

- [26] 龚廷贤. 寿世保元[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 367.
- [27] 许叔微. 普济本事方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959.
- [28] 祁坤. 外科大成[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1957: 196.
- [29] 龚廷贤. 万病回春[M]. 北京: 山西科学技术出版社, 2013: 219.
- [30] 危亦林. 世医得效方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 457.
- [31] 中医研究院中药研究所. 全国中药成药处方集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 128.
- [32] 河北省中医研究院. 清太医院配方[M]. 石家庄: 河北人民出版社, 1959: 266.
- [33] 顾世澄. 疡医大全[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 366.
- [34] 乐凤鸣. 同仁堂药目[M]. 北京: 学苑出版社, 2011: 5.
- [35] 北京市公共卫生局. 北京市中药成方选集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1961: 13.
- [36] 王晓晴. 传统茯苓酒的制备工艺及功能性研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
- [37] 温柔. 传统五加皮酒的制备及其初步药效学研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
- [38] 郭子祺. 木瓜酒降酸脱涩技术研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2022.
- [39] 郑利军, 邓晓庆, 陈雄, 等. 气相色谱法测定国公酒中7种掺伪香精成分[J]. 中国酿造, 2024, 43(2): 253-257.
- [40] 郭艳, 蒋中仁, 彭蕾, 等. 参茸酒的食用安全性研究[J]. 酿酒科技, 2019(1): 141-146.

## 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠中枢神经的影响

陶庄<sup>1</sup>, 刘继鹏<sup>2</sup>, 董文文<sup>1</sup>, 周佳锋<sup>3</sup>, 康帅<sup>3</sup>, 王蕊<sup>3</sup>, 赵俊杰<sup>4</sup>, 杨文明<sup>1</sup>, 汪美霞<sup>1\*</sup>  
(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽合肥 230031; 2. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 102401; 3. 安徽中医药大学研究生院, 安徽合肥 230038; 4. 中国科学技术大学附属第一医院, 安徽合肥 230036)

**摘要:** **目的** 探索肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠中枢神经的调控机制。**方法** SD 大鼠随机分为模型组、青霉胺组 (0.13 g/kg) 和肝豆扶木汤低、中、高剂量组 (5.85、11.7、23.4 g/kg), 另设空白组, 每组 10 只, 应用硫酸铜负荷饮食法 [含硫酸铜 (1 g/kg) 饲料和硫酸铜 (0.185%) 水溶液] 建立铜负荷大鼠模型, 各组给药干预 4 周后行静息态功能磁共振 (rs-fMRI) 检查; Western blot 法检测 c-fos 蛋白表达; HE 及 Nissl 染色观察肝组织病理学; 磁微粒化学发光法检测血清 HA、CIV、LN、PⅢNP 水平; 原子吸收分光光度法检测血清、脑组织 Cu<sup>2+</sup> 水平。**结果** 与空白组比较, 模型组感觉皮层、小脑后叶、运动皮层、小脑前叶、纹状体等脑区功能活动异常, 以基底节区为种子区, 发现其与不同脑区的功能连接广泛受损; 与模型组比较, 青霉胺组回调脑区为小脑后叶、小脑前叶、感觉皮层等, 种子区与下丘脑视前区、下丘脑结节区、下丘脑视上区、中脑背盖、脑桥被盖部、延髓等脑区的功能连接改善; 肝豆扶木汤低、中剂量组回调脑区为纹状体、小脑后叶等, 能够改善种子区与脑桥被盖部、下丘脑视前区、下丘脑结节区的功能连接; 纹状体、绒球小结叶、小脑后叶是肝豆扶木汤高剂量组回调脑区, 其种子区与纹状体、海马、小脑后叶等脑区功能连接得到改善; 以纹状体为靶点脑区, 与模型组比较, 青霉胺组和不同剂量肝豆扶木汤组脑组织 c-fos 相对表达和 Cu<sup>2+</sup> 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 青霉胺组和肝豆扶木汤各剂量组血清 Cu<sup>2+</sup> 和 PⅢNP 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 青霉胺组和肝豆扶木汤中剂量组血清 HA 水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** Wilson 病铜负荷大鼠模型存在广泛中枢神经系统受损, 表现为脑区功能活动及不同受损脑区功能连接异常; 肝豆扶木汤能够改善 Wilson 病铜负荷大鼠模型肝脏损伤、回调部分脑区功能异常活动。

**关键词:** 肝豆扶木汤; 肝豆状核变性 (Wilson 病); 铜负荷; 静息态功能磁共振技术; c-fos

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2025)08-2727-10

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.040

**收稿日期:** 2024-12-02

**基金项目:** 国家自然科学基金 (区域创新发展联合基金) (U22A20366); 青年岐黄学者培养项目 [国中医药人教函 (2022) 256 号]; 安徽省自然科学基金资助项目 (2308085QH291); 安徽省重点研究与开发计划 (202204295107020001); 安徽省青年领军后备人才支持项目 [中发展 (2022) 4 号]; 2023 年安徽省卫生健康科研项目 (AHWJ2023A30137); 2023 年度安徽省高校科研项目 (重点项目) (2023AH050765, 2023AH050798); 安徽中医药大学临床科研项目 (2024YFYLCZX13); 安徽中医药大学第一附属医院引进高层次人才项目 (2022 年)

**作者简介:** 陶庄 (1993—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医药防治脑病的研究。Tel: (0551) 62838522, E-mail: doersTZH@163.com

\* **通信作者:** 汪美霞 (1979—), 女, 博士, 主任医师, 从事中医药防治脑病的研究。Tel: (0551) 62838522, E-mail: meixiawang96@sina.com

Wilson病是一种常染色体隐性遗传的铜代谢障碍性疾病,以铜代谢障碍引起的肝硬化、基底节损害为主的脑变性疾病为特点,临床多表现为进行性加重的锥体外系症状、精神症状、肝硬化、肾功能损害及角膜色素环<sup>[1]</sup>。中医药在Wilson病领域的研究已愈四十年,形成了肝豆汤、肝豆灵片、肝豆扶木汤、清热利胆解毒方、补肾化痰祛瘀方等行之有效的中医方药<sup>[2]</sup>;基于循证医学的研究证据表明,中医药治疗能够促进患者24 h尿铜排泄,改善神经功能和肝功能,提高临床治疗有效率,具备良好的用药安全性;其发挥作用的机制可能与抗氧化、抑制细胞凋亡增殖、抗炎和抗纤维化作用有关<sup>[3]</sup>。

肝豆扶木汤是新安医学“虚-痰瘀”思想指导下创制的固本培元中药复方,临床疗效显著<sup>[4-5]</sup>。肝豆扶木汤方含枸杞子、郁金、白芍、土茯苓、柴胡、三七,其中枸杞子滋补肝肾、固本扶正;三七、郁金、土茯苓活血化瘀、解毒除湿;白芍、柴胡柔肝敛阴、条达肝气,诸药合用,共奏补益肝肾、豁痰化瘀之功效<sup>[6]</sup>。研究表明,肝豆扶木汤能够降低Wilson病患者肝纤维化指标水平的同时,亦可有效改善患者的临床症状及影像学指标<sup>[7-9]</sup>。截止目前,对于肝豆扶木汤发挥保护作用的中枢调控机制尚未阐明,本研究旨在通过利用静息态功能磁共振技术(resting-state functional magnetic resonance imaging, rs-fMRI)以获取大脑功能活动的信号变化,以期进一步揭示中医有效方药发挥治疗效果的中枢神经机制。

## 1 材料

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠60只,4~6周龄,体质量(200±20)g,由北京华阜阳康生物科技股份有限公司提供[实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0008],饲养于安徽农业大学生命科学院动物房(SPF级)[实验动物使用许可证号SYXK(皖)2021-009]。本研究通过安徽中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会的伦理审查(伦理号AZYFY-2024-1014)。

1.2 药物 青霉胺片(规格0.125g/片,批号601220803)购自上海上药信谊药厂有限公司。肝豆扶木汤由枸杞子12g、郁金10g、白芍15g、土茯苓15g、柴胡10g、三七3g组成,药材购自安徽中医药大学第一附属医院中草药房,由安徽中医药大学第一附属医院药剂科采用YJD30-GL30L型十功能自动煎药机制成水煎剂。

1.3 试剂 透明质酸(hyaluronic acid, HA)、IV型胶原(type IV collagen, CⅣ)、层黏连蛋白(laminin, LN)及Ⅲ型前胶原N端肽(type III procollagen peptide, PⅢNP)试剂盒(郑州安图生物工程股份有限公司,批号20240814、20240805、20240909、20240826);RIPA裂解液(强)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(合肥白鲨生物科技有限公司,批号23143679、22308210、23143679、24134864);PVDF膜(德国Millipore公司,批号0000230786);预染蛋白Marker(美国Thermo公司,批号2574135);ECL超敏

发光试剂盒(美国GlpBio公司,批号50); $\beta$ -actin抗体、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号19AW0505、249760203、247860216);c-fos抗体(美国Affinity公司,批号35i5486);铜离子(Cu)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20240221);PAGE胶促凝剂、TBST/PBST洗涤剂、HE染液、分化液、返蓝液(北京索莱宝科技有限公司,批号815C021、129T0112、G1100、G1862、G1866);尼氏染液(安徽科兔生物技术有限公司,批号BL-RS-21)。

1.4 仪器 超高场动物磁共振成像系统(武汉联影生命科学仪器有限公司,型号uMR 9.4T);高速医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号H1850);全自动化学发光测定仪(郑州安图生物工程股份有限公司,型号LAB-YQ/MY050);电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能科技有限公司,型号EPS300、VE-180、VE-186);高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司,型号JW-3021HR);电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司,型号DHG-9070);电子天平(上海菁海仪器有限公司,型号FA2004N);磁力加热搅拌器(常州市人和仪器厂,型号JJ-79-1);自动曝光仪(上海培清科技有限公司,型号JS-M6P);酶联免疫吸附测定分析仪(深圳市雷杜生命科学股份有限公司,型号RT-6100);脱水机、包埋机、冻台(武汉俊杰电子有限公司,型号JJ-12J、JB-P5、JB-L5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号RM2016);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号KD-P);烤箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号DHG-9030A);正置光学显微镜、成像系统(日本尼康公司,型号Nikon Eclipse E100、Nikon DS-U3)。

## 2 方法

2.1 造模 大鼠适应性饲养1周后,随机选取10只作为空白组,给予普通饲料常规饲养;剩余50只采用硫酸铜负荷饮食法建立Wilson病铜负荷模型,以含硫酸铜(1g/kg)的饲料和含硫酸铜(0.185%)的水喂养动物,连续4周<sup>[10]</sup>。饲养至第4周末,将大鼠置于代谢笼,留取24h尿液,火焰原子吸收光谱法检测其尿铜含量,以尿铜含量>100  $\mu$ g/L为造模成功标志,共造模成功43只,成模率86.00%。

2.2 分组及给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组、青霉胺组和肝豆扶木汤低、中、高剂量组。肝豆扶木汤水煎剂100 mL/剂,根据大鼠与人的体表面积比例进行给药剂量换算,折算系数0.018,肝豆扶木汤组低、中、高剂量组按生药量5.85、11.7、23.4 g/kg进行灌胃;青霉胺组将青霉胺片研成粉剂用蒸馏水配成0.13 g/kg混悬液,以2 mL/100 g容量灌胃给药;模型组和空白组灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续4周。

### 2.3 rs-fMRI扫描

2.3.1 麻醉与固定 大鼠放在有机玻璃装置内,用5%异氟烷、95% O<sub>2</sub>的混合物进行麻醉;在磁场中心施用2%异氟烷、98% O<sub>2</sub>的混合物维持麻醉状态,并将其固定在俯卧

位。实验过程,使用实时小动物生命体征监护仪监测动物体温、呼吸速率、心率,确保在正常范围内。

2.3.2 扫描序列、参数设置 所有大鼠均使用 uMR 9.4T 高场动物磁共振成像系统进行扫描,首先获取 T2 加权解剖图像 (T2-prepared\_GRE\_FSP, T2WI) 后,再进行 rs-fMRI 扫描。

T2WI: 扫描序列为 T2 磁化准备的快速梯度回波序列 (T2WI) 参数设置为重复时间 (repetition time, TR) 3 500 ms, 回波时间 (echo time, TE) 45 ms, 相位方向视野百分比 100 (percent phase field view 100,% P. FOV), 层厚 (slice thickness, Thk) 0.5 mm, 采集矩阵 (Matrix) 248×276, 翻转角 (Flip Angle, FA) 180°。

rs-fMRI: 采用基于血氧水平依赖 (blood oxygen level dependent, BOLD) 的 rs-fMRI 成像。扫描序列为基于血氧饱和水平依赖效应的脑功能磁共振成像技术 (EPI\_BOLD) 参数设置为 TR 2 053 ms, TE 11 ms,% P. FOV 100, Thk 0.5 mm, Matrix 160×160, FA 90°。

2.3.3 成像预处理与指标计算 运用 MRlron、spmhouseIHEP 和 DPABI 软件对数据进行预处理;通过时间片校正、头动校正以完成每只大鼠 BOLD 脑成像的空间标准化,对空间标准化后的图像进行重切片,图像像素大小为 1.0 mm×1.0 mm×1.0 mm [扩大 voxel size (体素尺寸) 后的标准];对图像数据进行高斯平滑、去线性漂移处理以进一步减少混杂因素的影响;以 BOLD 信号的低频振幅 (amplitude of low-frequency fluctuation, ALFF)、局部一致性 (regional homogeneity, ReHo) 分析所筛选获得的靶点脑区为种子区,逐像素地计算脑内其他区域与纹状体的皮尔逊相关系数,得到每只大鼠的功能连接图 (functional connectivity, FC)。

2.4 取材 所有大鼠通过异氟烷吸入深度麻醉,采用心尖取血法取血 2~3 mL, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清,于 -80 ℃ 冰箱保存备用。取血后经心脏灌注温生理盐水和 4% 多聚甲醛,收集肝脏及脑组织,放置在 4% 多聚甲醛中固定,组织脱水包埋,切成 4 μm 切片备用。

### 2.5 组织病理学观察

2.5.1 HE 染色观察肝组织病理形态 切片脱蜡、覆水,苏木精染色 3~8 min, 盐酸乙醇分化,氨水返蓝,伊红染色 1~3 min, 乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,切片于全景扫描仪中观察并采集图像。

2.5.2 Nissl 染色观察神经元结构 切片脱蜡、覆水,尼氏染色 10~30 min, 尼氏分化液中分化,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,切片于全景扫描仪中观察并采集图像。

2.6 Western blot 法检测脑组织 c-fos 蛋白表达 称取适量脑组织,按照 1:100 比例加入 RIPA 细胞裂解液 (含 1 mmol/L PMSF) 进行匀浆,置于冰上裂解 30 min,裂解液 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,即为总蛋白。蛋白样品按照 1:4 比例加入 5×蛋白上样缓冲液,沸水浴加热

10 min 使蛋白充分变性。配制 SDS-PAGE 凝胶后上样、电泳、转膜、封闭,分别进行一抗孵育、二抗孵育后,ECL 化学发光法显影,分析条带灰度值,计算蛋白相对表达。

2.7 肝纤四项指标检测 取 3.0 mL 血清,按照试剂盒说明书检测 HA、CIV、LN 及 PⅢNP 水平。

2.8 Cu<sup>2+</sup> 水平检测 取 0.3 mL 血清,加入 0.9 mL 超纯水充分混匀备用。称取适量脑组织消解过夜,完全消解后加超纯水定容至 10 mL,过滤除去残渣,3 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。所用容器和用具均先清洗干净,再经 50% HNO<sub>3</sub> 浸泡,超纯水反复冲洗,烘干备用。采用原子吸收分光光度法 (atomic absorption spectroscopy, AAS) 检测 Cu<sup>2+</sup> 水平。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件统计分析,计量资料以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,组间比较用方差分析或 Wilcoxon 秩和检验方法;计数资料以频数 (构成比) 统计描述,组间比较用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法检验。假设检验统一使用双侧检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

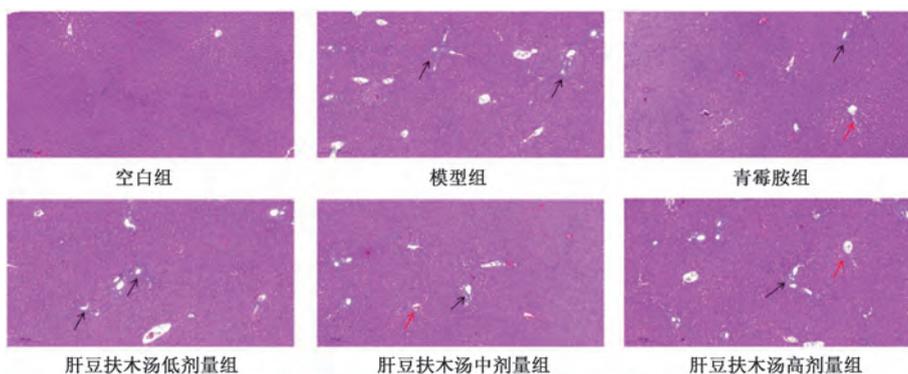
## 3 结果

3.1 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠肝、脑组织病理学的影响

3.1.1 肝组织 空白组大鼠肝小叶结构清晰,肝索及肝窦围绕中央静脉呈放射状排列;模型组大鼠肝小叶结构紊乱,可见桥接坏死,汇管区较多炎细胞浸润,纤维组织增生形成纤维间隔,假小叶形成;青霉素组大鼠肝小叶结构保存,局灶肝细胞点灶状坏死,个别汇管区少量炎细胞浸润;肝豆扶木汤低剂量组大鼠肝小叶结构紊乱,局灶肝细胞桥接坏死,汇管区较多炎细胞浸润,纤维组织中度增生伴假小叶形成趋势;肝豆扶木汤中剂量组大鼠肝小叶结构保存,局灶肝细胞点灶状坏死,汇管区少量炎细胞浸润;肝豆扶木汤高剂量组大鼠肝小叶结构基本保存,局灶肝细胞点灶状坏死,汇管区较多炎细胞浸润,纤维组织轻度增生,见图 1。

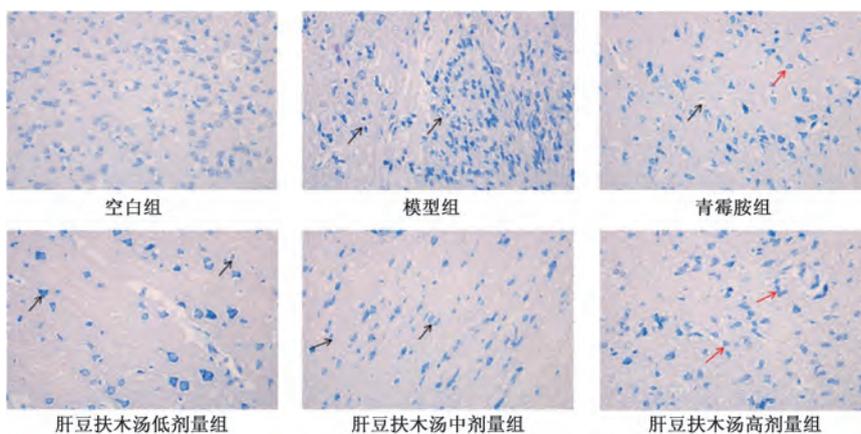
3.1.2 脑组织 空白组大鼠脑组织细胞形态规则,大小均匀,细胞排列紧密有序;模型组大鼠脑组织细胞形态不规则,大小不均匀,排列紊乱,细胞核固缩,空泡化明显;青霉素组大鼠脑组织细胞形态尚规则,大小尚均匀,细胞外空隙稍增大,少量细胞核固缩、空泡化;肝豆扶木汤低剂量组大鼠脑组织细胞形态不规则,大小欠均匀,细胞外空隙增大,部分细胞核固缩、空泡化;肝豆扶木汤中剂量组大鼠脑组织细胞形态欠规则,大小尚均匀,细胞外空隙稍增大,部分细胞核固缩、空泡化;肝豆扶木汤高剂量组大鼠脑组织细胞形态尚规则,大小尚均匀,细胞外间隙稍增大,可见细胞核固缩、空泡化,见图 2。

3.2 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠肝纤四项指标的影响 与空白组比较,模型组血清 HA、PⅢNP 水平升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,青霉素组和肝豆扶木汤中剂量组 HA 水平降低 ( $P<0.05$ ),青霉素组和肝豆扶木汤各剂量组 PⅢNP 水平降低 ( $P<0.05$ ),见图 3。



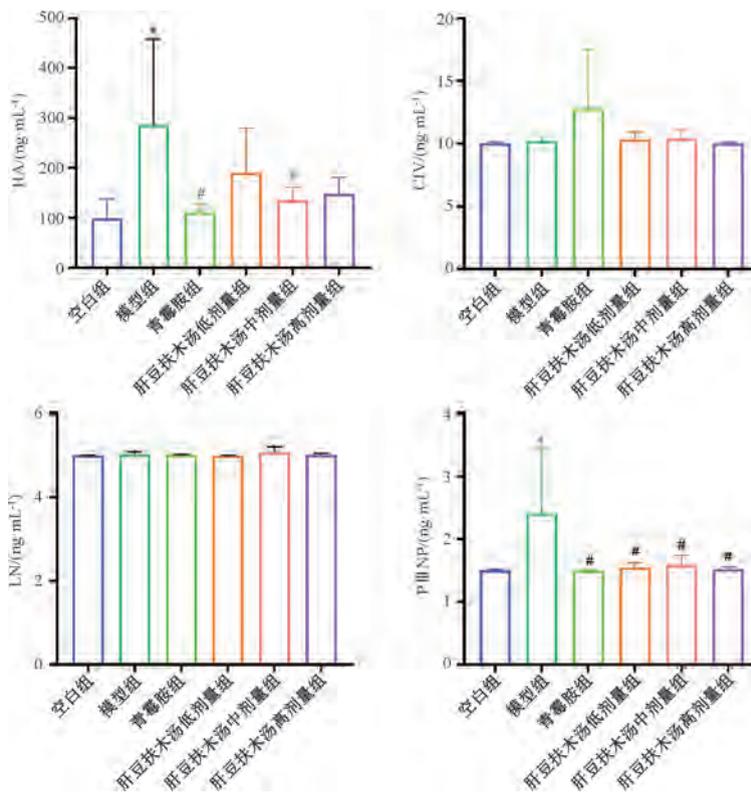
注：黑色箭头处可见肝小叶结构紊乱或炎细胞浸润、纤维组织增生，红色箭头处可见肝小叶结构基本保存。

图1 各组大鼠肝组织 HE 染色图 (×200)



注：黑色箭头处可见细胞形态不规则及细胞核固缩、空泡化，红色箭头处可见细胞形态尚规则、大小尚均匀。

图2 各组大鼠脑组织 Nissl 染色图 (×400)

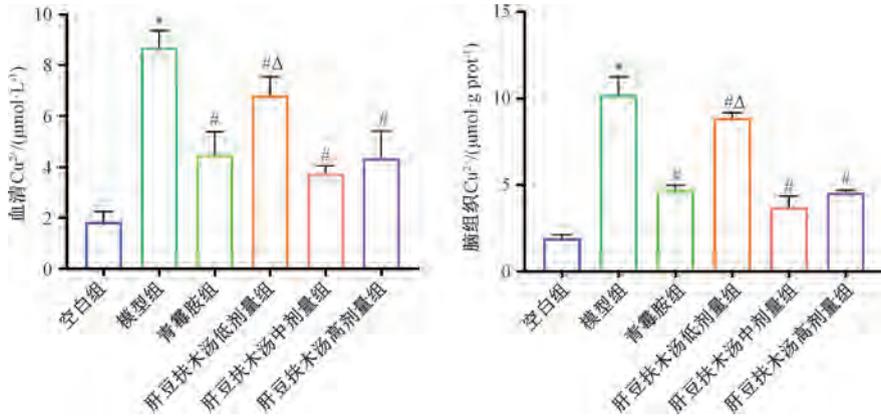


注：与空白组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠肝纤四项水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

3.3 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠血清和脑组织 Cu<sup>2+</sup> 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清和脑组织 Cu<sup>2+</sup> 水平均升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,青霉素组和肝

豆扶木汤各剂量组血清和脑组织 Cu<sup>2+</sup> 水平均降低 ( $P<0.05$ ),且肝豆扶木汤中、高剂量组的作用与青霉素组相当 ( $P>0.05$ ),见图4。

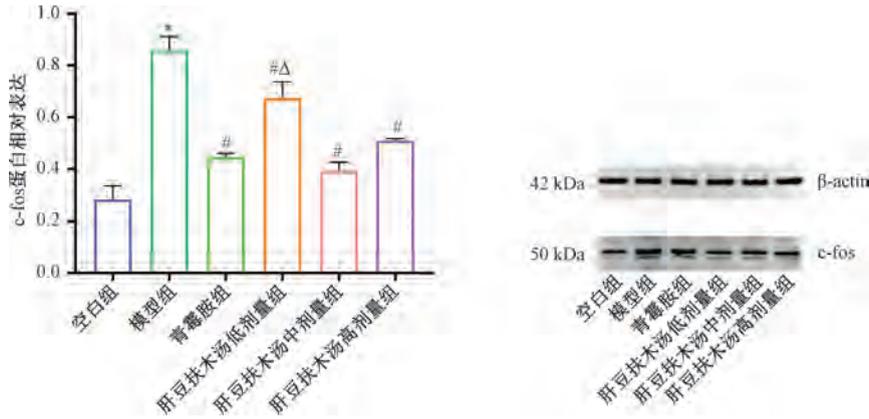


注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与青霉素组比较,Δ $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠血清和脑组织 Cu<sup>2+</sup> 水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

3.4 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠脑组织 c-fos 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠脑组织 c-fos 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,青霉素组和肝豆扶

木汤各剂量组大鼠脑组织 c-fos 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),且肝豆扶木汤中、高剂量组的作用与青霉素组相当 ( $P>0.05$ ),见图5。



注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与青霉素组比较,Δ $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠脑组织 c-fos 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

3.5 肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠 rs-fMRI 分析的影响

3.5.1 基于 fALFF 和 ReHo 的脑区功能活动分析 基于广义线性模型,将2组数据进行逐像素两样本 t 检验,在显著性水平  $P<0.05$ 、团簇像素点个数>100 的阈值下得到2组间 fALFF 和 ReHo 发生显著性改变的区域。显著性差异的区域显示为彩色;暖色部分代表脑功能活性增加的区域;冷色部分代表脑功能活性降低的区域。像素点个数为差异团簇包含的体素个数;T 值为团簇差异最大点统计值;坐标是差异最大点在鼠脑 Paxinos 空间的定位坐标,其中 X 代表左右, Y 代表背侧到腹侧, Z 代表前后。

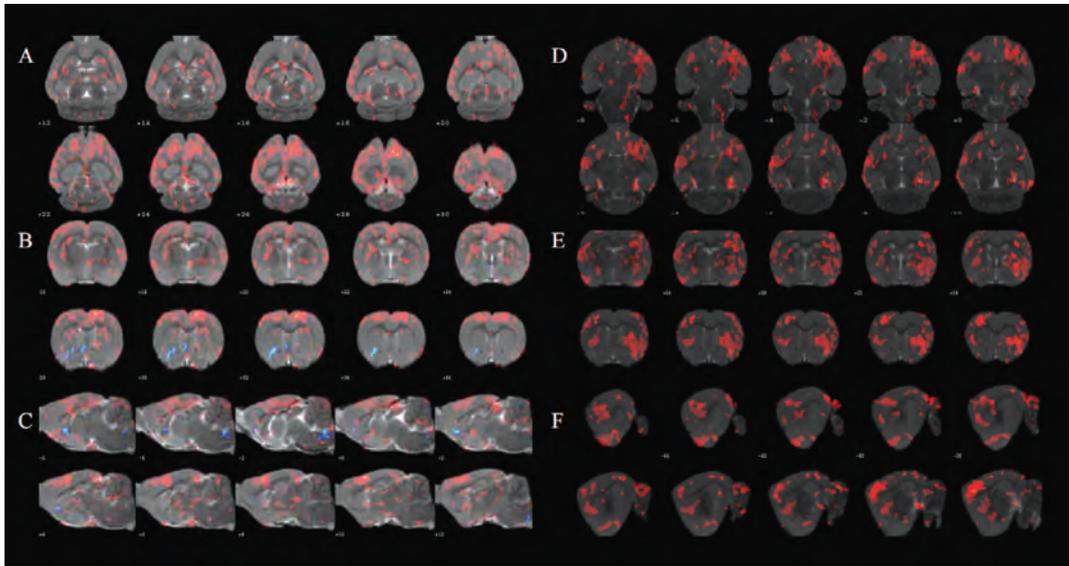
3.5.1.1 Wilson 病铜负荷大鼠模型脑区的异常激活 与空白组比较,模型组部分脑区的 fALFF 和 ReHo 水平发生显著改变,说明 Wilson 病铜负荷大鼠模型存在部分脑区功能活动的异常激活,异常激活的脑区主要包括感觉皮质、小脑

后叶、运动皮层、小脑前叶、纹状体、压部后皮层等。结果见图6、表1~2。

3.5.1.2 青霉素组回调脑区 与模型组比较,青霉素组部分脑区的 fALFF 和 ReHo 水平发生显著改变,说明排铜治疗能够改善部分脑区的功能活动。将模型组功能活动异常激活的脑区与青霉素组功能改善的脑区取交集,得到青霉素组的回调脑区为小脑后叶、小脑前叶、感觉皮质、海马等。结果见图7、表3~4。

3.5.1.3 不同剂量肝豆扶木汤组回调脑区 与模型组比较,不同剂量肝豆扶木汤组部分脑区的 fALFF 和 ReHo 水平发生显著改变,将模型组功能活动异常激活的脑区与不同剂量肝豆扶木汤组功能改善的脑区取交集,得到不同剂量肝豆扶木汤组的回调脑区。肝豆扶木汤低剂量组的回调脑区有纹状体、小脑后叶、绒球小结叶等;肝豆扶木汤中剂量组的回调脑区为小脑前叶、纹状体、小脑后叶等;肝豆扶木汤高剂

量组的回调脑区为纹状体、绒球小结叶、小脑后叶等。以肝豆扶木汤中剂量组为例，结果见图8、表5~表6。



注：A~C分别为fALFF轴位、冠状位、矢状位图；D~F分别为ReHo轴位、冠状位、矢状位图。

图6 空白组与模型组大鼠脑区功能活动变化图

表1 空白组与模型组功能活动变化统计表 (fALFF)

脑区		像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标		
				X	Y	Z
感觉皮层	左	1 221	14. 708	-4. 403	4. 714	-0. 838
	右	1 419	12. 467	4. 091	5. 451	3. 002
小脑后叶	左	833	14. 977	-4. 403	4. 555	-0. 838
	右	1 153	13. 938	3. 196	4. 626	0. 122
运动皮层	左	438	6. 685	-2. 288	3. 867	0. 122
	右	1 018	10. 340	1. 022	4. 791	-6. 598
小脑前叶	左	269	7. 751	-0. 699	3. 691	1. 562
	右	619	8. 127	2. 528	6. 081	-0. 358
纹状体	左	129	5. 709	-5. 847	7. 419	-2. 758
	右	556	9. 578	2. 673	5. 990	-0. 838
压部后皮层	右	415	10. 152	1. 791	4. 665	5. 402
视觉皮层	左	402	7. 432	-4. 462	4. 633	-6. 598
	右	313	5. 615	2. 985	4. 311	-4. 678
海马	左	206	6. 768	-5. 787	6. 050	-7. 078
	右	310	9. 467	4. 236	5. 343	2. 522
胼胝体	左	200	6. 061	-1. 321	5. 019	-2. 278
	右	304	7. 070	1. 581	5. 217	0. 602
丘脑外侧核群	左	478	9. 514	-3. 416	7. 445	-4. 678
	右	280	7. 433	3. 289	8. 002	-6. 598
中脑背盖	左	313	13. 020	-1. 011	8. 753	-4. 678
	右	348	11. 257	1. 541	7. 901	-6. 598
脑桥背盖	右	382	9. 834	0. 785	8. 534	0. 602

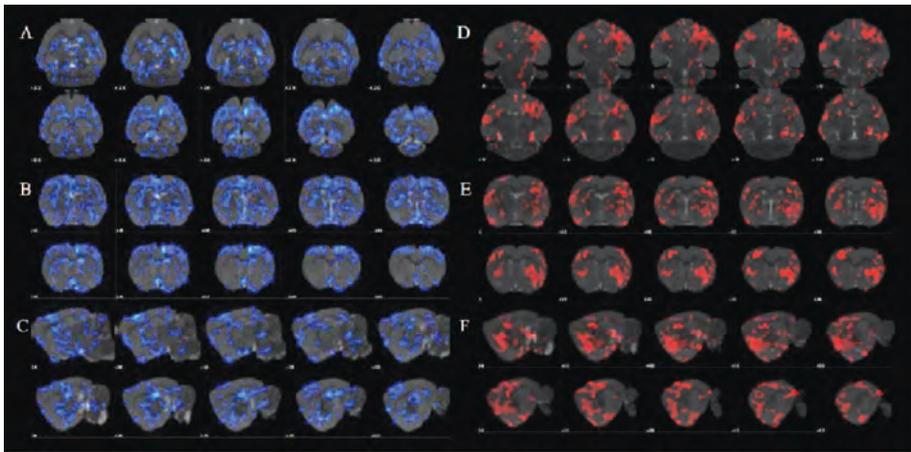
表2 空白组与模型组功能活动变化统计表 (ReHo)

脑区		像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标		
				X	Y	Z
感觉皮层	左	1 365	4. 845	-5. 581	3. 689	-3. 238
	右	2 464	9. 721	3. 972	5. 571	1. 562
小脑后叶	左	774	3. 943	-4. 031	5. 292	1. 082
	右	2 035	10. 153	3. 972	5. 412	1. 562
运动皮层	右	1 175	6. 551	2. 104	4. 879	1. 562
小脑前叶	左	105	3. 924	2. 633	5. 292	2. 042
	右	1 465	6. 007	2. 104	5. 021	1. 562
纹状体	左	148	3. 764	-4. 031	5. 434	1. 082
	右	1 549	5. 210	3. 601	6. 002	-0. 358
压部后皮层	右	352	4. 063	3. 959	5. 044	2. 522
视觉皮层	左	316	4. 112	-4. 328	3. 396	2. 522
	右	924	8. 099	3. 427	5. 089	-6. 598
海马	右	970	9. 213	5. 805	8. 846	-4. 678
胼胝体	右	743	8. 785	5. 926	8. 569	-4. 678
中脑下丘	右	449	4. 295	2. 348	5. 408	3. 962
中脑上丘	右	332	3. 766	2. 341	5. 365	4. 442
丘脑外侧核群	右	434	5. 492	1. 653	7. 598	-14. 758
	额叶	左	234	4. 441	-0. 354	4. 983
	右	375	5. 482	3. 831	7. 332	-7. 078
第三脑室	右	316	4. 720	5. 660	8. 512	-4. 198
绒球小结叶	右	363	4. 521	3. 462	7. 605	-0. 358
嗅皮质	左	207	4. 213	-6. 614	7. 971	-6. 118
	右	388	10. 159	5. 920	8. 527	-4. 198
齿状回	右	367	6. 782	3. 686	7. 140	-6. 598

### 3.5.2 基于FC的脑区功能连接分析

3.5.2.1 Wilson病铜负荷大鼠模型脑区功能连接及青霉胺干预后变化 根据本病颅脑特征性病理损伤表现<sup>[11]</sup>，本研究选择以基底节区作为种子区进行全脑功能连接分析。与空白组比较，模型组种子区与其他部分脑区的功能连接受损，说明铜负荷不但损伤脑区的功能活动，还会损伤脑区之间的功能连接。结果显示，青霉胺组能够调节种子区与下丘脑视前区、下丘脑结节区、下丘脑视上区、中脑背盖、

脑桥被盖部、延髓等脑区之间的功能连接，见图9、表7。  
3.5.2.2 不同剂量肝豆扶木汤组脑区功能连接分析 肝豆扶木汤低剂量组能够改善种子区与脑桥被盖部、下丘脑视前区、下丘脑结节区、海马、延髓等脑区之间的功能连接。肝豆扶木汤中剂量组种子区与脑桥被盖部、下丘脑视前区、下丘脑结节区、感觉皮质、延髓、小脑后叶等脑区之间的功能连接得到改善。肝豆扶木汤高剂量组可调节种子区与



注：A~C 分别为 fALFF 轴位、冠状位、矢状位图；D~F 分别为 ReHo 轴位、冠状位、矢状位图。

图 7 青霉胺组与模型组大鼠脑区功能活动变化图

表 3 青霉胺组与模型组回调脑区统计表 (fALFF)

脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
感觉皮质	右	42	6.281	5.912	7.633	-12.358
小脑后叶	左	26	4.875	-0.508	7.404	-12.358
海马	右	25	3.266	1.792	5.410	-4.678
小脑前叶	右	12	3.647	3.621	7.901	-11.878
纹状体	右	29	3.617	3.752	7.707	-11.398
隔区	左	23	6.105	-0.248	7.561	-12.358
嗅球	右	15	3.599	1.923	5.216	-4.198

表 5 肝豆扶木汤中剂量组与模型组回调脑区统计表 (fALFF)

脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
丘脑外侧核群	左	29	4.580	-2.620	9.104	-14.758
	右	15	6.395	1.904	8.895	-12.838
延髓	左	42	6.047	-2.336	9.304	-15.238
	右	33	7.220	2.042	8.762	-12.838
纹状体	左	10	4.877	-2.215	9.452	-15.238
	右	30	7.271	1.176	6.903	1.082
小脑前叶	左	43	9.702	-0.433	5.500	1.082
	右	77	6.989	0.765	6.353	2.042
内囊	左	17	4.551	-2.508	8.056	-12.838
	右	27	6.862	2.042	8.903	-12.838
小脑后叶	左	19	3.871	-2.633	7.709	-13.798
	右	35	4.476	4.295	5.604	-11.878
扣带回	左	40	9.383	-0.294	5.650	1.0821
	右	12	3.744	-0.156	5.658	1.0821
感觉皮质	右	64	6.017	4.295	5.445	-11.878
视觉皮质	右	77	5.283	4.904	4.633	-7.078
杏仁核	右	12	4.399	2.049	9.247	-13.318
终纹床核	右	20	6.164	1.897	8.853	-12.358
脑桥被盖	右	29	7.187	2.049	9.105	-13.318
胼胝体	右	32	8.435	0.758	6.168	2.522
第三脑室	右	18	5.270	0.910	6.562	1.562
绒球小结叶	左	25	4.052	-2.653	7.581	-12.358

表 4 青霉胺组与模型组回调脑区统计表 (ReHo)

脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
视觉皮质	左	838	7.408	-2.886	0.566	-4.198
	右	436	9.013	2.328	0.467	-4.678
感觉皮质	左	260	7.610	-3.857	0.383	-2.758
	右	218	5.567	7.249	4.672	-2.758
海马	左	224	9.452	-2.367	1.463	-4.198
	右	16	6.299	-2.090	1.338	-4.198
顶叶联合皮质	左	201	7.368	-3.031	0.215	-3.718
运动皮质	左	165	5.057	-1.765	1.476	1.082
压部后皮层	左	64	4.886	-1.396	0.637	-5.638
	右	130	8.575	1.124	0.581	-5.158
小脑前叶	右	115	4.652	1.739	2.876	-10.918
听皮质	右	102	4.715	7.256	4.714	-3.238
胼胝体	左	90	4.689	-2.354	1.407	-5.158
顶叶后区	左	53	3.697	-4.880	1.119	-5.158
小脑后叶	右	53	3.794	0.963	2.675	-12.358
松果体		33	4.579	-0.307	1.495	-8.038
扣带回	左	12	2.755	-1.851	1.526	-2.758

表 6 肝豆扶木汤中剂量组与模型组回调脑区统计表 (ReHo)

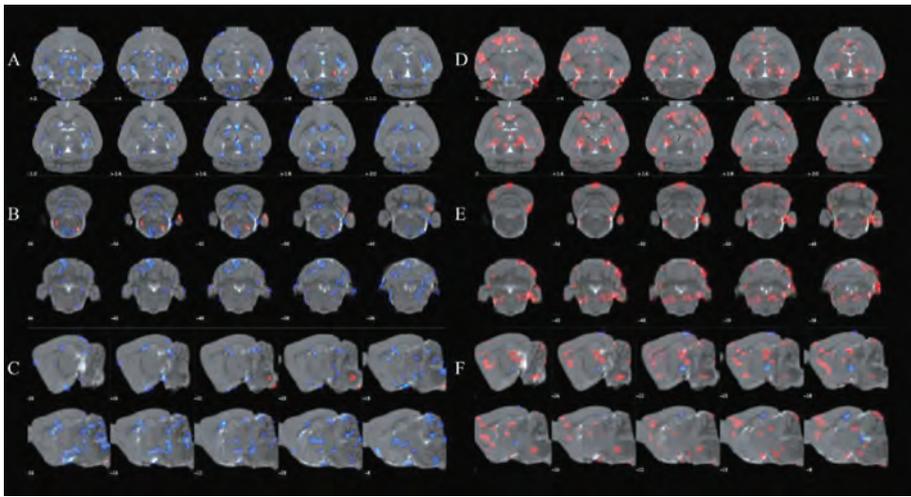
脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
齿状回	左	45	4.024	-3.018	2.495	-4.678
小脑前叶	右	95	4.474	1.075	3.096	-10.438
小脑后叶	右	27	3.203	2.719	5.865	-14.278
纹状体	左	50	4.024	-3.018	2.495	-4.678

纹状体、海马、小脑后叶、延髓、脑桥被盖部、感觉皮层等脑区之间的功能连接。以肝豆扶木汤中剂量组为例，结果见图 10、表 8。

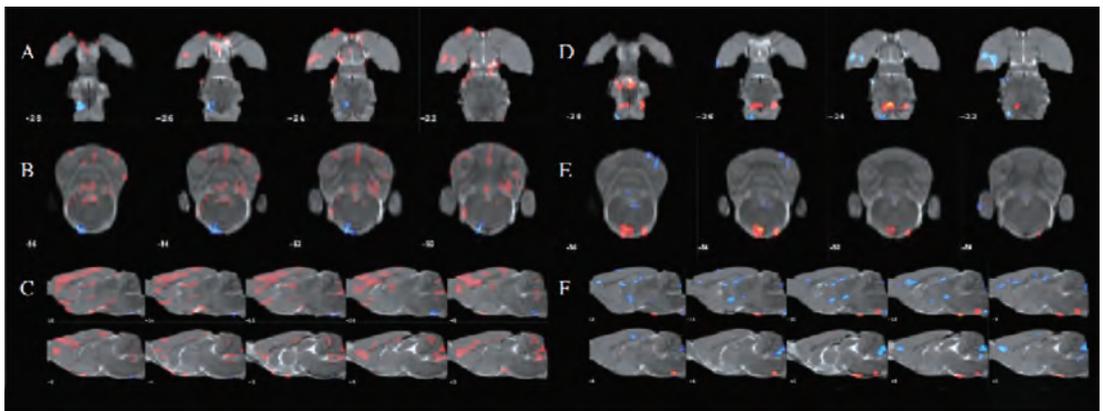
#### 4 讨论

rs-fMRI 是在静息状态下根据大脑不同区域血流和氧合作用的改变而获取大脑功能信息的成像方法<sup>[12]</sup>。近年来，rs-fMRI 逐渐应用于中医药研究领域<sup>[13-14]</sup>。利用 rs-fMRI 检

测发现，Wilson 病患者锥体外系核团功能受损，随着年龄增长，患者脑部核团的病理损伤及其自发活动和功能协调性损伤随之加重<sup>[15]</sup>。本课题组以往研究发现，胼胝体和皮质脊髓束的微观结构损伤与 Wilson 病患者神经系统症状存在相关，通过对各亚区进行功能连接和临床症状相关性分



注：A~C 分别为 fALFF 轴位、冠状位、矢状位图；D~F 分别为 ReHo 轴位、冠状位、矢状位图。  
图 8 肝豆扶木汤中剂量组与模型组大鼠脑区功能活动变化图



注：A~C 分别为空白组与模型组比较的 FC 轴位、冠状位、矢状位图；D~F 分别为青霉胺组与模型组比较的 FC 轴位、冠状位、矢状位图。  
图 9 空白组与模型组、青霉胺组与模型组大鼠脑区 FC 分析图

表 7 青霉胺组与模型组 FC 分析统计表

脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
下丘脑视前区	左	77	5.617	-0.363	9.649	-12.838
	右	51	5.170	2.042	9.788	-12.838
下丘脑结节区	左	29	4.892	-0.771	9.367	-13.318
	右	46	3.826	1.765	10.356	-12.838
中脑背盖 延髓	左	42	6.961	-1.343	10.023	-9.478
	左	22	4.020	-0.494	9.542	-13.318
脑桥被盖	右	43	5.517	1.904	10.223	-12.838
	左	162	7.503	-0.369	9.465	-12.358
视上区	右	73	4.888	1.897	10.180	-12.358
	左	73	5.503	-0.778	9.324	-12.838

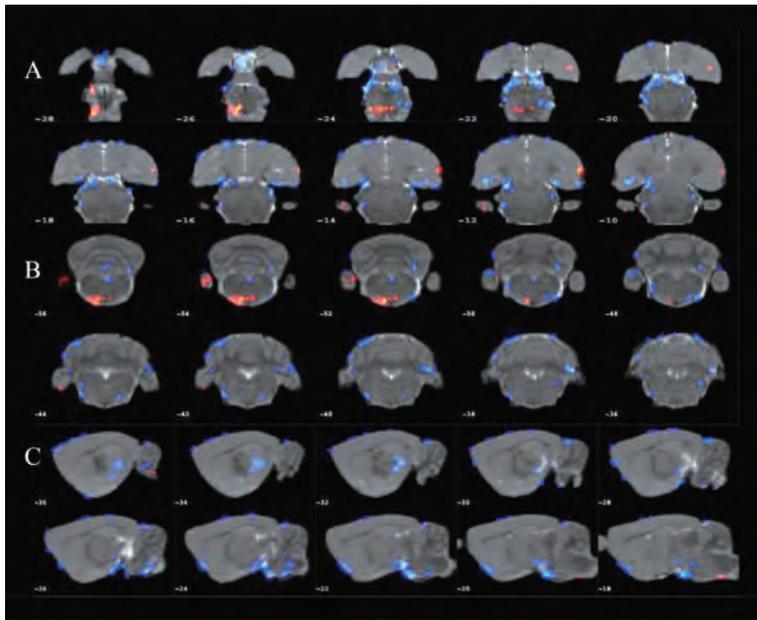
表 8 肝豆扶木汤中剂量组与模型组 FC 分析统计表

脑区	像素点 个数	T 值	Paxinos 坐标			
			X	Y	Z	
脑桥背盖	左	272	9.385	-0.784	9.724	-12.358
	右	23	4.907	0.565	9.519	-12.358
下丘脑视前区	左	163	8.917	-0.905	9.576	-12.358
	右	28	3.889	0.686	9.367	-12.358
下丘脑结节区	左	117	5.876	-1.429	9.913	-13.318
	左	117	4.181	-5.866	7.452	-11.398
感觉皮质 延髓	左	111	5.844	-1.297	9.737	-12.838
	右	97	7.106	6.588	7.355	-3.718
听皮质 视上区	左	62	6.179	-0.778	9.324	-12.838
	左	47	4.622	-4.660	6.580	-12.358
小脑后叶 嗅皮质	左	41	6.093	6.045	8.149	-3.238
	右	27	7.576	-1.771	9.914	-8.518
中脑背盖 杏仁核	左	27	3.868	5.111	8.679	-3.238
	右	21	3.086	-1.765	9.514	-8.998
嗅结节 绒球小结叶	左	21	3.754	-5.873	7.551	-10.918

析发现“皮质-纹状体-丘脑-皮质”环路受阻可能是 Wilson 病患者神经损伤的病理机制<sup>[16-18]</sup>。研究认为，不同疾病分型患者均存在程度不等的神经元活动性损伤，血清铜、尿铜等金属指标水平并不能准确反映脑部铜沉积的情况<sup>[19-20]</sup>。

Wilson 病患者存在广泛灰质和白质受损，与脑型 Wilson 病患者一致，肝型 Wilson 病患者脑部核团、核团纤维以及核团之间的联系纤维存在一定程度的结构性损伤，

脑部核团神经自发性及功能活动水平降低<sup>[20-21]</sup>。与以往研究结果相似<sup>[22-23]</sup>，本研究发现，Wilson 病核团负荷大鼠模型存在广泛脑区功能活动异常及损伤脑区之间功能连接的改



注：A~C 分别为肝豆扶木汤中剂量组与模型组比较的 FC 轴位、冠状位、矢状位图。

图 10 肝豆扶木汤中剂量组与模型组大鼠脑区 FC 分析图

变，异常脑区以感觉皮质、小脑后叶、运动皮质、小脑前叶、纹状体为著；青霉胺干预能够调节小脑后叶、小脑前叶、感觉皮质、海马等脑区的功能活动，改善种子区与下丘脑视前区、下丘脑结节区、下丘脑视上区、中脑背盖、脑桥被盖部、延髓等受损脑区之间的功能连接；肝豆扶木汤的回调脑区为纹状体、小脑后叶、绒球小结叶等，随着其应用剂量的增加，功能连接改善的受损脑区范围亦随之增多。提示肝豆扶木汤在逆转 Wilson 病铜负荷大鼠模型肝脏损伤的同时，协同排铜药物进一步改善不同脑区的神经功能活动。

早期基因 *c-fos* 是一种重要的转录因子，属于立即早期基因家族，能够在各种外界刺激下被迅速激活、表达，在细胞转录调控、神经功能活动及应激反应中发挥重要作用；正常情况下，*c-fos* 在中枢神经系统中处于低表达，当其在缺血缺氧等因素作用下，*c-fos* 迅速在脑组织中特异性表达以促进神经组织的修复<sup>[24-26]</sup>。本研究发现，Wilson 病铜负荷大鼠模型 *c-fos* 相对表达升高，青霉胺与肝豆扶木汤干预后其表达有所下降，提示 Wilson 病铜负荷大鼠模型存在广泛的脑组织损伤，保肝排铜治疗能够促进神经重塑及功能恢复；或许临床上联合神经保护药物治疗方案的启动能够在最大程度上保护神经细胞，降低中枢神经系统并发症发生，改善 Wilson 病患者的临床预后<sup>[27]</sup>。

本研究通过利用 rs-fMRI 成像技术探讨肝豆扶木汤对 Wilson 病铜负荷大鼠模型保护作用的中枢调控机制，研究表明 Wilson 病铜负荷大鼠模型存在广泛中枢神经系统受损，表现为脑区功能活动及不同受损脑区功能连接异常；肝豆扶木汤能够改善 Wilson 病铜负荷大鼠模型肝脏损伤、回调部分脑区功能异常活动；临床上针对肝型 Wilson 病患者及早启动神经保护药物治疗方案在一定程度上能够延缓疾病

进展、改善临床预后。未来本课题组将结合多组学研究技术对中医有效方药发挥作用的中枢神经机制进行深入研究，为临床诊断和治疗提供更多信息。

#### 参考文献：

- [1] Ana L V, Pilar R Z, Javier A. Wilson's disease: overview[J]. *Med Clin (Barc)*, 2023, 160(6): 261-267.
- [2] 陶 庄, 孙林娟, 王 飞, 等. 肝豆状核变性肝纤维化的中西医结合研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(18): 3380-3383.
- [3] Xu M B, Rong P Q, Jin T Y, et al. Chinese herbal medicine for Wilson's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 277.
- [4] 唐露露, 杨文明. 杨文明创肝豆扶木汤治疗肝豆状核变性肝纤维化经验[J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(10): 1878-1880.
- [5] 唐露露, 杨文明, 董 婷, 等. 肝豆扶木颗粒治疗肝肾亏虚兼痰瘀互结型 Wilson 病患者的临床疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12): 127-132.
- [6] 郝文杰, 杨文明, 魏涛华, 等. 基于生物信息学和细胞实验探讨肝豆扶木汤调控铁死亡治疗肝豆状核变性的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3461-3468.
- [7] 康 帅, 汪美霞, 陶 庄, 等. 基于网络药理学和临床研究探讨肝豆扶木颗粒调节肝豆状核变性肝纤维化的机制[J]. *中成药*, 2024, 46(9): 3099-3103.
- [8] 王 琼, 董 婷, 赵晨玲, 等. 肝豆扶木汤治疗肝肾亏虚型 Wilson 病患者的临床疗效及舌诊参数研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(6): 861-867.
- [9] 张艳云, 汪美霞, 杨文明, 等. 肝脏 FibroTouch 技术联合血清无创肝纤维化模型观察肝豆扶木汤对肝豆状核变性肝纤维化的临床疗效[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(4):

- 1868-1873.
- [10] Xu J, Jiang H, Li J, *et al.* <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics investigation of copper-laden rat: a model of Wilson's disease[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119654.
- [11] Grimm G, Prayer L, Oder W, *et al.* Comparison of functional and structural brain disturbances in Wilson's disease[J]. *Neurology*, 1991, 41(2): 272-276.
- [12] Yousaf T, Dervenoulas G, Politis M. Advances in MRI methodology[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2018, 141: 31-76.
- [13] Zhang G, Qu S, Zheng Y, *et al.* Key regions of the cerebral network are altered after electroacupuncture at the Baihui (GV20) and Yintang acupuncture points in healthy volunteers: an analysis based on resting fMRI[J]. *Acupunct Med*, 2013, 31(4): 383-388.
- [14] Liu J P, Li Y Y, Yang K Z, *et al.* Electroacupuncture and manual acupuncture at LR3 and ST36 have attenuating effects on hypertension and subsequent cognitive dysfunction in spontaneously hypertensive rats: a preliminary resting-state functional magnetic resonance imaging study[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1129688.
- [15] 周香雪, 李欣蓓, 初建平, 等. 肝豆状核变性患者锥体外系核团功能活动的静息态功能磁共振研究[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(9): 703-708.
- [16] Wang A, Dong T, Wei T, *et al.* Large-scale networks changes in Wilson's disease associated with neuropsychiatric impairments: a resting-state functional magnetic resonance imaging study[J]. *BMC Psychiatry*, 2023, 23(1): 805.
- [17] 袁年平, 王安琴, 武红利, 等. 基于功能磁共振成像的肝豆状核变性患者纹状体亚区损害及临床分析[J]. 同济大学学报(医学版), 2022, 43(2): 262-266.
- [18] Wang A, Wei T, Wu H, *et al.* Lesions in white matter in Wilson's disease and correlation with clinical characteristics[J]. *Can J Neurol Sci*, 2023, 50(5): 710-718.
- [19] Tao Z, Yang P, Zhou J, *et al.* Ideal serum non-ceruloplasmin bound copper prediction for long-term treated patients with Wilson disease: a nomogram model[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1275242.
- [20] 周香雪, 李润桦, 蒲小勇, 等. 肝、脑型肝豆状核变性患者影像学及金属代谢的对比分析[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(3): 176-181.
- [21] Lee J H, Yang T I, Cho M, *et al.* Widespread cerebral cortical mineralization in Wilson's disease detected by susceptibility-weighted imaging[J]. *J Neurol Sci*, 2012, 313(1): 54-56.
- [22] Yang Y, Wei T, Yang W, *et al.* Dysfunction of the lenticular nucleus is associated with dystonia in Wilson's disease[J]. *Brain Sci*, 2022, 13(1): 77.
- [23] 周香雪, 李润桦, 蒲小勇, 等. 肝、脑型肝豆状核变性患者影像学及金属代谢的对比分析[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(3): 176-181.
- [24] Fernando C M, Fernando J H, Adriana A D, *et al.* Immediate early gene c-fos in the brain: focus on glial cells[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(6): 687.
- [25] Katsuyasu S. Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain[J]. *J Biochem*, 2024, 175(4): 377-381.
- [26] Velazquez F N, Caputto B L, Boussin F D. c-Fos importance for brain development[J]. *Ageing (Albany NY)*, 2015, 7(12): 1028-1029.
- [27] 刘睿, 杨文明, 董文文, 等. 脑保护治疗在肝豆状核变性临床治疗中的地位[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(24): 3133-3136.