151)、蛋白酶抑制剂(货号:MA0151)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:MA0082-2)均购自大连美

收稿日期:2025-01-08;接受日期:2025-05-07

基金项目:国家自然科学基金项目(82174248, 82274409);福建省自然科学基金项目(2024J01132, 2022J01362, 2023J01868);福建中医药大学基础类学科科研提升计划项目(XJC 2022012)

通信作者:沈建英, E-mail: shenjianying0721@163.com

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2025.12003

仑生物技术有限公司;PAGE凝胶快速制备试剂盒 10%(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号:PG112);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,货号:AR1112-10);裂解型半胱氨酸蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,货号:YC0004);半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(货号:bs-0081R)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体(货号:bs-4563R)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(货号:bs-0127R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;脑源神经生长因子(BDNF)抗体(货号:ab108319)、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)抗体(货号:ab32515)均购自Abcam上海贸易有限公司。

**1.3 实验仪器** 生物组织包埋机(型号:EG1150H)、石蜡切片机(型号:RM2245)均购自德国Leica公司;显微镜(德国Carl Zeiss公司,型号:Axio Imager A2);化学发光凝胶成像系统(型号:hemiDoc™ XRS+)、垂直电泳槽(型号:552BR199563)均购自美国Bio-rad公司;动物行为学分析系统(美国Clever系统公司,型号:topscan kcaline option version 2.0)。

## 2 方法

**2.1 围绝经期模型验证及分组** 根据大鼠阴道脱落细胞涂片苏木素-伊红(HE)染色法结果判断大鼠是否进入围绝经期,若大鼠失去规律的动情周期,则表明其进入围绝经期,筛选出动情周期紊乱的围绝经期大鼠<sup>[9]</sup>。利用糖水偏好实验剔除应激抵抗大鼠,最终选择应激敏感的围绝经期大鼠14只进入正式实验<sup>[10]</sup>。按体质量分层采用随机数字表法将大鼠分为对照组和模型组,每组7只,对照组大鼠自由进食进水,无应激,模型组大鼠接受为期8周的CUMS,除造模及行为测试时段外予自由进食进水。

**2.2 CUMS模型制备** 参考课题组前期<sup>[9]</sup>及GAO等<sup>[11]</sup>报道的CUMS模型制备方法,CUMS应激源总共9种,每日采用1种应激源刺激,见表1。

表1 CUMS动物模型使用的应激源及刺激时间点

应激源	CUMS刺激时间点
24 h 禁食	第1、10、19、28、37、46、55天
15 min 45 °C 热烘	第2、11、20、29、38、47、56天
24 h 禁水	第3、12、21、30、39、48天
5 min 冰水刺激	第4、13、22、31、40、49天
24 h 鼠笼倾斜	第5、14、23、32、41、50天
5 min 不连续夹尾	第6、15、24、33、42、51天
6 h 束缚	第7、16、25、34、43、52天
24 h 潮湿垫料	第8、17、26、35、44、53天
5 min 30 V 足底电刺激	第9、18、27、36、45、54天

**2.3 样本采集** 于所有行为学实验结束后第2天取材。大鼠按3 mL/kg腹腔注射20%乌拉坦麻醉,

腹主动脉取血后,每组取4只大鼠进行心脏灌流固定,用铡刀断头,将整个脑组织从视交叉处完整取出,左半侧mPFC用于制备石蜡切片,右半侧mPFC用于制备冰冻切片。其余大鼠腹主动脉取血后断头,于冰上取下mPFC组织,放入冻存管中,-80 °C冻存储用。

## 2.4 观察指标

**2.4.1 体质量变化** 造模前后分别测量大鼠体质量,观察CUMS造模对体质量变化的影响。

**2.4.2 摄食量变化** 造模前后大鼠禁食不禁水24 h后,称取一定量的饲料放入食槽内,24 h后测量剩余饲料的重量,计算每只大鼠的平均摄食量。

**2.4.3 快感缺失情况** 于第57天进行糖水偏好实验,观察大鼠快感缺失(即对奖励性刺激的兴趣减退)情况,这是评估其抑郁样行为的核心指标。大鼠提前禁食禁水12 h后单笼喂养,同时予1%蔗糖水和纯水各1瓶,记录每瓶水重量,过1 h后交换蔗糖水和纯水的位置,再过1 h后分别记录每瓶水剩余重量。

糖水偏好率 = 蔗糖水消耗量 / (蔗糖水消耗量 + 纯水消耗量) × 100%

**2.4.4 行为绝望情况** 于第58天进行强迫游泳实验,观察大鼠的行为绝望情况。采用底部直径为20 cm,高度为45 cm的透明圆柱形游泳桶,在桶中装入25 °C左右的纯净水,水高35 cm,将大鼠轻轻放入水中,记录大鼠6 min内的表现,分析后4 min大鼠的游泳速度、静止潜伏期和静止不动时间。

**2.4.5 自主活动能力和焦虑情况** 于第59天进行旷场实验,观察大鼠的自主活动能力和焦虑情况。将大鼠放入长宽高为100 cm × 100 cm × 40 cm的旷场箱正中央,通过软件实时记录并分析5 min内大鼠在旷场箱内的水平运动总距离、进入中心区域次数、中心区域停留时间和中心区域运动距离。

**2.4.6 记忆保留与再认能力** 于第60~61天进行新物体识别实验,观察大鼠的记忆保留与再认能力。实验在旷场箱中进行。第1天为习得阶段,大鼠自由探索两个相同的物体10 min;第2天为测试阶段,一个熟悉的物体被替换为一个新的物体,大鼠自由探索两个物体10 min,记忆能力比较好的大鼠会记得熟悉物体而更热衷于探索新物体。探索旧物体的时间记为 $T_{\text{familiar}}$ ,探索新物体的时间记为 $T_{\text{novel}}$ ,探索两个物体的总时间记为 $T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}}$ ,并按照以下公式计算识别指数(DI):

$$DI = (T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}}) \times 100\%$$

**2.4.7 空间学习与记忆能力** 于第62~66天进行Morris水迷宫实验,观察大鼠的空间学习与记忆能力。第1~4天为定位航行实验,第1天将大鼠面向池壁从第1象限的中点处入水,第2天从第2象限

的中点处入水,以此类推,观察并记录大鼠在 60 s 内寻找水下平台的时间(即为逃避潜伏期),每天训练 4 次;空间探索实验于第 5 天进行,撤除水下平台后,将大鼠面向池壁从第 3 象限的中点处放入水中,记录其在 60 s 内穿越平台次数、经过平台所在象限停留时间、经过平台所在象限路程。

**2.4.8 mPFC 区病理改变** 采用尼氏染色观察 mPFC 区病理改变情况。脑组织固定后制作石蜡切片,切片常规脱蜡、水合后,浸泡于尼氏染色液染缸中,56 °C 恒温染色 1 h,纯水清洗,0.1% 冰醋酸分化 1 min,于光学显微镜下观察,待尼氏小体清晰可见后,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下随机采集 3 张放大 400 倍的图片,使用 ImageJ 图像分析软件计算尼氏小体个数。

**2.4.9 TUNEL 染色观察 mPFC 区神经元凋亡** mPFC 组织石蜡切片常规脱蜡水合后,磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)洗涤 3 次,每次 10 min,4% 无甲醇甲醛溶液中浸泡 15 min,蛋白酶 K 覆盖组织室温孵育 8~10 min,100  $\mu$ L 平衡缓冲液覆盖 5~10 min,50  $\mu$ L rTdT 温育缓冲液覆盖组织,37 °C 恒温孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片,用透明指甲油封住边缘,晾干 5~10 min,使用荧光显微镜观察拍照。神经元凋亡阳性细胞核呈明亮绿色荧光,使用 ImageJ 进行半自动计数,统计每视野阳性细胞数,换算为单位面积细胞密度(个/ $\mu$ m<sup>2</sup>)。

**2.4.10 Western blot 检测 mPFC 组织中 BDNF 和 CREB 蛋白表达水平** 称取适量 mPFC 组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,充分研磨,离心取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后 95 °C 变性 10 min,电泳、转膜后快速封闭液封闭 15 min,加入 BDNF(1:1 000)、CREB(1:1 000)和 GAPDH(1:20 000)一抗 4 °C 孵育过夜;次日,洗膜后加入二抗(1:10 000),37 °C 摇床孵育 1 h,洗膜后显影拍照,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

**2.4.11 免疫荧光染色观察 mPFC 区凋亡相关因子**

表达水平 mPFC 组织冰冻切片在 37 °C 烘箱烘烤 20 min,控干水分,固定液固定 30 min,PBS 洗涤 3 次,10% 山羊血清封闭 30 min,滴加 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 一抗(1:100)4 °C 孵育过夜。次日 PBS 洗涤 3 次,滴加荧光二抗,37 °C 避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,封片剂封片,荧光显微镜采集图像,采用 ImageJ 软件分析蛋白阳性表达平均荧光强度。

**2.5 统计学方法** 采用 Graphpad Prism 9.0.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料首先进行 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Levene 方差齐性检验。符合正态分布且方差齐,组间比较采用独立样本 *t* 检验或双因素重复测量方差分析,事后比较采用 Bonferroni 法;不符合正态分布和/或方差不齐的数据,采用 Mann-Whitney *U* 检验进行组间比较。符合正态分布的计量数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,非正态分布数据以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 2 组一般状态比较** 对照组大鼠昼伏夜出,反应灵敏,活动自如,毛色、摄食、进水及排便等均正常。模型组大鼠精神倦怠、喜蛰伏于鼠笼角落,反应迟缓,毛发黯淡无光泽,食欲减退,对蔗糖溶液的偏好显著降低,粪便稀软。见图 1。



图 1 2 组大鼠一般状态比较

**3.2 2 组体质量、摄食量和糖水偏好率比较** 见表 2。

表 2 2 组大鼠体质量、摄食量和糖水偏好率比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	时间点	体质量/g	摄食量/g	糖水偏好率/%
对照组	7	造模前	417.14 $\pm$ 43.74	28.14 $\pm$ 7.31	78.86 $\pm$ 7.76
		造模后	405.21 $\pm$ 30.72	30.29 $\pm$ 7.41	80.86 $\pm$ 4.85
模型组	7	造模前	418.43 $\pm$ 12.19	25.86 $\pm$ 4.38	76.86 $\pm$ 3.81
		造模后	366.00 $\pm$ 18.42 <sup>1)2)</sup>	7.14 $\pm$ 2.41 <sup>1)2)</sup>	61.29 $\pm$ 7.99 <sup>1)2)</sup>

注:与造模前比较,1)  $P < 0.05$ ;与对照组比较,2)  $P < 0.05$ 。

- 3.3 2组行为绝望情况比较 见表3。
- 3.4 2组自主活动能力和焦虑情况比较 见表4、图2。
- 3.5 2组记忆保留与再认能力比较 见表5、图3。
- 3.6 2组空间学习与记忆能力比较
- 3.6.1 2组水迷宫空间探索实验结果比较 见图4和表6。
- 3.6.2 2组水迷宫定位航行实验逃避潜伏期比较 随

着定位航行实验天数的增加,2组大鼠逃避潜伏期均逐渐减小。与对照组比较,模型组大鼠第2天、第3天和第4天逃避潜伏期均延长( $P<0.05$ )。见表7。

3.7 2组 mPFC 区病理改变 与对照组比较,模型组大鼠 mPFC 神经元分布疏松,边界模糊不清晰,神经细胞核位移明显,组织空泡样改变明显,胞质中尼氏小体染色较浅且数目明显减少( $P<0.05$ )。见图5和表8。

表3 2组强迫游泳实验结果比较[( $\bar{x}\pm s$ )/M( $P_{25}, P_{75}$ )]

组别	n	游泳速度/(mm/s)	静止潜伏期/s	静止不动时间/s
对照组	7	16.23±6.42	4.07(2.07,5.27)	62.44±20.16
模型组	7	8.51±2.29 <sup>1)</sup>	0.30(0.20,1.33) <sup>1)</sup>	161.5±44.57 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P<0.05$ 。

表4 2组旷场实验结果比较[( $\bar{x}\pm s$ )/M( $P_{25}, P_{75}$ )]

组别	n	水平运动总距离/m	进入中心区域次数/次	中心区域停留时间/s	中心区域运动距离/m
对照组	7	22.99±5.17	2.00(1.00,2.00)	5.44(3.88,11.52)	455.56(341.65,497.05)
模型组	7	14.87±4.23 <sup>1)</sup>	0.00(0.00,1.00) <sup>1)</sup>	1.08(0.00,1.21) <sup>1)</sup>	36.25(0.00,109.93) <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P<0.05$ 。

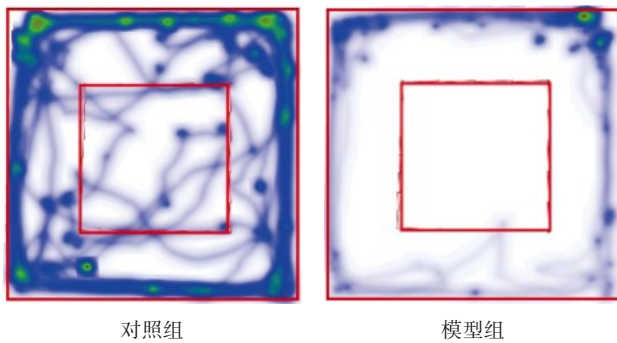
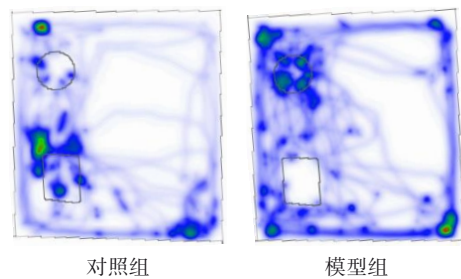


图2 2组旷场实验代表性活动轨迹密度图

表5 2组新物体识别实验结果比较( $\bar{x}\pm s$ ) %

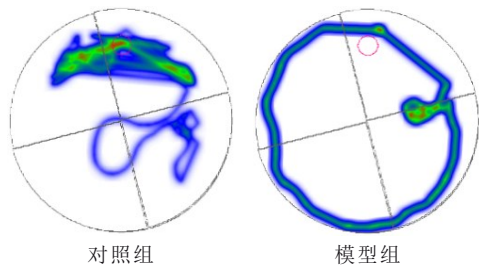
组别	n	熟悉物体花费时间占比	新物体花费时间占比	对新物体的鉴别指数
对照组	7	13.86±7.73	83.71±8.24	51.57±36.06
模型组	7	49.86±9.67 <sup>1)</sup>	50.14±9.67 <sup>1)</sup>	-13.71±16.17 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P<0.05$ 。



注:图中小方形代表新物体,圆形代表旧物体。

图3 2组新物体识别实验代表性活动轨迹密度图



注:图中小圆圈为平台所在位置。

图4 2组水迷宫空间探索实验代表性活动轨迹密度图

表6 2组水迷宫空间探索实验结果比较[( $\bar{x}\pm s$ )/M( $P_{25}, P_{75}$ )]

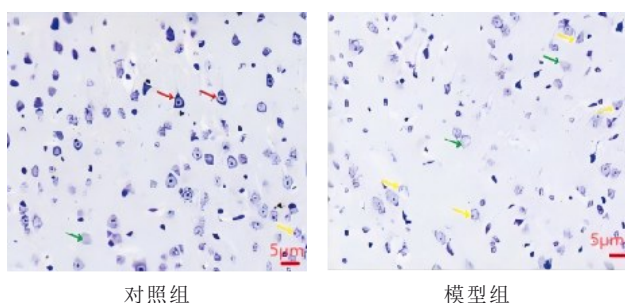
组别	n	进入目标象限次数/次	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s	游泳速度/(mm/s)
对照组	7	5.00±0.82	1.00(1.00,2.00)	15.82±2.58	220.10±15.38
模型组	7	3.14±1.57 <sup>1)</sup>	0.00(0.00,1.00) <sup>1)</sup>	10.35±4.65 <sup>1)</sup>	211.90±7.79

注:与对照组比较,1)  $P<0.05$ 。

表7 2组水迷宫定位航行实验逃避潜伏期比较( $\bar{x}\pm s$ ) s

组别	n	第1天	第2天	第3天	第4天
对照组	7	50.59±4.91	32.59±8.52	26.08±6.15	18.52±8.31
模型组	7	52.76±7.40	42.79±9.44 <sup>1)</sup>	38.89±7.18 <sup>1)</sup>	33.29±11.45 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P<0.05$ 。



注:红色箭头指示尼氏小体,绿色箭头指示神经细胞水肿所致的空泡现象,黄色箭头指示神经细胞核偏移现象。

图 5 2组 mPFC 区尼氏染色图(×400)

表 8 2组 mPFC 区尼氏小体数量比较( $\bar{x} \pm s$ ) 个/ $\mu\text{m}^2$

组别	n	尼氏小体数量
对照组	4	281.30±34.42
模型组	4	136.30±16.26 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P < 0.05$ 。

3.8 2组 mPFC 区神经元凋亡情况比较 见图 6 和表 9。

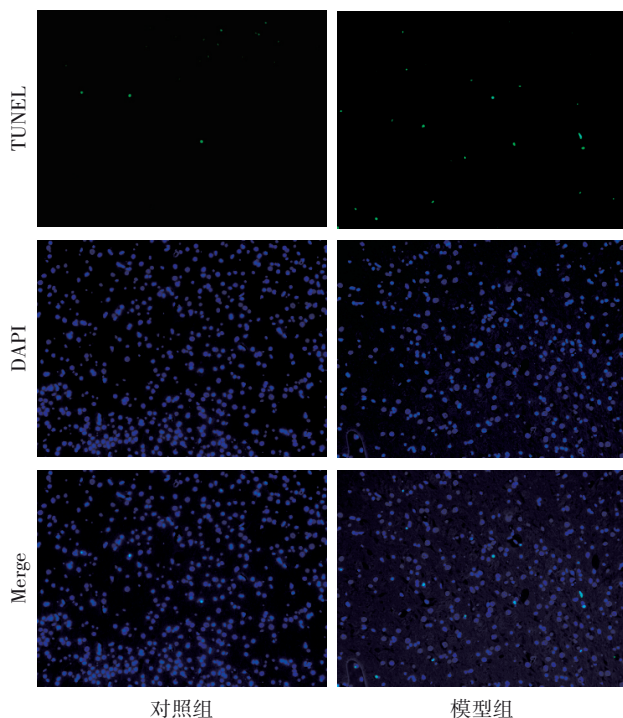


图 6 2组 mPFC 区 TUNEL 染色图(×400)

表 9 2组 mPFC 组织 TUNEL 染色阳性细胞比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TUNEL 阳性细胞/(个/ $\mu\text{m}^2$ )
对照组	4	40.71±8.93
模型组	4	69.88±8.12 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P < 0.05$ 。

3.9 2组 mPFC 区 BDNF 和 CREB 蛋白表达水平比较 见图 7 和表 10。

3.10 2组大鼠 mPFC 组织凋亡相关蛋白表达水平比较 见图 8 和表 11。

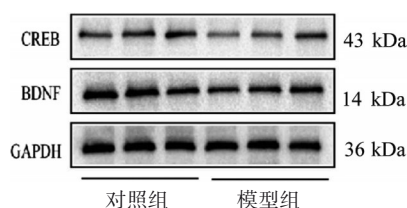


图 7 2组 mPFC 区 BDNF 和 CREB 蛋白条带图

表 10 2组 mPFC 区 BDNF 和 CREB 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	BDNF/GAPDH	CREB/GAPDH
对照组	3	0.99±0.29	1.18±0.43
模型组	3	0.49±0.07 <sup>1)</sup>	0.40±0.09 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P < 0.05$ 。

4 讨论

中医学理论认为,肝脑相维,情志内伤,首先伤肝,长期情志不畅最易导致肝疏泄功能失司,使得体内气机运行受阻,精气血津液难以输布于脑,终致脑失濡养。课题组前期研究证实围绝经期综合征的主要病机是肝郁,且慢性束缚应激结合孤养法复制的围绝经期综合征肝郁大鼠模型的学习及空间记忆能力出现明显损伤,其可能与前额叶脑组织抗氧化应激能力下降相关<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,CUMS 造模后围绝经期大鼠精神倦怠、喜蛰伏于鼠笼角落、反应迟缓,出现快感缺失、易绝望、自主活动能力下降和焦虑等肝郁表现,以及记忆保留与再认能力下降、空间学习与记忆能力下降等认知功能减退表现,脑老化明显。

mPFC 区是参与高级脑功能的关键脑区,其在情绪调节、认知控制、工作记忆和执行功能中扮演核心角色<sup>[13]</sup>。大量研究证实,mPFC 的结构和功能异常是抑郁症、焦虑症等情感障碍以及认知功能障碍共同的神经病理基础<sup>[14-16]</sup>。本研究通过病理染色显示,围绝经期肝郁证大鼠 mPFC 区神经细胞数量减少,病理改变明显,表明肝郁可加速围绝经期大鼠 mPFC 区退变。

细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种方式,在调节神经细胞数量、组织重塑过程和体内平衡中发挥重要作用<sup>[17]</sup>,神经元过度凋亡是认知障碍的病理特征<sup>[18-19]</sup>。线粒体凋亡是细胞凋亡途径中的一种,线粒体膜通透性转换是导致细胞凋亡的关键因素,其受到 Bcl-2 家族蛋白严格调控<sup>[20]</sup>。该家族中 Bcl-2 发挥抗凋亡作用,Bax 发挥促凋亡作用<sup>[21]</sup>。Caspase-3 是介导细胞凋亡的核心蛋白酶,为凋亡的执行人,可通过酶解灭活凋亡抑制物、细胞外基质及骨架蛋白,裂解 DNA 修复分子等启动 Caspase 级联反应,诱发细胞凋亡<sup>[22-23]</sup>。CREB/BDNF 通路在神经再生与神经重塑过程中发挥重要作用<sup>[24]</sup>,还可调节细胞凋亡,该通路激活会促进 CREB 和 BDNF 的表达,调控细胞内的生存信号通路<sup>[25]</sup>。

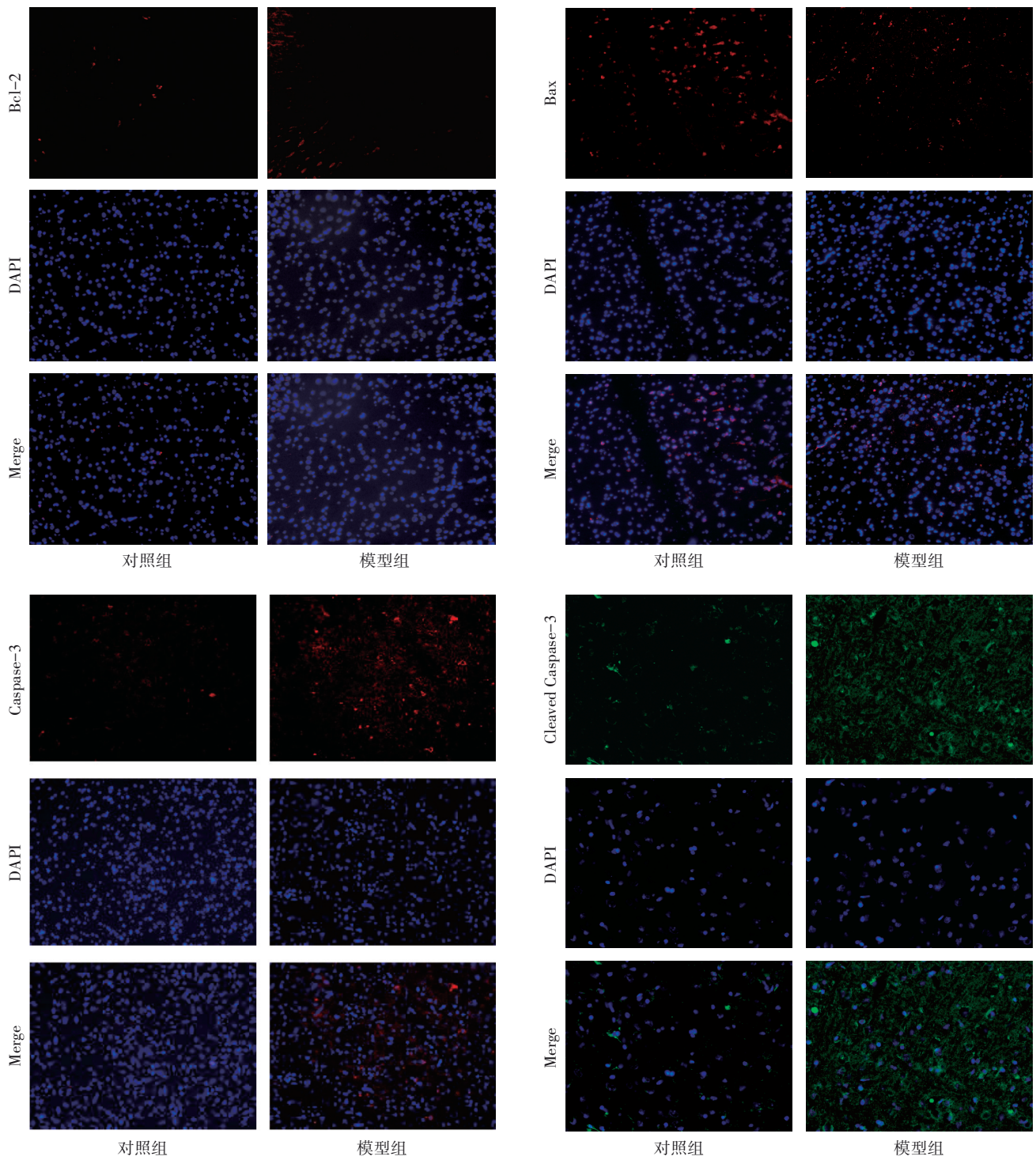


图 8 2 组 mPFC 区凋亡相关蛋白免疫荧光图 (×400)

表 11 2 组大鼠 mPFC 组织凋亡相关蛋白平均荧光强度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Cleaved Caspase-3
对照组	4	30.60 ± 2.06	30.79 ± 3.37	26.00 ± 0.98	1.75 ± 1.23
模型组	4	24.84 ± 0.65 <sup>1)</sup>	37.66 ± 1.96 <sup>1)</sup>	31.71 ± 4.54 <sup>1)</sup>	6.87 ± 3.20 <sup>1)</sup>

注: 与对照组比较, 1)  $P < 0.05$ 。

BDNF 可通过抑制凋亡相关蛋白的表达、促进抗氧化剂的生成等多种方式抑制细胞凋亡;而凋亡相关蛋白 Bcl-2 是 CREB 的重要靶点之一<sup>[26]</sup>。本研究结果发现,围绝经期肝郁证模型大鼠 mPFC 区促凋亡蛋白 BAX、Caspase-3、Cleaved Caspase-3 表达显著升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,CREB 和 BDNF 蛋白表达降低,提示肝郁可能通过调控凋亡相关因子表达,促进 mPFC 区神经元凋亡,加速围绝经期大鼠脑老化。

综上所述,肝郁可能通过调控凋亡相关因子表达,促进 mPFC 区神经元凋亡,加速脑老化,引起围绝经期大鼠认知功能减退。未来将进一步探究肝郁影响 mPFC 区的其他机制,并从更多脑区探索肝郁对围绝经期脑老化的影响。

#### 参考文献

- [1] PIZOVA N V, PIZOV N A, PIZOV A V. Perimenopausal period and mood disorders [J]. *Medicinskij Sovet*, 2021(4): 230-239.
- [2] 詹娜妮,王雅琪,唐丽,等. 5 280 名老年人主观记忆障碍现状及影响因素研究[J]. *护理学报*, 2024, 31(1): 22-26.
- [3] MA L N. Depression, anxiety, and apathy in mild cognitive impairment: current perspectives [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 9.
- [4] 马月玲,石红霞,郭蕾,等. 围绝经期女性轻度认知功能损害的影响因素研究[J]. *中华全科医学*, 2020, 18(4): 577-580, 678.
- [5] TIAN H Z, WANG Z F, MENG Y, et al. Neural mechanisms underlying cognitive impairment in depression and cognitive benefits of exercise intervention [J]. *Behav Brain Res*, 2025, 476: 115218.
- [6] WANG J Y, ZHANG Y, CHEN Y, et al. Mechanisms underlying antidepressant effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on CUMS model rats based on hippocampal  $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$  signal pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 291.
- [7] 陈淑娇. 围绝经期综合征肝郁病理特征及生物学机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013: 13-14.
- [8] 陈惠芳,龚琳,李巧琳,等. 基于“肝脑相维”探讨肝失疏泄对不同月龄雌性大鼠学习记忆能力及海马突触可塑性的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(5): 2548-2553.
- [9] 梁文娜,阮璐薇,张鹏横,等. 柴胡疏肝散调节围绝经期肝郁证大鼠 ERK1/2-CREB-BDNF 信号通路的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(6): 3147-3152.
- [10] 贺慧. HMGB1 介导小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活在应激敏感性调节中的作用及机制研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2024: 28.
- [11] GAO A X, XIA T C, PENG Z T, et al. The ethanolic extract of peanut shell attenuates the depressive-like behaviors of mice through modulation of inflammation and gut microbiota [J]. *Food Res Int*, 2023, 168: 112765.
- [12] 沈建英,梁文娜,张凌媛,等. 肝郁对围绝经期综合征大鼠认知功能及脑组织氧化应激的影响[J]. *福建中医药*, 2023, 54(1): 20-24.
- [13] DE OLIVEIRA JEREISSATI L, DA SILVA L A, ANTONIOL T, et al. The role of medial prefrontal cortex in cognition, aging and Parkinson disease [J]. *Braz J Clin Med Rev*, 2023, 1(3): 28-40.
- [14] LIANG J Q, CHEN L, LI Y B, et al. Unraveling the prefrontal cortex-basolateral amygdala pathway's role on schizophrenia's cognitive impairments: a multimodal study in patients and mouse models [J]. *Schizophr Bull*, 2024, 50(4): 913-923.
- [15] CRISP C M, SAHNI A, PANG S W, et al. Deterioration in cognitive control related mPFC function underlying development of treatment resistance in early psychosis [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12985.
- [16] RIGA M S, PÉREZ-FERNÁNDEZ M, MIQUEL-RIO L, et al. Scn1a haploinsufficiency in the prefrontal cortex leads to cognitive impairment and depressive phenotype [J]. *Brain*, 2024, 147(12): 4169-4184.
- [17] BILAL W, KHAWAR M B, AFZAL A, et al. Recent advances to neuroprotection: repurposing drugs against neuroinflammatory disorders [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(7): 6241-6250.
- [18] QIN S P, SUN D X, ZHANG C, et al. Downregulation of sonic hedgehog signaling in the hippocampus leads to neuronal apoptosis in high-fat diet-fed mice [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 367: 91-100.
- [19] CUI D Q, LIU H X, CAO L L, et al. MST1, a novel therapeutic target for Alzheimer's disease, regulates mitochondrial homeostasis by mediating mitochondrial DNA transcription and the PI3K-Akt-ROS pathway [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1056.
- [20] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 732-748.
- [21] RASMUSSEN M L, GAMA V. A connection in life and death: The BCL-2 family coordinates mitochondrial network dynamics and stem cell fate [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2020, 353: 255-284.
- [22] D'AMELIO M, CAVALLUCCI V, CECCONI F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(7): 1104-1114.
- [23] ASADI M, TAGHIZADEH S, KAVIANI E, et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(4): 1633-1645.
- [24] JIN L Y, BAO Y. Trichostatin A reduces nerve cell apoptosis in depressive rats by regulating CREB/BDNF signaling pathway [J]. *Trop J Pharm Res*, 2021, 20(9): 1875-1880.
- [25] GUPTA A K, GUPTA S, MEHAN S, et al. Exploring the connection between BDNF/TrkB and AC/cAMP/PKA/CREB signaling pathways: potential for neuroprotection and therapeutic targets for neurological disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(11): 14627-14659.
- [26] LU Q, ZHANG Y, ZHAO C, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis of hippocampal neuron via pCREB/BDNF/ and Nrf2/HO-1/NQO1 pathway [J]. *J Appl Toxicol*, 2022, 42(4): 694-705.