DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.023

加味柴胡疏肝汤激活RIP1/RIP3/MLKL信号通路抑制癫痫小鼠海马细胞坏死性凋亡

谢苗莹[1],曾榕[1],吴琼[2],陈江玮[1],梁霜[3],钟洁[3],罗玉珍[3],刁丽梅[3]
(1.广西中医药大学,广西 南宁 530200;2.信阳市中心医院,河南 信阳 464099;
3.广西中医药大学附属第一医院,广西 南宁 530200)

摘要:目的 探究加味柴胡疏肝汤通过RIP1/RIP3/MLKL通路对癫痫小鼠的调控作用。方法 将60只KM小鼠随机分为空白组、模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组、加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组。采用盐酸匹罗卡品制备癫痫模型,予加味柴胡疏肝汤19.52、39.04、78.08 g/(kg·d),卡马西平30 mg/(kg·d),连续灌胃2周,观察小鼠一般情况;脑电波情况;苏木素-伊红(HE)染色观察病理形态学改变;原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测神经细胞凋亡率;实时定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)及蛋白质印迹(Western Blot)检测小鼠海马组织RIP1、RIP3、MLKL、TNF-α、IL-1β、IL-6的mRNA和蛋白表达水平。结果 与空白组相比,模型组小鼠体质量明显降低;脑电图可以明显观测到连续发作的痫样波;HE染色可见较多神经元固缩,细胞体积减小,形态呈不规则状,胞核、胞质分界不清,染色加深;凋亡细胞阳性率明显提高;RIP1、RIP3、MLKL、TNF-α、IL-1β、IL-6mRNA和蛋白的相对表达量明显增高。各组经药物治疗之后,小鼠体质量较模型组稍有增加;脑电波痫性放电频次及强度明显减少;加味柴胡疏肝汤中剂量、加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组凋亡细胞阳性率明显低于模型组,差异有统计学意义;加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组的RIP1、RIP3、MLKL、TNF-α、IL-1β、IL-6mRNA和蛋白的相对表达量明显低于模型组,差异具有统计学意义。结论 加味柴胡疏肝汤可能通过RIP1/RIP3/MLKL信号通路发挥抗癫痫作用。

关键词:加味柴胡疏肝汤;癫痫;RIP1/RIP3/MLKL信号通路;坏死性凋亡
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0144-06

Modified Chaihu Shugan Decoction(加味柴胡疏肝汤) Activating RIP1/RIP3/MLKL Signaling Pathway and Inhibiting Necrotic Apoptosis of Hippocampal Cells in Epileptic Mice

XIE Miaoying[1],ZENG Rong[1],WU Qiong[2],CHEN Jiangwei[1],LIANG Shuang[3],ZHONG Jie[3],LUO Yuzhen[3],DIAO Limei[3]
(1. Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530200,Guangxi,China;
2. Xinyang Central Hospital,Xinyang 464099,Henan,China;
3. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530200,Jiangsu,China)

Abstract:*Objective* To investigate the regulatory effect of Modified Chaihu Shugan Decoction(加味柴胡疏肝汤) on epileptic mice through the protein kinases 1 (RIP1)/protein kinases 3(RIP3)/mixed lineage kinase domain-like protein(MLKL) pathway. *Method* Sixty KM mice were randomly divided into normal group,model group,low dose group of Modified Chaihu Shugan Decoction[19.52 g/(kg· d)],medium dose group of Modified Chaihu Shugan Decoction[39.04 g/(kg·d)],high dose group of Modified Chaihu Shugan Decoction[78.08 g/(kg·d)] and carbamazepine group[30 mg/(kg·d)]. Epilepsy models were prepared using pilocarpine hydrochloride. After continuous gavage for two weeks,the general condition and electroencephalogram(EEG) of the mice were observed. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe pathological and morphological changes. TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling(TUNEL) method was used to detect the apoptosis rate of neural cells. Quantitative real time polymerase chain reaction(qRT-PCR) and Western Blot(WB) measured the mRNA and protein expression levels of RIP1,RIP3,MLKL,tumor necrosis factor-α(TNF-α),interleukin-1β(IL-1β) and interleukin-6(IL-6) in the hippocampus of the mice. *Result* Compared with the normal group,the body weight of the model group mice was decreased significantly;EEG can clearly observe continuous epileptic waves;HE staining showed that many neurons were pyknotic,with reduced cell volume and irregular morphology. The boundaries between the nucleus and cytoplasm were unclear,and the staining deepened;The positive rate of apoptotic cells significantly increased;The relative expression levels of RIP1,RIP3,MLKL,TNF-α,IL-1β and IL-6 were significantly increased. After drug treatment,the weight of mice in each group increased slightly compared to that of the model group. The frequency and intensity of epileptic discharges in EEG waves were significantly reduced.

基金项目:国家自然科学基金项目(82360875);广西科技厅科技基地和人才专项(桂科AD22035168,桂科AD20238028)
作者简介:谢苗莹(1997-),女,浙江杭州人,硕士在读,研究方向:中西医结合脑病。
通讯作者:刁丽梅(1972-),女,山东黄县人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合脑病。E-mail:dlm721226@163.com。

The positive rates of apoptotic cells in the medium dose and high dose groups of Modified Chaihu Shugan Decoction and carbamazepine group were significantly lower than those in the model group, with statistical significance. The relative expression levels of mRNA and protein of RIP1, RIP3, MLKL, TNF－α, IL－1β and IL－6 in the high dose group of Modified Chaihu Shugan Decoction and the carbamazepine group were significantly lower than those of the model group, indicating statistical significance. *Conclusion* Modified Chaihu Shugan Decoction may exert its anti epileptic effect through the RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway.

Keywords: Modified Chaihu Shugan Decoction(加味柴胡疏肝汤); epilepsy; RIP1/RIP3/MLKL pathway; necroptosis

癫痫是一种由多种原因引起的脑部神经元异常放电所导致的短暂脑功能障碍，具有发病率高、复发率高、耐药等特点[1-2]，临床上多结合电生理、病因和共病因素共同诊断[3]。坏死性凋亡是一种与炎症有关的新型细胞死亡形式，是癫痫持续状态后神经元坏死的作用机制[4]，当细胞凋亡被抑制时，受体相互作用蛋白激酶 1 和 3(RIP1、RIP3)以及混合谱系激酶结构域样(MLKL)蛋白在坏死体激活和坏死性凋亡诱导之前被磷酸化[5]。加味柴胡疏肝汤是“从肝论治”的代表方之一，前期实验证实加味柴胡疏肝汤对癫痫有确切的治疗作用，可有效改善癫痫脑电图的异常情况，抑制癫痫的发生发展[6-7]。因此，本研究基于此，探究加味柴胡疏肝汤通过 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路对癫痫小鼠的治疗效果，为临床治疗癫痫提供一定思路。

1 材料

1.1 *实验动物* 健康雄性 KM 小鼠 70 只(其中 10 只为造模备用)，6～8 周龄，25～30 g，由广西中医药大学实验动物中心提供。饲养于 SPF 级广西中医药防治医学分子生物重点实验室动物中心，温度 22～25 ℃，相对湿度 45%～65%，12 h/12 h 日夜光照条件下饲养。

1.2 *实验药物* 实验中所有中药材由广西中医药大学附属第一医院中药房提供，加味柴胡疏肝汤组成：柴胡 15 g，白芍 15 g，枳壳(麸炒)10 g，炙甘草 6 g，川芎 10 g，香附 10 g，陈皮(醋炒)9 g，浙贝母 15 g，生牡蛎(先煎)30 g，钩藤(后下)10 g。采用自动煎药机煎煮，药物浓度浓缩至 500 mg/mL。卡马西平片(杭州赛诺菲制药有限公司)制作成 30 mg/(kg·d)的混悬液。

1.3 *主要实验试剂及仪器* trizol(Life Technologies 公司，货号 343903)；普通 RNA 反转录试剂盒(TAKARA 公司，货号 RR047)；qPCR 试剂盒(TAKARA 公司，货号 RR820)；GAPDH：上游：ACCACAGTCCATGCCATCAC，下游：TCCACCACCCTGTTGCTGTA，片段长度 432 bp[生工生物工程(上海)股份有限公司]；其余引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司合成：RIP1：上游：AAGACCCAGATAGATGTCCCA，下游：CTCACTTCTTTCTGCTTGTTGTC，片段长度 227 bp；RIP3：上游：CATCTTCTGACCCCCTCCCT，下游：GCCCTGTCATTGGATTCGGT，片段长度 177 bp；MLKL：上游：ATACAGGCTACACCATTCGG，下游：CTCTGCTTTAGTGCTCTTTGC，片段长度 151 bp；TNF－α：上游：CCCACGTCGTAGCAAACCAC，下游：ACAAGGTACAACCCATCGGC，片段长度 102 bp；IL－1β：上游：GCCACCTTTTGACAGTGATG，下游：CACAGCCACAATGAGTGATACT，片段长度 178 bp；IL－6：上游：CACTACAGGCTCCGAGATGA，下游：CGTTGCTTGGTTCTCCTTGT，片段长度：142 bp。Anti－GAPDH(Servicebio 公司，GB15004)；Anti－RIP1、Anti－RIP3、Anti－TNF－α、Anti－IL－1β(武汉三鹰，17519－1－AP、17563－1－AP、26405－1－AP、26048－1－AP)；Anti－MLKL、Anti－IL－6(Affinit，DF7412、DF6087)HRP－山羊抗兔二抗(Servicebio 公司，GB23303)。荧光定量 PCR 仪(Roche 公司，RocheLightCycler 480 Ⅱ)；多功能成像仪(GE 公司，AI600)。

2 方法

2.1 *模型制备* 癫痫小鼠模型制备参考文献[8]，将 70 只 KM 小鼠按随机数字表法分为空白组(10 只)和模型组(60 只)，模型组腹腔注射 17 mg/kg 的硫酸阿托品，30 min 后腹腔注射 180 mg/kg 的盐酸匹罗卡品制备模型。注射 30 min 后参照经典 Racine(1972)的实验动物痫性发作标准[9]观察小鼠，对未达 4 级标准的小鼠每隔 15 min 给予首剂 1/3 剂量的匹罗卡品追加注射，追加 2 次后仍未达到 4 级以上痫性发作则视为造模失败，不纳入后续行为学观察及指标检测。痫性发作持续 1 h 后给予地西泮终止痫性发作[10]。将造模成功的小鼠按照随机数字表法分为模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组、加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组，每组 10 只，中药组分别给予中药 19.52、39.04、78.08 g/(kg·d)，西药组给予卡马西平 30 mg/(kg·d)，连续灌胃 2 周。

2.2 *观察小鼠一般情况* 包括小鼠精神情况、体质量、毛发、饮食等一般情况。

2.3 *脑电图检测各组小鼠脑电波情况* 将小鼠麻醉后固定四肢，使用脑立体定位仪定位，手持颅钻在小鼠左右颞侧开窗，大小约 2 mm×2 mm，暴露脑组织，将电极针插入颞骨表面，连接同侧耳电极，待稳定后监测脑电图波变化情况。设定纸速为 3 cm/s，敏感度 100 μV/cm。通过 NCERP 5.01 数据分析软件记录小鼠皮层脑电图。

2.4 *各组小鼠标本采集* 灌胃 2 周后麻醉处死小鼠，一部分取全脑，固定于 4% 的多聚甲醛中，后续进行苏木素－伊红(HE)染色及原位末端转移酶标记技术(TUNEL)观察病理学改变。另一部分取小鼠海马，冻存于－80 ℃冰箱，后续运用实时定量反转录聚合酶链式反应(qRT－PCR)、蛋白质印迹(Western blot)技术检测相关 mRNA 及蛋白表达水平。

2.5 *病理学观察* 将小鼠大脑组织置于适量 4% 多聚甲醛中固定，石蜡切片，小鼠海马区脑组织经 HE 染色，光学显微镜观察病理形态学改变。

2.6 *TUNEL 法检测神经细胞凋亡率* 取已制备好的组织，经石蜡包埋、切片，二甲苯脱蜡及乙醇脱水，蛋白酶 K 消化后，加入 TUNEL 反应混合液 50 μL 于标本上在暗湿盒中反应 37 ℃×30 min，在组织处加 50～100 μL DAB 底物进行核染，反应 15～25 ℃×10 min，拍照后苏木素复染，封片镜检。

2.7 *qRT－PCR 检测各组小鼠海马组织 RIP1、RIP3、MLKL、TNF－α、IL－1β、IL－6 mRNA 的表达水平* 取小鼠海马组织，运用 trizol 法提取总 RNA，测定 RNA 浓度及纯度，逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行扩增，扩增程序为：95 ℃/30 s；40 cycles：5 ℃/5 s；60 ℃/20 s；95 ℃/0 s；60 ℃/15 s；95 ℃/0 s。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对结果进行分析。

2.8 *Western Blot 检测各组小鼠海马组织 RIP1、RIP3、MLKL、TNF－α、IL－1β、IL－6 的蛋白表达水平* 取小鼠海马组织提

取蛋白,运用 BCA 法测定蛋白浓度,根据目的蛋白大小配制不同浓度的胶,电泳转膜,5% 脱脂牛奶封闭,4 ℃孵育一抗过夜,GAPDH、RIP1、RIP3、MLKL、TNF-α、IL-1β、IL-6(1∶1000),TBST 清洗 5 次,二抗(1∶5000)常温孵育 1 h,ECL 显影液显影,以 GAPDH 为内参进行分析。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布以及方差齐性的,多组间比较采用单因素方差分析。不符合的多组间采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 空白组小鼠形体正常,精神状态佳,皮毛致密,光泽可,进食饮水正常。造模后小鼠形体瘦小,体质量较空白组减轻,毛发少泽,精神差,饮食饮水减少,时有节律性点头动作,伴嘴角流涎。给药组治疗 2 周后,小鼠精神状态好转,体质量较模型组略增加,但均未达空白组水平。各组体质量见表 1。

表 1 各组小鼠体质量情况($\bar{x} \pm s$) 单位:g

组别	n	造模前体质量	造模后体质量	给药后体质量
空白组	10	33.01 ± 1.36	40.34 ± 2.69	45.13 ± 3.95
模型组	10	33.36 ± 1.31	37.57 ± 1.59 *	37.97 ± 1.01 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	34.42 ± 1.50	37.44 ± 1.60 *	38.84 ± 1.96 *
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	33.87 ± 1.34	36.21 ± 2.18 *	39.33 ± 1.62 *
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	34.11 ± 1.36	36.62 ± 1.49 *	39.73 ± 1.62 *
卡马西平组	10	34.36 ± 0.87	35.87 ± 1.35 *	40.25 ± 1.44 *

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

3.2 各组小鼠脑电图情况 与空白组小鼠脑电图相比,模型组小鼠脑电图可以明显观测到连续发作的痫样波,以高频次节律性的多棘波、尖波为主。其余组与模型组相比,脑电波痫性放电频次及强度明显减少,其中卡马西平组最明显,其余依次为加味柴胡疏肝汤高剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组、加味柴胡疏肝汤低剂量组。见图 1。

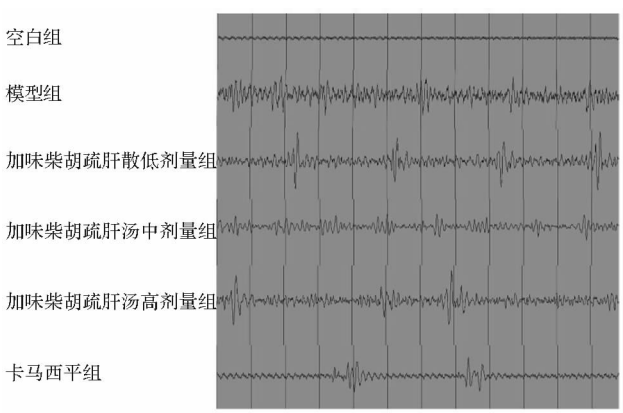


图 1 各组小鼠脑电图

3.3 小鼠海马神经元细胞 HE 染色情况 空白组和卡马西平组小鼠神经元形态规则,排列整齐密集,胞核大而圆,染色质少,核仁明显,均未见明显异常。模型组和加味柴胡疏肝汤低剂量组可见较多神经元固缩,细胞体积减小,形态呈不规则状,胞核、胞质分界不清,染色加深。加味柴胡中剂量组及高剂量组偶见神经元固缩,细胞体积减小,形态呈不规则状,胞核、胞质分界不清,染色加深。见插页 XXX 图 2。

3.4 各组小鼠 TUNEL 染色结果 与模型组相比,加味柴胡疏肝汤中剂量、加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组凋亡细胞阳性率降低,差异有统计学意义。见表 2。

3.5 各组小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的 mRNA 表达水平 模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组的 RIP1、RIP3、MLKL 的 mRNA 的相对表达量明显高于空白组,有统计学意义。加味柴胡疏肝汤中剂量组、加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组的 RIP1、RIP3、MLKL 的 mRNA 的相对表达量明显低于模型组,具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤低剂量组的 RIP3、MLKL 的 mRNA 的相对表达量明显低于模型组,差异具有统计学意义。见表 3。

表 2 各组小鼠凋亡细胞阳性率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡细胞阳性率/(%)
空白组	10	9.09 ± 4.50
模型组	10	39.03 ± 0.44 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	29.59 ± 2.35 *
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	28.82 ± 6.50 *△
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	24.39 ± 0.77 *△
卡马西平组	10	18.79 ± 1.70 *△

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

表 3 各组小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RIP1	RIP3	MLKL
空白组	10	0.14 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.05 ± 0.02
模型组	10	1.01 ± 0.15 *	1.01 ± 0.16 *	1.00 ± 0.08 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	0.69 ± 0.13 *	0.69 ± 0.05 *△	0.55 ± 0.17 *△
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	0.52 ± 0.22 *△	0.63 ± 0.05 *△	0.35 ± 0.04 *△
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	0.41 ± 0.06△	0.47 ± 0.06△	0.27 ± 0.02△
卡马西平组	10	0.35 ± 0.01△	0.40 ± 0.05△	0.19 ± 0.04△

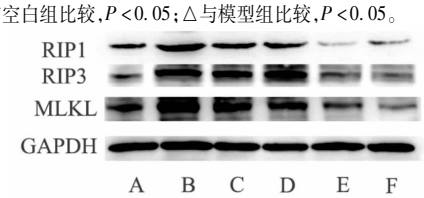
注:* 与空白组比较,$P < 0.05$;△与模型组比较,$P < 0.05$。

3.6 各组小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的蛋白相对表达量 模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组的 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白的相对表达量明显高于空白组,具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组的 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白的相对表达量明显低于模型组,具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组的 RIP1 蛋白的相对表达量明显低于模型组,差异具有统计学意义。见表 4、图 3。

表 4 各组小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RIP1	RIP3	MLKL
空白组	10	0.43 ± 0.01	0.38 ± 0.08	0.38 ± 0.04
模型组	10	0.94 ± 0.11 *	0.89 ± 0.04 *	0.94 ± 0.09 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	0.66 ± 0.06 *△	0.75 ± 0.02 *	0.79 ± 0.18 *
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	0.70 ± 0.03 *△	0.73 ± 0.01 *	0.78 ± 0.08 *
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	0.57 ± 0.04△	0.51 ± 0.08△	0.48 ± 0.11△
卡马西平组	10	0.54 ± 0.03△	0.49 ± 0.18△	0.44 ± 0.11△

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



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为加味柴胡疏肝汤低剂量组;D 为加味柴胡疏肝汤中剂量组;E 为加味柴胡疏肝汤高剂量组;F 为卡马西平组。

图 3 各组小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的蛋白相对表达量

3.7 各组小鼠海马组织中 TNF－α、IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量 模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组的 TNF－α、IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量明显高于空白组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤中剂量组的 IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量明显高于空白组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组的 TNF－α、IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量明显低于模型组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤中剂量组的 IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量明显低于模型组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤低剂量组的 IL－1β 的 mRNA 相对表达量明显低于模型组，具有统计学意义。见表 5。

表 5 各组小鼠海马组织中 TNF－α、IL－1β、IL－6 的 mRNA 相对表达量（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TNF－α	IL－1β	IL－6
空白组	10	0.13 ± 0.06	0.15 ± 0.12	0.16 ± 0.01
模型组	10	1.00 ± 0.12 *	1.00 ± 0.11 *	1.04 ± 0.36 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	0.71 ± 0.05 *	0.61 ± 0.09 *△	0.76 ± 0.10 *
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	0.69 ± 0.11△	0.54 ± 0.13 *△	0.72 ± 0.16 *
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	0.54 ± 0.11△	0.39 ± 0.09△	0.51 ± 0.10△
卡马西平组	10	0.36 ± 0.02△	0.17 ± 0.05△	0.24 ± 0.02△

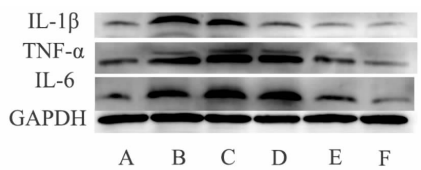
注：*与空白组比较，$P<0.05$；△与模型组比较，$P<0.05$。

3.8 各组小鼠海马组织中 TNF－α、IL－1β、IL－6 的蛋白相对表达量 模型组、加味柴胡疏肝汤低剂量组、加味柴胡疏肝汤中剂量组 TNF－α、IL－1β、IL－6 的蛋白相对表达量明显高于空白组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤中剂量组 TNF－α、IL－6 的蛋白相对表达量明显高于空白组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤高剂量组、卡马西平组 TNF－α、IL－1β、IL－6 的蛋白相对表达量明显低于模型组，具有统计学意义。加味柴胡疏肝汤中剂量组 IL－1β 蛋白相对表达量明显低于模型组，具有统计学意义。见表 6、图 4。

表 6 各组小鼠海马组织中 TNF－α、IL－1β、IL－6 的蛋白相对表达量（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TNF－α	IL－1β	IL－6
空白组	10	0.31 ± 0.07	0.23 ± 0.18	0.32 ± 0.12
模型组	10	0.82 ± 0.21 *	0.90 ± 0.08 *	0.83 ± 0.14 *
加味柴胡疏肝散低剂量组	10	0.77 ± 0.06 *	0.63 ± 0.16 *	0.79 ± 0.09 *
加味柴胡疏肝汤中剂量组	10	0.76 ± 0.15 *	0.51 ± 0.09△	0.78 ± 0.13 *
加味柴胡疏肝汤高剂量组	10	0.47 ± 0.11△	0.33 ± 0.20△	0.42 ± 0.07△
卡马西平组	10	0.38 ± 0.20△	0.20 ± 0.09△	0.33 ± 0.15△

注：*与空白组比较，$P<0.05$；△与模型组比较，$P<0.05$。



注：A 为空白组；B 为模型组；C 为加味柴胡疏肝汤低剂量组；D 为加味柴胡疏肝汤中剂量组；E 为加味柴胡疏肝汤高剂量组；F 为卡马西平组。

图 4 各组小鼠海马组织中 IL－1β、TNF－α、IL－6 的蛋白相对表达量

4 讨论

癫痫是一种常见的神经系统疾病，以反复发作及抑制性神经元和兴奋性神经元之间的同步破坏为特征[11]。全球有 1% ~2% 的人患有癫痫，影响超过 70 万人，除了癫痫疾病本身，患者还会出现一系列的社会、心理及经济方面的问题[12-13]。目前癫痫的治疗以西药为主，但调查显示有 20% ~30% 的患者对药物治疗无效，并且某些抗癫痫药物有一定的致畸风险[14]，而中医药不良反应弱、疗效佳，因此在治疗癫痫患者时应结合传统中医中药以增强抗癫痫的临床效果。

坏死性凋亡是程序性炎症细胞死亡的一种，由与细胞凋亡的相同刺激激发，死亡形态与坏死相似[15]，当参与细胞凋亡的半胱氨酸蛋白酶 8（Caspase－8）受到抑制时，RIP1 招募并磷酸化 RIP3，形成核小体，核小体磷酸化 MLKL 形成坏死体。MLKL 寡聚体转移到质膜中富含磷脂酰肌醇（PIP）的斑块上，形成大孔，通过离子内流、细胞膨胀和膜溶解导致细胞坏死并加重炎症反应，参与不同的生理病理过程[16]。坏死性凋亡本身可能是与癫痫有关的炎症祖细胞，另外癫痫发作可能会增强炎症前体，从而导致坏死性凋亡[17]。研究表明，坏死性凋亡可能与癫痫持续状态有关，RIP3 和 p－MLKL 的表达在幼年大鼠 SE 后 24 h 后增加，72 h 达到峰值，7 d 后下降，提示 MLKL 可能在癫痫持续状态下引起的坏死性凋亡中起到重要作用[18]。NecroX－7 是一种新型坏死抑制剂，对抗坏死损伤方面具有广泛的应用，通过清除线粒体 ROS，从而阻止坏死[19]，经 NecroX－7 处理后的颞叶癫痫小鼠海马神经胶质增生较少，并且 MLKL 和 p－MLKL 表达明显减弱，表明 NecroX－7 的抗癫痫的作用可能通过坏死性凋亡这一途径[4]。另外，中医药也能通过坏死性凋亡这一途径，改善癫痫所导致的脑部损伤。杜仲可以抑制 SE 大鼠海马组织中的 RIP1、MLKL 的表达，减少海马组织中凋亡神经元的数量[20]。经姜黄素治疗后的 SE 大鼠海马组织中凋亡的神经元较少，并且抑制 RIP1、MLKL 的高表达[5]。本研究表明，癫痫小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 及炎症因子高表达，提示坏死性凋亡可能在癫痫的发生发展中起到一定作用。

癫痫，中医病名为“痫病”，中医学认为，癫痫是由风、气、火、痰、瘀等病理因素导致人体气机逆乱、元神失控而发病[21]。《素问·至真要大论篇》提出“诸风掉眩，皆属于肝。”肝气失于疏泄条达，则容易产生风、痰、郁等病理因素，由此提出“从肝论治”的治则。“从肝论治”可以从调节气机的方向减轻由风生痰的几率，从而减少癫痫的发病[22]。加味柴胡疏肝汤在柴胡疏肝汤的基础上加以浙贝母、生牡蛎、钩藤，起到疏肝解郁，化痰熄风的功效。本课题组前期研究表明，加味柴胡疏肝汤在癫痫中可能通过抑制 lncRNA－UCA1 的表达来激活 miRNA－187 从而抑制 MAPK8/Wnt/β－catenin 细胞凋亡通路，对癫痫的发生发展起到抑制作用[23-25]。另外，加味柴胡疏肝汤可以激活癫痫小鼠海马组织中 miRNA－204 的表达，从而使 AKT/mTOR/P70S6K 通路磷酸化，降低自噬相关基因 ATG7、LC3Ⅱ的表达，减少癫痫小鼠海马神经元过度自噬和凋亡[6,8]。本研究显示，加味柴胡疏肝汤的治疗后，癫痫小鼠海马组织中 RIP1、RIP3、MLKL 及炎症因子的高表达得到抑制，提示加味柴胡疏肝汤可能通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路，对癫痫的治疗起到一定作用。

加味柴胡疏肝汤由柴胡、白芍、枳壳、川芎、香附、陈皮、浙贝母、生牡蛎、钩藤、炙甘草组成。君药柴胡可以通过调节 TREM2/NF－κB/IκBα 通路以抑制神经炎症，从而改善大鼠的癫痫状态和癫痫持续状态[26]，另外柴胡的多糖成分可以激活 PI3K/Akt/GSK－3β 通路和癫痫中的氧化应激来上调 TREM2 以减轻神经元凋亡[27]。臣药川芎抗癫痫的主要成分为川芎

嗪,川芎嗪通过降低凋亡因子 Bim、炎症因子 IL-2、IL-6 和 TNF-α 的表达和增强海马神经元细胞黏附分子-140(NCAM-140)表达对神癫痫起到治疗作用[28]。香附提取物可能通过增加 GABA 的表达水平起到具有预防 PTZ 引起的癫痫发作、抗氧化活性的潜在作用[29]。芍药苷是从芍药中提取的萜类糖苷化合物,芍药苷孵育可阻断原代培养海马神经元中的 Na^+ 电流和谷氨酸诱导的细胞内 Ca^{2+} 水平增加、膜去极化和神经元死亡,从而发挥抗癫痫作用[30]。钩藤碱为钩藤的主要成分之一,GENG H 等[31]通过网络药理学,发现钩藤碱是一种安全可靠的多靶点抗癫痫的化合物,钩藤碱可能通过感觉知觉调控、转运调控、cGMP 分解代谢过程、系统过程调控、铁转运等靶点,参与吗啡成瘾、神经活性配体受体相互作用、肾素分泌和 cGMP-PKG 信号通路起到抗癫痫作用。以上研究表明,加味柴胡疏肝汤可能通过多途径治疗癫痫,并且具有疗效好,不良反应较小等特点。

本研究显示,加味柴胡疏肝汤可以通过调控 RIP1/RIP3/MLKL 通路,抑制 TNF-α、IL-1β、IL-6 炎症因子的表达,改善癫痫小鼠海马组织凋亡率,以起到抗癫痫作用。

参考文献

[1] DIAO L M, YU H C, WANG S G, et al. MicroRNA-187 inhibits pentylenetetrazol-induced neuronal apoptosis and alleviates development of epilepsy in epileptic rats by regulating SPRY1 expression [J]. Trop J Pharm Res, 2021, 18(9): 1823-1829.

[2] HUANG L Y, XIAO W J, WANG Y, et al. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in epileptogenesis: an update on abnormal mGluRs signaling and its therapeutic implications[J]. Neural Regen Res, 2024, 19(2): 360-368.

[3] MANFORD M. Recent advances in epilepsy[J]. J Neurol, 2017, 264(8): 1811-1824.

[4] ROH Y, LEE S B, KIM M, et al. Alleviation of hippocampal necroptosis and neuroinflammation by NecroX-7 treatment after acute seizures[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1187819.

[5] WANG J, LIU Y, LI X H, et al. Curcumin protects neuronal cells against status-epilepticus-induced hippocampal damage through induction of autophagy and inhibition of necroptosis[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(5): 501-509.

[6] 汪顺贵,玉倩,李华霞,等. 加味柴胡疏肝汤调控 miR-204 对急性癫痫小鼠海马 AKT/mTOR/P70S6K 通路和脑电图的影响[J]. 时珍国医国药,2020,31(2): 273-276.

[7] 李华霞,玉倩,汪顺贵,等. 柴胡疏肝汤加减联合抗癫痫药治疗癫痫的疗效及安全性 Meta 分析[J]. 中华中医药学刊,2020,38(8): 151-156.

[8] 汪顺贵,玉倩,李华霞,等. 加味柴胡疏肝汤调控 miRNA-204 对癫痫小鼠海马自噬的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(22): 1-7.

[9] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. Ⅱ. Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 281-294.

[10] LU J, ZHOU N N, YANG P, et al. MicroRNA-27a-3p downregulation inhibits inflammatory response and hippocampal neuronal cell apoptosis by upregulating mitogen-activated protein kinase 4 (MAP2K4) expression in epilepsy: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8499-8508.

[11] KHAN R, CHATURVEDI P, SAHU P, et al. Role of potassium ion channels in epilepsy: focus on current therapeutic strategies[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2024, 23(1): 67-87.

[12] SANTOS V R, TILELLI C Q, FERNANDES A, et al. Different types of *Status Epilepticus* may lead to similar hippocampal epileptogenesis processes[J]. IBRO Neurosci Rep, 2023, 15: 68-76.

[13] THIJS R D, SURGES R, O'BRIEN T J, et al. Epilepsy in adults[J]. Lancet, 2019, 393(10172): 689-701.

[14] ALI A. Global health: epilepsy[J]. Semin Neurol, 2018, 38(2): 191-199.

[15] GAO W T, WANG X Y, ZHOU Y, et al. Autophagy, ferroptosis, pyroptosis, and necroptosis in tumor immunotherapy[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 196.

[16] YAN J, WAN P, CHOKSI S, et al. Necroptosis and tumor progression[J]. Trends Cancer, 2022, 8(1): 21-27.

[17] MOHSENI-MOGHADDAM P, KHALEGHZADEH-AHANGAR H, ATABAKI R. Role of necroptosis, a regulated cell death, in seizure and epilepsy[J]. Neurochem Res, 2024, 49(1): 1-13.

[18] CAI Q Y, GAN J, LUO R, et al. The role of necroptosis in status epilepticus-induced brain injury in juvenile rats[J]. Epilepsy Behav, 2017, 75: 134-142.

[19] HWANG I C, KIM J Y, KIM J H, et al. Therapeutic potential of a novel necrosis inhibitor, 7-amino-indole, in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Hypertension, 2018, 71(6): 1143-1155.

[20] WANG J, LI Y, HUANG W H, et al. The protective effect of aucubin from *Eucommia ulmoides* against status epilepticus by inducing autophagy and inhibiting necroptosis[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(3): 557-573.

[21] 高蕾,史正刚,高旅,等. 中医药调控神经递质治疗癫痫的研究进展[J]. 中医儿科杂志,2023,19(3):101-106.

[22] 付伶俐,惠波波,张晓乐,等. 中医药治疗难治性癫痫研究进展[J]. 河北中医,2023,45(7): 1227-1232.

[23] 吕婷婷,李瑞暖,李洁玉,等. 加味柴胡疏肝汤对急性癫痫小鼠海马 miR-187/Wnt/β-catenin 信号通路表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2023,41(9):89-93,275-276.

[24] 李瑞暖,谢苗莹,曾榕,等. 基于 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 通路探讨加味柴胡疏肝汤治疗癫痫作用机制[J]. 中国中西医结合杂志,2023,43(10):1205-1213.

[25] 汪顺贵,玉倩,李华霞,等. 加味柴胡疏肝汤调控 miR-204 影响癫痫小鼠海马神经元凋亡与 ATG7、LC3Ⅱ的表达[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(7):2154-2159.

[26] LI X M, LIU Y, WANG S Y, et al. Identification and potential mechanism of different components from the aerial part of *Bupleurum chinense* DC. for epileptic treatment[J]. Nat Prod Res, 2022, 36(23): 6137-6142.

[27] LI X M, LIU Y, WANG S Y, et al. The polysaccharides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC attenuate epilepsy-like behavior through oxidative stress signaling pathways[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7907814.

[28] 高代丽,李江川,季秀娜,等. 中药在抗癫痫中的应用及癫痫生物模型研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(10): 26-34.

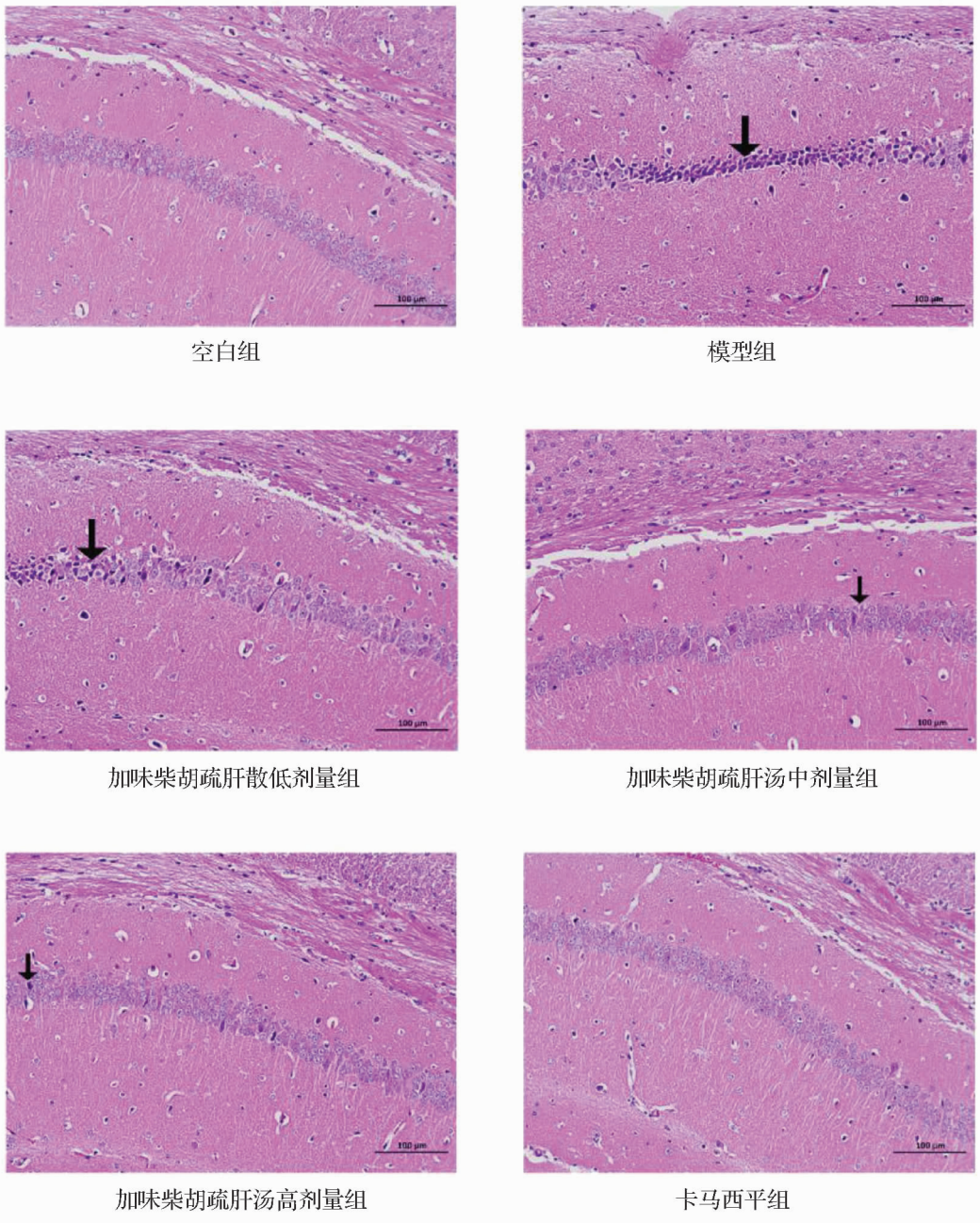
[29] HERRERA-CALDERON O, SANTIVÁÑEZ-ACOSTA R, PARI-OLARTE B, et al. Anticonvulsant effect of ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. leaves on pentylenetetrazol induced seizure in mice[J]. J Tradit Complement Med, 2018, 8(1): 95-99.

[30] HONG H X, LU X, WU C S, et al. A review for the pharmacological effects of paeoniflorin in the nervous system[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 898955.

[31] GENG H, CHEN X, WANG C. Systematic elucidation of the pharmacological mechanisms of Rhynchophylline for treating epilepsy via network pharmacology[J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 9.

加味柴胡疏肝汤激活 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路抑制癫痫小鼠海马细胞坏死性凋亡

（正文见 144－148 页）



注：箭头表示阳性结果。

图 2　各组小鼠造模后海马神经组织变化（HE 染色）