

文章编号:2095-7386(2023)06-0047-10

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2023.06.007

大黄素抗小鼠阿尔茨海默病的作用及机制分析

夏能银¹,徐凌云¹,王 钰¹,黄梦园¹,胥登瑞¹,黎 阳¹,吴浩明¹,梅之南²,余泽军¹

(1. 武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 430023;2. 华中农业大学 植物科学技术学院,武汉 430070)

摘 要:为研究大黄素对东莨菪碱所致小鼠阿尔茨海默病(AD)的神经保护作用及机制,采用分子对接、Morris 水迷宫、酶联免疫吸附法、蛋白质印迹、免疫荧光等方法和技术进行了分析。结果表明:大黄素与 TLR4、NLRP3、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶等靶点具有良好的结合作用;大黄素能够增加海马 Nrf2 和 HO-1 的表达水平,降低海马的 MDA 含量,增加 CAT 和 SOD 活性,抑制炎症因子 TLR4、NLRP3、IL-1 β 等的表达,同时调节胆碱代谢,增加海马胆碱含量,从而改善东莨菪碱诱导的小鼠认知功能损伤。综上,大黄素能通过 Nrf2/HO-1 和 TLR4/NLRP3 通路治疗阿尔茨海默病。研究将丰富和完善大黄素治疗阿尔茨海默病的作用机制,为中药单体治疗 AD 开辟新途径。

关键词:大黄素;阿尔茨海默病;抗氧化;抗炎;Nrf2/HO-1 通路;TLR4/NLRP3 通路

中图分类号:R 964

文献标识码:A

Study on the effects and mechanisms of emodin in the treatment of Alzheimer's disease in mice

XIA Nengyin¹, XU Lingyun¹, WANG Yu¹, HUANG Mengyuan¹, XU Dengrui¹, LI Yang¹,
WU Haoming¹, MEI Zhinan², YU Zejun¹

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore emodin's neuroprotective effects and underlying mechanisms in scopolamine-induced Alzheimer's disease (AD), molecular docking (MD), Morris water maze (MWM), Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), Western blot (WB), immunofluorescence were used. Molecular docking analysis predicted the strong affinity between emodin and TLR4, AChE, etc. The results showed that emodin increased the expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in hippocampus, decreased the lipid peroxidation MDA, promoted the activities of antioxidant enzyme CAT and SOD, inhibited the secretion of pro-inflammatory factors, such as TLR4, NLRP3, IL-1 β , and so on. Besides, emodin increased the content of ACh and modulated the activities of metabolic enzymes in

收稿日期:2023-10-11.

作者简介:夏能银(1995—),女,硕士研究生,E-mail:1745076135@qq.com.

通信作者:余泽军(1984—),男,讲师,博士,E-mail:yuzejun@126.com.

基金项目:湖北省教育厅科研计划项目(编号:B2022244);武汉轻工大学校立科研项目(编号:2023Y18).

hippocampus. In conclusion, emodin exerts neuroprotective effects against AD through its antioxidant, anti-inflammatory properties via Nrf2/HO-1 and TLR4/NLRP3 pathways. This study will enrich and supplement the mechanisms of emodin in the treatment of AD, offering a new strategy for the treatment of AD with traditional Chinese medicine monomers.

Key words: emodin; Alzheimer's disease; antioxidant; anti-inflammatory; Nrf2/HO-1 pathway; TLR4/NLRP3 pathway

1 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以认知和记忆缺陷为主要临床表现的神经退行性疾病,病理特征包括淀粉样斑块沉积和神经纤维缠结等^[1,2]。预计到 2030 年,全球阿尔茨海默病患者的数量将达到 1 亿,因此,阿尔茨海默病的治疗已成为一个迫切需要解决的医疗和社会问题^[3]。AD 的发病机制包括氧化应激、神经炎症以及海马中乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)含量的降低^[4]。ACh 是胆碱受体的激动剂,能增强学习记忆能力,其含量随年龄的增长而降低,在 AD 患者的大脑中可以观察到 ACh 含量的显著下降^[5]。东莨菪碱(scopolamine, SCP)是 M 胆碱受体的拮抗剂,通过与 ACh 竞争性结合胆碱受体产生拮抗 ACh 效应从而发挥作用,可诱导胆碱能神经元出现损伤及认知功能障碍,常用于 AD 认知功能的研究^[6]。

目前美国食品药品监督管理局批准用于治疗 AD 的临床药物主要是乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEIs),它能提升乙酰胆碱的含量。然而,临床证据显示 AChEIs 可导致以肌张力障碍为特征的比萨综合征^[7]。氢溴酸加兰他敏是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,会引起急性胆碱能综合征的发生,如脸发红、呕吐、呼吸困难^[8]。AChEIs 的不良反应提示了开发其它 AD 治疗药物的必要性。大黄为蓼科植物的根茎,是一种具有药用和食用功能的植物。大黄的主要活性成分是蒽醌衍生物,作为主要游离蒽醌之一的大黄素(emodin, Emo)具有调节胃肠、心脑血管保护、抗肿瘤、免疫调节的作用,特别是对神经具有保护作用^[9]。其中,大黄素可在 $A\beta_{25-35}$ 诱导的大鼠皮质神经元中发挥神经保护作用,这说明大黄素具有治疗阿尔茨海默病的潜力^[10]。值得注意的是,具有相似结构的芦荟大黄素可通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对患有缺血性脑卒中的大鼠发挥抗炎

作用^[11],这从另一个方面提示了大黄素具有保护神经的潜力。核因子 e2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是细胞中活性氧水平的调节因子,它控制着血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)等 II 期解毒酶的表达,对氧化应激能发挥重要的防御作用^[6]。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是一种 I 型跨膜蛋白,包含 3 个结构域,可识别不同的病原体相关分子模式,调控细胞的炎症和免疫反应^[12,13]。Toll 样受体在多种神经退行性疾病(如阿尔茨海默病、癫痫、帕金森综合征等)中能激活小胶质细胞从而介导神经炎症,使神经元及海马组织受损,最终导致神经障碍^[14]。在目前的研究中,大黄素能否改善东莨菪碱诱导的小鼠认知功能障碍尚未阐明,Nrf2 和 TLRs 在其中的作用亦未见文献报道。鉴于此,笔者拟从以下两个方面进行研究,以了解大黄素对 AD 的作用机制:(1)使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件筛选大黄素改善认知功能的靶点和通路;(2)采用东莨菪碱诱导的小鼠神经损伤模型研究大黄素改善认知功能损伤的机制。

2 材料和方法

2.1 动物

雄性 ICR 小鼠,生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010,体重为 (30 ± 2) g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。治疗前适应性喂养 1 周,在标准条件下(温度为 22 ± 2 °C,湿度为 50%~60%,光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗)自由进食、饮水。所有动物实验均经武汉轻工大学动物伦理委员会批准,授权号为 20220203。

2.2 药品和试剂

东莨菪碱(批号为 114-49-8,含量 >96%)、大黄素(批号为 518-82-1,含量 >98%)和多奈哌齐(donepezil, Don)(批号为 120011-70-3,含量 >98%)均购自

上海麦克林生化科技股份有限公司。

2.3 仪器

紫外分光光度计(UV-2000)购自尤尼柯(上海)仪器有限公司,酶标仪(EA-100)购自武汉班比科技发展有限公司,Morris 水迷宫(RWD 63034)购自上海欣软信息科技有限公司,迷你双垂直电泳槽(DY-CZ-DN)购自北京六一生物科技有限公司,凝胶成像分析系统(ChemiDoc™ XRS+)购自美国 BIO-RAD 公司,荧光显微镜(Nikon Eclipse C1)购自日本尼康公司。

2.4 方法

2.4.1 分子对接

将目标分子去除蛋白结晶水、原始配体,将蛋白结构导入 AutodockTools-1.5.6 进行加氢等处理。针对特定蛋白进行相关参数设置,采用 AutoDock Vina1.1.2 进行对接。利用 PyMOL2.3.0 和 LigPlot V 2.2.4 对对接结果进行相互作用模式分析。

2.4.2 动物分组与药物治疗

大黄素和多奈哌齐悬浮于浓度为 0.5% 的 CMC-Na 中。将 ICR 小鼠随机分为 6 组,每组 12 只。对第一组和第二组用浓度为 0.5% 的 CMC-Na 灌胃 28 d,从第 11 d 到第 28 d 两组分别腹腔注射生理盐水和东莨菪碱($2 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, i. p.),作为正常组和模型组;第三组到第五组口服大黄素($25 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, $50 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, $100 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, p. o.) 28 d,从第 11 d 到第 28 d 腹腔注射东莨菪碱($2 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, i. p.);第六组口服多奈哌齐(3 mg kg^{-1} , p. o.) 28 d,从第 11 d 到第 28 d 腹腔注射东莨菪碱($2 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{BW}$, i. p.) 作为阳性对照组。所有液体给药体积均为 10 ml/kg (体积:动物体重)。

2.4.3 Morris 水迷宫实验

在给药最后 5 d 对小鼠进行 Morris 水迷宫实验。前 4 d 为训练阶段,将小鼠从一个象限放入水中,允许其在 2 min 内搜索隐藏的平台,并故意放在平台上 20 s。如果小鼠在 2 min 内寻找平台失败,训练将在同一天重复 4 次,并且每个象限只使用一次。在第 4 d 记录小鼠到达目标象限的潜伏期。在最后一天的测试阶段移除平台,通过自动监控系统记录小鼠在目标象限的平均速度、通过平台的次数及在目标象限内所花费的时间。

2.4.4 小鼠海马中氧化应激、炎症和胆碱能递质相关指标的检测

给药结束后,将小鼠麻醉处死,在冰上用 PBS 制成浓度为 10% 的匀浆,离心取上清液。Ach 和 MDA 含量, AChE、BuChE、ChAT、CAT 和 SOD 的活性均按照试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所,南京)进行定量分析,同时用 ELISA 试剂盒检测海马促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量。

2.4.5 Western blot 分析

处死小鼠,取脑后在冰上分离海马,加入含有 2% 蛋白酶抑制剂和 2% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上匀浆 2 min,离心获得上清液。总蛋白浓度通过 BCA 试剂盒进行定量调至统一浓度,沸水变性 10 min。将 $30 \mu\text{g}$ 蛋白质通过浓度为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶分离,再进行转膜和封闭。将膜浸泡在兔抗 Nrf2 (1:1 000, Servicebio, 批号为 GB113808)、鼠抗 HO-1 (1:1 000, Servicebio, 批号为 GB12104) 和鼠抗 β -actin (1:1 000, Proteintech, 批号为 66009-1-Ig) 中,在 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,再与 HRP 偶联的二抗(山羊抗兔和山羊抗鼠)在室温条件下孵育 4 h。膜在 ECL 试剂中浸泡约 10 s,利用 Gel Doc XR+ 和 ChemiDoc XRS+ 系统检测蛋白质信号,并通过 Image J 软件进行定量。

2.4.6 免疫荧光观察

处死小鼠,在冰上取出大脑,在浓度为 4% 的多聚甲醛中固定过夜,用石蜡包埋切片,测定海马 CA1 区 TLR4、NLRP3、IL-1 β 的阳性细胞率。将石蜡切片脱蜡至水,经抗原修复、BSA 封闭(10% 驴血清)后,在 4 °C 条件下,与兔抗 TLR4 (1:500, Servicebio, 批号为 GB11519)、兔抗 NLRP3 (1:300, Servicebio, 批号为 GB114320)、兔抗 IL-1 β (1:200, Servicebio, 批号为 GB12104) 共同孵育过夜。随后在 25 °C 条件下,将切片与 Cy3 标记山羊抗兔二抗共同孵育 50 min。用含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenyl indole, DAPI) 的抗荧光淬灭封片剂封片,在荧光显微镜下观察并采集图像。

2.5 统计分析

数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。统计分析使用 SPSS (Version 27.0) 软件,采用单因素方差分

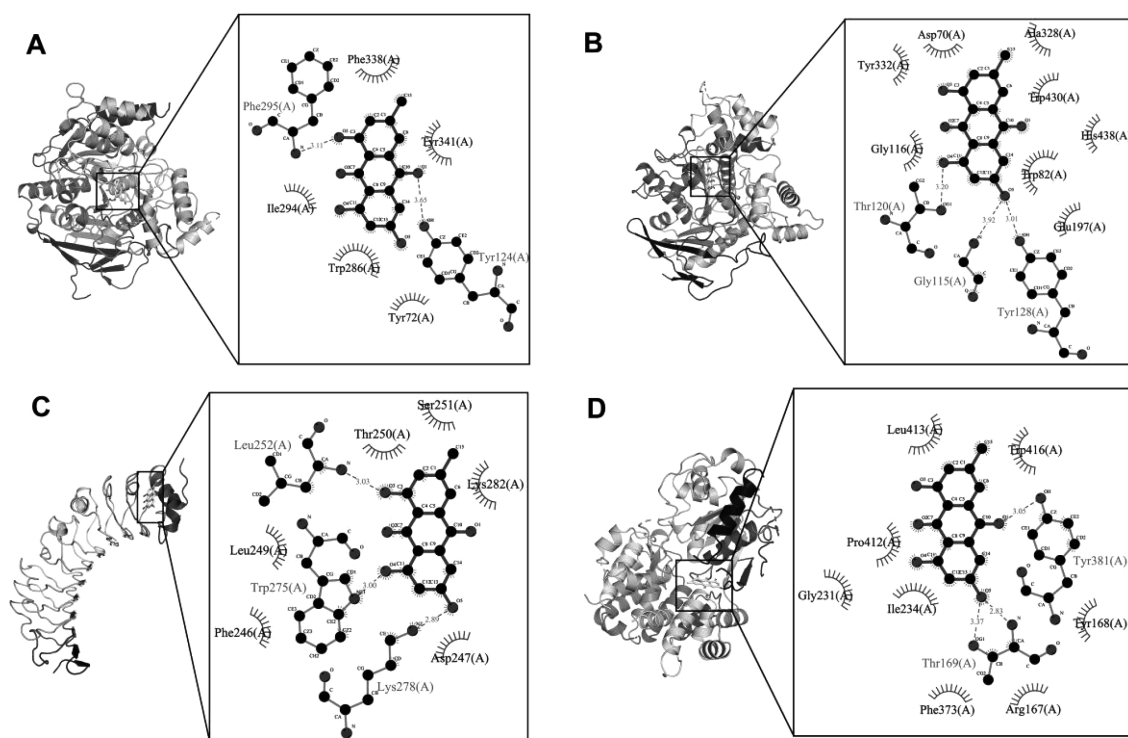
析(ANOVA)和最小显著性差异(LSD)来检验确定各组间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 分子对接结果

如图 1A~D 所示,大黄素与 AChE、BuChE、TLR4 和 NLRP3 的结合能分别为 -10.1 kcal/mol、 -9.8 kcal/mol、 -5.9 kcal/mol 和 -9.2 kcal/mol,所有结合能均小于 -5.5 kcal/mol。大黄素与 AChE、

BuChE、TLR4 和 NLRP3 的相互作用力主要为氢键和疏水力,大黄素与 AChE 的 Phe295(A)和 Tyr124(A),BuChE 的 Thr120(A)、Gly115(A)和 Tyr128(A),TLR4 的 Lys278(A)、Trp275(A)和 Leu252(A)以及 NLRP3 中的 Thr169(A)和 Tyr381(A)形成氢键,长度分别为 3.11 Å 和 3.65 Å、 3.20 Å 和 3.92 Å 以及 3.01 Å、 2.89 Å 和 3.00 Å 以及 3.03 Å、 3.37 Å 和 2.83 Å 以及 3.05 Å。这表明大黄素可以稳定地与以上四个关键蛋白结合。



(A—AChE, B—BuChE, C—TLR4, D—NLRP3)

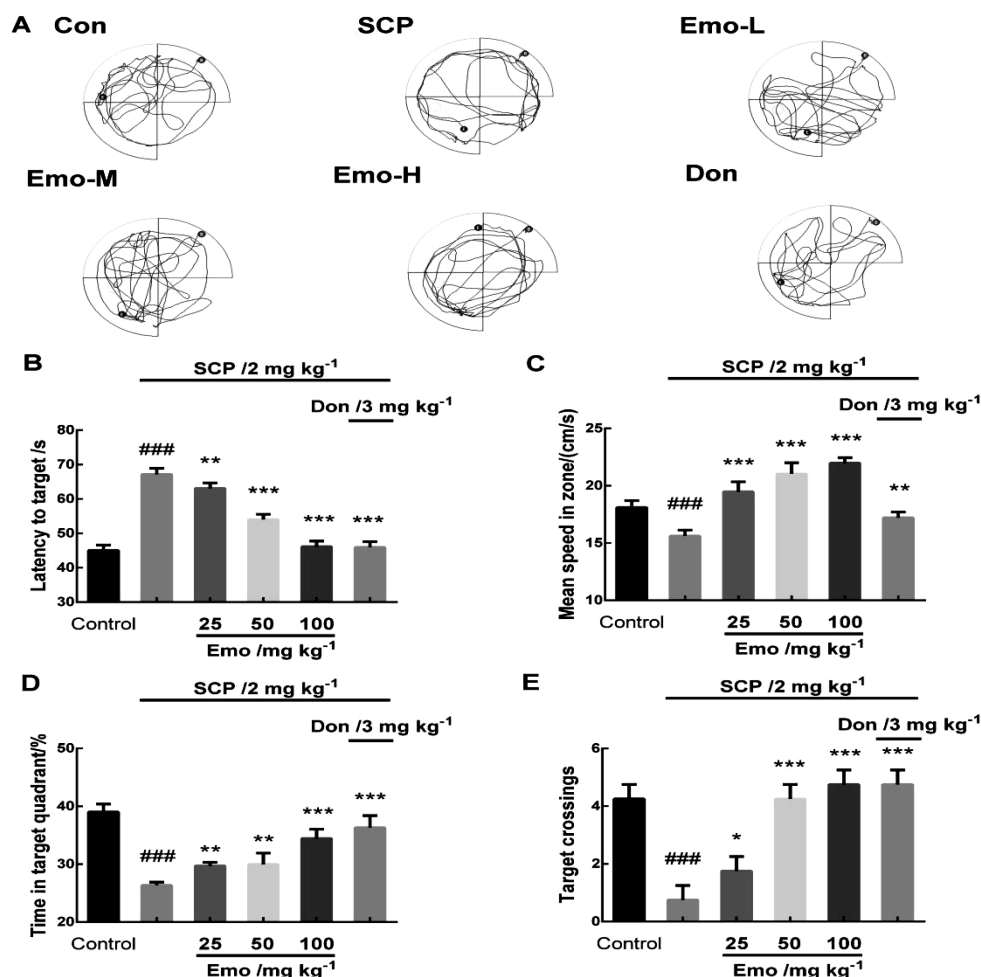
图 1 大黄素与目标靶点分子的对接图

Fig. 1 The molecular docking diagrams of the binding of the targets with emodin

3.2 大黄素对东莨菪碱诱导的小鼠认知功能障碍的影响

如图 2A 所示,采用 Morris 水迷宫测试小鼠空间认知和学习能力。在训练阶段的第 4 d,相较于正常组,东莨菪碱治疗显著延长了目标区域潜伏期($P < 0.001$),由 45.02 s 增加到 67.19 s。然而,不同剂量的大黄素明显缩短了小鼠的目标潜伏期($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),且呈剂量依赖性;在阳性药多奈哌齐组中,目标潜伏期相对于模型组显著降低,为 45.93 s($P < 0.001$)(图 2B)。在测试阶段,与正常组相比,东莨菪碱处理显著降低了小鼠在目标区域

的平均速度(15.62 cm s^{-1}),减少了在目标象限所花费的时间(26.36 s)和穿越平台次数(0.75 次)($P < 0.001$),而大黄素显著提高了小鼠在目标区域的平均速度,增加了在目标象限所花费的时间和穿越平台的次数($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);在多奈哌齐组中,小鼠在目标区域的平均速度提高,在目标象限所花费的时间和穿越平台次数增加,且与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)(图 2C~E)。这表明大黄素改善了东莨菪碱诱导的认知功能障碍。



模型组与正常组相比,###表示 $P<0.001$;给药组与模型组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$

(A—小鼠水迷宫轨迹图;B—小鼠逃避潜伏期;C—小鼠在目标区域的平均速度;

D—小鼠在目标象限所花费的时间;E—小鼠穿越平台的次数)($\bar{x}\pm s, n=4$)

图2 大黄素对东莨菪碱诱导小鼠认知功能的影响

Fig. 2 The effect of emodin on cognitive deficits in scopolamine-induced mice

3.3 大黄素对东莨菪碱诱导的小鼠海马 ACh 及相关代谢酶活性的影响

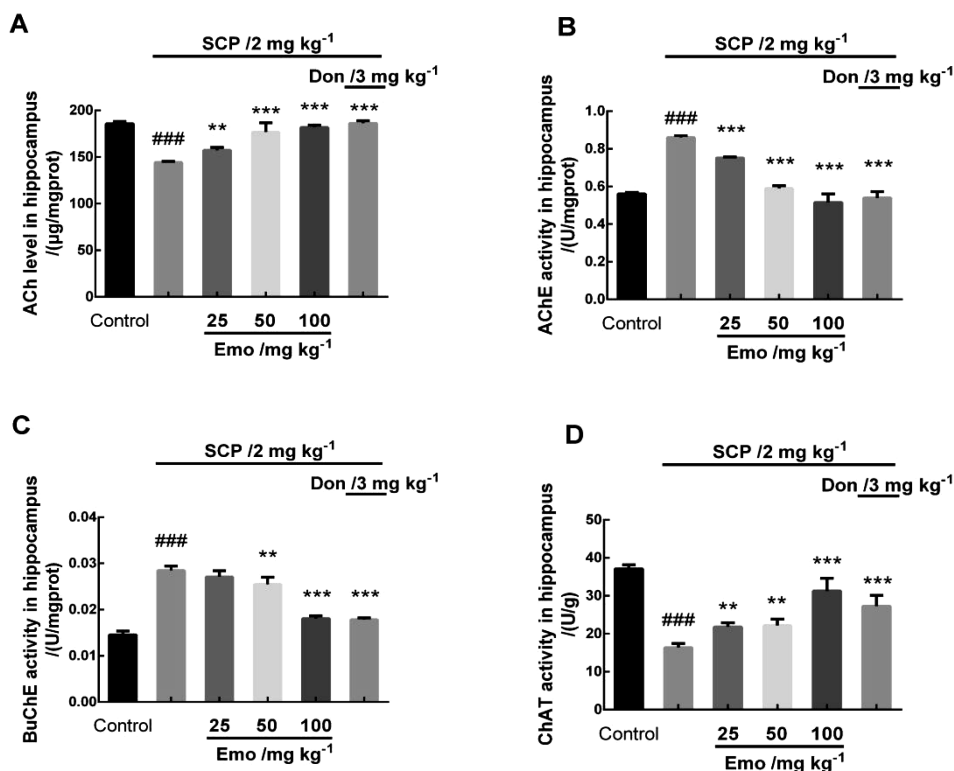
与正常组相比,东莨菪碱降低了小鼠海马中的 ACh 含量($146.23 \mu\text{g}/\text{mgprot}$),显著抑制了 ChAT 活性($16.36 \text{ U}/\text{g}$),增强了 AChE($0.85 \text{ U}/\text{mgprot}$)和 BuChE 活性($0.027 \text{ U}/\text{mgprot}$)($P<0.001$)(图 3A~D)。与模型组相比,低、中、高剂量的大黄素显著增加了 ChAT 活性($P<0.01$ 或 $P<0.001$)及 ACh 含量($P<0.01$ 或 $P<0.001$),降低了 AChE 活性($P<0.001$)(图 3A/B/D)。然而,当大黄素剂量达到 100 mg kg^{-1} 时,才能显著降低 BuChE 的活性($0.019 \text{ U}/\text{mgprot}$)($P<0.001$)(图 3C)。多奈哌齐可显著增加 ChAT 活性及 ACh 含量($P<0.001$),抑制 AChE、BuChE($P<0.001$),这表明大黄素能缓解东莨菪碱诱导的 ACh 下降及相关代谢

酶活性的失衡。

3.4 大黄素调控海马 Nrf2/HO-1 通路

与正常组相比,东莨菪碱组小鼠海马中的 MDA 含量升高($17.53 \text{ nmol}/\text{mgprot}$),CAT 活性($0.87 \text{ U}/\text{mgprot}$)、SOD 活性($479.9 \text{ U}/\text{mgprot}$)显著降低($P<0.001$)。相较于模型组,低、中、高剂量的大黄素($P<0.01$ 或 $P<0.001$)和多奈哌齐($P<0.001$)显著降低了 MDA 含量,增加了 CAT 和 SOD 的活性(图 4A~C)。与正常组相比,模型组小鼠海马 Nrf2($P<0.01$)和 HO-1($P<0.05$)的表达水平显著降低了约 50%。然而,与模型组相比,大黄素和多奈哌齐处理组显著提高了 Nrf2($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)和 HO-1($P<0.05$ 或 $P<0.01$)的蛋白表达水平(图 4D~F)。以上结果说明大黄素通过上调 Nrf2/HO-1 通路来抑制东莨菪碱

诱导的氧化应激。

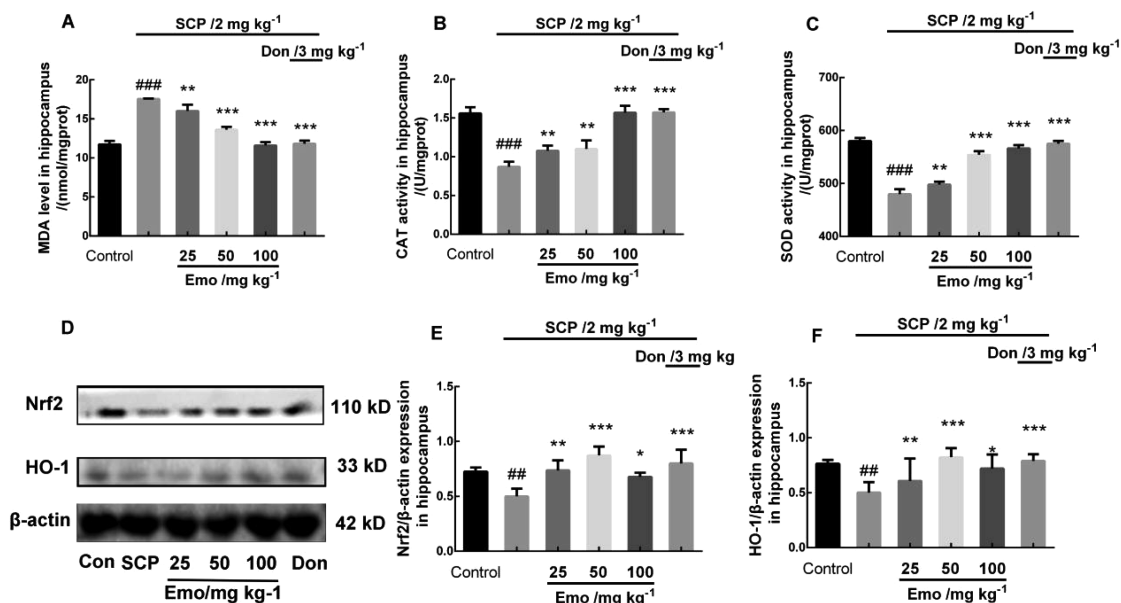


模型组与正常组相比,###表示 $P<0.001$;给药组与模型组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$

(A—ACh; B—AChE; C—BuChE; D—ChAT) ($\bar{x} \pm s, n=4 \sim 6$)

图3 大黄素对东莨菪碱诱导小鼠海马ACh含量及相关代谢酶活性的影响

Fig. 3 The effect of emodin on the content of ACh and the activities of neurotransmitter enzymes in hippocampus of scopolamine-induced mice



模型组与正常组相比,###表示 $P<0.001$;给药组与模型组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$

(A—MDA; B—CAT; C—SOD; D—蛋白条带图; E—Nrf2; F—HO-1) ($\bar{x} \pm s$, 图 A/B/C: $n=4 \sim 6$; 图 D/E/F: $n=3$)

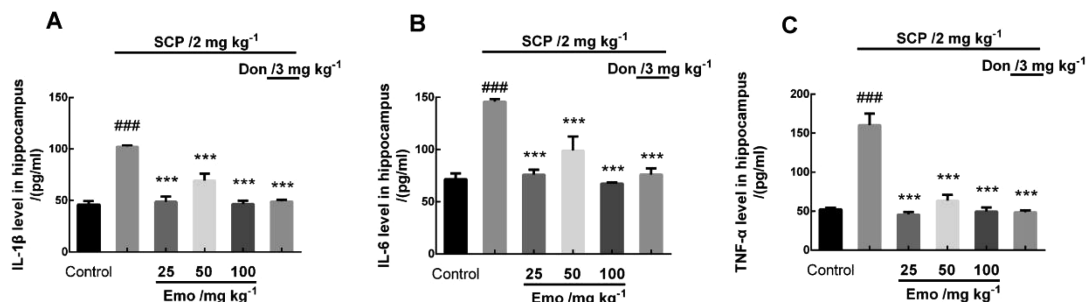
图4 大黄素对东莨菪碱诱导的氧化应激的影响

Fig. 4 The effect of emodin on oxidative stress in hippocampus of mice

3.5 大黄素调控海马 TLR4/NLRP3 通路

与正常组相比,东莨菪碱使得小鼠海马中 IL-1 β (102.13 pg/mL)、IL-6 (145.88 pg/mL) 和 TNF- α 含量 (160.36 pg/mL) 显著升高 ($P<0.001$),与模型组相比,低、中、高剂量的大黄素和多奈哌齐治疗显著降低了以上促炎细胞因子的含量 ($P<0.001$) (图 5A~C)。在正常组中,海马 CA1 区 TLR4、NLRP3 和 IL-1 β 的阳性表达率较低,约为 20%,东莨菪碱处理显著提高了以上蛋白的阳性表达率 ($P<0.001$)。

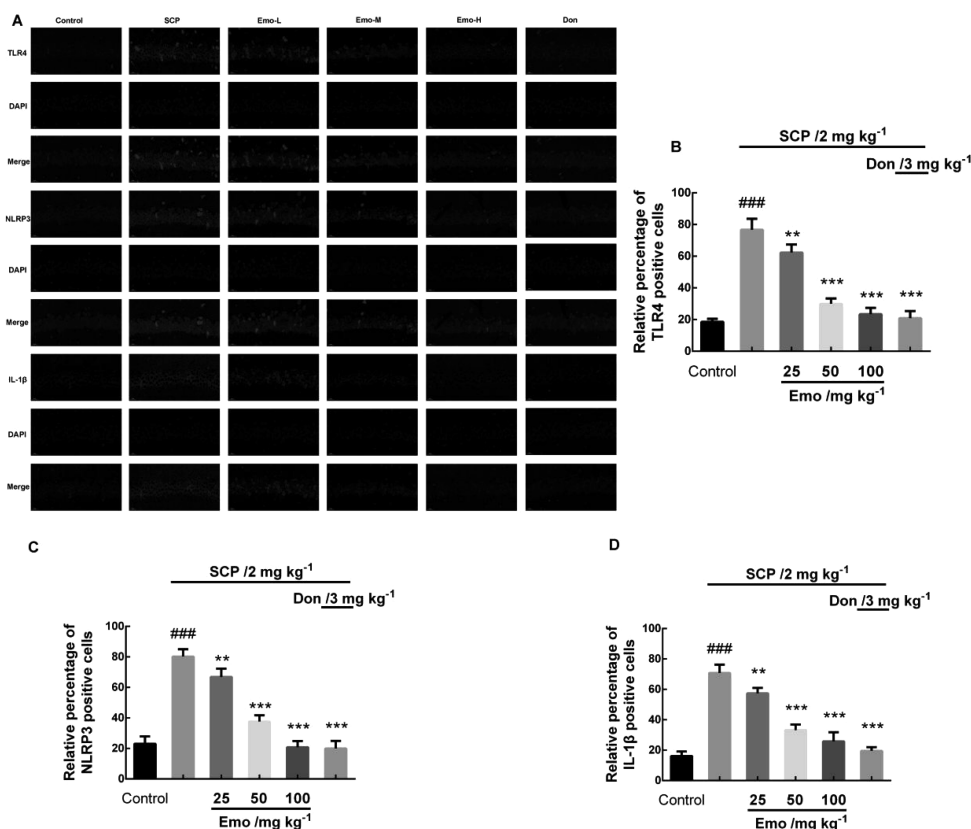
然而,不同剂量的大黄素 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$) 处理显著降低了海马 CA1 区 TLR4、NLRP3 和 IL-1 β 的阳性表达率,且具有明显的剂量依赖性,TLR4、NLRP3 和 IL-1 β 的阳性表达率在大黄素高剂量组分别下调至 23.40%、20.78% 和 25.76%,多奈哌齐 ($P<0.001$) 则分别降至 20.87%、19.96% 以及 19.56% (图 6A~C)。以上结果提示大黄素通过下调 TLR4/NLRP3 通路来抑制东莨菪碱诱导的神经炎症。



模型组与正常组相比,###表示 $P<0.001$;给药组与模型组相比,***表示 $P<0.001$ (A—IL-1 β ;B—IL-6;C—TNF- α) ($x\pm s, n=4\sim6$)

图 5 大黄素对东莨菪碱诱导小鼠海马中促炎细胞因子含量的影响

Fig. 5 The effect of emodin on the contents of proinflammatory factors in hippocampus of scopolamine-induced mice



模型组与正常组相比,###表示 $P<0.001$;给药组与模型组相比,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$

(A—免疫荧光图;B—TLR4;C—NLRP3;D—IL-1 β) ($x\pm s, n=3$)

图 6 大黄素对东莨菪碱诱导小鼠海马促炎相关蛋白表达的影响

Fig. 6 The effect of emodin on the expression levels of proinflammatory proteins in hippocampus of scopolamine-induced mice

4 讨论

ACh 是一种参与记忆形成的神经递质,影响学习和记忆能力^[15]。胆碱能神经元的退变与 AD 的发生呈正相关^[16],基底前脑胆碱能神经元的缺失可导致 AD 患者学习记忆能力的损伤^[17]。实验结果表明大黄素能通过提高 ACh 的含量来改善东莨菪碱诱导的认知功能缺陷。芦荟大黄素的结构与大黄素相似,可显著改善小鼠的认知功能障碍,增加海马中的 ACh 含量^[18]。ACh 含量变化是一个动态平衡过程,由多种酶维持,如 AChE、BuChE 和 ChAT^[19],其中 AChE、BuChE 在胆碱能的突触间能降解 ACh,但主要为 AChE 发挥作用,从而终止 ACh 对突触后膜的兴奋作用,而 ChAT 负责将乙酰辅酶 A 转移到胆碱上,促进 ACh 的合成,三者协同作用起到了维持神经递质 ACh 含量平衡的作用。研究表明,AD 患者海马中的 AChE、BuChE 活力升高^[20]。ChAT 活性降低会减弱 ACh 的合成,损害学习能力^[21],此外,BuChE 可替代 AChE 发挥作用,能抑制 BuChE 活性,有利于提高认知功能^[22]。因此,AChE、BuChE 和 ChAT 可能是改善 AD 缺陷有价值的靶点。AutoDock Vina 1.1.2 软件预测大黄素可与 AChE 和 BuChE 进行稳定结合,有作为胆碱酯酶抑制剂的潜力。通过 ELISA 法证实大黄素能抑制 AChE 和 BuChE 活性,并增加 ChAT 活性。

Nrf2 可调节细胞中活性氧的水平,也控制 II 相解毒酶如 HO-1、醌氧化还原酶 1(NQO1)以及包括 CAT 和 SOD 的抗氧化蛋白水平^[6]。实验结果显示:东莨菪碱能降低海马中 Nrf2 和 HO-1 的表达水平,但大黄素可恢复其部分表达;东莨菪碱会抑制抗氧化酶活性,而大黄素能恢复其活性。以上结果说明大黄素通过上调 Nrf2/HO-1 通路来缓解东莨菪碱诱导的氧化应激。类似的研究显示,大黄素可通过激活 AMPK/Nrf2 信号通路来减少氧自由基的产生^[23]。

在长期服用非甾体抗炎药的类风湿性关节炎患者中,AD 的发生率较低^[24],这说明促炎细胞因子可能是预防 AD 发生或阻碍 AD 进展的有效靶点。TLR4 是 Toll 样受体家族成员,能识别病原体 and 内源性配体,激活 NF- κ B 信号通路^[12,13]。当细胞膜上的 TLR4 被激活时,TLR4 可以活化 NF- κ B 从而促进 NLRP3 炎性小体复合物的组装^[25]。NLRP3 及其炎症小体复合物由 NLRP3、斑点样相关蛋白(ASC)和 pro-caspase-1 组成^[26]。当炎症小体被激

活时,NLRP3 与 ASC、pro-caspase-1 形成 NLRP3-ASC-pro-caspase-1 复合物,并剪切 pro-caspase-1 产生活性 caspase-1^[27],将下游的 pro-IL-1 β 转化为活性形式的 IL-1 β ,启动和放大下游炎症信号通路,引起炎症反应^[28]。笔者通过分子对接和实验证明大黄素通过下调 TLR4/NLRP3 通路抑制了东莨菪碱诱导的神经炎症。大黄素可降低结肠炎中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平^[29],在脂多糖构建的炎症模型中,大黄素能通过抑制 I κ B α 磷酸化来减少炎症反应^[19]。以上这些抗炎效果也佐证了我们的研究结果。

5 结论

综上,大黄素可通过以下三方面对阿尔茨海默病发挥治疗作用:通过抑制 AChE 和 BuChE 活性、增强 ChAT 活性、增加 ACh 含量来发挥神经保护作用;通过调控 Nrf2/HO-1 通路缓解东莨菪碱诱导的氧化应激;通过调控 TLR4/NLRP3 通路减轻东莨菪碱诱导的神经炎症。以上研究说明大黄素有可能成为治疗阿尔茨海默病的候选药物,本研究可为阿尔茨海默病的治疗提供新的有效单体,未来还需要借助基因敲除及过表达技术抑制或激活关键蛋白的表达,以进一步验证大黄素治疗阿尔茨海默病的靶点。另外,大黄素如何发挥激活 Nrf2 的作用、与 Nrf2 的结合位点在哪里等问题,也尚需采用分子对接等结构药理学研究方法来进行进一步阐明。

参考文献:

- [1] 龙清华,朱麒行,麦合丽娅·艾斯卡尔,等. 酸枣仁汤通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路改善阿尔茨海默病模型小鼠线粒体功能障碍[J]. 中国药理学通报,2023,39:1256-1262.
- [2] Dwomoh L, Tejeda G S, Tobin A B. Targeting the M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease[J]. *Neuron Signal*, 2022,6:NS20210004.
- [3] Qian X X, Hamad B, Dias-Lalcaca G. The Alzheimer disease market[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2015,14:675-676.
- [4] Nuzzo D, Frinchi M, Giardina C, et al. Neuroprotective and antioxidant role of oxotremorine-M, a non-selective muscarinic acetylcholine receptors agonist, in a cellular model of Alzheimer disease[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022,43:1941-1956.

- [5] Revi M. Alzheimer's disease therapeutic approaches[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1195: 105-116.
- [6] Kwon S H, Lee H K, Kim J A, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649: 210-217.
- [7] 荆国晓,董小娟. 乙酰胆碱酯酶抑制剂罕见不良反应比萨综合征分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43: 551-554.
- [8] Mohammad D, Chan P, Bradley J, et al. Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms-a safety evaluation[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16: 1009-1019.
- [9] Li X, Chu S, Liu Y, et al. Neuroprotective effects of anthraquinones from Rhubarb in central nervous system diseases [J]. *Evidence-based Compl Alt*, 2019, 2019: 3790728.
- [10] Liu T, Jin H, Sun Q R, et al. Neuroprotective effects of emodin in rat cortical neurons against β -amyloid-induced neurotoxicity[J]. *Brain Res*, 2010, 1347: 149-160.
- [11] Xian M, Cai J, Zheng K, et al. Aloe emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12: 8056-8067.
- [12] Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is pro-inflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2223-2233.
- [13] Bjorkbacka H, Fitzgerald K A, Huet F, et al. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades[J]. *Physiol Genomics*, 2004, 19: 319-330.
- [14] 张薇,曾常茜. Toll样受体与神经退行性疾病研究进展[J]. *生物化工*, 2023, 9: 175-180.
- [15] Picciotto M R, Higley M J, Mineur Y S. Acetylcholine as a neuromodulator: Cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior[J]. *Neuron*, 2012, 76: 116-129.
- [16] Whitehouse P J, Price D L, Clark A W, et al. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis[J]. *Ann Neurol*, 1981, 10: 122-126.
- [17] Whitehouse P J, Price D L, Struble R G, et al. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain[J]. *Science*, 1982, 215: 1237-1239.
- [18] Tao L, Xie J, Wang Y, et al. Protective effects of aloe-emodin on scopolamine-induced memory impairment in mice and H_2O_2 -induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 5385-5389.
- [19] Bekdash R A. The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1273.
- [20] Ferreira-Vieira T H, Guimaraes I M, Silva F R, et al. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Curr. Neuropharmacology*, 2016, 14: 101-115.
- [21] Hawley W R, Witty C F, Daniel J M, et al. Choline acetyltransferase in the hippocampus is associated with learning strategy preference in adult male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 289: 118-124.
- [22] Wang Z X, Lian W W, He J, et al. Cornuside ameliorates cognitive impairments in scopolamine induced AD mice: Involvement of neurotransmitter and oxidative stress[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115252.
- [23] de Oliveira M R, de Souza I C C, Brasil F B. Promotion of mitochondrial protection by emodin in methylglyoxal-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of the AMPK/Nrf2/HO-1 axis[J]. *Neurotox Res*, 2021, 39: 292-304.
- [24] Ozben T, Ozben S. Neuroinflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease [J]. *Clin. Biochem*, 2019, 72: 87-89.

- [25] Li W, Wang K, Liu Y, et al. A Novel Drug Combination of Mangiferin and Cinnamic Acid Alleviates Rheumatoid Arthritis by Inhibiting TLR4/NF κ B/NLRP3 Activation-Induced Pyroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 912933.
- [26] Kelley N, Jeltema D, Duan Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3328.
- [27] Paik S, Kim J K, Silwal P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18: 1141-1160.
- [28] Wang L, Hauenstein A V. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies [J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100889.
- [29] Zhang Y, Pu W, Bousquenaud M, et al. Emodin inhibits inflammation, carcinogenesis, and cancer progression in the AOM/DSS model of colitis-associated intestinal tumorigenesis [J]. *Front Onco*, 2021, 10: 564674.

(上接第 26 页)

- [13] 余业鑫, 李艳, 向罗京, 等. 汉江下游干支流浮游植物群落特征及其对水质的指示评价 [J]. *中国环境监测*, 2022, 38(1): 124-135.
- [14] 苟本富. 铜胁迫对蚕豆幼苗基因组 DNA 损伤效应的研究 [J]. *北方园艺*, 2011(4): 158-160.
- [15] 水利部. 水利部关于印发全国重要饮用水水源地名录(2016 年)的通知 [EB]. 2016-09-29.
- [16] 武汉市水务局. 武汉市饮用水水源地水质状况年度报告(2004—2021 年) [R]. 武汉: 武汉市水务局.
- [17] Mukhtar A, Manzoor M, Gul I, et al. Phytotoxicity of different antibiotics to rice and stress alleviation upon application of organic amendments [J]. *Chemosphere*, 2020, 258: 127353.
- [18] 仲昭朝, 邹婷, 唐惠炜, 等. 铜胁迫对蚕豆根尖细胞凋亡及线粒体功能的影响 [J]. *南京大学学报(自然科学)*, 2019, 55(1): 154-160.
- [19] Li N, Wang K, Lv Y, et al. Silicon enhanced the resistance of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) to ofloxacin on the growth, photosynthetic characteristics and antioxidant system [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 175: 44-57.
- [20] 范亚宁, 袁家根, 耿盼, 等. 秦岭北麓及周边生态系统水质净化功能评估 [J]. *环境科学与技术*, 2022, 45(3): 64-72.
- [21] Zubaidah T, Karnaningroem N, Slamet A. The self-purification ability in the rivers of Banjarmasin, Indonesia [J]. *Journal of Ecological Engineering*, 2019, 20(2): 177-182.
- [22] Cheng K Y, Sheng By, Zhao Y Y, et al. An urban water pollution model for Wuhu city [J]. *Water*, 2022, 14(3): 386-402.
- [23] 周芬, 申月红. 基于绿色施工的环境保护技术 [J]. *工程质量*, 2011, 29(1): 61-64.