

· 基础研究 ·

生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠海马 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路的影响

龙清华^{1,2} 赵宾宾³ 丁 莉³ 王 平³

摘要 **目的** 观察生慧汤对 APP/PS1 痴呆小鼠海马酪氨酸蛋白激酶 2 (JAK2) / 信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) / 细胞因子信号抑制物 1 (SOCS-1) 信号通路的影响, 并探讨其改善阿尔茨海默病 (AD) 突触可塑性的机制。**方法** 将 36 只 APP/PS1 小鼠随机分为 APP/PS1 组、多奈哌齐 (donepezil) 组和生慧汤 (SHD) 组, 另将 12 只 C57BL/6JNju 小鼠设为空白 (WT) 组。Donepezil 组按 0.92 mg / (kg·d) 的剂量灌胃多奈哌齐配置的混悬液, SHD 组按 13.5 g / (kg·d) 的剂量灌胃生慧汤水煎液, WT 组和 APP/PS1 组灌胃等体积的纯水。各组连续治疗 4 周, 采用 Morris 水迷宫实验和跳台实验评价小鼠的认知功能。尼氏染色观察小鼠海马区神经元病理形态; 高尔基染色观察小鼠海马区神经元树突棘的变化; 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和实时聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 分别检测小鼠海马中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的含量及其 mRNA 表达水平; 采用蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测小鼠海马离子钙结合蛋白 (IBA1)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、JAK2、p-JAK2-Tyr1007、STAT3、p-STAT3-Tyr705、SOCS-1 的蛋白表达水平。**结果** 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠平台潜伏期、游泳总路程和出错次数增加 ($P < 0.01$), 穿越平台次数、目标象限停留时间和潜伏期减少 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠平台潜伏期、游泳总路程和出错次数减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 穿越平台次数、目标停留象限时间和潜伏期增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元数量及树突棘密度显著减少 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元数量及树突棘密度增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量及 mRNA 水平增加 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量及 mRNA 水平减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 生慧汤可通过抑制神经炎症改善 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性, 其机制可能与其抑制 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路有关。

关键词 阿尔茨海默病; 生慧汤; 神经炎症; 突触可塑性; JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路

Effect of Shenghui Decoction on JAK2/STAT3/SOCS-1 Signaling Pathway in the Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Mice LONG Qing-hua^{1,2}, ZHAO Bin-bin³, DING Li³, and WANG Ping³ 1 Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Hubei (445000); 2 Department of Medicine, Hubei Minzu University, Hubei (445000); 3 Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065)

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No.82130119); 湖北省自然科学基金青年项目 (No.2021CFB206); 湖北民族大学高水平科研成果校内培育项目 (No.PY21015)

作者单位: 1. 湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室 (湖北 445000); 2. 湖北民族大学医学部 (湖北 445000); 3. 湖北中医药大学老年医学研究所 (武汉 430065)

通讯作者: 王 平, Tel: 027-6889008, E-mail: pwang54@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221017.182

ABSTRACT Objective To observe the effect of Shenghui Decoction on the janus kinase 2 (JAK2) / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) / suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) signaling pathway of hippocampus in APP/PS1 dementia mice, and explore the mechanism that Shenghui Decoction improved the synaptic plasticity of Alzheimer's disease (AD) . **Methods** Thirty-six APP/PS1 mice were randomly divided into APP/PS1 group, donepezil group and Shenghui Decoction (SHD) group, another twelve C57BL/6JNju mice were set as control (WT) group. Donepezil group was given a suspension of donepezil at a dose of 0.92 mg/ (kg · d) , SHD group was given Shenghui Decoction at a dose of 13.5 g/ (kg · d) , WT group and APP/PS1 group was given an equal volume of pure water. Each group was continuously treated for 4 weeks, and the cognitive function of mice was evaluated by Morris water maze test and platform jumping test. Nissl staining was used to observe the pathological morphology of neurons in the hippocampus of mice. Golgi-Cox staining was used to observe the changes in the dendritic spines of neurons in the hippocampus of mice. ELISA were used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) in the hippocampus of mice. Real-time PCR was used to detect the mRNA levels of TNF- α and IL-1 β in the hippocampus of mice. The protein expression levels of ion-calcium-binding protein (IBA1) , glial fibrillary acidic protein (GFAP) , JAK2, p-JAK2-Tyr1007, STAT3, p-STAT3-Tyr705 and SOCS-1 in the hippocampus of mice were also detected by Western Blot. **Results** Compared with the WT group, the escape latency, total swimming distance and error times in the APP/PS1 group were significantly increased ($P < 0.01$) , while the number of crossing platform, time staying in the target quadrant and step down latency were significantly reduced ($P < 0.01$) . Compared with the APP/PS1 group, the escape latency, total swimming distance and error times in the Donepezil group and SHD group were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$) , while the number of crossing platform, time staying in the target quadrant and step down latency were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . Compared with the WT group, the number of neurons in the CA3 and DG areas of the hippocampus of the APP/PS1 group and the dendritic spine density were significantly reduced ($P < 0.01$) . Compared with the APP/PS1 group, the number of neurons in the CA3 and DG areas of the hippocampus in the Donepezil group and the SHD group and the dendritic spine density were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . Compared with the WT group, the content and mRNA of TNF- α and IL-1 β in the hippocampus of the APP/PS1 group were significantly increased ($P < 0.01$) . Compared with the APP/PS1 group, the content and mRNA of TNF- α and IL-1 β in the hippocampus of the Donepezil group and SHD group were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . Compared with the WT group, the protein expression levels of IBA1, GFAP, p-JAK2-Tyr1007/JAK2, p-STAT3-Tyr705/STAT3 and SOCS-1 in the hippocampus of the APP/PS1 group were increased ($P < 0.01$) , while the above phenomenon was reversed by Donepezil and SHD ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . **Conclusion** Shenghui Decoction could improve hippocampal synaptic plasticity of APP/PS1 mice via inhibiting neuroinflammation, and its mechanism may be related to its inhibition of JAK2/STAT3/SOCS-1 signaling pathway.

KEYWORDS Alzheimer's disease; Shenghui Decoction; neuroinflammation; synaptic plasticity; JAK2/STAT3/SOCS-1 signaling pathway

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以认知损伤为核心症状的神经退行性疾病。近年来,随着全球人口老龄化的加剧,AD 的患病率也日益增加,相关研究显示当前全球罹患 AD 人数已突破 5 000 万人,进一步估算发现全球范围内每 3 秒就有 1 例 AD 确诊病例^[1]。AD 的高发病率将对我国经济和社会造成沉重负担,相关研究估计 2050 年我国用于 AD 的总花费将超过 9 000 亿美元^[2]。目前学术界较为公认的 AD 发病机制主要有胆碱能损伤假说、 β -淀粉样蛋白 (A β) 级联假说和 Tau 蛋白磷酸化假说,然而基于上述假说研发的药物仅能改善症状或临床药

物研发以失败告终^[3]。因此,AD 的防治形势日益严峻,迫切需要更为有效的治疗方式。临床和动物实验证实神经元和突触损伤为 AD 的典型病理改变,越来越多的研究则将目标投向突触可塑性,有研究者统计发现当前 AD 新药研发中有 27.3% 的药物为靶向突触可塑性的药物^[4-6]。AD 神经元和突触损伤形成机制复杂,其中神经炎症为其形成的重要因素,抑制神经炎症则可改善 AD 突触可塑性。最近研究发现酪氨酸蛋白激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) / 信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) / 细胞因子信号抑制物 1

(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS-1) 信号通路具有调节神经炎症的作用, 而抑制该信号通路则可缓解 AD 神经元和突触损伤, 并能改善突触可塑性^[7-9]。

AD 属于中医学“健忘”“痴呆”的范畴。AD 病位在脑, 其发病与心脾肾功能失调有关, 其中脾肾亏虚、心神失养、痰蒙脑窍为其重要病机。因此, 补肾健脾、养心安神和祛痰开窍为防治 AD 的重要治法。生慧汤出自陈士铎《辨证录·健忘门》, 具有补肾健脾、养心安神和祛痰开窍之功, 为治疗健忘的经典方^[10]。本课题组前期研究发现, 生慧汤可通过抑制海马神经炎症改善 APP/PS1 痴呆小鼠的认知功能和昼夜节律紊乱, 但尚不能确定其是否具有改善 AD 突触可塑性的作用^[11, 12]。基于上述研究背景及课题组前期研究基础, 本研究将 APP/PS1 痴呆小鼠作为 AD 模型, 拟从 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路研究生慧汤改善突触可塑性的分子机制, 从而为生慧汤防治 AD 提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 APP/PS1 小鼠 45 只, 5 月龄, 体重 25~28 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [许可证号: SCXK (京): 2014-0004]。相同月龄和遗传背景的空白对照 C57BL/6JNju 小鼠 15 只, 购自北京维通利华实验技术有限公司 [动物许可证号: SCXK (京): 2016-0006]。动物饲养于湖北中医药大学中医药实验中心 SPF 级动物房 [动物实验条件许可证号: SYXK (鄂): 2017-0067], 房内温度 23~25℃, 相对湿度 50%~60%, 动物可自由摄食和饮水。本实验经湖北中医药大学动物伦理委员会审核批准 (No. 82130119)。

2 药物及其制备 多奈哌齐片 (5 mg, 卫材药业有限公司, 批号: 1706065)。熟地黄 (30 g, 亳州华云中药饮片, 产地: 河南, 批号: 190301); 山茱萸 (12 g, 湖北时安饮片药业, 产地: 河南, 批号: 18030100); 人参 (9 g, 天济中药饮片, 产地: 吉林, 批号: 201902018); 石菖蒲 (1.5 g, 天济中药饮片, 产地: 湖北, 批号: 201807002); 白芥子 (6 g, 湖北金贵中药饮片, 产地: 湖北, 批号: A170901); 远志 (6 g, 亳州沪谯药业, 产地: 山西, 批号: 1903150212); 酸枣仁 (15 g, 安国瑞琪中药材, 产地: 河北, 批号: 201903142); 柏子仁 (15 g, 樟树安仁中药饮片, 产地: 山东, 批号: 201901108); 茯神 (9 g, 安徽新盛中药饮片, 产地: 安徽, 批号:

190211043i)。所有饮片经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准。混合饮片, 纯水煎煮 2 次后置旋转蒸发仪, 并将药液浓缩成含生药 1.35 g/mL。

3 试剂与仪器 尼氏染色液 (批号: GP1043)、高尔基染色液 (批号: GP1045), 武汉 Servicebio 公司。TRIzol (批号: P2043045), 美国 Thermo Scientific 公司。逆转录试剂盒 (批号: SA017A)、SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂盒 (批号: 1701244), 日本 TaKaRa 公司。小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、小鼠白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫吸附测定试剂盒, 购自武汉 Elabscience 公司 (批号: E-EL-M0049c、E-EL-M0037c)。离子钙结合蛋白 (calcium-binding protein, IBA1) 兔抗小鼠抗体 (批号: A12391)、胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 兔抗小鼠抗体 (批号: A14673)、JAK2 兔抗小鼠抗体 (批号: A7694)、p-JAK2-Tyr1007 兔抗小鼠抗体 (批号: AP0531)、STAT3 兔抗小鼠抗体 (批号: A11216)、p-STAT3-Tyr705 兔抗小鼠抗体 (批号: AP0070)、SOCS-1 兔抗小鼠抗体 (批号: A0820)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 兔抗小鼠抗体 (批号: AC026), 购自武汉 ABclonal 公司。HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号: 183629), 武汉 Servicebio 公司。Morris 水迷宫 (型号: Morris-ZH, 安徽正华)、跳台记录仪 (型号: SA202, 江苏赛昂斯)、组织包埋机 (型号: AP280-2, 美国 Microm 公司)、冰冻切片机 (型号: CM1520, 德国 Leica 公司)、多功能酶标仪 (型号: Synergy2, 美国 Bio-Tek 公司)、核酸蛋白仪 (型号: IMAGE 800, 美国 Beckman Coulter 公司)、荧光 PCR 仪 (型号: Rotor-Gene Q, 德国 QIAGEN 公司)、蛋白电泳仪 (型号: DYCZ-26B, 北京六一仪器厂)、凝胶成像仪 (型号: SYSTEM GelDoc XR+, 美国 Bio-Rad 公司)、正置光学显微镜 (型号: ECLIPSE E100, 日本 Nikon 公司)。

4 分组及干预 适应性饲养 1 周后, 根据 SPSS 23.0 软件生成的随机数字表将 36 只 APP/PS1 痴呆小鼠随机分为 APP/PS1 组、生慧汤 (Shenghui Decoction, SHD) 组、多奈哌齐 (Donepezil) 组, 每组 12 只。另将 12 只 C57BL/6JNju 小鼠设为空白 (WT) 组。参考课题组前期研究及临床等效剂量确定 Donepezil 组和 SHD 组的给药剂量^[11-13], 即 Donepezil 组和 SHD 组分别按照 0.92 mg / (kg · d)

和 13.5 g / (kg · d) 的剂量灌胃多奈哌齐和生慧汤制成的药液, WT 组和 APP/PS1 组则按照 20 mL / (kg · d) 的剂量灌胃等体积的纯水, 各组每天给药 1 次, 连续给药 4 周。

5 检测指标及方法

5.1 行为学检测 治疗结束后, 参考课题组前期研究进行 Morris 水迷宫实验和跳台实验^[14, 15]。Morris 水迷宫实验进行定位航行实验和空间探查实验, 定位航行实验用平台潜伏期评价小鼠的学习能力, 空间探查实验则用穿越平台次数和目标象限停留时间评价小鼠的记忆能力。跳台实验则用潜伏期和错误次数评价小鼠的学习记忆能力。

5.2 尼氏染色 行为学检测后, 从每组随机选取 3 只小鼠进行麻醉处理 (3 % 水合氯醛, 10 mL/kg), 断头取脑, 在冰上将脑分为两等分, 其中一部分置 4 % 多聚甲醛溶液固定, 另一部分置高尔基染色液固定。将脑组织置多聚甲醛溶液固定 24 h, 石蜡包埋, 使用切片机连续切取 5 μm 厚的切片。二甲苯和梯度乙醇 (100%—75%) 对脑组织进行脱蜡处理, 置尼氏染色液染色 20 min, 蒸馏水冲洗切片 5 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片。显微镜下观察切片, 用 Image J 计算海马区神经元数量。

5.3 高尔基染色 将脑组织置于由 Solution A 和 Solution B 按等比例混匀的液体, 室温避光固定 2 周后转移至 Solution C 溶液, 并于室温避光固定 3 天。切取 100 μm 厚的切片, 置 Solution C 溶液室温避光固定 3 天。Milli-Q 水冲洗切片, 将切片置于由 Solution D、Solution E 和 Milli-Q 配成的混合液 (按 1: 1: 2 的比例混合)。Milli-Q 水冲洗切片, 使用梯度乙醇 (50%—100 %) 脱水。二甲苯透明, 中性树胶封片。显微镜下观察切片, 用 Image J 计算神经元树突棘密度。

5.4 ELISA 检测 行为学检测后, 从每组随机选取 6 只小鼠进行麻醉处理, 断头取脑, 冰上分离海马, 置 -80℃ 冻存。取出脑组织, 按组织: PBS=1: 9 的比例加入 PBS, 置组织研磨仪匀浆。置 4℃

离心机以 12 000 r / min 离心 15 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书加样, 用酶标仪在 450 nm 波长测量光密度, 绘制标准曲线, 并计算海马中 TNF-α 和 IL-1β 的表达水平。

5.5 Real-time PCR 检测 行为学检测后, 从每组随机选取 3 只小鼠进行麻醉处理, 断头取脑, 冰上剥离海马, 分装置 -80℃ 冻存, 并用于 Real-time PCR 检测和 Western Blot 检测。取出脑组织, 加入 TRIzol 以提取海马总 mRNA, 核酸蛋白仪检测 mRNA 纯度和浓度。按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书逆转录, 逆转录条件为 37℃、15 min, 85℃、5 s。逆转录后按照 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂盒建立定量扩增反应体系, 置 PCR 仪扩增, 扩增条件为 95℃、10 min, 95℃、15 s, 58℃、1 min, 72℃、30 s, 共反应 40 个循环。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析实验结果, 其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。小鼠 TNF-α 和 IL-1β 引物及内参 GAPDH 引物由生工生物工程股份有限公司设计、合成和验证, 引物序列见表 1。

5.6 Western Blot 检测 取冻存的海马组织, 加入预冷的 RIPA 裂解液以提取海马总蛋白, 置 4℃ 离心机以 12 000 r / min 离心 15 min, 取上清液。BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度, 加入 4× 蛋白变性缓冲液, 置 100℃ 沸水变性 10 min。按照 SDS-PAGE 凝胶试剂盒制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 依次上样、电泳和转膜。置 5 % 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 TBST 稀释后的一抗 IBA1 (1:1 000)、GFAP (1:1 000)、JAK2 (1:1 000)、p-JAK2-Tyr1007 (1:1 000)、STAT3 (1:1 000)、p-STAT3-Tyr705 (1:1 000)、SOCS-1 (1:1 000)、β-actin (1:1 000), 置 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 置 TBST 稀释后的二抗中, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 滴加 ECL 显色液, 置凝胶成像仪曝光各组蛋白电泳条带, 用 image J 计算条带灰度值。

表 1 基因引物序列

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
TNF-α	Forward: 5' -CAGACTCATGATGACAGAGG-3'	381
	Reverse: 5' -GAGATGTACAGGATCTTCCC-3'	
IL-1β	Forward: 5' -CACTGGTTCCGAAAGGGACTC-3'	153
	Reverse: 5' -CTGAAGCAAAAATCGCCACCT-3'	
GAPDH	Forward: 5' -CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
	Reverse: 5' -ATGGAGCCAACCGATCCACA-3'	

6 统计学方法 运用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *Shapiro-Wilk* 检验对实验数据进行正态性分析,不符合正态分布则用 *Kruskal-Wallis H* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。符合正态性则用 *One-Way ANOVA*, 方差齐性时组间比较采用 *LSD* 法, 方差不齐时组间比较采用 *Tamhane's T2* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠焦躁、易怒,具有较强的攻击性,毛发欠光泽且易于脱落。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠焦躁、易怒状况好转,攻击性减弱,且毛发稍有光泽。各组小鼠的饮水及摄食量无明显变化。此外,造模及干预期间各组小鼠均死亡 3 只。

2 各组小鼠行为学检测结果 (表 2、3, 图 1) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠平台潜伏期、游泳总路程和出错次数显著增加 ($P < 0.01$), 穿越平台次数、目标象限停留时间和潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠平台潜伏期、游泳总路程和出错次数减少 ($P < 0.05$,

$P < 0.01$), 穿越平台次数、目标停留象限时间和潜伏期增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 4 组小鼠跳台实验指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	出错次数 (次)	潜伏期 (s)
WT	12	6.29 ± 2.27	25.38 ± 6.41
APP/PS1	12	16.44 ± 5.28*	11.70 ± 5.47*
Donepezil	12	12.51 ± 3.53 [△]	18.20 ± 3.89 [△]
SHD	12	11.38 ± 3.58 ^{△△}	19.72 ± 6.57 ^{△△}

注: 与 WT 组比较, * $P < 0.01$; 与 APP/PS1 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

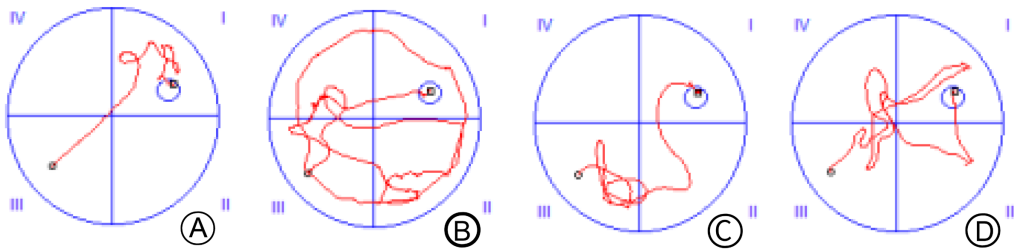
3 各组小鼠尼氏染色结果比较 (表 4, 图 2) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元数量明显减少 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元数量有所增加 ($P < 0.05$)。4 组两两比较, 小鼠海马 CA1 和 CA4 区神经元数量变化不明显, 且差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组小鼠高尔基染色结果比较 (表 5, 图 3) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元树突棘密度明显减少 ($P < 0.01$)。与 APP/PS1

表 2 4 组小鼠 Morris 水迷宫实验指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平台潜伏期 (s)	游泳总路程 (cm)	穿越平台次数 (次)	目标象限停留时间 (s)
WT	12	13.78 ± 5.02	434.43 ± 61.36	12.89 ± 2.19	22.99 ± 3.48
APP/PS1	12	24.26 ± 3.54*	615.51 ± 52.39*	5.72 ± 2.28*	13.69 ± 3.99*
Donepezil	12	18.79 ± 4.10 [△]	545.93 ± 70.86 [△]	9.06 ± 3.31 [△]	17.66 ± 2.66 [△]
SHD	12	17.04 ± 3.87 ^{△△}	509.17 ± 61.45 ^{△△}	8.95 ± 3.25 [△]	20.14 ± 3.19 ^{△△}

注: 与 WT 组比较, * $P < 0.01$; 与 APP/PS1 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$



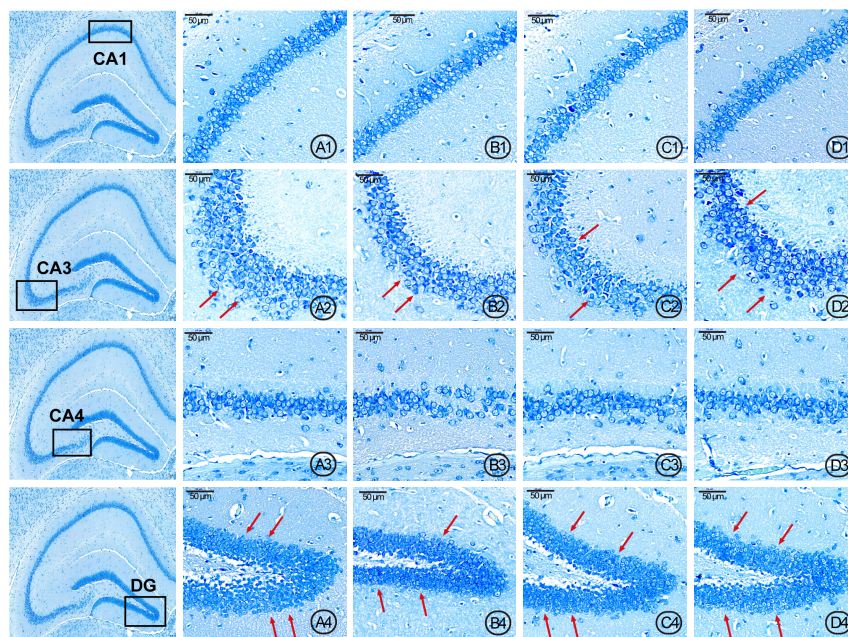
注: A 为 WT 组; B 为 APP/PS1 组; C 为 Donepezil 组; D 为 SHD 组

图 1 4 组小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验代表性轨迹图

表 4 4 组小鼠海马尼氏染色结果比较 (个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CA1	CA3	CA4	DG
WT	3	820.31 ± 50.24	1 100.23 ± 60.32	398.87 ± 29.58	1 623.14 ± 44.12
APP/PS1	3	780.29 ± 45.08	903.24 ± 45.23*	330.26 ± 38.46	1 380.47 ± 52.13*
Donepezil	3	791.48 ± 55.19	980.23 ± 36.09 [△]	360.14 ± 41.23	1 454.04 ± 67.22 [△]
SHD	3	796.23 ± 40.21	1 004.21 ± 46.21 [△]	380.47 ± 40.89	1 506.87 ± 58.43 [△]

注: 与 WT 组比较, * $P < 0.01$; 与 APP/PS1 组比较, [△] $P < 0.05$



注: A1、A2、A3、A4 为 WT 组; B1、B2、B3、B4 为 APP/PS1 组; C1、C2、C3、C4 为 Donepezil 组; D1、D2、D3、D4 为 SHD 组; 红色箭头所指为神经元丢失或增加区域

图 2 4 组小鼠海马尼氏染色结果 (×200)

组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马 CA3 和 DG 区神经元树突棘密度增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 5 4 组小鼠海马高尔基染色结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CA3 区 (个/10 μm)	DG 区 (个/10 μm)
WT	3	11.92 ± 1.32	10.86 ± 0.86
APP/PS1	3	$5.89 \pm 0.98^*$	$6.54 \pm 0.89^*$
Donepezil	3	$8.44 \pm 1.29^{\Delta}$	$8.15 \pm 1.08^{\Delta}$
SHD	3	$9.21 \pm 0.98^{\Delta\Delta}$	$8.94 \pm 1.16^{\Delta\Delta}$

注: 与 WT 组比较, $*P<0.01$; 与 APP/PS1 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

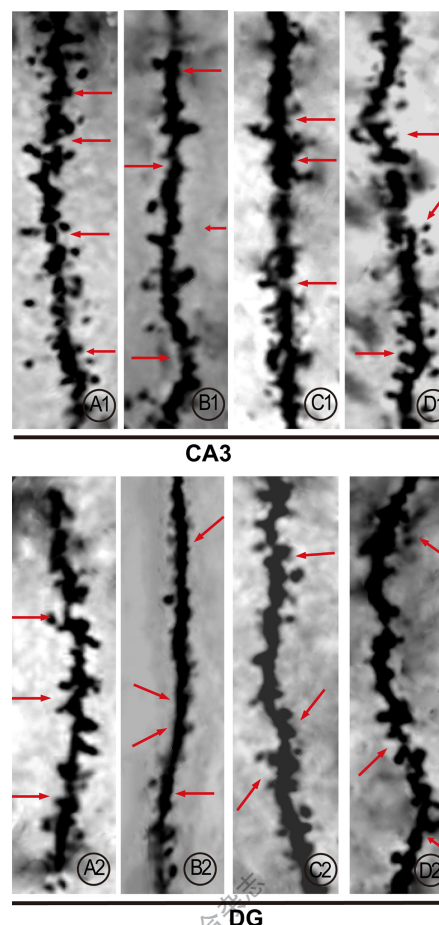
5 各组小鼠海马中 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平比较 (表 6) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量明显增加 ($P<0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 6 4 组小鼠海马 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α	IL-1 β
WT	6	63.98 ± 14.22	36.11 ± 9.74
APP/PS1	6	$134.62 \pm 16.75^*$	$63.81 \pm 10.43^*$
Donepezil	6	$104.96 \pm 11.85^{\Delta\Delta}$	$49.69 \pm 9.38^{\Delta}$
SHD	6	$109.47 \pm 17.49^{\Delta}$	$50.09 \pm 9.87^{\Delta}$

注: 与 WT 组比较, $*P<0.01$; 与 APP/PS1 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

6 各组小鼠海马中 TNF- α 及 IL-1 β mRNA 表达水平比较 (表 7) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小



注: A1、A2 为 WT 组; B1、B2 为 APP/PS1 组; C1、C2 为 Donepezil 组; D1、D2 为 SHD 组; 红色箭头所指为神经元树突棘减少或增加区域

图 3 4 组小鼠海马高尔基染色结果 (×1 000)

鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马中 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 7 4 组小鼠海马中 TNF- α 及 IL-1 β mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

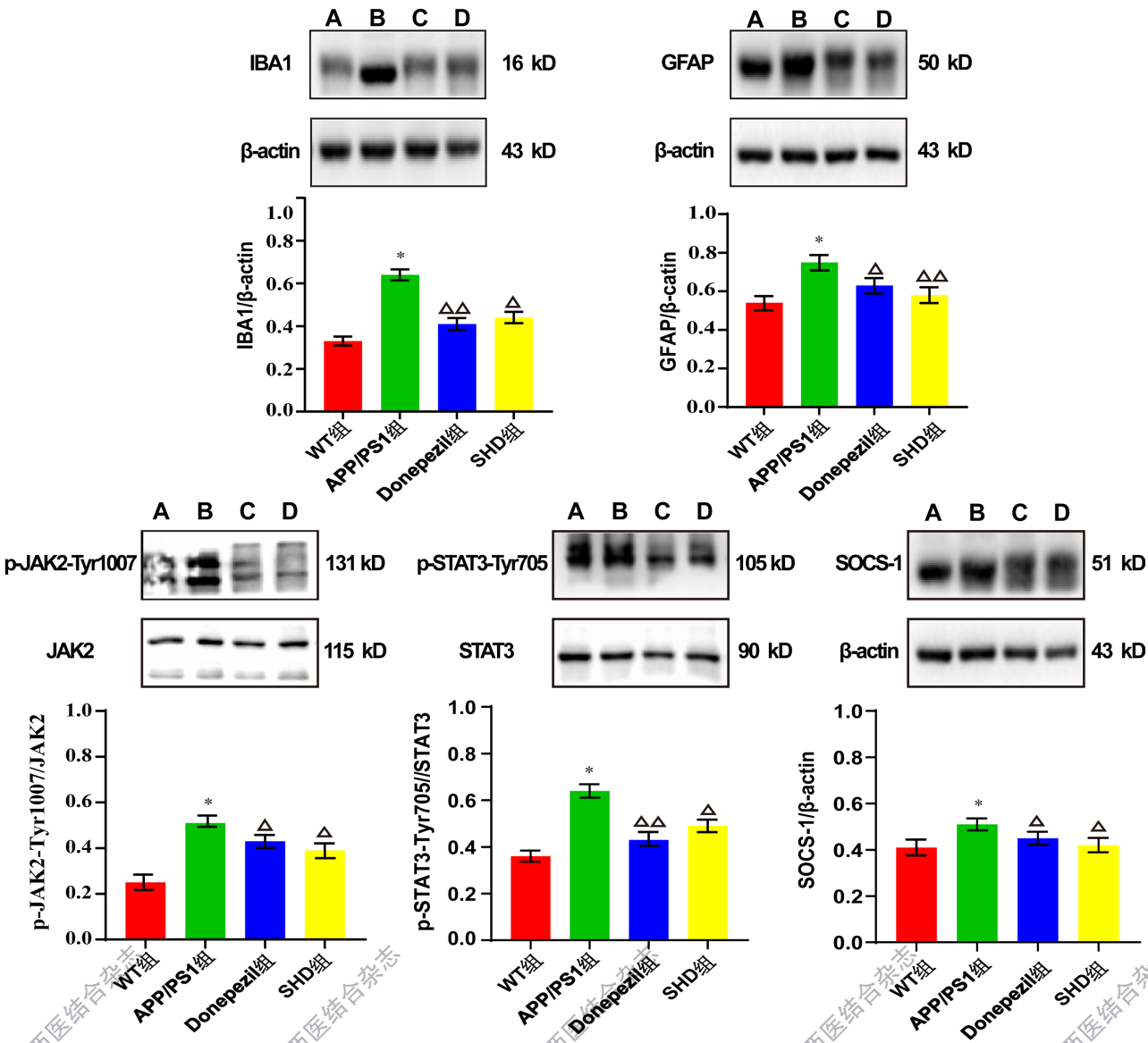
组别	<i>n</i>	TNF- α	IL-1 β
WT	3	0.49 $\pm$ 0.11	0.38 $\pm$ 0.09
APP/PS1	3	0.82 $\pm$ 0.14*	0.66 $\pm$ 0.12*
Donepezil	3	0.68 $\pm$ 0.15 $^{\Delta}$	0.52 $\pm$ 0.09 $^{\Delta}$
SHD	3	0.61 $\pm$ 0.09 $^{\Delta\Delta}$	0.48 $\pm$ 0.13 $^{\Delta\Delta}$

注: 与 WT 组比较, * $P<0.01$; 与 APP/PS1 组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

7 各组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平比较 (图 4) 与 WT 组比较, APP/PS1 组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平升高 ($P<0.01$)。与 APP/PS1 组比较, Donepezil 组和 SHD 组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

讨 论

生慧汤为清代名医陈士铎所创制, 并由熟地黄一两、山茱萸四钱、人参三钱、石菖蒲五分、白芥子二



注: A 为 WT 组; B 为 APP/PS1 组; C 为 Donepezil 组; D 为 SHD 组; 与 WT 组比较, * $P<0.01$; 与 APP/PS1 组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

图 4 4 组小鼠海马中 IBA1、GFAP、p-JAK2-Tyr1007/JAK2、p-STAT3-Tyr705/STAT3 和 SOCS-1 的蛋白表达水平比较

钱、酸枣仁五钱、柏子仁五钱、茯神三钱和远志二钱组成^[10]。生慧汤以大剂量的熟地黄为君药,取其补肾填精生髓之功,以补肾填精之山茱萸和大补脾肾之气的人参为臣药,并佐以化痰开窍之石菖蒲、白芥子,养心安神之酸枣仁、柏子仁、茯神和化痰开窍安神之远志,全方共奏补肾健脾、养心安神和祛痰开窍之功^[11, 16]。陈氏认为生慧汤为“治健忘之圣药”,服用 1 个月“自然不忘矣”,故取名“生慧汤”^[15]。本课题组前期研究证实生慧汤可改善 AD 模型和睡眠剥夺模型的认知功能,并具有一定的神经保护作用,因此本研究以生慧汤为研究对象^[10, 11, 16-18]。Morris 水迷宫实验和跳台实验为评价啮齿类动物认知功能的经典行为学方法,目前已被广泛用于检测 AD、PD 等神经退行性疾病的认知功能。本研究则通过 Morris 水迷宫实验和跳台实验评价了各组小鼠的认知功能,结果发现在给予 APP/PS1 小鼠连续 4 周的生慧汤治疗后,小鼠平台潜伏期、游泳总路程和出错次数减少,穿越平台次数、目标停留象限时间和潜伏期增加,这说明生慧汤可改善 APP/PS1 小鼠的认知功能。

神经元和突触为学习记忆的生物学基础,神经元和突触损伤则可引发认知障碍。研究证实,AD 患者和 AD 模型存在神经元和突触损伤^[19, 20]。本研究首先利用尼氏染色观察海马神经元病理损伤,结果发现生慧汤可增加 APP/PS1 小鼠海马 CA3 和 DG 区的神经元数量,这说明生慧汤可改善 AD 小鼠海马病理损伤。随后,本研究又利用高尔基染色检测了海马区树突棘的变化,结果证实生慧汤可增加 APP/PS1 小鼠海马 CA3 和 DG 区的树突棘密度,这一结果再次证实了尼氏染色的结果,二者均表明生慧汤可改善 APP/PS1 痴呆小鼠海马神经元和突触损伤。

星形胶质细胞和小胶质细胞对脑内微环境起着双重调节作用,一方面二者可及时清除脑内毒素,另一方面二者过度活化可促使 TNF- α 、IL-1 β 等促炎性因子的释放,从而形成神经炎症^[21, 22]。先前的研究证实,AD 脑内的老年斑和神经原纤维缠结可促使星形胶质细胞和小胶质细胞过度活化,抑制星形胶质细胞和小胶质细胞则的活性则可缓解神经炎症,并改善 AD 的认知功能和病理损伤^[23, 24]。因此,本研究对星形胶质细胞和小胶质细胞的标志性蛋白 GFAP 和 IBA1 进行检测,结果显示生慧汤可抑制 APP/PS1 小鼠海马中 GFAP 和 IBA1 的表达。此外,本研究还利用 Real-time PCR 和 ELISA 检测了促炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示生慧汤显著地抑制了 APP/PS1 小鼠海马中

TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达水平。上述实验结果表明生慧汤可通过抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的活化而缓解神经炎症。

JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路为促炎症反应的经典途径,该信号通路始于 JAK2 的活化, JAK2 在酪氨酸 (Tyr) 1007 位点磷酸化后会促使 STAT3 在酪氨酸 (Tyr) 705 位点磷酸化,磷酸化的 STAT3 会促使下游 SOCS-1 的活化,而 SOCS-1 的活化则会促使促炎性因子(如 TNF- α 、IL-1 β)的释放,并放大炎症反应,从而对 AD 形成“二次打击”^[7-9, 25, 26]。本研究利用 Western Blot 检测了海马中 JAK2、STAT3、SOCS-1 及 JAK2 和 STAT3 的磷酸化蛋白表达水平,结果显示生慧汤可抑制海马中 JAK2 和 STAT3 的磷酸化及 SOCS-1 的蛋白表达水平。上述实验结果表明生慧汤可通过抑制 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路改善 AD 神经炎症。

综合分析,生慧汤可通过抑制神经炎症改善 AD 突触可塑性,其机制可能与其抑制 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Lopez OL, Kuller LH. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 139-148.
- [2] Jia J, Wei C, Chen S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14 (4): 483-491.
- [3] Huang LK, Chao SP, Hu CJ. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27 (1): 18-30.
- [4] Ju Y, Tam KY. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17 (3): 543-549.
- [5] Chen Y, Fu AKY, Ip NY. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: Mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 195: 186-198.
- [6] Cummings J, Lee G, Ritter A, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020 [J]. *Alzheimers Dement (NY)*, 2020, 6 (1): e12050.

- [7] Toral-Rios D, Patiño-López G, Gómez-Lira G, et al. Activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis and neuronal death induced by A β O neurotoxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (20): 7458.
- [8] Li P, Wu Q, Li X, et al. Shenqi Yizhi Granule attenuates A β 1-42 induced cognitive dysfunction via inhibiting JAK2/STAT3 activated astrocyte reactivity [J]. *Exp Gerontol*, 2021, 151: 111400.
- [9] Hindam MO, Sayed RH, Skalicka-Woźniak K, et al. Xanthotoxin and umbelliferone attenuate cognitive dysfunction in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease: The role of JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 signalling pathway modulation [J]. *Phytother Res*, 2020, 4 (9): 2351-2365.
- [10] 清·陈士铎撰; 古典医籍编辑部主编. 辨证录 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 162.
- [11] 张美娅, 王平, 游秋云, 等. 生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠下丘脑区生物钟基因 Bmal1 及海马 IL-6, TNF- α 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (20): 7-12.
- [12] 龙清华. 补肾调心健脾法防治失眠健忘的理论探讨及生慧汤对 APP/PS1 痴呆小鼠神经发生的作用研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [13] 陈奇主编. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 31.
- [14] Long QH, Wu YG, He LL, et al. Suan-Zao-Ren Decoction ameliorates synaptic plasticity through inhibition of the A β deposition and JAK2/STAT3 signaling pathway in AD model of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Chin Med*, 2021, 16 (1): 14.
- [15] He LL, Wang YC, Ai YT, et al. Qiangji Decoction alleviates neurodegenerative changes and hippocampal neuron apoptosis induced by D-galactose via regulating AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 735812.
- [16] 丁莉. 昼夜节律的中医理论探讨及生慧汤对 APP/PS1 痴呆小鼠昼夜节律的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [17] 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6, TNF- α , COX-2 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (1): 96-100.
- [18] 谭爱华, 龙清华, 王平, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺模型小鼠的神经保护作用及其机制 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42 (1): 56-60.
- [19] Jia L, Zhu M, Kong C, et al. Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 17 (1): 49-60.
- [20] Mercerón-Martínez D, Ibaceta-González C, Salazar C, et al. Alzheimer's disease, neural plasticity, and functional recovery [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82 (s1): S37-S50.
- [21] Park JS, Kam TI, Lee S, et al. Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9 (1): 78.
- [22] Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9 (1): 42.
- [23] Liu S, Fan M, Xu JX, et al. Exosomes derived from bone-marrow mesenchymal stem cells alleviate cognitive decline in AD-like mice by improving BDNF-related neuropathology [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19 (1): 35.
- [24] Tsay HJ, Liu HK, Kuo YH, et al. EK100 and antrodin C improve brain amyloid pathology in APP/PS1 transgenic mice by promoting microglial and perivascular clearance pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (19): 10413.
- [25] El Sayed NS, Ghoneum MH. Antia, a natural antioxidant product, attenuates cognitive dysfunction in streptozotocin-induced mouse model of sporadic Alzheimer's disease by targeting the amyloidogenic, inflammatory, autophagy, and oxidative stress pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4386562.
- [26] Zhu H, Jian Z, Zhong Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 (7): 714943.

(收稿: 2022-06-20 在线: 2022-11-18)

责任编辑: 赵芳芳