# 淫羊藿苷对阿尔茨海默病模型大鼠海马区TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路的影响

谢立全，陈远园

杭州市中医院老年病科，浙江 杭州 310007

［摘要］**目的：**观察淫羊藿苷对阿尔茨海默病（AD）模型大鼠海马区Toll样受体4（TLR4）/髓样分化因子88（MyD88）/核因子κB p65（NF-κB p65）信号通路的影响。**方法：**将60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组（0.25 mg/kg盐酸多奈哌齐）、淫羊藿苷低、中、高剂量组（30.00、60.00、120.00 mg/kg）。除假手术组外，其余大鼠均注射$A\beta_{25-35}$建立AD模型。治疗4周后，采用Morris水迷宫测试空间学习能力；试剂盒检测海马组织超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）和丙二醛（MDA）活性；酶联免疫吸附法检测海马组织炎症因子［肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-1β（IL-1β）和白细胞介素-6（IL-6）］和神经递质［乙酰胆碱酯酶（AchE）、乙酰胆碱（Ach）、胆碱乙酰转移酶（ChAT）］水平；苏木精-伊红（HE）染色观察大鼠海马区神经元病理情况；Western blot检测海马组织TLR4、MyD88、NF-κB p65、剪切化半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶-3（C-Caspase3）、B-淋巴细胞瘤基因-2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）蛋白表达。**结果：**与假手术组比较，模型组大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期增加（$P<0.05$），穿越平台次数、原平台象限停留时间减少（$P<0.05$）；模型组大鼠海马组织Ach、ChAT、SOD、CAT水平及Bcl-2蛋白表达显著降低（$P<0.05$），AchE、MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6水平及Bax、C-Caspase-3、TLR4、MyD88、NF-κB p65蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；模型组大鼠海马CA1区可见神经元排列紊乱、神经元细胞结构疏松、核固缩、有空泡结构形成。与模型组比较，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组大鼠在Morris水迷宫中的逃避潜伏期减少（$P<0.05$），原平台象限停留时间和穿越平台次数增加（$P<0.05$）；海马组织Ach、ChAT、SOD、CAT水平及Bcl-2蛋白表达显著升高（$P<0.05$），AchE、MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6水平及Bax、C-Caspase-3、TLR4、MyD88、NF-κB p65蛋白表达显著降低（$P<0.05$）。给药后，各给药组大鼠海马CA1区神经元损伤有不同程度的改善。**结论：**淫羊藿苷可通过调节TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路，减轻大鼠海马氧化应激和炎症反应，抑制神经元细胞凋亡，从而缓解AD。

［关键词］阿尔茨海默病；淫羊藿苷；神经递质；炎症因子；氧化应激；细胞凋亡

［中图分类号］R749.1 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）01-0006-07

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.01.002

## Effect of Icariin on TLR4/MyD88/NF-κB p65 Signaling Pathway in Hippocampus in Rat Models of Alzheimers Disease

*XIE Liquan, CHEN Yuanyuan*

**Abstract: Objective:** To observe the effect of icariin on toll-like receptor 4(TLR4)/myeloid differentiation factor 88(MyD88) /nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B(NF-κB p65) signaling pathway in hippocampus in rat models of Alzheimers disease(AD). **Methods:** A total of 60 SD rats were randomly divided into the sham operation group, the model group, the positive control group(0.25 mg/kg Donepezil

［收稿日期］2022-06-09
［修回日期］2022-10-25
［作者简介］谢立全（1987-），男，主治医师，E-mail：551668757@163.com。
［通信作者］陈远园（1974-），女，硕士，副主任医师，E-mail：99504522@qq.com。

Hydrochloride), and the icariin groups of low dosage, medium dosage and high dosage(30.00, 60.00 and 120.00 mg/kg respectively). Except the rats in the sham operation group, all rats were injected with $A\beta_{25-35}$ to establish AD models. After four-week treatment, Morris water maze was used to test the spatial learning ability; the activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT), and malondialdehyde (MDA) in hippocampus were detected with the kit; enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the levels of inflammatory factors [tumor necrosis factor(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6)] and neurotransmitters [acetylcholinesterase(AchE), acetylcholine(Ach), choline acetyltransferase(ChAT)] in hippocampus; Hematoxylin and Eosin(HE) staining was used to observe the pathological changes of hippocampal neurons in rats; Western blot was used to detect the protein expressions of TLR4, MyD88, NF-κB p65, cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3(C-Caspase3), and B-cell lymphoma-2[Bcl-2, Bcl-2-associated X protein(Bax)] in hippocampus. **Results:** The escape latency in Morris water maze of rats in the model group was prolonged when compared with that in the sham operation group($P<0.05$), and the number of platform crossings and the time spent in the original platform quadrant in the model group were decreased($P<0.05$). The levels of Ach, ChAT, SOD and CAT in hippocampus and the protein expression of Bcl-2 in rats in the model group were significantly decreased when compared with those in the sham operation group, and the levels of AchE, MDA, TNF-α, IL-β and IL-6, and the protein expressions of Bax, C-Caspase-3, TLR4, MyD88 and NF-κB p65 were significantly increased($P<0.05$). In the CA1 region of the hippocampus in rat models, there were disordered arrangement of neurons, loose neuronal cell structure, karyopyknosis of neurons, and the formation of vesicles. The escape latency in Morris water maze of rats in the positive control group, and the icariin groups of medium dosage and high dosage was shortened when compared with that in the model group($P<0.05$), and the number of platform crossings and the time spent in the original platform quadrant in the model group were increased($P<0.05$). The levels of Ach, ChAT, SOD and CAT in hippocampus and the protein expression of Bcl-2 in rats in the positive control group, and the icariin groups of medium dosage and high dosage were significantly increased when compared with those in the model group, and the levels of AchE, MDA, TNF-α, IL-β and IL-6, and the protein expressions of Bax, C-Caspase-3, TLR4, MyD88 and NF-κB p65 were significantly decreased($P<0.05$). After administration, neuronal damage in the CA1 region of the hippocampus was improved to various degrees in rats of each administration group. **Conclusion:** Icariin can regulate TLR4/MyD88/NF-κB p65 signaling pathway to relieve oxidative stress and inflammatory responses in hippocampus of rats and inhibit neuronal apoptosis, thus alleviates AD.

**Keywords:** Alzheimers disease; Icariin; Neurotransmitters; Inflammatory factors; Oxidative stress; Apoptosis

阿尔茨海默病(AD)是以进行性认知障碍和记忆能力下降为主要临床表现的神经退行性疾病，其发病与淀粉样β蛋白(Aβ)干扰信号传导以及募集小胶质细胞引起神经毒性相关[1]。当前治疗AD的药物以胆碱酯酶抑制剂和NMDA受体选择性拮抗剂为主，对认知障碍、妄想等症状有一定缓解作用，但无法逆转病情进展[2]。淫羊藿具有补益肾阳、强健筋骨、祛风除湿的功效，是中医治疗AD的常用药物[3]。淫羊藿苷是淫羊藿的活性成分之一，具有调节免疫、抗氧化、抗骨质疏松作用，研究表明淫羊藿苷可穿透血脑屏障直接作用于中枢神经系统，具有一定的治疗神经系统疾病的优势，但具体机制尚不明

确[4-5]。本研究观察淫羊藿苷对AD大鼠认知功能的改变及对神经炎症、细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级雄性SD大鼠60只，6~8周龄，体质量200~220 g，购于北京斯贝福生物技术公司[许可证号：SCXK(京)2019-0010]。大鼠饲养于浙江中医药大学动物实验室，饲养温度18～26 ℃，湿度40%～70%，可自由摄入饮食。

**1.2 药物与试剂** 淫羊藿苷(纯度≥98.0%，北京康瑞纳生物科技有限公司，批号：A2148)；盐酸多奈哌齐片(卫材药业有限公司，国药准字H20050978)；淀粉样β蛋白片段25-35($A\beta_{25-35}$)(sigma公司，批号：A4559)；超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所，批号：A00132、A00721、A00312)；肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6大鼠ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司，批号：EK0526、EK0393、EK1742)；乙酰胆碱酯酶(AchE)、乙酰胆碱(Ach)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)大鼠ELISA试剂盒(博辉生物科技有限公司，批号：EKR31032、EKR31031、EKR31172)；B-细胞淋巴瘤基因-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、剪切化半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶-3(C-Caspase-3)、Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核因子-κB p65(NF-κB p65)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体购自Abcam公司(批号：ab32124、ab182734、ab32042、ab217274、ab133739、ab32536、ab8226)。

**1.3 动物造模、分组及给药** 大鼠适应性喂养7 d后，开始造模。60只SD雄性大鼠随机选取50只大鼠进行AD造模，剩下10只大鼠分为假手术组。参考文献[6]进行AD造模，方法如下：$A\beta_{25-35}$用无菌0.9%氯化钠溶液溶解(4 μg/μL)后，37 ℃孵育7 d；采用舒泰50麻醉大鼠并固定头部，除假手术组外，在其余大鼠双侧海马CA1区注射$A\beta_{25-35}$ 5 μL，假手术组大鼠注射等体积无菌0.9%氯化钠溶液，持续7 d。采用Morris水迷宫实验检测大鼠学习和记忆能力，若出现逃避潜伏期显著高于假手术组，原平台象限停留时间和穿越平台次数显著减少，表明模型建立成功[7]。将成功造模的50只大鼠，随机分为模型组，阳性对照组，淫羊藿苷低、中、高剂量组5组，每组10只。造模结束后进行药物治疗，阳性对照组大鼠给予盐酸多奈哌齐0.25 mg/kg，参考文献[7]确定淫羊藿苷低、中、高剂量组为30.00、60.00、120.00 mg/kg，灌胃对应剂量淫羊藿苷，假手术组和模型组灌胃等体积0.9%氯化钠溶液，治疗4周。

**1.4 Morris水迷宫检测大鼠学习记忆能力** 治疗结束后第2天，参考文献[8]对大鼠进行Morris水迷宫测试，评估大鼠的空间学习能力。该测试需要6 d完成，前5 d大鼠进行寻找平台训练，观察大鼠在120 s内找到水下平台的时间(逃避潜伏期)；第6天撤去平台，记录120 s内大鼠在原平台所在象限停留的时间和跨越虚拟平台的次数。

**1.5 苏木精-伊红(HE)染色检测海马病理学改变** Morris水迷宫实验结束后，将大鼠断头取脑，冰上分离海马，延长轴分为左右两部分，一部分固定于4%甲醛溶液，一部分用于生化分析。大鼠海马组织固定于4%甲醛溶液中48 h后，采用70%、80%、95%和无水乙醇梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋组织块后，切成4 μm厚度左右切片；再用二甲苯脱蜡，无水乙醇、95%、80%、75%乙醇梯度酒精水化；苏木精染色3 min，冲洗多余染色液，盐酸酒精分化3 s；自来水冲洗，伊红染料染色3 min；脱水、透明后，封片，在光学显微镜(奥利巴斯，CX33)下观察海马CA1区病理学改变。

**1.6 试剂盒检测海马组织SOD、CAT、MDA水平** 将脑组织冰上匀浆后，在离心半径10 cm，6 000 r/min条件下离心10 min。按照试剂盒说明书要求步骤检测海马组织SOD、CAT和MDA水平。

**1.7 酶联免疫吸附法检测炎症因子和神经递质水平** 将脑组织冰上匀浆后，BCA法进行蛋白定量，采用酶联免疫吸附法检测海马组织炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)水平以及神经递质(Ach、AchE、ChAT)水平，实验步骤按照试剂盒说明书进行严格操作。

**1.8 Western blot检测海马组织蛋白表达水平** 海马组织冰上匀浆，试剂盒提取总蛋白，BCA法检测蛋白浓度。配置电泳凝胶进行电泳，然后电转到硝酸纤维素(NC)膜上，用5%脱脂牛奶封闭2 h，4 ℃孵育一抗(1∶800)过夜，再孵育二抗(1∶5 000)2 h，显色后采用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

**1.9　统计学方法**　数据采用SPSS24.0进行统计学分析，计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示，重复测量资料采用重复测量方差分析，多组间比较采用单因素方差分析，事后分析采用LSD-$t$检验，$P<0.05$则表示差异有统计学意义。

## 2　结果

**2.1　各组AD大鼠学习记忆能力比较**　见表1、表2。随着训练时间的增加，各组大鼠逃避潜伏期较前一天减少($P<0.05$)。与假手术组比较，模型组大鼠逃避潜伏期均增加($P<0.05$)，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组均低于模型组($P<0.05$)。第6天，模型组大鼠在原平台象限停留时间和穿越平台次数均低于假手术组($P<0.05$)；阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组均高于模型组($P<0.05$)。

表1　各组AD大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm s$)　s

| 组　别 | 鼠数 | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 第4天 | 第5天 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 52.36±1.44 | 48.54±1.93③ | 35.09±1.32③ | 22.13±0.85③ | 20.59±0.71③ |
| 模型组 | 10 | 103.17±3.78① | 99.12±2.69①③ | 86.30±2.95①③ | 78.96±5.77①③ | 69.83±3.92①③ |
| 阳性对照组 | 10 | 79.62±4.28② | 58.41±3.12②③ | 56.26±3.51②③ | 50.12±2.70②③ | 47.42±2.98②③ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 99.85±5.37 | 95.43±3.82③ | 87.26±4.87③ | 73.01±3.96③ | 65.12±2.66③ |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 81.35±3.22② | 64.38±2.76②③ | 58.96±4.13②③ | 51.83±3.35②③ | 48.72±3.13②③ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 80.34±3.28② | 59.17±5.29②③ | 55.63±4.18②③ | 49.39±4.64②③ | 42.04±3.05②③ |

注：①与同时间假手术组比较，$P<0.05$；②与同时间模型组比较，$P<0.05$；③与同组前一天比较，$P<0.05$

表2　各组AD大鼠Morris水迷宫第6天大鼠穿越平台次数、原平台象限停留时间比较($\bar{x}\pm s$)

| 组　别 | 鼠数 | 原平台象限停留时间(s) | 穿越平台次数(次) |
|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 36.44±2.37 | 12.90±1.47 |
| 模型组 | 10 | 23.51±2.54① | 6.00±1.76① |
| 阳性对照组 | 10 | 33.82±3.67② | 12.10±1.95② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 25.14±1.48 | 6.80±1.53 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 29.84±3.97② | 9.20±1.36② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 24.95±2.71② | 10.80±1.42② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

**2.2　各组AD大鼠神经元病理变化比较**　见图1。HE染色结果显示，假手术组大鼠海马CA1区神经元排列有序，结构无明显异常，神经元细胞核清晰，胞浆饱满丰富；模型组大鼠海马CA1区可见神经元排列紊乱，神经元细胞结构疏松，出现核固缩，且有空泡结构形成；阳性对照组和淫羊藿苷各剂量组有不同程度地改善。

**2.3　各组AD大鼠神经递质水平比较**　见表3。与假手术组比较，模型组大鼠海马组织Ach、ChAT水平降低($P<0.05$)，AchE水平升高($P<0.05$)；与模型组比较，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马组织Ach、ChAT水平升高($P<0.05$)，AchE水平降低($P<0.05$)。

**2.4　各组AD大鼠氧化应激、神经炎症指标比较**　见表4、表5。与假手术组比较，模型组大鼠海马组织SOD、CAT水平降低($P<0.05$)，MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6水平升高($P<0.05$)；与模型组比较，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马组织SOD、CAT水平升高($P<0.05$)，MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6水平降低($P<0.05$)。

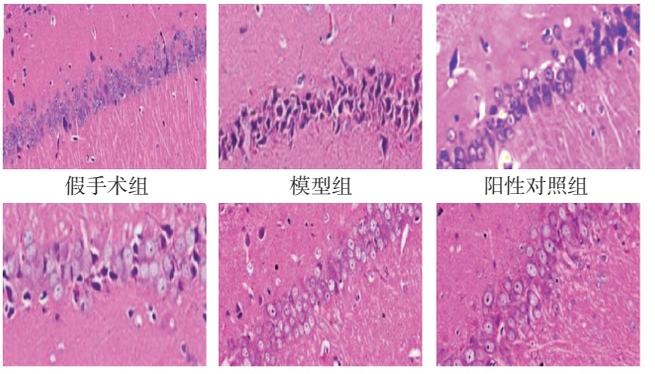



图1　各组AD大鼠海马神经元病理改变比较(×200)

表3　各组AD大鼠神经递质水平比较($\bar{x}\pm s$)

| 组　别 | 鼠数 | Ach(U/mL) | AchE(U/mL) | ChAT(U/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 5.43±0.38 | 714.05±153.89 | 842.93±28.11 |
| 模型组 | 10 | 3.15±0.46① | 1 310.35±156.62① | 461.10±58.32① |
| 阳性对照组 | 10 | 5.35±0.28② | 866.43±161.07② | 749.68±58.04② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 3.24±0.46 | 1 245.29±96.53 | 475.98±50.32 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 4.69±0.52② | 1 075.27±144.31② | 592.63±61.89② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 4.83±0.37② | 872.59±100.65② | 730.95±46.35② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

表4　各组AD大鼠氧化应激指标比较($\bar{x}\pm s$)

| 组　别 | 鼠数 | SOD(U/mL) | CAT(U/mL) | MDA(mmol/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 168.52±14.69 | 7.13±0.93 | 4.71±0.34 |
| 模型组 | 10 | 79.60±6.34① | 4.63±0.25① | 8.04±0.27① |
| 阳性对照组 | 10 | 154.38±5.51② | 6.18±0.31② | 5.32±0.28② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 83.91±4.86 | 4.82±0.48 | 7.83±0.39 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 125.13±10.65② | 5.78±0.62② | 6.26±0.45② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 156.17±13.42② | 6.45±.041② | 5.64±0.59② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

表5　各组AD大鼠神经炎症指标比较($\bar{x}\pm s$)　pg/mL

| 组　别 | 鼠数 | TNF-α | IL-1β | IL-6 |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 1 446.93±134.39 | 265.69±15.16 | 283.62±18.73 |
| 模型组 | 10 | 2 393.84±267.36① | 580.85±36.24① | 583.01±38.71① |
| 阳性对照组 | 10 | 1 247.13±152.49② | 276.98±23.49② | 315.85±47.23② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 2 297.74±243.78 | 565.37±34.85 | 562.17±29.74 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 1 590.92±136.47② | 386.47±20.69② | 367.12±37.04② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 1 218.63±164.07② | 331.68±21.70② | 328.77±36.68② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

**2.5　各组AD大鼠海马Bax、Bcl-2、C-Caspase-3蛋白表达比较**　见图2、表6。与假手术组比较，模型组大鼠海马组织Bax、C-Caspase-3蛋白表达均明显增加($P<0.05$)，Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$)；与模型组比较，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马组织Bax、C-Caspase-3蛋白表达降低($P<0.05$)，Bcl-2蛋白表达增加($P<0.05$)。

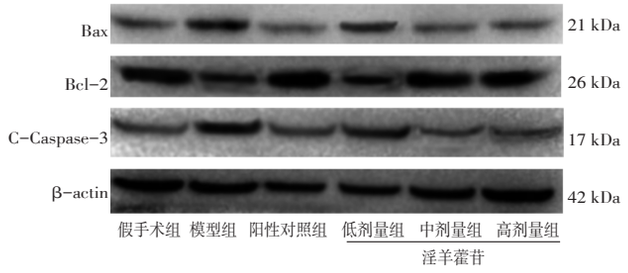



图2　各组大鼠海马Bax、Bcl-2、C-Caspase-3蛋白条带图

表6　各组AD大鼠海马Bax、Bcl-2、C-Caspase-3蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

| 组　别 | 鼠数 | Bax | Bcl-2 | C-Caspase-3 |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 0.44±0.09 | 1.04±0.17 | 0.65±0.08 |
| 模型组 | 10 | 0.62±0.10① | 0.87±0.14① | 0.92±0.17① |
| 阳性对照组 | 10 | 0.47±0.11② | 1.33±0.16② | 0.68±0.12② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 0.58±0.06 | 0.90±0.12 | 0.85±0.16 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 0.52±0.12② | 1.07±0.10② | 0.70±0.22② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 0.41±0.05② | 1.26±0.15② | 0.66±0.14② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

**2.6　各组AD大鼠TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路蛋白表达比较**　见图3、表7。与假手术组比较，模型组大鼠海马组织TLR4、MyD88、NF-κB p65蛋白表达明显升高($P<0.05$)，与模型组比较，阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组大鼠海马组织TLR4、MyD88、NF-κB p65蛋白表达明显降低($P<0.05$)。

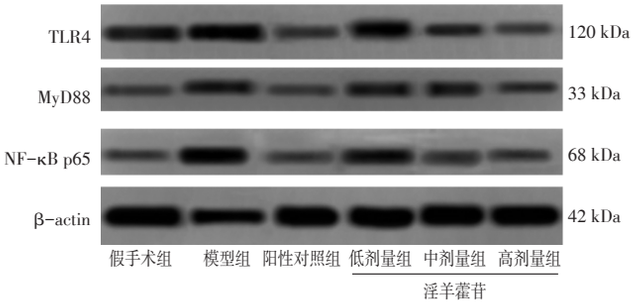



图3　各组大鼠TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路蛋白条带图

表7　各组AD大鼠TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

| 组　别 | 鼠数 | TLR4 | MyD88 | NF-κB p65 |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 10 | 0.60±0.06 | 0.44±0.08 | 0.43±0.05 |
| 模型组 | 10 | 0.88±0.14① | 0.81±0.16① | 0.86±0.13① |
| 阳性对照组 | 10 | 0.69±0.12② | 0.53±0.07② | 0.78±0.14② |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 10 | 0.86±0.17 | 0.71±0.19 | 0.82±0.13 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 10 | 0.53±0.07② | 0.62±0.08② | 0.59±0.09② |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 10 | 0.43±0.05② | 0.58±0.06② | 0.54±0.07② |

注：①与假手术组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

## 3　讨论

淫羊藿苷是淫羊藿主要活性成分之一，大量的研究证实淫羊藿苷有减轻炎症反应、保护神经、抗氧化等作用，能够有效防治帕金森、脑卒中、AD等中枢神经系统疾病[9-11]。本研究选择脑内注射$A\beta_{25-35}$造模，结果发现，模型组大鼠Morris水迷宫前5天的逃避潜伏期较假手术组显著增加；第6天原平台象限停留时间和穿越平台次数显著减少，提示$A\beta_{25-35}$造模成功。在此次研究中，发现淫羊藿苷中、高剂量组及阳性对照组大鼠的第6天原平台象限停留时间和穿越平台次数较模型组增加；给药大鼠海马CA1区排列紊乱，神经元细胞结构疏松，核固缩，且有空泡结构形成的病理情况得到缓解，提示淫羊藿苷可显著改善AD大鼠学习和记忆能力，能够改善海马CA1区神经元损伤。雷剑等[12]也发现了类似的结果，即淫羊藿苷能够减轻七氟醚诱发的术后认知功能障碍(POCD)小鼠的认知功能，保护海马神经元。

AD的发病机制目前存在多种假说，其中胆碱能假说认为AD患者产生认知功能障碍与脑内Ach减少有关，其中Ach由ChAT催化合成，受到AchE降解，研究发现提高脑内ChAT、Ach水平，降低AchE水平有利于改善AD引起的认知功能障碍[13-14]。本研究发现淫羊藿苷可以提高AD模型大鼠海马组织Ach、ChAT水平，降低AchE水平，提示淫羊藿苷能通过调节胆碱能系统和神经递质平衡来改善大鼠认知功能，与前人研究发现采用淫羊藿苷调节胆碱能系统改善大鼠的认知功能结果相类似[15]。

既往网络药理学研究发现，淫羊藿治疗AD的靶点主要与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等有关[16-17]。氧化应激引起的神经炎症在AD发生发展中至关重要，SOD和CAT为抗氧化酶，MDA是脂质氧化产物，均能反映氧化还原水平[18]。Aβ引起的氧化应激促使神经元细胞损伤，释放大量炎症因子，加速神经元细胞凋亡，其中Bax能促进细胞凋亡，Bcl-2通过抑制Bax激活来抑制细胞凋亡，Caspase-3激活后可水解蛋白质、裂解DNA，是细胞凋亡过程的最后一步[19-22]。本研究中，淫羊藿苷提高AD大鼠海马组织中SOD、CAT水平，降低MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6水平，下调Bax、C-Caspase-3蛋白表达，上调Bcl-2蛋白表达，表明淫羊藿苷能改善AD大鼠的氧化应激和神经炎症反应，抑制神经元细胞凋亡。前人研究发现中药抗氧化作用、抗炎、抗凋亡均可有效改善AD大鼠的认知障碍，提高认知功能[23-24]。

TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路与氧化应激、炎症反应以及细胞凋亡密切相关。TLR4主要在小胶质细胞表面表达，AD发病过程中，TLR4识别脑内Aβ后可招募MyD88进而激活NF-κB，活化的NF-κB从细胞质转移到细胞核，促进炎症因子IL-1β、TNF-α大量分泌，引起神经炎症，介导神经元细胞凋亡[25]。本研究中，淫羊藿苷可下调AD大鼠海马组织中TLR4、MyD88、NF-κB p65蛋白表达水平，表明淫羊藿苷可能通过调控TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路起到抗氧化、抗炎作用，减少神经元凋亡，从而改善AD。研究发现，采用TLR4抑制剂TAK-242靶向抑制TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路后，小鼠小胶质细胞BV-2中由Aβ诱导的氧化应激和炎症反应明显减轻[26]。

综上所述，淫羊藿苷能够通过介导TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路减轻大鼠海马氧化应激和炎症反应，抑制神经元细胞凋亡，逆转AD大鼠海马区神经元损伤来改善AD。

## [参考文献]

[1] TIWARI S，ATLURI V，KAUSHIK A，et al. Alzheimer′s disease：pathogenesis，diagnostics，and therapeutics[J]. Int J Nanomedicine，2019，14：5541-5554.

[2] 王思懿，李现想，刘宜周，等. 阿尔茨海默症治疗药物现状及展望[J]. 神经药理学报，2020，10(5)：38-42.

[3] 芦锰，周雨慧，李晓宁，等. 基于数据挖掘中医药治疗阿尔茨海默病用药规律研究[J]. 中国中药杂志，2021，46(6)：1558-1563.

[4] WANG S，MA J，ZENG Y，et al. Icariin，an Up-and-Coming Bioactive Compound Against Neurological Diseases：Network Pharmacology-Based Study and Literature Review[J]. Drug Des Devel Ther，2021，15：3619-3641.

[5] 闫磊，胡江平，邵新然，等. 淫羊藿苷联合冰片对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠抗氧化活性、炎症反应和血脑屏障通透性影响[J]. 陕西中医，2018，39(12)：1659-1662.

[6] WU W，HE X，XIE S，et al. Protective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang against $A\beta_{25-35}$-induced memory deficits and oxidative stress in rats[J]. J Int Med Res，2020，48(3)：300060519893859.

[7] 方丽媛，王平，谭爱华，等. 淫羊藿苷和固本方对肾虚型老年痴呆大鼠行为及病理学的作用[J]. 中华中医药杂志，2017，32(12)：5322-5326.

[8] 何川，黄重生，陈虹茹，等. 预针刺对阿尔茨海默病样大鼠学习记忆能力及海马区NLRP3炎性小体相关蛋白的影响[J]. 中国针灸，2020，40(12)：1323-1327.

[9] 李聪聪，赵鹏，秦燕勤，等. 淫羊藿苷的药理活性研究进展[J]. 中医学报，2020，35(4)：781-786.

[10] ZHANG B，WANG G，HE J，et al. Icariin attenuates neuroinflammation and exerts dopamine neuroprotection via an Nrf2-dependent manner[J]. J Neuroinflammation，2019，16(1)：92.

[11] DONG H，MING S，FANG J，et al. Icariin ameliorates angiotensin Ⅱ-induced cerebrovascular remodeling by inhibiting Nox2-containing NADPH oxidase activation[J]. Hum Cell，2019，32(1)：22-30.

[12] 雷剑，张昌盛，吴宝. 淫羊藿苷减轻七氟醚诱导的小鼠认知功能障碍[J]. 基础医学与临床，2022，42(10)：1497-1503.

[13] 郭佳旗，魏颖鸿，张慧，等. 阿尔茨海默病发病机制及基于神经递质治疗的研究进展[J]. 医学综述，2021，27(19)：3761-3766.

[14] HALDER N，LAL G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity[J]. Front Immunol，2021，12：660342.

[15] 刘运琴，刘燕芹，戢汉斌，等. 淫羊藿苷对精神分裂症模型大鼠认知功能的改善作用及机制[J]. 中国药房，2021，32(7)：812-818.

[16] 张运辉，周小青，伍大华，等. 基于网络药理学的淫羊藿治疗阿尔茨海默病作用机制研究[J]. 中国现代应用药学，2021，38(16)：1945-1951.

[17] CHEIGNON C，TOMAS M，BONNEFONT-ROUSSELOT D，et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease[J]. Redox Biol，2018，14：450-464.

[18] GANGULY U，KAUR U，CHAKRABARTI S S，et al. Oxidative Stress，Neuroinflammation，and NADPH Oxidase：Implications in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：7086512.

[19] 李冉，田子明. 肉桂提取物对阿尔茨海默病大鼠学习记忆和氧化应激水平的影响及机制[J]. 中国老年学杂志，2022，42(11)：2811-2815.

[20] 彭超，张艳，米彩云，等. 中医方药对阿尔茨海默病NF-κB信号通路调控的研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27(10)：1675-1679.

[21] PEÑA-BLANCO A，GARCÍA-SÁEZ A J. Bax，Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis[J]. FEBS J，2018，285(3)：416-431.

[22] OSTAPCHENKO V G，SNIR J，SUCHY M，et al. Detection of Active Caspase-3 in Mouse Models of Stroke and Alzheimer's Disease with a Novel Dual Positron Emission Tomography/Fluorescent Tracer [68Ga]Ga-TC3-OGDOTA[J]. Contrast Media Mol Imaging，2019，2019：6403274.

[23] 姬令山，秦合伟，王改凤，等. 地黄饮子通过调控miR-34a-5p影响细胞凋亡及炎性反应治疗阿尔茨海默病的机制[J]. 北京中医药大学学报，2022，45(1)：53-61.

[24] 路宇仁，陈昳冰，崔元璐，等. 淫羊藿苷药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(17)：209-220.

[25] CAI Y，CHAI Y，FU Y，et al. Salidroside Ameliorates Alzheimer's Disease by Targeting NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis[J]. Front Aging Neurosci，2022，13：809433.

[26] CHEN R，WANG Z，ZHI Z，et al. Targeting the TLR4/NF-κB pathway in β-amyloid-stimulated microglial cells：A possible mechanism that oxysophoridine exerts anti-oxidative and anti-inflammatory effects in an in vitro model of Alzheimer's disease[J]. Brain Res Bull，2021，175：150-157.

（责任编辑：冯天保，沈崇坤）