

# 加味当归芍药散对纤丝状 A<sub>42</sub> 诱导 脑内炎症因子及磷酸化 MAPK 信号分子表达的影响

黄德弘<sup>1</sup>, 刘孟渊<sup>2\*</sup>, 闫小峰<sup>2</sup>

(1. 广州市中医医院, 广州 510130; 2. 广州市中医中药研究所, 广州 510130)

**[摘要]** 目的: 观察 A<sub>42</sub> 沉积对大脑海马炎症因子和磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号分子表达的影响及加味当归芍药散 (JWDSS) 的干预作用。方法: 选用 12 周龄雌性 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 应用立体定位注射技术对 SD 大鼠 1 次性大脑海马定位注射纤丝状 A<sub>42</sub> 复制 AD 病理模型, 并给予 JWDSS (剂量分别为 70.654, 35.327 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 进行干预, 以西乐葆 (剂量 0.183 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 为对照, 用免疫组化 (SABC) 方法显示炎症因子及磷酸化 MAPK 信号分子表达情况, 并用分析软件进行图像分析。结果: 与正常对照组相比, AD 模型组的白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1), IL-6, phospho-p38 (p-p38), p-JNK, p-MEK3/6 的阳性细胞染色面积均增加而染色强度值均下降 (蛋白表达量与染色强度值成反比); 各给药组的 IL-1, IL-6 阳性细胞染色面积较 AD 模型组下降; JWDSS 高、低剂量组的 IL-6 及 JWDSS 高剂量组的 IL-1 染色强度值均较 AD 模型组增加, 而 JWDSS 低剂量组的 IL-1 染色强度值亦呈增加的趋势; 西乐葆对照组的 IL-1 染色强度值亦较 AD 模型组增加, 而 IL-6 染色强度值呈增加的趋势。另外, 除了 JWDSS 低剂量组的 p-JNK 外, 其余各给药组的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 阳性细胞染色面积与 AD 模型组相比均明显下降, 而染色强度值均较 AD 模型组明显增加。结论: A<sub>42</sub> 沉积可诱导大脑海马炎症反应和炎症细胞因子 IL-1, IL-6 及 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 的过表达, 而抑制炎症因子及磷酸化 MAPK 信号分子的过表达, 从而抑制 AD 模型脑内炎症, 可能是 JWDSS 拮抗 AD 的主要作用机制。

**[关键词]** 加味当归芍药散; 阿尔茨海默病; 炎症因子; MAPK 通路; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)02-0143-06

## Effects of Modified Danggui Shaoyao Powder on the Expression of Inflammatory Cytokines and Phosphorylated MAPK Signal Molecules in Hippocampus Induced by Fibrillar A<sub>42</sub>

HUANG De-hong<sup>1</sup>, LIU Meng-yuan<sup>2\*</sup>, YAN Xiao-feng<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China;

2. Guangzhou Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of A<sub>42</sub> deposition on the expression of hippocampal inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal molecules, and the intervention by Modified Danggui Shaoyao Powder (JWDSS). **Method:** Alzheimer's disease (AD) model was established by stereotactic injection of fibrillar A<sub>42</sub> into the hippocampus of 12 week-old female SD rats being divided into 6 groups. JWDSS (70.654, 35.327 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) was given for intervention, and celebrex (0.183 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) was used as control. Expression of inflammatory cytokines and phosphorylated MAPK pathway signaling molecules were observed by immunohistochemistry (SABC) methods and SABC images were analyzed by an image analyzing software. **Result:** Compared with the control group, the positive stained areas of interleukin-1 (IL-1), IL-6 and phospho-p38 (p-p38), p-JNK and p-MEK3/6 increased with decreased staining intensity in the model

**[收稿日期]** 20100720(005)

**[通讯作者]** \* 刘孟渊, 硕士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合基础和临床研究, Tel: 13642629036, E-mail: argnwu@scut.edu.cn

group. Protein expression quantity was inversely proportional to the staining intensity. The positive stained areas of IL-1, IL-6 and p-p38, p-JNK and p-MEK3/6 in the treatment groups decreased and their staining intensity increased, compared with the AD model group. **Conclusion:** A<sub>42</sub> deposition in hippocampus can induce inflammation of the brain and over-expression of IL-1, IL-6 and p-p38, p-JNK, p-MEK3/6. Inhibiting the over-expression of inflammatory cytokines and phosphorylated MAPK signaling molecules may be a major antagonistic mechanism of JWDSS for AD.

**[Key words]** Modified Danggui Shaoyao Powder; Alzheimers disease; inflammatory cytokines; MAPK pathway; rat

脑中沉积的老年斑(SP)又称神经炎性斑,是阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)主要的病理学特征之一。在AD患者脑内有强烈的局灶性炎症反应,在SP周围绕有大量激活的神经胶质细胞和明显的炎症标志物如IL-1, IL-6和TNF- $\alpha$ 等<sup>[1-2]</sup>。越来越多的研究表明,淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A<sub>42</sub>)沉积激活小胶质细胞引起的慢性神经炎症反应是AD的核心病理机制<sup>[3]</sup>。MAPK级联(cascade)是细胞内主要的信号转导系统。MAPK信号转导通路的激活在tau蛋白磷酸化、A<sub>42</sub>沉积及其引起的炎症反应等AD发病的分子机制中起重要作用,尤其是p38信号通路与后者具有紧密联系<sup>[4]</sup>。因此,本研究拟用大海马一次性定位注射聚集成纤丝状的A<sub>42</sub>复制AD病理模型,用免疫组化方法(SABC)观察、并进行图像分析各组大海马组织炎症因子IL-1, IL-6及p-p38, p-JNK, p-MEK等磷酸化MAPK通路信号分子表达的变化以及加味当归芍药散的干预作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 雌性SD大鼠66只,鼠龄12周,体重280~300g,购自广东省医学实验动物中心,证书号SCXY(粤)2008-0002。常规分笼饲养,自然照明,随意取食和饮水。

**1.2 药物** 塞来昔布(celecoxib),商品名西乐葆(celebrex),由辉瑞制药有限公司生产,批号BK050609。临用前用蒸馏水配制成0.0146g·mL<sup>-1</sup>的溶液。给药剂量0.183g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,为5倍临床等效剂量。

加味当归芍药散(简称为JWDSS)由当归芍药散加党参组成,即当归、赤芍、白芍、川芎、茯苓、白术、泽泻、党参等,党参、茯苓、白术、川芎与当归、赤芍、白芍及泽泻的比例为14:21:11。所有中药饮片均购自本医院中药房,加水浸泡30min后,煎煮3次。合并3次煎液,浓缩,纱布过滤,药液质量浓度

为生药5.652g·mL<sup>-1</sup>,此为高剂量药液,加水对倍稀释后即成为低剂量药液,密封蒸浴加热消毒,放置4冰箱备用。JWDSS高、低剂量组给药剂量分别为70.65, 35.33g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;分别为4.2, 2.1倍的临床等效剂量。

**1.3 试剂** A<sub>42</sub>购自美国Sigma公司,批号071205,用无菌生理盐水溶解,配制成2g·L<sup>-1</sup>的溶液,置37℃隔水式电热恒温培养箱孵育7d,成聚集状态的纤丝状。

免疫组化使用的一抗兔抗大鼠IL-1(批号L1808),IL-6(批号C2709),磷酸化c-Jun氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)(Thr183/Tyr185)(批号B1709),磷酸化的MAPK上游激酶MEK3/6[p-MEK-3/6(Ser189/Ser207)](批号C0309),均购自Santa Cruz生物技术公司。兔抗大鼠p-p38(Thr183/Tyr185)(批号4631S)购自Cell Signalling Technology公司。生物素化二抗(羊抗兔)、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)、二氨基联苯胺(DAB)染色试剂盒、复合消化液、抗原修复液等均购自武汉博士德生物工程有限公司。无水乙醇、分析纯的二甲苯、水合氯醛、医用双氧水、多聚甲醛购自广州化学试剂厂。临用前配制成合适浓度。

**1.4 仪器** 主要器械有隔水式电热恒温培养箱、电热恒温培养箱,脑立体定位仪(美国stoelting公司生产,型号ST51600),大鼠跳台仪(型号DTT-2,中国医学科学院药物研究所研制),德国Leica病理图像分析系统(型号DF320),Leica Qwin-plus图像分析软件。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 选用雌性SD大鼠66只,大鼠随机分为6组:正常对照组、生理盐水假手术组、AD模型组、JWDSS高、低剂量组及西乐葆对照组,每组11只

大鼠。

**2.2 动物造模** 参考吴琪等的方法<sup>[5]</sup>,以双侧海马为注射靶区,经预实验确定进针点:前囟向后 4.5 mm,向左、右各 2.5 mm,硬膜下垂直进针 2.9 mm。除正常对照组外,各组动物用 10% 水合氯醛以 3 mL·kg<sup>-1</sup>体重的剂量 ip 麻醉后,将大鼠背位固定于立体定位仪,碘酒消毒,正中矢状位切口,用三棱针在双侧海马定位注射进针点钻开颅骨,用 5 μL 微量注射器自硬膜下垂直进针 2.9 mm,将 5 μL 纤维状 A<sub>1-42</sub> 缓慢注入(0.5 μL·min<sup>-1</sup>),留针 15 min 后缓慢拔出,缝合切口,伤口消毒。生理盐水组注射生理盐水,其他处理均相同。正常对照组不作定位注射处理。

**2.3 药物干预** 分别于造模前、后各给药 7 d, ig 给药,给药体积量均为 2.5 mL·(200 g)<sup>-1</sup>体重。中药组的给药剂量参考本课题组之前研究使用的剂量, JWDSS 高、低剂量组给药剂量分别为 70.65, 35.33 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;西乐葆组给药剂量为 0.183 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;假手术组和正常对照组分别予等体积的蒸馏水 ig;每日 1 次,连续 14 d。

**2.4 各组大鼠大脑海马病理学检测**

**2.4.1 大脑海马组织取材、固定** 实验结束后,用 10% 水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>) ip 麻醉大鼠,经心脏快速灌注生理盐水 300 mL,然后用 4% 多聚甲醛(pH 7.3) 300 mL 缓慢灌注固定组织,断头取脑,分离双侧海马并浸泡于 4% 多聚甲醛中,室温固定 24 h 后,常规石蜡包埋,4 μm 切片,分别进行 HE 染色和刚果红染色。

**2.4.2 免疫组化检测** 每组选取 10 只大鼠经固定后的海马组织,经乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片;用免疫组化(SABC)方法检测。按照试剂盒说明操作,DAB 显色,观察蛋白表达情况,细胞浆出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。阴性对照以 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PBS 代替一抗,不出现阳性着色。

**2.4.3 免疫组化染色的半定量分析** 在 10 ×20 倍或 10 ×40 倍物镜下观察切片染色并拍照;图像分析:用德国 LEICA Qwin Plus 图像处理和分析软件对各组切片免疫组织化学反应进行测量,测定其阳性细胞平均染色强度值和染色面积,并进行半定量分析。

**2.5 实验数据的统计学处理** 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 11.5 统计软件包进行数据分析,

计量资料采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 HE 染色结果** 光镜下可见 AD 模型组大鼠海马小胶质细胞增生、聚集,核小深染,胞质少。向外周见核稍大,染色较浅呈卵圆形者为反应性星形胶质细胞。CA1 区锥体神经细胞带不完整,神经元丧失,为胶质细胞所取代。假手术组见少量胶质细胞增生,CA1 区受损细胞带明显较窄;与模型组相比, JWDSS 高、低剂量组和西乐葆组大鼠海马小胶质细胞与星形胶质细胞反应性增生及神经元丧失情况明显减轻,但仍较假手术组严重;正常对照组和假手术组 CA1 区细胞带完整,胶质细胞呈散在分布。

**3.2 刚果红染色结果** 刚果红染色光镜下 AD 模型组大鼠海马可见棕红色淀粉样蛋白沉积,并向周围扩散,苏术素复染示 A<sub>42</sub> 聚集区为大量增生的胶质细胞所包绕,与 AD 中的老年斑构成相似;假手术组刚果红染色浅淡,少量胶质细胞增生; JWDSS 高、低剂量组、西乐葆组刚果红染色亦变浅,棕红色淀粉样蛋白沉积较局限,无明显小胶质细胞与星形胶质细胞反应性增生。

**3.3 免疫组化结果**

**3.3.1 各组大鼠海马细胞因子 IL-1, IL-6 表达情况** AD 模型组双侧海马 CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> 区 IL-1, IL-6 免疫组化染色阳性锥体细胞数目明显增加,排列紧密,染色较深,胞浆呈棕黄色,尤以 CA<sub>3</sub> 区明显,两侧无明显差异;正常对照组和假手术组海马锥体细胞胞浆呈浅棕黄色;各给药组海马锥体细胞胞浆染色较 AD 模型组有程度不等的减轻,染色细胞数量亦减少。

**3.3.1.1 各组大鼠海马 IL-1, IL-6 阳性细胞染色面积比较** 免疫组化结果经 LEICA Qwin Plus 图像处理和分析软件进行半定量分析,各组大鼠海马 IL-1, IL-6 阳性细胞染色面积见表 1。染色面积与染色的阳性细胞数成正比,亦与蛋白的表达量成正比。如表 1 所示,与正常对照组相比,AD 模型组大脑海马的 IL-1, IL-6 阳性染色面积均明显增加(分别为 *P* < 0.01 或 *P* < 0.05),提示表达 IL-1, IL-6 的阳性细胞数增加。而假手术组的阳性染色面积与正常对照组相比,二者差别无显著性意义。与 AD 模型组比较,各给药组的 IL-1, IL-6 阳性染色面积均下降(均为 *P* < 0.05),但各给药组的 IL-1, IL-6 阳性染

色面积仍高于正常对照组(分别为  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠海马 IL-1, IL-6 阳性细胞染色面积比较 (均  $\pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	IL-1	IL-6
正常对照	-	2 569 ±1 290 <sup>2)</sup>	396 ±112 <sup>2)</sup>
假手术	-	2 677 ±1 334 <sup>2)</sup>	470 ±204 <sup>2)</sup>
AD 模型 <sup>5)</sup>	-	7 488 ±3 043 <sup>4)</sup>	2 091 ±1 193 <sup>4)</sup>
JWDSS	70.65	4 576 ±2 621 <sup>1, 3)</sup>	1 122 ±640 <sup>1, 4)</sup>
	35.33	4 632 ±1 997 <sup>1, 3)</sup>	877 ±300 <sup>1, 4)</sup>
西乐葆	0.183	4 231 ±2 046 <sup>1, 3)</sup>	896 ±241 <sup>1, 4)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与正常对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>5)</sup> 造模剂量为 A<sub>1-42</sub> 100  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (表 2 ~4 同)。

**3.3.1.2 各组大鼠海马 IL-1, IL-6 阳性细胞染色强度值比较** 免疫组化结果的图像分析显示,各组大鼠海马炎症细胞因子 IL-1, IL-6 阳性细胞染色强度值见表 2。

表 2 各组大鼠海马 IL-1, IL-6 阳性细胞染色灰度值比较 (均  $\pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	IL-1	IL-6
正常对照	-	138.31 ±4.60 <sup>2)</sup>	148.52 ±10.83 <sup>1)</sup>
假手术	-	138.58 ±5.82 <sup>1)</sup>	143.94 ±5.65 <sup>1)</sup>
AD 模型 <sup>5)</sup>	-	132.48 ±3.93 <sup>4)</sup>	137.12 ±6.81 <sup>3)</sup>
JWDSS	70.65	136.29 ±2.78 <sup>1)</sup>	145.26 ±6.99 <sup>1)</sup>
	35.33	135.55 ±3.79	145.11 ±6.04 <sup>1)</sup>
西乐葆	0.183	137.05 ±2.98 <sup>2)</sup>	139.92 ±1.09 <sup>3)</sup>

染色强度值与染色深浅和蛋白表达量成反比,强度值小,染色深,蛋白表达量高;强度值大,染色浅,蛋白表达量低。与正常对照组相比,AD 模型组海马的 IL-1, IL-6 的强度值下降(分别为  $P < 0.01$ ,

表 3 各组大鼠海马组织 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性细胞染色面积比较 (均  $\pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	p-p38	p-JNK	p-MEK3/6
正常对照	-	2 757 ±1 207 <sup>2)</sup>	1 594 ±749 <sup>2)</sup>	2 508 ±742 <sup>2)</sup>
假手术	-	3 739 ±2 079 <sup>2)</sup>	1 616 ±503 <sup>2)</sup>	2 387 ±614 <sup>2)</sup>
AD 模型 <sup>5)</sup>	-	9 759 ±3 423 <sup>4)</sup>	2 745 ±952 <sup>4)</sup>	6 207 ±2 183 <sup>4)</sup>
JWDSS	70.65	3 617 ±1 286 <sup>2)</sup>	1 835 ±495 <sup>1)</sup>	3 648 ±1 280 <sup>2, 3)</sup>
	35.33	4 241 ±2 323 <sup>2)</sup>	2 862 ±1 131 <sup>4)</sup>	3 799 ±398 <sup>2, 4)</sup>
西乐葆	0.183	3 238 ±1 001 <sup>2)</sup>	1 555 ±535 <sup>2)</sup>	3 505 ±1 202 <sup>2, 3)</sup>

**3.3.2.2 各组大鼠海马 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 阳性细胞染色强度值比较** 如表 4 所示,与正常对照组染色强度值相比,AD 模型组大海马的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 的强度值均下降(分别为  $P < 0.01$

$P < 0.05$ ),进一步提示 AD 模型组海马的 IL-1, IL-6 表达量高于正常对照组;假手术组的强度值与正常对照组的差别无显著性意义。与 AD 模型组相比,高、低剂量组的 IL-6 强度值及 JWDSS 高剂量组的 IL-1 强度值均增加(均为  $P < 0.05$ ),西乐葆组的 IL-1 强度值亦较 AD 模型组增加( $P < 0.01$ )。

**3.3.2 各组大鼠海马组织磷酸化 MAPK 信号分子 p-p38, p-JNK, p-MEK 表达情况** AD 模型组双侧海马 CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> 区 p-p38, p-JNK, p-MEK 免疫组化染色阳性锥体细胞数目明显增加,排列紧密,染色较深,胞浆呈棕黄色,尤以 CA<sub>1</sub> 区明显,两侧海马无明显差异;p-p38 在阳性细胞的胞浆和胞核均有表达,p-JNK, p-MEK 则在胞浆表达为主,也有少量在胞核表达;正常对照组和假手术组海马锥体细胞胞浆呈浅棕黄色;各给药组海马锥体细胞胞浆染色较 AD 模型组有程度不等的减轻,染色细胞数量亦减少。

**3.3.2.1 各组大鼠海马 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性细胞染色面积比较** 如表 3 所示,与正常对照组相比,AD 模型组大海马组织的 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性细胞染色面积均明显增加(均为  $P < 0.01$ ),提示表达 p-p38, p-JNK, p-MEK 的阳性细胞数增加;而假手术组的 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性染色面积与正常对照组相比,差别无显著性意义。与 AD 模型组比较,除 JWDSS 低剂量组的 p-JNK 外,其余各给药组的 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性染色面积均明显下降(分别为  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。但 JWDSS 低剂量组的 p-JNK 及 JWDSS 高、低剂量组的 p-MEK 阳性染色面积仍较正常对照组明显增加(分别为  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

或  $P < 0.05$ ),进一步提示 AD 模型组海马的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 的表达量高于正常对照组;假手术组的强度值与正常对照组的差别无显著性意义。

表 4 各组大鼠海马组织 p-p38, p-JNK, p-MEK 阳性细胞染色强度值比较( 珉±s, n=10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	p-p38	p-JNK	p-MEK3/6
正常对照	-	121.90 ±5.18 <sup>2)</sup>	103.34 ±13.33 <sup>1)</sup>	119.82 ±6.15 <sup>2)</sup>
假手术	-	120.68 ±4.09 <sup>2)</sup>	100.47 ±6.53 <sup>2)</sup>	115.94 ±6.31 <sup>2)</sup>
AD 模型 <sup>5)</sup>	-	108.65 ±6.70 <sup>4)</sup>	90.67 ±4.61 <sup>3)</sup>	99.94 ±6.01 <sup>4)</sup>
JWDSS	70.65	116.32 ±5.49 <sup>1,3)</sup>	98.96 ±8.51 <sup>1)</sup>	112.77 ±7.98 <sup>2,3)</sup>
	35.33	115.62 ±7.29 <sup>1,3)</sup>	97.58 ±12.31	105.42 ±7.48 <sup>4)</sup>
西乐葆	0.183	118.97 ±6.65 <sup>2)</sup>	102.60 ±10.60 <sup>2)</sup>	101.98 ±3.17 <sup>4)</sup>

与 AD 模型组相比,除 JWDSS 低剂量组的 p-JNK, p-MEK 及西乐葆组的 p-MEK 外,其余各给药组的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 染色强度值均明显增加(分别为  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );但除了 JWDSS 高、低剂量组的 p-JNK 及西乐葆组的 p-p38, p-JNK 外, p-p38 的 JWDSS 高、低剂量组及 p-MEK 各给药组的强度值仍较正常对照组为低(分别为  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

A 沉积激活小胶质细胞(MG)引起的慢性神经炎症反应是 AD 的核心病理机制。脑中沉积的 A 激活 MG, 释放 IL-1, IL-6, TNF- 等细胞因子, 使星形胶质细胞被激活、增殖、释放炎性蛋白, 促使散在的、可溶性 A 转化为丝状的具有神经毒作用的不溶性沉淀, 进一步激活 MG 释放致炎细胞因子, 从而在 AD 脑内形成一个不断增强的自身毒性环路, 使炎症反应和 A 沉积的不断增强, 脑中慢性炎症长期存在, 引发大量的神经细胞的死亡。其中 IL-1 是始动环节, 起着关键作用<sup>[6-7]</sup>。

本研究发现 AD 模型组海马切片可见大量棕红色 A 沉积, 为大量增生的胶质细胞所包绕, 与 AD 中的老年斑构成相似, 并向周围扩散, JWDSS 和西乐葆则可抑制海马 A 沉积, 使刚果红染色变浅, 棕红色淀粉样蛋白沉积较局限, 无明显小胶质细胞与星形胶质细胞反应性增生。AD 模型组海马的 H. E 染色可见小胶质细胞增生、聚集, 并见反应性星形胶质细胞, 及 CA1 区锥体神经细胞带不完整, 神经元丧失, 为胶质细胞所取代, 表明炎症反应及其损害的存在, 而 JWDSS 和西乐葆均能减轻 A<sub>42</sub> 沉积诱导的炎症反应及其引起的损害。

本研究结果发现 AD 模型组海马的 IL-1, IL-6 表达量高于正常对照组。IL-1, IL-6 表达增加亦是小胶质细胞激活的标志之一, 提示大脑海马定位注射聚集态 A<sub>1-42</sub> 诱发了局部的炎症反应, 小胶质细胞

激活, 导致炎症因子的表达增加, 表明炎症反应是 AD 的病理机制之一; 而 JWDSS 能抑制 AD 模型大脑海马 IL-1, IL-6 表达, 这可能是该复方治疗 AD 的作用机制之一。另外, 可见 AD 模型大脑海马 IL-1 表达的面积和强度均明显强于 IL-6, 此亦提示 IL-1 在 AD 脑内炎症反应中的始动和关键作用。

研究证实, 在 AD 的发病机制中, MAPK 信号通路参与了 AD 特征性病理改变<sup>[4]</sup>。提示抑制 MAPK 信号转导通路的活性可能成为治疗 AD 的一个重要靶点。在炎症反应中, p38 MAPK 通路可能起主要作用, 是炎症机制的重要调控者, 在氧化应激或受到 A 活化时, 促进炎症因子的生成, 反之, 后者又活化 p38, 使此正反馈环路不断扩大<sup>[8]</sup>。p38MAPK 的激活介导了许多炎症因子和致病因素对海马神经突触可塑性的损伤; JNK 则参与了炎症因子对神经突触可塑性的生物学基础——长时程增强(LTP)的抑制<sup>[9]</sup>, 均可导致 AD 的学习记忆能力受损。

本研究发现 AD 模型组海马组织的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 表达量高于正常对照组; 提示大脑海马定位注射聚集态 A<sub>42</sub> 诱发的局部炎症反应中, 在 IL-1, IL-6 表达增加的同时, 存在 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 的过表达即存在 MAPK 信号通路的磷酸化激活。MEK3/6 是 p38 的上游激酶。许多能激活 p38 的因素也能激活 JNK, 如 TNF, IL-1 等, p38MAPK 和 JNK 被称为压力激活激酶, 可促进炎症的发展。因而海马 A<sub>42</sub> 的沉积作为一种炎性刺激, 既可激活 MEK3/6, 进而激活 p38, 亦可激活 JNK。本研究结果表明 AD 模型大脑海马的纤维状 A<sub>42</sub> 激活了 p38MAPK 和 JNK 信号通路。但未检测出磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylated extracellular regulated protein kinase, p-ERK) 的表达, 提示 ERK 信号通路在 AD 模型大脑海马炎症反应中或者处于次要地位。在海马的炎症反应中, IL-1, IL-6 表达增加可能是 p38 MAPK 和 JNK 信号通路激活的生物

学效应,反之,其可能进一步激活 p38MAPK 和 JNK,致 IL-1, IL-6 等炎症因子产生更多,使此正反馈环路不断扩大。

观察各给药组对上述 MAPK 信号分子表达的影响,发现 JWDSS 和西乐葆均有抑制 AD 模型 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 过表达的作用,使 A<sub>42</sub> 沉积诱导的 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 阳性细胞数减少,染色变浅;提示 JWDSS 和西乐葆可能通过抑制 p38MAPK 和 JNK 信号通路的激活,从而抑制其下游生物学效应而发挥拮抗 AD 的作用。

本研究结果表明 A<sub>42</sub> 沉积可诱导大脑海马炎症反应和炎症细胞因子 IL-1, IL-6 及磷酸化 MAPK 信号分子 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 的过表达;海马 A<sub>42</sub> 沉积诱导的炎症反应是 AD 的病理机制之一, p38MAPK 和 JNK 信号通路的激活与 AD 病理过程中的炎症机制密切相关;而抑制 IL-1, IL-6 等炎症因子及 p-p38, p-JNK, p-MEK3/6 等 MAPK 信号分子的表达,可能是 JWDSS 拮抗 AD 的主要作用机制。

炎症因子 IL-1, IL-6 的表达与磷酸化 MAPK 信号分子的表达之间的相互关系及其在 AD 病理机制中的作用如何?值得进一步深入研究。

#### [参考文献]

[ 1 ] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and

Alzheimer's disease[ J ]. Neurobiol Aging, 2000, 21( 3 ) : 383.

[ 2 ] Golde T E. Inflammation takes on Alzheimer disease[ J ]. Nat Med, 2002, 8( 9 ) : 936.

[ 3 ] 陈龙飞,汪晓军,许国英,等.雷公藤氯内酯醇对阿尔茨海默病大鼠小胶质细胞活化的影响[ J ].解剖学杂志, 2009, 32( 4 ) : 485.

[ 4 ] Zhu X, Lee H G, Raina A K, et al. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease [ J ]. Neurosignals, 2002, 11( 5 ) : 270.

[ 5 ] 吴琪,方莹莹,郑树森,等.海马注射纤维状 A<sub>42</sub> 诱导 tau 异常磷酸化的研究[ J ].中国神经精神疾病杂志, 2003, 29( 3 ) : 175.

[ 6 ] 韦道祥.小胶质细胞与阿尔茨海默病[ J ].国外医学·老年医学分册, 2000, 21( 6 ) : 248.

[ 7 ] Mrak R E, Griffin W S. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease[ J ]. Neurobiol Aging, 2001, 22( 6 ) : 903.

[ 8 ] 宋锦秋综述,陈晓春审校. MAPK 信号通路与阿尔茨海默病 tau 蛋白磷酸化的关系[ J ].国际神经病学神经外科学杂志, 2006, 33( 4 ) : 339.

[ 9 ] 李君,高维娟. MAPK 级联信号通路与血管性痴呆的相关性进展[ J ].第四军医大学学报, 2009, 30( 17 ) : 630.

[责任编辑 聂淑琴]