

· 经典名方 ·

当归芍药散通过调控NLRP3/Caspase-1信号通路抑制 AD大鼠神经炎症的作用

宋祯彦, 夏小芳, 王玉珂, 郑雨珊, 陈佩莹, 罗德勇, 贺春香, 于文静, 李平*, 成绍武*
(湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:研究当归芍药散对 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂($A\beta_{1-42}$)诱导的阿尔茨海默病(AD)大鼠模型的神经保护作用及对NOD样受体3(NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)信号通路的调控作用。方法:大鼠脑内注射 $A\beta_{1-42}$ 构建AD动物模型,给予不同浓度的当归芍药散治疗。实验分为假手术组,模型组,当归芍药散高、中、低剂量干预组。Morris水迷宫实验检测动物学习记忆能力;苏木素-伊红(HE)染色和高尔基染色检测神经元形态功能;免疫荧光共定位检测NLRP3炎症小体活化情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-18 mRNA表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠学习记忆能力显著降低($P<0.01$);神经元形态功能受损;炎症因子IL-1 β 和IL-18 mRNA表达升高, NLRP3炎症小体活化增加, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,给予当归芍药散中、高剂量干预后,AD大鼠学习记忆能力明显增加($P<0.05, P<0.01$);神经元形态功能明显恢复;炎症因子IL-1 β 和IL-18 mRNA表达显著降低, NLRP3炎症小体活化减少, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:当归芍药散可能通过调控NLRP3/Caspase-1信号通路抑制炎症小体活化,抑制神经炎症反应,从而发挥神经保护作用。

[关键词] 当归芍药散; 阿尔茨海默病(AD); β -淀粉样蛋白($A\beta$); NOD样受体3(NLRP3)炎症小体; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)19-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211802

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210728.1827.006.html>

[网络出版日期] 2021-07-29 10:51

Danggui Shaoyaoan Inhibits Neuroinflammation in AD Rats by Regulating NLRP3/Caspase-1 Pathway

SONG Zhen-yan, XIA Xiao-fang, WANG Yu-ke, ZHENG Yu-shan, CHEN Pei-ying,

LUO De-yong, HE Chun-xiang, YU Wen-jing, LI Ping*, CHENG Shao-wu*

(Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effect of Danggui Shaoyaoan (DSS) in a rat model of amyloid- β -peptide₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$)-induced Alzheimer's disease (AD) as well as its regulatory effect on

[收稿日期] 20210420(007)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774129);国家自然科学基金青年项目(82004184);湖南省自然科学基金青年项目(2019JJ50441);湖南省卫生健康委员会科研项目(202102042251);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放性基金项目(2019ZXYJH06,2020XYJH72);2021年度湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202110541049)

[第一作者] 宋祯彦, 硕士, 实验师, 从事中西医结合神经退行性疾病防治研究, E-mail: songzhenyan2013@hnuucm.edu.cn

[通信作者] *李平, 实验师, 从事中西医结合神经退行性疾病防治研究, Tel: 0731-88458257, E-mail: 373162392@qq.com;

*成绍武, 教授, 从事中西医结合神经退行性疾病防治研究, Tel: 0731-88458257, E-mail: scheng@hnuucm.edu.cn

NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) signaling pathway. **Method:** The AD animal model was established via intracerebral injection of $A\beta_{1-42}$ and treated with different concentrations of DSS after the division of rats into the sham operation group, model group, as well as the high-, medium-, and low-dose DSS groups. Morris water maze test was conducted to determine the learning and memory abilities of rats. The morphology and function of neurons were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining and Golgi staining, followed by immunofluorescence co-localization of NLRP3 inflammasome activation. The mRNA expression levels of interleukin (IL) -1 β and IL-18 were measured by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the sham operation group, the model group exhibited significantly decreased learning and memory abilities ($P<0.01$), impaired neuronal morphology and function, up-regulated IL-1 β and IL-18 mRNA expression, enhanced NLRP3 inflammasome activation, and elevated NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β protein expression ($P<0.01$). Compared with the model group, DSS at both medium and high doses remarkably improved the learning and memory abilities of AD rats ($P<0.05$, $P<0.01$), restored neuronal morphology and function, down-regulated the mRNA expression levels of inflammatory factors IL-1 β and IL-18, reduced the activation of NLRP3 inflammasomes, and lowered the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β ($P<0.01$). **Conclusion:** DSS inhibits inflammasome activation and neuroinflammatory response possibly by regulating the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, thus exerting the neuroprotective effect.

[Keywords] Danggui Shaoyaosan; Alzheimer's disease (AD); amyloid- β -peptide ($A\beta_{1-42}$); NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasomes; cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1)

阿尔茨海默病(AD)是一种以神经细胞死亡和进行性痴呆为特征的破坏性神经退行性疾病,目前普遍认为细胞外老年性斑块中 β -淀粉样蛋白($A\beta$)的积聚和微管相关Tau蛋白的异常磷酸化所导致的神经元内神经原纤维缠结的形成是AD发病的主要病理过程,但导致斑块所致神经元功能障碍的具体机制仍不清楚^[1]。由炎症小体激活引起的神经炎症反应在AD发病中起着重要作用^[2]。炎症小体是一种多蛋白复合物,主要表达于髓系细胞,是激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)及其两种底物白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-18(IL-18)的分泌所必需的^[3]。研究表明,NOD样受体3(NLRP3)炎症小体缺乏有利于小胶质细胞分化为M2(抗炎)表型,并导致APP/PS1小鼠中 $A\beta$ 沉积减少^[4]。因此,抑制NLRP3炎症小体的激活可能是治疗AD的有效途径。

当归芍药散出自张仲景的《金匮要略》,具有调肝养血,健脾利湿的功效,临床和实验研究显示该方能显著改善AD患者认知功能^[5-7]。课题组前期研究证明当归芍药散通过抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路降低AD细胞模型的炎症反应^[8]。本研究以大鼠脑内注射 $A\beta_{1-42}$ 构建AD模型,从NLRP3/Caspase-1途径介导的细胞焦亡探讨当归芍

药散对AD大鼠的神经保护作用。

1 材料

1.1 动物 60只SPF级SD大鼠,体质量(150 \pm 20)g购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004,动物饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,伦理审批号为LLBH-201912310001。动物分笼饲养(每笼3只),恒温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,用标准的啮齿动物饲料和水喂养,光照/黑暗周期为12h。

1.2 药物及试剂 当归芍药散方剂中所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科(批号191219),由药剂科主任戴冰教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》要求;阿魏酸、芍药苷、藁本内酯、白术内酯I(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为SF8030,SP8030,SL8120,SA8650);乙酰泽泻醇B(中国食品药品检定研究院,批号YZ-111846); $A\beta_{1-42}$ (美国Thermo Fisher Scientific公司,批号03112);NLRP3(北京博奥森公司,批号bs-10021R);IL-1 β ,微管蛋白(Tubulin),Caspase-1抗体(中国Affinity Biosciences公司,批号分别为AF5103,AF7010,AF5418);山羊抗兔二抗(美国Sigma-Aldrich公司,批号AP132P);SlowFadeTM Gold Antifade Mountant with DAPI,驴抗兔免疫球蛋白

白(Ig)G(H+L)高交叉吸附二抗, Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 546(美国 Invitrogen 公司, 批号分别为 S36942, A21206, A10040, A10040); 快速高尔基染色试剂盒(美国 FD Neuro Technologies 公司, 批号 PK401); 苏木素染液及伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 ZLI-9610, ZLI-9613); TRIzol(美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-026); 反转录 cDNA 试剂盒(美国 Promega 公司, 批号 A5001); SYBR 染料(莫纳生物科技有限公司, 批号 MQ00401S)。

1.3 仪器 Sorvall™ Legend™ Micro 17R 型微量离心机, HM355S 型石蜡切片机(美国 Thermo Fisher 公司); Gel Doc XR+ 型凝胶成像系统, CFX96Touch 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪, 1658033 型小型垂直电泳转印系统(美国 Bio-Rad 公司); A1+ 型激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司); TissueFAXS PLUS 型全景组织细胞定量分析系统(奥地利 Tissue Gnostics GmbH 公司)。

2 方法

2.1 药物制备及鉴定 当归芍药散采用水提法按照课题组前期已报道的方案制备冻干粉并测定主要成分含量进行质控^[9]。以张仲景著述的《金匱要略》中原方比例(当归-白芍-茯苓-白术-川芎-泽泻的比例为 3:16:4:4:8:8)称取药材共 200 g, 5 倍蒸馏水浸泡为 1.5 h, 武火煮沸 0.5 h, 小火煮 1 h, 收集滤液, 药物残渣按上述步骤用 3 倍蒸馏水再次提取滤液, 混合 2 次提取的滤液浓缩、真空冷冻干燥制备冻干粉。以阿魏酸、芍药苷、藁本内酯、白术内酯 I 和乙酰泽泻醇 B 为标准品鉴定当归芍药散冻干粉主要成分含量进行质控。

2.2 动物造模 将 $A\beta_{1-42}$ 10 mg 溶于 DMSO 中制备 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 取 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 100 μL 加入 DMEM 制成 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 d 使 $A\beta_{1-42}$ 老化, 注射前样品在 $14\ 000 \times g$ 离心 20 min 去除不溶性低聚物, 并将含有可溶性 $A\beta_{1-42}$ 低聚物的上清液转移到干净的离心管中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存^[10]。大鼠造模前禁食 12 h, 使用戊巴比妥钠麻醉, 参考《大鼠脑立体定位图谱》对大鼠双侧侧脑室各注 $5 \mu\text{L}$ $A\beta_{1-42}$, 假手术组注射等体积生理盐水。立体定位坐标为前-后(AP), 距前囟 0.8 mm; 内侧-外侧(ML), 距中线 $\pm 1.5 \text{ mm}$; 背腹侧(DV), 距颅骨表面 3.7 mm, 以 $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度注射 5 min, 注射完后留针 5 min。出针后往伤口涂碘伏, 并进行手术缝合, 动物保温至苏醒, 观察 24 h, 活动正常后放回 SPF 级实验室饲

养^[11-12]。以 Morris 水迷宫实验评价模型是否成功。

2.3 动物分组及给药 将 60 只 SD 大鼠分为 5 组, 分别为假手术组、模型组、当归芍药散干预低剂量组 ($12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 中剂量组 ($24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和高剂量组 ($36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 给药剂量根据体表面积换算及前期研究基础确定^[6, 13], 给予灌胃治疗, 假手术组和模型组灌胃等体积生理盐水。造模 2 d 后开始灌胃, 按上述剂量分 2 次灌胃(早 9 点, 晚 6 点), 治疗 7 d。

2.4 Morris 水迷宫实验 定位航行实验: 将 Morris 水迷宫平台按照方位分为 4 个象限, 将救生平台固定在第一象限, 低于水面 1~2 cm, 测试时将大鼠分别从 4 个标试点放入水面, 记录大鼠到平台停留 2 s 所需的时间, 如果 1 min 内大鼠未找到平台, 将大鼠引导上平台学习 10 s 左右, 时间计为 60 s, 每天学习 2 次, 连续进行 5 d。空间探索实验: 第 6 天撤掉救生平台, 依次从 4 个象限放下大鼠, 记录 60 s 内每只大鼠在每个象限时穿梭平台的次数及在第一象限停留的时间。

2.5 取材 Morris 水迷宫后, 戊巴比妥钠深度麻醉大鼠后固定, 对大鼠腹腔做“U”型切口打开腹腔, 用 50 mL 注射器吸取 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 生理盐水对大鼠进行心脏灌注, 充分灌注后断头取脑, 脑组织放在包有冰块的锡箔纸上, 分离左右脑, 左脑进行组织学检查放入 4% 多聚甲醛溶液里固定, 右脑进行分子生物学检查, 分离海马放入冻存管置于液氮中速冻后转入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色 观察海马区组织病理变化 固定好的背侧海马区(距离前囟 2.5~4.5 mm)石蜡切片机行冠状面切片, 石蜡切片厚度为 $3 \mu\text{m}$, 石蜡切片烘烤, 脱蜡后, 苏木素染色 5 min, 盐酸乙醇分化, 蒸馏水返蓝, 梯度脱水, 二甲苯透明, 加盖玻片, 中性树胶封片, 使用麦克奥迪显微成像系统获取图像。

2.7 高尔基染色神经元病理形态变化 高尔基染色使用振动切片机进行冠状位切片, 切片厚度 $200 \mu\text{m}$, 使用快速高尔基染色试剂盒按试剂盒说明固定组织约 15 d, 切片, 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 加盖玻片, 中性树胶封片, 使用 TissueFAXS 成像系统获取图像, 采用 63 倍油镜通过延伸聚焦方式扫描获取, Z 轴扫描步径 $1 \mu\text{m}$ 。

2.8 免疫荧光法检测 NLRP3, Caspase-1 蛋白变化 石蜡切片, 烘烤, 脱蜡(二甲苯 I 15 min, 二甲苯 II 15 min, 100% 乙醇 3 min, 95% 乙醇 3 min, 85% 乙醇 3 min, 75% 乙醇 3 min, 蒸馏水洗 1 次), 3% 过氧

化氢灭活过氧化物酶 10 min, 0.3% Triton X-100 打孔 5 min, 5% 驴血清封闭 1 h, 特异性一抗孵育过夜, NLRP3(红色, 1:200), Caspase-1(绿色, 1:200)。荧光二抗室温孵育 2 h, 用含 DAPI 的封片剂封片, 闭光保存, 使用尼康 AI+ 激光共聚焦显微镜, 筛选出典型的图片作为代表呈现。

2.9 Real-time PCR 检测 IL-1 β , IL-18 mRNA 表达

大鼠脑组织分离海马, TRIzol 法提取总 RNA, 酶

标仪测定 RNA 浓度后使用逆转录试剂盒按照说明书步骤反转录获取 cDNA。引物序列见表 1, 采用 SYBR Green 染料法按照试剂盒说明书步骤在 Real-time PCR 仪上进行检测, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 循环 40 次。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。计算各目的基因 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值, 以假手术组为基线计算各组目的基因的相对表达水平。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列上游(5'-3')	序列下游(5'-3')	长度/bp
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TGATGGCAACAATGTCCACT	142
IL-1 β	CCTATGTCTTGCCCGTGGAG	CACACACTAGCAGGTCGTCA	118
IL-18	ACCACTTTGGCAGACTTCACT	ACACAGGCGGGTTTCTTTTG	90

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织相关蛋白表达 大鼠海马组织经液氮研磨成粉, 使用 RIPA 法提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白上样量为 30 μ g/孔。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗(NLRP3 1:1 000, IL-1 β 1:1 000, Caspase-1 1:1 000, Tubulin 1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗(1:8 000)37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒使用 Gel Doc XR+ 凝胶成像系统成像。使用 Image-Lab 以目的蛋白与 Tubulin 灰度值的比值计算相对蛋白表达量。

2.11 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 使用 Graphpad 8.0.1 制作统计图, $P<0.05$ 为差异有

统计学意义。

3 结果

3.1 对 AD 大鼠的学习和记忆损伤的影响 Morris 水迷宫结果显示, 大鼠通过连续 5 d 学习后, 与假手术组比较, AD 大鼠逃逸时间显著增加($P<0.01$), 且大鼠的行动轨迹混乱; 与模型组比较, 当归芍药散中、高剂量治疗后能显著减少 AD 大鼠逃逸时间($P<0.01$), 大鼠的行动轨迹清晰, 能较快找到平台。第 6 天, 撤除隐藏平台后, 与假手术组比较, AD 大鼠穿梭次数明显减少, 且在第一象限停留的时间显著减少($P<0.01$); 与模型组比较, 当归芍药散中、高剂量治疗后能增加 AD 大鼠穿梭次数, 并在第一象限停留的时间显著增加($P<0.01$)。见表 2。

表 2 当归芍药散对 AD 大鼠学习记忆功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Danggui Shaoyaoan on learning and memory function in AD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

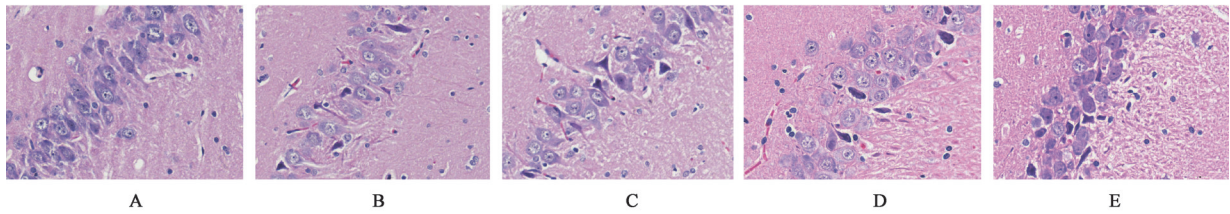
组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	逃逸时间/s	穿梭次数/次	停留时间/s
假手术		10.73 \pm 3.57	6.33 \pm 0.41	23.55 \pm 5.37
模型		22.73 \pm 4.35 ¹⁾	1.62 \pm 0.68 ¹⁾	11.56 \pm 2.97 ¹⁾
当归芍药散	12	20.65 \pm 5.91	2.21 \pm 0.31	11.96 \pm 3.90
	24	13.28 \pm 2.32 ³⁾	4.79 \pm 0.56 ³⁾	17.86 \pm 3.20 ²⁾
	36	14.94 \pm 1.73 ³⁾	5.08 \pm 0.84 ³⁾	18.04 \pm 4.47 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表 3~5 同)。

3.2 对 AD 大鼠神经元病理形态的影响 通过 HE 染色检查海马区神经元损伤情况, 结果显示, 与假手术组比较, AD 大鼠海马区部分神经细胞间隙增宽, 排列紊乱, 胞核变性, 固缩; 与模型组比较, 当归芍药散低剂量干预后, AD 大鼠海马区神经细胞损伤显著减少, 神经细胞胞质、胞核清晰可见, 结构完整, 细胞排列密集, 见图 1。通过高尔基染色从神经元形态、数量、密度等方面评估神经元功能, 结果显

示, 与假手术组比较, 模型组海马区神经元树突平均长度、平均分支数和棘密度均显著降低, 差异有显著统计学意义($P<0.01$); 与模型组比较, 当归芍药散干预中、高剂量组神经元树突平均长度、平均分支数和棘密度均显著升高, 差异有显著统计学意义($P<0.01$)。见图 2, 表 3。

3.3 对 AD 大鼠海马区炎症因子蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表



A. 假手术组; B. 模型组; C. 当归芍药散低剂量组; D. 当归芍药散中剂量组; E. 当归芍药散高剂量组(图2~4同)

图1 当归芍药散对AD大鼠海马组织病理学影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Danggui Shaoyaosan on histopathology in hippocampus of AD rats (HE, ×400)

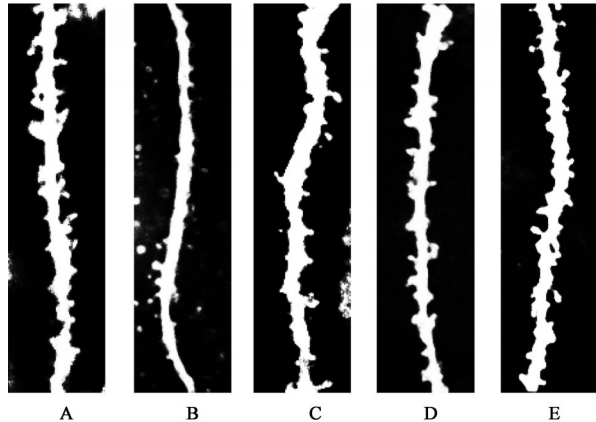


图2 当归芍药散对AD大鼠海马区神经元三级树突树突棘的影响(高尔基, ×630)

Fig. 2 Effect of Danggui Shaoyaosan on dendritic spines of tertiary dendrites of neurons in the hippocampus of AD rats (Golgi, ×630)

达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,当归芍药散低剂量组干预后IL-18 mRNA表达显著下调($P<0.01$),IL-1 β mRNA表达差异无统计学意义;与

表3 当归芍药散对AD大鼠海马区神经元功能的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Danggui Shaoyaosan on neurons function in hippocampus of AD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	树突长度/ μ m	树突分支数/个	树突棘密度/个/10 μ m
假手术		154.83±14.40	9.83±1.47	19.17±1.47
模型		82.33±10.80 ¹⁾	3.67±0.82 ¹⁾	8.33±1.75 ¹⁾
当归芍药散	12	82.83±12.70	4.33±1.21	9.17±1.94
	24	146.83±25.50 ³⁾	7.67±0.82 ³⁾	17.33±1.75 ³⁾
	36	163.17±13.12 ³⁾	8.83±1.47 ³⁾	18.00±2.00 ³⁾

表4 当归芍药散对AD大鼠海马区IL-1 β 和IL-18 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Danggui Shaoyaosan on IL-1 β and IL-18 mRNA expression in hippocampus of AD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
假手术		1.02±0.14	1.03±0.06
模型		3.05±0.55 ¹⁾	5.27±0.55 ¹⁾
当归芍药散	12	2.90±0.32	4.05±0.48 ³⁾
	24	1.62±0.34 ³⁾	1.91±0.25 ³⁾
	36	1.58±0.40 ³⁾	1.78±0.17 ³⁾

模型组比较,当归芍药散中、高剂量组干预后,IL-1 β 和IL-18 mRNA表达均显著下调,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。见表4。

3.4 对AD大鼠海马区NLRP3/Caspase-1信号通路蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组细胞胞浆内绿色荧光和红色荧光均显著增加,且大多数绿色荧光与红色荧光重合,提示胞浆中NLRP3/Caspase-1复合体大量形成;与模型组比较,当归芍药散干预后,胞浆内可见绿色荧光和红色荧光均显著减少,且绿色荧光与红色荧光重合明显减少,提示胞浆中NLRP3/Caspase-1复合体形成减少。见图3。与假手术组比较,模型组NLRP3, Caspase-1, pro-IL-1 β 和IL-1 β 蛋白的表达显著升高($P<0.01$);经当归芍药散干预后,与模型组比较,当归芍药散各剂量组Caspase-1, pro-IL-1 β 和IL-1 β 蛋白表达显著下降($P<0.01$),当归芍药散中、高剂量组NLRP3的蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),差异有显著统计学意义。见图4,表5。

4 讨论

关于老年痴呆的中医病因病机的论述及相关文献也比较多,大多从虚、实论述。大多医家认为肝肾不足,心脾两虚,气血不足,脑失所养而致病^[14]。通过前期文献研究和实验研究,认为老年痴呆的主要病机为“肝脾失调、气血不足、痰瘀蒙窍”^[15-16]。当归芍药散是肝脾同调、痰瘀并治的一个名方,该方出自东汉张仲景的《金匮要略》,全方具有疏肝理脾,活血祛湿的功效,临床和实验研究显

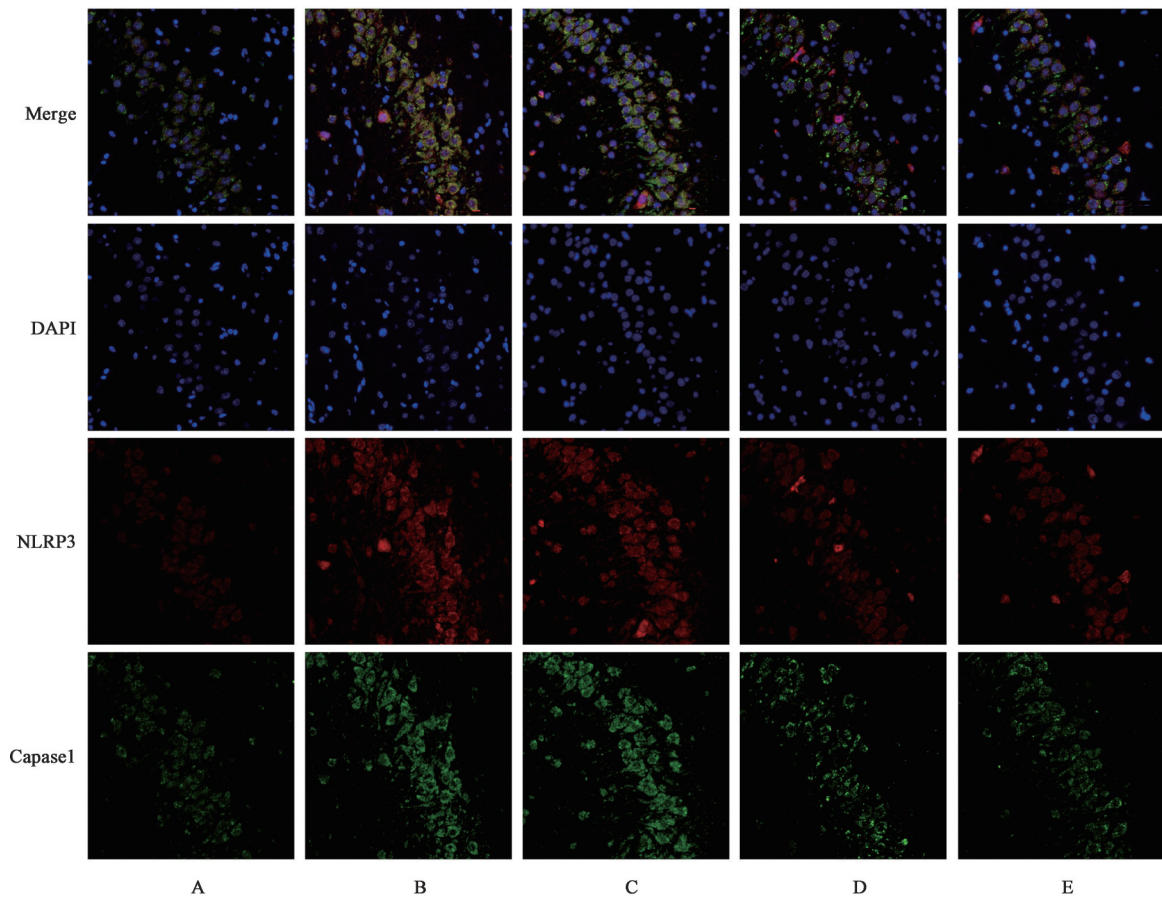


图3 当归芍药散对AD大鼠海马区NLRP3,Caspase-1和IL-1 β 表达的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Danggui Shaoyaosan on NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β in hippocampus of AD rats (IF, $\times 400$)

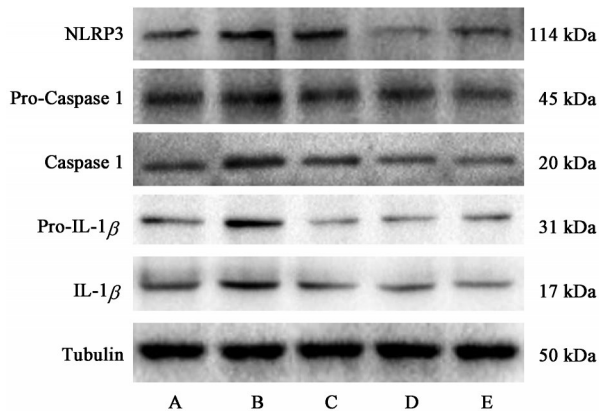


图4 AD大鼠海马区NLRP3,Caspase-1和IL-1 β 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β proteins in hippocampus of AD rats

示该方能显著改善AD的认知功能障碍^[17-19]。本研究的结果显示,当归芍药散干预后能明显改善AD大鼠学习记忆能力,病理形态结果显示当归芍药散干预后AD大鼠脑内神经元损伤显著减少,神经元树突平均长度,神经元平均分支数和神经元树突棘密度均显著高于模型组,提示当归芍药散对AD大鼠海马神经元损伤有保护作用且能有效抑制A β 诱

导的神经细胞凋亡。

炎症小体是由细胞质中的多聚蛋白复合物组成,介导IL-1 β 和IL-18的激活,并诱导细胞凋亡-程序性细胞死亡。已知至少有4种不同的炎症小体,尤其是NLRP3在AD的发病机制中发挥重要作用^[20]。衰老的特点是全身低度炎症,称为“炎症老化”,以衰老相关分泌表型为特征,研究表明,在AD脑组织,AD患者脑脊液和血清中IL-1 β ,IL-6,转化生长因子- β (TGF- β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)均升高^[21],A β 可诱导小胶质细胞分泌IL-1 β ,其作用方式为NLRP3依赖性,NLRP3作为聚集型A β 的感受器参与炎症小胶质细胞的活化^[22]。本文研究结果表明,对大鼠侧脑室注射A β_{1-42} 后,NLRP3蛋白表达增加,IL-1 β 和IL-18等促炎细胞因子mRNA表达显著增加,提示A β 毒性刺激引起脑内炎症级联反应促进神经炎症的发生。Western blot结果显示A β_{1-42} 注射后大鼠脑内除了成熟的IL-1 β 表达显著增加,pro-IL-1 β 蛋白表达也同样增加。pro-IL-1 β 是炎性细胞因子的前体物质,当免疫细胞的Toll样受体接受刺激后激活胞质内核转录因子- κ B(NF- κ B)入核,其亚

表5 当归芍药散对AD大鼠海马区NLRP3, Caspase-1和IL-1 β 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Danggui Shaoyao-san on NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β proteins expression in hippocampus of AD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3/Tubulin	pro-Caspase-1/Tubulin	Caspase-1/Tubulin	pro-IL-1 β /Tubulin	IL-1 β /Tubulin
假手术		1.02±0.11	1.10±0.11	1.15±0.15	1.10±0.11	1.05±0.13
模型		2.29±0.24 ¹⁾	1.63±0.22 ¹⁾	3.04±0.32 ¹⁾	2.51±0.42 ¹⁾	2.25±0.30 ¹⁾
当归芍药散	12	2.14±0.14	1.18±0.26 ³⁾	2.58±0.31 ³⁾	0.86±0.14 ³⁾	1.18±0.16 ³⁾
	24	0.89±0.19 ³⁾	1.21±0.23 ³⁾	1.31±0.14 ³⁾	0.90±0.21 ³⁾	1.02±0.15 ³⁾
	36	1.31±0.12 ³⁾	0.86±0.14 ³⁾	1.21±0.21 ³⁾	1.04±0.09 ³⁾	0.99±0.13 ³⁾

基形成环状结构与DNA接触,调控基因表达,使pro-IL-1 β 在细胞内大量合成和积累^[23]。IL-1 β 主要由活化的Caspase-1蛋白酶将IL-1 β 的前体分子切割加工而成。结果提示A β 毒性刺激不仅影响NF- κ B途径启动pro-IL-1 β 的大量合成,也影响NLRP3/Caspase-1信号通路的激活,促进IL-1 β 等炎症因子的分泌。给予当归芍药散干预后,NLRP3炎症小体激活明显减少,且显著降低了pro-IL-1 β 蛋白表达以及IL-1 β 等炎症因子的表达水平,一定程度上提示当归芍药散除了能调控NLRP3依赖性途径发挥抗炎作用外,可能还作用于NF- κ B信号通路等其他抗炎途径。

胶质细胞的活化和促炎细胞因子的过度表达被认为是阿尔茨海默病的早期事件,NLRP3的激活是AD病理过程的重要步骤^[24]。A β 毒性作用下,胶质细胞Toll样受体接受危险信号与其配体结合将信号传至细胞内,通过NF- κ B途径启动pro-IL-1 β 和NLRP3等前体蛋白的转录和表达^[25];同时,A β 也促进NLRP3炎性小体的激活,与斑点样蛋白(ASC),Caspase-1形成复合体切割pro-Caspase-1形成活化的Caspase-1,并对下游炎性因子进行加工修饰释放促炎细胞因子^[26]。本实验结果显示,给予当归芍药散干预后,AD大鼠海马区的NLRP3/Caspase-1复合物大量减少,NLRP3蛋白表达显著降低,表明当归芍药散可以直接抑制NLRP3的第一信号,即NLRP3炎性小体的活化,前期研究表明,当归芍药散能抑制NF- κ B核转录因子的核转移降低炎症因子的表达^[8],提示当归芍药散也可能通过调控NF- κ B信号通路抑制NLRP3的激活。Western blot结果显示,当归芍药散干预后,Caspase-1表达明显下降,且IL-1 β 蛋白表达也明显下降,表明当归芍药散可能通过抑制NLRP3/Caspase-1信号通路的激活,从而降低AD脑内炎症因子的表达,但当归芍药散是否能直接抑制Caspase-1的活化并不清楚,研究表明,APP/PS1小鼠中抑制NLRP3或抑制Caspase-1

均可导致脑内Caspase-1活化减少和IL-1 β 激活减少抑制神经炎症^[4,27]。结果中显示当归芍药散能减少pro-Caspase-1的表达,因此,推测当归芍药散可能也参与调控Caspase-1的活化过程。

综上所述,A β 毒性刺激可引起大鼠脑内神经炎症反应导致神经元功能受损,从而影响认知功能。当归芍药散能改善A β 诱导的大鼠认知功能障碍,其机制可能是当归芍药散通过调控NLRP3/Caspase-1信号通路抑制炎症小体活化,抑制神经炎症反应,从而发挥神经保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] HARDY J, SELKOE D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297 (5580) : 353-356.

[2] ONYANGO I G, JAUREGUI G V, ČARNA M, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Biomedicine, 2021, 9(5) : 524.

[3] LAMKANFI M, DIXIT V M. Mechanisms and functions of inflammasomes [J]. Cell, 2014, 157 (5) : 1013-1022.

[4] HENEKA M T, KUMMER M P, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. Nature, 2013, 493(7434) : 674-678.

[5] FU X, WANG Q, WANG Z, et al. Danggui-Shaoyao-San: new hope for Alzheimer's disease [J]. Aging Dis, 2016, 7(4) : 502-513.

[6] 李富周, 贺春香, 余婧萍, 等. 当归芍药散改善APP^{swE}/PS1^{ΔE9}转基因小鼠学习记忆能力及机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(9) : 1094-1100.

[7] 贺春香, 余婧萍, 李富周, 等. 当归芍药散含药血清对A β ₁₋₄₂诱导的SH-SY5Y细胞周期和凋亡的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(11) : 2875-2882.

[8] 余婧萍, 贺春香, 成绍武, 等. 当归芍药散通过调控NF- κ B炎性通路改善H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞衰

- 化损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10):1-7.
- [9] SONG Z, LI F, HE C, et al. In-depth transcriptomic analyses of LncRNA and mRNA expression in the hippocampus of APP/PS1 mice by Danggui-Shaoyao-San[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 23945-23959.
- [10] JIA J X, YAN X S, SONG W, et al. The protective mechanism underlying phenylethanoid glycosides (PHG) actions on synaptic plasticity in rat Alzheimer's disease model induced by beta amyloid₁₋₄₂ [J]. J Toxicol Environ Health A, 2018, 81(21):1098-1107.
- [11] LU Y, DONG Y, TUCKER D, et al. Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and oxidative stress in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 56(4):1469-1484.
- [12] MARCELLO E, MUSARDO S, VANDERMEULEN L, et al. Amyloid- β oligomers regulate ADAM10 synaptic localization through aberrant plasticity phenomena[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(10): 7136-7143.
- [13] 贺春香, 宋祯彦, 李泽, 等. 基于环状RNA测序探讨当归芍药散对APP^{swE}/PS1^{ΔE9}转基因小鼠的神经保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5):16-24.
- [14] 吴林, 伍媛, 劳伟林, 等. 近10年中医复方治疗老年性痴呆临床进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(2):8-11.
- [15] 刘洋, 梁腾霄. 肝性脑病与血管性痴呆的文献证素比较研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(2):244-247.
- [16] 张刚, 穆敬平, 廖恒, 等. 通督调神针刺法对脑梗死后血管性痴呆患者的认知、行为能力及抗氧自由基的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(11):3050-3053.
- [17] KIM Y, CHO S H. Danggui-Shaoyao-San for dementia: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(4): e18507.
- [18] 陈云慧, 夏军, 刘丹, 等. 当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机制实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20211102.
- [19] HUANG J, WANG X, XIE L, et al. Extract of Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits by regulating DHA metabolism in APP/PS1 mice [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 253:112673.
- [20] FENG Y S, TAN Z X, WU L Y, et al. The involvement of NLRP3 inflammasome in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101192.
- [21] KRITSILIS M, V RIZOU S, KOUTSOUDAKI P N, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease [J]. Int J Mol Sci, 2018, doi: 10.3390/ijms19102937.
- [22] HALLE A, HORNUNG V, PETZOLD G C, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta [J]. Nat Immunol, 2008, 9(8):857-865.
- [23] PATEL M N, CARROLL R G, GALVÁN-PEÑA S, et al. Inflammasome priming in sterile inflammatory disease[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(2):165-180.
- [24] EBRAHIMI T, RUST M, KAISER S N, et al. α 1-antitrypsin mitigates NLRP3-inflammasome activation in amyloid β (1-42)-stimulated murine astrocytes[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):282.
- [25] TAN J, WAN L, CHEN X, et al. Conjugated linoleic acid ameliorates high fructose-induced hyperuricemia and renal inflammation in rats via NLRP3 inflammasome and TLR4 signaling pathway [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(12):e1801402.
- [26] HANSLIK K L, ULLAND T K. The role of microglia and the Nlrp3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. Front Neurol, 2020, 11:570711.
- [27] DEMPSEY C, RUBIO ARAIZ A, BRYSON K J, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice [J]. Brain Behav Immun, 2017, 61:306-316.

[责任编辑 周冰冰]