

温脾通络开窍方抑制 AD 小鼠神经元坏死性凋亡的作用及机制[△]

朱小敏^{1*},陈 炜²,符钰岚¹,卓桂锋¹,黄颖睿¹,张 颖¹,吴 林^{1,3#}(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 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)09-1046-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.09.05



摘要 目的 基于Z-DNA结合蛋白1(ZBP1)/混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)信号通路探讨温脾通络开窍方对阿尔茨海默病(AD)小鼠神经元坏死性凋亡的影响及机制。方法 将40只APP/PS1转基因AD小鼠随机分为模型组,温脾通络开窍方低、高剂量组(10.4、20.8 g/kg,以生药量计)和盐酸多奈哌齐组(阳性对照,3 mg/kg),每组10只;并以10只C57BL/6J小鼠作为正常对照组。灌胃给药,每天1次,连续30 d。末次给药24 h后通过Morris水迷宫实验评估小鼠学习记忆能力,观察海马组织病理形态,检测血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素4(IL-4)水平,检测海马组织中Tau蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)和ZBP1/MLKL信号通路相关蛋白表达水平,检测海马组织神经元内磷酸化受体相互作用蛋白激酶3(p-RIPK3)阳性表达及海马组织中ZBP1 mRNA相对表达水平。结果 与正常对照组比较,模型组小鼠第3~5天的逃避潜伏期均显著延长($P<0.05$),穿越平台次数显著减少($P<0.05$),海马组织出现明显病理性改变;TNF-α水平,APP、p-Tau、ZBP1蛋白表达水平和RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白磷酸化水平,p-RIPK3荧光强度和ZBP1 mRNA相对表达水平均显著升高($P<0.05$);血清中IL-4水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠上述指标水平均显著逆转($P<0.05$),海马组织病理损伤减轻。结论 温脾通络开窍方可通过抑制ZBP1/MLKL信号通路,减少AD小鼠神经元坏死性凋亡,抑制炎症反应,进而改善AD小鼠学习和空间记忆能力。

关键词 温脾通络开窍方;阿尔茨海默病;ZBP1/MLKL信号通路;坏死性凋亡

Effect of Wenpi tongluo kaiqiao formula against neuronal necroptosis in mice with Alzheimer's disease and its mechanism

ZHU Xiaomin¹, CHEN Wei², FU Yulan¹, ZHUO Guifeng¹, HUANG Yingrui¹, ZHANG Ying¹, WU Lin^{1,3}(1. The First Clinical College of Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 2. Ward 1, Department of Encephalopathy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 3. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanism of Wenpi tongluo kaiqiao formula (WPTL) against neuronal necroptosis in Alzheimer's disease (AD) mice based on the Z-DNA binding protein 1 (ZBP1)/mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) signaling pathway. **METHODS** Forty APP/PS1 transgenic AD mice were randomly divided into model group, WPTL low-dose (WPTL-L) group (10.4 g/kg, calculated by the raw medicine), WPTL high-dose (WPTL-H) group (20.8 g/kg, calculated by the raw medicine) and donepezil hydrochloride group (3 mg/kg), with 10 mice in each group; another 10 C57BL/6J mice were selected as normal control group. Intragastric administration, once a day, for 30 consecutive days. Twenty-four hours after the last administration, Morris water maze test was performed to evaluate learning and memory abilities; the pathological morphology of hippocampal tissues was observed; the serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-4 (IL-4) were determined; the expressions of amyloid precursor protein (APP), Tau protein, and ZBP1/MLKL signaling pathway-related proteins in hippocampal tissues were detected; the positive expression of phosphorylated receptor-interacting protein kinase 3 (p-RIPK3) in the neurons of hippocampal tissues and mRNA expression of ZBP1 were measured in

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82460906);广西自然科学基金项目(No.2022GXNSFAA035461);广西科技计划项目(No.桂科AD20238028);广西中医药重点学科建设项目(No.GZXK-Z-20-13);第三批广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(No.202410)

* 第一作者 博士研究生。研究方向:中医药防治脑系疾病。
E-mail:671369756@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中医药防治脑系疾病。
E-mail:wul2003@gxtcmu.edu.cn

hippocampal tissues. **RESULTS** Compared with normal control group, the escape latency of mice in model group was prolonged significantly on day 3 to 5 ($P<0.05$), the times of crossing platform reduced significantly ($P<0.05$), and obvious pathological changes were observed in the hippocampal tissue. The level of TNF- α , the expressions of APP, p-Tau and ZBP1, the phosphorylation levels of RIPK1, RIPK3 and MLKL, the fluorescence intensity of p-RIPK3 as well as the mRNA expression of ZBP1 were significantly increased ($P<0.05$), while the serum level of IL-4 was decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, above indexes were reversed significantly in administration groups ($P<0.05$), and pathological damage of hippocampal tissue was alleviated. **CONCLUSIONS** WPTL can inhibit the ZBP1/MLKL signaling pathway, reduce neuronal necroptosis in AD mice, and inhibit inflammatory responses, thereby improving learning and spatial memory abilities in AD mice.

KEYWORDS Wenpi tongluo kaiqiao formula; Alzheimer's disease; ZBP1/MLKL signaling pathway; necroptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与衰老密切相关的神经退行性疾病,主要表现为进行性的学习记忆能力减退和认知功能退化,是目前最常见的痴呆类型,占所有痴呆类型的60%~80%^[1]。AD的发病机制复杂,主要病理特征包括由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)代谢异常引发的 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)斑块沉积、Tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结、神经元丢失及神经炎症反应等^[2]。

当前,AD的西医治疗主要以多奈哌齐等乙酰胆碱酯酶抑制剂和美金刚等N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂为主,这些药物可在一定程度上缓解AD症状,但无法阻止或逆转疾病的进展,并且还可能引起不良反应^[3]。中药具有多靶点、多途径的作用特点,能够综合调节机体的生理功能,减少不良反应的发生,逐渐成为AD新型治疗药物的研发热点。

温脾通络开窍方为全国老中医药专家学术继承指导老师、广西名老中医吴子辉教授治疗痴呆的经验方。本课题组前期研究已证实,该方可通过抑制神经炎症、保护神经元发挥对AD的保护作用^[4]。然而,其具体作用机制尚不完全清楚。坏死性凋亡是由受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)/RIPK3混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)信号通路介导的细胞程序性死亡形式,已被证明与AD的发生发展密切相关^[5]。有研究表明,Z-DNA结合蛋白1(Z-DNA binding protein 1, ZBP1)可通过激活RIPK1/RIPK3信号通路,诱导MLKL介导的坏死性凋亡^[6];且有研究表明,ZBP1在AD大鼠海马神经元的氧化应激和炎症进程中发挥了重要作用^[7]。鉴于此,本研究拟探讨温脾通络开窍方是否可通过抑制ZBP1/MLKL信号通路来抑制AD小鼠神经元坏死性凋亡,以期为该方治疗AD提供更充实的理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:XR-XM101型Morris水迷宫(上海欣软信息科技有限公司),CFX96型实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司),BX43型光学显微镜、UC90型成像系统(日本Olympus公司),DYY-4C型电泳仪及凝胶成像系统(北京六一仪器厂)等。

1.2 主要药品与试剂

温脾通络开窍方由黄芪30 g、益智仁10 g、三七10 g、石菖蒲10 g、何首乌10 g、绞股蓝10 g组成,上述饮片均购自广西中医药大学第一附属医院门诊中药房(批号分别为240501、240507、230801、240301、240903、240802);盐酸多奈哌齐片(批号211035,规格5 mg)购自卫材(中国)药业有限公司;苏木精、伊红染液均购自珠海贝索生物技术有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为MM-0132M1、MM-0165M1)均购自江苏酶免实业有限公司;磷酸化Tau(ser396)[p-Tau(ser396)]、ZBP1、RIPK1、磷酸化RIPK1(ser166)[p-RIPK1(ser166)]、RIPK3抗体(批号分别为RM4630、BD-PN2476、BD-PN1850、BD-PP1467、BD-PP1882)均购自苏州博奥龙科技有限公司;磷酸化RIPK3(ser277)[p-RIPK3(ser277)]、磷酸化MLKL(ser345)[p-MLKL(ser345)]抗体(货号分别为HA721428、ET1705-51)均购自杭州华安生物技术有限公司;MLKL抗体、羊抗兔IgG(H+L)红色荧光二抗(批号分别为21894、AS039)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;APP抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗、HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗(批号分别为25524-1-ap、60004-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;实时荧光定量PCR试剂盒、RNA提取试剂、逆转录试剂盒(批号分别为Q712、R701-01、R123-

01)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司设计并合成。

1.3 动物

40只6月龄SPF级雄性APP/PS1转基因AD小鼠(5XFAD小鼠)及10只同背景、同月龄的雄性野生型C57BL/6J小鼠均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004]。小鼠购入后,饲养于广西中医药大学动物实验中心SPF级动物房,该动物房符合SPF级医学实验动物环境及设施要求。本研究动物实验获广西中医药大学科学实验中心动物伦理委员会审核通过(伦理号:DW20220215-053-02)。

2 方法

2.1 温脾通络开窍方药液的制备

按温脾通络开窍方组成称取方中各饮片,置于烧瓶中,加水2 000 mL,煎煮2 h×3次;过滤,合并3次滤液,于45 °C水浴中减压浓缩至2.08 g/mL(以生药量计);置于4 °C下保存,备用。

2.2 分组与给药

将40只5XFAD小鼠和10只C57BL/6J正常小鼠适应性喂养1周。然后将5XFAD小鼠随机分为模型组(MOD组),温脾通络开窍方低、高剂量组(WPTL-L组、WPTL-H组),盐酸多奈哌齐组(阳性对照,DH组),每组10只;并将10只C57BL/6J小鼠作为正常对照组(NC组)。WPTL-L组、WPTL-H组小鼠分别按10.4、20.8 g/kg(以生药量计,根据人与小鼠体表面积换算,分别为1、2倍临床等效剂量)灌胃温脾通络开窍方药液;DH组小鼠按3 mg/kg灌胃盐酸多奈哌齐(根据文献[8]及预实验结果确定);NC组和MOD组小鼠灌胃等体积生理盐水。每天给药1次,连续30 d。

2.3 行为学检测

末次给药24 h后进行水迷宫实验以评估小鼠的学习及空间记忆能力。将水迷宫划分为4个象限,平台置于第三象限,注水没过平台。前5 d进行定位航行实验,分别将小鼠依次从4个象限放入,小鼠找到平台则停止实验,记录每天的逃避潜伏期;若小鼠60 s内未找到平台,则引导其至平台并停留10 s,逃避潜伏期按60 s计。第6天进行空间探索实验,撤走平台记录每组小鼠60 s内穿越平台次数。

2.4 样本制备

水迷宫实验结束后,小鼠经20%乌拉坦麻醉,腹主动脉取血。血样以3 000 r/min离心15 min,取上清液于

-80 °C下储存,备用。取血后处死小鼠,每组随机选取7只剥离其海马组织,并于-80 °C下保存,用于实时荧光定量PCR(每组3只)和Western blot检测(每组4只);快速取出每组剩余3只小鼠的脑组织,并置于4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋后切片(厚度约5 μm),用于苏木精-伊红(HE)染色及组织免疫荧光化学染色分析。

2.5 小鼠海马组织病理形态学观察

采用HE染色法观察。取“2.4”项下小鼠脑组织石蜡切片,经脱蜡、水洗后,行HE染色,显微镜下观察其海马组织病理形态学变化并拍照,采集图像并分析。

2.6 小鼠血清中TNF-α、IL-4水平检测

采用ELISA法检测。取“2.4”项下血清样品,室温解冻,按照ELISA试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪于450 nm波长处检测小鼠血清中TNF-α、IL-4水平。

2.7 小鼠海马组织中ZBP1/MLKL信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组冻存的小鼠海马组织适量,提取组织中总蛋白,测定总蛋白浓度后作变性处理,制备蛋白上样样品,随后进行电泳(电压400 V,电泳时间1 h)分离,并将分离的蛋白转移(电流400 mA,转膜时间100 min)到PVDF膜上,在室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h。加入GAPDH、APP、p-Tau、ZBP1、p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL一抗(稀释比例分别为1:60 000、1:500、1:2 000、1:500、1:500、1:500、1:1 000、1:500、1:1 000、1:500),于4 °C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:10 000),于室温下孵育1.5 h;洗膜后显影,成像。使用Image J软件分析各蛋白条带的灰度值,以APP、p-Tau、ZBP1与内参蛋白(GAPDH)条带的灰度值比值表示APP、p-Tau、ZBP1蛋白的表达水平,以p-RIPK1与RIPK1、p-RIPK3与RIPK3、p-MLKL与MLKL条带的灰度值比值表示RIPK1、RIPK3和MLKL蛋白的磷酸化水平。

2.8 小鼠海马组织神经元内p-RIPK3阳性表达检测

采用免疫荧光染色法检测。取“2.4”项下小鼠脑组织切片,经脱水、漂洗、封闭后与p-RIPK3抗体(稀释比例为1:100)孵育过夜,再使用羊抗兔IgG(H+L)红色荧光二抗(稀释比例为1:200)进行孵育;用DAPI染色细胞核,室温下孵育5~10 min,以标记核位置。对样本进行封片,并使用显微镜观察和成像。以红色荧光强度反映p-RIPK3阳性表达水平高低,采用Image J软件对阳性表达蛋白的荧光强度进行分析。

2.9 小鼠海马组织中ZBP1 mRNA水平检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取各组小鼠冻存的海马组织适量,提取组织中总mRNA,分析纯度与浓度后,将总RNA逆转录合成cDNA并进行PCR扩增。PCR反应体系包括: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ZBP1 mRNA的相对表达水平,结果以NC组为参照进行归一化处理。PCR引物序列及产物大小见表1。

表1 PCR引物序列及产物大小

基因名称	序列(5'→3')	产物大小/bp
GAPDH	正向:GGTTGTCTCGCGACTTCA	183
	反向:TGGTCAGGGTTCTACTCC	
ZBP1	正向:AAGAGTCCCCTGCCATTATTG	102
	反向:TCTGGATGGCGTTGAATTGG	

2.10 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用LSD-t检验,方差不齐时组间两两比较采用Games-Howell检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 小鼠学习及空间记忆能力考察结果

与NC组比较,MOD组小鼠第3~5天的逃避潜伏期均显著延长($P<0.05$),穿越平台次数显著减少($P<0.05$);与MOD组比较,各药物组小鼠第3~5天的逃避潜伏期均显著缩短($P<0.05$),穿越平台次数均显著增加($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组小鼠逃避潜伏期及穿越平台次数比较($n=10$)

组别	逃避潜伏期($\bar{x} \pm s$)/s					穿越平台次数 [$M(P_{25}, P_{75})$]次
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	
NC组	57.33±1.28	48.86±3.09	33.56±2.63	21.36±2.84	16.86±1.30	5(6.6)
MOD组	58.30±2.21	53.03±4.64	52.63±2.28 ^a	49.03±2.05 ^a	47.26±1.19 ^a	1(1.2) ^a
WPTL-L组	58.56±2.06	53.73±2.31	42.93±1.76 ^b	36.93±1.51 ^b	34.93±1.95 ^b	2(3.3) ^b
WPTL-H组	56.56±2.17	53.10±1.66	39.70±2.09 ^b	30.30±1.00 ^b	26.66±1.02 ^b	4(4.4) ^b
DH组	58.33±1.10	52.90±3.25	37.83±2.05 ^b	26.96±1.59 ^b	23.66±1.70 ^b	4(5.5) ^b

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

3.2 小鼠海马组织病理形态学观察结果

NC组小鼠海马组织结构正常,CA1区锥体细胞(蓝色箭头所指)排列整齐,胞核饱满,核仁清晰,染色均匀;

未发现细胞凋亡及坏死情况,无炎症细胞浸润。与NC组比较,MOD组小鼠海马组织损伤较严重,CA1区锥体排列紊乱,染色不均;锥体细胞较少,大量神经元固缩、深染(黄色箭头所指),甚至凋亡、消失。与MOD组比较,WPTL-L组小鼠海马组织损伤有所减轻,CA1区锥体细胞排列相对整齐,部分神经元固缩、深染;WPTL-H组和DH组小鼠海马组织损伤明显减轻,CA1区锥体细胞排列整齐,仅少量神经元固缩、深染。结果见图1。

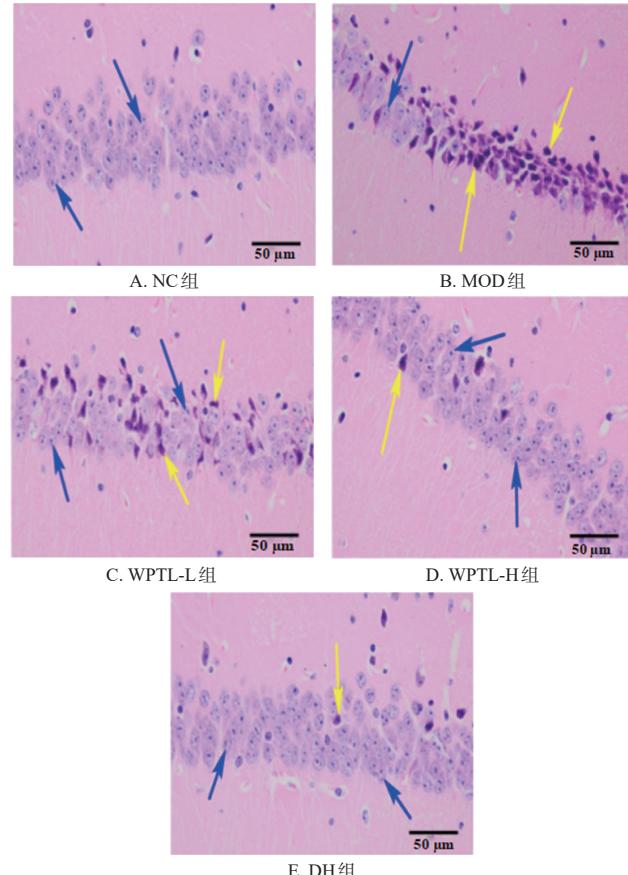


图1 各组小鼠海马组织HE染色显微图

3.3 小鼠血清中TNF-α、IL-4水平测定结果

与NC组比较,MOD组小鼠血清中TNF-α水平显著升高($P<0.05$),IL-4水平显著降低($P<0.05$)。与MOD组比较,各药物组小鼠血清中TNF-α水平均显著降低($P<0.05$),IL-4水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组小鼠血清中TNF-α、IL-4水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, pg/mL$)

组别	TNF-α	IL-4
NC组	32.16±0.71	61.92±1.35
MOD组	69.09±0.87 ^a	36.53±1.99 ^a
WPTL-L组	58.91±0.82 ^b	45.40±0.65 ^b
WPTL-H组	46.64±1.17 ^b	54.83±0.76 ^b
DH组	46.98±1.28 ^b	56.49±0.95 ^b

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

3.4 小鼠海马组织中ZBP1/MLKL信号通路相关蛋白表达检测结果

与NC组比较,MOD组小鼠海马组织中APP、p-Tau、ZBP1蛋白表达水平以及RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与MOD组比较,各药物组小鼠海马组织中上述指标水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图2、表4。

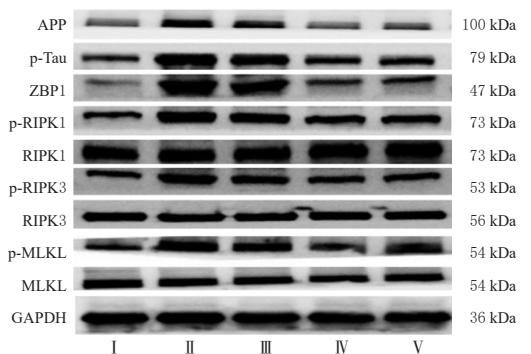


图2 各组小鼠海马组织中ZBP1/MLKL信号通路相关蛋白表达的电泳图

3.5 小鼠海马组织神经元内p-RIPK3阳性染色检测结果

与NC组($0.24\pm0.07,n=3$)比较,MOD组小鼠海马组织神经元内p-RIPK3荧光强度($3.52\pm0.37,n=3$)显著增强($P<0.05$)。与MOD组比较,WPTL-L组、WPTL-H组和DH组小鼠海马组织神经元内p-RIPK3荧光强度(分别为 1.65 ± 0.09 、 0.67 ± 0.09 、 $0.39\pm0.07,n=3$)均显著减弱($P<0.05$)。结果见图3。

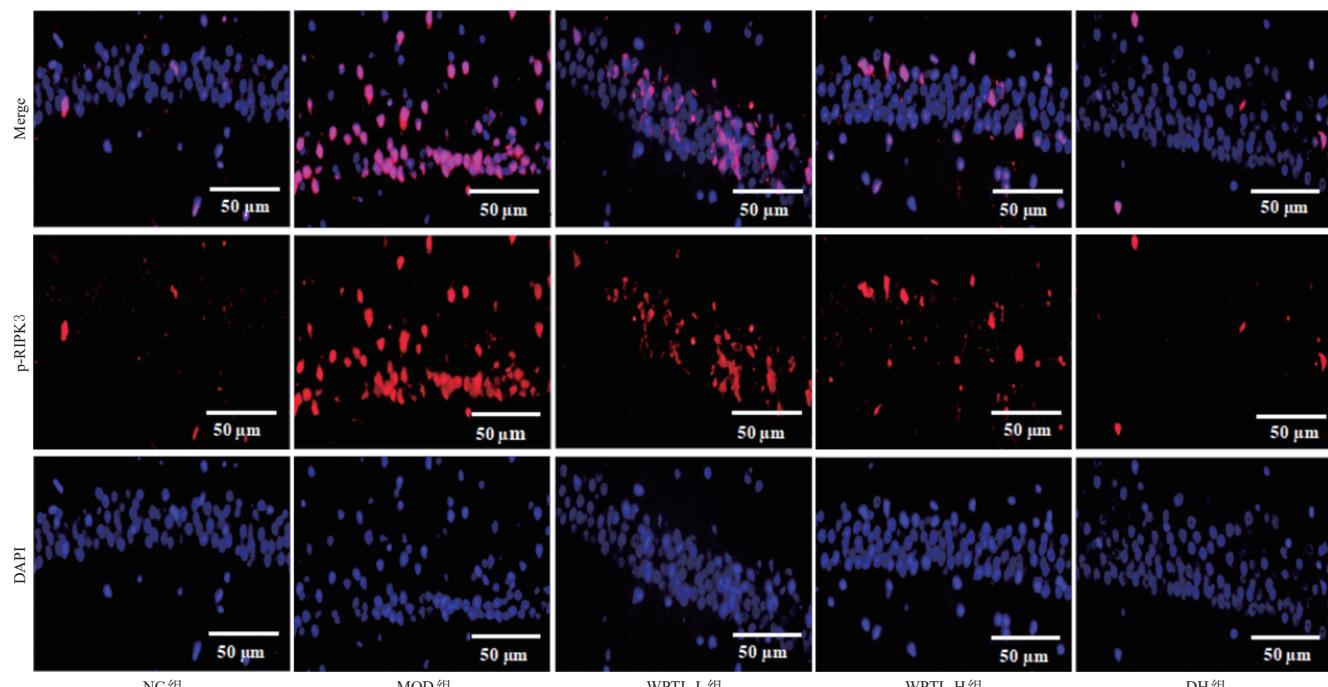


图3 各组小鼠海马组织神经元内p-RIPK3的免疫荧光染色图

表4 各组小鼠海马组织中ZBP1/MLKL信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	APP/GAPDH	p-Tau/GAPDH	ZBP1/GAPDH	p-RIPK1/ RIPK1	p-RIPK3/ RIPK3	p-MLKL/ MLKL
NC组	0.29 ± 0.39	0.25 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.73 ± 0.04	0.80 ± 0.10	0.66 ± 0.02
MOD组	0.74 ± 0.26^a	0.60 ± 0.03^a	0.97 ± 0.03^a	1.30 ± 0.02^a	1.27 ± 0.03^a	1.14 ± 0.02^a
WPTL-L组	0.59 ± 0.03^b	0.48 ± 0.01^b	0.85 ± 0.03^b	1.04 ± 0.09^b	1.07 ± 0.03^b	1.01 ± 0.03^b
WPTL-H组	0.37 ± 0.13^b	0.37 ± 0.01^b	0.57 ± 0.02^b	0.79 ± 0.02^b	0.96 ± 0.05^b	0.81 ± 0.06^b
DH组	0.36 ± 0.16^b	0.35 ± 0.03^b	0.59 ± 0.02^b	0.78 ± 0.02^b	0.93 ± 0.06^b	0.83 ± 0.06^b

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

3.6 小鼠海马组织中ZBP1 mRNA水平测定结果

与NC组($1.01\pm0.20, n=3$)比较,MOD组小鼠海马组织中ZBP1 mRNA相对表达水平($2.95\pm0.58, n=3$)显著升高($P<0.05$);与MOD组比较,WPTL-L组、WPTL-H组和DH组小鼠海马组织中ZBP1 mRNA相对表达水平(分别为 2.16 ± 0.28 、 1.42 ± 0.42 、 $1.51\pm0.20, n=3$)均显著降低($P<0.05$)。

4 讨论

AD属中医学“健忘”“痴呆”范畴。本课题组认为脾胃虚弱是AD发病的根本原因,痰浊瘀血阻窍是AD的关键病机,并针对AD病机演变过程中的关键环节,提出了“从脾论治痴呆”的观点,创立了“温脾通络开窍”治则,验之于临床疗效颇佳^[9]。本研究中Morris水迷宫实验结果显示,温脾通络开窍方干预后AD小鼠的逃避潜伏期显著缩短、穿越平台次数显著增加;HE染色结果显示,温脾通络开窍方干预后AD小鼠海马CA1区神经元固缩和深染显著减少。APP在淀粉样代谢途径中可剪切形成A β ,而A β 沉积与Tau蛋白过度磷酸化形成神经

纤维缠结是AD的主要病理特征^[2]。本研究Western blot实验结果显示,相较于NC组,MOD组小鼠海马组织中APP及p-Tau蛋白表达增强;而给予温脾通络开窍方干预后,可在一定程度上抑制AD小鼠脑组织中APP蛋白的表达及Tau蛋白的磷酸化。这说明温脾通络开窍方能够调节APP及p-Tau这2个关键病理蛋白的表达,减轻海马神经元损伤和病理表现,有效改善AD小鼠的认知功能。

以小胶质细胞数量增加和促炎细胞因子水平升高为特征的慢性神经炎症,被认为是AD的病理标志之一^[10]。当受到TNF- α 等炎症介质的刺激时,RIPK1会发生磷酸化并招募RIPK3形成复合体,随后,磷酸化的RIPK3进一步激活MLKL,启动损伤相关分子模式,并释放多种炎症因子,如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6,这些炎症因子会提高周围环境中警报信号水平,吸引巨噬细胞聚集到受影响的区域,从而加剧炎症反应^[11]。研究显示,ZBP1可通过识别病毒Z型双链RNA并招募RIPK3激活MLKL,从而触发感染细胞的坏死性凋亡^[12];沉默AD大鼠神经元细胞中ZBP1可显著减少其神经元损伤、氧化应激和炎症^[7]。另有研究发现,RIPK1、RIPK3、MLKL等蛋白的上调与AD患者神经元坏死性凋亡的进展密切相关^[13-15]。本研究结果显示,温脾通络开窍方能够显著抑制AD小鼠海马组织中ZBP1 mRNA及其蛋白表达,降低RIPK1、RIPK3及MLKL蛋白磷酸化水平,同时降低血清中促炎因子TNF- α 水平,升高抗炎因子IL-4水平。

综上所述,温脾通络开窍方可通过抑制ZBP1/MLKL信号通路,减少AD小鼠神经元坏死性凋亡发生,抑制炎症反应,进而改善AD小鼠学习和空间记忆能力。然而,本研究仍存在一定局限性,如未采用ZBP1/MLKL信号通路的抑制剂和激动剂进行通路验证等,后续本课题组将设计相关实验进行深入研究。

参考文献

- [1] ROSTAGNO A A. Pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1):107.
- [2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [3] TATULIAN S A. Challenges and hopes for Alzheimer's disease[J]. Drug Discov Today, 2022, 27(4):1027-1043.
- [4] 陈炜,李兴峰,陈业文,等.温脾通络开窍方通过影响

NF- κ B通路改善阿尔兹海默症大鼠的认知功能研究[J].时珍国医国药,2021,32(10):2330-2333.

- [5] CACCAMO A, BRANCA C, PIRAS I S, et al. Necroptosis activation in Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(9):1236-1246.
- [6] SCHWARZER R, JIAO H P, WACHSMUTH L, et al. FADD and caspase-8 regulate gut homeostasis and inflammation by controlling MLKL- and GSDMD-mediated death of intestinal epithelial cells[J]. Immunity, 2020, 52(6):978-993.e6.
- [7] GUO H, CHEN R, LI P, et al. ZBP1 mediates the progression of Alzheimer's disease via pyroptosis by regulating IRF3[J]. Mol Cell Biochem, 2023, 478(12):2849-2860.
- [8] 张重阳,于森,陈荣昌,等.党参皂苷对衰老小鼠认知功能障碍保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(20):70-76.
- [9] 杨惠丹.加味温脾通络开窍方治疗脾虚痰阻型阿尔茨海默病的临床疗效观察[D].南宁:广西中医药大学,2017.
- [10] MANDREKAR-COLUCCI S, LANDRETH G E. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010, 9(2):156-167.
- [11] ZHANG W K, ZHENG X H, GONG Y H, et al. VX-11e protects articular cartilage and subchondral bone in osteoarthritis by inhibiting the RIP1/RIP3/MLKL and MAPK signaling pathways[J]. Bioorg Chem, 2022, 120:105632.
- [12] KOEHLER H, TITUS D, LAWSON C. Cell-type dependence of necroptosis pathways triggered by viral infection [J]. FEBS J, 2024, 291(11):2388-2404.
- [13] OFENGEIM D, MAZZITELLI S, ITO Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(41):E8788-E8797.
- [14] DEGTEREV A, OFENGEIM D, YUAN J Y. Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(20):9714-9722.
- [15] TU J L, CHEN W P, CHENG Z J, et al. EGb761 ameliorates cell necroptosis by attenuating RIP1-mediated mitochondrial dysfunction and ROS production in both *in vivo* and *in vitro* models of Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2020, 1736:146730.

(收稿日期:2025-01-13 修回日期:2025-03-19)

(编辑:林 静)