

加味不忘散对 AD 模型大鼠海马区 NLRP3 炎症通路中相关因子表达的影响

何玲玲^{1,2}, 李晓琼¹, 刘晓蕾¹, 侯苗苗¹, 李新毅^{1*}

(1. 山西医科大学 附属大医院, 太原 030000; 2. 安徽医科大学 附属巢湖医院, 合肥 230031)

[摘要] **目的:** 通过观察加味不忘散对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠学习记忆能力及海马区 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)炎症通路中相关分子 NLRP3, 天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达的影响, 探讨其作用机制。**方法:** 通过 Morris 水迷宫筛选出合格 SD 大鼠 52 只, 随机均分为假手术组, AD 模型组, 加味不忘散低剂量组(1.5 g·kg⁻¹), 加味不忘散高剂量组(3 g·kg⁻¹)。采用双侧海马注射 β -淀粉样蛋白 1-42(A β_{1-42}) 5 μ L (2 g·L⁻¹) 建立 AD 模型大鼠。造模后分别予低、高剂量加味不忘散灌胃, 每日 1 次, 连续 4 周。灌胃结束后通过 Morris 水迷宫法检测大鼠学习记忆能力, 判断造模是否成功; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR), 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织中 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:** 与假手术组比较, AD 模型组大鼠学习记忆能力明显下降($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 加味不忘散低剂量组大鼠学习记忆能力无改善, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β mRNA 和蛋白的表达水平均无统计学差异, 加味不忘散高剂量组大鼠学习记忆能力明显改善, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β mRNA 和蛋白的表达均明显下降($P < 0.05$)。**结论:** 高剂量加味不忘散可改善大鼠学习记忆能力, 其机制可能与下调 NLRP3 炎症通路中 NLRP3 及下游 Caspase-1, IL-1 β 的表达, 抑制海马组织内的炎症反应有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 加味不忘散; NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3) 炎症小体; 天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0035-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200239

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191009.1332.007.html>

[网络出版时间] 2019-10-09 15:58

Effect of Modified Buwangsan on Expression of Related Molecules in NLRP3 Inflammatory Signaling Pathway in Hippocampus of AD Rats

HE Ling-ling^{1,2}, LI Xiao-qiong¹, LIU Xiao-lei¹, HOU Miao-miao¹, LI Xin-yi^{1*}

(1. Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;
2. Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of modified Buwangsan on the learning and memory ability of Alzheimer's disease (AD) model rats and the expression of NOD-like receptor 3 (NLRP3), cysteine-containing aspartate-specific proteases 1 (Caspase-1) and interleukin-1 beta (IL-1 β) in NLRP3 inflammatory pathway in hippocampus of AD model rats, and exploring the underlying mechanism of modified Buwangsan. **Method:** The 52 eligible rats were randomly divided into sham control group, AD model group, low-dose modified Buwangsan group (1.5 g·kg⁻¹) and high-dose modified Buwangsan group (3 g·kg⁻¹). AD mouse model was established by bilateral hippocampus injection of A β_{1-42} 5 μ L (2 g·L⁻¹). The rats in low-dose and high-dose

[收稿日期] 20190110(016)

[基金项目] 山西省教育厅研究生优秀创新重点项目(2016BY087); 山西省重点研发计划国际合作项目(201703D421018); 山西省留学人员科技活动择优项目[(2018)1059-13]

[第一作者] 何玲玲, 硕士, 从事老年痴呆与脑血管病研究, E-mail: 616819749@qq.com

[通信作者] *李新毅, 博士, 主任医师, 从事老年痴呆与脑血管病研究, E-mail: xinyili2003@163.com

modified Buwangsan group received low and high dose modified Buwangsan respectively within the next 4 weeks, once daily. The learning and memory ability was tested by Morris water maze. The expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β mRNA was tested by quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** As compared with the sham group, the learning and memory ability of the rats were significantly impaired ($P < 0.05$). Compared with AD model group, the learning and memory ability and the expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β mRNA and protein were all no statistical differences in low-dose modified Buwangsan group, while the learning and memory ability of the rats were significantly improved and the expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β mRNA in hippocampus of rats was significantly decreased in high-dose modified Buwangsan group ($P < 0.05$). **Conclusion:** High-dose modified Buwangsan could attenuate neuroinflammation in the hippocampus of AD mouse model via inhibiting the expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β , which may be the mechanisms of modified Buwangsan could be used to ameliorate the learning and memory ability of AD mouse model.

[**Key words**] Alzheimer's disease; modified Buwangsan; NOD-like receptor 3 (NLRP3) inflammasome; cysteine containing aspartate specific proteases-1 (Caspase-1); interleukin-1 beta (IL-1 β)

阿尔茨海默病(AD)是以认知功能障碍,进行性记忆力减退为特征的中枢神经系统退行性疾病^[1]。主要病理改变为 β 淀粉样蛋白(A β)沉积,神经纤维缠结(NFT)和神经炎性反应^[2-3]。大量研究表明神经炎性反应在AD的发病机制中起重要作用^[4-5]。NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎症通路是神经炎性反应中重要传导通路,大脑中的A β 沉积可以促进NLRP3的激活,造成白细胞介素(IL)-1 β 过度表达,介导AD神经炎性反应^[6-7]。已有研究表明NLRP3炎症通路的抑制可以很大程度上减少APP/PS1双转基因小鼠中的A β 沉积,改善学习记忆能力^[8]。抑制NLRP3炎症通路的激活被认为可能是AD的一种新的治疗方法^[9]。

随着世界人口老龄化,AD发病率呈迅速上升趋势。全世界已投入巨额资金致力于AD治疗药物的研发,但仍未找到逆转AD进展的治疗药物,AD防治已成为一项具有挑战性的世界难题^[10]。AD病理改变是全身性的,有多种调控因子与调控网络参与,但目前公认AD治疗药物作用靶点单一,且无法逆转AD的病理改变,因此目前AD的治疗策略的研究更倾向多靶点治疗^[11-12]。古方不忘散是我国传统益智良方,出自明代王肯堂《证治准绳》,由人参片、茯苓、茯神、菖蒲、远志5味中药组成,是我国传统益智良方,主治心孔昏塞,多忘善误,加味不忘散是在不忘散基础上添加熟地黄、当归、白术、黄连片4味药构建而成,组方更加合理,作用靶点多,但是否具有抗炎作用机制如何尚有待进一步研究。初步的临床应用显示加味不忘散对AD患者认知功能具有一定的保护作用。前期课题组研究表明加味不忘散可明显改善AD模型大鼠学习记忆能力^[13],在此

基础上本实验观察加味不忘散对AD模型大鼠行为学及海马组织中NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)、天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-1和IL-1 β mRNA和蛋白表达水平,以期探讨其治疗AD可能的抗炎作用机制,为AD的临床防治及新药研发提供新思路 and 靶点。

1 材料

1.1 动物 55只SPF级SD雄性大鼠,体质量(250 \pm 20)g,由中国人民解放军军事医学科学院动物实验中心提供,合格证号SCXK(京)2012-0004。大鼠分笼饲养于恒温恒湿环境中,用Morris水迷宫测试其学习记忆能力,淘汰2只反应过于迟钝老鼠,1只特别敏感的大鼠,实验通过动物伦理委员会标准审查。

1.2 药物与试剂 加味不忘散由远志20g,石菖蒲5g,人参片15g,茯苓10g,熟地黄15g,当归10g,白术10g,黄连片5g,茯神10g组成,均由山西大医院中药房提供;A β ₁₋₄₂, trizol试剂盒(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为A9810, A9561);ECL发光检测试剂盒(美国Thermo Scientific Pierce公司,批号NCI5079);BCA蛋白测定试剂盒(美国Thermo公司,批号PC201489);丙烯酰胺(美国Amresco公司,批号0341); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,核转录因子- κ B(NF- κ B)p65抗体,NLRP3抗体,Caspase-抗体,IL-1 β 抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab8227, ab16502, ab214185, ab1872);山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(Ig)G(美国Jackson Immuno Research公司,批号5223340);PCR反转录试剂盒(美国Fermentas公司,批号K1622);PCR反应体系(美国Roche公司,批号04913850001)。

1.3 仪器 MP8003 型脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);5024R 型高速低温离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);7300 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 Applied Biosystems 公司);SmartGelTM600 型一体式凝胶成像仪(北京赛智创业科技有限公司);PL203 型电子天平(美国梅特勒多利有限公司);SpectraMax M2/Mze 酶标仪(美国 Molecular Oerices Corp 公司);Powerpac Basic 型垂直电泳、电泳槽及转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);Morris 水迷宫动物行为学分析系统(荷兰诺达斯科技公司)。

1.4 试剂配制 ① AB_{1-42} ($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 配制:取 2 mg AB_{1-42} 粉末溶于二甲基亚砜(DMSO)溶液 1 mL 中充分溶解,37 °C 条件下孵育 1 周,使其变为凝聚态 AB_{1-42} ,用 4 °C 冰箱保存备用。②4% 水合氯醛配制:取 4 mg 水合氯醛粉末溶于 100 mL 生理盐水中,现配现用或 4 °C 避光干燥保存。③加味不忘散溶液配制:参考徐淑云《药理学实验方法》^[14],通过体表面积法换算大鼠用药剂量,配置成高剂量加味不忘散溶液($3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),取高剂量加味不忘散溶液加生理盐水稀释相同体积即为低剂量加味不忘散($1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

2 方法

2.1 AD 模型制备 4% 水合氯醛($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠。待充分麻醉后利用耳杆将大鼠头部固于在脑立体定位仪上,从头顶正中作一 1 ~ 2 cm 切口,充分暴露前囟,参考 George 等^[15]的大鼠脑立体定位图谱定位,以前囟为坐标原点向后 3.8 mm,旁开 2 mm,钻开颅骨,用微量注射器垂直向脑内进针 2.8 mm 达海马区,每侧均缓慢注入 AB_{1-42} 5 μL ,5 min 内注完,留针 5 min 使其在海马内充分浸润,假手术组注射等量生理盐水。缓慢撤针局部消毒后缝合切口,术后伤口处连续 3 d 滴注庆大霉素预防感染,保温清醒后放回笼中继续饲养。

2.2 分组及给药 将 52 只合格 SD 大鼠随机分为假手术组,AD 模型组,加味不忘散低、高剂量组。模型组通过向大鼠每侧海马注射 AB_{1-42} 5 μL 制备 AD 模型大鼠,1 周后予生理盐水($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,连续 4 周;假手术组将造模注射的 AB_{1-42} 换为等量生理盐水,余同 AD 模型组;加味不忘散各剂量组造模方法同 AD 模型组,1 周后予低剂量加味不忘散($1.5, 3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,连续 4 周。

2.3 Morris 水迷宫检测 通过 Morris 水迷宫在实验前筛选合格老鼠并在灌胃结束后评价大鼠学习记

忆能力。实验室过程中保持安静,亮度适中,水温(22 ± 1) °C,水迷宫均分为 4 个象限。定位航行实验:依次从 4 个象限正中位置贴壁放老鼠入水,记录大鼠 60 s 内找到平台所用时间,即为逃避潜伏期。超过 60 s 均记为 60 s,用黑棒将大鼠上引导至平台停留 15 s,强化记忆。每天 1 次,连续训练 5 d,记录每只老鼠每个象限逃避潜伏期。空间探索实验:第 6 天移除平台,所有大鼠均为同一入水点,让大鼠靠前 5 d 记忆搜寻找平台,记录大鼠 60 s 在原平台象限内停留的时间,跨台累计次数和游泳速度。数据采集处理由 Morris 水迷宫图像采集分析系统完成。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白的表达 将 SD 大鼠麻醉后快速断头,冰上取出大鼠新鲜海马组织,-80 °C 冻存。取出加入组织裂解液冰上研磨、低温离心提取总蛋白。利用比色法测样本的吸光度,参照标准蛋白的浓度,根据蛋白定量标准曲线计算各样本内蛋白含量。每组取 10 μL 进行聚丙烯酰胺凝胶电(SDS-PAGE),将蛋白转移至 PVDF 膜上,加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液,4 °C 封闭过夜,将封闭的 PVDF 膜浸泡在以 TBST 稀释的 NLRP3 (1:1 000),Caspase-1 (1:1 000) 和 IL-1 β (1:1 000) 一抗中,4 °C 孵育过夜,洗涤后浸泡在以 TBST (1:1 万) 稀释的二抗中,室温孵育 2 h。最后将 PVDF 膜至于凝胶成像仪上,加入 ECL 化学发光剂显色成像并保存。采用 Gel-Pro 32 软件分析条带的灰度值。

2.5 Real-time PCR 检测 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β mRNA 的表达 取 -80 °C 保存的大鼠海马组织,用 trizol 试剂盒抽提获取总 RNA。取总 RNA ($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 11 μL 为模板,加入随机引物 ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL 逆转录 cDNA,取 cDNA 2 μL 为模板行 PCR 扩增(PCR 扩增体系参照金斯瑞生物科技有限公司 PCR 说明书),PCR 扩增反应步骤依次:预变性 94 °C 3 min,1 个循环,变性 94 °C 30 s,退火 58 °C 30 s,延伸 72 °C 45 s,各步骤循环 35 次。分析数据使用 ABI Prism 7500 SDS 软件,自动计算 C_t 值。Real-time PCR 检测 NLRP3 炎症小体及下游相关分子 Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组 mRNA 表达水平。引物设计运用 Prime5 软件,利用 Blast 检测引物扩增后序列和基因序列的匹配程度,所需引物由金斯瑞生物有限公司代合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NLRP3	上游 GCTGCTCAGCTCTGACCTCT	108
	下游 GTCCTCACAGAGGAGCTTG	
Caspase-1	上游 TATGGAAAAGGCACGAGACC	137
	下游 CAGCTGATGGACCTGACTGA	
IL-1 β	上游 AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT	230
	下游 TGAGTGACACTGCCTTCCTG	
β -actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCAGGATTTTC	

2.6 统计学分析 运用 SPSS 19.0 软件处理数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, Morris 水迷宫数据运用重复测量数据的方差分析, 余数据均采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠学习记忆能力的影响

3.1.1 对大鼠平均逃避潜伏期的影响 与假手术组比较, AD 模型组 5 d 平均逃避潜伏期均明显延长 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 加味不忘散低剂量组 5 d 平均逃避潜伏期无显著差异, 加味不忘散高剂量组 5 d 平均逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味不忘散对大鼠平均逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 2 Effect of modified Buwangsan on average escape incubation period in rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$) s

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	平均逃避潜伏期/s
假手术	-	12	28.16 \pm 10.93
AD 模型	-	11	44.61 \pm 12.44 ¹⁾
加味不忘散	1.5	11	39.98 \pm 14.39
	3.0	12	30.90 \pm 10.48 ^{1,2)}

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 AD 模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与加味不忘散低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.1.2 对大鼠原始象限停留时间、跨台次数和游泳速度的影响 与假手术组比较, AD 模型组的大鼠在原平台象限停留时间明显缩短 ($P < 0.05$), 跨平台次数明显减少 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 加味不忘散低剂量组的大鼠在原平台象限停留的时间以及跨台次数均无统计学差异, 但加味不忘散高剂量组大鼠在原平台象限停留时间明显延长 ($P < 0.05$), 跨平台次数明显增加 ($P < 0.05$); 各组大鼠游泳速度无统计学差异。见表 3。

3.2 对 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠海马内 NLRP3,

表 3 加味不忘散对大鼠原平台象限停留时间、跨台次数和游泳速度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 3 Effect of modified Buwangsan on quadrants residence time, cross platform times and swimming speed of primary platform in ratsescape incubation period in rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	原平台象限停留时间/s	跨台次数/次	游泳速度/ $cm \cdot s^{-1}$
假手术	-	18.70 \pm 3.31	5.50 \pm 0.83	22.33 \pm 4.41
AD 模型	-	10.09 \pm 3.90 ¹⁾	2.56 \pm 1.07 ¹⁾	21.65 \pm 4.99
加味不忘散	1.5	11.18 \pm 3.63 ¹⁾	3.00 \pm 1.15 ¹⁾	19.18 \pm 6.49
	3.0	15.49 \pm 3.20 ^{2,3)}	4.89 \pm 0.99 ^{2,3)}	21.04 \pm 6.36

Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 水平相关指标均明显增加 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 大鼠海马内 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 水平在加味不忘散低剂量组均无统计学差异, 而加味不忘散高剂量组相关指标均明显下降 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 加味不忘散对大鼠海马组织中 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 4 Effect of modified Buwangsan on expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β mRNA in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

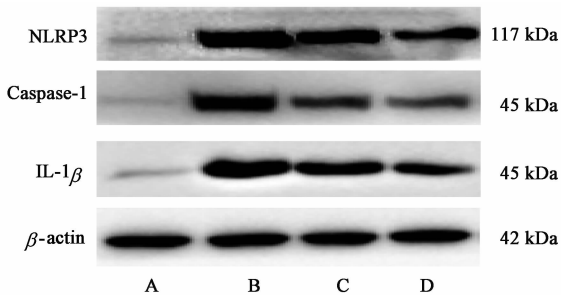
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β
假手术	-	1.35 \pm 1.25	1.67 \pm 1.59	2.09 \pm 1.08
AD 模型	-	8.99 \pm 2.66 ¹⁾	9.40 \pm 3.66 ¹⁾	10.66 \pm 1.97 ¹⁾
加味不忘散	1.5	8.92 \pm 1.64	8.59 \pm 1.51	8.51 \pm 2.33
	3.0	4.52 \pm 1.53 ^{2,3)}	4.03 \pm 2.05 ^{2,3)}	4.72 \pm 1.45 ^{2,3)}

3.3 对 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠海马内 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 的相对蛋白表达量均明显增加 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 大鼠海马内 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 相对蛋白表达水平在加味不忘散低剂量组中均无统计学差异, 而在加味不忘散高剂量组中均明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 5。

4 讨论

AD 发病机制尚不完全清楚, 炎症反应机制假说是 AD 发病机制中重要假说之一, A β 沉积可通过激活小胶质细胞诱发中枢神经系统炎症级联反应, 释放炎症介质引起神经细胞毒性作用^[3,16]。炎症小体是机体内固有免疫中重要部分, 通过多种机制参与各系统疾病的发生发展, 其在 AD 的病理改变过程起重要作用, 其中 NLRP3 炎症小体目前研究最热门且较深入 NLRs 蛋白家族成员, 由 NLRP3,



A. 假手术组; B. AD 模型组; C. 加味不忘散低剂量组; D. 加味不忘散高剂量组

图 1 大鼠海马组织的 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β protein expression in hippocampus of rats

表 5 加味不忘散对大鼠海马组织的 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 5 Effect of modified Buwangsan on expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β protein in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NLRP3 /β-actin	Caspase-1 /β-actin	IL-1 β /β-actin
假手术	-	0.29 ± 0.10	0.60 ± 0.18	0.63 ± 0.26
AD 模型	-	1.57 ± 0.91 ¹⁾	2.95 ± 0.53 ¹⁾	3.11 ± 0.48 ¹⁾
加味不忘散	1.5	1.40 ± 0.26	2.63 ± 0.59	2.75 ± 0.51
	3.0	0.91 ± 0.19 ^{2,3)}	1.51 ± 0.37 ^{2,3)}	1.90 ± 0.46 ^{2,3)}

Caspase-1 前体和接头蛋白凋亡相关斑点蛋白 ASC 组成,可特异性激活多种机制参与 AD 的神经炎症过程,对于 AD 发病、进展起重要作用^[17-18]。NLRP3 炎症小体在小胶质细胞中表达丰富,NLRP3 炎症小体可识别多种病原相关模式分子以及内源性危险信号,并被激活,活化后的 NLRP3 可通过半胱天冬酶募集结构域(CARD)募集 ASC 与 Caspase-1 前体,并裂解活化 Caspase-1,激活的 Caspase-1 水解 IL-1 β , IL-18 前体释放出有活性的 IL-1 β , IL-18 等炎症因子介导组织损伤过程^[19-20],促进各种炎症性疾病如系统性红斑狼疮,2 型糖尿病,痛风,动脉粥样硬化,炎症性肠病和阿尔茨海默病等发生、发展^[21-22]。近年来 NLRP3 炎症小体在 AD 发病机制中的作用日益显著,抑制 NLRP3 炎症小体可能为 AD 防治提供新靶点和思路。有研究发现 NLRP3 炎症小体的抑制剂可显著降低 AD 模型小鼠脑内 A β 的沉积的病理改变^[23]。Dempsey 等^[24] 研究表明 MCC950 作为 NLRP3 炎症小体抑制剂通过靶向抑制 NLRP3 促进 APP/PS1 小鼠中 A β 沉积的清除,改善其认知功能。本研究中 AD 模型大鼠海马组织 NLRP3, Caspase-1

和 IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平均明显增加,进一步说明 NLRP3 炎症小体参与 AD 炎症反应。

AD 占痴呆患者 60% ~ 70%,是最常见的痴呆类型^[25]。随着人口老龄化的不断加剧,AD 目前已经成为老年人中继心脑血管疾病和恶性肿瘤后的第 4 位致死原因^[26]。目前 FAD 批注用于药物如多奈哌齐、利斯的明、美金刚等只能部分改善 AD 患者认知及记忆能力减退的临床表现,但并不能从根本上阻断或逆转 AD 的病理改变,所以找到可逆转 AD 疾病发展进程的药物才是攻克 AD 治疗的关键。AD 病理改变尚不明确目前有多种假说,针对其病理假说,AD 药物作用靶点包括减少 A β 的沉积、平衡 Tau 蛋白、调节神经递质、平衡 Ca²⁺ 水平、抗氧化应激、抑制炎症反应、调节糖代谢和激素水平的,针对 AD 主要病理 A β 及 Tau 蛋白开发药物的多项临床试验均宣告失败。炎症反应是 AD 发病机制中重要假说,从药物的抗炎作用入手,可能为 AD 治疗提供新思路,虽有研究表明非甾体类抗炎药对 AD 模型大鼠的抗炎治疗有效,但在临床治疗 AD 过程中,消化系统副作用明显,故广泛应用受限制^[27],目前尚无公认抗 AD 炎症机制药物。我国传统中药具有多靶点的药理学活性的优势作用,近年来相关研究较多。有文献总结发现治疗 AD 的中药中,出现频率前较高的药物有石菖蒲、茯苓、丹参、远志、熟地黄、益智仁等^[28]。有研究报道传统中药单药如淫羊藿苷、红景天素、茯苓、白芍总苷、白术、人参、远志等也具有免疫调节作用^[29-32],传统中药复方黄连解毒汤剂^[33]、还聪明益汤^[34]、加味当归芍药散^[35]等在 AD 治疗中具有抗炎作用机制,中药抗炎治疗有望成为 AD 治疗一种新趋势。古方不忘散主治心孔闭塞,多忘善误,是传统益智良方。有研究表明不忘散可以降低去卵巢(OVX)大鼠海马组织的炎症反应,发挥益智作用^[36]。本研究的加味不忘散中药复方是在不忘散中添加白术、当归、熟地黄和黄连而创造性的构建成,在减轻不忘散原有副作用的同时加入的熟地黄、黄连使原方剂中抗炎免疫调节特性增加。加味不忘散的主药远志有安神益智的功效,有研究表明远志及其提取物改善学习记忆能力的机制可能通过增强 AD 模型鼠海马区突触可塑性^[37],调节海马区 Tau 蛋白过度磷酸化^[38],抗氧化、抑制神经细胞凋亡^[39-40]。远志也可通过抑制 AD 中核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 的活化发挥抗炎作用^[41]。本实验发现高剂量的加味不忘散可显著下调大鼠海马区 NLRP3 炎症通路中 NLRP3 及下游相关分子

Caspase-1, IL-1 β 的 mRNA 和蛋白的表达,改善 AD 模型大鼠学习记忆能力,提示高剂量加味不忘散可能通过抑制 AD 模型大鼠中增加的 NLRP3 炎症通路相关因子,抑制海马组织的炎症反应,改善学习记忆能力。

不足之处在于本实验加味不忘散仅设置高、低两个剂量,且低剂量干预后效果不明显,而高剂量干预后效果显著,今后有必要关注多个浓度梯度药物治疗效果,寻找最佳药物治疗浓度。同时本次实验给药时间统一为4周,今后研究有必要设置多个给药持续时间,找出最佳持续给药时间。由于目前尚无公认的治疗 AD 的抗炎药物,未设置标准治疗组对照;加味不忘散副作用尚未明确,长期使用的安全性需要关注。

由本实验可知,高剂量的加味不忘散可以有效改善学习记忆能力,缓解 AD 模型大鼠病情进展,机制可能与下调 AD 模型大鼠海马组织 NLRP3 炎症通路上 NLRP3, Caspase-1 和 IL-1 β 表达,起到抗炎作用有关。加味不忘散有望用于 AD 病理改变中神经炎症反应的预防和治疗。

[参考文献]

[1] Iqbal K, LIU F, GONG C, et al. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(1): 53-69.

[2] Masters C, Selkoe D. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(6): a006262.

[3] FU W, Vukojevic V, Patel A, et al. Role of microglial amylin receptors in mediating beta amyloid ($A\beta$)-induced inflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 199.

[4] TAN M S, YU J T, JIANG T, et al. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 875-882.

[5] Dansokho C, Heneka M. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2018, 125(5): 771-779.

[6] Saresella M, La Rosa F, Piancone F, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11: 23.

[7] Garcez M, Mina F, Bellettini-Santos T, et al. The involvement of NLRP3 on the effects of minocycline in an AD-like pathology induced by β -amyloid oligomers administered to mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 2606-2617.

[8] Heneka M, Kummer M, 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.

[9] ZHOU K, SHI L, WANG Y, et al. Recent advances of the NLRP3 inflammasome in central nervous system disorders [J]. *J Immunol Res*, 2016, doi: 10.1155/2016/9238290.

[10] 陈彪, 马秋兰. 阿尔茨海默病病因学研究进展及治疗展望 [J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(2): 81-83.

[11] Selkoe D. The therapeutics of Alzheimer's disease: where we stand and where we are heading [J]. *Ann Neurol*, 2013, 74(3): 328-336.

[12] 雷曦, 王健辉, 程肖蕊, 等. 防治阿尔茨海默病多靶点药物研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(2): 205-215.

[13] 成红江. 加味不忘散对 MicroRNA-30e 海马过表达 SD 大鼠学习记忆及海马 ChAT 改变的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2017.

[14] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 911.

[15] George P, Charles W. The rat brain in stereotaxic coordinate fourth edition [M]. Orlando Florida: Academic Press, 1998: 80-89.

[16] 官杰, 李浩, 刘剑刚. 炎症反应及抗炎药物与阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2012, 12(11): 732-738.

[17] 李翔, 刘红梅, 林文源. NLRP3 炎性小体在炎症疾病中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2015, 21(24): 4451-4454.

[18] Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 787-791.

[19] HE Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.

[20] Mariathasan S, Newton K, Monack D, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf [J]. *Nature* 2004, 430(6996): 213-218.

[21] SHEN H, YANG Y, MENG X, et al. NLRP3: a promising therapeutic target for autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(7): 694-702.

[22] Olsen I, Singhrao S. Inflammasome involvement in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54(1): 45-53.

- [23] YIN J, ZHAO F, Chojnacki J, et al. NLRP3 inflammasome inhibitor ameliorates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3):1977-1987.
- [24] Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson K, 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.
- [25] Lobo A, Launer L, Fratiglioni L, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic diseases in the elderly research group* [J]. *Neurology*, 2000, 54(11 Suppl 5):4-9.
- [26] Zilka N, Novak M. The tangled story of Alois Alzheimer [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2006, 107(9/10):343-345.
- [27] Daniels M, Rivers-Auty J, Schilling T, et al. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:12504.
- [28] 韩德军, 杨锡燕, 时晶, 等. 中药治疗痴呆随机对照文献治法及用药规律分析 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(12):1051-1054.
- [29] LI W, GAO X, WANG X, et al. Icarin inhibits hydrogen peroxide-induced toxicity through inhibition of phosphorylation of JNK/p38 MAPK and p53 activity [J]. *Mutat Res*, 2011, 708(1/2):1-10.
- [30] 谢桂琴, 孙秀兰, 田苏平, 等. 红景天素对实验性老年性痴呆大鼠防治作用的研究 [J]. *中国行为医学科学*, 2003, 1(12):18-20.
- [31] 孙维广, 廖慧丽, 黄兆胜, 等. 中药对老年性痴呆免疫系统改变的干预作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(9):716-718.
- [32] 冯靖涵, 蔡宝昌, 过伟峰, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(4):394-396.
- [33] 陈一君, 吴庆光, 刘颖, 等. 黄连解毒汤单独用药及联合用药对 2 型糖尿病治疗效果的 Meta 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10):212-220.
- [34] 刘孟渊, 黄德弘, 闫小峰. 加味当归芍药散对淀粉样蛋白 42 诱导脑内炎症因子及 CD45、磷酸化 tau 蛋白表达的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(3):357-362, 442.
- [35] 官杰, 李浩, 刘剑刚, 等. 还脑益聪方组分对 APP 转基因小鼠脑组织炎症因子和氧化应激的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(4):732-738.
- [36] 李淑玲, 邢毅, 李育竹, 等. 不忘散对去卵巢大鼠雌激素水平和海马组织炎症反应的影响 [J]. *山东大学学报:医学版*, 2011, 49(3):50-54.
- [37] 穆俊霞, 郭锋, 崔丽霞, 等. 远志对阿尔茨海默病大鼠海马神经元 Tau 蛋白磷酸化的影响 [J]. *山西中医学报*, 2013, 14(1):22-24.
- [38] 陈树沙, 李新毅, 赵大鹏. 远志总皂苷增强鹅膏蕈氨酸诱导阿尔茨海默病大鼠的突触可塑性研究 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2012, 19(6):449-452.
- [39] 陈庆林, 陈勤, 金蓓蓓. 远志皂苷对 AD 小鼠学习记忆能力及中枢胆碱能系统标志酶活性的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(3):33-36.
- [40] 周君. 远志皂苷对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 AD 大鼠大脑神经细胞凋亡及 tau 蛋白过度磷酸化影响的实验研究 [D]. 合肥:安徽大学, 2010.
- [41] LI Z, LIU Y, WANG L, et al. Memory-enhancing effects of the crude extract of polygala tenuifolia on aged mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, doi:10.1155/2014/392324.
- [42] Cheong M, Lee S, Yoo H, et al. Anti-inflammatory effects of polygala tenuifolia root through inhibition of NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3):1402-1408.

[责任编辑 孙丛丛]