

基于Nlrp3/ASC/Caspase-1通路探讨加减薯蓣丸对APP/PS1痴呆小鼠神经炎症的影响

王小燕¹, 谭子虎^{1,2*}, 喻小明¹, 王威¹, 余何¹, 汤琪¹, 萧闵¹
(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] 目的:观察加减薯蓣丸对淀粉样蛋白前体蛋白/早老素1(APP/PS1)痴呆小鼠认知障碍的治疗效果并探讨其作用机制。方法:将10只野生型小鼠设为正常组,40只APP/PS1小鼠,分为模型组,加减薯蓣丸低、高剂量组(14, 64 g·kg⁻¹)和多奈哌齐组(1 mg·kg⁻¹),每组10只,正常组、模型组给予等体积生理盐水,连续灌胃35 d。给药结束后, Morris水迷宫检测小鼠记忆和空间探索能力;尼氏(Nissl)染色观察小鼠海马神经元形态;免疫组化检测小鼠海马 β 淀粉样蛋白1-42(A β ₁₋₄₂)沉积;免疫荧光检测海马小胶质细胞(MG)标志物离子钙结合衔接分子1(Iba1)和激活状态标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马NOD样受体3(Nlrp3),接头蛋白指向相关斑点蛋白(ASC),半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)通路及白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马IL-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-18(IL-18)mRNA的表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠记忆和空间探索能力明显降低($P < 0.05$),海马神经元数量减少,A β ₁₋₄₂沉积增多, MG激活标记物Iba1, iNOS增加, Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β 蛋白的表达均明显增高($P < 0.05$), IL-1 β , IL-18, TNF- α mRNA表达均明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,加减薯蓣丸组能够明显改善APP/PS1小鼠的空间探索能力和记忆能力($P < 0.05$),增加海马神经元数量,减少A β ₁₋₄₂沉积,减轻MG的激活,降低Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β 蛋白的表达($P < 0.05$),减少炎症因子mRNA的表达($P < 0.05$)。结论:加减薯蓣丸能够通过抑制Nlrp3/ASC/Caspase-1通路,降低APP/PS1小鼠海马IL-1 β 等炎症因子的表达,缓解神经炎症,减轻阿尔兹海默症(AD)病理损伤。

[关键词] 加减薯蓣丸; 淀粉样蛋白前体蛋白/早老素1(APP/PS1); NOD样受体3(Nlrp3); 炎症; 小胶质细胞

[中图分类号] R2-0;R289;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210339

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201216.0932.001.html>

[网络出版日期] 2020-12-16 10:06

Effect of Modified Shuyuwan on Neuroinflammation in APP/PS1 Dementia Mice Based on Nlrp3/ASC/Caspase-1 Signaling Pathway

WANG Xiao-yan¹, TAN Zi-hu^{1,2*}, YU Xiao-ming¹, WANG Wei¹, YU He¹, TANG Qi¹, XIAO Min¹

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Shuyuwan in amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1) dementia mice on cognitive and memory impairment and to explore its mechanism. **Method:** The 40 APP/PS1 mice were divided into model group (given Physiological saline), low and high-dose modified Shuyuwan (14, 64 g·kg⁻¹) group, and donepezil group (1 mg·kg⁻¹) and 10 wild mice were set as the blank control group (given Physiological saline). All of the mice were administered intragastrically for 35 days. The memory and space exploration ability of mice was detected by Morris water maze, the morphology of mouse hippocampal neurons were observed by Nissl staining. The deposition of β amyloid 1-42(A β ₁₋₄₂) in mouse

[收稿日期] 20201025(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703954);湖北省自然科学基金项目(2015CFA089)

[第一作者] 王小燕,在读博士,从事中医药防治心脑血管病研究,E-mail:13027782985@163.com

[通信作者] *谭子虎,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治心脑血管病研究,E-mail:hucmtan@163.com

hippocampus was detected by immunohistochemistry, and the expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), a marker of hippocampal microglia (MG) and Nitric oxide synthase (iNOS), a marker of activated MG, were detected by immunofluorescence. The protein expression of NLR family pyrin domain containing 3 (Nlrp3), Apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain (ASC), cysteine protease-1 (Caspase-1) and interleukin-1 beta (IL-1 β) were detected by Western blot, and the expression of IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-18 (IL-18) mRNA were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank control group, the memory and space exploration ability of the model group were significantly reduced ($P < 0.05$), the number of hippocampal neurons decreased, the deposition of A β_{1-42} increased, the markers of activated MG Iba1, iNOS increased, the protein expression of Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β increased significantly ($P < 0.05$), and the mRNA expression of IL-1 β , IL-18, and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the Chinese medicine group can improve the APP/PS1 mice's space exploration ability and memory ability ($P < 0.05$), increase the number of hippocampal neurons, reduce A β_{1-42} deposition, reduce the activation of MG, and reduce the protein expression of Nlrp3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β ($P < 0.05$), and reduced the expression of IL-1 β mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Shuyuwan can reduce the expression of IL-1 β and other inflammatory factors in the hippocampus of APP/PS1 mice by inhibiting the Nlrp3/ASC/Caspase-1 pathway, and relieve nerve inflammation and pathological injury of AD.

[Key words] Modified Shuyuwan; amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1); NOD-like receptor 3 (Nlrp3); inflammation; microglia

阿尔茨海默病(AD)是最常见的痴呆类型,是以认知、记忆障碍和精神行为异常为主要临床特征的神经退行性疾病^[1]。据统计,2050年全世界痴呆患者人数将达到1.5亿^[2]。AD发病机制仍不明确,其病理特征是 β 淀粉样蛋白(A β)沉积,tau过度磷酸化和神经炎症,而AD患者尸检表明了神经炎症可能是该疾病的关键驱动因素^[3-4]。NOD样受体3(Nlrp3)通路是神经炎症反应中的重要途径,大脑中的A β 沉积可以促进Nlrp3的激活,造成白细胞介素-1 β (IL-1 β)过度表达,介导AD神经炎症反应^[5-6]。现有研究表明Nlrp3通路的抑制可以减少AD小鼠中的A β 沉积,改善学习记忆能力,因此抑制Nlrp3通路的激活被认为可能是AD的一种新的治疗方法^[7]。

加减薯蓣丸是湖北省中医院名老中医吕继端,根据AD脾肾亏虚,痰瘀互阻的病机特点,在《金匮要略》薯蓣丸的基础上化裁而来。前期临床研究发现加减薯蓣丸能够改善AD患者的记忆、认知和日常生活能力,减少AD患者外周血IL-1 β 的表达^[8-9]。基础实验研究表明,加减薯蓣丸能够抑制血管性痴呆大鼠的海马神经元凋亡^[10]。但其是否通过抑制中枢炎症途径发挥治疗效果尚不清楚,故本实验在前期研究的基础上,以淀粉样蛋白前体蛋白/早老素1(APP/PS1)小鼠为AD模型,通过检测海马组织中

Nlrp3,接头蛋白指向相关斑点蛋白(ASC),半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白的表达,以期探讨加减薯蓣丸对中枢炎症的影响及作用机制,为AD的防治提供新思路。

1 材料

1.1 动物 SPF级5月龄APP/PS1小鼠40只,同月龄同背景野生型C57BL/6J小鼠10只,购于斯贝福生物技术有限公司(合格证编号1103242011013250),体重(30 \pm 3)g。饲养于湖北中医药大学SPF级实验动物中心,温度(22 \pm 3) $^{\circ}$ C,湿度(60 \pm 5)% ,自由进食进水,12h明暗交替,适应性喂养1周后开始实验。本实验获得湖北中医药大学动物实验中心伦理委员会批准(伦理编号HUCMS202007010),实验操作严格遵守相关规定进行。

1.2 药物及主要试剂 加减薯蓣丸浓缩剂(湖北省中医院制剂中心制备,批号Z20180013),由山药30g,党参20g,白术18g,茯苓18g,当归20g,白芍20g,川芎10g,熟地黄24g,何首乌24g,杜仲12g,枸杞子12g,五味子10g,远志12g,石菖蒲12g组成,上述药物第1次加水15倍,第2,3次加水10倍,煮3次,每次1h,过滤合并,经物理方法提纯浓缩成含生药1g \cdot mL⁻¹的溶液250mL。药材由湖北省中医院中药房提供,经湖北省中医院制剂科周从辉主管药师鉴定,符合用药标准;盐酸多奈哌齐(卫材

(中国)药业有限公司,批号1911067)溶于生理盐水中配成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液;尼氏(Nissl)染色液,兔多抗 $\text{A}\beta_{1-42}$,兔多抗离子钙结合衔接分子1(Iba1),兔多抗诱导型一氧化氮合酶(iNOS),第一链cDNA合成试剂盒(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号分别为G1036,GB111197,GB12105,GB11119,G3330);兔多抗ASC抗体,兔多抗Nlrp3抗体,兔多抗IL-1 β 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10500-1-AP,19771-1-AP,16806-1-AP);兔单抗Caspase-1抗体(中国艾博抗上海贸易有限公司,批号ab108362);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号BA1054);trizol(北京艾德莱生物科技有限公司,批号252250AX)。

1.3 仪器 Morriss水迷宫(成都泰盟科技有限公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);DYCZ-24DN型垂直电泳槽,DYCZ-40型电转仪(北京六一仪器厂);QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国赛默飞科技有限公司);EDC-810型PCR仪(东胜创新生物科技有限公司);JY02S型紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司);752型分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司);LP115型pH计(德国梅特勒-托利多有限公司);E100型显微镜,Nikon DS-U3成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 40只APP/PS1小鼠随机分为4组,分别为模型组,加减薯蓣丸低、高剂量组和多奈哌齐组,每组10只,另外取10只同月龄、同背景野生型C57BL/6J做正常组。加减薯蓣丸成人推荐剂量为 $1.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,依据《药理学实验方法》^[11]中人与动物体表面积换算法,小鼠药物剂量折算为低剂量组为 $14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高剂量组为 $64\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,盐酸多奈哌齐组给予 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,每日1次,连续35 d灌胃。正常组和模型组给予等体积的生理盐水。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 Morris水迷宫检测空间探索和记忆能力 灌胃结束后,用Morris水迷宫进行空间探索实验和定航实验。Morris水迷宫由圆形水池、无色圆形平台和视频追踪系统组成。定位航行实验中,将圆形平台置于水池第3象限,每次将小鼠按照第1,2,3,4象限顺序放入池中,记录小鼠从放入水中到找到平台的时间,为逃避潜伏期,连续进行5 d。空间探索

实验,第6天撤去平台,从第2象限放入,记录90 s内,小鼠穿越平台次数和在第3象限停留的时间。采用逃逸潜伏期、穿越平台次数、目标象限停留百分比评估小鼠认知能力。

2.2.2 Nissl染色评估海马形态学变化 行为学检测结束后,用2%戊巴比妥钠($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉小鼠,心脏灌注后取脑,中性固定液固定,石蜡包埋,切片($0.4\text{ }\mu\text{m}$),二甲苯、乙醇梯度脱蜡并用Nissl染液染色。使用显微镜和成像系统获取图像。

2.2.3 免疫组化检测小鼠海马组织中 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的表达水平 将 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的脑切片洗涤,用3%过氧化氢淬灭,封闭,加一抗(1:200),在4℃过夜,加二抗(1:1000)室温放置1 h,显色,用苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯脱蜡。光学显微镜在相同部位相同视野下拍照。

2.2.4 免疫荧光法检测小鼠海马组织中Iba1及iNOS表达情况 将 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的脑切片降梯度脱蜡至水,于EDTA抗原修复缓冲液进行抗原修复,用3%双氧水溶液进行封闭,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,血清封闭,加用PBS配置的Iba1(1:500)稀释液,4℃孵育过夜,加CY3-TSA荧光标记二抗(1:1000),洗涤3次,加用PBS配置的iNOS(1:500)稀释液,加FITC-TSA荧光标记二抗(1:1000),DAPI核复染,加荧光淬灭剂,封片,荧光显微镜拍照。

2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马ASC,Nlrp3,Caspase-1,IL-1 β 蛋白表达 行为学检测结束后,处死小鼠,于冰上迅速取出海马组织加入RIPA裂解液中,组织匀浆, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,离心半径4 cm,取上清,提取总蛋白,BCA法测蛋白质浓度,电泳,转膜,用5%脱脂牛奶封闭,加一抗(Nlrp3,ASC 1:1000,Caspase-1 1:2000,IL-1 β 1:800),加二抗(1:5000),显色液显色,用Image J计算各条带灰度值。

2.2.6 Real-time PCR检测海马IL-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-18(IL-18)mRNA表达 取海马组织30 mg,加trizol 1 mL提取总RNA,用第一链cDNA合成试剂盒将提取的总RNA反转成cDNA,反应条件为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。取合成后的cDNA($4\times$ 稀释) $4\text{ }\mu\text{L}$ 加入上、下游引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 进行Real-time PCR。PCR的循环程序参数为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,40个循环。绘制扩增曲线溶解曲线,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 进行分析。引物序列为IL-1 β 上游5'-GCACTACAGGCTCCGAGAT

GAA-3', 下游 5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT-3', 产物长度 145 bp; TNF- α 上游 5'-GCCACCACGC TCTTCTGTCTAC-3', 下游 CCTCCACACTCTCC TCCACCTT-3', 产物长度 178 bp; IL-18 上游 5'-CTGCTCTCCTGGTATGCCTCCT-3', 下游 5'-GGAC CTTGGATGCCGTGTGAT-3', 产物长度 233 bp; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 上游 5'-ATGGT GAAGTCGGTGTGAACG-3', 下游 5'-CGCTCC TGGAAGATGGTGTGATGG-3', 产物长度 233 bp。所有引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

表1 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of modified Shuyuwan on Escape latency in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第3天	第5天
正常		29.34±20.15	18.58±6.59	10.14±6.33
模型		63.76±15.33 ¹⁾	34.82±14.52 ¹⁾	20.52±12.86 ¹⁾
加减薯蓣丸	14	33.28±22.42 ²⁾	21.70±11.34 ²⁾	13.64±3.86 ²⁾
	64	35.60±29.72 ²⁾	20.36±14.05 ²⁾	12.48±9.11 ²⁾
多奈哌齐	0.001	43.38±22.33 ²⁾	22.82±11.18 ²⁾	20.12±12.72 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与加减薯蓣丸高剂量组比较³⁾ $P<0.05$ (表2~5同)。

3.1.2 对APP/PS1小鼠空间探索实验的影响 与正常组比较,模型组穿越平台次数显著减少,在目标象限停留百分比明显降低($P<0.05$);与模型组比较,加减薯蓣丸高、低剂量组治疗后穿越平台次数和目標象限停留百分比显著提高($P<0.01$),加减薯蓣丸低、高级量组比较,差异无统计学意义。见表2。

3.2 对APP/PS1小鼠的海马神经元的影响 海马CA1区Nissl染色显示,正常组小鼠海马神经元尼氏体丰富,细胞膜完整,着色明显。与正常组比较,模型组小鼠海马神经元细胞个数明显减少,细胞膜破裂,着色较浅,尼氏体数量减少;与模型组比较,加减薯蓣丸高、低剂量组神经元细胞数量增加,尼氏

2.3 统计学方法 使用SPSS 20.0软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合正态分布时,组间采用单因素方差分析,不符合正态分布时采用非参数秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris水迷宫结果

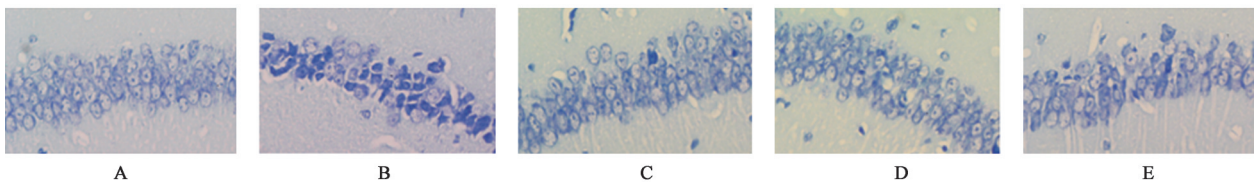
3.1.1 对APP/PS1小鼠定航实验的影响 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$);与模型组比较,加减薯蓣丸低、高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$)。见表1。

表2 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠空间探索实验的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of modified Shuyuwan on spatial exploration test in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台次数/数	目标象限停留百分比/%
正常		2.40±1.14	31.98±10.63
模型		1.40±0.54 ¹⁾	15.50±2.85 ¹⁾
加减薯蓣丸	14	3.00±0.70 ²⁾	23.78±3.73 ²⁾
	64	3.20±0.83 ²⁾	28.52±7.70 ²⁾
多奈哌齐	0.001	2.60±0.54 ²⁾	27.22±6.44 ²⁾

体增多,着色加深,但加减薯蓣丸低剂量和高剂量组无明显差异,多奈哌齐组海马区尼氏体的数量和神经元的个数升高。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 加减薯蓣丸高剂量组;D. 加减薯蓣丸低剂量组;E. 多奈哌齐组(图2~5同)

图1 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠海马CA1区神经元的影响(Nissl染色,×200)

Fig. 1 Effect of modified Shuyuwan on neuron in hippocampal CA1 region(Nissl staining,×200)

3.3 对APP/PS1小鼠海马A β_{1-42} 沉积的影响 海马CA1区免疫组化显示,与正常组比较,模型组A β_{1-42} 沉积升高($P<0.01$);与模型组比较,加减薯蓣丸高、

低剂量组A β_{1-42} 明显降低($P<0.05$);与多奈哌齐组比较,加减薯蓣丸高剂量组A β_{1-42} 沉积明显降低($P<0.05$)。见图2,表3。

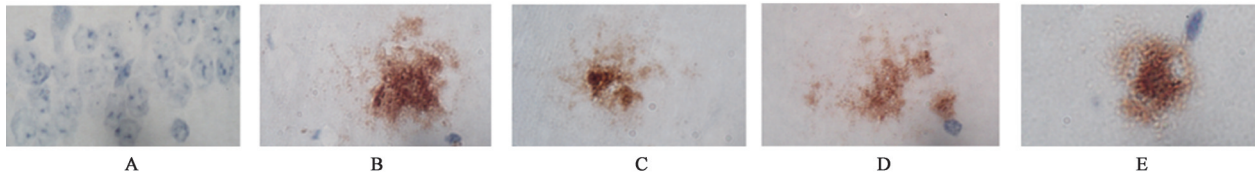


图2 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠海马CA1区Aβ₁₋₄₂的影响(免疫组化,×600)

Fig. 2 Effect of modified Shuyuwan on Aβ₁₋₄₂ in hippocampal CA1 region(IHC,×600)

表3 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠海马CA1区Aβ₁₋₄₂的影响(̄x±s,n=10)

Table 3 Effect of modified Shuyuwan on Aβ₁₋₄₂ in hippocampal CA1 region (̄x±s,n=10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Aβ ₁₋₄₂
正常		0
模型		0.62±0.01 ¹⁾
加减薯蓣丸	14	0.38±0.03 ²⁾
	64	0.42±0.01 ²⁾
多奈哌齐	0.001	0.52±0.04 ³⁾

3.4 对APP/PS1海马MG激活的影响 免疫荧光双染结果显示,与正常组比较,模型组小胶质细胞标记物Iba1和iNOS的表达明显增多;与模型组比

较,加减薯蓣丸高、低剂量组海马Iba1,iNOS阳性细胞显著减少;与多奈哌齐组比较,加减薯蓣丸高剂量组Iba1,iNOS阳性细胞数明显减少。见图3。

3.5 对海马Nlrp3,ASC,Caspase-1,IL-1β蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组Nlrp3,ASC,Caspase-1,IL-1β蛋白的表达显著增加(P<0.01);与模型组比较,加减薯蓣丸高、低剂量组Nlrp3,ASC,Caspase-1,IL-1β蛋白表达明显降低(P<0.05),加减薯蓣丸低剂量组与高剂量组比较,各蛋白表达差异无统计学意义;与多奈哌齐比较,加减薯蓣丸高剂量组Nlrp3,ASC,Caspase-1,IL-1β明显降低(P<0.05)。见表4,图4。

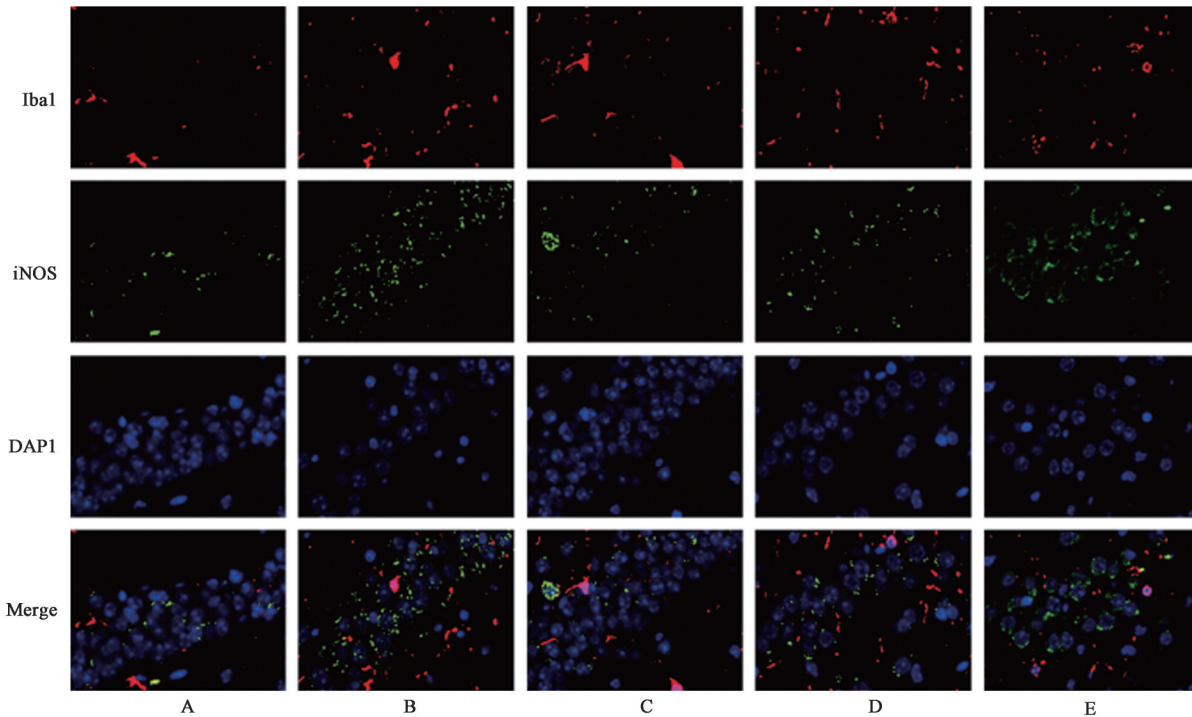


图3 加减薯蓣丸对APP/PS1小鼠海马CA1区Iba1,iNOS蛋白表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of modified Shuyuwan on Iba1, iNOS expression in CA1 region in mice(IF,×200)

3.6 对海马炎性细胞因子mRNA的表达的影响 与正常组比较,模型组IL-1β,TNF-α,IL-18 mRNA的表达量明显增高(P<0.05);与模型组比较,加减薯蓣丸高、低剂量组IL-1β,TNF-α,IL-18 mRNA表达明显降低(P<0.05);与多奈哌齐组比较,

加减薯蓣丸高剂量组IL-1β,TNF-α,IL-18 mRNA相对表达明显降低(P<0.05)。见表5。

4 讨论

AD是一种全球性疾病,已成为仅次于心、脑血管疾病和肿瘤的第四大引发老年人死亡的疾病,

表 4 加减薯蓣丸对 APP/PS1 小鼠海马 Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of modified Shuyuwan on Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β protein expression in hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nlrp3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH	IL-1 β /GAPDH
正常		0.20±0.02	0.16±0.01	0.21±0.01	0.17±0.03
模型		0.77±0.03 ¹⁾	0.56±0.08 ¹⁾	0.75±0.01 ¹⁾	0.59±0.13 ¹⁾
加减薯蓣丸	14	0.41±0.04 ²⁾	0.30±0.02 ²⁾	0.37±0.01 ²⁾	0.33±0.13 ²⁾
	64	0.44±0.05 ³⁾	0.35±0.04 ³⁾	0.42±0.01 ³⁾	0.37±0.11 ³⁾
多奈哌齐	0.001	0.57±0.03 ³⁾	0.41±0.08 ³⁾	0.54±0.01 ³⁾	0.45±0.17 ³⁾

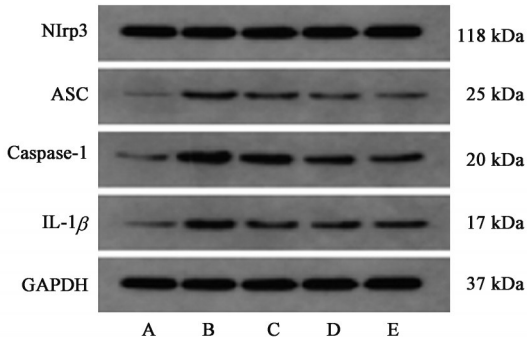


图 4 APP/PS1 小鼠海马 Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Nlrp3, ASC, Caspase-1, IL-1 β protein expression in hippocampus of APP/PS1 mice

表 5 加减薯蓣丸对 APP/PS1 小鼠海马 IL-1 β , TNF- α , IL-18 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of modified Shuyuwan on IL-1 β , TNF- α , IL-18 mRNA expression in hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	TNF- α	IL-18
正常		1.00	1.00	1.90±0.01 ¹⁾
模型		2.32±0.01 ¹⁾	2.07±0.27 ¹⁾	3.51±0.37
加减薯蓣丸	14	1.60±0.04 ²⁾	1.26±0.19 ²⁾	1.19±0.04 ²⁾
	64	1.22±0.09 ²⁾	1.10±0.04 ²⁾	1.90±0.05 ²⁾
多奈哌齐	0.001	2.18±0.06 ³⁾	1.73±0.183 ³⁾	3.03±0.05 ³⁾

威胁着世界各地的数千万老年人的健康。目前治疗 AD 的常用药物为胆碱酯酶抑制剂和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂,两者仅缓解症状并适度改善疾病状况、不能逆转病理改变,所以开发可阻断病理进程的药物对于 AD 的治疗具有重要临床意义^[12]。近 10 年,针对 AD 病理标志物 A β 和 Tau 蛋白的新药,在临床试验中均以失败告终,AD 的药物研发已进入瓶颈期^[13]。神经炎症是 AD 发病机制中重要假说,从药物的抗炎作用入手,可能成为治疗 AD 新的切入点^[14]。

神经炎症被认为是 AD 的重要发病机制,而 MG 的激活是神经炎症的启动和发展的关键^[15]。Nlrp3/ASC/Caspase-1 通路是 MG 激活的重要“开关”,

Nlrp3 作为一种胞内的模式识别受体,在 MG 中大量表达,被 A β 激活后募集 ASC,组装形成一个多蛋白复合体即“Nlrp3 炎性小体”,导致 Caspase-1 的激活,进而促进 IL-1 β 的剪切成熟和分泌^[16]。释放到胞外的 IL-1 β ,一方面与神经元上的 IL-1 β 受体结合,介导神经元凋亡,另一方面与 MG 上的受体结合引起更多的 MG 激活,产生大量的促炎因子如 TNF- α , IL-18, IL-1 β , 导致 MG 数量增加, Nlrp3 通路持续性激活,形成炎症的恶性循环,使神经细胞在炎性病理条件下大量死亡^[17]。本研究中 APP/PS1 小鼠海马组织 Nlrp3, Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平平均明显增加,进一步说明 Nlrp3/ASC/Caspase-1 通路参与 AD 神经炎症反应。有研究发现 Nlrp3 炎性小体的抑制剂可显著降低 AD 模型大鼠脑内 A β 的沉积,改善其认知功能,因此 Nlrp3/ASC/Caspase-1 通路是神经炎症以及由此引起的 AD 发病机制和进展的关键驱动因素^[18]。

加减薯蓣丸是在经典名方薯蓣丸的基础上减去祛风之品,加远志、石菖蒲而成。《医学心悟·健忘》云:“肾主智,肾虚则智不足,故喜忘其前言。”故方中用熟地黄、何首乌、杜仲补肾填精,充养脑髓,共为君药;山药、党参、白术、茯苓补中健脾,培补后天以益先天,为臣药;当归、白芍、川芎养血活血,使精血互化有源,为佐药;远志、石菖蒲祛痰益智,引诸药入脑,为使药,全方共奏补肾健脾、化痰祛瘀之功。本方专门针对 AD 病机而设,以往临床及基础研究已证实疗效确切。现代药理学研究发现,远志通过下调核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,防止 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的细胞凋亡;菖蒲通过抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)介导的髓样分化因 88(MyD88)/NF- κ B 信号通路发挥抗炎和神经保护作用^[19-20]。由此可见,加减薯蓣丸中的有效成分具有抗神经炎症功效,另外临床实验发现其可降低血中的促炎因子含量,提示加减薯蓣丸可能通过减轻神经炎症改善 AD 症状^[8]。

本实验发现加减薯蓣丸组,APP/PS1 小鼠海马

区 Nlrp3 炎症通路中 Nlrp3 及下游相关分子 ASC, Caspase-1 蛋白和 IL-1 β , IL-18 和 TNF- α mRNA 的表达量均显著降低,同时 Iba1 和 iNOS 蛋白表达量减少, Iba1 为 MG 特异性标志物, iNOS 在 MG 活化状态下表达。提示加减薯蓣丸可能通过抑制 APP/PS1 小鼠海马中 Nlrp3 炎症通路蛋白及相关促炎因子,减少小胶质细胞活化,抑制海马组织的炎症反应,改善学习记忆能力。同时本研究也表明,加减薯蓣丸使 APP/PS1 小鼠海马区 A β_{1-42} 的沉积明显减少,而 A β_{1-42} 是最容易聚集、神经毒性最强的 A β 片段,能够造成 MG 的过度激活和 Nlrp3 炎症小体活化,被认为是 AD 的常见病理标志物^[21];并且加减薯蓣丸显著改善了海马区神经元的数量减少,而神经元大量丢失是 AD 主要病理特征之一,说明加减薯蓣丸具有减缓 APP/PS1 小鼠 AD 病理进程的作用。

综上所述,加减薯蓣丸可以有效改善 AD 小鼠的学习记忆能力,缓解 APP/PS1 小鼠病情进展,机制可能与抑制 APP/PS1 小鼠海马组织 Nlrp3/ASC/Caspase-1 通路, MG 活化,发挥抗炎作用有关。加减薯蓣丸有望用于减缓 AD 病理改变中的神经炎症反应,成为防治 AD 的潜在药物。

[参考文献]

[1] LANE C A, HARDY J, SCHOTT J M. Alzheimer's disease[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.

[2] NICHOLS E, SZOEKE C, VOLLSET S E, et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(1): 88-106.

[3] 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.

[4] QUERFURTH H W, LAFERLA F M. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.

[5] LI Q, CHEN L, LIU X, et al. Pterostilbene inhibits amyloid- β -induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/Caspase-1 inflammasome pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 7053-7062.

[6] HALLE A, HORNING 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.

[7] LI J, ZHUANG L, LUO X, et al. Protection of MCC950 against Alzheimer's disease via inhibiting neuronal pyroptosis in SAMP8 mice [J]. *Exp Brain*

Res, 2020, 238(11): 2603-2614.

[8] 谢文婷, 谭子虎, 陈延, 等. 加减薯蓣丸对轻、中度阿尔茨海默病的临床疗效及外周血 IL-1 β 、NF- κ B、miR-146a 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(6): 668-674.

[9] 谢文婷, 谭子虎, 陈延, 等. 加减薯蓣丸治疗轻、中度阿尔茨海默病的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 176-181.

[10] 谭子虎, 陈延, 刘茜, 等. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区细胞凋亡及 PTEN 信号通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(10): 2471-2474.

[11] 高华. 药理学实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 76-78.

[12] MEHTA D, JACKSON R, PAUL G, et al. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015 [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(6): 735-739.

[13] BACHURIN S O, BOVINA E V, USTYUGOV A A. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends [J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(5): 1186-1225.

[14] MINTER M R, TAYLOR J M, CRACK P J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2016, 136(3): 457-474.

[15] HANSEN D V, HANSON J E, SHENG M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 459-472.

[16] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832.

[17] XIE L, LAI Y, LEI F, et al. Exploring the association between interleukin-1 β and its interacting proteins in Alzheimer's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3219-3228.

[18] FENG J, WANG J X, DU Y H, et al. Dihydropyridin inhibits microglial activation and neuroinflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation in APP/PS1 transgenic mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(12): 1207-1218.

[19] CHEN S, JIA J. Tenuifolin Attenuates Amyloid- β 42-induced neuroinflammation in microglia through the NF- κ B signaling pathway [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 76(1): 195-205.

[20] KIM B W, KOPPULA S, KUMAR H, et al. α -Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-induced behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 97(10): 46-57.

[21] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595-608.

[责任编辑 孙丛丛]