

淫羊藿苷通过调节 RhoA/ROCK 信号通路改善 AD 神经元和树突损伤的机制

何丽君^{1*}, 杨彬彬¹, 卓实¹, 顾承真², 丁雯², 刘丹琪², 徐小妹³

(1. 福建中医药大学附属人民医院, 福州 350004;

2. 福建农林大学, 福州 350002;

3. 福建省医学科学研究院 福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

[摘要] 目的:观察淫羊藿苷对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠 Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)信号通路的作用,并探讨其改善神经元和树突损伤的作用机制。方法:通过对大鼠双侧侧脑室注射 β 样淀粉蛋白 1-42($A\beta_{1-42}$, $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)建立 AD 模型,并将大鼠分为模型组,淫羊藿苷低、中、高剂量组(0.03 、 0.06 、 $0.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设空白组。空白组和模型组按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃等体积的生理盐水。采用 Morris 水迷宫评估大鼠的认知功能。采用尼氏染色观察大鼠海马 CA1 区病理形态。采用高尔基染色观察大鼠海马 CA1 区树突棘密度和树突长度。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 的 mRNA 表达水平。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 的蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著增加($P<0.01$),穿越平台次数和目标象限驻留时间显著减少($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠逃避潜伏期减少($P<0.05$, $P<0.01$),穿越平台次数和目标象限驻留时间增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠海马 CA1 区神经元数量、树突棘密度和树突长度显著减少($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马 CA1 区神经元数量、树突棘密度和树突长度增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠海马中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2 的 mRNA 和蛋白表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:淫羊藿苷改善 AD 认知功能、神经元和树突损伤可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路相关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 淫羊藿苷; Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)信号通路; 神经元和树突损伤

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R745.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0090-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221943

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220804.0857.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-04 11:48

Mechanism of Icariin in Ameliorating Neuronal and Dendritic Damage in Alzheimer's Disease by Regulating RhoA/ROCK Signaling Pathway

HE Lijun^{1*}, YANG Binbin¹, ZHUO Shi¹, GU Chengzhen², DING Wen², LIU Danqi², XU Xiaomei³

(1. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004,

China; 2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Testing, Fujian Academy of Medical Sciences,

Fuzhou 350001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of icariin on the recombinant Ras homolog family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) signaling pathway in rats with

[收稿日期] 2022-05-04

[基金项目] 2018年福建省卫计委中青年骨干项目(2018-ZQN-68)

[通信作者] *何丽君,主任中药师,从事临床方剂与中药相关合理用药分析研究, E-mail: helj0909@163.com

Alzheimer's disease (AD), and to explore the mechanism of icariin in ameliorating the neuronal and dendritic damage. **Method:** The β -amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$, $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) was used to induce AD in rats via lateral ventricle injection, and the rats were divided into a model group, a low-dose icariin group ($0.03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), a middle-dose icariin group ($0.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), a high-dose icariin group ($0.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a control group. The control group and the model group were given an equal volume of normal saline at a dose of $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. The cognitive function of rats was assessed by the Morris water maze. The pathological morphology of the rat hippocampal CA1 area was observed by Nissl staining. Dendritic spine density and dendritic length in the CA1 region of the hippocampus were observed by Golgi-Cox staining. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1, and ROCK2 in the hippocampus. Western blot assay was used to detect the protein expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1, and ROCK2 in the hippocampus. **Result:** As compared with the control group, the escape latency of the rats in the model group was increased ($P<0.01$), while the number of crossing the platform and the dwelling time in the target quadrant were decreased ($P<0.01$). As compared with the model group, the escape latency of the rats in the middle and high-dose icariin groups was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the number of crossing the platform and the dwelling time in the target quadrant were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). As compared with the control group, the number of neurons, dendritic spine density, and dendritic length in the hippocampal CA1 area of the rats in the model group were decreased ($P<0.01$). As compared with the model group, the number of neurons, dendritic spine density, and dendritic length in the hippocampus of the rats in the middle and high-dose icariin groups were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). As compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1, and ROCK2 in the hippocampus of the rats in the model group were increased ($P<0.01$). As compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1, and ROCK2 in the hippocampus of the rats in the middle and high-dose icariin groups were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Icariin improves cognitive function and neuronal and dendritic damage in AD by inhibiting the RhoA/ROCK signaling pathway.

[Keywords] Alzheimer's disease; icariin; Ras homolog family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) signaling pathway; neuronal and dendritic damage

阿尔茨海默病(AD)为我国发病率较高的神经退行性疾病,常表现为认知功能减退。随着人口老龄化的加速,当前我国罹患AD的人群已突破1 000万人^[1]。然而,AD治疗药物有限,现有的多奈哌齐、美金刚等药物仅能改善症状,且无法从根本上逆转其病理进程^[2-3]。因此,迫切需要更为有效的抗AD药物。中医学认为AD属于衰老相关疾病,并将其归为“健忘”“善忘”等范畴。AD发病与五脏亏损关系密切,其中肾气亏虚尤为关键。近年来,临床和动物实验均证实补肾类中药具有较好的抗AD作用^[4-6]。淫羊藿,亦仙灵脾,为经典的补肾药物。《神农本草经·淫羊藿》认为淫羊藿有“益力气、强志”之功,《本草新编·淫羊藿》亦认为其有“除中年健忘,益肾固筋,增力强志”之效。一些动物实验研究也表明淫羊藿的有效活性成分淫羊藿苷具有较好的抗AD作用,并能通过改善线粒体能量代谢、抑制氧

化应激和神经炎症等途径延缓AD的病理进程^[7-10]。

神经元和树突损伤为AD的典型病理特征之一。近年来,研究证实神经炎症对神经元和树突损伤的发生尤为关键,抑制神经炎症则可改善AD认知功能、神经元和树突损伤^[11-12]。Ras同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)为调节炎症的经典通路,研究证实AD脑内表现有RhoA/ROCK信号通路异常活化的情况,抑制该信号通路则可改善AD认知功能和神经元损伤^[13-15]。尽管RhoA/ROCK信号通路在AD中的作用已得到广泛证实,但目前尚缺乏淫羊藿苷通过抑制RhoA/ROCK信号通路改善AD神经元和树突损伤的研究。基于上述研究现状及课题“基于生物色谱联合技术的淫羊藿补肾助阳活性物质研究(2018-ZQN-68)”的基础上,本研究将通过侧脑室注射 β 淀粉样蛋白1-42($A\beta_{1-42}$)建立AD模型,并给予不同剂

量的淫羊藿苷治疗,治疗结束后将对大鼠的认知功能、神经元和树突损伤及RhoA/ROCK信号通路中的关键分子进行检测,从而明确淫羊藿苷改善AD神经元和树突损伤的分子机制。

1 材料

1.1 动物 80只SPF级雄性SD大鼠,体质量(220±20)g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号SYXK(辽)2020-0001,合格证编号210726211100125325。动物饲养于福建中医药大学,动物房控制在23~25℃,相对湿度维持在40%~50%。实验期间,动物可自由摄食和饮水。本实验获得福建中医药大学动物伦理委员会审核和批准,伦理审批号为2018-ZQN-68。

1.2 药物及试剂 淫羊藿由福建中医药大学附属人民医院中药房提供,淫羊藿苷则由本课题组前期实验提取分离所得,并经福建中医药大学中药鉴定教研室杨成梓教授团队鉴定;A β_{1-42} (美国Sigma-Aldrich公司,批号A2648);尼氏染色液(上海翌圣生物科技有限公司,批号60531ES50);高尔基染色液、RNA提取液、First Strand cDNA Synthesis试剂盒、SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix 试剂盒(武汉Servicebio公司,批号分别为G1069、G3013、G3330、G3326);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抗体、白细胞介素-1 β (IL-1 β)抗体、白细胞介素-6(IL-6)抗体(武汉ABclonal公司,批号分别为A11534、A1112、A0286);BCA蛋白浓度测定试剂盒、Ras同源基因家族成员A(RhoA)抗体、Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(ROCK1)抗体、Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶2(ROCK2)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020、K001649P、K001838P、K004146P、K106389P、SA134)。

1.3 仪器 XR-XM101型Morris水迷宫(上海欣软信息科技有限公司);LRH-70型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);71000型大小鼠脑立体定向仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);KD-BM型组织包埋机和KD2260型石蜡切片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司);Bioptic Qsep100型核酸蛋白分析仪(江苏光鼎生物科技有限公司);LC480型Real-time PCR仪(瑞士Roche公司);SVE-2型垂直电泳仪及电源(武汉Servicebio公司);Tanon 1600型全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限

公司);BX43型正置光学显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将SD大鼠随机分为正常组和造模组,其中正常组15只,造模组65只。参考之前的文献报道^[9]制备A β_{1-42} 悬浮液:用二甲基亚砜(DMSO)和无菌生理盐水的混合液将A β_{1-42} 稀释成2.5 g·L⁻¹的混悬液,置37℃恒温孵育1周。参考文献^[10]制备AD模型:用4%水合氯醛溶液经腹腔注射麻醉大鼠(400 mg·kg⁻¹),解剖头部皮毛,并将其固定于脑立体定位仪。依据大鼠脑立体定位图谱,于囟门后0.9 mm,矢状线左/右侧1.5 mm处钻深为4.0 mm的圆孔(AP=0.9, L/R=1.5, V=4.0),钻孔后,使用微量进样器向大鼠双侧侧脑室匀速注射A β_{1-42} 悬浮液各2 μ L,注射速度为0.5 μ L·min⁻¹,留针5 min,退针,缝合皮毛。

2.2 给药 造模1周后,应用Morris水迷宫实验筛选出认知损伤大鼠60只。将60只认知损伤大鼠随机分为模型组,淫羊藿苷低、中、高剂量组,另将正常大鼠设为空白组,每组15只。参考文献^[9-10]确定淫羊藿苷组的给药剂量,即淫羊藿苷低、中、高剂量组分别按0.03、0.06、0.09 g·kg⁻¹的剂量灌胃淫羊藿苷配置的溶液。空白组和模型组则按10 mL·kg⁻¹的剂量灌胃等体积的生理盐水。5组连续灌胃4周,1次/d。

2.3 Morris水迷宫实验 治疗结束后,采用Morris水迷宫实验检测大鼠的认知功能。正式测试前,连续进行5 d学习记忆训练。训练结束后进行定位航行实验和空间探查实验,其中定位航行实验统计大鼠的逃避潜伏期,空间探查实验则统计大鼠的穿越平台次数、目标象限驻留时间及平均游泳速度。

2.4 尼氏染色观察大鼠海马病理形态 水迷宫实验后,从每组随机选取4只大鼠,麻醉后断头取脑,将脑组织平分为左右两等份,其中一部分置4%多聚甲醛溶液固定,另一部分则用作高尔基染色。将脑组织从多聚甲醛溶液捞出,进行石蜡包埋。利用切片机将脑组织切取5 μ m厚的切片。使用二甲苯和梯度乙醇对切片做脱蜡处理,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,将切片置尼氏染色液孵育15 min。再次使用梯度乙醇脱水,中性树胶封片。显微镜下观察,并用图像分析软件Image J分析海马区神经元数量。

2.5 高尔基染色观察大鼠海马区神经元树突棘 将一部分脑组织置4%多聚甲醛溶液固定48 h。

PBS漂洗后,将脑组织置高尔基染色液避光处理14 d,浸泡48 h后更换染色液,此后每3 d更换1次。PBS漂洗脑组织,将脑组织置80%冰乙酸孵育过夜。捞出脑组织,置30%蔗糖浸泡1 h。使用切片机将脑组织切成100 μm厚的切片,过夜避光晾干。浓氨水处理切片15 min,再用酸性坚膜定影液处理15 min。PBS洗涤,甘油明胶封片。光学显微镜下观察切片,采集图像。将图片导入Image J软件,将图像转换成灰度图片后使用Threshold二值化图片,添加标尺,利用Skeletonize将骨骼化图片,最后应用Skeleton计算树突棘密度和树突长度。

2.6 Real-time PCR检测大鼠海马中TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA表达水平

从每组随机选取7只大鼠,并以相同方式麻醉大鼠。断头取脑,冰上分离海马组织。取海马组织,加入RNA提取液1 mL,使用核酸蛋白仪分析mRNA的纯度和浓度。利用First Strand cDNA Synthesis逆转录试剂盒对纯度合格的样本逆转录,以合成cDNA。按照SYBR Green Real-time PCR Master Mix试剂盒说明书进行PCR反应,并置Real-time PCR仪扩增。扩增条件为95 °C预变性30 s,95 °C变性15 s,60 °C退火30 s,循环40次后绘制溶解曲线。分析和统计 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。本研究所用引物由武汉皮诺飞生物科技有限公司设计和合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TNF-α	上游 GCTTCGGCCACTCTTGTTT	180
	下游 AACGCTCTGTGCCTTATTGC	
IL-1β	上游 CCTATGTCTTGCCCGTGGAG	118
	下游 CACACACTAGCAGGTCGTCA	
IL-6	上游 CACCGATTGAAGAGAAGCG	142
	下游 AAGTTGATGGTCTGAGGGAA	
RhoA	上游 CTAAAGTCCAAGGGTCCATTT	162
	下游 ATTCTTGGATTCCCATTCTT	
ROCK1	上游 CTTATTGTCTTGGGAAATCT	175
	下游 GGGAAATCCAATCTTATTCTT	
ROCK2	上游 TCCAAATCCGGATGGTCCTTT	120
	下游 ATTGTTATCTCCATTGGATTTA	
GAPDH	上游 ATGGGTGTGAACCACGAGA	229
	下游 CAGGGATGATGTTCTGGGCA	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马中TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平 取剩余4只大鼠海马,加入RAPI裂解液1 mL,匀浆,以12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6.5 cm),取上清液。BCA法测定各样本蛋白浓度,沸水变性蛋白后收集样本。按照试剂盒说明书制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,上样30 μg,依次电泳和转膜。将膜置5%脱脂牛奶中封闭30 min。加入一抗TNF-α(1:1 000)、IL-1β(1:1 000)、IL-6(1:1 000)、RhoA(1:1 000)、ROCK1(1:1 000)、ROCK2(1:1 000)和GAPDH(1:2 000),置4 °C孵育过夜;TBST洗膜,加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:1万),室温孵育1 h;TBST洗膜,向膜表面均匀滴加ECL显色液,并用凝胶成像仪曝光条带。用图像分析软件Image J分析目标蛋白的灰度值,并做统计分析。

2.8 统计学分析 采用SPSS 26.0软件对实验数据进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据不符合正态性则采用Kruskal-Wallis H检验。实验数据符合正态性则用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐组间比较采用Tamhane's T2检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 水迷宫实验筛选结果 造模7 d后,本研究通过水迷宫实验筛选出60只认知损伤大鼠。与正常组比较,造模组大鼠平台潜伏期显著增加($P < 0.01$),而穿越平台次数和目标象限停留时间明显减少($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

表2 水迷宫实验筛选结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Preliminary experimental results of water maze test ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
正常组	15	19.04±4.39	5.34±0.59	26.13±3.79
造模组	60	32.94±4.51 ²⁾	4.04±0.71 ¹⁾	17.97±2.86 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

3.2 对AD大鼠学习记忆的影响 与空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著增加($P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠逃避潜伏期明显减少($P < 0.05, P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),淫羊藿苷低剂量组大鼠逃避潜伏

期、穿越平台次数和目标象限驻留时间较模型组也有所变化,但差异没有统计学意义。此外,各组大

鼠平均游泳速度变化不明显,差异没有统计学意义。见表3。

表3 淫羊藿苷对AD大鼠学习记忆的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

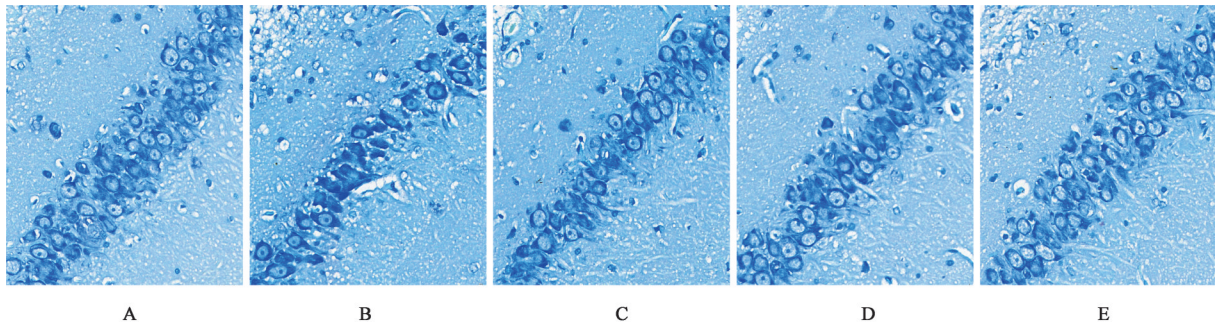
Table 3 Effect of icariin on learning and memory ability of AD rat ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	目标象限驻留时间/s	平均游泳速度/cm·s ⁻¹
空白组		14.23±4.23	5.57±0.83	28.53±7.15	8.54±2.23
模型组		28.36±4.56 ¹⁾	2.72±0.93 ¹⁾	11.57±4.33 ¹⁾	8.24±2.04
淫羊藿苷低剂量组	0.03	25.48±3.61	2.89±0.65	12.99±4.17	8.89±2.27
淫羊藿苷中剂量组	0.06	19.24±4.33 ³⁾	3.49±0.49 ²⁾	22.28±4.62 ³⁾	8.33±2.92
淫羊藿苷高剂量组	0.09	20.36±3.79 ³⁾	3.96±0.91 ³⁾	22.81±5.53 ³⁾	8.05±1.99

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表4-表9同)

3.3 对AD大鼠海马病理形态的影响 空白组大鼠海马CA1区神经元结构清晰,神经元排列规则,细胞间隙较小。模型组大鼠海马CA1区神经元间隙增加、排列欠规则,胞内可见尼氏体深染。淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马CA1区神经元间隙减小、排列稍整齐,胞内尼氏体深染减少,而淫羊藿苷低剂量组海马神经元形态与模型组相似。与空白组

比较,模型组大鼠海马CA1区神经元数量显著减少,差异具有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马CA1区神经元数量均有不同程度增加差异具有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。淫羊藿苷低剂量组大鼠海马CA1区神经元数量较模型组也有所增加,但差异没有统计学意义。见图1、表4。



注:A.空白组;B.模型组;C.淫羊藿苷低剂量组;D.淫羊藿苷中剂量组;E.淫羊藿苷高剂量组(图2-图4同)

图1 淫羊藿苷对AD大鼠海马病理形态的影响(尼氏染色,×400)

Fig. 1 Effect of icariin on pathological morphology of hippocampus in AD rat (Nissl staining, ×400)

表4 淫羊藿苷对AD大鼠海马CA1区神经元数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of icariin on number of neurons in hippocampal CA1 region of AD rat ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经元数量/个
空白组		149.39±17.15
模型组		89.49±15.14 ¹⁾
淫羊藿苷低剂量组	0.03	99.07±14.34
淫羊藿苷中剂量组	0.06	117.92±15.91 ²⁾
淫羊藿苷高剂量组	0.09	127.62±14.58 ³⁾

3.4 对AD大鼠海马CA1区神经元树突棘密度和树突长度的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马CA1区神经元树突棘密度和树突长度显著减少(P<0.01);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海

马CA1区神经元树突棘密度和树突长度均明显增加(P<0.05, P<0.01),淫羊藿苷低剂量组大鼠海马CA1区神经元树突棘密度和树突长度较模型组也有所增加,但差异没有统计学意义。见图2、表5。

3.5 对AD大鼠海马中TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA表达水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA表达水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA表达水平均明显下降(P<0.05, P<0.01),淫羊藿苷低剂量组大鼠海马中TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA表达水平较模型组也有所降低,但差异无统计学意义。见表6。

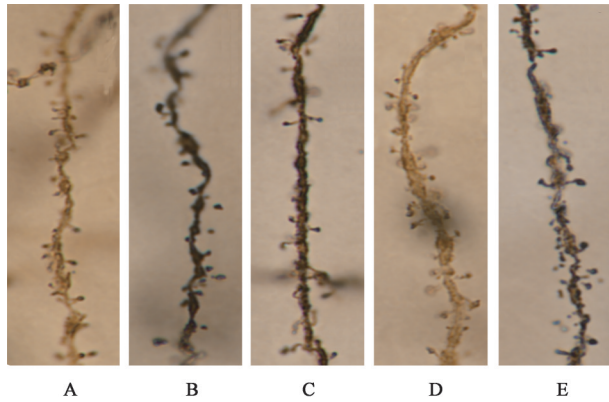


图2 淫羊藿苷对AD大鼠海马CA1区神经元树突棘密度和长度的影响(高尔基染色, ×1 000)

Fig. 2 Effect of icariin on density and length of dendritic spines in hippocampal neuron CA1 region of AD rat (Golgi-cox staining, ×1 000)

3.6 对AD大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的蛋白表达水平均有不同程度下降($P<0.05$, $P<0.01$),

表5 淫羊藿苷对AD大鼠海马CA1区神经元树突棘密度和长度的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 5 Effect of icariin on density and length of dendritic spines in hippocampal neuron CA1 region of AD rat ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

模型	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	树突棘密度/ $\text{个}/10\ \mu\text{m}$	树突长度/ μm
空白组		7.87 \pm 0.71	5.84 \pm 0.55
模型组		4.13 \pm 0.59 ¹⁾	3.98 \pm 0.62 ¹⁾
淫羊藿苷低剂量组	0.03	4.23 \pm 0.42	4.11 \pm 0.45
淫羊藿苷中剂量组	0.06	5.66 \pm 0.39 ³⁾	4.39 \pm 0.63 ²⁾
淫羊藿苷高剂量组	0.09	5.86 \pm 0.64 ³⁾	4.81 \pm 0.39 ³⁾

淫羊藿苷低剂量组大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的蛋白表达水平较模型组也有所降低,但差异没有统计学意义。与空白组比较,模型组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平均有不同程度下降($P<0.05$, $P<0.01$),淫羊藿苷低剂量组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平较模型组也有所降低,但差异没有统计学意义。见表7、图3和图4。

表6 淫羊藿苷对AD大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of icariin on mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1 and ROCK2 in hippocampus of AD rat ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6	RhoA	ROCK1	ROCK2
空白组		0.55 \pm 0.08	0.58 \pm 0.13	0.54 \pm 0.15	0.44 \pm 0.14	0.37 \pm 0.12	0.45 \pm 0.11
模型组		0.98 \pm 0.07 ¹⁾	0.87 \pm 0.15 ¹⁾	0.81 \pm 0.18 ¹⁾	0.76 \pm 0.11 ¹⁾	0.73 \pm 0.11 ¹⁾	0.82 \pm 0.14 ¹⁾
淫羊藿苷低剂量组	0.03	0.97 \pm 0.09	0.84 \pm 0.14	0.76 \pm 0.13	0.69 \pm 0.10	0.69 \pm 0.13	0.79 \pm 0.11
淫羊藿苷中剂量组	0.06	0.72 \pm 0.07 ³⁾	0.65 \pm 0.13 ³⁾	0.59 \pm 0.11 ³⁾	0.63 \pm 0.09 ²⁾	0.56 \pm 0.08 ³⁾	0.62 \pm 0.12 ³⁾
淫羊藿苷高剂量组	0.12	0.64 \pm 0.11 ³⁾	0.68 \pm 0.08 ³⁾	0.61 \pm 0.15 ²⁾	0.59 \pm 0.11 ³⁾	0.61 \pm 0.09 ²⁾	0.63 \pm 0.14 ³⁾

表7 淫羊藿苷对AD大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2的蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 7 Effect of icariin on protein expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, RhoA, ROCK1 and ROCK2 in hippocampus of AD rat ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α /GAPDH	IL-1 β /GAPDH	IL-6/GAPDH	RhoA/GAPDH	ROCK1/GAPDH	ROCK2/GAPDH
空白组		0.61 \pm 0.19	0.69 \pm 0.13	0.73 \pm 0.09	0.61 \pm 0.11	0.51 \pm 0.11	0.71 \pm 0.10
模型组		0.93 \pm 0.15 ¹⁾	1.13 \pm 0.12 ¹⁾	1.18 \pm 0.06 ¹⁾	1.39 \pm 0.15 ¹⁾	0.96 \pm 0.19 ¹⁾	1.04 \pm 0.11 ¹⁾
淫羊藿苷低剂量组	0.03	0.90 \pm 0.12	1.05 \pm 0.09	1.07 \pm 0.15	1.30 \pm 0.08	0.89 \pm 0.11	0.98 \pm 0.15
淫羊藿苷中剂量组	0.06	0.72 \pm 0.13 ³⁾	0.89 \pm 0.06 ³⁾	0.99 \pm 0.06 ²⁾	1.09 \pm 0.09 ³⁾	0.72 \pm 0.08 ²⁾	0.81 \pm 0.07 ³⁾
淫羊藿苷高剂量组	0.09	0.69 \pm 0.12 ³⁾	0.91 \pm 0.07 ³⁾	0.96 \pm 0.09 ³⁾	1.15 \pm 0.14 ²⁾	0.77 \pm 0.06 ²⁾	0.86 \pm 0.09 ²⁾

4 讨论

中医学认为,肾虚为AD发病的关键,治疗上则主张采用补肾益智之法。淫羊藿,首载于《神农本草经》,性温味辛甘,具有补肾壮阳和祛风除湿之

功。此外,《神农本草经·淫羊藿》还载其有“强志”之效。此后,淫羊藿的益智功效被广泛提及,《日华子本草·草部·仙灵脾》和《证类本草·卷八·淫羊藿》则明确提出淫羊藿可治“中年健忘”,《本草新编·淫

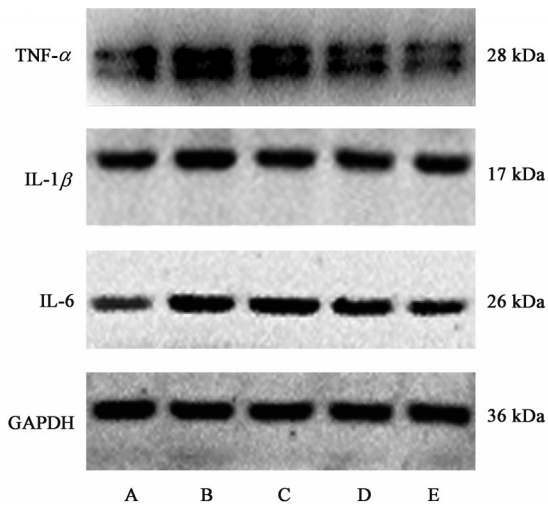


图3 各组大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein expression in hippocampus of rat in each group

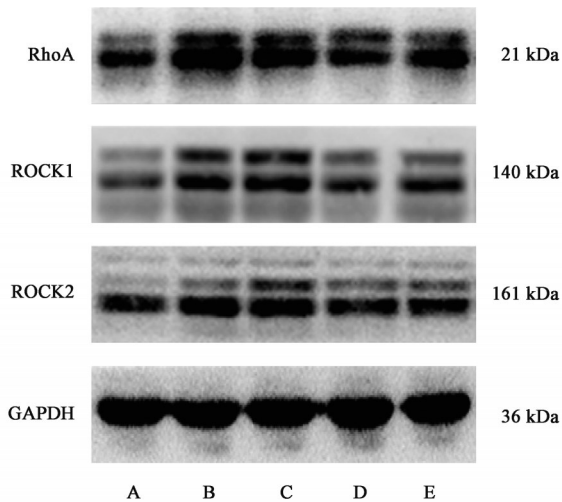


图4 各组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of RhoA, ROCK1 and ROCK2 protein expression in hippocampus of rat in each group

羊藿》也认为其可“除中年健忘，益肾固筋，增力强志”。因此，淫羊藿为抗AD的有效药物。几年来，学术界从淫羊藿中鉴定出多种活性成份，其中淫羊藿苷抗AD的作用被广泛提及。研究证实淫羊藿苷对AD动物和细胞模型均具有较好的治疗作用，且具有一定的神经保护作用^[16-17]。因此，本实验将研究淫羊藿苷抗AD的作用及作用机制。本研究水迷宫实验证实淫羊藿苷中、高剂量组可减少大鼠逃避潜伏期，并增加大鼠穿越平台次数和目标象限驻留时间，说明淫羊藿苷可改善A β ₁₋₄₂诱导的认知损伤。

神经元和树突损伤为AD的重要病理特征，其形成与A β 毒性、Tau蛋白磷酸化、氧化应激和神经炎症关系密切^[18-20]。近年来，研究证实抑制AD脑内神经炎症可改善AD神经元和树突损伤，并缓解

海马依赖性学习记忆障碍^[11-12]。本研究首先通过尼氏染色和高尔基染色对AD模型大鼠神经元和树突进行检测，结果发现，模型组大鼠海马CA1区神经元数量、树突棘密度和树突长度较空白组明显减少，而淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马CA1区神经元数量、树突棘密度和树突长度较模型组增加，这说明淫羊藿苷可以改善A β ₁₋₄₂诱导的神经元和树突损伤。此外，课题组还检测了脑内促炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的mRNA和蛋白表达水平，结果证实淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的mRNA和蛋白表达水平较模型组下调，这说明淫羊藿苷可抑制A β ₁₋₄₂诱导神经炎症。综合分析上述实验结果，课题组认为淫羊藿苷可通过抑制神经炎症改善AD神经元和树突损伤。

RhoA为Rho亚家族之一，属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。RhoA为调节细胞骨架肌动蛋白重要因子，并广泛分布于肝、肺等组织^[21]。近年来，研究证实RhoA还可在脑和心脏表达，并证实其可通过影响A β 代谢，突触发育、神经炎症等途径参与AD的病理进程^[13,22-23]。ROCK1和ROCK2为RhoA下游的关键效应物，RhoA的活化可促使ROCK1和ROCK2的进一步激化，从而形成RhoA/ROCK信号转导途径。近年来，有研究发现RhoA/ROCK信号通路可调节AD神经炎症和突触可塑性，且该信号通路在AD脑内存在异常活化的表现^[24-26]。本研究发现，对大鼠侧脑室注射A β ₁₋₄₂后，模型组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA和蛋白表达水平明显高于空白组，这验证了文献报道AD脑内RhoA/ROCK信号通路异常活化的结论。在给予AD大鼠不同剂量的淫羊藿苷治疗后，淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马中RhoA、ROCK1、ROCK2的mRNA和蛋白表达水平下降，这说明淫羊藿苷可抑制AD脑内RhoA/ROCK信号通路的活化。

综上，淫羊藿苷，尤其是中、高剂量淫羊藿苷，可改善AD认知功能障碍、神经元和树突损伤，其机制可能与其抑制脑内RhoA/ROCK信号通路有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: A cross-sectional study [J]. Lancet Public Health, 2020, 5 (12): e661-e671.
- [2] KHAN S, BARVE K H, KUMAR M S. Recent

- advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(11): 1106-1125.
- [3] ATHAR T, AL BALUSHI K, KHAN S A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(7): 5629-5645.
- [4] 时晶,倪敬年,司芸芳,等. 补肾法治疗阿尔茨海默病的系统评价[J]. *天津中医药大学学报*, 2021, 40(2): 211-217.
- [5] 张丁阳,解紫从,华茜. 补肾益智方药治疗阿尔茨海默病疗效的系统评价与Meta分析[J]. *世界中医药*, 2021, 16(13): 1990-1997.
- [6] 邓敏贞,钟晓琴,彭丽霖,等. 阿尔茨海默病的病理机制及中医药防治机制研究进展[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(4): 984-990.
- [7] 何丽君,江金井,陈豪,等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(2): 17-20.
- [8] CHUANG Y, VAN I, ZHAO Y, et al. Icariin ameliorate Alzheimer's disease by influencing SIRT1 and inhibiting A β cascade pathogenesis [J]. *J Chem Neuroanat*, 2021, 117: 102014.
- [9] JIANG X, CHEN L L, LAN Z, et al. Icariin ameliorates amyloid pathologies by maintaining homeostasis of autophagic systems in A β_{1-42} -injected rats [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(12): 2708-2722.
- [10] SHENG C, XU P, ZHOU K, et al. Icariin attenuates synaptic and cognitive deficits in an A β_{1-42} -induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7464872.
- [11] CORNELL J, SALINAS S, HUANG H Y, et al. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4): 705-716.
- [12] WANG P, WANG F, NI L, et al. Targeting redox-altered plasticity to reactivate synaptic function: A novel therapeutic strategy for cognitive disorder [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(3): 599-608.
- [13] CAI R, WANG Y, HUANG Z, et al. Role of RhoA/ROCK signaling in Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 414: 113481.
- [14] PARK J C, BAIK S H, HAN S H, et al. Annexin A1 restores A β_{1-42} -induced blood-brain barrier disruption through the inhibition of RhoA-ROCK signaling pathway [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 149-161.
- [15] 刘忠锦,张春梅,张羽楠,等. 鹿茸多肽对APP/PS1双转基因小鼠Rho/ROCK通路的影响[J]. *解剖学报*, 2022, 53(2): 190-195
- [16] 明玲,巴智胜,黄南渠,等. 淫羊藿主要活性成分对阿尔茨海默病中炎症反应的作用及机制的研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(6): 227-231.
- [17] 李莹,黄南渠,冯飞,等. 淫羊藿苷在阿尔茨海默病中的神经保护作用及机制研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 192-196, 27.
- [18] CUESTAS TORRES D M, CARDENAS F P. Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging [J]. *Rev Neurosci*, 2020, 31(3): 245-268.
- [19] MERCERÓN-MARTÍNEZ D, IBACETA-GONZÁLEZ C, SALAZAR C, et al. Alzheimer's disease, neural plasticity, and functional recovery [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82(s1): s37-s50.
- [20] 谭雪,高莉,任佳,等. 突触可塑性对阿尔茨海默病影响的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(9): 52-55.
- [21] 王新斌,戴恩来,薛国忠,等. 基于RhoA/ROCK通路探讨淫羊藿苷对肾病综合征大鼠的保护机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11): 78-84.
- [22] AGUILAR B J, ZHU Y, LU Q. Rho GTPases as therapeutic targets in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, 9(1): 97-114.
- [23] 张天弼,张云龙,胡警文,等. Rho/ROCK2通路在阿尔茨海默病病理进程中的重要作用[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(1): 33-38.
- [24] ZHANG X, YE P, WANG D, et al. Involvement of RhoA/ROCK Signaling in A β -induced chemotaxis, cytotoxicity and inflammatory response of microglial BV2 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(5): 637-650.
- [25] XIANG X, WANG X, JIN S, et al. Activation of GPR55 attenuates cognitive impairment and neurotoxicity in a mouse model of Alzheimer's disease induced by A β_{1-42} through inhibiting RhoA/ROCK2 pathway [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2022, 112: 110423.
- [26] GUILER W, KOEHLER A, BOYKIN C, et al. Pharmacological modulators of small GTPases of Rho family in neurodegenerative diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 661612.
- [责任编辑 孙丛丛]