

开心散改善阿尔茨海默病神经炎症的机制预测与验证^Δ

徐丹丹^{1*}, 曾永长², 梁少瑜³, 刘琦³, 吴俊洪³, 何康^{1#} (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 广州医科大学附属中医医院制剂科, 广州 510140; 3. 深圳市第二人民医院老年医学研究所, 广东深圳 518035)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)12-1476-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.12.10



摘要 目的 预测并验证开心散(简称“KXS”)改善阿尔茨海默病(AD)神经炎症的潜在机制。方法 采用网络药理学方法,挖掘KXS用于AD的核心抗炎成分及核心炎症靶点,进行基因本体(GO)功能、京都基因和基因组数据库(KEGG)通路富集分析,并进行分子对接。基于网络药理学结果,以雄性SD大鼠为对象,以D-半乳糖慢性诱导建立AD模型,考察KXS对AD大鼠体质量评分、学习记忆能力指标(逃避潜伏期、穿越平台次数、平台象限路程及时间)、脏器(心脏、肝脏、脾脏、胸腺)指数、海马组织病理改变以及炎症相关通路及上下游蛋白表达的影响。结果 KXS用于AD的核心抗炎成分包括五味子酯乙、人参炔三醇、五味子酯甲、enhydrin、vulgarin、人参环炔醇,核心炎症靶点包括核因子 κ B亚基1、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6、Toll受体4(TLR4)、肿瘤坏死因子、核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)、胱天蛋白酶1(CASP1);GO、KEGG富集结果涉及炎症反应、磷酸化途径及NF- κ B炎症通路;核心抗炎成分与核心炎症靶点之间具有较强的结合能力。动物实验显示,与模型组比较,KXS组大鼠海马组织CA1、CA3、DG区神经元皱缩、尼氏体减少等病理改变均有改善,脏器指数(肝脏指数除外)、尼氏染色阳性细胞数均显著升高或增多,学习记忆能力指标均显著改善,体质量评分(实验第8、12周)和NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65、TLR4、NLRP3、CASP1、IL- 1β 蛋白的表达均显著降低或下调。结论 KXS能有效改善AD大鼠神经炎症,减轻海马神经元损伤,提高学习记忆能力;上述作用可能与抑制NF- κ B信号通路及其上下游相关蛋白的表达有关。
关键词 开心散;阿尔茨海默病;神经炎症;网络药理学;分子对接;NF- κ B信号通路

Mechanism prediction and validation of Kaixinsan in ameliorating neuroinflammation in Alzheimer's disease

XU Dandan¹, ZENG Yongchang², LIANG Shaoyu³, LIU Qi³, WU Junhong³, HE Kang¹ (1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Preparation Department, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China; 3. Geriatric Medicine Institute, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To predict and validate the potential mechanisms of Kaixinsan (KXS) in ameliorating neuroinflammation in Alzheimer's disease (AD). **METHODS** Network pharmacology was employed to identify core anti-inflammatory components and key inflammatory targets of KXS for AD. Gene ontology (GO) functional annotation, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment, and molecular docking were performed. Based on these findings, male SD rats were used to establish an AD model via chronic D-galactose induction. The effects of KXS on AD rats were evaluated, including quantitative behavioral score, learning and memory parameters (escape latency, platform crossings, platform quadrant distance and time), organ indexes (heart, liver, spleen, thymus), histopathological alterations in the hippocampus, and expressions of inflammation-related pathway proteins and their upstream/downstream regulators. **RESULTS** Core anti-inflammatory components of KXS for AD included gomisin B, panaxytriol, gomisin A, enhydrin, vulgarin and panaxydol, while key inflammatory targets involved nuclear factor-kappa B subunit 1 (NF κ B1), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3) and caspase-1 (CASP1). GO and KEGG pathway enrichment involved inflammatory response, phosphorylation and the NF- κ B signaling pathway. Molecular docking confirmed strong binding affinities between core components and key targets. Animal experiments demonstrated that, compared to the model group, KXS significantly alleviated histopathological damage (e.g., neuronal shrinkage, reduced Nissl bodies in hippocampal CA1, CA3, and DG regions), increased organ indexes (except for liver index) and Nissl-stained positive cells, improved learning and memory performance, and reduced behavioral scores (at the 8 and 12 weeks of the experiment) and protein expression of NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, CASP1

^Δ 基金项目 广东省自然科学基金项目(No.2021A1515010978, No.2021A1515012474); 深圳市科技创新委员会基础研究项目(No. JCYJ20210324121610029)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及中药新制剂研发。E-mail:2109650462@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药与民族药药效物质基础。E-mail:hekang0851@163.com

and IL-1 β . **CONCLUSIONS** KXS effectively mitigates neuroinflammation, reduces hippocampal neuronal injury, and enhances learning and memory ability in AD rats, potentially through suppressing the NF- κ B signaling pathway and its upstream/downstream regulators.

KEYWORDS Kaixinsan; Alzheimer's disease; neuroinflammation; network pharmacology; molecular docking; NF- κ B signaling pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是严重威胁人类健康的重大疾病。随着全球人口老龄化程度的不断加剧,AD的发病率逐年攀升,据估计,到2050年,全球将约有1.52亿人罹患此病^[1]。胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、利斯的明)和N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂(美金刚)是临床常用的AD治疗药物,但上述药物作用机制单一,而AD病因复杂、发病机制尚未明确,故治疗效果有限^[2]。

目前,AD发病机制涉及多种假说,如神经炎症假说、tau蛋白过度磷酸化假说、 β -淀粉样蛋白(β -protein, A β)级联假说等,其中神经炎症被认为是AD最关键的致病机制之一^[3]。研究指出,持续的神经炎症可引发tau蛋白过度磷酸化、A β 聚集及胆碱能系统紊乱等病理改变,这一系列病理改变又可进一步加剧炎症介质的释放,从而形成一个自我放大的正反馈循环,最终引发AD^[4]。由此可见,抑制神经炎症可能是治疗AD的重要前提。

中草药因具有多成分、多靶点的作用特点,在防治AD方面独具优势^[5]。开心散(简称“KXS”)是沿用至今、疗效确切且具有AD治疗优势的经典名方^[2]。该方始载于唐代孙思邈的《备急千金要方》,由远志、人参、茯苓、石菖蒲组方而成,主治好忘,具有安神、补气、利湿化浊之功效,已被载入国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》^[2]。临床研究证实,KXS可通过降低血清和脑组织中的炎症介质水平而有效减轻神经炎症,从而缓解AD症状^[6],但其具体的抗炎机制尚未明确。基于此,本研究拟借助网络药理学手段,预测KXS与AD神经炎症的潜在关联,并通过分子对接和动物实验来探讨KXS改善AD神经炎症的潜在机制,为KXS的应用及相关新药的研发提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括SA201型Morris水迷宫视频分析系统(江苏赛昂斯生物科技有限公司)、SpectraMax i3x型全波长全自动多动能酶标仪(美国Molecular Devices公司)、PowerPac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司)、Tanon-5200SF型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)、Tekscray SQS-1000型玻片扫描影像系统(深圳市生强科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

KXS组方药材远志、人参、茯苓、石菖蒲饮片(批号分别为230401、230201、F1218411、230501)均购自广州至信中药饮片有限公司,出厂鉴定均显示为真品。

D-半乳糖(D-galactose, D-gal;批号C2202593,纯度 \geq 99%)、盐酸多奈哌齐对照品(批号K2119303,纯度 \geq 98%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色溶液(批号分别为CR2211064、CR2206058)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA蛋白检测试剂盒、化学发光试剂盒(批号分别为091922230203、103122230302)均购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(货号分别为BM0627、BA1054)均购自武汉博士德生物工程技术有限公司;兔抗Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体、兔抗核因子 κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)抗体、兔抗白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)抗体、兔抗胱天蛋白酶1(caspase-1, CASP1)抗体、鼠抗核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)抗体、HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗(货号分别为19811-1-AP、80979-1-RR、66737-1-Ig、22915-1-AP、68102-1-Ig、RGAMOO1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗磷酸化NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)抗体(货号为AF2006)购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠32只,体重200~250 g,购自广东维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2022-0063。所有大鼠均饲养于中科产业控股(深圳)有限公司SPF级实验动物中心[相对湿度(50 \pm 10)%,温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,昼夜交替循环照明],自由摄食、饮水,并适应性喂养1周。本实验方案经该公司实验动物福利伦理委员会审核批准(编号202300167)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 KXS活性成分的筛选及靶点预测

通过TCMSP数据库检索人参、茯苓、石菖蒲的化学成分,以口服生物利用度 \geq 30%和药物相似性 \geq 0.18为标准筛选核心成分^[7]。对于未被TCMSP数据库收录的远志,本研究先通过文献检索确定其所含成分的准确结构,再导入TCMSP数据库进行筛选。为了提高数据的完整性,本研究还利用了本草组鉴数据库来补充检索组方药材的化学成分,并通过PubChem数据库检索其简短有机分子结构式(simplified molecular input line entry system, SMILES),将SMILES导入SwissADME数据库,

按照“类药性五原则”筛选核心成分^[8]。将上述所得成分去重、合并,共得104个核心成分。

借助SwissTargetPrediction数据库,以可能性 ≥ 0.1 为标准筛选上述核心成分的靶点^[9],共得970个核心成分靶点。

2.1.2 疾病靶点预测及药物-疾病交集靶点的获取

以“Alzheimer’s disease”为关键词,在GeneCards数据库、DrugBank Online数据库、OMIM数据库和TTD数据库中检索和筛选AD疾病靶点,共得1 185个疾病靶点。

借助韦恩图将“2.1.1”项下核心成分靶点与前述疾病靶点进行映射,取交集后,共得330个药物-疾病交集靶点。

2.1.3 蛋白-蛋白相互作用网络构建

将药物-疾病交集靶点导入STRING数据库,设置高可信度为0.900,去除无关联节点后,构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,并使用Cytoscape 3.10.2软件对度值大于其中位值的节点(133个)进行可视化展示(限于篇幅,该网络可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图1)。在该PPI网络中,有25个节点的度值超过20,为核心靶点。其中,部分核心靶点与炎症通路相关,如核因子 κB 亚基1(nuclear factor-kappa B subunit 1, NFKB1)、NF- κB p65、IL-1 β 、IL-6、TLR4、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF);此外,靶点NLRP3、CASP1的度值虽低于20,但在炎症通路中具有重要作用^[2]。因此,将上述(核心)靶点作为AD相关核心炎症靶点。

2.1.4 “药物-活性成分-靶点”网络构建

使用Cytoscape 3.10.2软件对药物、核心成分、交集靶点构建“药物-活性成分-靶点”网络(限于篇幅,该网络可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图2)。该网络有节点439个、边2 830条。拓扑学分析结果显示,度值排前12位的成分依次为panaxacol、去氧哈林通碱(deoxyharringtonine)、龙胆根素(gentisin)、五味子酯乙(gomisin B)、人参炔三醇(panaxytriol)、五味子酯甲(gomisin A)、quinicine、enhydrin、tauremisin、vulgarin、人参环氧炔醇(panaxydol)、celabenzine,属核心活性成分。其中,五味子酯乙^[10]、人参炔三醇^[11]、五味子酯甲^[12]、enhydrin^[13]、vulgarin^[14]、人参环氧炔醇^[15]均具有一定的抗炎活性,为KXS的核心抗炎成分。

2.1.5 基因本体、京都基因和基因组数据库富集分析

将药物-疾病交集靶点导入Metascape在线工具进行基因本体(gene ontology, GO)、京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。其中,GO富集包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。分别将GO富集结果(富集基因数排前10位)、KEGG富集结果(富集基因数排前20位)导入微生信在线平台生成气泡图。富集结果(图1)中,BP项的“炎症反应”直接指向炎症,BP项

的“磷酸化”与MF项的“磷酸酶结合”指向磷酸化途径,KEGG富集通路项的“NF- κB 信号通路”是重要的炎症通路^[16]。

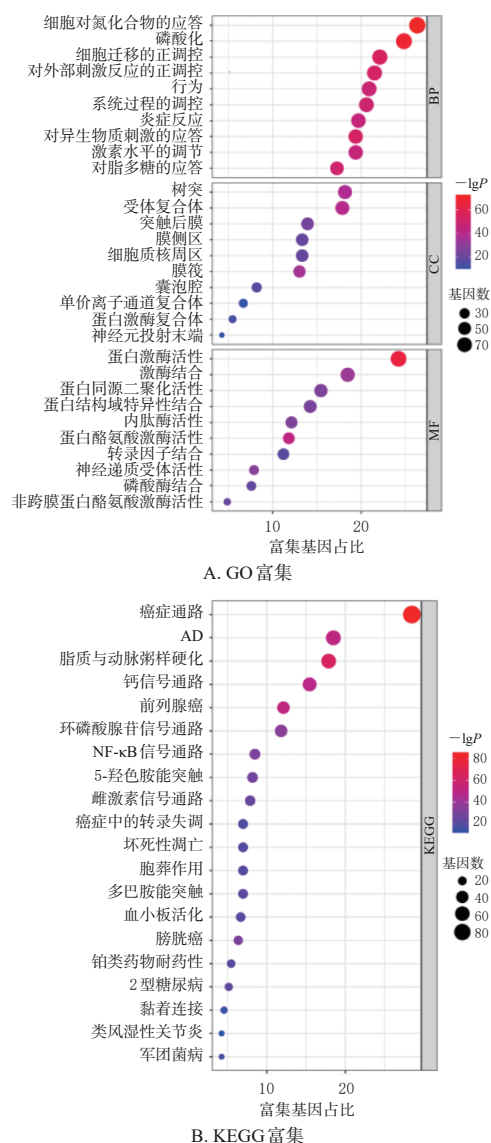


图1 KXS改善AD交集靶点的GO、KEGG富集分析气泡图

2.2 分子对接分析

通过PubChem数据库下载核心抗炎成分五味子酯乙、人参炔三醇、五味子酯甲、enhydrin、vulgarin、人参环氧炔醇的3D结构,使用Chem 3D软件进行小分子结构优化;从RCSB PDB数据库中下载核心炎症靶点蛋白NFKB1、NF- κB p65、IL-1 β 、IL-6、TLR4、TNF、NLRP3、CASP1的晶体结构,然后使用PyMOL软件去除水分子和天然配体;使用AutoDock软件的“AutoGrid”模块识别活动对接部位,构建受体-配体“pdbqt”文件并进行分子对接可视化展示,其结合能热图见图2(限于篇幅,分子对接示例可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图3)。对接结果显示,上述成分与靶点之间均具有较强的结合能力(结合能 < -0.42 kcal/mol即表示结合能力较强^[17], 1 kcal=4.184 kJ)。

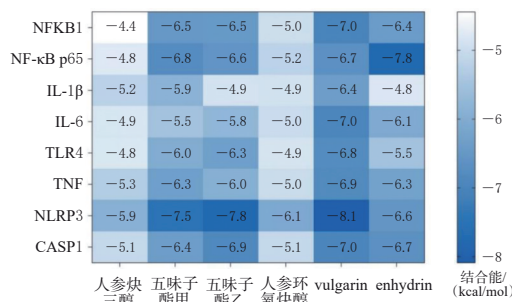


图2 KXS核心抗炎成分与炎症通路核心靶点的结合能热图

2.3 动物实验验证

基于上述网络药理学结果和相关文献^[16],本研究拟从NF-κB信号通路出发进行验证。

2.3.1 药液的配制

分别取远志、人参、茯苓、石菖蒲饮片90、90、180、90 g,混合,加12倍量水浸泡0.5 h后,加热回流1.5 h,过滤;药渣加8倍量水,加热回流1 h,过滤;合并2次滤液,减压浓缩,得质量浓度为1 g/mL(以生药量计)的药液,于-20 °C下保存,备用。

2.3.2 分组、造模与给药

将大鼠随机分为对照组(CON组)、模型组(MOD组)、KXS组[1.35 g/(kg·d),以水为溶剂,按成人临床剂量换算而得]、多奈哌齐组[DON组,1.35 mg/(kg·d),以水为溶剂,按成人临床剂量的1.5倍换算而得^[19]],每组8只。除对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射250 mg/kg的D-gal(以生理盐水为溶剂),每天1次;与此同时,KXS组和DON组大鼠灌胃相应药液,每天1次。造模及给药均持续12周。其间,每2周检测各组大鼠体重1次,根据其体征量化评分、Morris水迷宫实验及脑组织切片结果来判断AD模型是否复制成功^[19]。

2.3.3 大鼠体征量化评分

实验期间,由2位实验人员对大鼠体征(包括毛发、皮肤、神情、活动、抓取时抵抗力、扎堆情况)进行量化评分,每4周评估1次。具体标准参考相关文献^[20]。采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。服从正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,采用LSD-*t*检验(方差齐时)或Games-Howell检验(方差不齐时)进行进一步两两比较;不服从正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用Kruskal-Wallis *H*检验进行多组间比较,采用Wilcoxon秩和检验进行进一步两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ (统计方法后同)。

结果(表1)显示,实验第8、12周时,与CON组比较,MOD组大鼠的体征量化评分均显著升高($P<0.01$);与MOD组比较,KXS组和DON组大鼠的体征量化评分均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3.4 大鼠学习记忆能力评估

采用Morris水迷宫实验于实验第12周评估大鼠学习记忆能力(其间维持正常给药),具体操作参考相关文献^[21]:实验为期6 d,包括适应性训练、定位航行训练及空

表1 各组大鼠体征量化评分比较($\bar{x} \pm s, n=8$,分)

组别	第0周	第4周	第8周	第12周
CON组	2.0±0.6	4.1±1.7	7.5±1.8	8.8±2.1
MOD组	1.7±0.8	4.8±1.8	9.6±1.5 ^a	14.2±1.9 ^a
KXS组	2.1±0.5	5.0±1.3	8.3±1.7 ^b	11.3±2.0 ^b
DON组	1.8±0.8	4.6±1.1	8.2±2.2 ^b	10.4±2.3 ^b

a:与CON组比较, $P<0.01$;b:与MOD组比较, $P<0.05$;c:与MOD组比较, $P<0.01$ 。

间探索实验。首日为适应性训练,即每只大鼠游泳1 min以适应圆柱形水池(直径150 cm、深50 cm)环境并认识逃生平台(高出水面1.5 cm)。第2至5天为定位航行训练,即让大鼠每天从水池4个象限入水,记录其找到平台(低于水面1.5 cm)的逃避潜伏期(若大鼠60 s内找到平台,则记录实际所用时间;若未找到,则记为60 s,并将大鼠引导至平台停留10 s)。第6天为空间探索实验,即移除平台,将大鼠置于水池固定象限(第3象限)的特定位置,记录其60 s内的游泳活动路线,分析其逃避潜伏期、穿越平台次数、平台象限路程及时间,作为大鼠学习记忆能力的评估指标。

结果(表2、图3)显示,与CON组比较,MOD组大鼠的游泳活动路线复杂,其逃避潜伏期显著延长,穿越平台次数、平台象限路程及时间均显著减少或缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与MOD组比较,KXS组和DON组大鼠的游泳活动路线有不同程度简化,其逃避潜伏期均显著缩短,KXS组大鼠的穿越平台次数、平台象限路程及时间和DON组大鼠的穿越平台次数均显著增加或延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表2 各组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数、平台象限路程及时间比较($n=8$)

组别	逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s$)/s	穿越平台次数[M(P_{25}, P_{75}) 或($\bar{x} \pm s$)]	平台象限路程 ($\bar{x} \pm s$)/cm	平台象限时间 ($\bar{x} \pm s$)/s
CON组	25.00±14.99	1.5(1.0,2.0)	368.44±77.73	13.80±3.01
MOD组	54.75±7.55 ^a	0(0,1.0) ^a	270.66±78.42 ^b	10.52±2.21 ^b
KXS组	29.38±23.02 ^c	1.50±0.93 ^c	376.56±71.00 ^d	15.63±4.09 ^d
DON组	33.50±19.03 ^d	1.25±0.71 ^d	309.99±77.63	12.96±2.57

a:与CON组比较, $P<0.01$;b:与CON组比较, $P<0.05$;c:与MOD组比较, $P<0.01$;d:与MOD组比较, $P<0.05$ 。

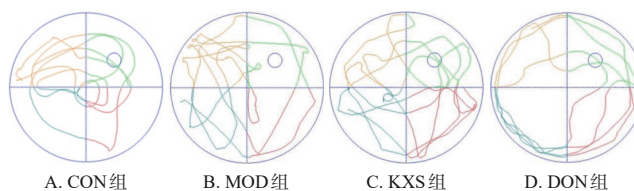


图3 各组大鼠空间探索实验的游泳活动路线

2.3.5 标本采集与脏器指数检测

Morris水迷宫实验后,称定各组大鼠体重,将其麻醉后处死,取其大脑。随机选取每组3只大鼠的大脑,用4%多聚甲醇溶液固定,用于后续HE、尼氏染色观察;取每组剩余大鼠的大脑,分离海马组织并冻存,用于后续Western blot实验。同时,收集各组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、胸腺,称重后计算相应脏器指数并进行组间比较。

结果(表3)显示,与CON组比较,MOD组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、胸腺指数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与MOD组比较,KXS组、DON组大鼠上述脏器指数(KXS组肝脏指数除外)均显著升高($P<0.05$)。

表3 各组大鼠脏器指数比较($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mg/g}$)

组别	心脏指数	肝脏指数	脾脏指数	胸腺指数
CON组	3.05±0.18	26.74±1.02	2.10±0.08	0.85±0.07
MOD组	2.72±0.30 ^a	24.11±1.77 ^b	1.87±0.17 ^a	0.69±0.10 ^a
KXS组	2.95±0.25 ^c	24.86±3.14	2.04±0.19 ^c	0.80±0.10 ^c
DON组	2.96±0.18 ^c	27.12±3.16 ^c	2.07±0.24 ^c	0.79±0.13 ^c

a: 与CON组比较, $P<0.01$; b: 与CON组比较, $P<0.05$; c: 与MOD组比较, $P<0.05$ 。

2.3.6 大鼠脑组织病理学变化观察

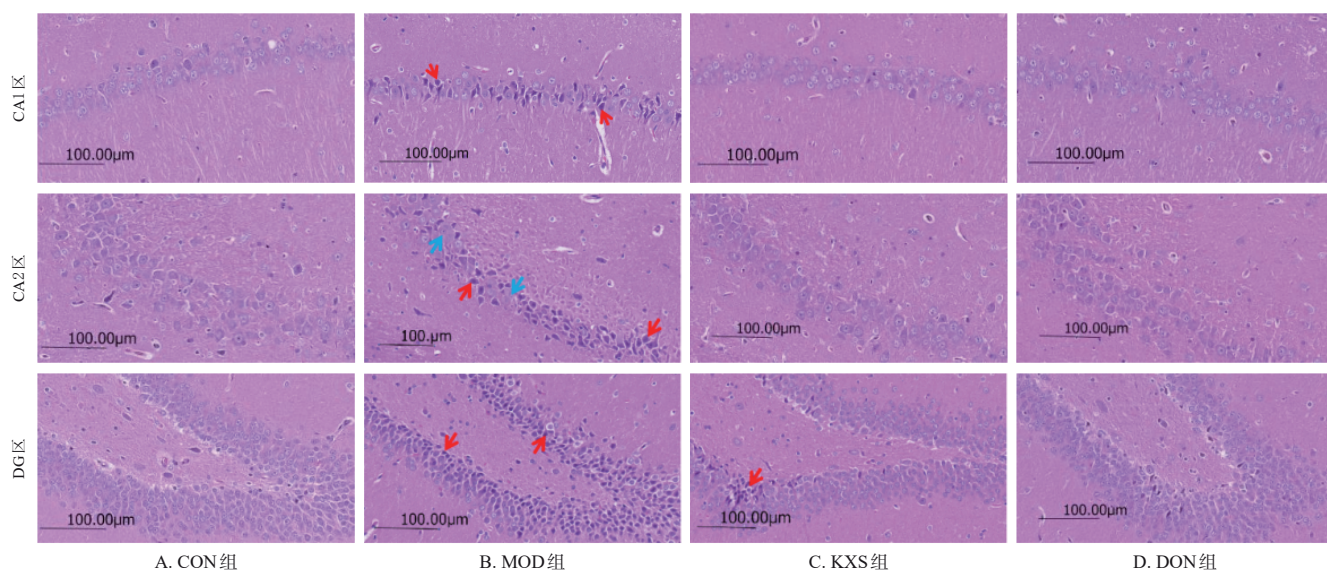
取“2.3.5”项下各组大鼠经4%多聚甲醛溶液固定的大脑,进行常规石蜡包埋、切片后脱蜡水合,分别进行HE染色和尼氏染色,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,

以中性树脂封片,使用显微镜观察其海马组织CA1、CA3、DG区的组织病理学变化,并使用Image J软件对尼氏染色阳性细胞(边界清晰,且有完整细胞核)进行计数。

结果(图4、图5、表4)显示,CON组大鼠海马组织的CA1、CA3、DG区神经元数量丰富、排列紧密,且形态结构正常。与CON组比较,MOD组大鼠海马组织各区均可见神经元皱缩深染、形状不规则,细胞核与细胞质分界不清晰,尼氏体减少,阳性细胞数均显著减少($P<0.01$),甚至出现核仁消失。与MOD组比较,KXS组、DON组大鼠海马组织各区上述病理改变均有不同程度改善,尼氏体有所增加,阳性细胞数均显著增多($P<0.01$)。

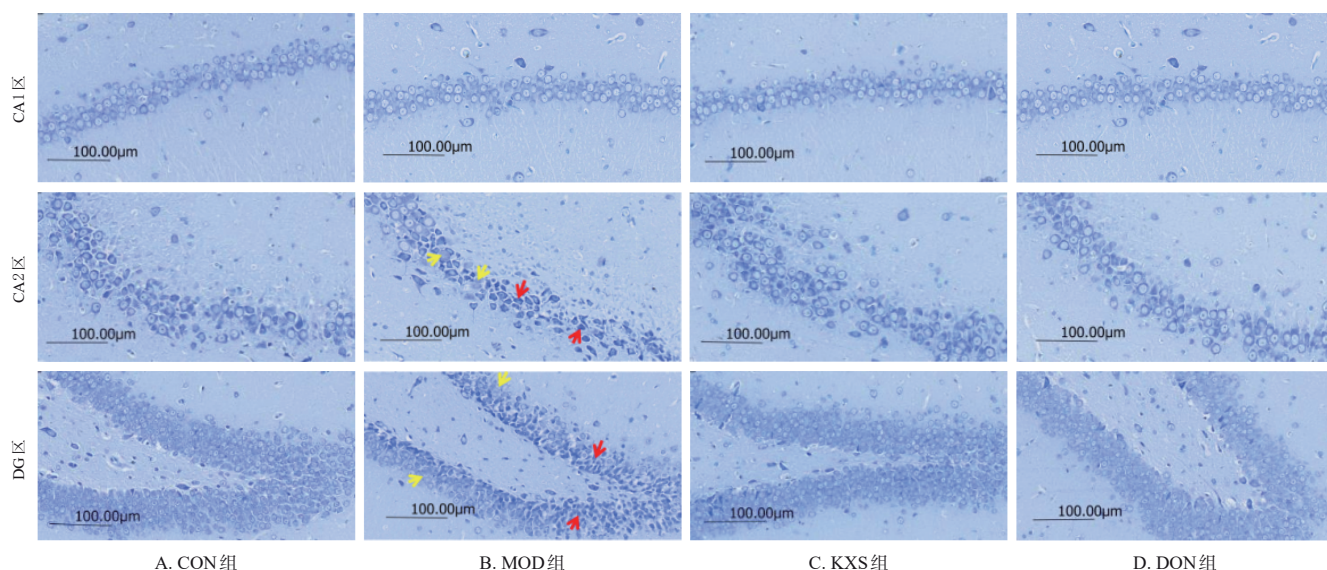
2.3.7 大鼠海马组织中NF- κ B信号通路及其上下游蛋白表达检测

取“2.3.5”项下各组大鼠冻存的海马组织适量,剪碎后,加入预冷的RIPA裂解液(含蛋白酶及磷酸酶抑制



红色箭头:固缩的神经元;蓝色箭头:细胞核不清晰、细胞质分界的细胞。

图4 各组大鼠海马组织病理学观察的显微图(HE染色)



红色箭头:固缩的神经元;黄色箭头:核仁消失的细胞。

图5 各组大鼠海马组织病理学观察的显微图(尼氏染色)

表4 各组大鼠海马组织中尼氏染色阳性细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{个}$)

组别	CA1区	CA3区	DG区
CON组	66.67±5.31	49.17±5.97	328.75±24.50
MOD组	35.67±11.32 ^a	26.33±9.29 ^a	122.42±44.08 ^a
KXS组	59.42±5.28 ^b	44.00±8.53 ^b	286.17±17.27 ^b
DON组	62.25±6.77 ^b	37.58±9.59 ^b	300.83±43.76 ^b

a: 与CON组比较, $P < 0.01$; b: 与MOD组比较, $P < 0.01$ 。

剂), 经匀浆、超声、离心后分离上清液, 用BCA法测定蛋白浓度, 加入loading buffer, 于100 °C下加热变性。取变性蛋白适量, 进行10%~15%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用5%脱脂奶粉室温封闭2 h; 洗膜后, 加入TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、CASP1、IL-1 β 、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:6 000、1:6 000、1:2 000、1:1 000、1:6 000、1:2 000、1:6 000), 4 °C下孵育过夜; 洗膜后, 加入相应的二抗(稀释比例均为1:6 000), 室温下孵育1 h; 洗膜后, 用ECL超敏发光液显色, 并置于全自动化学发光图像分析系统下成像。以 β -actin为内参, 使用Image J软件计算目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值, 以表征目的蛋白的表达水平。结果以CON组为标准进行归一化处理(NFKB1与NF- κ B p65同为NF- κ B蛋白家族的成员, IL-6、TNF与IL-1 β 同为炎症因子, 故未作重复验证)。

结果(图6、表5)显示, 与CON组比较, MOD组大鼠海马组织中TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、NLRP3、CASP1、IL-1 β 蛋白的表达均显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与MOD组比较, KXS组、DON组大鼠海马组织中上述蛋白(DON组的TLR4、NF- κ B p65、IL-1 β 蛋白除外)的表达均显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

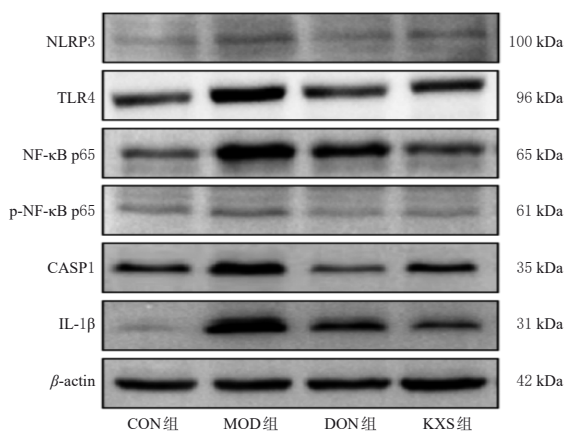


图6 各组大鼠海马组织中NF- κ B信号通路及其上下游蛋白表达的电泳图

3 讨论

本研究首先通过网络药理学分析获得了AD相关核心炎症靶点(NFKB1、NF- κ B p65、IL-1 β 、IL-6、TLR4、TNF、NLRP3、CASP1)和KXS用于AD的潜在核心抗炎成分(五味子酯乙、人参炔三醇、五味子酯甲、enhydrin、vulgarin、人参环氧炔醇); 随后, 通过富集分析获知, GO功能富集涉及磷酸化、炎症反应等, KEGG富集通路包

表5 各组大鼠海马组织中NF- κ B信号通路及其上下游蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TLR4	NF- κ B p65	p-NF- κ B p65	NLRP3	CASP1	IL-1 β
CON组	1.00±0.47	1.00±0.21	1.00±0.33	1.00±0.23	1.00±0.22	1.00±0.23
MOD组	2.21±0.78 ^a	2.32±0.37 ^a	1.50±0.47 ^a	1.42±0.36 ^b	1.78±0.35 ^a	4.71±1.29 ^b
KXS组	1.18±0.41 ^c	0.87±0.22 ^c	0.89±0.25 ^d	0.76±0.21 ^c	0.98±0.08 ^c	1.92±0.29 ^d
DON组	1.52±0.37	1.82±0.28	0.89±0.28 ^d	0.93±0.25 ^d	0.71±0.18 ^c	2.94±0.92

a: 与CON组比较, $P < 0.01$; b: 与CON组比较, $P < 0.05$; c: 与MOD组比较, $P < 0.01$; d: 与MOD组比较, $P < 0.05$ 。

含NF- κ B这一重要炎症通路; 最后, 通过分子对接进一步证实了KXS潜在核心抗炎成分与核心炎症靶点之间具有较高的亲和力。由此本课题组推测, KXS可能主要作用于NF- κ B信号通路, 并通过影响其上下游相关蛋白的表达来缓解神经炎症, 从而发挥改善AD的作用。

为验证这一推测, 本研究进行了相关动物实验。首先, 本研究使用D-gal诱导建立AD大鼠模型, 结果显示, 与CON组比较, MOD组大鼠实验第8、12周时的体质量评分均显著升高, 提示其具有明显的衰老症状(如毛发干枯发黄、活动减少、神情呆滞等); 心脏、肝脏、脾脏、胸腺指数均显著降低, 逃避潜伏期、穿越平台次数、平台象限路程及时间等学习记忆能力评估指标均显著恶化, 海马组织出现神经元皱缩、细胞核与细胞质分界不清晰、尼氏体减少等病理改变, 表明大鼠上述脏器明显萎缩、学习记忆能力明显减退、海马组织受损严重, AD大鼠模型复制成功。经KXS干预后, AD大鼠的体质量评分显著降低, 上述脏器指数(肝脏指数除外)均显著升高, 各学习记忆能力评估指标和海马组织病理改变均有所改善, 提示KXS可明显改善AD大鼠的相关症状, 与既往研究基本一致^[22]。

NF- κ B信号通路是重要的炎症通路, 可介导大脑中的神经病变。转录因子NF- κ B是炎症的中心介质, 可直接参与调控多种炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的表达^[23]。在静息状态下, NF- κ B二聚体(如p65)与NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B; 如I κ B α)结合, 形成NF- κ B/I κ B复合物, 并停留在细胞质中; 当细胞受到胞内外细胞因子、应激信号、病原体等刺激时, I κ B会被磷酸化, 使得NF- κ B二聚体被释放, 并引发进一步的磷酸化(如NF- κ B p65转化成p-NF- κ B p65), 进而启动下游炎症因子的释放, 加剧AD的神经炎症^[24]。本研究结果显示, MOD组大鼠海马中NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白的表达均较CON组显著上调, 提示NF- κ B信号通路被异常激活; 经KXS干预后, 上述蛋白的表达被显著逆转, 提示KXS可有效抑制NF- κ B信号通路所诱导的炎症过表达。

本研究进一步对NF- κ B信号通路上下游相关蛋白的表达情况进行了分析。其中, TLR4是该通路常见的上游因子, 可激活细胞内髓样分化因子88, 进而磷酸化I κ B; 磷酸化的NF- κ B二聚体(如p-NF- κ B p65)会进入细胞核, 从而启动促炎因子(如NLRP3炎症小体)的转录, 最终形成经典的TLR4/NF- κ B/NLRP3炎症通路^[25]。此

外,NLRP3炎症小体还会继续激活CASP1(又被称作IL-1 β 转化酶),从而增加炎症因子IL-1 β 的分泌^[25]。本研究结果显示,MOD组大鼠海马组织中TLR4、NLRP3、CASP1、IL-1 β 蛋白的表达均较CON组显著上调;经KXS干预后,大鼠海马组织中上述蛋白的表达均显著下调,进一步提示KXS缓解AD神经炎症的作用可能与抑制NF- κ B信号通路上下游相关蛋白的表达有关,与网络药理学预测结果基本一致。

综上所述,KXS能有效改善AD大鼠神经炎症,减轻海马神经元损伤,提高学习记忆能力;上述作用可能与抑制NF- κ B信号通路及其上下游相关蛋白的表达有关。

参考文献

[1] ATRI A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management[J]. Med Clin North Am, 2019, 103(2):263-293.

[2] 单晓晓,周乐乐,李大伟,等. 经典名方开心散治疗阿尔茨海默病的机制研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(11):3685-3695.

[3] PAK V M, ONEN S H, BLIWISE D L, et al. Sleep disturbances in MCI and AD: neuroinflammation as a possible mediating pathway[J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12:69.

[4] YANG Q Q, ZHOU J W. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells[J]. Glia, 2019, 67(6):1017-1035.

[5] 刘欣,张若冰,李陈雪,等. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(5):1146-1154.

[6] BAI G Q, JING S W, CAO H M, et al. Kai-xin-san protects depression mice against CORT-induced neuronal injury by inhibiting microglia activation and oxidative stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022:5845800.

[7] 白亚利,崔鑫钰,袁悦莹,等. 基于网络药理学和动物实验研究麝香通心滴丸防治糖尿病心肌病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(7):1905-1914.

[8] 蔡晴晴,李煜,黄颖,等. 基于网络药理学研究心舒宝片抗炎、血管舒张和心肌保护作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(2):487-497.

[9] 刘文杰,涂玥,何伟明,等. 大黄蛰虫丸通过PI3K/AKT/HIF-1 α 信号通路减轻心肌细胞凋亡而延缓心脏衰老的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(5):1276-1285.

[10] LIU J M, ZUO X, HUANG M J, et al. Multifunctional gomisins B enhances cognitive function in APP/PS1 transgenic mice by regulating A β clearance and neuronal apoptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 166:115423.

[11] HIRAMATSU G, MATSUDA K, UTA D, et al. Panaxatriol inhibits lipopolysaccharide-induced microglia activation in brain inflammation *in vivo*[J]. Biol Pharm Bull, 2021, 44(7):1024-1028.

[12] ZHANG Z Y, YANG W K, CHEN J J, et al. Efficacy and mechanism of *Schisandra chinensis* active component gomisins A on diabetic skin wound healing: network phar-

macology and *in vivo* experimental validation[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337(Pt 1):118828.

- [13] CHEN J H, HU J P, LI X Q, et al. Enhydrin suppresses the malignant phenotype of GBM via Jun/Smad7/TGF- β signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2024, 226:116380.
- [14] ELGAMAL R A, GALALA A A, ABDEL-KADER M S, et al. Microbial transformation of the sesquiterpene lactone, vulgarin, by *Aspergillus niger*[J]. Molecules, 2023, 28(9):3729.
- [15] KIM M Y, JEONG B, LEE G S, et al. Panaxydol extracted from *Panax ginseng* inhibits NLRP3 inflammatory activation to ameliorate NASH-induced liver injury[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 128:111565.
- [16] 王慧,闫晓培,徐莉. 苦豆碱通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3通路改善香烟烟雾诱导的人支气管上皮细胞损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2024, 40(5):411-418.
- [17] GAILLARD T. Evaluation of AutoDock and AutoDock vina on the CASF-2013 benchmark[J]. J Chem Inf Model, 2018, 58(8):1697-1706.
- [18] LIU J J, WEI F, WANG Y D, et al. *Ginseng* and *Polygonum multiflorum* formula protects brain function in Alzheimer's disease[J]. Front Pharmacol, 2025, 16:1461177.
- [19] 王曦,龙清华,蔡元钦,等. 基于PERK-eIF2 α -NF- κ B信号通路研究茯苓散治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(1):80-87.
- [20] 李丹阳,艾民,周派,等. 肾虚证阿尔兹海默病证结合小鼠模型的构建及评价[J/OL]. 中药药理与临床, 2024:1-21[2024-10-24]. <https://link.cnki.net/doi/10.13412/j.cnki.zyy1.20241024.003>.
- [21] 刘传芬,宋征宇,张晓丽,等. 番茄红素调节JAK2/STAT3/VEGF信号通路对脑小血管病大鼠血脑屏障和神经损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(11):2343-2349.
- [22] WANG H J, ZHOU L F, ZHENG Q, et al. Kai-Xin-San improves cognitive impairment in D-gal and A β_{25-35} induced ad rats by regulating gut microbiota and reducing neuronal damage[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329:118161.
- [23] WANG Z L, FANG C C, YAO M T, et al. Research progress of NF- κ B signaling pathway and thrombosis[J]. Front Immunol, 2023, 14:1257988.
- [24] HE J J, WU T Q, YAN S R, et al. S100A4 promotes experimental autoimmune encephalomyelitis by impacting microglial inflammation through TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142(Pt A):112849.
- [25] ZHANG Z Y, LIU D, LV R, et al. FBL promotes LPS-induced neuroinflammation by activating the NF- κ B signaling pathway[J]. J Inflamm Res, 2024, 17:2217-2231.

(收稿日期:2024-11-22 修回日期:2025-04-12)

(编辑:张元媛)