

186; 113331.

[19] Xie M, Zhang M, Qiao Y, *et al.* Molecular mechanism of PSORI-CM01 for psoriasis by regulating the inflammatory cytokines network[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318 (Pt A): 116935.

[20] Yang Y, Zhao Y, Lai R, *et al.* An emerging role of proanthocyanidins on psoriasis: evidence from a psoriasis-like mouse model[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5800586.

[21] 陈建霞, 冯燕艳. 巨噬细胞在银屑病发病机制中作用的研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2019, 48(11): 714-716.

[22] Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) -mediated autoimmunity: lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris[J]. *Autoimmun Rev*, 2013, 12 (5): 580-590.

[23] Yeung Y T, Bryce N S, Adams S, *et al.* p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells[J]. *J Neurooncol*, 2012, 109(1): 35-44.

[24] Gesser B, Rasmussen M K, Iversen L. Dimethyl fumarate targets MSK1, RSK1, 2 and IKKα/β kinases and regulates NF-κB/p65 activation in psoriasis: a demonstration of the effect on peripheral blood mononuclear cells, drawn from two patients with severe psoriasis before and after treatment with dimethyl fumarate[J]. *Psoriasis (Auckl)*, 2020, 10: 1-11.

[25] Aarebrot A K, Solberg S M, Davies R, *et al.* Phosphorylation of intracellular signalling molecules in peripheral blood cells from patients with psoriasis on originator or biosimilar infliximab[J]. *Br J Dermatol*, 2018, 179(2): 371-380.

[26] Xu J, Duan X, Hu F, *et al.* Resolvin D1 attenuates imiquimod-induced mice psoriasiform dermatitis through MAPKs and NF-κB pathways[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 89(2): 127-135.

[27] 王 宁, 牛凡琪, 李彦梅, 等. 银屑病相关信号通路的中药调控研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(7): 118-129.

基于 PGAM5-Drp1 轴探讨温肺降浊方对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞线粒体功能的影响

张 鼎¹, 胡芷涵², 周珂青¹, 陈 炜³, 秦红玲³, 向军军³, 胡跃强^{3*}
(1. 广西中医药大学研究生院, 广西南宁 530001; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023)

摘要: **目的** 探讨温肺降浊方对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞线粒体功能的影响。**方法** 通过 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞建立阿尔茨海默病 (AD) 细胞模型, 确定 Aβ₂₅₋₃₅ 干预的最佳浓度和时间点, 设置 LFHP-1c 组 (抑制剂) 和温肺降浊方含药血清组。CCK-8 法检测最佳干预浓度和时间点, Transwell 实验观察细胞迁移情况, Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡情况, 免疫荧光法检测 PGAM5、Drp1 的阳性细胞表达情况, RT-qPCR 法和 Western blot 法检测细胞 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达。**结果** 以终浓度 5 μmol/L 的 Aβ₂₅₋₃₅ 干预 48 h 为制备 AD 细胞模型的最佳条件, 20% 温肺降浊方含药血清干预 48 h 细胞活性最佳。与对照组比较, 模型组细胞迁移数量减少, 存在较多亮蓝色阳性凋亡细胞, PGAM5、Drp1 阳性细胞数、mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$), OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组细胞迁移数量增加, 亮蓝色阳性凋亡细胞减少, PGAM5、Drp1 阳性细胞数、mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$), OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$)。**结论** 温肺降浊方可以调控 PGAM5-Drp1 轴减轻 AD 模型细胞损伤, 改善线粒体稳态平衡, 从而提高认知水平, 发挥脑保护效应。

关键词: 温肺降浊方; 阿尔茨海默病; Aβ₂₅₋₃₅; PGAM-Drp1 轴; 线粒体稳态平衡; BV-2 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2558-08

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2025. 08. 011

收稿日期: 2024-03-18
基金项目: 国家自然科学基金 (82260904); 国家中医药管理局高水平重点学科 (ZYYZDXK-2023166); 广西中医脑病临床研究中心项目 (桂科 AD20238028); 广西中医药重点学科建设项目 (GZXK-Z-20-13); 广西中医药大学“歧黄工程”高层次人才团队 (202410); 广西中医药大学博士研究生创新项目 (YCBXJ2023010)
作者简介: 张 鼎 (1993—), 男, 博士生, 从事中医药防治缺血性中风和血管性痴呆的基础与临床研究。E-mail: 1301482056@qq.com
***通信作者:** 胡跃强 (1973—), 男, 教授, 从事中医药防治缺血性脑血管疾病。Tel: 13152510678, E-mail: 137463195@qq.com
网络出版日期: 2024-07-22
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240719.1021.002.html>.

Effects of Wenfei Jiangzhuo Formula on mitochondrial function of Aβ₂₅₋₃₅-induced BV-2 cells based on PGAM5-Drp1 axis

ZHANG Ding¹, HU Zhi-han², ZHOU Ke-qing¹, CHEN Wei³, QING Hong-ling³,
XIANG Jun-jun³, HU Yue-qiang^{3*}

(1. Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. The First Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Wenfei Jiangzhuo Formula on mitochondrial function of Aβ₂₅₋₃₅-induced BV-2 cells. **METHODS** In the establishment of cell model of Alzheimer's disease (AD) using Aβ₂₅₋₃₅ on the BV-2 cells, the optimal concentration and time point of Aβ₂₅₋₃₅ intervention were determined; and the groups for the intervention of LFHP-1c group (inhibitor) or the serum containing Wenfei Jiangzhuo Formula were set up. The detection of the optimal intervention concentration and time point by CCK-8 assay; the observation of cell migration and apoptosis by Transwell assay and Hoechst 33342 staining; the detection of the positive expressions of PGAM5 and Drp1 by immunofluorescence; and the detection of cellular PGAM5, Drp1, OPA1, and Mfn1/2 mRNA and protein expressions by RT-qPCR and Western blot were conducted. **RESULTS** The best AD cell model was established by 48 h exposure to 5 μmol/L of Aβ₂₅₋₃₅, and most active cell viability was achieved with the 48 h use of serum containing 20% Wenfei Jiangzhuo Formula. Compared with the control group, the model group displayed decreased number of cell migration, more bright blue positive apoptotic cells, increased number of PGAM5 and Drp1 positive cells and their mRNA and protein expressions ($P<0.05$); and decreased mRNA and protein expressions of OPA1 and Mfn1/2 ($P<0.05$). Compared with the model group, the groups intervened with the medicines shared increased number of cell migration, less bright blue positive apoptotic cells, decreased number of PGAM5 and Drp1 positive cells and their mRNA and protein expressions ($P<0.05$); and elevated OPA1 and Mfn1/2 mRNA and protein expressions ($P<0.05$). **CONCLUSION** Wenfei Jiangzhuo Formula exerts cerebroprotective effects to improve cognition by reducing cell damage and improving the balance of mitochondrial homeostasis through PGAM5-Drp1 axis in AD model.

KEY WORDS: Wenfei Jiangzhuo Formula; Alzheimer's disease; Aβ₂₅₋₃₅; PGAM-Drp1 axis; mitochondrial homeostatic balance; BV-2 cells

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又被称为老年痴呆症, 以记忆力减退、认知功能障碍为主要临床表现^[1-2]。据统计, 2030 年全球痴呆患病人数将增至 8 200 万, 其中 AD 患者的人数大约占 66%^[3]。AD 不仅严重损害患者的身心健康, 也给社会和病患家庭带来了不容忽视的经济负担^[4-5]。

AD 是一种病因和病理机制极其复杂的神经退行性疾病^[6]。目前认为 AD 的发生主要与 Aβ 毒性、tau 蛋白异常修饰、胆碱能损伤等因素相关^[7]。研究证明, 线粒体质量异常与衰老相关疾病的发生密切相关^[8]。因此, 研究线粒体稳态平衡对减轻 AD 带来的认知损伤具有重要意义。课题组前期研究结果提示, 温肺降浊方可以通过降低

AD 大鼠线粒体相关蛋白细胞色素、凋亡蛋白的表达, 减少神经元凋亡^[9-11]。Bax 的高表达促进线粒体动力相关蛋白 (Drp1) 定位于线粒体外膜, 加强线粒体分裂活性^[12-13]。然而, 磷酸甘油酸变位酶 5 (PGAM5) 能够介导 Drp1 易位到受损的线粒体, 从而构成 PGAM5-Drp1 轴调控线粒体动力学系统, 但是该信号轴的上游机制仍不清楚。故本研究拟从 PGAM5-Drp1 轴与线粒体稳态的关系着手, 构建 Aβ₂₅₋₃₅诱导 BV-2 细胞体外模型, 通过温肺降浊方含药血清干预探讨其可能的作用机制, 以期为 AD 的中医治疗提供新方法。

1 材料

1.1 细胞和动物 BV-2 细胞株由广西中医药大学基础医学院阮子芸副教授课题组捐赠。SPF 级健康

成年雄性 SD 大鼠 10 只，体质量（180±20）g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，饲养于广西中医药大学科学实验中心动物房，实验动物生产许可证号 SCXK（湘）2019-0004。本研究经广西中医药大学科学实验中心伦理委员会批准（伦理号 DW20230425-105）。

1.2 药物 温肺降浊方由制附子 20 g（先煎）、党参 15 g、干姜 10 g、三七 10 g、酒大黄 10 g、炙甘草 6 g 组成，饮片均购于广西中医药大学第一附属医院门诊中药房，经广西中医药大学第一附属医院陈炜教授鉴定为正品。取各味药材，煎煮 2 次，取汁 200 mL，加热浓缩至生药量 1.5 g/mL，于 4℃ 保存备用。

1.3 试剂 高糖培养基、Gibco 优级胎牛血清（批号 11965118、10100147C，美国 Gibco 公司）；青链霉素混合液（批号 P1400，北京索莱宝科技有限公司）；Aβ₂₅₋₃₅（批号 GP10082，美国 GlpBio 公司）；PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn2 抗体（批号 ab308447、ab184247、ab42364、ab124773，英国 Abcam 公司）；三色预染蛋白 Marker 10~250 kDa（批号 WJ103，上海雅酶生物医药科技有限公司）；Alexa Fluor™ 488（批号 ZF-0511，北京中杉金桥生物技术有限公司）；CCK-8 试剂盒（批号 BS350B，北京兰杰柯科技有限公司）；Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液、QuickBlock™ 封闭液（批号 C1062L、P0023A、P0023D、P0220，上海碧云天生物技术有限公司）；Immobilon® -E PVDF 膜（批号 ISEQ0010，德国默克公司）。

1.4 仪器 MCO-5AC CO₂ 细胞培养箱（日本 Panasonic 公司）；Multiskan FC 全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；CX31 倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；垂直电泳转印系统、Gel Doc XR/ChemiDoc XRS 全自动化学发光凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 BV-2 细胞培养和传代 细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 90% 高糖培养基，置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养。当细胞汇聚率达到 70%~90% 时，PBS 振荡洗涤 2 次，弃上清，加胰蛋白酶 500 mL 进行消化。当细胞完全悬浮后加入完全培养基，终止胰蛋白酶消化，充分吹打，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，按 1：3~1：2 比例传代细胞，每 3 d 传代 1 次。

2.2 温肺降浊方含药血清制备 10 只 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后，灌胃给予温肺降浊方 11.8 mg/kg，每天 1 次，连续 7 d。末次灌胃给药后 1 h，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉，无菌环境下腹主动脉采血，全血室温静置 30 min，5 000 r/min 离心 15 min，取上层血清，50℃ 水浴灭活 30 min，于-80℃ 冰箱保存备用。含药血清使用时经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，并用 DMEM 培养基分别稀释至 5%、10%、20%。

2.3 造模 参照文献 [14] 报道，BV-2 细胞以 1×10⁵/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h，分别加入终浓度为 5、10、20 μmol/L 的 Aβ₂₅₋₃₅，以等量 PBS 缓冲液代替 Aβ₂₅₋₃₅ 作为正常组，每组设置 3 个复孔，继续培养 24、48 h，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 10 μL CCK-8，培养箱继续孵育 2 h，用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度，计算细胞存活率。以细胞存活率为 70%~80% 的 Aβ₂₅₋₃₅ 的浓度和时间点作为 AD 细胞模型最佳浓度和时间点。

2.4 分组和给药 实验分为对照组、模型组、LFHP-1c 组（抑制剂）、温肺降浊方含药血清组。细胞计数后，用 DMEM 基础培养基调整至所需细胞密度，于 6 孔板、96 孔板、T25 培养瓶中分别加入 2.5×10⁵/mL、1×10⁵/mL、4×10⁵/mL BV-2 细胞株，再加入 5 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅，培养 48 h，对照组和模型组给予 10% 高糖培养基培养；温肺降浊方含药血清组加入 20% 温肺降浊方含药血清，培养 48 h；LFHP-1c 组加入 10 μL 终浓度为 100 μg/mL 的 LFHP-1c 高糖培养基稀释液。LFHP-1c 作为一种特异性小分子 PGAM5 的抑制剂，可以有效抑制 PGAM5 的过度升高，从而减少 Drp1 的去磷酸化状态。

2.5 CCK-8 法检测温肺降浊方含药血清干预的最佳浓度和时间点 将 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 BV-2 细胞以 1×10⁵/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h，加入 5%、10%、20% 温肺降浊方含药血清，以等量 PBS 缓冲液作为正常组，每组设置 3 个复孔；继续培养 24 h，PBS 洗涤 2 次，每孔加 10 μL CCK-8，避光培养箱孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度，以确定温肺降浊方含药血清不同浓度及时间点对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 BV-2 细胞的影响。采用 CCK-8 法检测 5%、10%、20% 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞活力的影响，细胞分为 10% 胎牛血清组

(10% 胎牛血清)、10% 空白血清组 (10% 空白血清)、20% 空白血清组 (20% 空白血清)、5% 温肺降浊方含药血清 (5% 温肺降浊含药血清+5% 空白血清)、10% 温肺降浊方含药血清 (10% 温肺降浊含药血清) 和 20% 温肺降浊方含药血清 (20% 温肺降浊含药血清)。

2.6 Transwell 实验检测细胞迁移数量 用 20% 温肺降浊方含药血清处理 BV-2 细胞, 用 RPMI 无血清培养基调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 加入 Transwell 小室中, 将 500 μL DMEM 高糖培养基添加到 24 孔板中培养 48 h。取出 Transwell 小室, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色 5 min。观察染色细胞, 并用倒置显微镜进行拍照, 采用 Image J 8.0 软件进行数据分析。

2.7 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡数量 将 6 孔板中细胞胰酶消化后放置于 15 mL 无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 加入 Hoechst 33342 染色剂, 恒温培养箱孵育 20 min, 加入培养基进行吹打洗涤, 离心, 去除上清液, 重悬细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 3.5 cm^2 培养皿中, 于荧光倒置显微镜下观察细胞核形态、数量

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
PGAM5	GTCGGGAACAGGCTGAAC TC	TGGCAGGTGCTTACTGATGA
Drp1	GTTGAAGCAGAAGAATGGGG	CGAGAAAACCTTGAGATGGA
OPA1	TTCTTCACTGCGGGTACACCT	GCTTGTCACTTTCGGATCCATGA
Mfn1	GAATAATCGTTGGGATGCT	AACTCCTGTAATCTTGCTGA
Mfn2	TGTCTTGAAATGCGGGAA	CTTGAGGACAACTGGGGA
GAPDH	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	AGCCCAGGATGCCCTTTACT

2.10 Western blot 法检测 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1/2 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解各组细胞, 提取蛋白, BCA 法检测蛋白含量, 取等质量蛋白进行变性, 加入蛋白上样缓冲液后冻存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶, 上样, 电泳, 湿转法转移至 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, 分别加入 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1、Mfn2 (1 : 3 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日加入二抗 (1 : 8 000) 室温孵育 1 h, 使用全自动化学发光图像分析系统显影, 以 GAPDH 为内参, 通过 Image J 软件计算蛋白相对表达。

2.11 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 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。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

和荧光强度。凋亡细胞核固缩、核膜裂解, 细胞形态损坏, 凋亡细胞呈现浓集的亮蓝色形态。

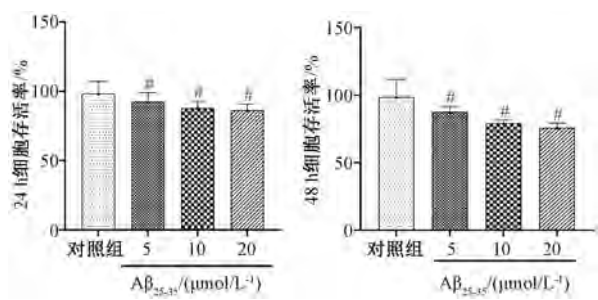
2.8 免疫荧光染色检测细胞 PGAM5、Drp1 阳性细胞表达量 将每组细胞分别洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 洗涤 3 次, 内源性过氧化物酶封闭液阻断 15 min, 洗涤 3 次, 0.01% Triton 100 通透 10 min, 洗涤 3 次, 5% BSA 封闭 1 h, 加入 PGAM5、Drp1 一抗 (1 : 100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤 3 次, 次日加入 Alexa Fluor™ 488 (H+L) 孵育 1.5 h, 洗涤 3 次, 染核 8 min, 洗涤 3 次, 于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

2.9 RT-qPCR 法检测 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1/2 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA; 使用微量分光光度计测定总 RNA 浓度; 按照 TOLOBIO 反转录试剂盒进行逆转录反应; 使用 SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行扩增反应, 引物序列见表 1, 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行相对定量处理。

3 结果

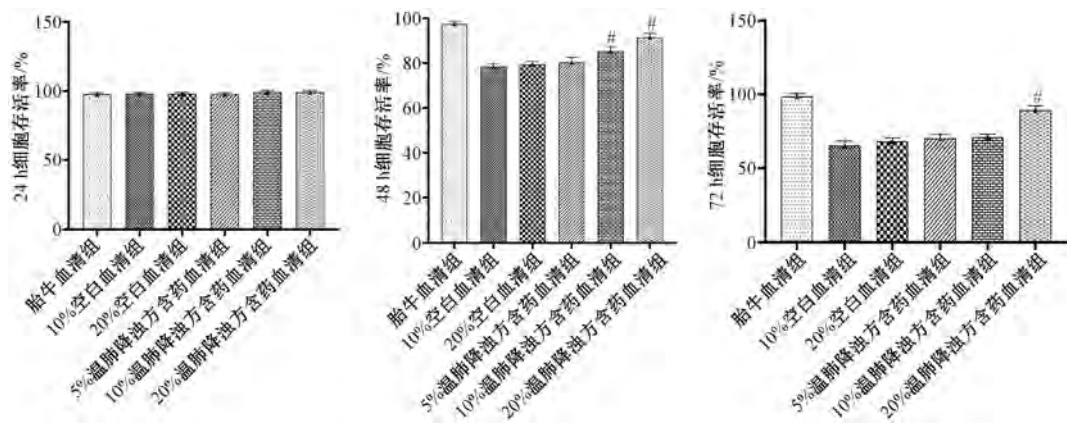
3.1 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 BV-2 细胞最佳终浓度及时间点 与对照组比较, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 干预 BV-2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率随着 $\text{A}\beta_{25-35}$ 浓度增加而降低, 以 5 $\mu\text{mol/L}$ 最佳, 见图 1。同时, 结合文献 [9] 报道, 本实验以细胞存活率在 80% 左右认定最佳。因此, 后续实验选择终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 干预 48 h。

3.2 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞存活率的影响 干预 24 h 后各组间细胞存活率并无显著差异 ($P > 0.05$); 干预 48 h 后, 与 10%、20% 空白血清组比较, 10%、20% 温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞存活率升高 ($P < 0.05$); 干预 72 h 后, 与 10%、20% 空白血清组比较, 20% 温肺降浊方含

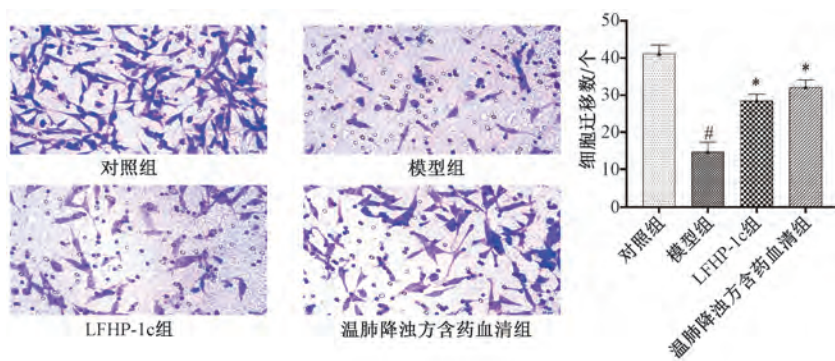


注：与对照组比较，[#]*P*<0.05。
图 1 Aβ₂₅₋₃₅诱导 BV-2 细胞最佳终浓度及时间点 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig.1 Optimal final concentration and time point of Aβ₂₅₋₃₅ induction in BV-2 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



注：与 10%、20% 空白血清组比较，[#]*P*<0.05。
图 2 温肺降浊方含药血清干预 BV-2 模型细胞活性最佳终浓度及时间点 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)
Fig.2 Optimal final concentration and time point for intervention of serum containing Wenfei Jiangzhuo Formula on cellular activity in the BV-2 cell model ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。
图 3 各组 BV-2 细胞迁移数量比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)
Fig.3 Comparison of the number of migrating BV-2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

模型组比较，LFHP-1c 组和温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞凋亡率降低 (*P*<0.05)，见图 4。

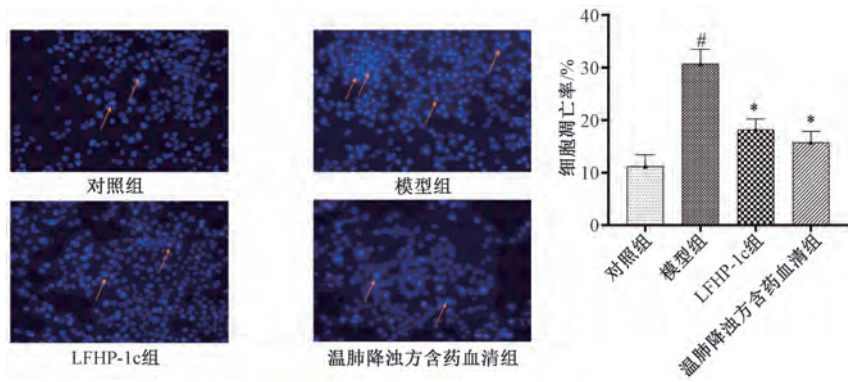
3.5 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 阳性细胞表达的影响 与对照组比较，模型

药血清组 BV-2 细胞存活率升高 (*P*<0.05)，且 48 h 温肺降浊方含药血清提升细胞活力效果最佳，见图 2。故后续选用 20% 温肺降浊方含药血清，并以 48 h 作为药物干预最佳时间点。

3.3 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞迁移数量的影响 与对照组比较，模型组 BV-2 细胞迁移数量减少 (*P*<0.05)；与模型组比较，LFHP-1c 组和温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞迁移数量增加 (*P*<0.05)，见图 3。

3.4 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞凋亡的影响 对照组中有少许亮蓝色阳性细胞，与对照组比较，模型组 BV-2 细胞凋亡率升高 (*P*<0.05)；与

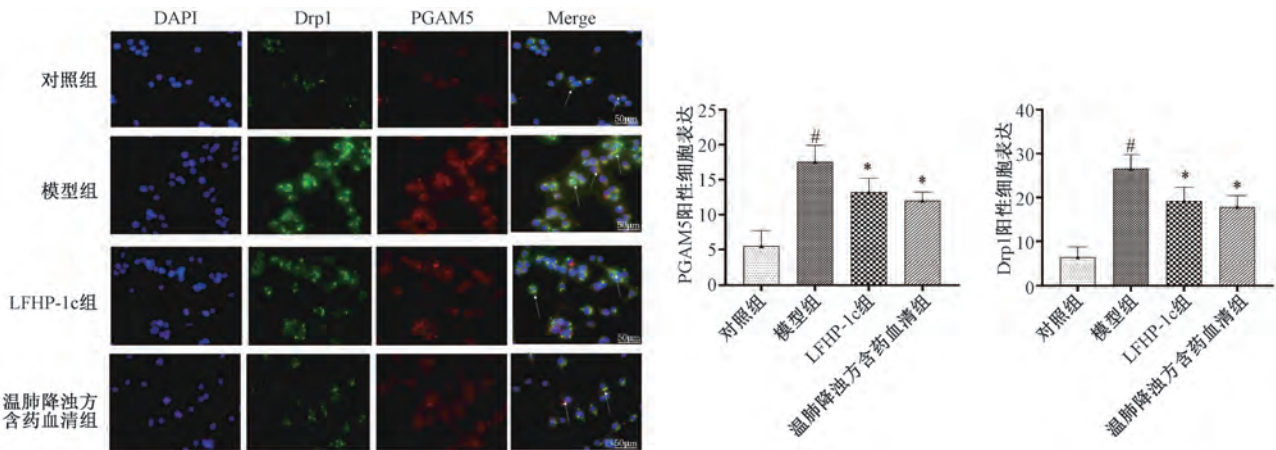
组 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 阳性细胞表达升高 (*P*<0.05)；与模型组比较，LFHP-1c 组和温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 阳性细胞表达降低 (*P*<0.05)，见图 5。



注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 4 各组 BV-2 细胞凋亡数量比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig. 4 Comparison of the number of apoptotic BV-2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



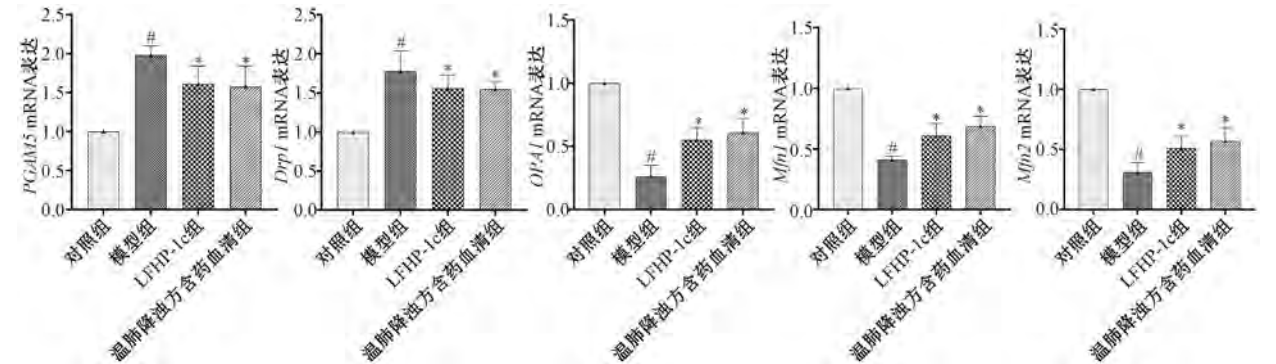
注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 5 各组 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 阳性细胞表达比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig. 5 Comparison of PGAM5 and Drp1 positive expressions in BV-2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

3.6 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞 *PGAM5*、*Drp1*、*OPA1*、*Mfn1*、*Mfn2* mRNA 表达的影响 与对照组比较，模型组 BV-2 细胞 *PGAM5*、*Drp1* mRNA 表达升高 (*P*<0.05)，*OPA1*、*Mfn1*、*Mfn2*

mRNA 表达降低 (*P*<0.05)；与模型组比较，LFHP-1c 组和温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞 *PGAM5*、*Drp1* mRNA 表达降低 (*P*<0.05)，*OPA1*、*Mfn1*、*Mfn2* mRNA 表达升高 (*P*<0.05)，见图 6。



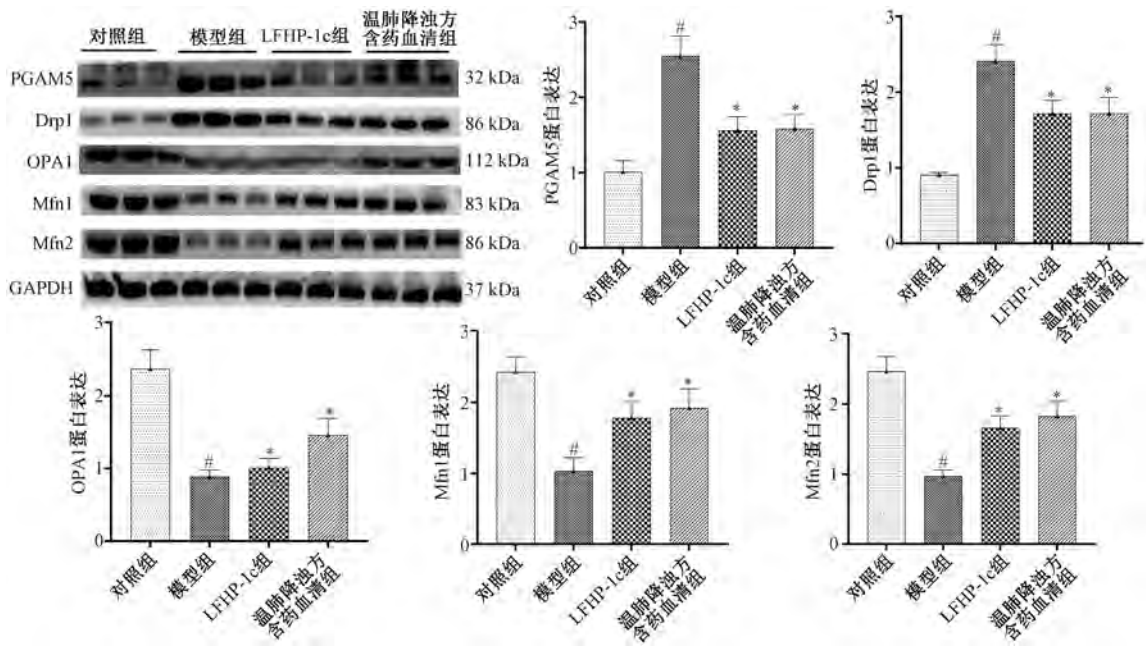
注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 6 各组 BV-2 细胞 *PGAM5*、*Drp1*、*OPA1*、*Mfn1*、*Mfn2* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig. 6 Comparison of *PGAM5*, *Drp1*, *OPA1* and *Mfn1*, *Mfn2* mRNA expressions in BV-2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

3.7 温肺降浊方含药血清对 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1、Mfn2 蛋白表达的影响 与对照组比较,模型组 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 蛋白表达升高 ($P<0.05$),OPA1、Mfn1、Mfn2 蛋白表

达降低 ($P<0.05$);与模型组比较,温肺降浊方含药血清组 BV-2 细胞 PGAM5、Drp1 蛋白表达降低 ($P<0.05$),OPA1、Mfn1、Mfn2 蛋白表达升高 ($P<0.05$),见图 7。



注:与对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$

图 7 各组 BV-2 细胞内 PGAM5-Drp1 轴相关蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Comparison of the expressions of PGAM5-Drp1 axis-related proteins in BV-2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

在中医学古籍中并无明确信息提及老年痴呆的病名,但是对于痴呆的病因病机认识却十分广泛^[15]。多数医家流派认为,年迈体弱,病邪内耗,正气不存是发生老年痴呆的主要病因^[16]。此外,气血失调、痰浊瘀阻阻滞经脉亦是呆证加重的众多病理学因素^[17]。根据“阳化气,阴成形”理论,“痰、瘀”为阴成形太过表现,责之为元阳虚衰,需扶正祛邪^[18]。基于此,课题组推衍出“温肾益肺,祛瘀化痰”的中医治则治法(简称温肺降浊法),创立了温肺降浊方。方中制附子温肾化气,使水气上行;党参滋补五脏安精神,亦可监制附子温燥之气,更能助髓通脑;干姜温养肺气,可助附子温阳;三七活血化痰,运化周身血脉;酒大黄泻下之力缓弱,化痰之功尤增,荡涤肠胃,通利水谷,安和五脏;炙甘草调和诸药,缓急补中。诸药合用,标本同治,助阴阳和,达到拮抗脑损伤的目的。

线粒体作为细胞“动力室”,不仅为细胞提供 95% 的能量,而且还在各种细胞生物学过程中发挥重要作用^[19-21]。线粒体通过融合和分裂的过程,

控制着线粒体质量,当线粒体这种调节过程失衡,就会引起线粒体形态、数量及相关酶功能异常,从而引发多种神经退行性疾病的发生^[22-23]。PGAM5 是磷酸甘油酸变位酶超家族成员之一,是一种位于线粒体外膜的蛋白质。最新调查显示,PGAM5 在线粒体稳态平衡中占据重要地位,它可通过 Ser 637 位点的 Drp1 去磷酸化促进线粒体自噬性,引起线粒体的分裂,最终发生细胞死亡^[24]。此外,在线粒体外膜分裂之前,线粒体的内膜融合过程就已经启动。其外膜上线粒体融合蛋白 1/2 (Mfn1/2) 环状拉近其距离,在 ATP 被水解产生能量后完成外膜融合。随后,早老素相关菱形样蛋白 (PARL)、动力相关的 GTP 酶 (Mgm1p) 等融合相关的因子使神经萎缩相关蛋白 1 (OPA1) 降解为长短 2 种异构体,完成线粒体内膜的融合^[25]。最新证据指出,老年性痴呆大鼠组织内 OPA1 表达降低,引起 Drp1 表达升高;而抑制 Drp1 表达,使得 OPA1、Mfn1/2 蛋白表达升高,线粒体融合作用增强^[26]。因此,AD 的发生发展必定和线粒体动力学失衡相关,而调控 PGAM5-Drp1 轴对减轻线粒体分裂,增强线粒体融合至关重要。

本研究发现，经过抑制剂（LFHP-1c）和 20% 温肺降浊方含药血清干预后，细胞迁移数量增加，凋亡细胞减少，PGAM5、Drp1 阳性表达、蛋白及 mRNA 表达降低，OPA1、Mfn1/2 蛋白及 mRNA 表达升高，且温肺降浊方含药血清的药效作用更为显著。结果提示，温肺降浊方可以调控 PGAM5-Drp1 信号轴减轻 BV-2 细胞损伤，改善线粒体稳态平衡，从而提高认知水平，发挥脑保护效应。

参考文献：

[1] 曾星开, 薛中峰. 自噬在阿尔茨海默病中的作用及中医药研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (3): 273-282.

[2] Tian Z M, Ji X M, Liu J. Neuroinflammation in vascular cognitive impairment and dementia: current evidence, advances, and prospects[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6224.

[3] Wang W Z, Qiao O, Ji H X, *et al.* Autophagy in vascular dementia and natural products with autophagy regulating activity[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105756.

[4] 魏江平, 代 渊, 文跃强, 等. 从“阳化气, 阴成形”理论探讨阿尔茨海默症病机演变规律[J]. 中医杂志, 2018, 59(24): 2099-2102; 2106.

[5] 任北大, 王庆国, 程发峰, 等. 探讨阿尔茨海默病/血管性痴呆异病同治的炎症机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3116-3122.

[6] 郑国庆. 阿尔茨海默病源性轻度认知损害中西医结合防治[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(2): 143-147.

[7] 田文国, 王春芳, 陈金鹏, 等. 中药抗阿尔茨海默病的作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53 (10): 3195-3208.

[8] Wang X X, Zhang B, Xia R, *et al.* Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9601-9614.

[9] 庞燕梅, 周福军, 胡跃强, 等. 基于药效筛选和正交试验优化温肺降浊方的提取工艺[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2420-2425.

[10] 胡跃强, 向军军, 赖菁菁, 等. 从线粒体相关凋亡蛋白表达探讨温肺降浊方对 VD 大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中医药通报, 2017, 16(2): 59-62.

[11] 吴 林, 唐 农, 麻小梅, 等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区神经元凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(20): 5074-5077.

[12] Feng L, He H J, Xiong X, *et al.* Plasma-derived phosphoglycerate mutase 5 as a biomarker for Parkinson’s

disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 1022274.

[13] Yao R Q, Ren C, Xia Z F, *et al.* Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles[J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 385-401.

[14] Oh S J, Park K, Sonn S K, *et al.* Pancreatic β -cell mitophagy as an adaptive response to metabolic stress and the underlying mechanism that involves lysosomal Ca^{2+} release[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(9): 1922-1932.

[15] 畅苏瑞, 刘剑刚, 赵三虎, 等. 从中医五脏整体观探讨老年性痴呆的病因病机[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(11): 2106-2109.

[16] 林 龙, 吴 林, 劳伟林, 等. 中医药复方干预血管性痴呆的作用及机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (6): 111-114.

[17] 唐 农. 论人体内阳外阴本体结构理论与扶阳学派核心思想的贯通[J]. 中医杂志, 2017, 58(23): 1981-1984.

[18] 苏嘉楠, 敖玉涵, 安继仁, 等. 中医痴呆病位、病因、病机制论框架结构研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(10): 125-129.

[19] Cheng M Y, Lin N, Dong D L, *et al.* PGAM5: A crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death[J]. *Eur J Cell Biol*, 2021, 100(1): 151144.

[20] Gao C L, Xu Y Z, Liang Z Z, *et al.* A novel PGAM5 inhibitor LFHP-1c protects blood-brain barrier integrity in ischemic stroke[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 11(7): 1867-1884.

[21] Liang M Z, Ke T L, Chen L Y. Mitochondrial protein PGAM5 emerges as a new regulator in neurological diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 730604.

[22] Baba T, Tanimura S, Yamaguchi A, *et al.* Cleaved PGAM5 dephosphorylates nuclear serine/arginine-rich proteins during mitophagy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(7): 119045.

[23] Cui W W, Chen C H, Gong L Y, *et al.* PGAM5 knockout causes depressive-like behaviors in mice *via* ATP deficiency in the prefrontal cortex[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2): e14377.

[24] Zhong F X, Gan Y H, Song J Q, *et al.* The inhibition of PGAM5 suppresses seizures in a kainate-induced epilepsy model *via* mitophagy reduction[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1047801.

[25] Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(2): 933-949.

[26] Baker N, Wade S, Triolo M, *et al.* The mitochondrial protein OPA1 regulates the quiescent state of adult muscle stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(9): 1315-1332.