

引用:邱华安,胡国恒,李宇翔,曾阳,谢丹,王焱,盛望.滋肾醒脑汤通过TLR4/NF- κ B/NLRP3抑制APP/PS1小鼠小胶质细胞焦亡改善认知功能研究[J].中医药导报,2025,31(7):25-31.

滋肾醒脑汤通过TLR4/NF- κ B/NLRP3抑制APP/PS1小鼠小胶质细胞焦亡改善认知功能研究*

邱华安^{1,2},胡国恒³,李宇翔¹,曾阳³,谢丹³,王焱³,盛望³

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;

2.浏阳市中医医院,湖南浏阳 410300;

3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨滋肾醒脑汤对APP/PS1小鼠小胶质细胞焦亡及认知功能的影响。方法:将50只APP/PS1小鼠随机分为模型组、滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组,每组10只。另取10只C57BL/6J小鼠为正常组。各组分别灌胃给予相应药物。采用水迷宫行为学评定各组小鼠学习及记忆能力;苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠脑组织形态;尼氏染色观察小鼠神经元损伤;透射电镜观察小胶质细胞形态;免疫组化分析海马及皮层 β -淀粉样蛋白1~42($A\beta_{1-42}$)沉积情况;蛋白免疫印记法(Western blotting)法检测各组海马中Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)、核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3(NLRP3)和胱天蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达情况。结果:模型组、滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期均长于正常组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期均短于模型组($P<0.05$)。模型组小鼠平台象限滞留时间短于正常组($P<0.05$),且跨越平台次数少于正常组($P<0.05$);滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠平台象限滞留时间均长于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);滋肾醒脑汤中剂量组及多奈哌齐组小鼠穿越平台次数多于模型组($P<0.01$)。HE染色显示正常组小鼠海马区CA1区神经元排列整齐,形态正常;模型组小鼠海马区CA1区神经元结构不完整,受损的神经元数量增多;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马区CA1区小鼠神经元结构、数量及形态均有所改善,仅有少数神经元核空泡丢失,偶见异质细胞。尼氏染色显示正常组小鼠神经元内尼氏体分布均匀,细胞形态规则、排列紧密;模型组小鼠神经元存活数量少、排列稀疏,神经元明显肿胀且胞内尼氏体分布稀疏;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马组织中的损伤神经元显著减少,神经元数量、形态及结构均明显改善。免疫组化染色显示正常组小鼠海马CA1区、皮质区神经元形态规则;模型组较正常组细胞形态异常,神经元周围存在明显的深褐色 $A\beta_{1-42}$ 蛋白沉积;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 蛋白沉积明显改善,细胞受损情况明显改善。透射电镜下正常组小鼠海马小胶质细胞形态结构正常;模型组小鼠海马神经元明显变性坏死,可见大量呈空泡状的焦亡小体;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠神经元皱缩情况明显改善,胞膜较为完整。模型组小鼠海马组织TLR4、NF- κ B、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量高于正常组($P<0.01$);滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马组织TLR4、NF- κ B、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.01$)。结论:滋肾醒脑汤可能通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路活性,降低TLR4、NF- κ B、NLRP3及Caspase-1的表达,抑制APP/PS1小鼠小胶质细胞焦亡,减少 $A\beta_{1-42}$ 沉积,发挥神经保护作用,改善认知功能。

[关键词] 阿尔茨海默病;滋肾醒脑汤;TLR4/NF- κ B/NLRP3通路;小胶质细胞;细胞焦亡;认知功能;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)07-0025-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.07.004

*基金项目:2021年度长沙市自然科学基金项目(kq2202456)

通信作者:盛望,男,副主任医师,研究方向为神经内科疾病临床及实验研究

Zishen Xingnao Decoction(滋肾醒脑汤)Improves Cognitive Function by Inhibiting Microglial Pyroptosis in APP/PS1 Mice through TLR4/NF-κB/NLRP3 Signaling Pathway

QIU Huan^{1,2}, HU Guoheng³, LI Yuxiang¹, ZENG Yang³, XIE Dan³, WANG Yan³, SHENG Wang³

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China;

2.Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang Hunan 410300, China;

3.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Zishen Xingnao decoction(ZSXND) on microglial pyroptosis and cognitive function in APP/PS1 mice. Method: Totally 50 APP/PS1 mice were randomly divided into model group, ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group, 10 mice in each group, and 10 C57BL/6J mice were selected as the normal group. Drugs were administered via gavage. Learning and memory abilities were assessed using the Morris water maze test. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe neuronal morphology and Nissl staining was employed to evaluate neuronal damage. Transmission electron microscopy(TEM) was used to observe microglial ultrastructure. Immunohistochemistry was used to analyze Aβ₁₋₄₂ deposition in the hippocampus and cortex. Western blotting quantified hippocampal protein levels of toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor κB (NF-κB), NOD-like receptor protein3 (NLRP3) and Caspase-1. Results: Model group, ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group showed longer escape latency than normal group ($P<0.01$ or $P<0.05$). ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group exhibited shorter escape latency than model group ($P<0.05$). The model group showed reduced platform quadrant retention time than normal group ($P<0.05$) and model group showed fewer platform crossings than normal group ($P<0.05$). ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group showed longer platform retention time than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). ZSXND medium-dose group and donepezil group showed increased platform crossings than model group ($P<0.01$). HE staining showed that the neurons in the CA1 region of the hippocampus were arranged neatly and had normal morphology in normal group. There were disorganized and damaged neurons in the hippocampal CA1 region of the model group, whereas ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group showed improved neuronal structure, count, and morphology, with only minimal nuclear vacuolization and occasional heterochromatin. Nissl staining showed that Nissl bodies were evenly distributed in neurons in normal group, with regular cell morphology and tight arrangement. There were significantly reduced Nissl bodies, sparse arrangement, and cellular swelling in model group neurons. These damages were markedly ameliorated in ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group. Immunohistochemical staining showed regular morphology of neurons in the hippocampal CA1 and cortical regions in normal group. There were prominent brownish Aβ₁₋₄₂ deposits surrounding neurons with abnormal morphology in model group. Aβ₁₋₄₂ deposition and neuronal damage were significantly reduced in ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group. According to TEM, the morphology and structure of hippocampal microglia were normal in normal group. There were degenerated neurons and numerous vacuolated pyroptotic bodies in model group, while ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group showed improved cell shrinkage and relatively intact cell membranes. Model group showed higher TLR4, NF-κB, NLRP3, and Caspase-1 expression in hippocampal than normal group ($P<0.01$). ZSXND low-dose group, ZSXND medium-dose group, ZSXND high-dose group, and donepezil group showed lower TLR4, NF-κB, NLRP3, and Caspase-1 expression in hippocampal than model group ($P<0.01$). Conclusion: Zishen Xingnao decoction may exert neuroprotective effects and improve cognitive function by inhibiting the TLR4/NF-κB/NLRP3 signaling pathway, reducing the expression of TLR4, NF-κB, NLRP3, and Caspase-1, inhibiting microglial pyroptosis, and mitigating Aβ₁₋₄₂ deposition.

[Keywords] Alzheimer disease; Zishen Xingnao decoction; TLR4/NF-κB/NLRP3 signaling pathway; microglia; cell pyroptosis; cognitive function; mouse

阿尔茨海默病(Azheimer's disease, AD)是一种常见的神经系统退行性疾病,起病隐匿,呈进行性发展。患者一般表现为记忆力下降、认知功能障碍及日常生活能力减退。根据流行病学预测,未来我国AD患者将持续增长,2050年全国AD患者人数将超过3 000万^[1]。80岁以上患者比例将接近50%,成为我国痴呆患者的主要人群^[1]。同时,AD具有年龄相关性,严重影响老年人的生活质量,给家庭和社会带来沉重的负担。AD的机制复杂,个体差异性大,治疗局限性显著,因此关于AD发病机制研究和药物研发刻不容缓。研究表明,细胞焦亡及神经炎症在AD进展中扮演重要角色^[2-3]。抑制中枢Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)/核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3(NOD-like receptor protein3, NLRP3)炎症通路过度活化,可减轻中枢神经炎症反应,改善APP/PS1小鼠的认知障碍^[4]。小胶质细胞可通过NLRP-3/胱天蛋白酶-1(cysteinyI aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)/消皮素D(Gasdermin D, GSDMD)信号轴介导的经典途径焦亡,释放大炎症因子进而促进其周边小胶质细胞迅速、大量、持续地炎症活化进而导致脑组织损伤^[5]。因此,调控TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路是干预神经炎症因子分泌及小胶质细胞焦亡的有效方法。

中医药治疗AD优势突出。本课题组基于“肾脑同治”原则,针对AD“肾虚痰瘀”病机,提出“滋肾活血化痰”治法理论,拟定具有益肾生髓、清化痰浊、祛瘀通窍功效的滋肾醒脑汤,临床效果颇佳。课题组前期研究发现,滋肾醒脑汤可显著改善AD大鼠的学习和记忆能力,抑制神经元凋亡,从而改善AD大鼠的神经功能^[6],但神经恢复功能是否通过调控细胞焦亡途径尚未可知。因此,本研究基于TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路,探究滋肾醒脑汤对APP/PS1小鼠小胶质细胞焦亡及认知功能的影响。

1 材 料

1.1 药物 滋肾醒脑汤(生地黄24 g,熟地黄24 g,山萸肉12 g,法半夏9 g,陈皮10 g,石菖蒲15 g,益智仁10 g,川芎12 g,丹参20 g,当归10 g,茯苓20 g,红景天20 g,竹沥10 g,地龙10 g)药材购于湖南中医药大学第一附属医院,经张裕民主任中药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》的规定。于湖南中医药大学第一附属医院制剂室,采用熬制法制备中药液。将中药材饮片放入蒸馏水中浸渍30 min,一煎加水500 mL,煎取200 mL,二煎加水300 mL,煎取150 mL。合并两次水煎液,文火煎,用旋转蒸发仪浓缩至生药质量浓度为1.339 g/mL,放入4℃冰箱备用。盐酸多奈哌齐片[卫材(中国)药业有限公司,批号:2203026]。

1.2 实验动物 SPF级APP/PS1小鼠50只,6个月龄,同月龄同背景野生型C57BL/6J小鼠10只,体质量(29.18±7.41)g,购于杭州子源实验动物科技有限公司,动物生产许可证号:SCK(浙)2019-0004。动物质量合格证编号:20230418Abbz0105000271。小鼠饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,温度(22±3)℃,湿度(60±5)%,自由进食进水,12 h明暗交替,适应性喂养1周后实验。本实验获得湖南中医药大学动物中心实验室批准[SYSK(湘)2020-0010],实验操作严格遵守《实验动物管理条例》相关规定进行,遵循3R原则。本实验已通过湖南中医药大

学第一附属医院伦理委员会批准(ZYFY20231116-131)。

1.3 试剂 蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号:1030);RIPA裂解液(批号:P0005)、磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:P0007)均购自武汉市皮诺飞生物科技有限公司;山羊抗兔IgG(H+L)(批号:G1213)、山羊抗鼠IgG(H+L)(批号:G1214)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号:G2026)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;NF- κ B抗体(批号:10745-1-AP)、Caspase-1抗体(批号:22915-1-AP)、TLR4抗体(批号:66350-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗NLRP3抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-10021R)。

1.4 主要仪器 ZS-Morris型水迷宫视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司);JXFSTPRP-48型高速组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);TGL-16型高速离心机(江苏科析仪器有限公司);CF1524R型台式冷冻离心机(美国赛洛捷克);JT-12S型脱水机(武汉俊杰电子有限公司);BMJ-A型包埋机(常州市中威电子仪器有限公司);RM2016型病理切片仪(上海徕卡仪器有限公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);PHS-3C型精密pH计(上海雷磁仪器有限公司);SMR60047型酶标仪(武汉优尔生生命科学装备有限公司);E100型正置光学显微镜(日本尼康公司);DS-S100型数显钟摆摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);AX-II型暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司)。

2 方 法

2.1 动物分组及给药 将50只APP/PS1小鼠随机分为模型组、滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组、多奈哌齐组,每组10只。10只C57BL/6J小鼠为正常组。适应性喂养7 d后开始灌胃,1次/d。按70 kg成人与动物体质量药量折算表换算。小鼠剂量=成人每日剂量×小鼠体质量与体表面积比值/人体质量与体表面积比值。正常组与模型组小鼠灌胃蒸馏水(0.2 mL/10 g)。滋肾醒脑汤成人每日服用量为206 g(按生药计算),滋肾醒脑汤低、中、高剂量组小鼠灌胃剂量分别为13.39、26.78、40.17g/(kg·d),相当于成人口服剂量的0.5、1.0、2.0倍。多奈哌齐组小鼠予多奈哌齐灌胃[0.65 mg/(kg·d)]。各组连续灌胃35 d。灌胃结束后进行水迷宫实验,观察小鼠行为学变化,末次灌胃24 h后取材。

2.2 观察指标

2.2.1 一般情况 每天观察并记录小鼠一般状况,包括运动、反应能力、皮肤、毛发、精神状态。

2.2.2 行为学观察 采用Morris水迷宫系统观察小鼠行为学变化,评价其空间学习、记忆能力。选取逃避潜伏期、跨台次数及原平台所在区域游行时间进行比较分析。水迷宫实验分为定位航行和空间探索两部分。

2.2.2.1 定位航行实验 检测小鼠的空间学习能力,持续5 d。将平台置于第四象限,把清水注入迷宫并使水位超出平台高度2~3 cm后,将二氧化钛混合入水中,搅混至水变成乳白色。将小鼠爬上平台的时间设为90 s,从各象限边缘中点置入水中。小鼠头朝池壁边缘放入水中,采集记录各组航行轨迹及寻找隐匿平台时间。当90 s内小鼠未能找到平台,人为引导小鼠至平台上,且保存停留15 s后将其取出,逃避潜伏期记为

90 s。每只小鼠每日各象限训练1次,取第5天的4次潜伏期总和均值作为小鼠成绩。

2.2.2.2 空间探索实验 检测小鼠的空间记忆能力,持续1 d。小鼠第5天完成定位航行实验后,于第6天撤走平台。依次将各组小鼠分别从原平台所在对侧象限放入水中,记录90 s内小鼠逃逸潜伏期、穿越平台次数、每个象限内花费的时间、小鼠的游泳速度、运动轨迹及原平台所在区域游行时间等参数,以考察小鼠空间学习记忆能力。其中摄像机位于池中心上方。训练期、测试期尽量避免特殊气味与光线。

2.2.3 HE染色 取每组小鼠左侧脑半球,用4%多聚甲醛在4℃固定24 h后进行石蜡包埋,分离海马组织,制作石蜡切片(5 μm)。切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水合后,对切片进行HE染色,封片后显微镜观察。

2.2.4 尼氏染色 石蜡切片脱蜡后,甲苯胺蓝染液染色1~2 min,水洗后用0.5%的冰醋酸分化背景,边分化边水洗,显微镜下控制分化程度,切片置于65℃烤箱烤干。烘烤4 h后依次放入二甲苯 I 2 min、二甲苯 II 15 min。中性树脂封片,显微镜下观察。运用Image-J软件处理进行系统分析。

2.2.5 免疫组化检测海马CA1区、皮质区β淀粉样蛋白1~42(Aβ₁₋₄₂)蛋白表达 将切片浸入二甲苯脱蜡,置酒精水化。采用1×柠檬酸(pH=6.0)修复液处理修复,山羊血清室温封闭切片20 min。切片滴加一抗β amyloid(1:1 000),4℃孵育过夜;PBS溶液清洗3次,5 min/次。滴加生物素标记山羊抗兔抗体稀释液,37℃孵育1 h;PBS溶液清洗3次,5 min/次;滴加二氨基联苯胺(DAB)显色后采用苏木素复染5 min,常规脱水及透明。封片后将各组置于显微镜下观察,采用Image-J自动图像分析系统对切片进行分析,观察小鼠海马CA1区、皮质区Aβ₁₋₄₂蛋白沉积情况。

2.2.6 透射电镜下观察小胶质细胞形态 取小鼠脑组织,分离海马脑组织,迅速切成体积约为1 mm³的组织块,放入装有电镜固定液的EP管内继续固定,4℃冰箱内静置2 h后,用0.01 mol/L的PBS(pH=7.3)漂洗3次,15 min/次,于室温下用1%的锇酸固定2 h, PBS漂洗3次后分别以30%~50%~70%~80%~95%~100%~100%乙醇梯度脱水,20 min/次,后以100%丙酮脱水2次,15 min/次。采用丙酮、812包埋剂(体积比例为1:1),于37℃条件下包埋2~4 h。随后采用丙酮、812包埋剂(体积比例为1:2)37℃渗透过夜,纯812包埋剂37℃下包埋5~8 h。将纯812包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后37℃烤箱过夜。将组织切成60~80 nm超薄切片,分别于2%醋酸铀饱和酒精溶液中避光染色8 min,清洗后于2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色8 min。清洗吸干后,通过透射电子显微镜观察,观察小胶质细胞形态,并采集图像分析。

2.2.7 小鼠海马组织中TLR4、NF-κB、NLRP3和Caspase-1蛋白表达水平 采用Western blotting法检测小鼠海马组织中TLR4、NF-κB、NLRP3和Caspase-1蛋白表达水平。组织块用预冷的PBS缓冲液漂洗2~3次,加入组织蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆。将匀浆液转移至离心管中,振荡。冰浴30 min确保匀浆液完全裂解。4℃12 000 r/min(离心半径为48 mm)离心15 min,收集上清,移至新的离心管备用。采用BCA蛋白定量法对蛋白定量。制胶后各孔上样,电泳浓缩胶电压为80 V,分离胶电压

为130 V,待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。设定电流为250 mA,根据分子量调整转膜时间。5%脱脂奶粉中振荡封闭1 h;加入一抗(1:4 000),4℃孵育过夜。次日用TBST洗膜5次,5 min/次;加入二抗(1:4 000)孵育1 h。用TBST洗膜5次,5 min/次;滴加ECL发光液,采用化学发光成像系统,根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。将胶片扫描存档,ImageJ软件处理系统分析目标带的灰度值。

2.3 统计学方法 采用SPSS 27.0统计学软件分析实验数据。尼氏染色及免疫组化均使用ImageJ进行数据分析。计量资料以“均数±标准差”(x̄±s)表示,多组比较,若满足正态性及方差齐性则采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD法,若不满足正态性及方差齐性则采用Kruskal-Wallis H检验,组间两两比较采用Nemenyi法。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 正常组小鼠黑色毛发顺滑有光泽,进食饮水正常,反应敏捷,性情温顺,精神状态良好。模型组小鼠毛色不齐、毛发粗糙,反应迟钝,性情急躁易怒,偶见行为异常。滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠情况均有所改善。

3.2 水迷宫实验

3.2.1 定位巡航实验 第1天各组小鼠逃避潜伏期大致相等,各组小鼠在学习能力训练上无明显差异。在学习训练的第2~5天,各组小鼠的逃避潜伏期逐渐减短,呈现出明显差异。模型组、滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期均长于正常组(P<0.01或P<0.05),其中模型组的逃避潜伏期最长。滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期均短于模型组(P<0.05)。滋肾醒脑汤低、中、高剂量组小鼠逃避潜伏期比较,差异无统计学意义(P>0.05)。表明APP/PS1小鼠出现明显的学习能力减退现象,不同剂量滋肾醒脑汤及多奈哌齐均可改善APP/PS1小鼠的学习能力。(见表1)

表1 各组小鼠平均逃避潜伏比较 (x̄±s)

组别	n	给药剂量	平均逃避潜伏期/s
正常组	10		25.98±4.89
模型组	10		80.01±11.18 ^a
滋肾醒脑汤低剂量组	10	13.39 g/(kg·d)	49.87±16.32 ^{bc}
滋肾醒脑汤中剂量组	10	26.78 g/(kg·d)	49.24±22.15 ^{bc}
滋肾醒脑汤高剂量组	10	40.17 g/(kg·d)	57.01±16.77 ^{bc}
多奈哌齐组	10	0.65 mg/(kg·d)	46.91±12.91 ^{bc}
F			8.101
P			0.000

注:与正常组比较,^aP<0.01,^bP<0.05;与模型组比较,^cP<0.05。

3.2.2 空间探索实验 模型组小鼠平台象限滞留时间短于正常组,且跨越平台次数少于正常组,差异均有统计学意义(P<0.05)。滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠平台象限滞留时间均长于模型组(P<0.05或P<0.01)。滋肾醒脑汤中剂量组及多奈哌齐组小鼠穿越平台次数多于模型组(P<0.05)。滋肾醒脑汤低、高剂量组小鼠穿越平台次数与模型组比较,差异无统计学意义。

($P>0.05$)。滋肾醒脑汤中、高剂量组小鼠平台象限滞留时间均长于滋肾醒脑汤低剂量组($P<0.05$)。滋肾醒脑汤中剂量组小鼠平台象限滞留时间与滋肾醒脑汤高剂量组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。滋肾醒脑汤低、中、高剂量组小鼠穿越平台次数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。表明APP/PS1模型小鼠出现明显的空间记忆能力减退,滋肾醒脑汤及多奈哌齐均可不同程度改善小鼠的空间记忆能力。(见表2、图1)

表2 各组小鼠平台象限滞留时间及穿越平台区次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	平台象限滞留时间/s	穿越平台次数/次
正常组	10		48.34±6.34	4.67±2.58
模型组	10		18.47±4.42 ^a	1.17±1.33 ^a
滋肾醒脑汤低剂量组	10	13.39 g/(kg·d)	23.29±2.40 ^b	2.5±2.35 ^d
滋肾醒脑汤中剂量组	10	26.78 g/(kg·d)	28.92±0.60 ^c	3.67±2.07 ^b
滋肾醒脑汤高剂量组	10	40.17 g/(kg·d)	32.25±1.72 ^c	2.67±1.03 ^d
多奈哌齐组	10	0.65 mg/(kg·d)	37.48±2.13 ^c	4.33±1.51 ^b
F			55.336	2.861
P			0.000	0.032

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$,^d $P>0.05$;与滋肾醒脑汤低剂量组比较,^e $P<0.05$ 。

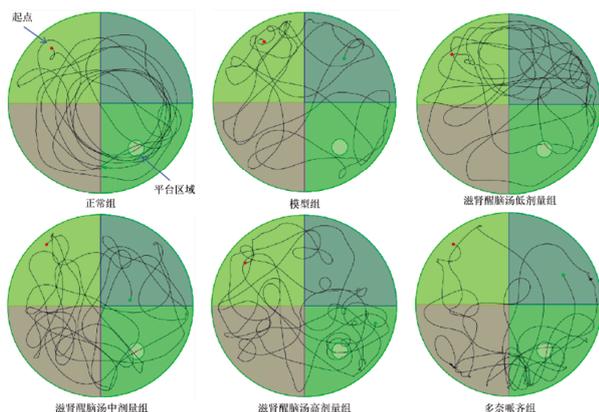


图1 各组小鼠空间探索轨迹图

3.3 海马区CA1区神经元形态 正常组小鼠海马区CA1区神经元排列整齐,结构完整,核圆,颜色浅,形态正常;模型组小鼠海马区CA1区神经元结构不完整,排列不紧密,核固缩、边缘化、分叶明显,受损的神经元数量增多;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马区CA1区神经元结构、数量及形态均有所改善,仅有少数神经元核空泡丢失,偶见异质细胞。(见图2)

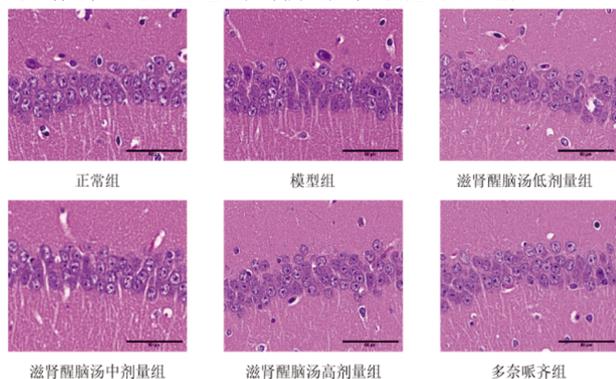


图2 海马CA1区神经元形态 (HE,×400)

3.4 尼氏染色观察神经元形态 正常组小鼠神经元内尼氏体分布均匀,细胞形态规则、排列紧密;与正常组比较,模型组小鼠神经元存活细胞数量少、排列稀疏,神经元明显肿胀且胞内尼氏体分布稀疏;滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马组织中的损伤神经元显著减少,神经元数量、形态及结构均明显改善。(见图3~4)

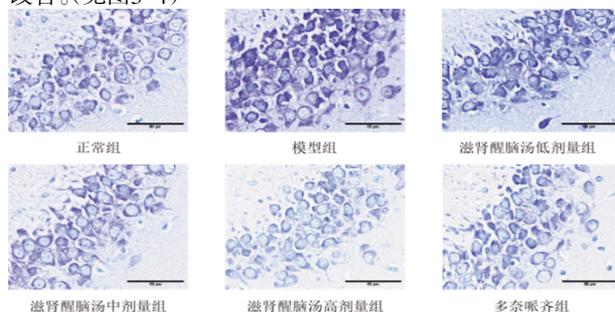


图3 尼氏染色下小鼠海马CA3区神经元形态 (×400)

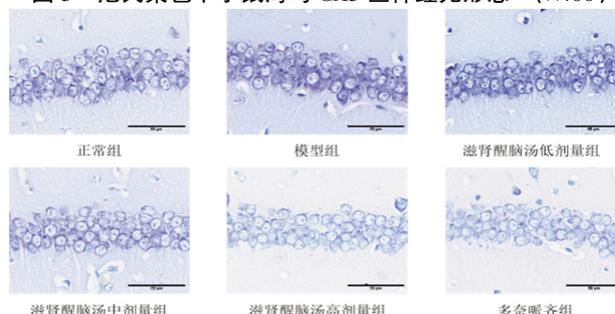


图4 尼氏染色下小鼠海马CA1区神经元形态 (×400)

3.5 小鼠海马CA1区、皮质区 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白表达 正常组小鼠海马CA1区、皮质区神经元形态规则,而模型组神经元形态异常,并可见神经元坏死,神经元周围存在明显的深褐色 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白沉积。滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马CA1区、皮质区 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白沉积明显改善,神经元受损情况明显改善。表明滋肾醒脑汤可有效减少 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白沉积,保护神经功能。(图5~6)

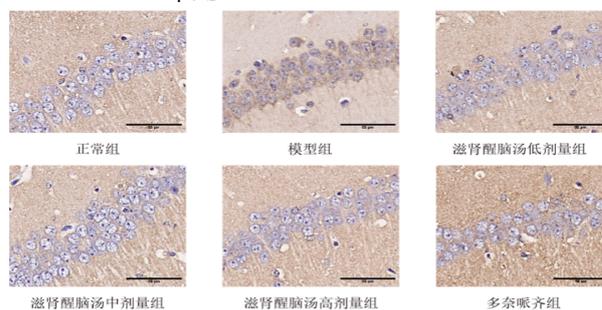


图5 海马区CA1区 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白表达 (免疫组化,×400)

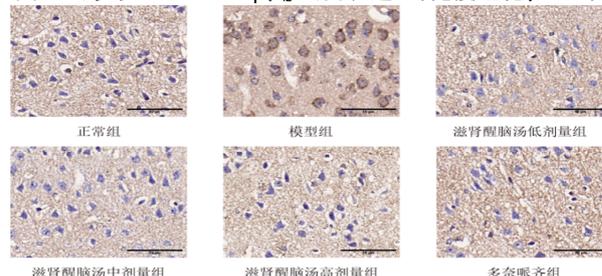


图6 海马区皮质 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白表达 (免疫组化,×400)

3.6 小胶质细胞焦亡情况 透射电镜下的小胶质细胞的胞核形态为椭圆、类三角形或肾形,核膜光滑,核内异染色质占比高。胞质通常稀少,而突起明显,常深入周围组织,同时胞质中无中间纤维、微管和糖原颗粒,胞体和突起轮廓不规则,受周边组织界限制约。正常组小鼠海马小胶质细胞形态结构正常,胞膜完整,细胞核内染色质散在分布。模型组小鼠海马神经元明显变性坏死,胞膜破裂,细胞皱缩,可见大量呈空泡状的焦亡小体。滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠神经元皱缩情况明显改善,胞膜较为完整,表明滋肾醒脑汤可有效抑制小胶质细胞的焦亡。(见图7)

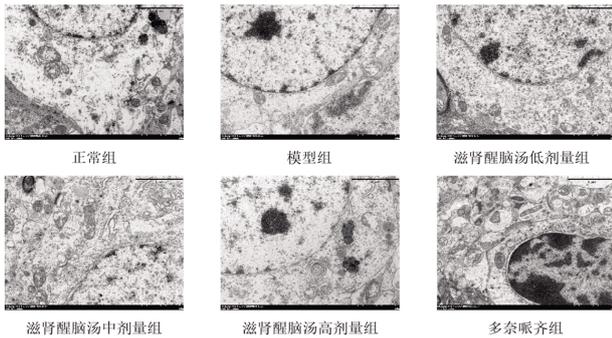
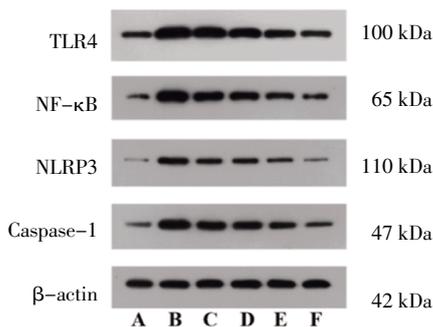


图7 小胶质细胞形态 (×80 000)

3.7 各组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量比较 模型组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量高于正常组($P<0.01$);滋肾醒脑汤低剂量组、滋肾醒脑汤中剂量组、滋肾醒脑汤高剂量组及多奈哌齐组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.01$);滋肾醒脑汤高剂量组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量低于滋肾醒脑汤低剂量组及滋肾醒脑汤中剂量组($P<0.05$)。表明滋肾醒脑汤可降低小胶质细胞焦亡相关蛋白的表达。(见图8、表3)



注:A.正常组;B.模型组;C.滋肾醒脑汤低剂量组;D.滋肾醒脑汤中剂量组;E.滋肾醒脑汤高剂量组;F.多奈哌齐组。

图8 各组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白表达Western blotting图

4 讨论

AD属于中医学中“痴呆”“呆病”范畴。《左传》记载“周子有兄而无慧,不能辨菽麦”。不慧,即痴呆,可见在春秋时期,人们已初步认识痴呆。《石室秘录》云“痰势最盛,呆气最深”。痰浊的深浅与痴呆病情的程度相关。《血证论》记载:“血在上则浊蔽而不明矣。”血瘀脑络,气血失调,脑络失养,则神机

表3 各组小鼠海马组织TLR4、NF-κB、NLRP3及Caspase-1蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	TLR4	NF-κB	NLRP3	Caspase-1
正常组	10		0.49±0.01	0.31±0.06	0.23±0.06	0.32±0.04
模型组	10		1.33±0.01 ^a	1.21±0.05 ^a	1.20±0.05 ^a	1.22±0.02 ^a
滋肾醒脑汤低剂量组	10	13.39 g/(kg·d)	1.15±0.02 ^{ad}	0.91±0.04 ^{cd}	0.88±0.01 ^{cd}	1.09±0.04 ^{cd}
滋肾醒脑汤中剂量组	10	26.78 g/(kg·d)	0.86±0.05 ^{cd}	0.71±0.04 ^{cd}	0.75±0.44 ^{cd}	0.94±0.05 ^{cd}
滋肾醒脑汤高剂量组	10	40.17 g/(kg·d)	0.68±0.01 ^{bc}	0.55±0.07 ^{bc}	0.61±0.01 ^{bc}	0.80±0.01 ^{bc}
多奈哌齐组	10	0.65 mg/(kg·d)	0.53±0.01 ^{bc}	0.36±0.03 ^{bc}	0.30±0.03 ^{bc}	0.60±0.02 ^{bc}
F			721.075	142.398	319.994	308.434
P			0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.01$,^b $P>0.05$;与模型组比较,^c $P<0.01$;与滋肾醒脑汤高剂量组比较,^d $P<0.01$ 。

失用。AD发病与心、肾、脾、肝有关,本于虚损,与情志、痰饮及瘀血等病理因素密切相关。滋肾醒脑汤中熟地黄补肾填精而益髓。《本草从新》记载熟地黄“滋肾水,封填骨髓”。脑髓充则精明之府有所养,智力不消。法半夏、茯苓、石菖蒲化痰开窍;川芎、丹参、当归、红景天活血化瘀;竹沥、地龙豁痰通络。生地黄可以减少Aβ在APP/PS1小鼠脑内沉积,保护血脑屏障完整性,保护神经功能。当归多糖和地黄多糖均可通过调节胆碱能系统功能、抗氧化应激及炎症反应改善记忆障碍^[9-10]。滋肾醒脑汤治疗因肾精不足,导致脑髓失充、痰瘀阻滞脑络、脑失所养、神机失用的痴呆患者疗效显著。前期研究^[6]显示,滋肾醒脑汤治疗AD记忆下降疗效显著。本研究进一步证实滋肾醒脑汤能够改善APP/PS1小鼠行为习惯,改善小鼠的学习及认知功能。

AD是一种进行性、不可逆转性中枢神经系统退行性疾病,发病机制复杂,多发于65岁以上老人。AD临床表现为记忆障碍、失语、失用、失认、视空间能力损害、抽象思维和计算力损害、人格和行为改变等。Aβ在AD发病机制中起关键作用,AD中神经变性和神经元丢失均与Aβ的积累及相关炎症有关^[11]。Aβ沉积可激活小胶质细胞或星形胶质细胞中TLR4信号通路的启动,激活NF-κB,提高NLRP3的表达,进而导致Caspase-1水平升高并释放细胞因子^[12]。而小胶质细胞过强活化可造成神经元突触损伤,或分泌炎症因子造成细胞死亡,最终形成慢性神经炎症,加剧Aβ清除障碍^[13]。抑制TLR4、NF-κB p65和NLRP3蛋白表达,减少海马炎症因子释放,可改善大鼠学习记忆和认知功能^[14]。地黄饮子可通过抑制磷酸化NF-κB p65蛋白(p-NF-κB p65),降低肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)表达水平,抑制小胶质细胞激活,起到改善小鼠记忆能力的作用^[15]。本研究与上述研究结果一致,表明滋肾醒脑汤可以减轻小鼠Aβ₁₋₄₂蛋白的沉积,有助于减少炎症因子的释放,抑制小胶质细胞过度活化,从而减轻神经元损伤。

细胞焦亡是AD脑损伤发展过程中关键上游机制^[16]。在经典的焦亡途径中,由NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和Caspase-1组成的炎症复合物NLRP3激活后,可通过Caspase-1水解IL-1β前体(Pro-inflammatory cytokine IL-1β, pro-IL-1β)、IL-18前体(Pro-inflammatory cy-

tokineIL-18, pro-IL-18)和GSDMD,使其形成并释放具有活性的IL-1 β 、IL-18和GSDMD-N,从而诱导细胞焦亡^[17]。在AD中后期,A β 沉积和tau缠结可引起神经元死亡。当神经元开始大量死亡时,小胶质细胞和星形胶质细胞被激活引起神经炎症^[18]。炎症小体的激活可诱导细胞焦亡,导致IL-1 β 和凋亡相关斑点蛋白(ASC)斑点的分泌。ASC斑点与A β 结合并在周围薄壁组织中附着,可导致进一步的A β 聚集^[19]。同时小胶质细胞焦亡后分泌的IL-1 β 可激活TLR4^[20-21],形成小胶质细胞A β -TLR4-NLRP3炎症小体及IL-1 β 的恶性循环,从而维持AD中的神经炎症,加剧AD的发生发展。研究表明,神经元焦亡高度依赖于Caspase-1介导的经典途径,靶向抑制NLRP3/ASC/Caspase-1可有效减少神经元焦亡^[22]。朱博超等^[23]研究发现针刺可通过TLR4/NF- κ B信号通路抑制海马区胶质细胞的激活并降低促炎性细胞因子表达。本研究发现,APP/PS1小鼠海马组织中TLR4、NF- κ B、NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平升高,提示AD进展过程中Caspase-1介导的焦亡通路被激活。给予多奈哌齐或滋肾醒脑汤干预后,各项指标显著逆转。由此可见,滋肾醒脑汤与多奈哌齐有类似的作用,均可通过调控TLR4/NF- κ B/NLRP3通路抑制海马神经元焦亡,改善海马及皮层炎症损伤,提高APP/PS1小鼠认知能力。

综上所述,滋肾醒脑汤可能通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路活性,降低TLR4、NF- κ B、NLRP3及Caspase-1的表达,抑制小胶质细胞焦亡,减少A β_{1-42} 沉积,发挥神经保护作用,改善认知功能。

参考文献

- [1] 任汝静,殷鹏,王志会,等.中国阿尔茨海默病报告2021[J]. 诊断学理论与实践,2021,20(4):317-337.
- [2] 雷露,吕沛然,赵耀,等.神经炎症与阿尔茨海默病的关系及针灸调控机制研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2024,26(4):1028-1035.
- [3] 李润琪,邹伟,刘利.细胞焦亡在神经退行性疾病中的研究进展[J].医学综述,2022,28(11):2100-2105.
- [4] 廖冬梅,庞芳,周敏,等.基于TLR4/NF- κ B/NLRP3通路探讨电针对阿尔茨海默病小鼠认知障碍的影响[J].针刺研究,2022,47(7):565-572.
- [5] 吕媛.NLRP-3/caspase-1/GSDMD信号轴介导小胶质细胞的焦亡:一种缺氧缺血性脑损伤发生的新途径[D].苏州:苏州大学,2020.
- [6] 盛望,胡国恒,陈培亮,等.基于BDNF/TrkB/PI3K/Akt信号通路的滋肾醒脑汤对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的影响[J].中国中医药信息杂志,2022,29(3):53-58.
- [7] 矫增金,陈民.论老年性痴呆中医病因病机[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(6):58-60.
- [8] 赵大鹏.中药地黄对APP/PS1小鼠血脑屏障的保护性研究及以地黄为君药的中药复方治疗阿尔茨海默病的临床应用研究[D].南京:南京中医药大学,2022.
- [9] DU Q, ZHU X Y, SI J R. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(1):1-10.
- [10] 马媛媛,姚晓英,谈卓臣,等.地黄多糖对东莨菪碱诱导小鼠学习记忆能力障碍的改善作用及其机制[J].中成药,2021,43(6):1462-1466.
- [11] 彭俊,张杰.中医药通过PI3K/Akt信号通路防治阿尔茨海默病的研究进展[J].中医药导报,2022,28(9):105-109.
- [12] CAI Y W, CHAI Y H, FU Y, et al. Salidroside ameliorates Alzheimer's disease by targeting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 13: 809433.
- [13] 刘立阳.Akt/FOXO1信号通路参与阿尔茨海默病小胶质细胞焦亡的机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2023.
- [14] 孙佳姿,翟玲,张向悦,等.基于CaMK II/CREB/BDNF信号通路麦粒灸对抑郁大鼠行为学及海马神经保护作用机制研究[J].中医药导报,2024,30(11):26-31.
- [15] 曹珊,陈智慧,秦静琪,等.中药及其有效成分治疗阿尔茨海默病研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(10):258-268.
- [16] ZHAO N N, SUN C X, ZHENG M, et al. Amentoflavone suppresses amyloid β 1-42 neurotoxicity in Alzheimer's disease through the inhibition of pyroptosis[J]. Life Sci, 2019, 239: 117043.
- [17] VASUDEVAN S O, BEHL B, RATHINAM V A. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage[J]. Semin Immunol, 2023, 69: 101781.
- [18] MCALPINE C S, PARK J, GRICIUC A, et al. Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease[J]. Nature, 2021, 595(7869):701-706.
- [19] VENEGAS C, KUMAR S, FRANKLIN B S, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease[J]. Nature, 2017, 552(7685):355-361.
- [20] MIRON J, PICARD C, LAFAILLE-MAGNAN M É, et al. Association of TLR4 with Alzheimer's disease risk and presymptomatic biomarkers of inflammation[J]. Alzheimers Dement, 2019, 15(7):951-960.
- [21] CHAKRAVARTY S, HERKENHAM M. Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines[J]. J Neurosci, 2005, 25(7):1788-1796.
- [22] 巩俐,刘雪梅,罗超琴,等.基于NLRP3/ASC/Caspase-1细胞焦亡通路探讨补肾启智方改善缺血性脑卒中大鼠认知功能的作用机制[J/OL].中医学报,1-10[2025-01-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20250116.1410.002.html>.
- [23] 朱博超,李彦杰,秦合伟,等.针刺通过TLR4/NF- κ B信号通路调控炎症反应治疗中枢神经系统疾病的作用机制研究进展[J].中医药导报,2023,29(2):160-165.

(收稿日期:2024-12-15 编辑:蒋凯彪)