

基于 IL-1 β 信号通路探讨当归芍药散对 SAMP8 小鼠学习记忆的影响



潘艳芳¹, 贾晓涛², 屈梦扬¹, 方 艳¹, 应小平¹

摘要:目的 探讨当归芍药散对快速老化小鼠学习记忆的影响及作用机制。方法 选取快速老化 SAMR1 小鼠 10 只、SAMP8 小鼠 30 只,采用随机数字表法对实验动物进行编号,按照机遇均等原则分为 SAMR1 组、SAMP8 组、DSS 15 g/kg 组和 DSS 60 g/kg 组,每组 10 只。SAMR1 组小鼠作为对照组,DSS 15 g/kg 组和 DSS 60 g/kg 组小鼠分别给予 15 g/kg、60 g/kg 剂量的当归芍药散灌胃,每日 1 次;SAMR1 组和 SAMP8 组小鼠给予相应体积的生理盐水(每 10 g 0.1 mL)灌胃,每日 1 次。连续灌胃 8 周后,进行 Y 迷宫实验和 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习和记忆能力。行为学实验结束后,取出各组大鼠海马组织,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测组织裂解物中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平。结果 小鼠 Morris 水迷宫行为学实验发现,在连续 5 d 寻找水下平台测试中,与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠寻找水下平台的日均潜伏期明显延长,穿越平台象限时间和距离占整个游泳时间或距离的百分比下降($P < 0.05$);而 DSS 60 g/kg 组小鼠寻找水下平台的日均潜伏期较 SAMP8 组明显缩短,穿越平台象限时间和距离占整个游泳时间或距离的百分比均上升($P < 0.05$)。与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠进臂正确率明显下降($P < 0.05$);与 SAMP8 组小鼠比较,DSS 60 g/kg 组小鼠进臂正确率明显增加($P < 0.05$)。与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达量明显升高($P < 0.05$);与 SAMP8 组小鼠比较,DSS 60 g/kg 组小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达量明显下降($P < 0.05$)。结论 当归芍药散可能通过抑制 SAMP8 小鼠海马组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达来缓解 SAMP8 小鼠认知功能障碍。

关键词:阿尔茨海默病;当归芍药散;快速老化小鼠;学习记忆;神经炎症因子

doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2022.11.009

Effects of Danggui Shaoyao San on SAMP8 Mice Learning and Memory Based on IL-1 β Signaling Pathway

PAN Yanfang, JIA Xiaotao, QU Mengyang, FANG Yan, YING Xiaoping

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

Corresponding Author: JIA Xiaotao (The Affiliated Xi'an Central Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710003, Shaanxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of Danggui Shaoyao San (DSS) on learning and memory of rapidly aging mice. **Methods** Rapidly-aging SAMR1 mice of 10 and SAMP8 mice of 30 were randomly divided into SAMR1 group, SAMP8 group, DSS15 g/kg group, and DSS60 g/kg group, with 10 mice in each group. SAMR1 mice were used as control group, mice in DSS15 g/kg group and DSS60 g/kg group were given 15 g/kg and 60 g/kg Danggui Shaoyao San gavage, respectively, once a day. Mice in SAMR1 group and SAMP8 group were given corresponding volume of normal saline (0.1 mL/10 g) by gavage, once a day. After 8 weeks of continuous intragastric administration, Y maze test and Morris water maze test were performed to detect the learning and memory ability of mice. After the behavioral experiment, the hippocampal tissue of each group was taken out, and the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in tissue lysates were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Morris water maze behavior experiment of mice showed that in the test of searching for underwater platform for 5 consecutive days, compared with SAMR1 group, the average latency of searching for underwater platform in SAMP8 group was significantly longer, and the percentage of time and distance across platform quadrant in the whole swimming time or distance was decreased ($P < 0.05$); compared with SAMP8 group, the average latency of DSS 60 g/kg group searching for underwater platform was significantly shorter, and the percentage of crossing platform quadrant time and distance in the whole swimming time or distance were increased ($P < 0.05$). Compared with SAMR1 group, the accuracy of arm entry in SAMP8 group were significantly decreased ($P < 0.05$), and compared with SAMR8 group, the accuracy of arm entry in DSS 60 g/kg group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with SAMR1 group, the expression levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in hippocampus of SAMP8 group were significantly increased ($P < 0.05$), and compared with SAMR8 group, the expression levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in DSS 60 g/kg group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Danggui Shaoyao San may alleviate the cognitive dysfunction of SAMP8 mice by inhibiting the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the hippocampus of SAMP8 mice.

Keywords: Alzheimer's disease; Danggui Shaoyao San; rapidly-aging mice; learning and memory; neuroinflammatory factors

基金项目 国家自然科学基金青年项目 (No.81703842); 陕西省重点研发计划项目 (No.2018SF-036, 2020SF-343)

作者单位 1. 陕西中医药大学 (陕西咸阳 712046); 2. 西安交通大学附属西安中心医院 (西安 710003)

通讯作者 贾晓涛, E-mail: 227xiaotao@163.com

引用信息 潘艳芳, 贾晓涛, 屈梦扬, 等. 基于 IL-1 β 信号通路探讨当归芍药散对 SAMP8 小鼠学习记忆的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(11): 1969-1973.

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄相关的中枢神经系统原发性退行性疾病,主要表现为进行性认知功能障碍、精神行为异常、生活能力下降,晚期出现严重痴呆^[1]。截至 2019 年,我国共有 1 000 多万例阿尔茨海默病患者,约占全球阿尔茨海默病总数的五分之一^[2-3],至今仍无法治愈,其发病机制也尚不明确。研究证实,脑内 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积是阿尔茨海默病形成过程的核心事件^[4]。 β 淀粉样蛋白可以引起氧化应激、轴突损伤和突触丢失等级联反应,最终导致神经元死亡^[5-6]。因此,减少 β 淀粉样蛋白过度产生和聚集是遏制阿尔茨海默病发生发展的关键步骤。研究显示,神经炎症的重要组分白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)能够通过加快 β 淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)的产生来促进 β 淀粉样蛋白的合成聚积^[7]。因此,减少炎性因子 IL-1 β 能够减少 β 淀粉样蛋白的沉积。2019 年加州大学的研究人员在 PNAS 期刊上发表的研究表明,一种名为 TOM1 的蛋白质能够将 IL-1 β 及其受体 IL-1R 带入胞内进行降解,减轻炎症反应^[8]。当归芍药散(DSS)是出自《金匱要略》治疗阿尔茨海默病疗效确切的经方,前期研究表明其具有抗衰老、抗炎症的作用^[9-10]。本研究探讨当归芍药散通过 IL-1 β 通路降低脑内炎症反应,减少脑内 β 淀粉样蛋白沉积来防治阿尔茨海默病的机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂 快速老化 SAMR1 小鼠 10 只、SAMP8 小鼠 30 只均由成都达硕实验动物有限公司提供,采用随机数字表法对实验动物进行编号,按照机遇均等原则分为 SAMR1 组、SAMP8 组、DSS 15 g/kg 组和 DSS 60 g/kg 组,每组 10 只。SAMR1 组小鼠作为对照组,DSS 15 g/kg 组和 DSS 60 g/kg 组小鼠分别给予 15 g/kg、60 g/kg 剂量的当归芍药散灌胃,每日 1 次;SAMR1 组和 SAMP8 组小鼠给予相应体积的生理盐水(每 10 g 0.1 mL)灌胃,每日 1 次。连续灌胃 8 周后进行行为学实验,实验结束后取大脑皮层和海马组织于 -80 ℃ 储存待检测。

1.2 Morris 水迷宫实验 通过水迷宫实验系统,进行小鼠空间学习记忆能力的检测。全部测试包括定位航行试验、空间探索试验、可视平台试验。每天连续训练 4 次,每次间隔 20 min,连续训练 5 d。自由录像系统记录小鼠找到平台的时间和游泳路径,4 次训练即将

小鼠分别从 4 个不同的起始点(不同象限)放入水中,小鼠找到平台后或 120 s 内找不到平台(潜伏期记为 120 s),则由实验者将其引导到平台,在平台上休息 10 s,再进行下一次试验。第 6 天移除平台,将大鼠放置在起点,记录小鼠寻找平台所需的时间以及路径。主要观察指标有:小鼠找到水下平台的平均逃避潜伏期和平均逃避距离、撤除平台后小鼠在目标象限内的游泳时间和距离百分比以及游泳速度等。

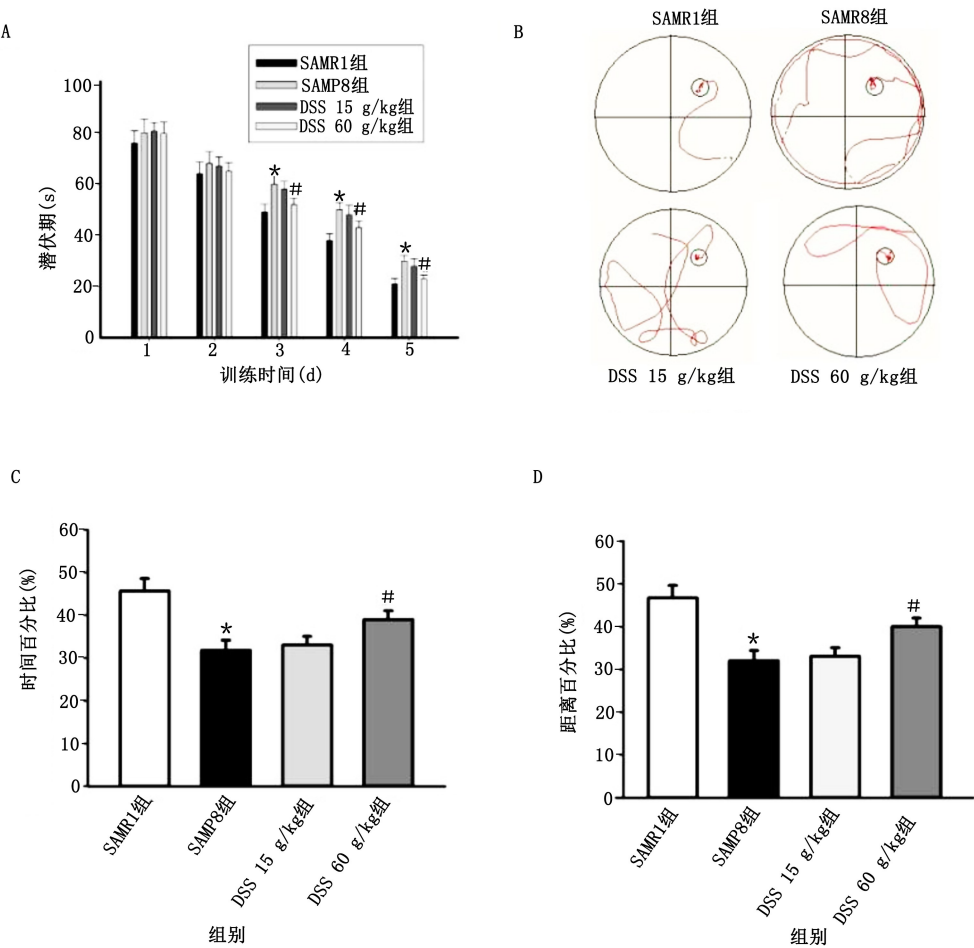
1.3 Y 迷宫实验 通过 Y 迷宫检测小鼠的工作记忆能力。Y 迷宫由 3 个夹角为 120° 的支臂组成。实验开始时,将小鼠放入 3 臂的交汇处,让其自由探索 8 min,记录分析各臂小鼠的进入顺序、进入时间及进臂的总次数以及每次进臂的顺序,并计算进臂正确率。进臂正确率=进臂正确的次数/(进臂总次数-2)×100%。

1.4 神经炎性因子的检测 收集的海马组织用 RIPA 裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl, 0.5% 脱氧胆酸钠, 5 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)匀浆。将样品的组织匀浆在 4 ℃ 下全速离心 15 min。蛋白质定量试剂盒(BCA)法进行蛋白浓度测定(试剂盒购自美国 Thermo Pierce 公司)。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测组织裂解物中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平(试剂盒购自美国 R&D 公司)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。定位航行试验和游泳速度采用重复测量方差分析,空间探索试验、可视平台试验采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验比较 小鼠 Morris 水迷宫行为学实验发现,在连续 5 d 寻找水下平台测试中,与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠寻找水下平台的日均潜伏期明显延长(见图 1A),穿越平台象限时间和距离占整个游泳时间(见图 1C)或距离(见图 1D)的百分比下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而 DSS 60 g/kg 组小鼠寻找水下平台的日均潜伏期较 SAMP8 组明显缩短,穿越平台象限时间和距离占整个游泳时间或距离的百分比均上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 SAMP8 组小鼠比较,DSS 15 g/kg 组小鼠寻找水下平台的日均潜伏期、穿越平台象限时间和距离占整个游泳时间或距离的百分比比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。



与 SAMR1 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP8 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验比较

(A 为寻找水下平台的潜伏期;B 为第 5 天各组小鼠寻找水下平台的代表性游泳轨迹;
C 为目标象限的时间百分比;D 为目标象限的距离百分比)

为了排除药物对大鼠运动能力的影响,各组小鼠进行了水上平台实验,结果显示,各组小鼠寻找平台潜

伏期(见图 2A)和平均游泳速度(见图 2B)比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

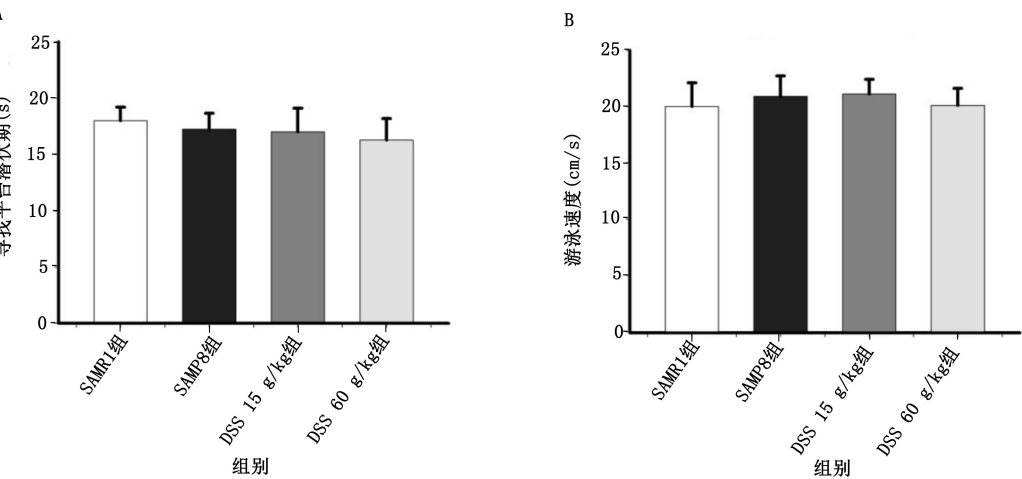
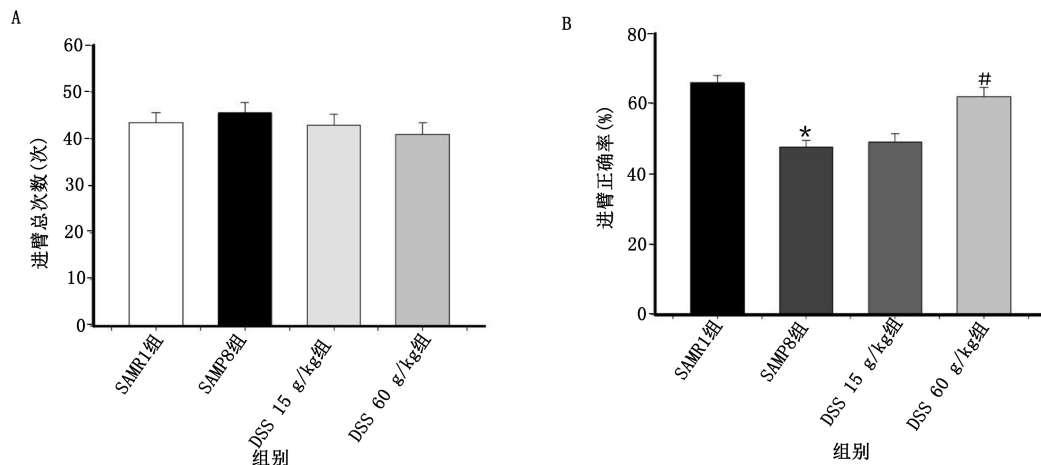


图 2 各组小鼠水上平台实验比较

(A 为各组小鼠找到水上平台的时间;B 为各组小鼠游泳速度)

2.2 各组小鼠 Y 迷宫实验比较 各组小鼠 8 min 进臂总次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠进臂正确率明显

下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SAMP8 组小鼠比较,DSS 60 g/kg 组小鼠进臂正确率明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 3。



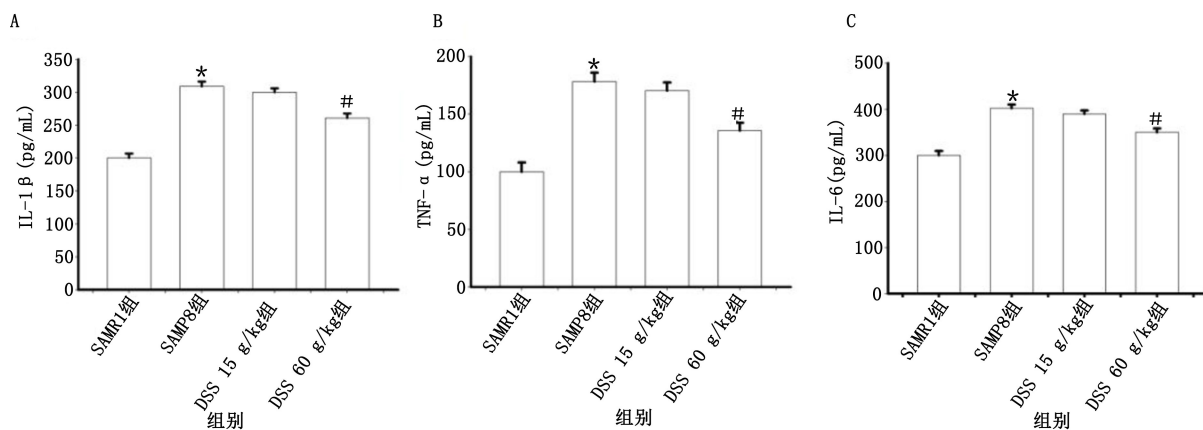
与 SAMR1 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP8 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠 Y 迷宫实验比较

(A 为各组小鼠总的进臂次数; B 为各组小鼠进臂正确率)

2.3 各组小鼠神经炎症因子水平比较 与 SAMR1 组小鼠比较,SAMP8 组小鼠海马组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 的表达量明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);

与 SAMP8 组小鼠比较,DSS 60 g/kg 组小鼠海马组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 的表达量明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 4。



与 SAMR1 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP8 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠海马组织中神经炎症因子水平比较

(A 为 $\text{IL-1}\beta$ 变化; B 为 $\text{TNF-}\alpha$ 变化; C 为 IL-6 变化)

3 讨论

β 淀粉样蛋白沉积形成老年斑是阿尔茨海默病最主要的病理学特征。研究发现,脑内高淀粉样蛋白水平与早期阿尔茨海默病密切相关^[11-12]。 β 淀粉样蛋白是由细胞膜上淀粉样前体蛋白发生异常剪切和错误折叠而产生的^[13-14]。在阿尔茨海默病病人体内, β 淀粉样前体蛋白经过 β 分泌酶裂解在细胞膜上产生含有 99 个氨基酸残基的胞外片段,此片段包含了完整的 β

淀粉样蛋白肽,经 γ 分泌酶裂解,产生具有致病作用的 β 淀粉样蛋白, β 淀粉样前体蛋白经过 γ 分泌酶剪切后产生不同长度的 β 淀粉样蛋白残基,其中 40 和 42 个氨基酸残基最多,后者更容易沉积,是形成老年斑的主要物质^[15]。在脑内,特别是大脑皮层、海马区 β 淀粉样蛋白沉积能自发地形成 β 折叠结构,这些 β 折叠进一步堆积就形成了脑中的淀粉样老年斑,导致突触损伤和神经元丢失^[16]。

长期慢性炎症与 β 淀粉样蛋白毒性作用共同损伤神经系统,促进阿尔茨海默病的发展。其中,IL-1 β 信号通路在阿尔茨海默病中发挥致病作用^[17-18]。IL-1 β 主要通过促进 β 淀粉样蛋白聚积和神经原纤维缠结参与阿尔茨海默病的致病过程,IL-1 β 在淀粉样斑块形成的早期过度表达,通过蛋白激酶 C 途径促进 β 淀粉样前体蛋白的合成、分泌,从而促进 β 淀粉样蛋白的沉积, β 淀粉样蛋白可以激活小胶质细胞,而活化的小胶质细胞可以产生 IL-1 β 等大量细胞因子,IL-1 β 可通过旁分泌作用激活星形胶质细胞,使其产生一氧化氮(NO)、IL-6、TNF 和载脂蛋白 E(ApoE)等,这些产物本身不仅可以造成神经元损伤、参与淀粉样斑块的形成,而且可以进一步激活小胶质细胞,从而产生更多的 IL-1 β 等细胞因子,形成恶性循环^[19]。当归芍药散主要由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻 6 味药组成。其中芍药(白芍)养血、川芎活血、当归兼备活血养血,配以茯苓、白术、泽泻健脾渗湿,诸药合用具有补血活血化痰、健脾利湿化痰的功效,既补中寓泻,又泻中求补,既益气养血,又化痰逐瘀,切中虚、痰、瘀。现代网络药理学研究显示,当归芍药散治疗阿尔茨海默病可能与其调节炎症、免疫系统、钙信号、细胞与细胞之间的信号交流等机制有关^[20]。本研究结果显示,当归芍药散能缓解 SAMP8 小鼠的学习和记忆功能,其机制可能与其降低 SAMP8 小鼠海马组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达水平有关。

参考文献:

- [1] BALLARD C, GAUTHIER S, CORBETT A, *et al.* Alzheimer's disease[J].Lancet,2011,377(9770):1019-1031.
- [2] 贾建平,李妍.中国痴呆的现状和未来[J].中华神经科杂志,2020,53(2):81-82.
- [3] XU J F,WANG J,WIMO A,*et al.* The economic burden of dementia in China,1990-2030:implications for health policy[J].Bulletin of the World Health Organization,2017,95(1):18-26.
- [4] HOWLETT D R,BOWLER K,SODEN P E,*et al.* Abeta deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J].Histology and Histopathology,2008,23(1):67-76.
- [5] PENSALFINI A, ZAMPAGNI M, LIGURI G, *et al.* Membrane cholesterol enrichment prevents A β -induced oxidative stress in Alzheimer's fibroblasts[J].Neurobiology of Aging,2011,32(2):210-222.
- [6] ZHAN X H,JICKLING G C,ANDER B P,*et al.* Myelin basic protein associates with A β PP,A β 1-42,and amyloid plaques in cortex of Alzheimer's disease brain[J].Journal of Alzheimer's Disease:

- JAD,2015,44(4):1213-1229.
- [7] BEN MENACHEM-ZIDON O,BEN MENACHEM Y,BEN HUR T,*et al.* Erratum: intra-hippocampal transplantation of neural precursor cells with transgenic over-expression of IL-1 receptor antagonist rescues memory and neurogenesis impairments in an Alzheimer's disease model[J].Neuropsychopharmacology,2015,40(2):524.
- [8] CADETE M A, ANGELA G A, STEFANIA F, *et al.* Amyloid-beta impairs TOM1-mediated IL-1R1 signaling[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2019,116(42):21198-21206.
- [9] 吴枫,朱丹妮,林志宏,等.当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究Ⅹ——当归芍药散精方多糖部位的抗氧化作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(7):23-26.
- [10] 钟树志,马世平,洪宗元,等.基于抗炎作用的当归芍药散抗阿尔茨海默氏症的实验研究[J].中国中药杂志,2011,36(22):3155-3160.
- [11] KLYUBIN I, ONDREJCAK T, HAYES J, *et al.* Neurotransmitter receptor and time dependence of the synaptic plasticity disrupting actions of Alzheimer's disease A β in vivo [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B,Biological Sciences,2013,369(1633):20130147.
- [12] SPERLING R A,DONOHUE M C,RAMAN R,*et al.* Association of factors with elevated amyloid burden in clinically normal older individuals[J].JAMA Neurology,2020,77(6):735-745.
- [13] HUNTER S,BRAYNE C.Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease[J].Molecular Psychiatry,2018,23(1):81-93.
- [14] MURATORE C R,RICE H C, SRIKANTH P, *et al.* The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons [J]. Human Molecular Genetics,2014,23(13):3523-3536.
- [15] CHITI F,DOBSON C M.Protein misfolding,amyloid formation,and human disease:a summary of progress over the last decade[J]. Annual Review of Biochemistry,2017,86(1):27-39.
- [16] BENILOVA I,KARRAN E,DE STROOPER B.The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease:an emperor in need of clothes[J].Nature Neuroscience,2012,15(3):349-357.
- [17] SCHMIDT J, BARTHEL K, WREDE A, *et al.* Interrelation of inflammation and APP in sIBM:IL-1 β induces accumulation of β -amyloid in skeletal muscle[J].Brain,2008,131(5):1228-1240.
- [18] POMILIO C,GORJOD R M,RIUDAVETS M,*et al.* Microglial autophagy is impaired by prolonged exposure to β -amyloid peptides: evidence from experimental models and Alzheimer's disease patients[J].Geroscience,2020,42(2):613-632.
- [19] 周成成,梁幼雅,刘四军,等.基于网络药理学探讨当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机理[J].中医杂志,2019,60(9):784-789.
- [20] 尹芳,宋祯彦,李富周,等.基于网络药理学研究当归芍药散防治阿尔茨海默病的作用机制[J].药物评价研究,2018,41(2):210-215.

(收稿日期:2021-01-22)

(本文编辑 邹丽)