

基于 A β 代谢和 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路探讨开心散对阿尔茨海默病小鼠神经元损伤的影响

刘江华^{1,2}, 潘 娴³, 吴永贵^{4,5*}

(1. 湖北中医药大学附属国医医院和第三临床学院, 湖北 武汉 430000; 2. 武汉市中医医院康复医学科, 湖北 武汉 430000; 3. 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北 武汉 430065; 4. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065; 5. 建始县中医医院, 湖北 恩施 445300)

摘要: 目的 研究开心散对阿尔茨海默病 (AD) 模型小鼠认知障碍、神经元丢失、A β 沉积及神经炎症的作用。方法 将C57BL/6小鼠设为空白组, APP/PS1小鼠随机分为模型组和开心散低、高剂量组 (0.7、2.8 g/kg), 灌胃给药30 d后, 采用Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力; 尼氏染色观察海马神经元数量; 免疫组化法检测海马组织A β 和NeuN表达; 免疫荧光染色检测海马组织IBA1和GFAP表达; ELISA法检测海马组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平; Western blot法检测海马组织APP、ADAM10、BACE1、PS1、IDE、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、cleaved GSDMD蛋白表达。结果 与模型组比较, 开心散各剂量组小鼠逃避潜伏期和游泳路程缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限驻留时间增加 ($P < 0.01$); 海马组织病理损伤缓解; 海马CA3区NeuN标记的神经元数量增加 ($P < 0.01$); 海马组织A β 相关斑块数量及面积均减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马组织IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); IBA1和GFAP荧光表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); APP、BACE1、PS1、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、cleaved GSDMD蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ADAM10、IDE蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。结论 开心散可改善AD小鼠认知障碍、神经元丢失、A β 沉积及神经炎症, 其机制可能与调节A β 代谢和NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路有关。

关键词: 开心散; 阿尔茨海默病; APP/PS1小鼠; A β 代谢; NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0431-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.011

Effects of KaiXinSan on neuronal injury in Alzheimer's disease mice based on A β metabolism and NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway

LIU Jiang-hua^{1,2}, PAN Xian³, WU Yong-gui^{4,5*}

(1. Guoyi Hospital & Third Clinical College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China; 2. Rehabilitation Department, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China; 3. School of Acupuncture-Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 4. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 5. Jianshi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Enshi 445300, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect of the KaiXinSan (KXS) on cognitive impairment, neuronal loss, A β deposition, and neuroinflammation in Alzheimer's disease (AD) mice. **METHODS** C57BL/6 mice were set as the blank group. APP/PS1 mice were randomly divided into the model group and low- and high-dose of KXS groups (0.7 and 2.8 g/kg). After intragastric administration for 30 days, Morris water maze test was used to detect learning and memory ability in mice. Nissl staining was used to observe the number of hippocampal neurons. Immunohistochemistry was used to detect A β and NeuN expressions in hippocampal tissue. Immunofluorescence

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 湖北省自然科学基金中医药联合基金项目 (2023AFD176); 湖北省中医药管理局中医药科研项目 (ZY2025Q002); 武汉市科技局知识创新专项基础研究项目 (2023020201010201)

作者简介: 刘江华 (1986—), 男, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治老年病及老年脑病的研究。E-mail: 276899964@qq.com

* 通信作者: 吴永贵 (1986—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药神经药理学的研究。E-mail: wuyonggui6245@163.com

staining was used to detect IBA1 and GFAP expressions in hippocampal tissue. ELISA was used to detect levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampal tissue. Western blot was used to detect protein expressions of APP, ADAM10, BACE1, PS1, IDE, NLRP3, ASC, cleaved Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and cleaved GSDMD in hippocampal tissue. **RESULTS** Compared with the model group, the escape latency and swimming distance in each dose group of KXS were shortened ($P<0.05$, $P<0.01$), and the times of crossing the platform and the residence time in the target quadrant were increased ($P<0.01$). Pathological damage of hippocampus was relieved. The number of NeuN labeled neurons in CA3 area of hippocampus increased ($P<0.01$). The number and area of A β related plaques in hippocampus decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in hippocampus decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The fluorescence expressions of IBA1 and GFAP decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expressions of APP, BACE1, PS1, NLRP3, ASC, cleaved Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and cleaved GSDMD decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein expressions of ADAM10 and IDE increased ($P<0.01$). **CONCLUSION** KXS can improve cognitive impairment, neuron loss, A β deposition and neuroinflammation in AD mice, and its mechanism may be related to regulating A β metabolism and NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway.

KEY WORDS: KaiXinSan; Alzheimer's disease; APP/PS1 mice; A β metabolism; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway

近年,我国阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者超千万且患病率随老龄化加剧^[1],现有药物难逆病理^[2-3],而中医药防治AD历史悠久、疗效确切,研发抗AD中药切实可行。AD发病机制尚不明确,但已有研究证实其存在神经元丢失或死亡、 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)沉积、线粒体损伤、突触功能障碍、神经炎症等病理改变^[4-5],当前研究以改善或延缓这些损伤为目标。A β 沉积与相关分泌酶和降解酶有关,其中 α 相关分泌酶(A disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)和胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)可抑制A β 生成,而 β 相关分泌酶(β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1)和 γ 相关分泌酶(presenilin 1, PS1)可促进A β 生成^[6-8]。A β 具神经毒性,可诱导神经元损伤与神经炎症^[9-10]。研究证实,AD患者脑内存在NOD样受体热蛋白结构域3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(cysteinyI aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)/切割膜穿孔蛋白(gasdermin D, GSDMD)通路过度活化,抑制该通路可缓解认知障碍,故其成为了抗AD重要靶点^[11-13]。

开心散源自孙思邈《备急千金要方·小肠腑方》,具有培元化痰、开窍醒神之效,主治“好忘”。课题组前期研究发现,其能激活Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap-1)/核转录因子E2相关因子2

(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)通路抑制AD模型氧化应激,改善神经元损伤与认知功能^[14]。近年来,有研究证实开心散有抗AD作用,可改善多种AD病理损伤^[15-17]。本研究拟进一步探究开心散对A β 代谢和NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路的作用,以阐明开心散改善AD神经元损伤的分子机制。

1 材料

1.1 实验动物 30只SPF级雄性APP/PS1小鼠,8月龄;10只相同月龄的C57BL/6小鼠,均购自江苏华创信诺医药科技有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(苏)2020-0009],饲养于湖北中医药大学中医药实验中心SPF级动物房,环境温度20~26℃,相对湿度40%~70%,12h/12h黑暗光照循环,自由饮水和摄食。本研究获湖北中医药大学实验动物伦理委员会审查和批准(伦理号HUCMS31264328)。

1.2 药物 开心散由人参(批号2201034)、茯苓(批号2303166)、石菖蒲(批号2304823)、远志(批号2105078)组成,所有中药饮片均由安徽群康药业科技有限公司生产,购自武汉市中医医院中药房。

1.3 试剂 4%多聚甲醛、尼氏染色液、DAB显色试剂盒、BCA试剂盒、SDS-PAGE凝胶试剂盒、ECL显色液、神经元核抗原(NeuN)抗体、离子钙结合衔接分子-1(IBA1)抗体、胶质纤维酸性

蛋白 (GFAP) 抗体、淀粉样前体蛋白 (APP) 抗体、 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 抗体、解整合素金属蛋白酶 10 (ADAM10) 抗体、早老素 1 (PS1) 抗体、胰岛素降解酶 (IDE) 抗体、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 G1101、G1036、G1212、G2026、G2037G2020、GB15138、GB15105、GB12100、GB11307、GB111197、GB11318、GB11779、GB111387、GB11113); IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒、 β -分泌酶 (BACE1) 抗体、NLRP3 抗体、ASC 抗体、cleaved GSDMD 抗体、GSDMD 抗体、Caspase-1 抗体、 β -激动蛋白 (β -actin) 抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 RK00006、RK00008、RK04595、A11533、A5652、A22046、A24059、A18281、A0964、AC026); IL-18 抗体、cleaved Caspase-1 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 67775、89332)

1.4 仪器 Morris 水迷宫实验系统 (型号 XR-XM101, 上海欣软信息科技有限公司); 病理切片机 (型号 WRD-Minux S712, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 光学显微镜、荧光显微镜 (型号 CX41、BX43F, 日本 Olympus 公司); 多功能全自动酶标仪 (型号 Spark, 瑞士 Tecan 公司); 多功能凝胶图像分析系统 (型号 Tanon 1600, 上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 参考前期研究及文献 [14] 报道, 按 3 : 3 : 2 : 2 的比例称取人参、茯苓、石菖蒲、远志, 加 6 倍体积纯水浸泡 30 min, 煮沸后文火煎煮 30 min, 过滤, 再次加入纯水, 煮沸后文火煎煮 30 min, 过滤, 合并 2 次滤液, 浓缩, 制备生药量 0.07、0.28 g/mL 的溶液, 灭菌后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 动物分组及给药 将 APP/PS1 小鼠随机分为模型组和开心散低、高剂量组, 另取相同月龄和品系的 C57BL/6 小鼠作为空白组, 每组 10 只。参考前期研究、文献报道及临床等效剂量确定给药剂量^[15-17], 开心散低、高剂量组灌胃 0.7、2.8 g/kg 开心散水煎液, 空白组和模型组灌胃等体积生理盐水, 各组连续干预 30 d, 每天灌胃给药 1 次。

2.3 Morris 水迷宫实验 先对小鼠进行连续 5 d 定位航行训练, 记录 60 s 内小鼠找到平台的时间, 即为逃避潜伏期; 若 60 s 未找到平台, 则引导小鼠至平台, 停留 15 s 以强化空间记忆, 每天 4 次,

间隔 30 min。第 6 天进行正式实验, 上午、下午各测试 1 次, 记录逃避潜伏期, 同步记录游泳路程。第 7 天进行空间探索实验, 撤去平台, 从与训练时相对的象限放入小鼠, 记录 60 s 内平台穿越次数及目标象限驻留时间。采用 EthoVision XT 系统采集数据。

2.4 样本采集 Morris 水迷宫实验完成后, 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.1 mL/10 g) 进行麻醉, 每组随机取 3 只小鼠海马组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋, 制成 5 μ m 切片; 剩余海马组织于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于 ELISA 及 Western blot 检测。

2.5 尼氏染色 取石蜡包埋的脑组织, 切片, 使用脱蜡液和乙醇对切片进行脱蜡处理; 尼氏染色液染色 15 min, 使用乙醇和二甲苯对切片进行脱水和透明处理; 封片, 于光学显微镜下观察, 拍照, 分析海马区神经元数量。

2.6 免疫组化染色 取脑组织石蜡切片, 依次进行脱蜡、抗原修复; 使用 3% H_2O_2 孵育 25 min, 以阻断内源性过氧化物酶; 使用 3% 胎牛血清封闭 30 min; 洗涤后滴加一抗 $A\beta$ (1 : 400) 和 NeuN (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗涤后滴加二抗 (1 : 200) 室温孵育 1 h; 洗涤后滴加 DAB 显色液显色; 终止显色后洗涤, 苏木素复染细胞核, 封片, 于光学显微镜下观察, 拍照, 分析海马区 $A\beta$ 相关的斑块数量和面积, 以及 NeuN 标记的阳性细胞数。

2.7 免疫荧光染色 取脑组织石蜡切片, 依次进行脱蜡、抗原修复和血清封闭处理; PBS 洗涤, 滴加一抗 IBA1 (1 : 400) 和 GFAP (1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗涤后滴加荧光二抗 (1 : 200), 室温孵育 1 h; 洗涤后使用 DAPI 染液复染细胞核, 封片, 于荧光显微镜下观察, 拍照, 分析海马区 IBA1 和 GFAP 表达。

2.8 ELISA 法检测海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 取冻存的海马组织, 加入 9 倍量 PBS, 使用组织研磨仪研磨, 匀浆液离心, 收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.9 Western blot 法检测海马组织各蛋白表达 取冻存的海马组织, 加入 10 倍量 RIPA 裂解液, 匀浆, 离心, 收集上清液; BCA 法测定蛋白浓度, 加入还原型蛋白上样缓冲液, 于沸水中加热变性, 自然冷却后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。按照 SDS-PAGE 试剂盒说明书制胶, 依次上样、电泳、转膜; 将

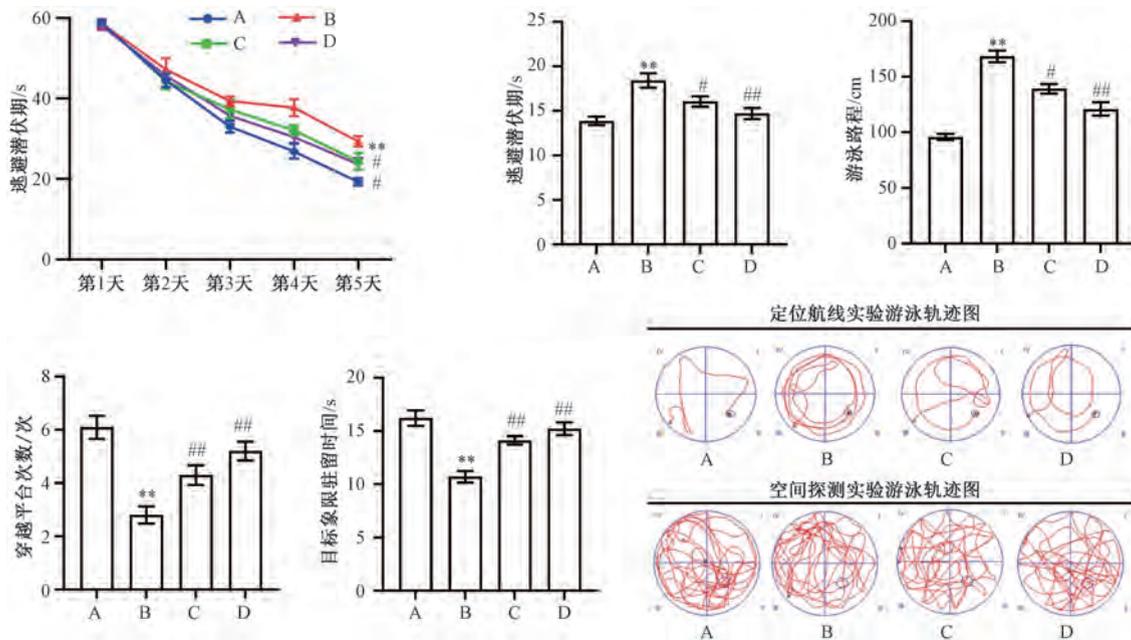
PVDF膜置于5%脱脂牛奶中封闭30 min,滴加一抗APP(1:1 000)、ADAM10(1:1 000)、BACE1(1:1 000)、PS1(1:1 000)、IDE(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、ASC(1:1 000)、cleaved Caspase-1(1:500)、IL-1 β (1:1 000)、IL-18(1:1 000)、cleaved GSDMD(1:500)、 β -actin(1:1 000),4℃孵育过夜;次日TBST洗膜,滴加二抗(1:10 000),室温孵育30 min;洗膜后滴加ECL显色液,凝胶成像仪曝光,拍照,通过Image J软件分析条带灰度值,以 β -actin为内参,计算目的蛋白与内参的比值。

2.10 统计学分析 通过GraphPad Prism 9.0软件进行处理,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布的数据组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时进一步两两比较采用LSD检验,方差不齐时则采用Tamhane's T2检验;实验数据

不符合正态分布,组间比较则采用Kruskal-Wallis H检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 开心散对AD小鼠学习记忆能力的影响 如图1所示,各组小鼠训练期前4 d逃避潜伏期变化不明显,且差异没有统计学意义($P>0.05$)。第5、6天,与空白组比较,模型组小鼠逃避潜伏期延长($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠逃避潜伏期缩短($P<0.05$, $P<0.01$)。如图1所示,模型组小鼠在定位航线实验中游泳路程较空白组增加,而开心散各剂量组小鼠则缩短了APP/PS1小鼠的游泳路程。与空白组比较,模型组小鼠穿越平台次数和目标象限驻留时间减少($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠穿越平台次数和目标象限驻留时间增加($P<0.01$)。



注: A 为对照组, B 为模型组, C~D 分别为开心散低、高剂量组。与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

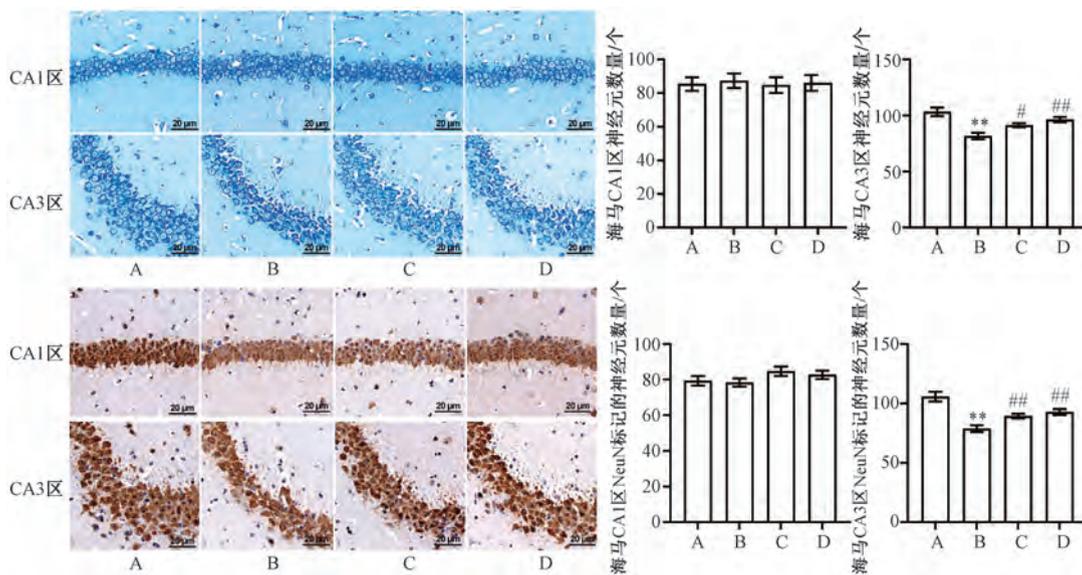
图1 开心散对AD小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effects of Kaixinsan on learning and memory ability of AD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.2 开心散对AD小鼠海马组织病理学的影响 如图2所示,模型组小鼠海马CA3区神经元存在深染和核固缩的现象,而开心散各剂量组上述病理损伤均得到改善。如图2所示,与空白组比较,模型组小鼠海马CA3区神经元数量减少($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马CA3区神经元数量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠海马CA3区NeuN标记的阳性细胞数减少($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂

量组小鼠海马CA3区NeuN标记的阳性细胞数增加($P<0.01$)。各组小鼠海马CA1区神经元数量和NeuN标记的阳性细胞数无显著差异($P>0.05$)。

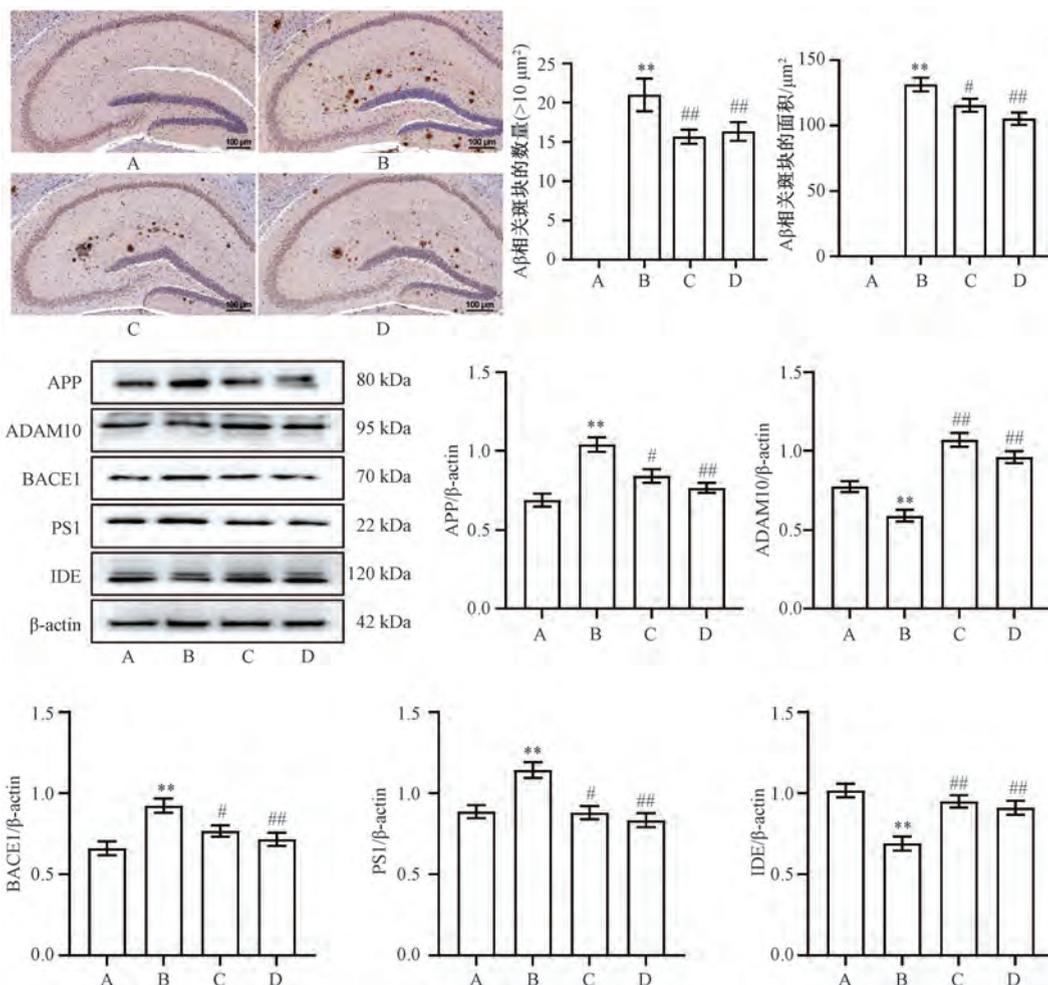
3.3 开心散对AD小鼠海马A β 沉积的影响 如图3所示,与空白组比较,模型组小鼠海马区A β 相关斑块的数量和面积均增加($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马区A β 相关斑块的数量和面积均减少($P<0.05$, $P<0.01$)。A β 沉积主要与A β 相关分泌酶和降解酶有关,如图3所



注：A 为对照组，B 为模型组，C~D 分别为开心散低、高剂量组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 2 开心散对 AD 小鼠海马组织病理学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of Kaixinsan on histopathology of hippocampus in AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注：A 为对照组，B 为模型组，C~D 分别为开心散低、高剂量组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

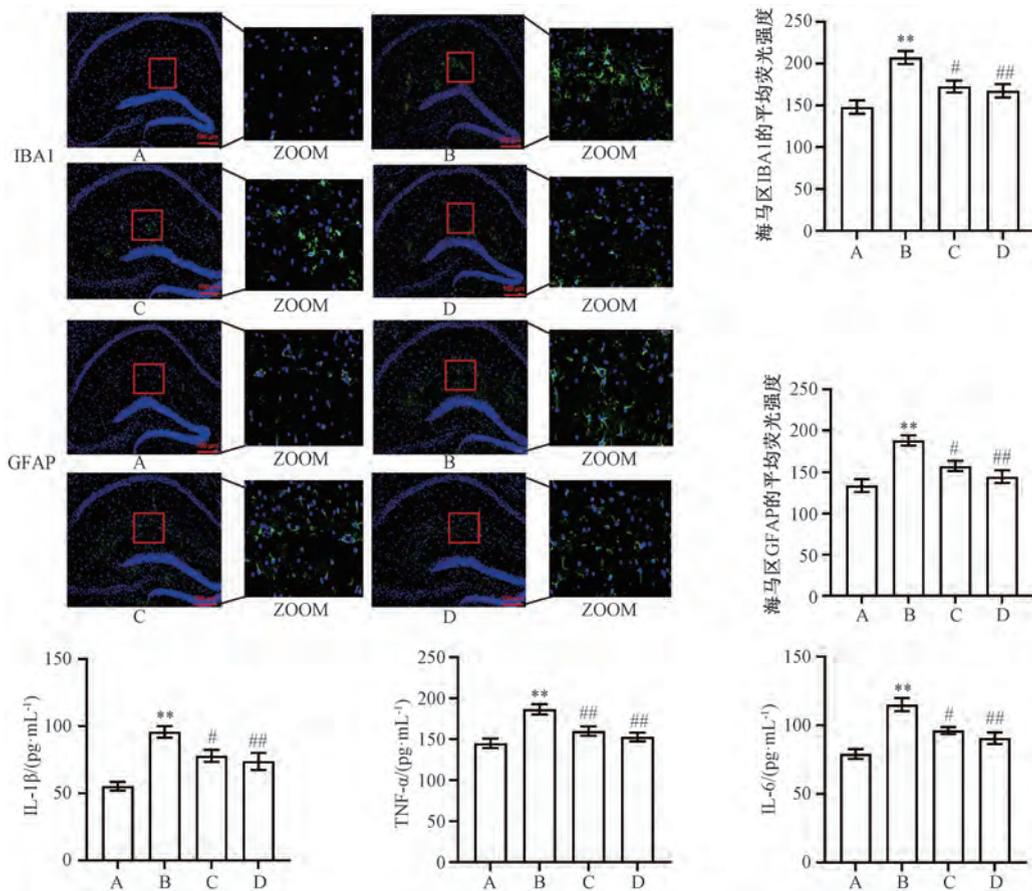
图 3 开心散对 AD 小鼠海马 Aβ 沉积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of Kaixinsan on Aβ deposition in hippocampus of AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

示,与空白组比较,模型组小鼠海马组织 APP、BACE1、PS1 蛋白表达升高 ($P<0.01$), ADAM10、IDE 蛋白表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马组织 APP、BACE1、PS1 蛋白表达水降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), ADAM10、IDE 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

3.4 开心散对 AD 小鼠海马组织 IBA1、GFAP 表达及促炎性因子水平的影响 神经炎症是导致神经元丢失或死亡的重要因素,而 AD 神经炎症的发生主要与小胶质细胞和星形胶质细胞的异常活化有关^[18-19]。本研究利用免疫荧光对小胶质细胞和星

形胶质细胞的标志蛋白 IBA1 和 GFAP 进行标记。如图 4 所示,与空白组比较,模型组小鼠海马组织 IBA1 和 GFAP 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马组织 IBA1 和 GFAP 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。小胶质细胞和星形胶质细胞活化可促进促炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放。如图 4 所示,与空白组比较,模型组小鼠海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注: A 为对照组, B 为模型组, C~D 分别为开心散低、高剂量组。与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 4 开心散对 AD 小鼠海马组织 IBA1、GFAP 表达及促炎性因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

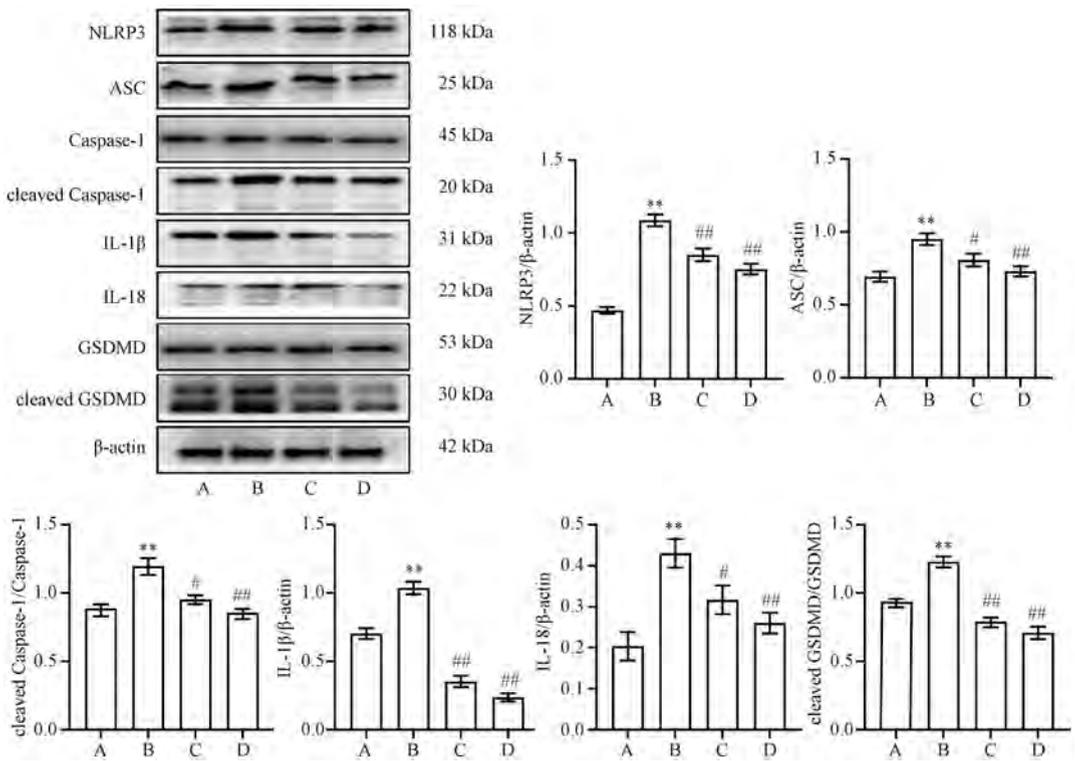
Fig. 4 Effect of Kaixinsan on the expressions of IBA1 and GFAP and the levels of proinflammatory factors in hippocampus of AD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 开心散对 AD 小鼠海马组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响 如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马组织 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1/Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、cleaved GSDMD/GSDMD 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组小鼠海马组织 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1/Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、cleaved GSDMD/

GSDMD 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

4 讨论

开心散由人参、石菖蒲、茯苓、远志组成,原用于治疗“好忘”,现被广泛用于治疗 AD、抑郁症等神经退行性疾病^[20]。有研究发现,开心散可改善多种 AD 模型的认知功能、神经元损伤、突触功能障碍等病理改变^[15-17,21]。本研究采用 AD 研究



注：A 为对照组，B 为模型组，C~D 分别为开心散低、高剂量组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 5 开心散对 AD 小鼠海马组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of Kaixinsan on NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway in hippocampus of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

领域较为公认的 APP/PS1 痴呆小鼠，并予以不同剂量开心散干预，发现各剂量开心散均可缩短小鼠逃避潜伏期，增加穿越平台次数和目标象限停留时间，表明开心散可改善 AD 小鼠的认知功能^[14]，该结果与课题组前期研究结果一致。

神经元为学习记忆的生物学基础，神经元丢失为 AD 的病理特征之一。本研究利用尼氏染色和 NeuN 免疫组化评估开心散对 AD 小鼠神经元的保护作用，结果发现，开心散可减少 APP/PS1 小鼠海马区神经元核固缩、深染，并能增加海马神经元数量和 NeuN 标记的阳性细胞数，表明开心散可改善 AD 小鼠海马神经元病理损伤和神经元丢失。

Aβ 沉积为 AD 的重要病理特征，可诱导神经元损伤。Aβ 为 APP 水解的产物，受 Aβ 相关分泌酶 (ADAM10、BACE1、PS1) 和降解酶 (IDE) 的调控^[7-8]。本研究结果显示，开心散可减少 APP/PS1 小鼠海马 Aβ 沉积，还可降低 APP、BACE1、PS1 蛋白表达，升高 ADAM10、IDE 蛋白表达，表明开心散可通过调节 Aβ 代谢减少 AD 小鼠海马 Aβ 沉积。

神经炎症是导致 AD 神经元损伤的重要因素，其发生与 Aβ 沉积诱导小胶质细胞和星形胶质细胞

过度激活关系密切^[22-23]。IBA1 和 GFAP 分别是小胶质细胞和星形胶质细胞的标志蛋白，本研究结果显示，开心散可降低 APP/PS1 小鼠海马区 IBA1 和 GFAP 表达，还可降低海马组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，表明开心散可通过抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的活化，减轻 AD 小鼠海马炎症反应。

NLRP3 炎性小体是天然免疫系统的重要组成部分，其异常活化可介导慢性炎性和细胞焦亡。NLRP3 炎性小体由 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 组成。NLRP3 炎性小体可招募 pro Caspase-1，调控 Caspase-1 的活性并形成活化的 Caspase-1 (cleaved Caspase-1)^[24]。Caspase-1 的活化可将 pro IL-1β、pro IL-18 切割成成熟的 IL-1β、IL-18^[25]。活化的 Caspase-1 还可识别并切割 GSDMD，活化的 GSDMD (cleaved GSDMD) 会迁移至细胞膜上打孔，细胞内的炎症因子可由此释放到细胞膜外，从而介导炎症反应^[26]。本研究结果显示，开心散可降低 APP/PS1 小鼠海马中 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1/Caspase-1、IL-1β、IL-18、cleaved GSDMD/GSDMD 蛋白表达，表明开心散可能是通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路活化，进而改善 AD 小鼠神经炎症。

综上所述,开心散可改善AD小鼠认知障碍、神经元丢失、 $A\beta$ 沉积和神经炎症,其机制可能与调节 $A\beta$ 代谢和抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路活化有关。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献:

[1] Jia L, Du Y, Chu L, *et al.* Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671.

[2] Zheng Q, Wang X. Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy[J]. *Protein Cell*, 2025, 16(2): 83-120.

[3] Twarowski B, Herbet M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease-pathomechanism, diagnosis and treatment: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6518.

[4] Zhang J, Zhang Y, Wang J, *et al.* Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 211.

[5] Rajendran K, Krishnan U M. Mechanistic insights and emerging therapeutic stratagems for Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 97: 102309.

[6] Aisen P, Bateman R J, Crowther D, *et al.* The case for regulatory approval of amyloid-lowering immunotherapies in Alzheimer's disease based on clearcut biomarker evidence[J]. *Alzheimers Dement*, 2025, 21(1): e14342.

[7] Zhang H, Wei W, Zhao M, *et al.* Interaction between $A\beta$ and Tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2181-2192.

[8] Jin Y, Du Q, Song M, *et al.* Amyloid- β -targeting immunotherapies for Alzheimer's disease[J]. *J Control Release*, 2024, 375: 346-365.

[9] Niu Q, Li D, Zhang J, *et al.* The new perspective of Alzheimer's disease research: mechanism and therapeutic strategy of neuronal senescence[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 102: 102593.

[10] Pradeepkiran J A, Baig J, Islam M A, *et al.* Amyloid- β and phosphorylated Tau are the key biomarkers and predictors of Alzheimer's disease[J]. *Ageing Dis*, 2024, 16(2): 658-682.

[11] Zhu M J, Zhang L, Wang C P. Copper overload promotes β -amyloid induced NLRP3/Caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis in Alzheimer's disease[J]. *J Integr Neurosci*, 2024, 23(10): 194.

[12] Cheon J, Kwon S, Kim M. Exerkines mitigating Alzheimer's disease progression by regulating inflammation: focusing on macrophage/microglial NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Alzheimers Dement*, 2025, 21(2): e14432.

[13] Xu W, Huang Y, Zhou R. NLRP3 inflammasome in neuroinflammation and central nervous system diseases[J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22(4): 341-355.

[14] 刘江华, 杨 晶, 张京兰, 等. 开心散对 $A\beta_{1-42}$ 诱导Alzheimer病大鼠模型Keap-1/Nrf2/MnSOD信号通路的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 25-32.

[15] Ren J, Xiang B, Song L, *et al.* Kaixinsan regulates neuronal mitochondrial homeostasis to improve the cognitive function of Alzheimer's disease by activating CaMKK β -AMPK-PGC-1 α signaling axis[J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156170.

[16] Shan X, Tao W, Li J, *et al.* Kai-Xin-San ameliorates Alzheimer's disease-related neuropathology and cognitive impairment in APP/PS1 mice *via* the mitochondrial autophagy-NLRP3 inflammasome pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329: 118145.

[17] Shan X, Lv S, Huang P, *et al.* Classic famous prescription Kai-Xin-San ameliorates Alzheimer's disease *via* the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(4): 2297-2312.

[18] Wang C, Zong S, Cui X, *et al.* The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1117172.

[19] Qiu Z, Zhang H, Xia M, *et al.* Programmed death of microglia in Alzheimer's disease: autophagy, ferroptosis, and pyroptosis[J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2023, 10(1): 95-103.

[20] 薛冬磊, 金 珏, 邹纯朴, 等. 经典名方开心散关键信息考证与古今应用研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2025, 39(2): 75-81.

[21] Fu H, Xu Z, Zhang XL, *et al.* Kaixinsan, a well-known Chinese herbal prescription, for Alzheimer's disease and depression: a preclinical systematic review[J]. *Front Neurosci*, 2020, 13: 1421.

[22] Rostami J, Mothes T, Kolahdouzan M, *et al.* Crosstalk between astrocytes and microglia results in increased degradation of α -synuclein and amyloid- β aggregates[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 124.

[23] Deng Q, Wu C, Parker E, *et al.* Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: significance and summary of recent advances[J]. *Ageing Dis*, 2024, 15(4): 1537-1564.

[24] Terzioglu G, Young-Pearse T L. Microglial function, INPP5D/SHIP1 signaling, and NLRP3 inflammasome activation: implications for Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18(1): 89.

[25] 夏春鹏, 齐 越, 董笑博, 等. 癫痫清颗粒通过调控NLRP3/Caspase-1通路对阿尔茨海默病小鼠Tau蛋白的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(12): 3968-3976.

[26] McManus R M, Komes M P, Griep A, *et al.* NLRP3-mediated glutaminolysis controls microglial phagocytosis to promote Alzheimer's disease progression[J]. *Immunity*, 2025, 58(2): 326-343.