

creased serum TNF- α and IL-6 ($P < 0.01$), up-regulated protein and gene expression levels in the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway of ileocecal junction ($P < 0.01$), and obvious inflammatory swelling of intestinal villi. Compared with the model group, Dahuang Mudan Decoction at each dose significantly enhanced the propulsive intestinal motility, lowered the contents of serum TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$), improved the inflammatory infiltration of intestinal villi to varying degrees in a dose-dependent manner. Dahuang Mudan Decoction at 2.5 g/kg down-regulated the protein and gene expression levels in the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway of ileocecal junction ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** Dahuang Mudan Decoction alleviates the intestinal mucosal injury in rats after operation and reduces the contents of inflammatory factors, which may be related to its inhibition of protein and gene expression levels of the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway.

Key words Dahuang Mudan Decoction, early postoperative inflammatory intestinal obstruction, Toll-like receptor-4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor κ B (TLR4/MyD88/NF- κ B) pathway

黄连解毒汤对阿尔茨海默病大鼠海马 NLRP3 炎症通路的影响*

董秤均, 曹鑫馨, 屈艳秦, 梁雨晴, 杨燕, 伍文彬**

(成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

摘要 目的: 探讨黄连解毒汤对阿尔茨海默病(AD)大鼠学习记忆能力和海马区 NLRP3 炎症通路中 NOD 样受体热蛋白结构域 3(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。方法: 健康雄性 SD 大鼠 70 只, 通过 Morris 水迷宫筛选出合格大鼠 60 只, 随机抽取 10 只作为假手术对照组, 其余 50 只采用双侧海马注射 β -淀粉样蛋白 1-42($A\beta_{1-42}$) 1 μ g/ μ L 建立 AD 模型大鼠, 随机分为 AD 模型组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg 组、黄连解毒汤 6、3、1.5 g/kg 组, 每组 10 只, 假手术对照组注射等体积用于配置 $A\beta_{1-42}$ 的溶剂, 造模后连续灌胃 4 w, 1 次/d, 灌胃结束后 Morris 水迷宫法检测大鼠学习记忆能力; 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马病理改变; 酶联免疫吸附法(Elisa)检测大鼠血清 IL-1 β 水平、蛋白免疫印迹法(Western Blot)、实时荧光定量 PCR 反应(Real-time PCR)检测大鼠海马组织中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 的表达水平; 免疫组化法(IHC)检测大鼠海马组织中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IBA-1 蛋白表达。结果: 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠逃避潜伏期显著升高($P < 0.05$), 穿越平台次数、有效区域停留时间和运动距离显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HE 染色观察到模型对照组大鼠海马区神经细胞变性坏死, 排列紊乱, 数量减少; 血清 IL-1 β 水平显著升高($P < 0.01$); 海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IHC 检测 NLRP3、Caspase-1 和 IBA-1 蛋白表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 黄连解毒汤 3、6 g/kg 组可降低模型大鼠逃避潜伏期, 增加模型大鼠穿越平台次数、有效区域停留时间和运动距离($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 降低血清 IL-1 β 水平($P < 0.05$); 下调大鼠海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 保护神经元。结论: 黄连解毒汤能改善 AD 大鼠学习记忆能力, 保护神经元, 抑制 AD 大鼠神经炎反应, 其机制可能与下调 NLRP3 炎症通路中 NLRP3 及下游 Caspase-1、IL-1 β 的表达有关。

关键词 黄连解毒汤; 阿尔茨海默病; NOD 样受体热蛋白结构域 3; 天冬氨酸蛋白酶-1; 白细胞介素-1 β

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2021.06.003

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性进行性神经变性疾病, 其典型病理变化为胞外 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积, 胞内神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT), 神经元丢失及胶质细胞增生等^[1]。目前, AD 患者数量逐年增加, 但仍没有药物能够从根本上逆转 AD 的病程进展, 开发 AD 的有效治疗药物已成为当务之急。

近年来, 随着针对 A β 沉积的临床研究相继失败, AD 的神经炎症机制逐渐成为新的研究热点。有研究发现, 其损伤机制主要与脑小胶质细胞(microglia, MG)内神经炎通路 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 有关, NLRP3 炎症小体可被多种内源性和外源性危险信号激活后释放细胞因子形成循环炎症级联损伤, 而细胞因子 IL-1 β 则是通路循环激活的重要因素。20 世纪 90 年代, 王永炎院士提出“毒损脑络”理论是 AD 病理演变的根本^[7], 为

中医治疗 AD 提供了新的思路。黄连解毒汤是清热解暑的中医经典名方, 具有抗炎、抑制免疫反应、抗氧化及调节肠道菌群等作用。本课题组在前期研究中发现, 黄连解毒汤能降低 A β 诱导的 MG 培养上清液和 AD 大鼠脑组织中促炎因子 IL-1 β 的表达, 减少神经元损伤, 改善 AD 大鼠学习记忆能力等, 但具体作用机制不明。本研究通过观察黄连解毒汤对 AD 大鼠 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症通路的影响, 探讨其防治 AD 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验药物 黄连解毒汤(黄连 225 g、黄芩 150 g、黄柏 150 g、栀子 225 g)购于成都中医药大学附属医院中药房, 所购

* 基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(编号: 2018JY0060); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才提升计划(编号: QNXZ2018004)。

** 通信作者: 伍文彬, 博士, 博士后, 博士生导师, 教授, 研究方向为阿尔茨海默病的中医药防治, E-mail: wwb1201@vip.sina.com; 作者简介: 董秤均, 在读硕士研究生, 专业方向: 中医药防治呼吸与老年病, E-mail: 15908843514@163.com。

中药材由成都中医药大学药学院马云桐教授鉴定为正品。原方加 10、8、8 倍量水,浸泡 30 min,按照 100 °C 提取时间依次为 2、1.5、1.5 h,80 °C 浓缩为 0.6 g/mL 放入 4 °C 冰箱备用,临用前以无菌水稀释为相应浓度。石杉碱甲片,商品名:哈伯因(河南太龙药业股份有限公司,批号:190503,规格:0.05 mg/片)临用前研成粉末用无菌水配置为混悬液使用。

1.2 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 70 只,雄性,体重 180 g~220 g,成都达硕实验动物有限责任公司提供,动物生产合格证号:SCXK(川)2020-030。动物使用许可证号:SYXK(川)2017-179。动物饲养于成都中医药大学脏腑病证动物房,室内恒温恒湿,12 h 光照,12 h 避光循环饲养,给予标准饲料和饮用水。本研究所有动物获成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理批准号:2018-16。

1.3 试剂 β_{1-42} [吉尔生化(上海)有限公司,批号:052487],实验前用 DMSO、PBS 为溶剂,在 37 °C 温箱孵化 72 h 的 β_{1-42} 为溶质,配制成质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液置于 -20 °C 冰箱备用;苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:ZH193907);伊红染液(珠海贝索生物技术有限公司,批号:C200403);RNA Trizol Reagent(合肥博美生物科技有限公司,批号:vs18061730);Caspase-1 抗体(Abcam 公司,批号:ab1872);IL-1 β 抗体(Abcam 公司,批号:ab205924);NLRP3 抗体(Thermo Fisher 公司,批号:PA5-79740);IBA-1 小鼠克隆抗体(Servicebio 公司,批号:GB12105);生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(Abcam 公司,批号:ab6721);浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号:K135925C);Rat IL-1 β ELISA KIT(上海茁彩生物科技有限公司,批号:ZC-36391)。

1.4 仪器 大鼠脑立体定位仪(成都泰盟科技有限公司);PIKORed 96 实时荧光定量仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司);5200 化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);MK3 多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司);徕卡-2016 转轮式切片仪(德国徕卡微系统有限公司);TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机、BMJ-III 型包埋机(常州郊区中威电子仪器有限公司);BA400Digital 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司);Pannoramic 250 数字切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司)。

1.5 方法 雄性 SD 大鼠 70 只,通过 Morris 水迷宫筛选出合格 SD 大鼠 60 只。先随机抽取 10 只作为假手术对照组,其余 50 只造模成功后,随机分为模型对照组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg 组(相当于临床人日用量的 6 倍)、黄连解毒汤 6、3、1.5 g/kg 组(相当于临床成人日用量的 12、6、3 倍)组,每组 10 只。假手术对照组与模型对照组大鼠每日予无菌水灌胃。各组灌胃体积均为 10 mL/kg,连续灌胃 4 w。

根据参考文献方法,各组动物均 1%戊巴比妥钠腹腔注射 45 mg/kg 麻醉,剔除头部毛发,待充分麻醉后将大鼠头部固于在脑立体定位仪上,消毒头皮,在头部正中中线纵向作一 1.5 cm 切口,暴露前囟,参考文献^[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,左右旁开 2 mm,用大鼠颅骨钻钻开颅骨,借助脑立体定位仪用微量注射器垂直向脑内进针 2.8 mm 达海马区,两侧分别以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度缓慢注入 β_{1-42} 5 μL ,留针 5 min 使其充分浸润,随后缓慢撤针,缝合切口消毒局部。假手术对照组注射等体积 DMSO、PBS 溶剂。

1.5.1 Morris 水迷宫测试 灌胃结束后进行 Morris 水迷宫试验,连续 5 d,前 3 d 为训练期,第 4 d 为定位航行试验,第 5 d 为空间探索试验。训练方法:在水迷宫均分的四个象限中依次将大鼠头面向水迷宫壁放入水中,并引导未在 120 s 内找到平台的大鼠爬上平台,强化记忆。定位航行试验:记录大鼠从投入水至找到并爬上平台所需时间。若 120 s 未找到平台,则记录潜伏期为 120 s。空间探索试验:移走水迷宫内平台,记录大鼠在 120 s 内穿越平台次数、有效区停留时间、有效区运动距离。

1.5.2 样本的采集与处理 在末次水迷宫试验后,大鼠用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,每组随机挑选 6 只腹主动脉取血后冰上迅速取脑并分离双侧海马组织,经预冷的生理盐水冲洗后置于冻存管中,存放于 -80 °C 冰箱;剩下的 4 只,心脏取血后再用生理盐水和预冷的 4%多聚甲醛灌注心脏,灌注至肝肺颜色转白,取脑组织固定于 4%多聚甲醛中;所取血液样本静置后离心,取血清存放于 -80 °C 冰箱。

1.5.3 HE 染色观察大鼠海马组织病理改变 取 4%多聚甲醛固定的大鼠脑组织,乙醇脱水、修剪、包埋、5 μm 切片、HE 染色封片后,于光镜下观察大鼠海马组织病理学改变。

1.5.4 Elisa 法检测血清 IL-1 β 水平 取大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒提供的步骤说明,检测标本 IL-1 β 含量,最后用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。

1.5.5 Real-time PCR 检测 *Nlrp3*、*Caspase-1*、*Il1 β* mRNA 表达 取 -80 °C 冰箱冻存脑组织,用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,测定 RNA 浓度,使用大容量 cDNA 反向转录试剂盒进行逆转录。设计并合成引物,配制 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 充分延伸 30 s,共循环 45 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表达 mRNA 相对表达水平。引物设计与合成交由上海生工生物工程技术有限公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/(bp)
<i>Nlrp3</i>	上游 GCAGCGATCAACAGCGGAGAC	135
	下游 TCCCAGCAAACCTATCCACTCCTC	
<i>Caspase1</i>	上游 TGGAGCTTCAGTCAGTCCATCAG	133
	下游 GAACCACTCGGTCCAGAAATGC	
<i>Il1β</i>	上游 CTTGACTTGGGCTGTCCAGATGAG	81
	下游 CACTGCCTTCTGAAGCTCTTGTGTC	
<i>Actb</i>	上游 GAAGATCAAGATCATTGCTCC	111
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCA	

1.5.6 Western Blot 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达 取 -80 °C 冰箱冻存脑组织,用灭菌剪刀将组织剪碎,加入 RIPA 裂解液,置碎冰上裂解 10 min 后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,检测蛋白浓度。各组取 50 μL 上清液,加入 5 倍上样缓冲液,混匀后于热循环仪 95 °C 变性 15 min。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭 2 h,分别加入一抗和二抗孵育后,加入 ECL 化学发光剂,采用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描,结果以目的蛋白积分光密度值(IOD)/内参积分光密度值(IOD)确定其相对含量。

1.5.7 IHC 检测 NLRP3、Caspase1、IL-1 β 、IBA-1 蛋白表达 取

4%多聚甲醛固定的大鼠脑组织,脱水,包埋,切片。按照免疫组化试剂盒说明,采用SP脱蜡、阻断内源性过氧化物酶,再滴加一抗和二抗,滴加一抗(Caspase1,1:100;IL-1 β ,1:100;NL-RP3,1:200;IBA-1,1:100)4℃孵育过夜,滴加生物素化二抗,37℃孵育30min,以上各步骤均用PBS漂洗3次。DAB显色,苏木素轻度复染,乙醇脱水,透明,中性树胶封片。显微镜镜检,每张切片先于100倍下观察全部组织,再选取3个视野分别采集400倍显微图像,以细胞呈蓝色,底物呈白色为阴性表达,以细胞呈黄色或棕黄色为阳性表达,阳性产物均主要分布在细胞质及细胞间质。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测定并分析每张切片3个视野下阳性染色部分的平均积分光密度IOD。

1.5.8 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件进行统计分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多样本均数间比较采用One-Way ANOVA检验,方差齐则采用LSD检验,方差不齐则采用Tamhane's T2检验,检验结果以 $P<0.05$ $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连解毒汤对AD大鼠模型Morris水迷宫定位航行试验逃避潜伏期和空间探索试验的影响 第4d正式试验,与假手术对照组比较,模型对照组大鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$);与模型对照组比较,黄连解毒汤3g/kg组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg组大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组大鼠穿越平台次数、有效区域停留时间及运动距离均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型对照组比较,黄连解毒汤3、6g/kg组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg组穿越平台次数、有效区域停留时间明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);黄连解毒汤3g/kg组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg组有效区域运动距离明显延长($P<0.05$)。见表2、3。

2.2 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织病理学的影响 对照组大鼠海马锥体细胞层排列整齐,结构正常;模型对照组大鼠海马CA1区锥体细胞变性坏死,见胞核固缩深染,胞质溶解,

表2 黄连解毒汤对AD大鼠模型逃避潜伏期的影响^[15]
($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量/ (g/kg)	逃避潜伏期/s			
		第1d	第2d	第3d	第4d
假手术对照		41 \pm 28	39 \pm 26	27 \pm 24*	19 \pm 14*
模型对照		31 \pm 32	31 \pm 18	47 \pm 15	43 \pm 28
石杉碱甲	2×10^{-5}	42 \pm 31	45 \pm 23	28 \pm 11*	23 \pm 10**
黄连解毒汤	1.5	39 \pm 14	32 \pm 18	38 \pm 27	32 \pm 13
黄连解毒汤	3	32 \pm 25	44 \pm 15	31 \pm 16	26 \pm 14*
黄连解毒汤	6	50 \pm 25	37 \pm 14	35 \pm 16	30 \pm 11

与模型对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (下同)。

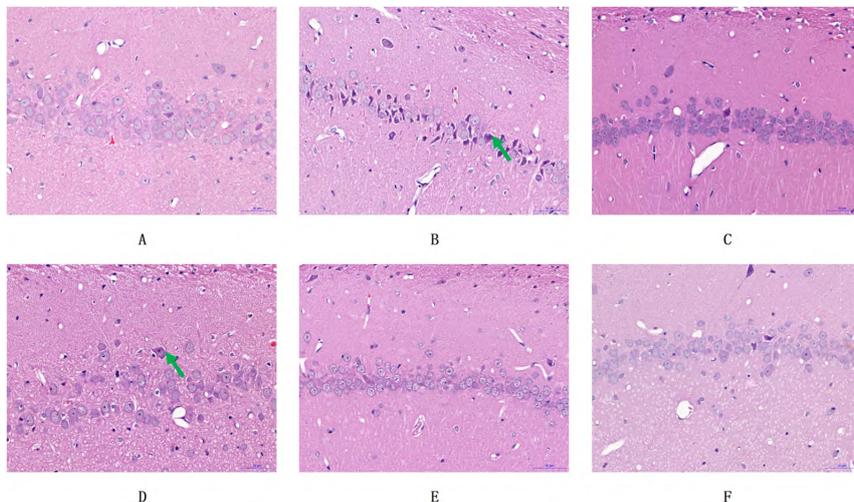
表3 黄连解毒汤对AD大鼠模型空间探索试验的影响
($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	剂量/ (g/kg)	穿越平台次数	有效区域停留时间	运动距离
		/次	/s	/(mm)
假手术对照		10.8 \pm 4.1**	11.8 \pm 5.2*	2159 \pm 884*
模型对照		3.8 \pm 1.9	3.9 \pm 1.9	961 \pm 394
石杉碱甲	2×10^{-5}	8.6 \pm 3.2*	9.2 \pm 3.7*	2036 \pm 820*
黄连解毒汤	1.5	4.8 \pm 1.6	5.7 \pm 1.8	1153 \pm 287
黄连解毒汤	3	7.9 \pm 2.7*	8.8 \pm 2.5**	1868 \pm 565*
黄连解毒汤	6	7.8 \pm 3.1*	9.0 \pm 2.4**	1620 \pm 923

排列紊乱,数量减少,细胞之间距离显著增宽,淡染的胶质细胞增生;石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg组、黄连解毒汤6g/kg组大鼠海马CA1区细胞层排列较为整齐,神经元形态正常。黄连解毒汤1.5、3g/kg组大鼠海马CA1区细胞层排列稀疏,见少量锥体细胞变性坏死。见表4、图1。

表4 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织病理损害程度分布的影响($n=3$)

组别	剂量/ (g/kg)	病理损害程度分布/只				
		没有病变 (-)	轻微 (+)	轻度 (++)	中度 (+++)	重度 (++++)
假手术对照		3	0	0	0	0
模型对照		0	1	1	0	1
石杉碱甲	2×10^{-5}	3	0	0	0	0
黄连解毒汤	1.5	1	2	0	0	0
黄连解毒汤	3	2	1	0	0	0
黄连解毒汤	6	2	1	0	0	0



A: 假手术对照; B: 模型对照; C: 石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg; D: 黄连解毒汤1.5g/kg; E: 黄连解毒汤3g/kg; F: 黄连解毒汤6g/kg。
B: CA1区锥体细胞坏死(↑); D: CA1区锥体细胞坏死(↑)。

图1 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织病理学的影响(HE, $\times 400$)

2.3 黄连解毒汤对 AD 大鼠模型血清 IL-1 β 含量的影响 与假手术对照组比较,模型对照组血清 IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,黄连解毒汤 6 g/kg 组和石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg 组血清 IL-1 β 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 黄连解毒汤对 AD 大鼠模型血清白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	剂量/(g/kg)	IL-1 β /(pg/mL)
假手术对照		2.5 \pm 0.7 **
模型对照		3.7 \pm 0.6
石杉碱甲	2×10^{-5}	3.1 \pm 0.4 *
黄连解毒汤	1.5	3.3 \pm 0.8
黄连解毒汤	3	3.1 \pm 0.8
黄连解毒汤	6	2.9 \pm 0.8*

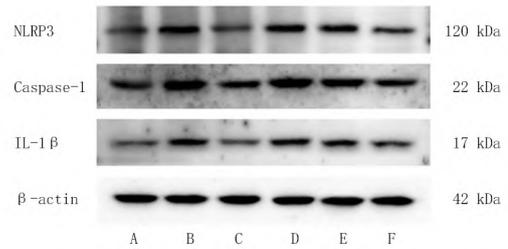
2.4 黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 *Nlrp3*、*Caspase1*、*Il1 β* mRNA 表达的影响 与假手术对照组比较,模型对照组 *Nlrp3*、*Caspase1*、*Il1 β* mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型对照组比较,黄连解毒汤 3、6 g/kg 组和石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg 组 *Nlrp3*、*Caspase1* 和 *Il1 β* mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 6。

表 6 黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (*Nlrp3*)、天冬氨酸蛋白酶-1 (*Caspase1*) 和白细胞介素-1 β (*Il1 β*) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

组别	剂量/(g/kg)	<i>Nlrp3</i> mRNA/	<i>Caspase1</i> mRNA/	<i>Il1β</i> mRNA/
		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
假手术对照		1.1 \pm 0.5 *	1.2 \pm 0.9*	1.07 \pm 0.42 **
模型对照		2.6 \pm 0.7	2.6 \pm 0.5	2.32 \pm 0.58
石杉碱甲	2×10^{-5}	0.9 \pm 0.4 **	0.8 \pm 0.5 **	1.22 \pm 0.41 *
黄连解毒汤	1.5	2.1 \pm 0.8	2.2 \pm 0.9	1.88 \pm 0.60
黄连解毒汤	3	1.1 \pm 0.7 **	1.3 \pm 0.4 *	1.39 \pm 0.24*
黄连解毒汤	6	1.4 \pm 0.6 *	1.2 \pm 0.4 *	1.23 \pm 0.20*

2.5 Western Blot 法检测黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达的影响 与假手术对照组比较,模型对照组 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较,黄连解毒汤 6 g/kg 组和石杉碱甲

$\times 10^{-5}$ g/kg 组 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 2、表 7。



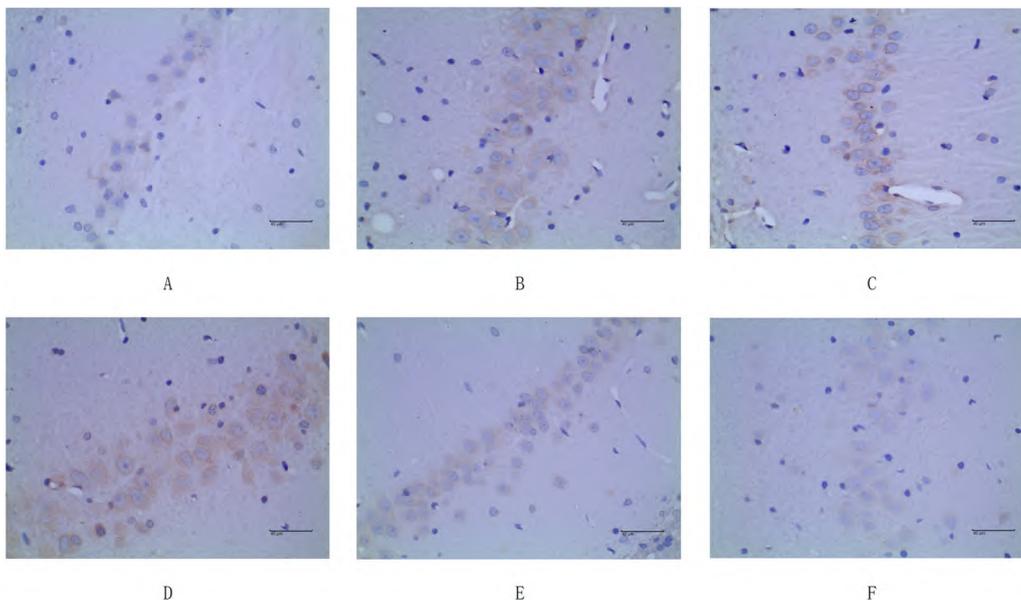
A: 假手术对照; B: 模型对照; C: 石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg; D: 黄连解毒汤 1.5 g/kg; E: 黄连解毒汤 3 g/kg; F: 黄连解毒汤 6 g/kg。

图 2 Western Blot 法检测黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达的影响

表 7 Western Blot 法检测黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3)、天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$, 归一法)

组别	剂量/(g/kg)	NLRP3/	Caspase-1/	IL-1 β /
		β -actin	β -actin	β -actin
假手术对照		1.00 \pm 0 **	1.00 \pm 0 **	1.00 \pm 0 **
模型对照		2.07 \pm 0.19	2.55 \pm 0.25	2.33 \pm 0.22
石杉碱甲	2×10^{-5}	1.11 \pm 0.32 **	1.43 \pm 0.25 **	1.37 \pm 0.60 *
黄连解毒汤	1.5	2.08 \pm 0.38	2.65 \pm 0.24	2.33 \pm 0.50
黄连解毒汤	3	1.68 \pm 0.19	2.33 \pm 0.38	1.86 \pm 0.47
黄连解毒汤	6	0.98 \pm 0.04 **	1.56 \pm 0.34 **	1.37 \pm 0.38*

2.6 IHC 法检测黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IBA-1 蛋白表达的影响 与假手术对照组比较,模型对照组 NLRP3、Caspase-1、IBA-1 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,黄连解毒汤 6 g/kg 组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 黄连解毒汤 3 g/kg 组、石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg 组 Caspase-1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 3~6、表 8。



A: 假手术对照; B: 模型对照; C: 石杉碱甲 2×10^{-5} g/kg; D: 黄连解毒汤 1.5 g/kg; E: 黄连解毒汤 3 g/kg; F: 黄连解毒汤 6 g/kg(下同)。

图 3 黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马组织 NLRP3 表达的影响(免疫组化 $\times 400$)

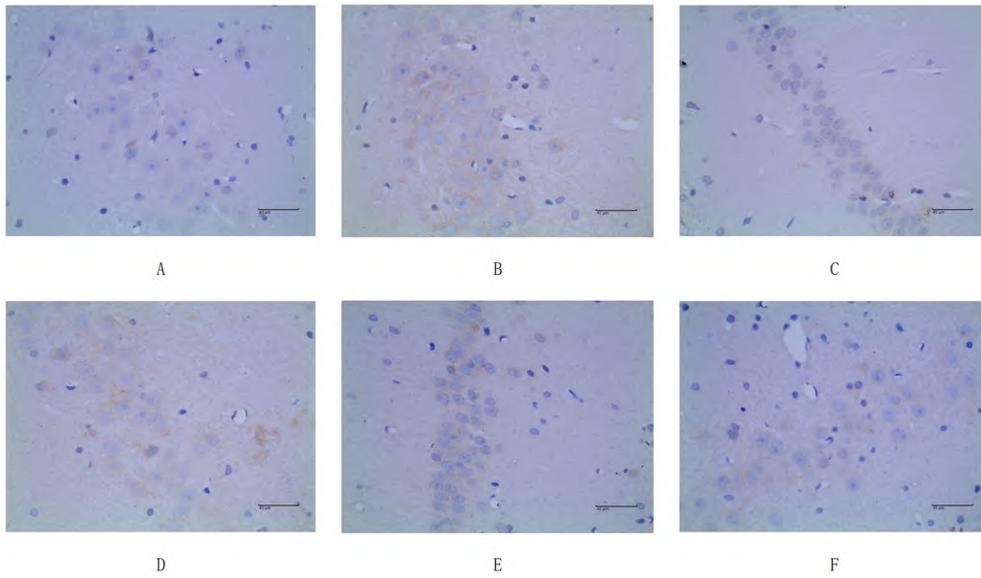


图4 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织Caspase-1表达的影响(免疫组化×400)

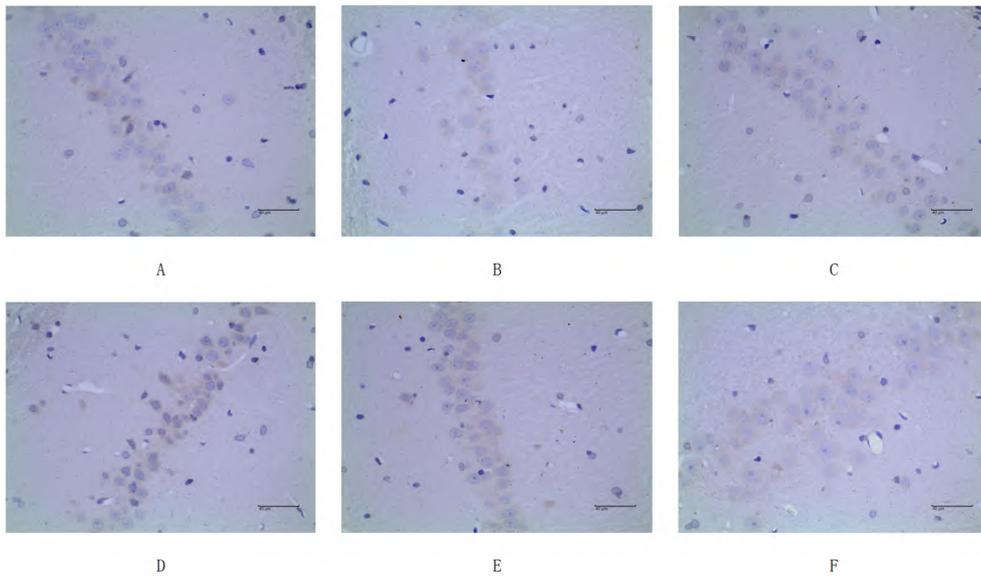


图5 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织IL-1β表达的影响(免疫组化×400)

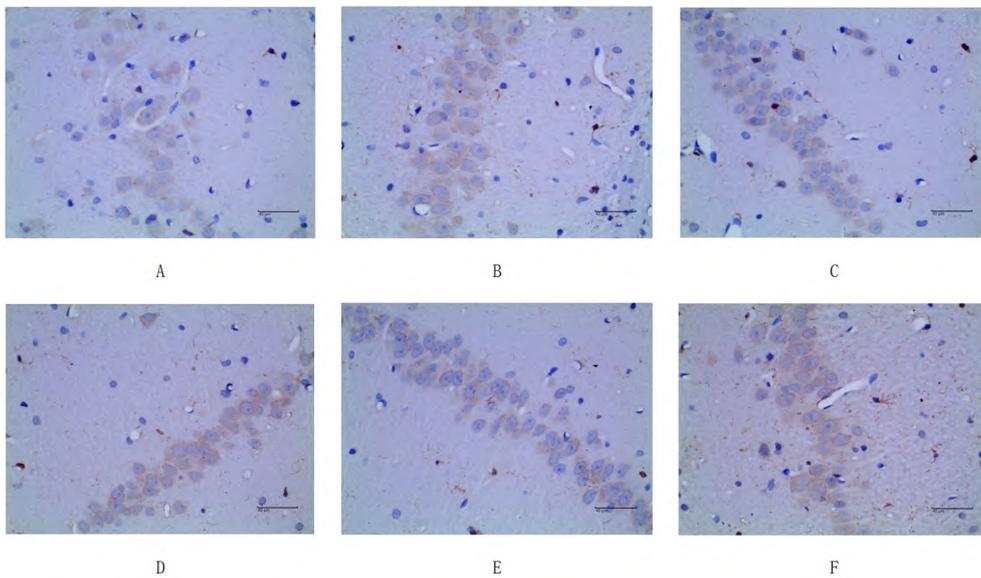


图6 黄连解毒汤对AD大鼠模型海马组织IBA-1表达的影响(免疫组化×400)

表 8 IHC 法检测黄连解毒汤对 AD 大鼠模型海马 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3)、天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和离子钙接头蛋白抗原-1 (IBA-1) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	剂量/ (g/kg)	$D_{NLRP3}/$ OD	$D_{Caspase-1}/$ OD	$D_{IL-1\beta}/$ OD	$D_{IBA-1}/$ OD
假手术对照	-	0.193 \pm 0.013 *	0.187 \pm 0.010 **	0.180 \pm 0.008	0.2215 \pm 0.0088 *
模型对照	-	0.220 \pm 0.008	0.224 \pm 0.010	0.194 \pm 0.009	0.2344 \pm 0.0010
石杉碱甲	2 \times 10 ⁻⁵	0.203 \pm 0.010	0.190 \pm 0.010 **	0.192 \pm 0.004	0.2297 \pm 0.0045
黄连解毒汤	1.5	0.228 \pm 0.016	0.203 \pm 0.015	0.204 \pm 0.017	0.2420 \pm 0.0041
黄连解毒汤	3	0.215 \pm 0.010	0.198 \pm 0.019 *	0.198 \pm 0.020	0.2296 \pm 0.0081
黄连解毒汤	6	0.198 \pm 0.010 *	0.193 \pm 0.012 *	0.180 \pm 0.003	0.2320 \pm 0.0067

3 讨论

AD 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病。临床上以认知功能障碍、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征。病理上以 A β 沉积和 Tau 蛋白缠结为主要特征。本研究通过大鼠海马注射 A β_{1-42} 建立 AD 大鼠模型, A β 是一种不溶性多肽, 在脑组织沉积后具有很强的神经毒性作用^[16]。造模后, 以 Morris 水迷宫测试观察其学习记忆能力。与假手术对照组比较, 模型对照组大鼠逃避潜伏期显著升高, 穿越平台次数、有效区域停留时间及运动距离显著降低, 即认知功能损伤表现。同时, 相较于假手术对照组, HE 染色可见模型对照组大鼠海马区 CA1 区锥体细胞变性坏死, 胞核固缩深染, 胞质溶解, 排列紊乱, 数量减少, 细胞之间距离显著增宽, 说明 A β_{1-42} 通过神经毒性作用损伤神经元导致的认知功能障碍, 同时具有 AD 病理学改变和行为学改变的动物模型成立。

AD 发病机制尚不完全清楚, 炎症反应机制假说是 AD 发病机制中重要的假说之一。现诸多研究证据表明, 炎症反应可能不是 A β 沉积触发的被动反应, 而是与 A β 沉积同样重要的致病因素^[17]。在 AD 中, A β 沉积通过激活 MG 内 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症通路引发脑内循环炎症级联反应。MG 是神经胶质细胞的一种, 相当于脑和脊髓中的巨噬细胞, 介导中枢神经系统 (Central Nervous System, CNS) 免疫反应。正常情况下, 其可以通过吞噬作用清除人正常代谢产生的一定量 A β 以维持脑内动态平衡; 当 A β 沉积超过其清除能力时, 在清除过程中被 A β 沉积激活的胞内 NLRP3 炎症通路中 IL-1 β 便会募集激活更多 MG 群来参与清理, 但与此同时, 过量的 MG 激活也会导致细胞因子过度释放形成炎症损伤^[18]。

在固有免疫系统中, 组织器官中的巨噬细胞可以通过模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别和吞噬病原体, 促进自我防御和炎症反应发生^[19]。NLRP3 炎症小体是免疫细胞内普遍存在的 PRRs, 能够被多种内源性和外源性危险信号所激活。在 AD 中, MG 内 NLRP3 被激活后释放细胞因子 Caspase-1 介导神经细胞的焦亡, 而被 Caspase-1 水解活化的 IL-1 β 则能持续激活 NLRP3 炎症小体, 从而促使更多 Caspase-1、IL-1 β 表达^[20] 并通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 途径促进 β -淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, β -APP) 的合成、分泌裂解及诱导脑内星形胶质细胞 (Astroglia, As) 活化增生, 进一步促进 A β 的产生和沉积。此外, IL-1 β 还能增加 Tau 蛋白表达, 促进 Tau 蛋白磷酸化导致神经元末端树突、轴突发生营养不良性萎缩、增强神经元乙酰胆碱酯酶 (Acetyl cholinester-

ase, AChE) 活性导致中枢胆碱能神经系统紊乱。最终使得 AD 炎症损伤形成一个互为因果并不断放大的“细胞因子循环”。在本试验中, 海马注射 A β_{1-42} 复制的 AD 大鼠模型 HE 染色海马组织神经元明显损伤, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达及血清 IL-1 β 水平显著升高, 进一步说明 NLRP3 炎症通路参与了 AD 炎症反应。

本研究结果显示, 与模型对照组比较, 黄连解毒汤 3、6 g/kg 组能降低模型大鼠逃避潜伏期, 增加其穿越平台次数、有效区域停留时间及运动距离; 能降低血清 IL-1 β 水平, 能下调模型大鼠海马 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达, 减少神经元损伤。由此我们推测, 黄连解毒汤改善 AD 大鼠学习记忆能力, 保护神经元, 其机制可能与作用于 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症通路, 下调 NLRP3 炎症通路中 NLRP3 及下游 Caspase-1、IL-1 β 的表达, 减少炎症细胞因子对 AD 的循环级联损伤有关。但在 IHC 结果中 IL-1 β 蛋白下降趋势不明显, 其原因可能与样本数量过少及检测方法侧重性有关。此外, 我们还发现 AD 模型大鼠海马区及血清中 IL-1 β 水平同时升高, 提示 IL-1 β 可能有“中枢-外周”内外迁移致病能力, 但此机制仍需进一步研究。

后续我们将在通路中增加阻断剂进行深入研究, 确定通路中的关键靶点蛋白, 同时增加动物样本量进一步观察黄连解毒汤对 AD 模型大鼠“中枢-外周”炎症因子的作用, 为黄连解毒汤用于 AD 治疗提供更多的实验证据。

参考文献

- [1] Jeong S. Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease [J]. Mol Cells 2017 40(9): 613-620.
- [2] Huang L K, Chao S P, Hu C J. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease [J]. J Biomed Sci 2020 27(1): 18.
- [3] 时建铨, 徐俊. NLRP3 炎症小体: 阿尔茨海默病炎症反应核心机制及潜在靶点 [J]. 中国现代神经疾病杂志 2020 20(1): 29-33.
- [4] Zhang X, Wang R, Hu D et al. Oligodendroglial glycolytic stress triggers inflammasome activation and neuropathology in Alzheimer's disease [J]. Sci Adv 2020 6(49): eabbb8680
- [5] 雷洪涛, 王筠, 马淑骅, 等. IL-1 β 、TNF- α 与阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国老年学杂志 2014 34(24): 7115-7117.
- [6] 邢恩鸿, 田建丽, 王爱霞, 等. 肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 在淀粉样蛋白致阿尔茨海默病大鼠神经元损伤中的作用 [J]. 中国老年学杂志 2014 34(20): 5802-5804.
- [7] 王永炎. 再度思考提高治疗脑血管病疗效的难点 [J]. 中国中西医结合杂志 2017 37(10): 1164-1166.
- [8] 顾欣如, 王宏洁, 杨健, 等. 黄连解毒汤治疗阿尔茨海默病作用机制研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报 2018 42(10): 829-835.
- [9] 伍文彬, 谢淑玲, 李斌, 等. 黄连解毒汤对 2 型糖尿病大鼠脑内 GLUT3 及 tau 蛋白 O-GlcNAc 糖基化的影响 [J]. 中华中医药杂志 2017, 32(6): 2706-2709.
- [10] 何小静. 黄连解毒汤含药脑脊液对 A β_{1-42} 致 BV2 细胞炎症反应的机制研究 [D]. 成都中医药大学 2019.
- [11] 彭红梅. 黄连解毒汤含药脑脊液对 A β_{1-42} 致 BV2 细胞凋亡及炎症反应的机制研究 [D]. 成都中医药大学 2020.
- [12] 陈金鑫. 基于 α 7nAChR 探讨黄连解毒汤对 A β_{1-42} 诱导的小胶质细胞炎症反应的作用机制 [D]. 成都中医药大学 2020.
- [13] 曹鑫馨, 董秤均, 杨燕, 等. 黄连解毒汤对 A β_{1-42} 诱导 AD 大鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志 2021 27

(10) : 23-30.

[14]何玲玲,李晓琼,刘晓蕾,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(4):35-41.

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

[16]Guan Z. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutamatergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(7): 773-780.

[17]李慧源,姜源,孙晓红.阿尔茨海默病炎症反应机制的研究进展

[J]. 中国临床研究, 2016, 29(1): 130-132.

[18]Zhang C J, Jiang M, Zhou H, et al. TLR-stimulated IRAK1 activates caspase-8 inflammasome in microglia and promotes neuroinflammation [J]. J Clin Invest, 2018, 128(12): 5399-5412.

[19]Broz P, Monack D M. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections [J]. Immunological reviews, 2011, 243(1): 174-190.

[20]Mrak R E, Griffin W S. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2001, 22(6): 915-922.

Effect of Huanglian Jiedu Decoction on NLRP3 Inflammatory Pathway in Hippocampus of Rats with Alzheimer's Disease*

Dong Chengjun, Cao Lixin, Qu Yanqin, Liang Yuqing, Yang Yan, Wu Wenbin**

(Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072)

Objective: To investigate the effects of Huanglian Jiedu Decoction on learning and memory abilities of rats with Alzheimer's disease (AD) and the expression of nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3), cysteine-dependent aspartate-directed protease-1 (Caspase-1), and interleukin-1 β (IL-1 β) in the NLRP3 inflammatory pathway of rat hippocampus. **Methods:** Seventy healthy male SD rats were subjected to the Morris water maze test, from which 60 eligible ones were selected. Ten rats were randomly selected and classified into the sham operation group, and the remaining 50 were injected with 1 μ g/ μ L β -amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$) into bilateral hippocampi for inducing AD. They were then randomly divided into the AD model group, 2×10^{-5} g/kg huperzine A group, and 6, 3, and 1.5 g/kg Huanglian Jiedu Decoction groups, with 10 in each group. The ones in the sham operation group were injected with the same volume of $A\beta_{1-42}$ solvent. After modeling, the rats were gavaged with the corresponding drugs, once a day, for four weeks. Then the learning and memory abilities of rats were detected in the Morris water maze test, and the pathological changes in hippocampus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The serum level of IL-1 β was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa). The protein and mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β in rat hippocampal tissue were assayed by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blotting, respectively. The protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IBA-1 in rat hippocampal tissue were measured by immunohistochemistry (IHC). **Results:** Compared with the normal control group, the model group exhibited prolonged escape latency ($P < 0.05$), reduced number of platform crossings and time of stay in the effective area, and shortened distance of movement ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining showed that the nerve cells in the hippocampus were degenerated, necrotic, disorderly arranged, and decreased. The serum level of IL-1 β was significantly increased ($P < 0.01$). The protein and mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β in the hippocampus were significantly up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IBA-1 were proved elevated by IHC ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, Huanglian Jiedu Decoction at 3 and 6 g/kg shortened the escape latency of rats ($P < 0.05$), increased the number of platform crossings and stay time in effective area, extended the movement distance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), lowered the serum IL-1 β ($P < 0.05$), down-regulated the mRNA and protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β in hippocampus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and protected the neurons. **Conclusion:** Huanglian Jiedu Decoction improves the learning and memory abilities of AD rats, protects neurons, and inhibits neuritis, which may be related to the down-regulation of NLRP3 and downstream Caspase-1 and IL-1 β in NLRP3 inflammatory pathway.

Key words Huanglian Jiedu Decoction, Alzheimer's disease (AD), nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3), cysteine-dependent aspartate-directed protease-1 (Caspase-1), interleukin-1 β (IL-1 β)