

· 经典名方 ·

苓桂术甘汤对阿尔茨海默病血脑屏障损伤的影响

王紫薇, 周西彬, 邓菊, 凌云, 周春祥*

(南京中医药大学 中医学院 中西医结合学院, 南京 210046)

[摘要] 目的:通过观察苓桂术甘汤(LG)对体外阿尔茨海默病(AD)病理状态下血脑屏障模型的影响,探讨其对AD血脑屏障损伤后修复的具体机制。方法:将50只雄性SPF级大鼠,随机分为5组,分别灌胃7 d,2次/d, LG高、中、低剂量组以4.8, 2.4, 1.2 g·kg⁻¹,西药组以盐酸多奈哌齐0.5 mg·kg⁻¹,正常组以等体积生理盐水灌胃,末次灌胃1 h后经腹主动脉取含药血清;以细胞共培养法构建AD体外血脑屏障损伤模型,实验分为正常组,模型组, LG高、中、低剂量组和盐酸多奈哌齐组,模型组加入 β 淀粉样蛋白1-42(A β ₁₋₄₂)100 μ L,终浓度为5 μ mol·L⁻¹, LG高、中、低剂量组以及盐酸多奈哌齐组在模型组基础上分别加入10%含药血清。通过噻唑蓝(MTT)比色法检测各组细胞存活率;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定各组血脑屏障相关骨架蛋白跨膜蛋白-5(Claudin-5),外周支架蛋白-1(ZO-1),闭合蛋白(Occludin),基质金属蛋白酶-2(MMP-2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量变化;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和Western blot检测LG高、中、低剂量组血脑屏障不同时间点A β 转运蛋白低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP-1)和晚期糖基化终产物受体(RAGE)表达。结果:MTT结果分析显示,与正常组比较,模型组细胞存活率明显下降($P<0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和LG高剂量组细胞存活率明显增强($P<0.05$);Western blot结果分析显示,与正常组比较,模型组骨架蛋白显著下调, MMP-2, MMP-9蛋白明显上调($P<0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和LG高剂量骨架蛋白含量明显上调($P<0.05$), MMP-2, 9水平明显下降($P<0.05$);与模型组比较,仅LG中剂量组Claudin-5蛋白水平明显上调($P<0.05$), MMP-2水平明显下调($P<0.05$);ELISA结果分析显示,与正常组比较,模型组IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量明显上调($P<0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和LG高、中剂量组IL-1 β , IL-6, TNF- α 表达明显下调($P<0.05$);PCR结果分析显示,与0 h比较,3 h时LRP-1表达明显上调, RAGE表达明显下调($P<0.05$), 6, 12, 24, 36 h后LRP-1, RAGE表达逐渐和缓;Western blot结果分析显示,3 h时,与正常组比较,模型组LRP-1含量明显下调, RAGE含量明显上调($P<0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和LG高剂量组LRP-1含量显著上调, RAGE含量明显下调($P<0.05$)。结论:LG对AD体外血脑屏障损伤具有修复作用,其机制可能与抑制炎症因子和MMP-2, MMP-9表达、促进骨架蛋白表达并调节转运蛋白平衡相关。

[关键词] 血脑屏障; 苓桂术甘汤(LG); β 淀粉样蛋白1-42(A β ₁₋₄₂); 阿尔茨海默病(AD)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0016-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212404

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211026.1107.002.html>

[网络出版日期] 2021-10-26 16:30

Mechanism of Lingui Zhugantang in Repairing Blood-brain Barrier Injury of Alzheimer's Disease

WANG Zi-wei, ZHOU Xi-bin, DENG Ju, LING Yun, ZHOU Chun-xiang*

(College of Traditional Chinese Medicine, College of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Lingui Zhugantang (LG) on the blood-brain barrier

[收稿日期] 20210719(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774021, 82074504);江苏高校优势学科建设工程项目(中西医结合)

[第一作者] 王紫薇,在读硕士,从事《伤寒论》抗炎、抗肿瘤与免疫研究, E-mail:2224620810@qq.com

[通信作者] *周春祥,博士,教授,博士生导师,从事《伤寒论》抗炎、抗肿瘤与免疫研究, E-mail:chunxiangzhou@njucm.deu.cn

(BBB) model of Alzheimer's disease (AD) *in vitro* and to explore the mechanism of LG in repairing the BBB injury in AD. **Method:** A total of 50 male SPF rats were randomized into five groups: high-dose ($4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose ($2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose ($1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) LG groups, western medicine ($0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ donepezil hydrochloride) group, and normal group (normal saline of equivalent volume). They received (*ig*) corresponding drugs twice a day for 7 d. Drug-containing serum was respectively collected from the abdominal aorta 1 h after the last administration. The BBB injury of AD *in vitro* was induced with the cell co-culture method, and 6 groups were designed: normal group, model group, high-, medium-, and low-dose LG groups, and western medicine group. The model group was added with $100 \mu\text{L}$ amyloid β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$, final concentration: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and high-dose, medium-dose, and low-dose LG groups and the western medicine group were added with corresponding 10% drug-containing serum in addition to the $100 \mu\text{L}$ $A\beta_{1-42}$ (final concentration: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cell survival rate was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, expression of BBB-related skeleton proteins (claudin-5, ZO-1, occludin), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by Western blot, and content of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). BBB $A\beta$ transporter low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) and advanced glycation end product receptor (RAGE) at different time points in high-dose, medium-dose, and low-dose LG groups were determined by Real-time PCR and Western blot. **Result:** Cell survival rate of the model group was lower than that of the normal group ($P<0.05$) and the survival rates of the western medicine group and high-dose LG group was higher than that in the model group ($P<0.05$). The skeleton proteins were down-regulated and MMP-2 and MMP-9 were up-regulated in the model group compared with those in the normal group ($P<0.05$). The expression of skeleton proteins was higher ($P<0.05$) and that of MMP-2 and MMP-9 was lower ($P<0.05$) in the western medicine group and high-dose LG group than in the model group. Compared with the model group, only the medium-dose LG group showed the up-regulation ($P<0.05$) of claudin-5 ($P<0.05$) and the decrease ($P<0.05$) of MMP-2. IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the model group were up-regulated ($P<0.05$) compared with those in the normal group, and those inflammatory factors in the western medicine group and high-dose and medium-dose LG groups were lower ($P<0.05$) than those in the model group. LRP-1 expression was up-regulated and RAGE expression was down-regulated at 3 h compared with those at 0 h ($P<0.05$), while the expression of the two became stable at 6, 12, 24, 36 h. At 3 h, LRP-1 expression was down-regulated and RAGE expression was up-regulated in model group compared with those in the normal group at 3 h ($P<0.05$). Moreover, the LRP-1 content was higher and RAGE content was lower in the western medicine group and high-dose LG group than in the model group. **Conclusion:** LG can repair the BBB injury *in vitro* by inhibiting the expression of inflammatory factors and MMP-2, MMP-9, promoting the expression of skeletal proteins, and regulating the balance of transporters.

[Keywords] blood-brain barrier; Linggui Zhugantang (LG); amyloid β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$), Alzheimer's disease (AD)

β 淀粉样蛋白($A\beta$)级联学说是阿尔茨海默病(AD)发病机制中最主要的学说之一^[1]。 $A\beta$ 持续沉积、清除不力及诱发炎症反应是造成神经元细胞损伤的重要因素^[2]。在常见的散发性或迟发性AD形式中,以及在某些AD病例中,脑内 $A\beta$ 水平升高是由于清除受损而不是生产过剩^[3],因此,对于 $A\beta$ 的清除显得至关重要。

脑屏障(BBB),作为确保中枢神经系统稳态

的重要结构,是由不同类型的细胞组成的神经血管单位,在大脑受到内源性、血液来源的危险时起保护作用^[4]。苓桂术甘汤(LG)是“病痰饮者,当以温药和之”的代表方剂,具有温阳健脾,清化痰饮之功。除温肾益髓^[5]、温阳化痰^[6]等方法可改善AD病理进程外,课题组通过临床研究发现,健脾化痰亦可显著改善AD患者智能障碍,提高认知能力及日常生活能力^[7]。实验研究亦表明LG可抑制小胶质

细胞炎症因子的分泌,提高神经元细胞存活率。LG干预后,AD大鼠模型学习记忆能力和脑组织病理有明显改善,具体机制可能与BBB上 $\text{A}\beta$ 相关转运蛋白调节有关^[8-9]。因此,该研究在此基础上,采用LG含药血清干预体外AD病理状态下的BBB损伤模型,观察LG对BBB损伤后的保护作用,旨在进一步探讨LG干预AD的潜在机制,以此揭示“健脾化饮”治疗AD的新内涵。

1 材料

1.1 动物 3月龄雄性SD大鼠50只,体质量(220±20)g,购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号SCXK(苏)2017-0001,动物合格证编号201909302,实验动物饲养环境为SPF级屏障系统,光照12h,自由摄食饮水,大鼠适应性喂养3d后,开始实验,本实验获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(备案编号201904A002)。

1.2 药物 苓桂术甘汤由茯苓、桂枝、生白术、炙甘草组成,按照《伤寒论》原书比例-茯苓-桂枝-白术-甘草4:3:2:2,称取茯苓40g,桂枝30g,白术20g,甘草20g,所有中药材均购自南京中医药大学国医堂中药房,经南京中医药大学中医学院唐德才教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》项下规定。将以上4味中药以纯水约800mL浸泡30min,头煎以武火煮沸后转至文火煎煮20min,倒出药液,次煎不浸泡,加入纯水约400mL,武火煮沸后转至文火煎煮20min,混合药液并经八层纱布过滤,后经旋转蒸发器浓缩至相当于含生药质量浓度 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓缩液。盐酸多奈哌齐片(江苏豪森药业集团有限公司,国药准字H20030472)。

1.3 试剂 $\text{A}\beta_{1-42}$ (美国Sigma公司,批号SCP0038);大鼠白细胞介素- 1β (IL- 1β),IL-6,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为P1350,P1328,PT516);原代星形胶质细胞与脑微血管内皮细胞(赛百慷生物技术股份有限公司,批号分别为RAT-iCELL-n009,RAT-iCELL-n001);TRIzol试剂(上海拜力生物科技有限公司,批号15596-026);PCR检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号Q511-02);噻唑蓝(MTT)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号AR1156);外周支架蛋白-1(ZO-1)抗体,基质金属蛋白酶-2(MMP-2)抗体,MMP-9抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为21773-1-

AP, 10373-2-AP, 10375-2-AP, 20536-1-AP, SA00001-2);跨膜蛋白-5(Claudin-5,北京博奥森生物工程有限公司,批号bs-10296R);闭合蛋白(Occludin),晚期糖基化终产物受体(RAGE),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP-1)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab216327,ab216329,ab92544)。

1.4 仪器 RE52-99型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);MCO-20AIC型二氧化碳培养箱(日本Sanyo公司);Sorvall ST 16R型低温离心机,Quantstudio 3型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国赛默飞世尔科技公司);Ts100-F型倒置显微镜(日本Nikon公司);SW-CJ-1F型单人双面超净工作台(苏州净化设备有限公司);ELX800型全自动酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);ZBRTD-211型高精度数显恒温水浴锅(上海邦西仪器科技有限公司);YXQ-LS-18S I型手提式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司);PowerPac™ Basic型垂直电泳系统,1708265型化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组与含药血清制备 取3月龄雄性SD大鼠50只,随机分为5组,分别为正常组,LG $4.8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,LG $2.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和LG $1.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,盐酸多奈哌齐 $0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,每组10只。给药剂量和方法参照《药理实验方法学》中的人和动物按体表面积等效剂量折算比值表计算,大鼠等效剂量为 $1.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,LG高、中、低含药血清组分别以大鼠等效剂量4,2,1倍进行灌胃,西药组以盐酸多奈哌齐 $0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃。适应性喂药3d后灌胃给药,每天2次,连续用药7d。于末次灌胃后1h麻醉大鼠,取血清后离心, $3\ 000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min(离心半径9cm,下同),重复3次,收集上清灭活, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.2 $\text{A}\beta_{1-42}$ 制备 将 $\text{A}\beta_{1-42}$ 干粉溶解于无菌生理盐水中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育7d,成为纤维凝聚状态, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.3 建立细胞共培养模型 实验共分为6组(正常组,模型组,盐酸多奈哌齐组,LG $4.8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,LG $2.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和LG $1.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组)。取原代星形胶质细胞(AC)用含10%胎牛血清的完全培养基重悬,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL种植于预先包被2%明胶的细胞培养池多聚酯膜下侧200 μL ,培养4h,将培养池放入12孔培养板继续培养,12孔板内加完全培养基1.5mL,培养池内加入完全培养基0.5mL,放入5% CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养,3d换液1次,

待AC融合至80%,在各组培养池多聚酯膜上侧种植脑微血管内皮细胞(BMEC),然后将培养板置于5% CO₂, 37 °C培养箱继续培养24 h^[10]。

2.4 建立 Aβ₁₋₄₂诱导AD的BBB损伤模型 镜下观察细胞融合情况后,除正常组之外的各组加入Aβ₁₋₄₂(终浓度为5 μmol·L⁻¹),给药浓度参照文献[11],建立Aβ诱导的AD体外BBB损伤模型,继续培养24 h。按照上述分组顺序,依次加入10%空白血清,10%盐酸多奈哌齐血清,10% LG 4.8 g·kg⁻¹血清,10% LG 2.4 g·kg⁻¹血清和10% LG 1.2 g·kg⁻¹血清,继续孵育24 h后分别进入测试。

2.5 MTT比色法测定BBB损伤后相关细胞活性 应用倒置显微镜观察各组细胞形态学变化,并用MTT比色法测各组细胞的活性。于终止培养前,每孔加入MTT 10 μL,在培养4~6 h,弃上清,每孔加二甲基亚砜(DMSO)100 μL,于酶标仪测定560 nm的吸光度A。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测BBB损伤后相关骨架蛋白和MMP-2, MMP-9蛋白表达 细胞培养后,经RIPA裂解液裂解后离心,取上层液。蛋白样品,经过SDS-PAGE电泳后,将蛋白电转至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉液封闭后,加入一抗,稀释倍数分别为Claudin-5(1:500),ZO-1(1:1000),Occludin(1:1000),MMP-2(1:500),MMP-9(1:500),β-actin内参(1:1000),4 °C孵育过夜,洗涤后加入HRP标记的二抗(1:2000)室温孵育1 h后,ECL底物化学发光显色后曝光显影,通过Bio-Rad Chemi DocXRS化学发光成像系统,结果使用Image J软件测定目的条带与内参β-actin灰度值的比值表示。

2.7 ELISA检测BBB损伤后相关炎症因子含量 细胞培养后,吸取上清液,2500 r·min⁻¹离心5 min,取上层液。按照ELISA试剂盒说明书操作,检测AD体外BBB损伤模型中TNF-α, IL-1β, IL-6的表达情况。

2.8 Real-time PCR检测BBB损伤后各时间点Aβ转运蛋白mRNA相对表达量 选择0, 3, 6, 12, 24, 36 h 6个时间节点,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用TRIzol法提取样本总RNA,进行PCR扩增(95 °C, 2 min; 95 °C, 15 s, 60 °C, 34 s, 40个循环, 72 °C, 30 s, 获取荧光值; 95 °C, 15 s, 60 °C, 1 min, 95 °C, 15 s),引物序列见表1,以β-actin为内参,用2^{-ΔΔC_t}法分析计算晚期糖基化终产物受体(RAGE)和低密度脂蛋白受体相关蛋白-1

(LRP-1)相对mRNA表达量。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
RAGE	上游 GACAGTGATCCCCACCCAAG	138
	下游 CAACCAACAGCTGAATGCC	
LRP-1	上游 CCGCATCTTCTTCAGTGACA	117
	下游 ACAGAGCCCACATTTTCCAC	
β-actin	上游 AATCGTGCGTGACATCAAA	123
	下游 AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC	

2.9 Western blot检测BBB损伤后Aβ转运蛋白表达 步骤以及结果计算方法同2.6项,检测转运蛋白LRP-1, RAGE的表达。一抗稀释倍数分别为RAGE(1:1000)和LRP-1(1:2万)。二抗稀释倍数同2.6项。

2.10 统计学方法 采用GraphPad Prism 8.3.0软件进行数据分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验, P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对BBB损伤后相关细胞活性的影响 与正常组比较,模型组细胞存活率明显降低,为69.52%(P<0.05),提示BBB损伤模型建立成功;与模型组比较,盐酸多奈哌齐组细胞存活率明显升高,为83.55%(P<0.05),表明盐酸多奈哌齐可提高细胞存活率,提示实验方法学无误;与模型组比较,LG高、中、低含药血清组,细胞存活率分别为79.82%, 78.30%, 78.00%,其中高、中含药血清组差异具有统计学意义(P<0.05)。见表2。

表2 苓桂术甘汤对BBB损伤后相关细胞活性的影响(n=4)

Table 2 Effect of LG on related cell activity after BBB injury (n=4)

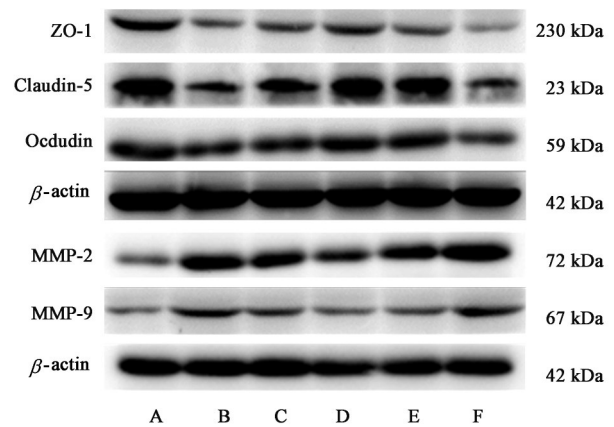
组别	剂量/g·kg ⁻¹	A($\bar{x} \pm s$)	细胞存活率/%
正常		0.25±0.01	100.00
模型		0.17±0.01 ¹⁾	69.53 ¹⁾
苓桂术甘汤	1.2	0.19±0.01	78.00
	2.4	0.19±0.01	78.30
	4.8	0.20±0.01	79.82 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.000 5	0.20±0.02	83.55 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05(表3~4, 8同)。

3.2 对BBB损伤后相关骨架蛋白及MMP-2, MMP-9表达的影响 与正常组比较,模型组Claudin-5, ZO-1, Occludin蛋白水平明显降低(P<

0.05), MMP-2, MMP-9 蛋白水平均明显升高 ($P < 0.05$), 提示 BBB 损伤模型建立成功; 与模型组比较, LG 高剂量组和盐酸多奈哌齐处理后, ZO-1, Claudin-5, Occludin 蛋白水平均明显升高 ($P < 0.05$), MMP-2, MMP-9 蛋白水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, LG 中剂量组 Claudin-5 蛋白水平明显上调 ($P < 0.05$), MMP-2 水平明显下调 ($P < 0.05$), 盐酸多奈哌齐组结果表明实验方法学无误; 中药组结果表明, LG 在一定程度上对 BBB 损伤后具有修复作用。见图 1, 表 3。

3.3 对 BBB 损伤后相关炎症因子表达的影响 与正常组比较, 模型组 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量明显升高 ($P < 0.05$), 提示 BBB 损伤模型建立成功; 与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$), 表明实验方法学无误; 与模型组比较, LG 高、中剂量组炎症因子的含量明显降低 ($P < 0.05$), 提示 LG 在一定程度上可降低 BBB 相关



A. 正常组; B. 苓桂术甘汤低剂量组; C. 苓桂术甘汤中剂量组; D. 苓桂术甘汤高剂量组; E. 盐酸多奈哌齐组; F. 模型组(图 2 同)

图 1 苓桂术甘汤对 BBB 损伤后 $\alpha\beta$ 骨架蛋白和 MMP-2, MMP-9 电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of LG on expression of skeletal protein and MMP-2, MMP-9 after BBB injury

炎症因子的含量, 从而对 BBB 损伤后具有修复作用。见表 4。

表 3 苓桂术甘汤对 BBB 损伤后骨架蛋白及 MMP-2, MMP-9 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of LG on expression of skeletal protein and MMP-2, MMP-9 after BBB injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Claudin-5/ β -actin	ZO-1/ β -actin	Occludin/ β -actin	MMP-2/ β -actin	MMP-9/ β -actin
正常		0.82±0.08	0.77±0.13	0.76±0.14	0.62±0.05	0.35±0.08
模型		0.40±0.02 ¹⁾	0.35±0.02 ¹⁾	0.36±0.05 ¹⁾	1.22±0.09 ¹⁾	0.78±0.19 ¹⁾
苓桂术甘汤	1.2	0.40±0.01	0.43±0.05	0.45±0.04	1.04±0.12	0.63±0.11
	2.4	0.57±0.02 ²⁾	0.50±0.05	0.44±0.06	0.80±0.11 ²⁾	0.49±0.09
	4.8	0.80±0.09 ²⁾	0.68±0.10 ²⁾	0.75±0.12 ²⁾	0.72±0.02 ²⁾	0.43±0.09 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.000 5	0.77±0.05 ²⁾	0.59±0.07 ²⁾	0.66±0.09 ²⁾	0.87±0.06 ²⁾	0.41±0.06 ²⁾

表 4 苓桂术甘汤对 BBB 损伤后相关炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of LG on related inflammatory factors after BBB injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常		1 065.58±28.55	1 075.29±41.70	377.52±30.24
模型		2 375.46±179.85 ¹⁾	1 639.38±56.48 ¹⁾	661.90±24.10 ¹⁾
苓桂术甘汤	1.2	2 068.97±56.99 ²⁾	1 578.56±58.29	603.14±29.64 ²⁾
	2.4	1 828.34±38.44 ²⁾	1 430.33±67.03 ²⁾	524.37±49.46 ²⁾
	4.8	1 634.44±28.76 ²⁾	1 273.63±51.96 ²⁾	487.52±7.79 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.000 5	1 534.02±183.42 ²⁾	1 263.05±50.91 ²⁾	445.94±53.58 ²⁾

3.4 对 BBB 损伤后各时间点 $\alpha\beta$ 转运蛋白 mRNA 相对表达量的影响 与 0 h 组比较, 3, 6, 12, 24, 36 h 处 RAGE mRNA 水平均明显下调 ($P < 0.05$), LRP-1 mRNA 水平均明显上调 ($P < 0.05$), 表明 3 h 时, LG 含药血清已经具有抑制 RAGE, 促进 LRP-1 分泌的作用。见表 5~7。

3.5 对 BBB 损伤后各时间点 $\alpha\beta$ 转运蛋白相对表达量的影响 Real-time PCR 检测结果显示, 3 h 时 LG 对转运蛋白的干预效应最佳, 因此仅测定 3 h 时转运蛋白表达情况, 见图 2。与正常组比较, 模型组 RAGE 水平明显升高 ($P < 0.05$), LRP-1 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 盐酸多奈哌齐和 LG 高

表 5 苓桂术甘汤高剂量组对 BBB 损伤后 A β 转运蛋白 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of LG high dose group on A β transporter mRNA levels after BBB injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间/h	RAGE	LRP-1
0	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.04
3	0.16 \pm 0.03 ¹⁾	4.60 \pm 0.10 ¹⁾
6	0.27 \pm 0.03 ¹⁾	3.72 \pm 0.09 ¹⁾
12	0.39 \pm 0.04 ¹⁾	3.14 \pm 0.08 ¹⁾
18	0.46 \pm 0.02 ¹⁾	2.87 \pm 0.05 ¹⁾
24	0.53 \pm 0.02 ¹⁾	2.54 \pm 0.05 ¹⁾
36	0.59 \pm 0.02 ¹⁾	2.11 \pm 0.12 ¹⁾

注:与 0 h 组比较¹⁾ $P<0.05$ (表 6~7 同);剂量均为 4.8 g·kg⁻¹。

表 6 苓桂术甘汤中剂量组对 BBB 损伤后 A β 转运蛋白 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of LG medium dose group on A β transporter mRNA levels after BBB injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间/h	RAGE	LRP-1
0	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.10
3	0.24 \pm 0.01 ¹⁾	3.89 \pm 0.07 ¹⁾
6	0.33 \pm 0.13 ¹⁾	3.27 \pm 0.13 ¹⁾
12	0.43 \pm 0.01 ¹⁾	2.67 \pm 0.07 ¹⁾
18	0.50 \pm 0.02 ¹⁾	2.36 \pm 0.04 ¹⁾
24	0.56 \pm 0.02 ¹⁾	2.14 \pm 0.06 ¹⁾
36	0.63 \pm 0.02 ¹⁾	1.89 \pm 0.03 ¹⁾

注:剂量均为 2.4 g·kg⁻¹。

表 7 苓桂术甘汤低剂量组对 BBB 损伤后 A β 转运蛋白 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of LG low dose group on A β transporter mRNA levels after BBB injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间/h	RAGE	LRP-1
0	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.28
3	0.29 \pm 0.06 ¹⁾	3.38 \pm 0.17 ¹⁾
6	0.38 \pm 0.03 ¹⁾	2.99 \pm 0.15 ¹⁾
12	0.48 \pm 0.01 ¹⁾	2.40 \pm 0.08 ¹⁾
18	0.53 \pm 0.11 ¹⁾	2.03 \pm 0.15 ¹⁾
24	0.62 \pm 0.03 ¹⁾	1.77 \pm 0.03 ¹⁾
36	0.68 \pm 0.02 ¹⁾	1.61 \pm 0.05 ¹⁾

注:剂量均为 1.2 g·kg⁻¹。

剂量组 RAGE 水平明显降低 ($P<0.05$), LRP-1 水平明显升高 ($P<0.05$), 提示 LG 含药血清可干预 BBB 相关转运蛋白的表达, 从而减少 A β 的脑内沉积, 对 BBB 损伤后具有一定的修复作用。见表 8。

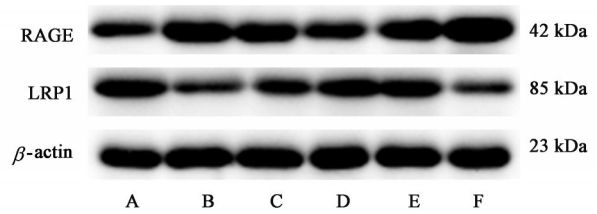


图 2 苓桂术甘汤对 BBB 损伤后 A β 转运蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of LG on A β transporter after BBB injury

表 8 苓桂术甘汤对 BBB 损伤后 A β 转运蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of LG on A β transporter after BBB injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RAGE/ β -actin	LRP-1/ β -actin
正常		0.84 \pm 0.07	1.31 \pm 0.16
模型		1.41 \pm 0.17 ¹⁾	0.66 \pm 0.08 ¹⁾
苓桂术甘汤	1.2	1.30 \pm 0.14	0.80 \pm 0.02
	2.4	1.03 \pm 0.19	0.84 \pm 0.14
	4.8	0.86 \pm 0.10 ²⁾	1.04 \pm 0.08 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.000 5	0.90 \pm 0.20 ²⁾	1.04 \pm 0.16 ²⁾

4 讨论

健康大脑中的低 A β 水平依靠其自身降解、中枢淋巴系统清除以及 BBB 转运来维持的^[12]。研究表明, 在 AD 的病变过程中, BBB 的损伤先于神经退行性变的产生^[13]; 通过动态对比增强磁共振成像量化发现, BBB 完整性随着年龄增加而逐渐丧失, 同年龄段的轻度认知障碍患者 (MCI) 中 BBB 通透性明显增加^[14]; AD 患者的认知能力与 BBB 完整性成正比关系, 同时发现, 脑内高 A β 水平区域, 其 BBB 的完整性越低, 可能与其转运清除 A β 能力下降有关^[15-16], 而 A β 清除受损将导致其在脑内过度沉积, 破坏脑中低水平 A β 的状态, 从而加重 AD 的病理进程, 进一步影响 BBB 的完整性。由此可见, BBB 的完整性受损贯穿 AD 发病的始终, 且呈正相关, 因此对 BBB 损伤后修复将显得至关重要。

BBB 是内皮细胞之间形成的细胞间紧密连接 (TJ) 复合物的代表, TJ 处的蛋白质表达特征非常独特^[17], 该结构由 Claudin, ZO, Occludin 等骨架蛋白构成。BBB 的完整性与血管内皮细胞上的 Claudin-5, ZO-1, Occludin 等骨架蛋白密切相关^[18-19]。与此同时, MMP-2, MMP-9 的过表达可破坏 TJ 相关骨架蛋白, 从而增加 BBB 的损伤^[20], 因此 BBB 的损伤与 MMP 的上调和骨架蛋白的下调密切相关。

BBB 对 A β 的转运功能主要由内皮细胞的转运蛋白, LRP-1 和 RAGE 实现^[21], 小鼠脑内皮特异性

LRP-1失活显著减少了注射A β 的脑外排,使学习和记忆障碍加重,表明LRP-1能从脑内排出A β ,调控脑内A β 的稳态^[22];RAGE与A β 的结合会使血液中的A β 跨过BBB转移到脑内,加重脑内A β 沉积,从而促进促炎细胞因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6)的释放^[23],与此同时,促炎细胞因子的释放可激活脑内皮细胞,从而下调BBB相关骨架蛋白的水平,改变BBB的通透性,破坏BBB的完整性^[24-25]。基于上述过程,BBB相关转运蛋白与A β 结合失衡引起脑部炎症反应,BBB破坏和通透性增加,造成脑内A β 的过度沉积,进而加重AD的病理损伤。

由于年老脾衰,以致机体生化乏源,精血亏虚,上无以奉心化赤,下无以充精益髓,脑髓空虚,神机失用,以致谈前忘后,神情呆滞,神思不敏,AD才易于发生。因脾运不及,升降失常,清阳不升,浊阴不降,津不输布,水湿内停,则为痰为饮;痰饮上蒙清窍,见头晕,神情呆钝,词不达意,或喃喃自语,或呆若木鸡;痰饮中阻气机,则口涎外溢,痞满不适;痰饮下滞经络,则四肢困重,动作迟缓,懈惰思卧,更致AD不断进展。可见,在AD发生、发展进程中,脾气不足是其重要病理基础,并因此导致的痰饮内生是其重要的病理核心。《金匱要略·痰饮病篇》指出痰饮病的治则为“病痰饮者,当以温药和之”,代表方苓桂术甘汤,方中仅4味药,然选药精良,配伍有度。茯苓化痰饮,益脾气;桂枝温中阳,行水气;白术健脾胃,祛痰湿;甘草补脾气,和诸药。四药合用,脾胃健,痰饮去,驱邪扶正,标本兼顾。现代药理学研究亦表明,该方中多种主要成分具有抗炎抗氧化及神经保护作用^[26-30]。

本实验采用双层共培养法构建体外BBB模型,经A β 诱导后,可认为是AD病理状态下的体外BBB损伤模型。与模型组比较,24 h时,LG已显著提高细胞存活率,因此后续实验仅检测给予LG 24 h后骨架蛋白、炎症因子以及MMP-2, MMP-9的表达情况。与正常组比较,模型组主要骨架蛋白水平显著下降,致BBB损伤的相关炎症因子水平显著升高,表明A β 诱导的体外BBB损伤模型建立成功。与模型组相比,LG组可显著提高细胞存活率,且呈浓度依赖,初步提示LG在一定程度上对BBB损伤后具有修复作用。进一步研究发现,与模型组比较,LG组BBB骨架蛋白升高,相关炎症因子以及MMP-2, MMP-9水平降低,表明LG可减少BBB的渗漏和功能障碍,在一定程度上维护BBB的完整性。骨架蛋白构成的BBB紧密连接具有一定稳定性^[31],而

RAGE和LRP-1作为转运A β 的载体,存在不断转入和转出A β 的动态平衡状态。课题组前期研究发现,在AD大鼠模型中,LG可调节BBB上相关转运蛋白LRP-1, RAGE水平,进而减少A β 沉积引起的脑内炎症损伤^[9],基于上述认识,检测了给予LG后间隔较短的不同时间点的A β 相关转运蛋白的变化。通过对不同时间点A β 相关转运蛋白mRNA相对表达量的研究发现,3 h时,RAGE含量最低,LRP-1含量最高,随着时间的延长,RAGE含量逐渐上升,LRP-1含量逐渐下降,表明在给予LG 3 h后,对LRP-1, RAGE的调控作用达到顶峰,随后逐步趋于和缓,表明了LG在3 h已具有调节BBB上相关转运蛋白含量的作用,从而减少A β 的脑内沉积,对BBB损伤后具有一定的修复作用。

综上所述,LG对A β_{1-42} 引起的BBB损伤具有明显的保护作用,一方面可能与改善A β_{1-42} 引起的BBB相关骨架蛋白(ZO-1, Claudin-5, Occludin)降低、基质金属蛋白酶(MMP-2, MMP-9)以及炎症因子的升高,从而引起BBB完整性修复有关;另一方面可能与改变A β 的转运失衡状态,提高LRP-1水平促进A β 转出,降低RAGE水平减低A β 转入,从而改变BBB通透性相关,通过上述两条途径减缓“A β 沉积-BBB破坏-A β 沉积”的恶性循环。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KIM D H, LEE D, LIM H, et al. Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on amyloid beta levels *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4):933-940.
- [2] REVETT T J, BAKER G B, JHAMANDAS J, et al. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2013, 38(1):6-23.
- [3] MAWUENYEGA K G, SIGURDSON W, OVOD V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2010, 330(6012):1774.
- [4] DANEMAN R, PRAT A. The blood-brain barrier [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(1):a20412.
- [5] 马俊杰,周春祥,王小龙. 基于龟鹿二仙胶干预阿尔茨海默病血管周围间隙探讨“精生髓”内涵[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(11):106-111.

- [6] 温小雨,孙玉浩,夏猛. 五脏温阳化痰汤含药血清干预阿尔茨海默症细胞模型磷酸化tau蛋白的变化[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(7): 1116-1121.
- [7] 桑锋,谢中尧,刘成全,等. 通窍化痰汤治疗阿尔茨海默病30例[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(1): 95-96.
- [8] XI F, SANG F, ZHOU C, et al. Protective effects of LinguiZhugan decoction on amyloid-beta peptide (25-35)-induced cell injury: anti-inflammatory effects [J]. Neural Regen Res, 2012, 7(36): 2867-2873.
- [9] HU Q, YU B, CHEN Q, et al. Effect of LinguiZhugantang on neuroinflammation and expression disorder of the amyloid β -related transporters RAGE and LRP-1 in a rat model of Alzheimer's disease [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 827-834.
- [10] GOSSELET F. Modelling of the blood-brain barrier [J]. Med Sci (Paris), 2017, 33(4): 423-431.
- [11] YAO Y, HUANG J Z, CHEN Y, et al. Effects and mechanism of amyloid β_{1-42} on mitochondria in astrocytes [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6997-7004.
- [12] TARASOFF-CONWAY J M, CARARE R O, OSORIO R S, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(8): 457-470.
- [13] STORCK S E, PIETRZIK C U. The blood brain-barrier and its role in Alzheimer's disease [J]. Neuroforum, 2018, 24(4): A197-A205.
- [14] MONTAGNE A, BARNES S R, SWEENEY M D, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus [J]. Neuron, 2015, 85(2): 296-302.
- [15] van de HAAR H J, BURGMANS S, JANSEN J F, et al. Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer disease [J]. Radiology, 2016, 281(2): 527-535.
- [16] MINERS J S, SCHULZ I, LOVE S. Differing associations between $A\beta$ accumulation, hypoperfusion, blood-brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(1): 103-115.
- [17] TIETZ S, ENGELHARDT B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions [J]. J Cell Biol, 2015, 209(4): 493-506.
- [18] NITTA T, HATA M, GOTOH S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [J]. J Cell Biol, 2003, 161(3): 653-660.
- [19] Van ITALLIE C M, ANDERSON J M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 36: 157-165.
- [20] WAN W, CAO L, LIU L, et al. $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced leakage in an *in vitro* blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins [J]. J Neurochem, 2015, 134(2): 382-393.
- [21] YAMAZAKI Y, KANEKIYO T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2017, doi: 10.3390/ijms18091965.
- [22] STORCK S E, MEISTER S, NAHRATH J, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- β_{1-42} across the blood-brain barrier [J]. J Clin Invest, 2016, 126(1): 123-136.
- [23] ZLOKOVIC B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [J]. Neuron, 2008, 57(2): 178-201.
- [24] WANG Y, JIN S, SONOBE Y, et al. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110024.
- [25] ROCHFORD K D, COLLINS L E, MURPHY R P, et al. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101815.
- [26] 秦劭晨,王爱梅,李若瑜. 茯苓酸对TNF- α 诱导SH-SY5Y细胞炎症氧化应激反应和凋亡的拮抗作用研究 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(6): 854-858.
- [27] 王文琪,崔磊,张馨方,等. 茯苓桂枝药对对慢性心力衰竭模型大鼠心肌组织血管紧张素II受体1及血清炎症因子的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(21): 1921-1926.
- [28] 陈浩,师亮,王燕宏,等. 甘草黄酮对MPTP帕金森病模型小鼠的神经保护效应及对小胶质细胞活化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 225-229.
- [29] 王俐君,李坤,高洁,等. 反式桂皮醛通过抑制前额皮质IL-1 β 改善阿尔茨海默病小鼠记忆障碍的作用研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(2): 429-436.
- [30] 赵玉娇,高耀,周玉枝,等. 白术在神经精神系统疾病中的药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4546-4551.
- [31] ZIHNI C, MILLS C, MATTER K, et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(9): 564-580.

[责任编辑 周冰冰]