

黑逍遥散调控 p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路对阿尔茨海默病大鼠神经炎症的影响

米彩云, 彭超, 周君, 李明成, 王虎平*

(甘肃中医药大学, 甘肃省方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 观察黑逍遥散对 $A\beta_{1-42}$ 所致阿尔茨海默病 (AD) 大鼠学习记忆能力的影响, 并从 p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路介导的炎症级联反应探讨其作用机制。方法 双侧海马注射 $1 \mu\text{L}$ $A\beta_{1-42}$ 溶液复刻 AD 大鼠模型。筛选建模成功的大鼠 50 只, 随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组 (0.5 mg/kg) 和黑逍遥散低、中、高剂量组 (4.25、8.5、17 g/kg), 连续给药 42 d。Morris 水迷宫实验检测定位航行与空间探索能力, HE 染色观察海马神经元病理结构改变, ELISA 法检测海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、PGE₂ 表达, RT-qPCR 法检测海马组织 p38、ATF2、COX-2 mRNA 表达, Western blot 法检测海马组织 p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达。结果 与模型组比较, 黑逍遥散中、高剂量组和盐酸多奈哌齐组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 有效区域运动距离、目标象限滞留时间百分比增加 ($P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元排列有序, 胞体清晰, 凋亡细胞减少, 海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、PGE₂ 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p38、COX-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p38、p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。结论 黑逍遥散可改善 $A\beta_{1-42}$ 所致 AD 大鼠的认知能力, 其机制可能与阻断 p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路传导, 进而减轻炎症反应有关。

关键词: 黑逍遥散; 阿尔茨海默病; 神经炎症; p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)02-0590-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.039

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种患者认知和记忆能力恶化并伴随着神经精神症状和行为障碍的慢性退行性疾病。据估计, 全球约有 4 600 万 AD 病例, 每年的相关支出费用约为 8 000 亿美元, 是仅次于心脏病、恶性肿瘤和中风的第四大死亡原因^[1], 已成为一个棘手的社会和医学问题, 但目前尚无有效的方法治疗或减缓 AD 的进程^[2]。研究表明, 神经炎症是 AD 重要的发病机制之一, AD 患者大脑通常具有炎症迹象, 在炎性环境下, 神经元进行性丧失, 并最终导致认知和运动障碍^[3]。AD 可归于中医“呆症”“健忘”“痴呆”等范畴, 与肝、脾、肾三脏密切相关, 因此, 本研究选用肝脾肾“三脏并调”的经典方黑逍遥散进行研究, 探讨该方通过调控 p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路防治 AD 的作用及其免疫炎症机制, 以期为临床应用黑逍遥散防治 AD 提供实验支撑。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 4 月龄雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体质量 (250±50) g, 由甘肃中医药大学动物实验中心提供 (动物质量合格证号 6200100000570)。所有大鼠置于受控环境下

饲养, 温度 (23±2) °C, 相对湿度 (45±5) %, 12 h 光照/12 h 黑暗周期, 自由饮食饮水。所有动物均按实验动物中心的指导原则处理, 所有项目均经过甘肃中医药大学伦理委员会的评估和批准 (伦理号 2020-004)。

1.2 药物与试剂 黑逍遥散组方购自甘肃中医药大学第二附属医院中药房, 经鉴定符合 2020 年版《中国药典》要求。 $A\beta_{1-42}$ 蛋白 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 107761-42-2); 盐酸多奈哌齐 [卫材 (中国) 药业有限公司, 国药准字 H20070181]; HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1120); $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、PGE₂ 酶联免疫试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司, 批号 YY56922、YY98455、YY69712); p38、p-p38、COX-2、ATF2、p-ATF2 抗体 (美国 ImmunoWay 公司, 批号 YT3513、YP0336、YT1037、YT0385、YP0023)。

1.3 仪器 MT-200 型 Morris 水迷宫实验系统 (成都泰盟科技有限公司); Multiskan Mk3 型酶标仪、Real-time PCR 仪 (美国罗氏公司); JY-SCZ2+型垂直电泳槽、JY-ZY5 型转膜仪、JY300C 型电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); 5200 型化学发光凝胶成像仪 (上海天能科技)。

收稿日期: 2023-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960828); 甘肃省高等学校创新能力提升项目 (2019B-400)

作者简介: 米彩云 (1996—), 女, 硕士生, 从事中医复方物质基础及作用机理研究。Tel: 15293170157, E-mail: 854354645@qq.com

* 通信作者: 王虎平 (1980—), 男, 博士, 从事中医复方物质基础及作用机理研究。Tel: (0931) 5162454, E-mail: whp@

gszy.edu.cn

2 方法

2.1 药物制备 黑逍遥散按熟地 15 g、柴胡 10 g、当归 10 g、白芍 10 g、白术 10 g、茯苓 10 g、生姜 10 g、炙甘草 8 g、薄荷 2 g 比例称取饮片，凉水浸泡 40 min，大火煮沸，小火煎熬 1 h，后下薄荷煎煮 5 min，滤出药汁后，加水二次煎煮 30 min，混合 2 次滤出药汁，浓缩得到生药量 1.0 g/mL 的黑逍遥散汤剂。盐酸多奈哌齐研成粉末，溶解于纯水中，配制成 0.005 mg/mL 的溶液。

2.2 模型复制 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉，剃去大鼠头部毛发备皮后固定头部，沿脑顶部正中切开 1 cm 左右切口，使颅骨完全暴露，确定海马 CA1 区位置并标记，用牙科钻在标记处钻孔直至出现落空感，再用微量进样器在 2 孔各缓慢注射 1 μ L $A\beta_{1-42}$ 溶液至硬脑膜下深 3 mm，留针 3 min 后再缓慢出针。假手术组大鼠注射等剂量生理盐水，不注射 $A\beta_{1-42}$ 溶液，术后在创面涂抹青霉素干粉剂以防感染，缝合皮肤后再次碘伏消毒。

2.3 分组与给药 随机选取 10 只大鼠作为空白组，10 只作为假手术组，选取造模成功的大鼠 50 只，随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散低、中、高剂量组。根据第四版《药理实验方法学》中人和大鼠体表面积折算方法，黑逍遥散低、中、高剂量为 4.25、8.5、17 g/kg，盐酸多奈哌齐剂量为 0.5 mg/kg，空白组与假手术组给予生理盐水，灌胃给药，每天 1 次，连续 42 d。

2.4 Morris 水迷宫行为学检测 给药结束后进行水迷宫实验，向水箱注水至淹没圆形平台 2 cm 处，加入二氧化钛使水变为乳白色避免大鼠看清水下平台，将大鼠面朝池壁随机放入任一象限，分别记录大鼠找到平台的时间，如果时间超过 120 s，则引导大鼠至平台上停留 15 s，每次游泳结束后，将大鼠用毛巾擦干以防感冒。每只大鼠每天测试 2 次，连续测试 5 d，第 6 天撤除平台，开始 120 s 的探索训

练。记录 2 次结果，作为行为学的检测指标。

2.5 标本采集与保存 于末次行为学测试后，大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉，待麻醉后处死，每组取 3 只大鼠全脑，置于固定液中，常温放置；其余大鼠脑组织在冰浴条件下，剥离海马体，置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.6 HE 染色观察海马 CA1 区病理形态学变化 脑组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 8 h，浸于 70% 乙醇溶液中，然后分别置于 80%、90%、95% 和无水乙醇中梯度脱水 4 h，将组织浸泡在二甲苯中 30 min，然后用石蜡包埋，切片，脱蜡水化后将切片浸泡于苏木素溶液中染色 10 min，纯水冲洗干净，然后使用 1% 盐酸乙醇冲洗切片 5 s，纯水冲洗干净后用伊红复染 2 min，纯净水再次冲洗，经脱水、透明、封片后置于显微镜下观察。400 倍镜下观察海马组织结构及细胞形态，同时采集照片。

2.7 ELISA 法检测海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平 取海马组织，匀浆后离心，收集上清液，于孔板上加入各梯度标准品和待测样品，按各试剂盒说明书操作进行反应，反应终止后在 450 nm 波长处检测各孔光密度 (OD) 值，根据 OD 值绘制标准曲线，计算各组大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平。

2.8 RT-qPCR 法检测海马组织 p38、ATF2、COX-2 mRNA 表达 称取各组海马组织 100 mg，加入 RNA 抽提试剂提取 RNA，用微量分光光度计检测 RNA 纯度，重复 3 次取平均值。将所提取的 RNA 按照说明书操作反转录合成 cDNA，建立 20 μ L 反应体系 (各 0.4 μ L 正反向引物、1 μ L 待测 DNA、10 μ L HieffTM qPCR SYBR& Green Master Mix、无酶水定容至 20 μ L) 进行 qPCR 反应。按照试剂盒说明书设置两步法扩增程序，40 个循环后采集荧光信号，每个基因重复 3 次实验。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
p38	ATGCCAAAAGCTTACAGATGACC	ATCATCAGTGTGTGCGGCCAA
ATF2	TGACTTGGCAAGTCCATTCG	AACGGGCTATCTCGGTGAGT
COX-2	AACATTCTTCCCCAGCAA	TCTATCACTGGCATCCGCTG
GAPDH	AGGATGCGTTGCTGACAATCTTGA	TGGAATCCACTGGCGTCTTCAC

2.9 Western blot 法检测海马组织 p38、p-p38、ATF2、p-ATF2、COX-2 蛋白表达 取海马组织 80 mg，加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂，匀浆后离心，吸取上清液进行 BCA 蛋白浓度测定，蛋白定量后进行变性。取蛋白样品加样电泳，然后转移至 PVDF 膜，室温封闭 2 h，加一抗置于摇床上孵育 1 h 后，于 4 $^{\circ}$ C 过夜，次日用 PBST 洗膜，加入稀释好的二抗孵育 2 h，PBST 洗膜，用滤纸吸干 PVDF 膜的液体，将膜放在曝光机显影板上曝光，分析条带灰度值。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐采用 LSD 法；方差不齐采用 Games-Howell 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 空白组大鼠常规喂养，发育良好，皮毛有光泽，反应迅速，饮食、二便未见改变；造模 48 h 后，假手术组及造模组大鼠精神不振，蜷缩俯卧，饮食减少，大便色浅呈稀糊状，假手术组死亡 1 只，模型组死亡 2 只，均出现脑部水肿；给药 1 周后黑逍遥散中剂量组死亡 1 只，高剂量组死亡 2 只，腹部膨大，判断为肠梗阻死亡。随着药物干预时间的推移，各给药组大鼠一般状况有所好转，大鼠皮毛逐渐恢复光泽，精神状态逐渐变好，活跃度有所提升，饮食尚可，二便较正常；模型组和假手术组术后常规饲养，未进行任何治疗，一般状态稍有好转，但仍精神不振、皮毛蓬松没有光泽、反应迟钝、饮食饮水较少，体

质量增长缓慢。

3.2 黑逍遥散对AD大鼠学习记忆能力的影响 与空白组比较,假手术组大鼠第2天逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$),第3、4天无明显变化 ($P > 0.05$),模型组大鼠第2~4天逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$);与假手术组比较,模型组大鼠第2~4天逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$);与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组和盐酸多奈哌齐组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$),低剂量组无明显变化 ($P > 0.05$),见表2。与

空白组比较,假手术组大鼠有效区域运动距离、目标象限停留时间百分比无明显变化 ($P > 0.05$),模型组有效区域运动距离减少 ($P < 0.01$),在目标象限停留时间百分比降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,黑逍遥散各剂量组及多奈哌齐组有效区域运动距离增加 ($P < 0.01$),黑逍遥散高、中剂量组及多奈哌齐组大鼠目标象限停留时间百分比提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量组无明显变化 ($P > 0.05$),表3。

表2 黑逍遥散对AD大鼠第2~4天逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	逃避潜伏期/s		
		第2天	第3天	第4天
空白组	10	61.50±13.22	33.10±7.91	22.20±4.13
假手术组	9	72.11±12.61*	41.33±8.90	25.89±9.35
模型组	8	104.75±8.10**△△	81.75±11.51**△△	67.75±7.69**△△
黑逍遥散低剂量组	10	97.20±8.13	72.00±10.15	63.10±11.16
黑逍遥散中剂量组	8	96.13±6.96##	60.25±5.97##	34.25±11.12##
黑逍遥散高剂量组	9	86.67±11.51##	59.44±9.29##	40.44±13.86##
盐酸多奈哌齐组	10	84.70±10.19##	51.40±11.37##	29.50±6.57##

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与假手术组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

表3 黑逍遥散对AD大鼠有效区域运动距离和目标象限停留时间百分比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	有效区域运动距离/cm	目标象限停留时间百分比/%
空白组	10	619.33±137.06	28.38±6.90
假手术组	9	551.23±104.48	26.80±3.68
模型组	8	46.75±11.76**△△	11.39±3.12**△△
黑逍遥散低剂量组	10	278.47±64.75##	16.19±4.42
黑逍遥散中剂量组	8	341.53±81.89##	20.38±5.95#
黑逍遥散高剂量组	9	388.95±175.68##	23.04±5.23##
盐酸多奈哌齐组	10	483.37±113.56##	23.53±6.80##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与假手术组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

3.3 黑逍遥散对AD大鼠海马CA1区病理改变的影响 空白组大鼠海马CA1区神经元数量丰富,排列有序,结构正常,细胞核清晰,核仁明显,细胞质丰富;与空白组比较,假手术组大鼠海马CA1区神经元形态、结构、数量未见明显改变;模型组大鼠海马CA1区神经元明显丢失,可见大

量肿胀的神经元,结构疏松,细胞核固缩,形成一些液泡结构;与模型组比较,各给药组大鼠海马神经元形态均有所改善,以黑逍遥散高剂量组和盐酸多奈哌齐组作用最为显著,可以清晰地观察到神经元排列有序,细胞体饱满,未见大量凋亡细胞,见图1。

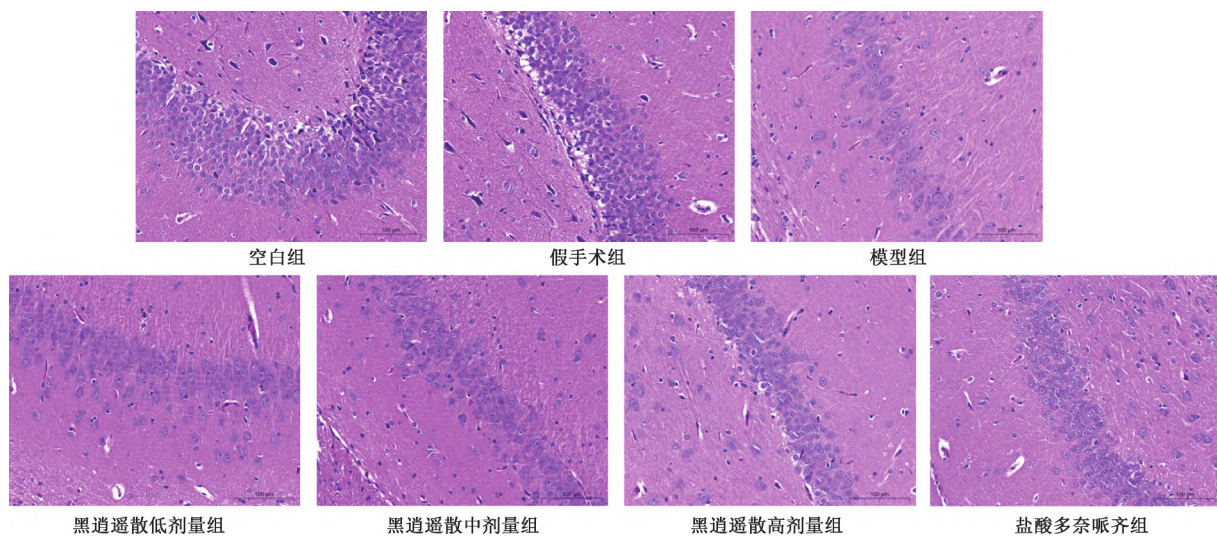


图1 黑逍遥散对AD大鼠海马CA1区病理改变的影响 (HE, ×400)

3.4 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平的影响 与空白组比较,假手术组大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平无明显变化 ($P>0.05$),模型组大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平升高 ($P<0.01$);与假手术

组比较,模型组大鼠海马组织 iNOS、 PGE_2 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,黑逍遥散中、高剂量组和盐酸多奈哌齐组大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表4。

表4 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 、iNOS、 PGE_2 水平的影响 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	$A\beta_{1-42}$	iNOS	PGE_2
空白组	22.86±1.06	1.38±0.42	247.85±18.03
假手术组	23.63±1.15	1.48±0.29	243.61±12.54
模型组	36.56±1.17** $\Delta\Delta$	6.69±0.27** $\Delta\Delta$	327.24±15.71** $\Delta\Delta$
黑逍遥散低剂量组	35.08±2.31	6.34±0.64	319.97±11.97
黑逍遥散中剂量组	29.13±1.90 [#]	4.52±0.26 [#]	293.30±24.01 [#]
黑逍遥散高剂量组	24.61±1.98 [#]	2.83±0.34 [#]	282.09±21.45 [#]
盐酸多奈哌齐组	24.63±1.15 [#]	2.15±0.22 [#]	269.67±35.34 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

3.5 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 p38、ATF2、COX-2 mRNA 表达的影响 与空白组比较,假手术组大鼠海马组织 p38 mRNA 表达升高 ($P<0.05$),ATF2、COX-2 mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$),模型组大鼠海马组织 p38、COX-2 mRNA 表达均升高 ($P<0.01$),ATF2 mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠海马组织 p38 mRNA 表达升高 ($P<0.01$),ATF2、COX-2 mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$);与模型组比较,各给药组 p38 mRNA 表达均降低 ($P<0.01$),ATF2 mRNA 无明显变化 ($P>0.05$),黑逍遥散中、高剂量组及盐酸多奈哌齐组 COX-2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),低剂量组 COX-2 mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$),见表5。

3.6 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 p38、p-p38、ATF2、p-ATF2、COX-2 蛋白表达的影响 与空白组比较,假手术组 p38、ATF2、p-p38、p-ATF2 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$),假手术组大鼠海马 COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$),模型组大鼠海马组织 p38、p-p38、p-ATF2 蛋白表达升高 ($P<0.01$),ATF2 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠海马组织 p38、p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),ATF2 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$);与模型组比较,黑逍遥散低剂量组 p-ATF2 蛋白表达降低 ($P<0.01$),中剂量组 p38、p-p38、p-ATF2 蛋白表达降低 ($P<0.01$),高剂量组及盐酸多奈哌齐组 p38、p-p38 蛋白表达降低 ($P<0.01$),黑逍遥散高剂量组及盐酸多奈哌齐组 p38、p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达均降低 ($P<0.01$),见表6、图2。

表5 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 p38、ATF2、COX-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	p38	ATF2	COX-2
空白组	0.28±0.07	1.02±0.18	0.29±0.05
假手术组	0.41±0.10*	1.19±0.06	0.39±0.15
模型组	1.00±0.00** $\Delta\Delta$	1.00±0.00	1.00±0.00**
黑逍遥散低剂量组	0.46±0.02 [#]	1.07±0.10	0.64±0.10
黑逍遥散中剂量组	0.45±0.07 [#]	0.92±0.05	0.50±0.07 [#]
黑逍遥散高剂量组	0.40±0.12 [#]	0.92±0.06	0.52±0.01 [#]
盐酸多奈哌齐组	0.48±0.05 [#]	1.08±0.12	0.45±0.06 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

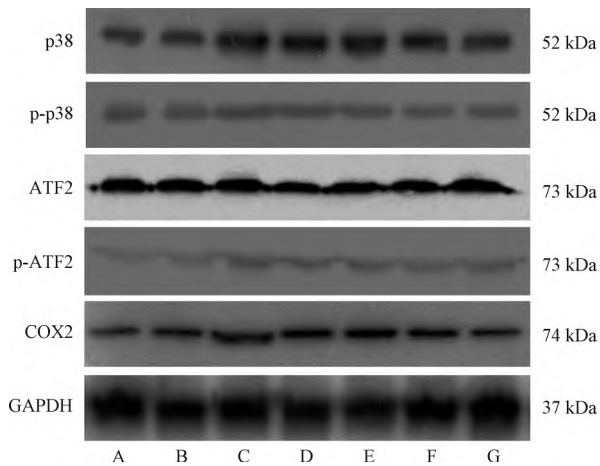
表6 黑逍遥散对AD大鼠海马组织 p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	p38	p-p38	ATF2	p-ATF2	COX-2
空白组	1.01±0.03	0.38±0.01	1.03±0.07	0.40±0.04	0.65±0.03
假手术组	0.98±0.02	0.47±0.03	1.15±0.07	0.48±0.01	0.98±0.05*
模型组	1.34±0.08** $\Delta\Delta$	1.04±0.05** $\Delta\Delta$	1.09±0.06	0.98±0.08** $\Delta\Delta$	1.31±0.05** Δ
黑逍遥散低剂量组	1.14±0.03	1.01±0.01	0.94±0.02	0.66±0.11 [#]	1.19±0.10
黑逍遥散中剂量组	0.92±0.08 [#]	0.78±0.04 [#]	0.98±0.01	0.64±0.12 [#]	1.25±0.05
黑逍遥散高剂量组	0.70±0.03 [#]	0.66±0.01 [#]	1.04±0.07	0.65±0.08 [#]	1.02±0.06 [#]
盐酸多奈哌齐组	0.68±0.04 [#]	0.75±0.25 [#]	1.06±0.05	0.70±0.05 [#]	0.80±0.03 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假手术组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

的重要底物,在炎症中具有潜在的作用^[9]。研究发现,当其上游信号分子 p38MAPK 被激活后,ATF2 的 Try307 位点会迅速发生磷酸化改变,从而上调或下调靶基因的转录过

程,干扰正常的基因表达,介导诸如细胞凋亡等病理过程^[10-11]。有研究表明,在 ATF2 基因敲除大鼠中,经脂多糖刺激后肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6



注: A 为空白组, B 为假手术组, C 为模型组, D~F 为黑逍遥散低、中、高剂量组, G 为盐酸多奈哌齐组。

图 2 各组大鼠海马组织 p38、p-p38、ATF2、p-ATF2、COX-2 蛋白条带图

的表达受到显著抑制,且 ATF2 在浸润性巨噬细胞中高表达,并抑制抗炎分子 ATF3 在白色脂肪组织的 M1 巨噬细胞中的转录^[12]。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 可由 NOS 的 3 种亚型产生,其中诱导型 NOS (iNOS) 能够通过脂多糖和各种细胞因子的刺激,产生大量 NO,从而加速 AD 的进程^[13-14]。另一种炎症介质 PGE₂ 可通过环氧合酶 2 (cyclooxygenase, COX-2) 依赖性途径合成参与神经退行性病损等疾病的病理过程^[15]。研究表明,在炎症模型中,当机体受到外界刺激后,COX-2 应激性升高,促进其催化产物 PGE₂ 的表达量增加^[16],PGE₂ 进一步作用于局部炎性细胞,加重炎症损伤^[17]。

黑逍遥散出自清·徐大椿《医略六书·女科指要》卷二十六方,由《局方》之逍遥散加熟地而成,具有补肾填精、养血疏肝、健脾和中功效。课题组前期研究已经证实,黑逍遥散对提高大鼠学习记忆功能具有确切疗效,并对 AD 表现出较为显著的防治作用^[18-21],但其对于学习记忆的改善是否与调控 p38MAPK 途径减轻 AD 脑内及血清中炎症因子的表达有关,有待进一步证实。本研究发现,黑逍遥散可以缩短大鼠逃避潜伏期,增加平台象限停留时间,提示其在改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆缺陷方面的有效作用;黑逍遥散能降低 AD 大鼠海马组织 Aβ₁₋₄₂、iNOS、PGE₂ 水平;黑逍遥散能降低 p38、COX-2 mRNA 表达和 p38、p-p38、p-ATF2、COX-2 蛋白表达,提示其能够通过降低 p38 总量以及其磷酸化水平来阻断 p38MAPK 信号通路。而本实验发现,p38 的下游底物 ATF2 在各组中总量变化无明显差异,但 p-ATF2 在模型组中呈高表达,给药干预后其表达降低,说明 p-p38 能够激活 ATF2 使其磷酸化,活化后的 ATF2 又可诱导 COX-2 的上调。因此,阻断 p38MAPK/ATF2/COX-2 介导的炎症通路可能是治疗 AD 的重要靶点。

综上所述,黑逍遥散对 AD 具有明确的防治作用,其作用机制可能是通过调控 p38MAPK/ATF2/COX-2 信号通路

从而抑制炎症因子的释放,进而改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的神经元改变和学习记忆障碍。

参考文献:

- [1] 贾建平,陈生弟. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 265.
- [2] Long J M, Holtzman D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 312-339.
- [3] Webers A, Heneka M T, Gleeson P A. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease[J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98(1): 28-41.
- [4] Leng F D, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [5] Rogers J, Webster S, Lue L F, et al. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Neurobiol Aging*, 1996, 17(5): 681-686.
- [6] Bagyinszky V, Giaua V V, Shim K, et al. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 376: 242-254.
- [7] Hampel H, Caraci F, Cuello A C, et al. A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 456.
- [8] Chang K W, Zong H F, Rizvi M Y, et al. Modulation of the MAPKs pathways affects Aβ-induced cognitive deficits in Alzheimer's disease via activation of α7nAChR [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2020, 168: 107154.
- [9] Chiu Y J, Hsieh Y H, Lin T H, et al. Novel compound VB-037 inhibits Aβ aggregation and promotes neurite outgrowth through enhancement of HSP27 and reduction of P38 and JNK-mediated inflammation in cell models for Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2019, 125: 175-186.
- [10] Wei T H, Hsieh C L. Effect of acupuncture on the p38 signaling pathway in several nervous system diseases: a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4693.
- [11] 严琪. 抑制 p38MAPK/ATF2 信号通路对 APP^{swe}/PS1^{dE9} 小鼠认知功能障碍的改善作用及其分子机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [12] Li M M, Zhang D M, Ge X, et al. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376(2): 133-148.
- [13] Kim D H, Li H, Han Y E, et al. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in LPS-stimulated BV-2 microglia by prenylated chalcones from *Cullen corylifolium* (L.) Medik. through inhibition of I-κBα degradation [J]. *Molecules*, 2018, 23(1): 109.
- [14] 石炜弘, 窦丹波, 沈若冰. 诱导型一氧化氮合酶/一氧化氮在气道炎症中的研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(5): 852-857.
- [15] Komatsu N, Kajiya M, Morimoto S, et al. Cox2-mediated PGE2

- production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes [J]. *Biophys Res Commun*, 2020, 530(2): 448-454.
- [16] 王 焯, 范小雪, 屈丽媛, 等. 清湿化痰法对子宫腺肌病小鼠 Ras 基因和 COX2-PGE2-P450arom 正反馈环调控机制变化的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(9): 2094-2096.
- [17] Park J Y, Pillinger M H, Abramson S B. Abramson prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases [J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(3): 229-240.
- [18] 吴红彦, 王虎平. 以肝脾论治老年性痴呆及逍遥散对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经元活性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(5): 190-192.
- [19] 吴红彦, 王虎平, 王彩霞. 黑逍遥散对老年性痴呆的防治作用及其机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 912-913.
- [20] 李海龙, 王虎平, 刘建鸿, 等. 黑逍遥散对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(21): 186-189.
- [21] 马春林, 吴红彦, 兰美华, 等. 黑逍遥散干预 APP/PSI 双转基因小鼠海马区 $\text{A}\beta$ 降解相关基因和蛋白表达效应的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 115-118.

清热化痰方调控 Th17 对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

林文勇^{1,2}, 施雪斐¹, 张春伶¹, 王栋元^{1,2}, 牛振超^{1,2}, 芦瑞霞^{1,2}, 王丹^{1,2}, 阮小芬^{1,2}, 王肖龙^{1,2*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院心血管病研究所, 上海 201203)

摘要: 目的 探索清热化痰方通过调控 T 辅助细胞 17 (Th17) 对小鼠心肌缺血再灌注损伤 (I/R) 的影响。方法 45 只小鼠随机分为假手术组、模型组和清热化痰方低、中、高剂量组 (13、26、52 g/kg), 各组小鼠灌胃给予不同剂量清热化痰方或蒸馏水 7 d, 通过左冠状动脉结扎 30 min 再灌注 24 h 建立心肌缺血再灌注损伤模型。术后 24 h 采用心脏超声检测心功能, HE 染色观察心脏组织病理改变, TTC 染色观察心肌梗死面积, 试剂盒检测血清乳酸脱氢酶 (LDH)、白介素 17 (IL-17) 和白介素 6 (IL-6) 水平, Western blot 和 RT-qPCR 法检测心脏组织中 ROR γ t mRNA 和蛋白表达, 流式细胞术检测外周血中 Th17、Treg 和 Th17/Treg 细胞比例。结果 与模型组比较, 清热化痰方组小鼠心功能提高, 梗死面积减少, Th17 细胞比例降低, 促炎因子 IL-17 和 IL-6 水平降低, Th17/Treg 动态平衡得到恢复 ($P < 0.05$)。结论 清热化痰方可通过调节 Th17 恢复 Th17/Treg 稳态, 从而减轻心肌缺血再灌注损伤。

关键词: 清热化痰方; 心肌缺血再灌注损伤; Th17 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)02-0595-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.040

急性心肌梗死仍然是世界范围内发病和死亡的主要原因^[1-2], 早期再灌注是目前拯救心肌梗死患者危险心肌的最有效策略。然而, 早期心肌再灌注却矛盾地诱发了心肌缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 的损伤^[3]。I/R 的病理过程包括产生过多的自由基、线粒体肿胀并激活促凋亡的级联反应和自噬功能障碍^[4]。一系列的病理改变最终导致了心肌细胞凋亡的增加和梗死面积的扩大, 加重心肌梗死患者的临床症状和不良预后^[5]。因此, 确定新的干预目标和辅助治疗策略以限制 I/R 损伤是非常必要的。

清热化痰方是曙光医院心内科王肖龙教授根据临床经验总结, 发现急性心肌梗死患者以舌质红者居多, 伴随炎症因子水平增高, 因此提出急性心肌梗死应“热痰同治”, 在《金匱要略》“三黄汤”的基础上加味组成“清热化痰方”。前期临床研究结果表明, 清热化痰方可以调控免疫微环境, 对心肌梗死后心脏损伤起保护作用, T 辅助细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 可能是其抗心肌 I/R 损伤的潜在靶点^[6-8], 但其作用机制尚不明确。因此, 本实验拟采用小鼠冠状动脉结扎松解法建立心肌缺血再灌注损伤模型,

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573647, 82074222); 上海市中医临床重点实验室 (14DZ2273200); 上海市科委引导类项目 (19401934300); 上海市卫健委中医药事业发展三年行动计划 (ZY [2018-2020] -CCCX-2003-07); 上海市临床重点专科项目 (shslczdzk05301); 上海中医药大学附属曙光医院四明青年基金 (SGKJ-202005)

作者简介: 林文勇 (1990—), 男, 博士生, 研究方向为中西医结合防治心血管病。Tel: 13761065579, E-mail: 345507472@qq.com

* 通信作者: 王肖龙 (1965—), 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管病。E-mail: wxlqy0214@163.com