

基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨黄精多糖对慢性间歇缺氧大鼠认知功能的改善作用

陆连第¹, 郭琦¹, 王义义¹, 苗轩², 张维维³

(1. 天津大学海河医院神经内科, 天津市呼吸疾病研究所, 天津 300350; 2. 天津医科大学海河临床学院基础医学实验部, 天津 300350; 3. 天津大学海河医院基础医学实验部, 天津市呼吸疾病研究所, 天津 300350)

摘要: **目的** 探讨黄精多糖改善慢性间歇缺氧 (CIH) 大鼠认知功能损伤的作用机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和黄精多糖低、中、高剂量组 (100、200、400 mg/kg), 每组 6 只。使用间歇低氧箱循环低氧/复氧方法建立 CIH 大鼠模型, 各组灌胃给药 4 周后, 测定大鼠体质量; Morris 水迷宫实验评估大鼠行为学变化; 试剂盒检测大鼠血清及海马组织中炎症因子 (IL-1 β 、TNF- α) 和氧化应激指标 (SOD、MDA) 水平; HE 染色观察海马 CA1 区神经元形态学变化; 免疫组化 (IHC) 染色观察海马 CA1 区神经元 cleaved-Caspase3 表达; DCFH-DA 荧光探针检测海马组织 ROS 表达; RT-qPCR 和 Western blot 法检测海马组织 Nrf2、HO-1、HIF-1 α 、NF- κ B、NLRP3 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠体质量降低 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$), 穿越平台次数和目标象限停留时间减少 ($P < 0.05$); 海马 CA1 区神经细胞排列紊乱, 间隙增大; cleaved-Caspase3 蛋白阳性率升高 ($P < 0.01$); 血清和海马组织中 MDA、IL-1 β 、TNF- α 和 HIF-1 α 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SOD 活性降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马组织中 ROS 水平升高 ($P < 0.05$), Nrf2、HO-1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$), NF- κ B、NLRP3、HIF-1 α mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 黄精多糖中、高剂量组大鼠体质量升高 ($P < 0.05$), 逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 穿越平台次数和目标象限停留时间增加 ($P < 0.05$); 海马 CA1 区组织损伤减轻, 神经细胞排列较为整齐; cleaved-Caspase3 蛋白阳性率降低 ($P < 0.01$); 血清和海马组织中 MDA、IL-1 β 、TNF- α 和 HIF-1 α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SOD 活性升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$), NF- κ B、NLRP3、HIF-1 α mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 黄精多糖可改善 CIH 大鼠学习及记忆认知功能, 减轻海马区神经元损伤, 其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 拮抗 HIF-1 α 发挥抗氧化应激及抗炎作用有关。

关键词: 黄精多糖; 慢性间歇缺氧; Nrf2/HO-1 信号通路; 氧化应激; 认知功能; HIF-1 α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)02-0439-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.012

Effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on cognitive function in rats with chronic intermittent hypoxia based on Nrf2/HO-1 signaling pathway

LU Lian-di¹, GUO Qi¹, WANG Yi-yi¹, MIAO Xuan², ZHANG Wei-wei³

(1. Department of Neurology, Haihe Hospital, Tianjin University, Tianjin Institute of Respiratory Diseases, Tianjin 300350, China; 2. Department of Basic Medicine, Haihe Clinical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300350, China; 3. Department of Basic Medicine, Haihe Hospital, Tianjin University, Tianjin Institute of Respiratory Diseases, Tianjin 300350, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the mechanism of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides in improving cognitive impairment in rats with chronic intermittent hypoxia (CIH). **METHODS** Thirty SD rats were randomly divided into normal group, model group and low-, medium- and high- dose *P. sibiricus* polysaccharides groups (100, 200 and 400 mg/kg), with 6 rats in each group. CIH rat model was established by circulating hypoxia/reoxygenation in

收稿日期: 2025-05-15

基金项目: 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题 (2023216)

作者简介: 陆连第 (1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合治疗脑血管病痴呆及颅内感染的研究。E-mail: liandilu@126.com

intermittent hypoxia chamber. After 4 weeks of intragastric administration, the body weight of rats was measured. Morris water maze test was used to evaluate the behavioral changes of rats. The levels of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α) and oxidative stress indices (SOD, MDA) in serum and hippocampus of rats were detected by test kit. Morphological changes of neurons in hippocampal CA1 region were observed by HE staining. Immunohistochemical (IHC) staining was used to observe the expression of cleaved-Caspase3 in hippocampal CA1 neurons. DCFH-DA fluorescence probe was used to detect the expression of ROS in hippocampus. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, HIF-1 α , NF- κ B, NLRP3 in hippocampus. **RESULTS** Compared with the normal group, the model group showed decreased body weight ($P < 0.05$), prolonged escape latency ($P < 0.05$), reduced number of platform crossings and time spent in the target quadrant ($P < 0.05$); disordered arrangement and widened intercellular spaces of neurons in the hippocampal CA1 region; increased positive rate of cleaved-Caspase3 protein ($P < 0.01$); elevated levels of MDA, IL-1 β , TNF- α and HIF-1 α in serum and hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decreased SOD activity in serum and hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased ROS levels in hippocampal tissues ($P < 0.05$); decreased mRNA and protein expressions of Nrf2 and HO-1 ($P < 0.05$); and increased mRNA and protein expressions of NF- κ B, NLRP3 and HIF-1 α ($P < 0.05$). Compared with the model group, the medium- and high-dose *P. sibiricum* polysaccharides groups showed increased body weight ($P < 0.05$), shortened escape latency ($P < 0.05$), increased number of platform crossings and time spent in the target quadrant ($P < 0.05$); alleviated histological damage in the hippocampal CA1 region with more orderly arranged neurons; decreased positive rate of cleaved-Caspase3 protein ($P < 0.01$); decreased levels of MDA, IL-1 β , TNF- α and HIF-1 α in serum and hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased SOD activity in serum and hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased mRNA and protein expressions of Nrf2 and HO-1 in hippocampal tissues ($P < 0.05$); and decreased mRNA and protein expressions of NF- κ B, NLRP3 and HIF-1 α ($P < 0.05$). **CONCLUSION** *P. sibiricum* polysaccharides can improve the cognitive function of learning and memory in CIH rats, and reduce the damage of neurons in hippocampus. Its mechanism may be related to activating Nrf2/HO-1 signaling pathway and antagonizing HIF-1 α to exert anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects.

KEY WORDS: *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; chronic intermittent hypoxia; Nrf2/HO-1 signaling pathway; oxidative stress; cognitive function; HIF-1 α

随着肥胖的流行、人口老龄化、上气道结构改变,阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)患病率逐年上升^[1-2]。OSA是肥胖、高血压、糖尿病等代谢性疾病、卒中及心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的独立危险因素^[3],其特点是机体炎症加剧、氧化应激激活和认知功能障碍。慢性间歇性缺氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)是OSA主要的病理特征,其可破坏血脑屏障,改变大脑微环境,最终损伤神经系统^[4]。大量研究表明,CIH会引起焦虑并损伤学习记忆,导致认知功能障碍^[5-6]。机体缺氧状态下产生大量活性氧(active oxygen, ROS),诱导氧化应激和缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)活性。缺氧状态下HIF-1 α 累积能够激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)通路,促进炎症因子活化和释放。核因子E2相关因子2/

血红素氧合酶-1(nuclear factor e2-related factor 2/ heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1)信号通路作为对抗氧化应激反应的主要防御机制,在OSA发病中起到重要作用。此外, Nrf2/HO-1信号通路还参与调控细胞凋亡、焦亡、铁死亡和自噬等病理过程,保护细胞和器官免受损伤^[7]。

黄精多糖是黄精的主要活性成分,目前已被证实具有调节免疫、抗肿瘤、抗衰老、提高和改善记忆、抗氧化、降脂降糖、抗动脉粥样硬化、抗炎及抗病毒等多种药理作用^[8-9]。黄精多糖能够改善痴呆小鼠海马CA1区的线粒体结构^[10],改善血管性痴呆大鼠脂代谢,降低海马组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,发挥抗氧化作用^[11]。研究发现,黄精多糖可通过调节Nrf2/HO-1信号通路改善氧化损伤模型小鼠的肝脏

损伤。然而黄精多糖能否通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路改善 CIH 认知功能障碍,目前尚不明确。因此,本研究采用间歇低氧箱循环低氧/复氧方法构建 CIH 大鼠模型,探讨黄精多糖对 CIH 大鼠认知功能的改善作用,并研究其潜在作用机制,以期为黄精多糖治疗 CIH 相关认知损害提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,10~11 月龄,体质量 500~650 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号 SCXK(京)2024-001],饲养于天津市海河医院[实验动物使用许可证号 SYXK(津)2021-0002]。本实验已获得天津市海河医院动物实验伦理委员会批准[批准号 2023HHKT(A)-01]。

1.2 药物与试剂 黄精多糖(上海源叶生物技术有限公司,批号 s27804)。SOD、MDA、ROS、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、HIF-1 α 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号 E-BC-K020-M、E-BC-K025-M、E-BC-K138-F、E-EL-R0012、E-EL-R2856、E-EL-R0513);HIF-1 α 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号 BS0737R);Nrf2、HO-1、NF- κ B、NLR 家族 pyrin 结构域包含蛋白 3(NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3)、核纤层蛋白 A/C(Lamin A/C)、 β -肌动蛋白(β -actin)、切割活化型半胱天冬酶-3(cleaved-Caspase3)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 80593-1-RR、10701-1-AP、10745-1-AP、30109-1-AP、10298-1-AP、20536-1-AP、GB11532)。

1.3 仪器 间歇低氧箱(变压吸附式制氮机装置)(石家庄邦力机电设备有限公司,型号 BDL-SP2);气体浓度控制器(上海塔望智能科技有限公司,型号 Pro-Ox-100-m);电子天平(瑞士梅特勒托利多公司,型号 PL-601-L);Morris 水迷宫仪器及行为测试软件(北京硕林苑科技有限公司,型号 SLY-WMS);酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号 SpectraMax M5);组织包埋机、病理切片机(上海徠卡仪器有限公司,型号 EG1150、RM2235);小型转印槽、电泳槽、电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号 JY-zy6、JY-SPCT、JY-300C);倒置显微镜(日本 Olympus 公司,型号 CKX31)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 大鼠随机分为正常组、

模型组和黄精多糖低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg),每组 6 只,除正常组外,其余各组均参考文献[12]报道建立 CIH 模型。间歇性低氧舱采用自动气压调控,程序设计每 1 个低氧-复氧循环时间为 8 min,前 3 min 充纯氮气(使氧浓度由 21%降至 5%,5%氧浓度维持 2 min),后 2 min 充氧气供氧(使氧浓度由 5%升至 21%,21%氧浓度维持 1 min)。造模组大鼠每天放入间歇性低氧舱中 8 h(8:00 时至 16:00 时),其余 16 h 置于常规饲养笼正常饲养(室温、空气、正常饮食饮水),共 28 d。正常组大鼠每日同一时间段置于相同规格的有机玻璃舱内,输入空气,不进行缺氧处理。造模的同时灌胃给药,正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水。

2.2 行为学检测 造模及给药 28 d 后,开展 Morris 水迷宫实验,实验分为 2 个部分:定位航行实验及空间探索实验。实验设备包括 1 个圆形水池,充满水(水深约 60 cm),用墨汁将水染黑,水池以假想的十字线分为 4 个象限,将直径 10 cm 平台放在第二象限水面下 15 cm,分别从 4 个象限将大鼠面向池壁放入水中。实验为期 4 d,记录从入水至爬到平台所需时间即为逃避潜伏期;如果大鼠在 60 s 内未找到平台,则将其引至平台,并保持 15 s;逃避潜伏期超 60 s,记为 60 s,每天进行 1 次。整个实验过程中,水池周围参照物位置不变。在完成定位航行实验的次日,开展空间探索实验,拆除平台后,从原平台对侧象限将大鼠放入水中,记录其每 60 s 穿过原平台的次数以及在原平台象限搜索的时间。

2.3 取材及体质量测定 行为学实验结束后,大鼠禁食不禁水 12 h,称定体质量,使用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血,离心后分离血清。断头处死大鼠,分离海马组织,其中一侧冷冻保存,另一侧固定于多聚甲醛中,经脱水、石蜡包埋,制备组织切片。

2.4 血清和海马组织 SOD 活性和 MDA、IL-1 β 、TNF、HIF-1 α 水平检测 新鲜海马组织加入 9 倍量 PBS,于冰上研磨,离心后取上清,备用。按照试剂盒说明书操作,比色法检测血清和海马组织 SOD 活性和 MDA 水平,ELISA 法检测血清和海马组织 IL-1 β 、TNF、HIF-1 α 水平。

2.5 HE 染色观察海马 CA1 区病理组织学改变 取大鼠海马组织石蜡切片,经脱蜡、水化、PBS 漂洗后,苏木素染色,盐酸分化,伊红染色,脱水、透

明、封片后于显微镜下观察、拍照。

2.6 免疫组化 (IHC) 染色观察大鼠海马 CA1 区 cleaved-Caspase3 蛋白表达 取大鼠海马组织石蜡切片, 脱蜡, 抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 血清封闭, 加 cleaved-Caspase3 一抗 (1:500) 孵育过夜, PBS 洗涤, 滴加二抗室温孵育 50 min。DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 脱水、封片后于显微镜下观察。苏木素染细胞核为蓝色, DAB 阳性表达为棕黄色。拍照后通过 Image J 软件计算大鼠海马 CA1 区 cleaved-Caspase3 阳性表达百分比。

2.7 海马组织 ROS 水平检测 新鲜海马组织立即放入预冷的 PBS, 采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液, 按照试剂盒说明书操作检测 ROS 水平。

2.8 RT-qPCR 法检测海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* mRNA 表达 取大鼠新鲜海马组织, 使用 TRIzol 法提取 RNA, 检测 RNA 浓度, 逆转录为 cDNA 后进行扩增反应, 反应程序为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 共 40 个循环。实验结果以 C_T 值呈现, 以 β -actin 为内参, 采用以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列由天津津科生物科技有限责任公司设计合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	长度/bp
<i>β-actin</i>	正向 ACAGGATGCGAGAAGGAGATTAC	117
	反向 ACAGTGAGGCCAGGATAGA	
<i>Nrf2</i>	正向 CTGTGATCTGTCCCTGTGTAAA	99
	反向 GGAAGTGTGTTCCAGGAAATG	
<i>HO-1</i>	正向 GATGGCCTCCTGTACCATATC	99
	反向 AGCTCCTCAGGGAAGTAGAG	
<i>NF-κB</i>	正向 AGACATCCTTCCGAAACTC	102
	反向 TAGGTCCATCCTGCCATAA	
<i>NLRP3</i>	正向 GGAAGATGTGGACCTCAAGAAA	110
	反向 GATCCAAGTGATCTGCCTTCTC	
<i>HIF-1α</i>	正向 TCCATTACTGCCTCTGAAAC	97
	反向 CTCTGGGCTTGACTCTAACTTC	

2.9 Western blot 法检测海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 蛋白表达 取大鼠海马组织, 剪碎, 用预冷的裂解液提取总蛋白。在冰水浴上用组织研磨器充分研磨, 离心后取上清液。用核蛋白抽提试剂盒提取核蛋白, 通过 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 调整不同样品蛋白浓度至一致。蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳分离, 湿转法转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h, 加入 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 一抗 (1:1 000 稀释)

4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗室温孵育 1 h, PBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入 ECL 进行显色, 曝光。细胞核 *Nrf2*、*NF-κB* 以 Lamin A/C 为内参, *HO-1*、*NLRP3*、*HIF-1α* 以 β -actin 为内参, 通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示目的蛋白相对表达。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 22 软件进行处理, 数据以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 定位航行阶段组间比较采用多元重复测量方差分析, 其他数据组间比较采用单因素方差分析, 蛋白灰度比值检验采用非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄精多糖对 CIH 大鼠体质量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠体质量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄精多糖中、高剂量组大鼠体质量升高 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Comparison of body weight of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	造模前	造模后
正常组	562.33±36.19	607.67±36.05
模型组	568.67±51.28	491.01±26.12*
黄精多糖低剂量组	565.17±21.09	497.50±24.49
黄精多糖中剂量组	572.23±27.42	521.51±33.31#
黄精多糖高剂量组	571.50±37.66	530.83±18.60#

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。

3.2 黄精多糖对 CIH 大鼠定位航行及空间搜索行为能力的影响 与正常组比较, 模型组大鼠第 2~4 天逃避潜伏期延长 ($P<0.05$), 第 5 天穿越平台次数及目标象限停留时间减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄精多糖各剂量组大鼠逃避潜伏期缩短 ($P<0.05$), 第 5 天穿越平台次数及目标象限停留时间增加 ($P<0.05$), 见表 3~4。

3.3 黄精多糖对 CIH 大鼠海马组织病理变化影响 正常组大鼠海马组织 CA1 区神经元细胞结构清晰, 排列整齐紧密; 与正常组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区细胞排列稀疏絮乱, 细胞间隙增大, 部分神经元脱失, 神经元损伤严重; 与模型组比较, 黄精多糖中、高剂量组神经元损伤程度较低, 细胞结构较为清晰, 排列较整齐致密, 整体组织病理结构得以改善, 见图 1。

3.4 黄精多糖对 CIH 大鼠海马组织 cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠海马区 cleaved-Caspase3 蛋白表达阳性率升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄精多糖各剂量组

表3 各组大鼠逃避潜伏期比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.3 Comparison of escape latency of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	逃避潜伏期/s			
	1 d	2 d	3 d	4 d
正常组	45.06±18.35	29.92±16.15	24.33±15.45	21.94±9.27
模型组	56.55±5.76	49.50±10.96*	44.52±15.48*	34.93±15.31*
黄精多糖低剂量组	52.49±12.65	35.44±20.92#	33.42±13.58#	27.04±17.71#
黄精多糖中剂量组	49.81±17.87	34.35±19.32#	29.27±12.93#	25.52±7.87#
黄精多糖高剂量组	46.10±16.74	34.19±19.05#	28.33±18.23#	24.39±18.67#

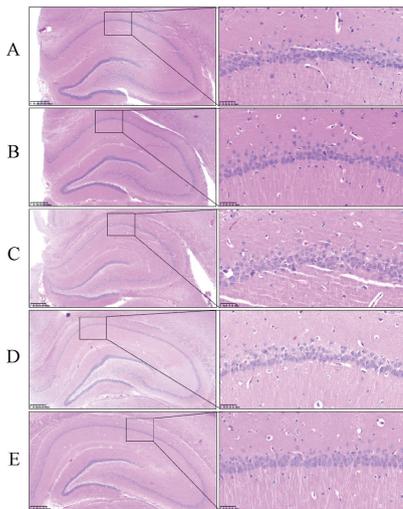
注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠穿越平台次数及目标象限停留时间比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.4 Comparison of crossing platform times and residence time in target quadrant of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
正常组	5.86±0.84	24.24±4.39
模型组	2.83±0.45*	12.32±3.62*
黄精多糖低剂量组	4.56±0.47#	17.85±6.03#
黄精多糖中剂量组	4.87±0.84#	19.34±6.61#
黄精多糖高剂量组	5.16±1.03#	20.16±2.37#

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

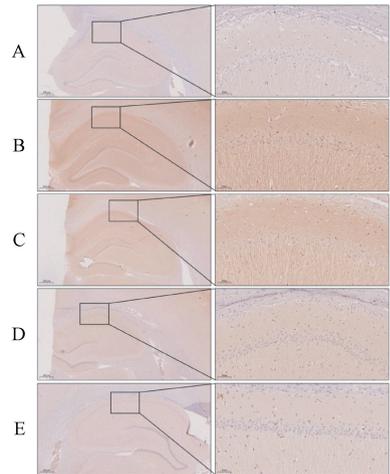


注：A为正常组，B为模型组，C~E分别为黄精多糖低、中、高剂量组。

图1 各组大鼠海马组织CA1区病理学变化(HE染色)
Fig.1 Pathological changes in hippocampal CA1 region of rats in each group (HE staining)

cleaved-Caspase3 蛋白表达阳性率降低 ($P<0.01$)，见图2、表5。

3.5 黄精多糖对CIH大鼠氧化应激的影响 与正常组比较，模型组大鼠血清及海马组织SOD活性降低 ($P<0.05, P<0.01$)，MDA水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，黄精多糖中、高剂量组大鼠血清及海马组织SOD活性升高 ($P<0.05, P<0.01$)，MDA水平降低 ($P<0.05, P<0.01$)，见



注：A为正常组，B为模型组，C~E分别为黄精多糖低、中、高剂量组。

图2 各组大鼠海马组织CA1区cleaved-Caspase3免疫组化染色

Fig.2 Immunohistochemical staining of cleaved-Caspase3 in CA1 area of hippocampus of rats in each group

表6。与正常组比较，模型组大鼠海马组织ROS水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，黄精多糖中、高剂量组大鼠ROS水平降低 ($P<0.05$)，见表7。

表5 各组大鼠海马组织cleaved-Caspase3蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.5 Comparison of cleaved-Caspase3 protein expression in hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	阳性表达面积比/%
正常组	5.80±0.52
模型组	49.40±7.75**
黄精多糖低剂量组	18.88±10.36##
黄精多糖中剂量组	18.14±3.24##
黄精多糖高剂量组	10.14±2.53##

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

3.6 黄精多糖对CIH大鼠炎症反应的影响 与正常组比较，模型组血清及海马组织IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，黄精多糖中、高剂量组血清及海马组织IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)，见表8。

表6 各组大鼠血清及海马组织 SOD 活性和 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 6 Comparison of SOD activity and MDA level in serum and hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	血清		海马组织	
	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mg prot ⁻¹)	MDA/(nmol·mg prot ⁻¹)
正常组	263.36±49.97	2.37±1.02	139.61±12.67	1.92±0.24
模型组	190.41±16.25*	4.46±0.67**	104.34±9.72**	4.27±0.41**
黄精多糖低剂量组	209.68±16.68	3.75±0.59	116.75±11.46	3.36±0.32#
黄精多糖中剂量组	224.71±26.95##	3.36±0.48#	123.32±10.81#	3.31±0.35#
黄精多糖高剂量组	254.47±31.96##	3.11±0.46##	137.49±9.96#	2.26±0.28#

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

表7 各组大鼠海马组织 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 7 Comparison of ROS levels in hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ROS
正常组	1 386.19±123.13
模型组	2 114.04±224.30*
黄精多糖低剂量组	2 064.94±94.72
黄精多糖中剂量组	1 905.98±105.64#
黄精多糖高剂量组	1 778.88±141.36#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

表8 各组大鼠血清及海马组织 IL-1β、TNF-α 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 8 Comparison of IL-1β and TNF-α levels in serum and hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	血清/(pg·mL ⁻¹)		海马组织/(pg·mg prot ⁻¹)	
	IL-1β	TNF-α	IL-1β	TNF-α
正常组	63.28±15.60	66.78±16.53	44.18±3.60	31.38±6.50
模型组	109.47±19.58*	114.83±19.96*	94.67±6.78*	64.43±7.68*
黄精多糖低剂量组	98.41±22.50	102.62±21.84	86.41±10.82	57.12±5.49
黄精多糖中剂量组	76.18±15.79#	73.84±16.45#	63.68±5.79#	44.62±4.50#
黄精多糖高剂量组	62.95±16.23#	69.82±19.64#	52.60±3.30#	39.28±3.02#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

表9 各组大鼠血清及海马组织 HIF-1α 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 9 Comparison of HIF-1α levels in serum and hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	血清		海马组织	
	HIF-1α/(ng·mL ⁻¹)	HIF-1α/(ng·mg prot ⁻¹)	HIF-1α/(ng·mL ⁻¹)	HIF-1α/(ng·mg prot ⁻¹)
正常组	14.97±1.62	2.85±0.71		
模型组	26.33±2.76*	5.32±0.66*		
黄精多糖低剂量组	24.29±1.38	4.68±0.36#		
黄精多糖中剂量组	22.49±2.17##	4.48±0.45##		
黄精多糖高剂量组	22.42±1.69##	4.37±0.97##		

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

mRNA 表达降低 ($P<0.05$), *NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* mRNA 表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,黄精多糖中、高剂量组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1* mRNA 表达升高 ($P<0.05$), *NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 见表 10。

3.9 黄精多糖对 CIH 大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 蛋白表达的影响 与正常

3.7 黄精多糖对 CIH 大鼠血清及海马组织 *HIF-1α* 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清及海马组织 *HIF-1α* 水平升高 ($P<0.05$);与模型组比较,黄精多糖中、高剂量组大鼠血清及海马组织 *HIF-1α* 水平降低 ($P<0.01$),黄精低剂量组海马组织 *HIF-1α* 水平降低 ($P<0.05$), 见表 9。

3.8 黄精多糖对 CIH 大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1*

组比较,模型组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1* 蛋白表达降低 ($P<0.05$), *NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,黄精多糖中、高剂量组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1* 蛋白表达升高 ($P<0.05$), *NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 蛋白表达降低 ($P<0.05$),黄精多糖低剂量组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1* 蛋白表达升高 ($P<0.05$), *NF-κB*、*HIF-1α* 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 3、表 11。

4 讨论

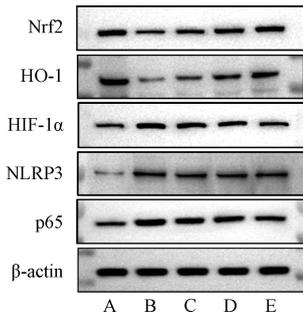
阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 的患者在睡眠过程中反复出现呼吸暂停和低通气,导致低氧血症和高碳酸血症以及片段化睡眠,引起多种心脑血管疾病及内分泌代谢紊乱,甚至出现记忆力下降和认知障碍^[2]。OSAHS 导致的多种靶器官损伤尤其是认知障碍严重影响患者生存质量。海马作为人体学习记忆重要部位,对缺血缺氧非常敏感,缺氧导致自由基水平和炎症反应增加,促进海

表 10 各组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 10 Comparison of mRNA expressions of *Nrf2*, *HO-1*, *NF-κB*, *NLRP3* and *HIF-1α* in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	<i>Nrf2</i>	<i>HO-1</i>	<i>NF-κB</i>	<i>NLRP3</i>	<i>HIF-1α</i>
正常组	1.000±0.156	1.000±0.167	1.000±0.183	1.000±0.107	1.000±0.163
模型组	0.364±0.069*	0.500±0.077*	2.157±0.377*	1.967±0.312*	2.331±0.403*
黄精多糖低剂量组	0.461±0.036	0.597±0.095	1.821±0.300	1.606±0.250#	2.135±0.299
黄精多糖中剂量组	0.667±0.102#	0.714±0.115#	1.512±0.303#	1.438±0.272#	1.577±0.253#
黄精多糖高剂量组	0.858±0.140#	0.900±0.175#	1.359±0.231#	1.229±0.202#	1.414±0.225#

注：与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。



注：A为正常组，B为模型组，C~E分别为黄精多糖低、中、高剂量组。

图 3 各组大鼠海马组织 *HIF-1α*、*Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3* 蛋白条带图

Fig. 3 Protein bands of *HIF-1α*, *Nrf2*, *HO-1*, *NF-κB* and *NLRP3* in hippocampus of rats in each group

表 11 各组大鼠海马组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NF-κB*、*NLRP3*、*HIF-1α* 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 11 Comparison of protein expressions of *Nrf2*, *HO-1*, *NF-κB*, *NLRP3* and *HIF-1α* in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	<i>Nrf2</i>	<i>HO-1</i>	p65	<i>NLRP3</i>	<i>HIF-1α</i>
正常组	1.00±0.06	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.03
模型组	0.50±0.04*	0.49±0.02*	2.00±0.07*	1.96±0.13*	1.96±0.05*
黄精多糖低剂量组	0.64±0.04#	0.64±0.04#	1.87±0.10#	1.84±0.13	1.82±0.09#
黄精多糖中剂量组	0.78±0.05#	0.77±0.03#	1.57±0.09#	1.53±0.12#	1.57±0.07#
黄精多糖高剂量组	0.88±0.07#	0.88±0.03#	1.25±0.03#	1.23±0.07#	1.22±0.03#

注：与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

改善海马组织病理结构，减轻组织损伤。

缺氧状态下线粒体生成大量内源性活性氧簇，攻击机体内 DNA 和蛋白质，导致氧化应激反应增强，最终造成神经系统和心血管系统受损^[19]。SOD 具有清除氧自由基作用，可缓解缺氧导致神经元损伤，而 MDA 是自由基损伤细胞膜代谢产物，反映氧化应激水平。*HIF-1α* 是缺氧状态下的核心转录因子，介导细胞对缺氧的生理病理过程。*HIF-1α* 可激活 *NF-κB* 通路，*NF-κB* 是调控炎症介质的重要转录因子，上调下游的炎症因子基因表达，包括 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β*、*M-CSF*、*IL-8*、*MCP-1*、*ICAM-1* 及 *VCAM-1* 等。本研究结果显示，模型组大鼠血清和海马组织中促炎因子 *TNF-α*、*IL-1β* 以及氧化应激指标 MDA 水平升高，SOD 活

性降低，同时海马组织中 ROS 和 *NF-κB* 表达升高；而黄精多糖可降低 *TNF-α*、*IL-1β*、MDA 和 ROS 水平，升高 SOD 活性，下调 *NF-κB* mRNA 和蛋白表达，这些结果与以往的研究结果表现一致^[20-21]。

黄精为百合科黄精属植物黄精的干燥根茎，药食同源，广泛应用于保健食品开发，黄精多糖是其活性成分。研究显示，黄精多糖可提高 AD 小鼠及 D-Gal 衰老小鼠的学习记忆能力，增加小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性，降低 MDA 水平^[14-15]。本研究通过间歇性低氧舱采用自动气压调控技术建立 CIH 大鼠模型，发现模型组大鼠学习能力及空间探索能力下降，与以往研究相一致^[16-18]，说明造模成功。给予黄精多糖干预后，发现其可改善大鼠学习和记忆能力，减轻大鼠海马组织 CA1 区损伤程度，表明黄精多糖可以提高 CIH 大鼠认知能力，

马神经元氧化，损害突触的可塑性以及空间记忆能力^[13]。

Nrf2/*HO-1* 信号通路是经典的对抗氧化损伤的途径。*Nrf2* 是抗氧化应激的关键转录因子，*Nrf2* 激活后进入细胞核，结合抗氧化应激反应元件 (ARE)，驱动下游抗氧化基因，尤其是 *HO-1* 转录表达。*HO-1* 通过催化血红素分解成亚铁、一氧化碳、胆绿素，清除 ROS，抑制 *NF-κB* 和 *NLRP3* 炎症小体活化，发挥抗氧化应激及抗炎功能^[22]。有研究发现，黄精多糖通过调节 *Nrf2*/*HO-1* 信号通路减轻氧化损伤，具有改善线粒体功能和抑制细胞凋亡的作用^[23]。本研究结果显示，黄精多糖可逆转

CIH 大鼠海马组织中 Nrf2 和 HO-1 表达升高的异常应激反应,提示其可能通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路对缺氧所致的大脑组织损伤发挥保护作用。此外, Nrf2/HO-1 信号通路在抗细胞凋亡和抗细胞焦亡方面具有关键作用^[24-25]。本研究发现,黄精多糖可升高 CIH 大鼠海马组织 Caspase-3 和 NLRP3 蛋白表达,提示黄精多糖可能对缺氧状态下神经细胞具有抗凋亡和抗焦亡作用,但具体的作用机制还需深入的探索和研究。

综上所述,黄精多糖可明显改善 CIH 大鼠认知功能障碍和海马组织神经元结构,同时也能减轻海马组织神经元细胞凋亡和焦亡,其机制可能是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 HIF-1 α 蛋白及 mRNA 表达,减轻氧化应激损伤和缺氧状态下的炎症级联反应,发挥保护缺氧状态下海马神经元的作用。

参考文献:

[1] Gaspar L S, Álvaro A R, Moita J. Obstructive sleep apnea and hallmarks of aging[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23 (8): 675-692.

[2] 中国医师协会睡眠医学专业委员会. 成人阻塞性睡眠呼吸暂停多学科诊疗指南[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(24): 1902-1914.

[3] Jordan A S, McSharry D G, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea[J]. *Lancet*, 2014, 383(9918): 736-747.

[4] Qiu X, Li L, Wei J. The protective role of Nrf2 on cognitive impairment in chronic intermittent hypoxia and sleep fragmentation mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109813.

[5] 竺飞燕,王云玲,金鑫,等. 老年中重度阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者的睡眠结构特征与认知障碍的关系研究[J]. *浙江医学*, 2021, 43(22): 2422-2425.

[6] Cheung E, Escobar J, Schunke K. Effects of chronic intermittent hypoxia on cognitive function in rats[J]. *Physiology*, 2023, 38(S1): 5734793.

[7] 李佳琪,崔淑侠. Nrf2/HO-1 信号通路的神经保护作用研究进展[J]. *临床医学进展*, 2024, 14(9): 1064-1071.

[8] 周忠光,官铭海,王晓慧,等. 黄精多糖药理作用及机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(12): 1-4.

[9] 王艳,董鹏,金晨钟,等. 黄精多糖组成及其抗氧化活性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(5): 2191-2199.

[10] 成威,李友元,邓洪波,等. 黄精多糖对痴呆小鼠海马线粒体超微结构的影响[J]. *中南药学*, 2014, 12(10): 969-972.

[11] 陆连第,段伟松,赵玉,等. 黄精多糖对血管性痴呆模型大鼠干预作用的实验研究[J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2212-2215.

[12] Yagishita S, Suzuki S, Yoshikawa K. Treatment of intermittent hypoxia increases phosphorylated tau in the hippocampus via biological processes common to aging[J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 2.

[13] Arias-Cavieres A, Khoo M A, Nwakudu C U. A HIF1 α -dependent pro-oxidant state disrupts synaptic plasticity and impairs spatial memory in response to intermittent hypoxia[J]. *eNeuro*, 2020, 7(3): ENEURO. 0024-20. 2020.

[14] 吴繁荣,李友元,吴曦,等. 黄精多糖对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆力影响及作用机制研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2008, 27(4): 291-295.

[15] 刘露露,李洪宇,苑广信. 黄精多糖对 D-半乳糖诱导衰老小鼠学习和记忆水平的影响[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2021, 22(2): 192-197.

[16] Row B W, Kheirandish L, Neville J J, et al. Impaired spatial learning and hyperactivity in developing rats exposed to intermittent hypoxia[J]. *Pediatr Res*, 2002, 52: 449-453.

[17] Gozal D, Row B W, Gozal E, et al. Temporal aspects of spatial task performance during intermittent hypoxia in the rat: evidence for neurogenesis[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(8): 2335-2342.

[18] Wagner S, Quente J, Staedtler S, et al. A high risk of sleep apnea is associated with less postoperative cognitive dysfunction after intravenous anesthesia; results of an observational pilot study[J]. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 139.

[19] 陈卉,郭村村,潘雅琪,等. 复方人参对机体缺氧损伤的保护作用及其分子机制研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2025, 37(1): 27-39.

[20] 贾春辉,李静,牛美兰. 黄精多糖对胃溃疡大鼠胃黏膜的保护作用及作用机制[J]. *黑龙江医学*, 2025, 49(5): 556-558.

[21] 王恩顺,李子煜,韩于辉,等. 黄精多糖对口腔溃疡模型大鼠的治疗作用及其机制研究[J]. *安徽医学学报*, 2024, 23(3): 75-77.

[22] Tong F, Zhou X. The Nrf2/HO-1 pathway mediates the antagonist effect of L-arginine on renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(3): 519-529.

[23] 王婷,李乐迅,邵长胜,等. 黄精多糖对 β 淀粉样蛋白诱导细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(19): 155-164.

[24] Wang S, Zheng Y, Jin S, et al. Dioscin protects against cisplatin-induced acute kidney injury by reducing ferroptosis and apoptosis through activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(12): 2443.

[25] Meng M, Huo R, Wang Y, et al. Lentianin inhibits oxidative stress and alleviates LPS-induced inflammation and apoptosis of BMECs by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222(Pt B): 2375-2391.

[26] Zou Y, Luo X, Feng Y, et al. Luteolin prevents THP-1 macrophage pyroptosis by suppressing ROS production via Nrf2 activation[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109573.