

益肺宣肺降浊方通过抑制线粒体分裂抗血管性痴呆的作用研究[△]

符钰岚^{1*}, 陈 炜², 卓桂锋¹, 朱小敏¹, 黄颖睿¹, 张金枝¹, 杨富才¹, 张 颖¹, 吴 林^{3#}(1. 广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530022; 2. 广西中医药大学第一附属医院脑病科一区, 南宁 530022; 3. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530200)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)15-1859-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.15.07



摘要 **目的** 探究益肺宣肺降浊方通过抑制线粒体分裂对血管性痴呆(VaD)大鼠的干预作用及其潜在机制。**方法** 采用双侧颈总动脉结扎法建立VaD大鼠模型。将实验动物随机分为假手术组(SHAM组)、模型组(MOD组)、益肺宣肺降浊方低剂量组、益肺宣肺降浊方高剂量组、盐酸多奈哌齐组(阳性对照), 每组9只。干预30 d后, 通过Morris水迷宫实验评估大鼠的学习及空间记忆能力; 苏木精-伊红染色观察海马CA1区组织病理学变化; 酶联免疫吸附试验法检测血清中炎症因子[白细胞介素(IL)-1 β 、IL-4]水平; Western blot法检测海马组织中热休克蛋白90(HSP90)/混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)/动力相关蛋白1(Drp1)信号通路相关蛋白、线粒体融合蛋白(MFN1、MFN2)及三磷酸腺苷合成酶5A(ATP5A)的蛋白表达; 免疫组化检测磷酸化MLKL(p-MLKL)水平; 实时荧光定量PCR检测HSP90、MFN1、MFN2、ATP5A的mRNA表达。**结果** 与SHAM组比较, MOD组大鼠逃避潜伏期显著延长, 穿越平台次数显著减少, 海马组织呈现典型神经元损伤特征, p-MLKL阳性表达量及血清中IL-1 β 水平均显著升高, 血清中IL-4水平显著降低, 海马组织中HSP90蛋白及mRNA、p-MLKL/MLKL及p-Drp1(Ser616)/Drp1蛋白表达水平均显著上调, MFN1、MFN2、ATP5A蛋白及mRNA和p-Drp1(Ser637)/Drp1蛋白表达水平均显著下调($P < 0.05$)。经益肺宣肺降浊方干预后, 各给药组上述指标水平均显著逆转($P < 0.05$)。**结论** 益肺宣肺降浊方可能通过调控HSP90/MLKL/Drp1信号通路, 抑制线粒体分裂, 进而维持线粒体动力学平衡, 改善线粒体功能, 从而起到减轻VaD大鼠的神经元损伤和神经炎症反应的作用。

关键词 血管性痴呆; 益肺宣肺降浊方; 线粒体分裂; HSP90/MLKL/Drp1信号通路

Anti-vascular dementia effect of Yifei xuanfei jiangzhuo formula by inhibiting mitochondrial fission

FU Yulan¹, CHEN Wei², ZHUO Guifeng¹, ZHU Xiaomin¹, HUANG Yingrui¹, ZHANG Jinzhi¹, YANG Fucai¹, ZHANG Ying¹, WU Lin³ (1. The First Clinical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 2. Dept. of Encephalopathy, Zone 1, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 3. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the intervention effect and its potential mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula by inhibiting mitochondrial fission in a vascular dementia (VaD) model rats. **METHODS** VaD rat model was established by bilateral common carotid artery ligation. The experimental animals were randomly divided into sham operation group (SHAM), model group (MOD), Yifei xuanfei jiangzhuo formula low-dose group (YFXF-L), Yifei xuanfei jiangzhuo formula high-dose group (YFXF-H), and Donepezil hydrochloride group (positive control), with 9 animals in each group. After 30 days of intervention, the spatial learning memory ability was assessed by Morris water maze experiment; HE staining was used to observe histopathological changes in CA1 area of hippocampus; ELISA was used to detect the levels of serum inflammatory factors [interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-4]; Western blot was used to detect the expressions of heat shock protein 90 (HSP90)/mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)/dynamain-related protein 1 (Drp1) pathway-related proteins, mitochondrial fusion proteins (MFN1, MFN2), and adenosine triphosphate synthase 5A (ATP5A) in hippocampal tissues. The immunohistochemistry was used to detect the level of phosphorylated MLKL (p-MLKL); real-time fluorescence quantitative PCR was adopted to detect mRNA expressions of HSP90, MFN1, MFN2 and ATP5A. **RESULTS** Compared with SHAM group, the escape latency of rats in the MOD

[△] 基金项目 国家自然科学基金项目(No. 82374387, No. 82160885); 广西自然科学基金项目(No. 2024JJA141356); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(No. 桂中医大党[2024]3号)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中医药防治脑系疾病。

E-mail: 2272292743@qq.com

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

group was significantly prolonged, the number of crossing the platform was significantly reduced, and the hippocampal tissues showed typical neuronal damage characteristics, the positive expression level of p-MLKL and the serum level of IL-1 β significantly increased, while the serum level of IL-4 significantly decreased, the protein and mRNA expression of HSP90, as well as the protein expressions of p-MLKL/MLKL and p-Drp1(Ser616)/Drp1 were all significantly increased in hippocampal tissue, the protein and mRNA expressions of MFN1, MFN2 and ATP5A, and protein expression of p-Drp1(Ser637)/Drp1 were all significantly decreased ($P<0.05$). After the intervention of Yifei xuanfei jiangzhuo formula, above indicators in each treatment group were all significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Yifei xuanfei jiangzhuo formula may alleviate neuronal damage and neuroinflammatory responses in VaD rats by regulating the HSP90/MLKL/Drp1 signaling pathway, inhibiting mitochondrial fission, thereby maintaining mitochondrial dynamic balance and improving mitochondrial function.

KEYWORDS vascular dementia; Yifei xuanfei jiangzhuo formula; mitochondrial fission; HSP90/MLKL/Drp1 signaling pathway

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是由脑血管疾病引发的认知功能障碍综合征,以认知缺陷、定向力障碍、日常生活能力下降及血管损伤为主要特征^[1]。2020年统计数据显示,我国60岁及以上人群中约有1 507万痴呆症患者,其中VaD患者约392万^[2]。VaD的病理机制涉及神经炎症、氧化应激、线粒体功能障碍及神经元损伤等多种因素,其中线粒体动力学是当前研究的热点^[3]。

线粒体动力学,即线粒体融合与分裂的动态平衡,对维持线粒体功能至关重要,其异常与多种神经系统疾病的发生发展密切相关^[3]。磷酸甘油酸变位酶5(phosphoglycerate mutase 5, PGAM5)是一种线粒体膜蛋白磷酸酶,参与线粒体分裂、细胞死亡及代谢调控^[4]。动力相关蛋白1(dynammin-related protein 1, Drp1)是线粒体分裂的主要调节因子,其过度激活导致线粒体过度分裂,引发细胞凋亡^[3]。可见,PGAM5/Drp1信号通路可能参与调控线粒体动力学系统,但其上游机制尚不明确。热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)是一种三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)依赖的分子伴侣,参与蛋白折叠、细胞内稳态维持及信号转导等过程。研究表明,在应激条件下,HSP90的分泌会增加,从而促进活性氧和活性氮释放,加剧炎症反应^[5]。混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)是坏死性凋亡中的关键效应分子,其激活依赖HSP90的调控^[6]。HSP90与MLKL的结合对维持MLKL的稳定性至关重要,抑制HSP90可降低MLKL磷酸化水平,减少其寡聚化和质膜易位,从而抑制坏死性凋亡和炎症反应^[7]。研究表明,MLKL与PGAM5形成的分子级联反应可招募Drp1至线粒体,促进其易位并通过去磷酸化激活Drp1的鸟苷三磷酸酶活性,最终导致线粒体断裂和细胞坏死^[8-9]。因此,HSP90/MLKL可能为PGAM5/Drp1信号通路的潜在上游,抑制HSP90/MLKL/Drp1信号通路可能对调控线粒体分裂、改善线粒体动力学具有重要意义。

益肺宣肺降浊方由黄芪、人参、麦冬、三七、苏子、石菖蒲、桔梗、苦杏仁、酒大黄9味中药组成。方中人参、黄芪相须为用,补益肺气以充养五脏;麦冬、桔梗、苦杏仁、苏子宣通肺气,消痰降浊;石菖蒲化湿豁痰益智,三七活血化瘀,酒大黄通腑降浊。诸药相合,既可益肺宣肺补本,又能通络祛痰、通腑降浊除标。该方主要活性成分包括人参皂苷等^[10]。研究表明,人参皂苷能够通过抑制HSP90的释放降低血脑屏障通透性并减轻神经炎症^[11]。本课题组前期研究表明,益肺宣肺降浊方能够提高VaD大鼠海马组织中线粒体复合物活性及ATP含量,同时降低炎症因子水平^[12-13],但其具体作用机制仍有待阐明。本研究主要探讨益肺宣肺降浊方通过调控HSP90/MLKL/Drp1信号通路对线粒体动力学的干预机制,以期作为VaD的中医治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括XR-XM101型Morris水迷宫仪器(上海欣软信息科技有限公司),CFX96型实时荧光定量PCR(qPCR)仪(美国Bio-Rad公司),BX43型光学显微镜、UC90型显微成像系统(日本Olympus公司),DYY-4C型电泳仪、DYY-12型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

益肺宣肺降浊方(饮片组成:黄芪15 g,人参15 g,麦冬15 g,桔梗10 g,苦杏仁10 g,三七15 g,苏子15 g,石菖蒲15 g,酒大黄6 g)由广西中医药大学第一附属医院提供,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(国药准字H20050978,规格5 mg/片,批号2203026)购自卫材(中国)药业有限公司;苏木精(批号BA-4041)、伊红(批号BA-4024)染色剂均购自珠海贝索生物技术有限公司;RIPA组织裂解液(货号R0020)购自北京索莱宝科技有限公司;Trizol、氯仿、异丙醇及无水乙醇均购自天津市永大化学试剂有限公司;白细胞介

素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(货号MM-0047R1)和IL-4(货号MM-0191R1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司;HSP90抗体(货号#4877,兔抗)购自美国CST公司;MLKL抗体(批号A21894,兔抗)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;磷酸化(phosphorylated, p)-MLKL抗体(货号ET1705-51,兔抗)购自杭州华安生物技术有限公司;Drp1抗体(货号12957-1-AP,兔抗)、ATP合成酶5A(ATP synthase 5A, ATP5A)抗体(货号66037-1-Ig,兔抗)、线粒体融合蛋白(mitochondrial fusion protein, MFN)1抗体(货号66776-1-Ig,鼠抗)、MFN2抗体(货号67487-1-Ig,鼠抗)、GAPDH抗体(货号60004-1-Ig,鼠抗)以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(货号SA00001-2)和山羊抗鼠二抗(货号SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;p-Drp1抗体(磷酸化位点Ser637,货号BD-PP0841,兔抗)、p-Drp1抗体(磷酸化位点Ser616,货号BD-PP1318,兔抗)均购自苏州博奥龙科技有限公司;qPCR试剂盒(货号Q712)、RNA提取试剂(货号R701-01)、逆转录试剂盒(货号R123-01)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。实验所需PCR引物均由南宁捷尼斯生物科技股份有限公司完成设计与合成。

1.3 实验动物

SPF级SD雄性大鼠45只,7周龄,体重(280 \pm 20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004]。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(使用许可证号为SYXK桂2024-0004),在恒温(24 \pm 1) $^{\circ}$ C、12 h光/暗循环条件下饲养。实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会审批通过(伦理批号DW20220212-062-08),所有操作均严格遵循实验动物福利伦理规范。

2 方法

2.1 药液的制备

中药药液:称取黄芪、人参、麦冬、三七、苏子、石菖蒲各15 g,桔梗、苦杏仁各10 g,酒大黄6 g,置于烧瓶中,加水2 000 mL,煎煮2 h \times 3次;过滤,合并3次滤液,于45 $^{\circ}$ C水浴中减压浓缩至1.218 g/mL(以生药量计),于4 $^{\circ}$ C下保存备用。阳性对照溶液:取盐酸多奈哌齐片,研磨,溶于110 mL蒸馏水中,制成质量浓度为0.045 mg/mL的阳性对照溶液。

2.2 造模、分组与给药

采用双侧颈总动脉结扎法建立VaD大鼠模型。将大鼠随机分为假手术组(SHAM组, $n=9$)和手术组($n=36$)。手术组大鼠经异氟烷麻醉后,行颈部正中切口,分离并结扎双侧颈总动脉进行造模;SHAM组大鼠仅进行

血管分离操作。造模后第3天,进行Morris水迷宫行为学测评,以SHAM组大鼠逃避潜伏期为参考值,计算两组大鼠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^[4]。将造模成功的大鼠随机分为模型组(MOD组)、益肺宣肺降浊方低剂量组[YFXF-L组,给药剂量为12.18 g/(kg \cdot d)]、益肺宣肺降浊方高剂量组[YFXF-H组,给药剂量为24.36 g/(kg \cdot d)]、盐酸多奈哌齐组[DH组,给药剂量为0.2 g/(kg \cdot d),阳性对照],每组9只。药物持续干预30 d,其中MOD组和SHAM组大鼠给予等体积生理盐水[10 mL/(kg \cdot d)]。给药剂量依据60 kg成人的临床等效剂量换算确定。

2.3 Morris水迷宫实验

药物干预结束后,运用Morris水迷宫实验评估所有大鼠的学习及空间记忆能力。每只大鼠连续进行5 d Morris水迷宫实验。将水迷宫划分为4个象限,平台置于第2象限,注水没过平台约3 cm。前4 d进行定位航行实验,分别将大鼠从4个象限放入,大鼠找到平台则停止实验,记录大鼠的逃避潜伏期;若大鼠60 s内未找到平台,则引导它们至平台并停留1 min后取出。实验第5天实施空间探索测试,采集第5天的实验数据,移除平台后记录各组大鼠60 s内穿越平台次数。

2.4 标本制备

Morris水迷宫实验测试完成后,大鼠经20%乌拉坦麻醉后,腹主动脉取血,以3 000 r/min离心15 min,取上清液,于-80 $^{\circ}$ C储存,备用。取血后处死大鼠。随机选取各组6只大鼠,分离其大脑海马组织,置于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中保存,用于Western blot及qPCR检测。另取各组3只大鼠,经心脏灌注固定后取海马组织,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,保存于4 $^{\circ}$ C,用于苏木精-伊红(HE)染色及免疫组化分析。

2.5 大脑海马CA1区组织病理学观察

采用HE染色。取“2.4”项下制备的石蜡组织块,切片(5 μ m),切片于苏木精-伊红染液染3 min,用自来水洗涤,分化液分化10 s,再用自来水洗涤。经无水乙醇水化、二甲苯脱蜡、中性树胶封片后,于光学显微镜下观察并采集大脑海马CA1区组织病理学图像。

2.6 海马组织中p-MLKL表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.5”项下大鼠脑组织切片,经烘干、二甲苯脱蜡、乙醇洗脱、抗原修复、封闭后,加入p-MLKL一抗(稀释比例为1:50)及对应二抗孵育。显影阶段采用DAB显色试剂避光反应,苏木精复染细胞核,经氨水返蓝处理后用中性树胶封固,最后通过数字病理扫描系统采集图像,观察DAB显色强度并定量分析。

2.7 海马组织中 HSP90/MLKL/Drp1 信号通路相关蛋白表达的检测

采用 Western blot 法检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的大脑海马组织,经低温匀浆后,采用 RIPA 裂解液提取蛋白,离心,取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度并进行加热变性处理。取变性蛋白 10 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再转移到 PVDF 膜上,并在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h;加入相应一抗[稀释比例依次为抗 GAPDH 1:7 000,抗 HSP90 1:1 000、抗 p-MLKL 1:1 000,抗 MLKL 1:500,抗 p-Drp1 (Ser637) 1:500,抗 p-Drp1 (Ser616) 1:500,抗 Drp1 1:2 000,抗 ATP5A 1:5 000,抗 MFN1 1:4 000,抗 MFN2 1:6 000],于 4 °C 孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例均为 1:7 000),室温孵育 2 h;经 TBST 缓冲液洗涤后,采用化学发光法显影后进行蛋白条带成像,并通过 Image J 软件对条带灰度值进行定量分析。以 HSP90、ATP5A、MFN1、MFN2 与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平,以 p-MLKL 与 MLKL、p-Drp1 (Ser637) 与 Drp1、p-Drp1 (Ser616) 与 Drp1 条带灰度值的比值表示 MLKL、Drp1 (Ser637)、Drp1 (Ser616) 蛋白的磷酸化水平。

2.8 海马组织中 HSP90、MFN1、MFN2、ATP5A mRNA 表达的检测

采用 qPCR 法检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的海马组织适量,以 Trizol 通用试剂裂解,以异丙醇沉淀氯仿,加入 75% 乙醇纯化得到总 RNA,分析纯度与浓度后,将总 RNA 逆转录合成 cDNA 并进行 PCR 扩增。PCR 体系包括:cDNA 模板 1 μL,SYBR Green Master Mix 5 μL,正、反向引物各 0.4 μL,加无核酸酶水至 20 μL。PCR 扩增条件如下:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因 mRNA 的相对表达量,结果以 SHAM 组为参照进行归一化处理。PCR 引物序列及产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	正向:GACATGCCGCTGGAGAAC	138
	反向:AGCCAGGATGCCCTTAGT	
HSP90	正向:CAATTCATCGAGCTCTGG	109
	反向:TCCACAATGGTCAGGGTTCG	
MFN1	正向:GTGGAGATACAGGCTACAGAAC	116
	反向:ACAGCATTGCGTTGATGACAGA	
MFN2	正向:CACCGTCAAGAAGGATAAGCG	103
	反向:CAGTTCGTATTCTGTGGTGC	
ATP5A	正向:GCTATTGGTCAGAAACGGTCC	97
	反向:CAGCCTGCTGGATAAGTCGT	

2.9 血清中炎症因子水平检测

取“2.4”项下血清样品,室温融化,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测血清中 IL-1β、IL-4 水平。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 益肺宣肺降浊方对 VaD 大鼠学习及空间记忆能力的影响

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

表 2 各组大鼠逃潜伏期及穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
SHAM 组	13.53 ± 3.98	6.11 ± 1.53
MOD 组	45.76 ± 5.78 ^a	1.66 ± 1.22 ^a
YFXF-L 组	36.38 ± 4.50 ^a	3.44 ± 0.88 ^a
YFXF-H 组	26.52 ± 2.76 ^a	4.77 ± 1.09 ^a
DH 组	24.25 ± 1.84 ^a	5.00 ± 1.00 ^a

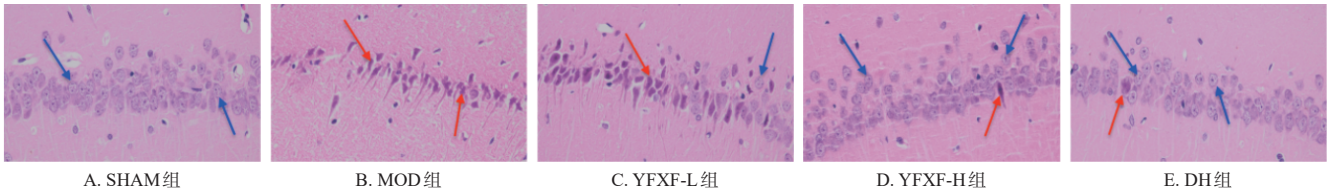
a:与 SHAM 组比较, $P<0.05$;b:与 MOD 组比较, $P<0.05$ 。

3.2 益肺宣肺降浊方对 VaD 大鼠海马 CA1 区组织病理学变化的影响

SHAM 组大鼠海马结构整齐,CA1 区锥体细胞层排列规整,细胞核形态正常。与 SHAM 组比较,MOD 组大鼠海马组织损伤明显,CA1 区锥体细胞结构排列紊乱,细胞大量坏死,染色不均,细胞间隙较大;大量神经元凋亡、固缩、深染。与 MOD 组比较,各给药组大鼠海马组织损伤均有改善,且呈现一定的量效关系,其中 YFXF-L 组大鼠海马 CA1 区组织损伤程度较 MOD 组有所改善,表现为细胞间隙缩小,但仍可见大量神经元固缩、深染,部分锥体细胞排列相对整齐,细胞核形态正常,染色均匀;YFXF-H 组和 DH 组大鼠海马组织损伤明显减轻,CA1 区锥体细胞排列较为整齐,细胞核形态完整,仅见少量神经元固缩、深染,且两组改善效果相当。结果见图 1。

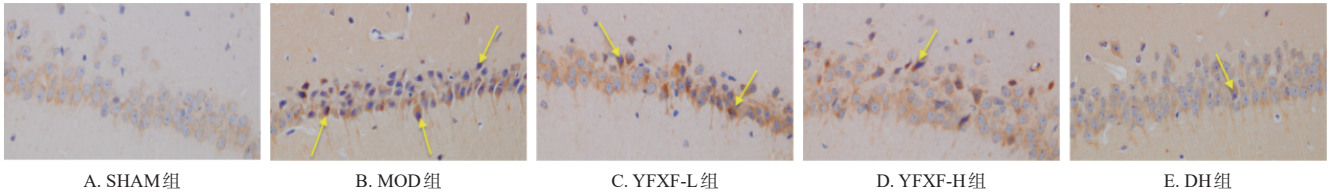
3.3 益肺宣肺降浊方对 VaD 大鼠海马组织中 p-MLKL 阳性表达量的影响

与 SHAM 组比较,MOD 组大鼠海马组织中 p-MLKL 的阳性表达量显著升高($P<0.05$);与 MOD 组比较,各给药组大鼠海马组织中 p-MLKL 的阳性表达量均显著降低($P<0.05$)。结果见图 2、表 3。



蓝色箭头:正常细胞形态;红色箭头:异常细胞形态。

图1 各组大鼠海马CA1区组织HE染色显微图(×400)



黄色箭头:p-MLKL阳性表达细胞。

图2 各组大鼠海马组织中p-MLKL阳性表达免疫组化显微图(×400)

表3 各组大鼠海马组织中p-MLKL阳性表达量和血清中IL-1 β 、IL-4水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	p-MLKL阳性表达量(n=3)	IL-1 β (n=9)/(pg/mL)	IL-4(n=9)/(pg/mL)
SHAM组	0.0009 \pm 0.0000	37.18 \pm 1.38	89.91 \pm 3.48
MOD组	0.0099 \pm 0.0005 ^a	87.91 \pm 1.43 ^a	33.30 \pm 1.61 ^a
YFXF-L组	0.0072 \pm 0.0003 ^b	62.04 \pm 1.47 ^b	57.94 \pm 1.19 ^b
YFXF-H组	0.0060 \pm 0.0002 ^b	44.83 \pm 1.70 ^b	71.64 \pm 1.54 ^b
DH组	0.0048 \pm 0.0004 ^b	43.84 \pm 1.27 ^b	74.05 \pm 1.03 ^b

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

3.4 益肺宣肺降浊方对VaD大鼠血清中IL-1 β 、IL-4水平的影响

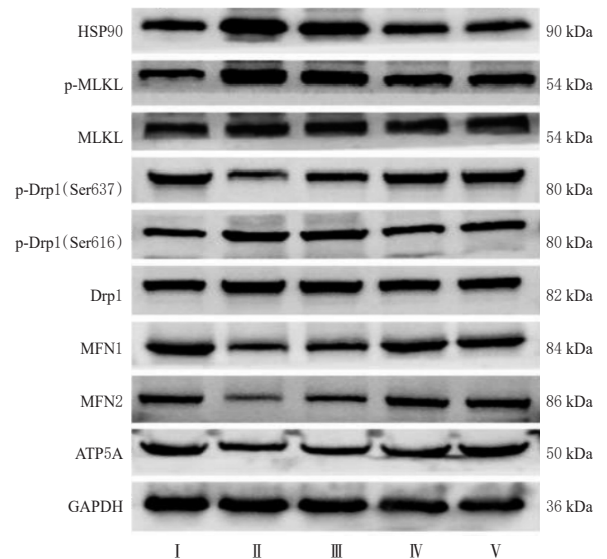
与SHAM组比较,MOD组大鼠血清中IL-1 β 水平显著升高,IL-4水平显著降低($P < 0.05$);与MOD组比较,各给药组大鼠血清中IL-1 β 水平均显著降低,IL-4水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表3。

3.5 益肺宣肺降浊方对VaD大鼠海马组织中HSP90/MLKL/Drp1信号通路相关蛋白表达的影响

与SHAM组比较,MOD组大鼠海马组织中HSP90、p-MLKL/MLKL、p-Drp1(Ser616)/Drp1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),p-Drp1(Ser637)/Drp1、MFN1、MFN2、ATP5A蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$);与MOD组比较,各给药组大鼠海马组织中HSP90、p-MLKL/MLKL、p-Drp1(Ser616)/Drp1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),p-Drp1(Ser637)/Drp1、MFN1、MFN2、ATP5A蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图3、表4。

3.6 益肺宣肺降浊方对大鼠海马组织中HSP90、MFN1、MFN2、ATP5A mRNA表达的影响

与SHAM组比较,MOD组大鼠海马组织中HSP90 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$),MFN1、MFN2、



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

图3 各组大鼠海马组织中HSP90/MLKL/Drp1信号通路相关蛋白表达电泳图

表4 各组大鼠海马组织中HSP90/MLKL/Drp1信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HSP90/ GAPDH	p-MLKL/ MLKL	p-Drp1(Ser637)/ Drp1	p-Drp1(Ser616)/ Drp1	MFN1/ GAPDH	MFN2/ GAPDH	ATP5A/ GAPDH
SHAM组	0.59 \pm 0.05	0.60 \pm 0.04	1.12 \pm 0.12	0.90 \pm 0.03	0.82 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	0.64 \pm 0.02
MOD组	0.93 \pm 0.04 ^a	0.92 \pm 0.04 ^a	0.64 \pm 0.03 ^a	1.21 \pm 0.06 ^a	0.49 \pm 0.03 ^a	0.28 \pm 0.02 ^a	0.47 \pm 0.02 ^a
YFXF-L组	0.84 \pm 0.06 ^b	0.76 \pm 0.03 ^b	0.78 \pm 0.07 ^b	1.08 \pm 0.03 ^b	0.62 \pm 0.03 ^b	0.39 \pm 0.03 ^b	0.52 \pm 0.01 ^b
YFXF-H组	0.67 \pm 0.03 ^b	0.71 \pm 0.05 ^b	1.00 \pm 0.06 ^b	0.90 \pm 0.04 ^b	0.77 \pm 0.03 ^b	0.50 \pm 0.04 ^b	0.60 \pm 0.03 ^b
DH组	0.68 \pm 0.04 ^b	0.65 \pm 0.05 ^b	1.02 \pm 0.04 ^b	1.06 \pm 0.06 ^b	0.79 \pm 0.02 ^b	0.51 \pm 0.03 ^b	0.61 \pm 0.06 ^b

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

ATP5A mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$);与MOD组比较,各给药组大鼠海马组织中HSP90 mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$),MFN1、MFN2、ATP5A mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表5。

表5 各组大鼠海马组织中HSP90、MFN1、MFN2、ATP5A mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HSP90	MFN1	MFN2	ATP5A
SHAM组	1.00±0.07	1.00±0.03	1.00±0.04	1.00±0.08
MOD组	3.56±0.27 ^a	0.20±0.01 ^a	0.18±0.03 ^a	0.24±0.03 ^a
YFXF-L组	2.28±0.06 ^b	0.46±0.02 ^b	0.52±0.06 ^b	0.45±0.04 ^b
YFXF-H组	1.55±0.12 ^b	0.79±0.04 ^b	0.80±0.08 ^b	0.74±0.05 ^b
DH组	1.51±0.04 ^b	0.82±0.05 ^b	0.82±0.08 ^b	0.80±0.10 ^b

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

4 讨论

研究表明, VaD的病理机制与脑组织持续性低灌注导致的代谢紊乱密切相关^[1]。线粒体在神经炎症调控中起关键作用, 胶质细胞活化释放的炎症因子又加剧线粒体氧化应激, 促进线粒体DNA释放并激活炎症小体^[15]。上述病理过程相互促进, 共同推动VaD的发生发展。

本课题组前期研究表明, 益肺宣肺降浊方通过改善海马神经元损伤、减轻神经炎症, 进而发挥改善VaD的作用^[14]。本研究行为学实验结果显示, 与SHAM组比较, MOD组大鼠逃避潜伏期显著延长, 穿越平台次数显著减少, 而益肺宣肺降浊方干预后上述指标显著改善, 提示其可改善VaD大鼠的学习及空间记忆功能。组织病理学结果显示, MOD组大鼠海马神经元排列紊乱, 细胞间隙增宽, 核固缩明显; 益肺宣肺降浊方干预后细胞损伤减轻, 结构趋于致密。ELISA结果显示, MOD组大鼠促炎因子IL-1 β 水平显著升高, 抗炎因子IL-4水平显著降低, 而益肺宣肺降浊方干预后IL-1 β 、IL-4水平均显著逆转。

线粒体功能障碍在VaD的发病机制中占据核心地位, 其中线粒体动力学失调在VaD中的具体作用机制备受关注。研究表明, PGAM5通过调控线粒体动力学参与细胞衰老和坏死过程。在严重受损的线粒体中, PGAM5介导的线粒体过度分裂会导致线粒体功能障碍, 进而引发细胞死亡^[16]。在病理条件下, 活化的MLKL形成寡聚体并转位至质膜, 进而激活下游效应蛋白PGAM5; PGAM5通过使Drp1去磷酸化, 促进Drp1向线粒体募集, 从而激活线粒体裂变, 导致线粒体碎片化增加, 最终引发线粒体功能障碍^[9]。以上研究表明, MLKL/PGAM5/Drp1信号通路是调控线粒体分裂、影响线粒体动力学、维持线粒体功能与结构完整的关键途径。

HSP90作为ATP依赖性分子伴侣, 通过介导钙调磷酸酶依赖的Drp1磷酸化过程, 促进Drp1向线粒体转移, 进而调控线粒体分裂^[17]。研究表明, 抑制HSP90可促进错误折叠蛋白的降解, 从而改善记忆障碍并恢复突触功能^[18]。本研究结果显示, 益肺宣肺降浊方干预可显著下调HSP90蛋白的表达。MLKL是HSP90的直接作用靶点, HSP90通过作用于MLKL的末端, 调控其寡聚化和

膜转位过程, 抑制HSP90可显著降低内源性MLKL蛋白水平, 逆转线粒体裂变并调节Drp1的磷酸化^[19]。Drp1 Ser637位点磷酸化被认为是神经系统疾病和神经退行性疾病发展的关键因素^[20]; Ser616位点磷酸化被认为是促进线粒体分裂的激活步骤, 促进Drp1在线粒体外膜的定位; Ser637位点磷酸化则被钙依赖性磷酸酶调控导致其去磷酸化, 从而减少线粒体分裂^[21]。本研究结果显示, 益肺宣肺降浊方干预可显著下调p-MLKL、p-Drp1 (Ser616)的表达; 值得注意的是, 经益肺宣肺降浊方干预后p-Drp1 (Ser637)以及MFN1、MFN2的表达均上调。在脑缺血/再灌注损伤模型大鼠的海马组织中, HSP90和MLKL的表达显著升高, 并伴随细胞凋亡和神经炎症反应^[22]。此外, 线粒体分裂与融合的平衡至关重要, 线粒体过度分裂会抑制融合。MFNs代表完整的线粒体蛋白, MFN1和MFN2是线粒体外膜的关键融合蛋白, 作为MFNs的亚型, 其GTP结合域对融合至关重要, 缺失任一蛋白, 均会抑制融合^[3]。Saita等^[23]研究发现, Drp1水平过高会导致MFNs水平下降。上述结果表明, HSP90/MLKL/Drp1信号通路可通过调控线粒体分裂参与VaD发展过程, 抑制该通路可有效改善线粒体功能, 减轻VaD大鼠神经元损伤和炎症反应。

本研究结果还显示, 益肺宣肺降浊方可显著提高ATP5A蛋白及mRNA表达, 表明益肺宣肺降浊方可能通过调控神经炎症, 提高VaD大鼠海马组织中线粒体复合物活性。此外, 本研究结果显示, 与MOD组比较, 经益肺宣肺降浊方干预后, 各给药组大鼠HSP90/MLKL/Drp1信号通路相关指标水平均逆转, 表明益肺宣肺降浊方可能通过调控该通路, 维持线粒体动力学平衡, 从而发挥其神经保护作用。

综上所述, 益肺宣肺降浊方可能通过调控HSP90/MLKL/Drp1信号通路, 抑制线粒体分裂, 进而维持线粒体动力学平衡, 改善线粒体功能, 从而起到减轻VaD大鼠的神经元损伤和神经炎症反应的作用。

参考文献

- [1] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC scientific expert panel[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(25): 3326-3344.
- [2] JIA L F, DU Y F, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. Lancet Public Health, 2020, 5(12): e661-e671.
- [3] GRELL H, WOZNICA D, RATAJCZAK K, et al. Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: unrav-

- eling the role of fusion and fission processes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17):13033.
- [4] RUIZ K, THAKER T M, AGNEW C, et al. Functional role of PGAM5 multimeric assemblies and their polymerization into filaments[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):531.
- [5] KHANDIA R, MUNJAL A K, IQBAL H M N, et al. Heat shock proteins: therapeutic perspectives in inflammatory disorders[J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2017, 10(2):94-104.
- [6] JACOBSEN A V, LOWES K N, TANZER M C, et al. HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(1):e2051.
- [7] YANG C K, HE S D. Heat shock protein 90 regulates necroptosis by modulating multiple signaling effectors[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(3):e2126.
- [8] LU W, SUN J H, YOON J S, et al. Mitochondrial protein PGAM5 regulates mitophagic protection against cell necroptosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147792.
- [9] KANG J S, CHO N J, LEE S W, et al. RIPK3 causes mitochondrial dysfunction and albuminuria in diabetic podocytopathy through PGAM5-Drp1 signaling[J]. *Metabolism*, 2024, 159:155982.
- [10] WU L, ZHAO Q S, LI T W, et al. Yifei xuanfei jiangzhuo formula, a Chinese herbal decoction, improves memory impairment through inhibiting apoptosis and enhancing PKA/CREB signal transduction in rats with cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4273-4283.
- [11] ZHAI K F, DUAN H, WANG W, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates blood-brain barrier disruption and traumatic brain injury via attenuating macrophages derived exosomes miR-21 release[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11):3493-3507.
- [12] 雷裕君, 吴鹏, 黄立武, 等. 益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠 VEGF 基因表达及线粒体凋亡通路的影响[J]. *广西中医药*, 2020, 43(1):60-62.
- [13] 黄德庆, 任昕怡, 陈炜, 等. 益肺宣肺降浊方调控 miR-485/AIM2 炎症小体途径治疗血管性痴呆的机制研究[J/OL]. *海南医学院学报*, 2024: 1-16(2024-10-17)[2025-03-12]. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HNYY20241016002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [14] 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.
- [15] HAN B, JIANG W, LIU H J, et al. Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6):2832-2848.
- [16] ZUO W, YAN F, LIU Z Y, et al. miR-330 regulates Drp1 mediated mitophagy by targeting PGAM5 in a rat model of permanent focal cerebral ischemia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880:173143.
- [17] HUANG G J, CONG Z L, WANG X Y, et al. Targeting HSP90 attenuates angiotensin II -induced adventitial remodelling via suppression of mitochondrial fission[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5):1071-1084.
- [18] THIRSTRUP K, SOTTY F, MONTEZINHO L C P, et al. Linking HSP90 target occupancy to HSP70 induction and efficacy in mouse brain[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 104:197-205.
- [19] ZHAO X M, CHEN Z, ZHAO J B, et al. HSP90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(2):e2089.
- [20] DU Y, HE J Q, XU Y N, et al. SIRT6 prevent chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive impairment by remodeling mitochondrial dynamics in a STAT5-PGAM5-Drp1 dependent manner[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1):788.
- [21] 沈海珊, 王数, 冯巩. 动力蛋白相关蛋白1(Drp1)在非酒精性脂肪性肝病中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(1):159-163.
- [22] ZHOU Y, SHE R N, MEI Z G, et al. Crosstalk between ferroptosis and necroptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury and Naotafang formula exerts neuroprotective effect via HSP90-GCN2-ATF4 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130:155399.
- [23] SAITA S, ISHIHARA T, MAEDA M, et al. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission[J]. *Genes Cells*, 2016, 21(5):408-424.

(收稿日期:2025-03-22 修回日期:2025-07-04)

(编辑:舒安琴)