

基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路探讨温肾方对甲状腺功能减退小鼠神经细胞焦亡的影响

曾明星^{1,2}, 陈继东^{3,4*}, 向楠³, 邹小娟¹, 吴永贵¹, 卞庆来¹, 吴祖苦³, 张海洋³
(1. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065; 3. 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北 武汉 430061; 4. 湖北中医药大学附属医院, 湖北省中医院, 湖北 武汉 430063)

摘要: **目的** 探讨温肾方对甲状腺功能减退 (简称甲减) 小鼠认知障碍及神经细胞焦亡的影响。**方法** 60 只 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为正常组, 模型组, 优甲乐组 (15 $\mu\text{g/kg}$), 温肾方低、高剂量组 (12.87、25.74 g/kg), 联合用药组 (15 $\mu\text{g/kg}$ +12.87 g/kg), 每组 10 只。模型小鼠自由饮用丙硫氧嘧啶 (PTU) 溶液建立甲减模型, 给药 12 周后, ELISA 法检测血清 TT_3 、 TT_4 、TSH 水平; 生化法检测皮质和海马 TC、GSH 水平; 流式细胞仪检测皮质和海马 ROS 水平; RT-qPCR 法检测皮质和海马 *UCP4* mRNA 表达; Western blot 法检测皮质和海马 UCP4、ApoE4、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方高剂量组和联合用药组小鼠血清 TSH 水平, 皮质和海马 TC、ROS 水平, 皮质和海马 ApoE4、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 血清 TT_3 、 TT_4 水平, 皮质和海马 GSH 水平, 皮质和海马 *UCP4* mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 联合用药效果优于优甲乐单独用药 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 温肾方可改善甲减小鼠甲状腺功能和认知障碍, 其可能通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路, 抑制神经细胞焦亡发挥作用。

关键词: 温肾方; 甲状腺功能减退; 认知障碍; 甲状腺功能; 焦亡; NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)08-2742-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.042

甲状腺功能减退症 (简称甲减) 是成人认知功能减退的重要原因之一^[1], 患病率高达 27.3%^[2], 严重威胁着人们的生命健康。中医认为, 甲减认知障碍的病机为肾阳亏虚、痰瘀互结、蒙蔽清窍, 临床运用温肾方治疗, 疗效显著。前期研究发现, 温肾方能调控外泌体介导的胆固醇稳态而发挥治疗甲减认知障碍的作用^[3]。在神经细胞中, 升高的载脂蛋白 E4 (apolipoprotein E4, ApoE4) 可增加细胞内胆固醇水平, 抑制谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的运输, 升高活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 引起氧化应激, 触发 NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptors3, NLRP3) 炎症小体, 激活凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase-1), 消皮素 D (gasdermin-D, GSDMD) 被募集到 NLRP3 炎症小体, 引起焦亡, 引发认知运动障碍和抑郁或焦虑样行为^[4]。因此, 调控 NLRP3/Caspase-1/

GSDMD 信号通路可以减轻神经细胞焦亡, 是治疗甲减认知障碍的可能有效靶点。因此, 本研究通过建立甲减认知障碍模型, 探讨温肾方是否通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导神经细胞焦亡保护神经细胞而发挥改善甲减认知障碍的作用, 以期为临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 60 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 10~11 周龄, 体质量 25~30 g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005], 饲养于湖北中医药大学实验动物中心标准实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (鄂) 2023-0067], 饲养温度 (22±0.5)℃, 相对湿度 50%~70%, 12 h/12 h 光/暗循环, 自由取食, 适应性饲养 1 周后进行实验。本实验经湖北中医药大学实验动物伦理委员会审批 (伦理批准号 HUCMS87784651)。

1.2 药物 温肾方由肉苁蓉、补骨脂、益智仁、女贞子、

收稿日期: 2024-07-30

基金项目: 湖北省自然科学基金中医药创新发展联合基金项目 (2023AFD147); 湖北省卫计委湖北中医名师工作室建设项目 (鄂卫生计生通报 (2018) 15 号); 全国中医学术流派传承工作室第二轮建设项目 (国中医药人教函 [2019] 62 号)

作者简介: 曾明星 (1984—), 男, 博士, 讲师, 从事病证结合基础及效应机制、中医药防治内分泌代谢性疾病的研究。E-mail: zengmingxing001@126.com

* 通信作者: 陈继东 (1969—), 男, 博士, 教授, 从事中医药治疗内分泌代谢性疾病的研究。Tel: (027) 88929306, E-mail: dondong@139.com

桑椹、丹参、石菖蒲、法半夏、王不留行等组成，中药饮片购自湖北省中医院。药材充分混合后加入 10 倍量水浸泡 30 min，武火加热煮沸后文火煎煮 30 min，滤出药液；第 2 次加 5 倍量水煎 30 min，滤出药液，将 2 次药液混合，浓缩至生药量 1.29 g/mL，于 4 ℃ 冰箱中保存，临用时以蒸馏水配制成所需浓度，每周制备 1 次。丙硫氧嘧啶片（propylthiouracil，PTU，上海朝晖药业有限公司，批号 2302N01，规格 50 mg/片），按照 1 mg/mL 溶解于饮用水中，供小鼠自由饮用。左甲状腺素钠片（levothyroxine sodium，L-T₄，德国默克公司，批号 G01S0G，规格 50 μg/片），用蒸馏水配成 1.5 μg/mL 溶液，现配现用。

1.3 试剂 还原型谷胱甘肽（GSH）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A006-2-1）；总胆固醇（total cholesterol，TC）比色法测试盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，货号 E-BC-K109-M）；二氢乙锭（dihydroethidium，DHE）（上海碧云天生物技术股份有限公司，货号 S0063）；兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（杭州贤至生物科技有限公司，货号 AB-P-R 001）；兔多抗 NLRP3、兔多抗 GSDMD（美国 Affinity Bioscience 公司，货号 DF7438、AF4012）；兔多抗 Caspase1、兔多抗 ASC、兔多抗解偶联蛋白 4（uncoupling protein 4，UCP4）（武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号 A0964、A1170、A13834）；兔多抗 ApoE4（北京博奥森生物技术有限公司，货号 Bs-5038R）。

1.4 仪器 H1-16KR 型台式高速冷冻离心机（湖南可成仪器设备有限公司）；Multiskan FC 型酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；SPX70B Ⅲ型生化培养箱〔菲斯福仪器（河北）有限公司〕；SH-523 型化学发光成像系统（杭州申花科技有限公司）；LF-600S 型电泳仪（北京龙方科技有限公司）；L00686C 型 eBlot™ L1 快速湿转仪（金斯瑞生物科技股份有限公司）；PR-96 型 PCR 仪（杭州米欧仪器有限公司）；Quant Studio 6 型 Real-Time PCR System（美国 ABI 公司）；cytoFLEX 型流式细胞仪（美国 Beckman Coulter 公司）。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将小鼠分为对照组（10 只）和造模组（50 只），造模组小鼠自由饮用含 1 mg/mL PTU 的饮用水，连续 4 周。造模 4 周后，随机选取造模组小鼠 3 只，检测血清总甲状腺素（total thyroxine，TT4）、促甲状腺激素（thyroid stimulating hormone，TSH）水平，以 TSH 水平升高、TT4 水平降低，以及体质量减轻、食水量减少、皮温降低、畏寒蜷缩、精神萎靡、活动减少等表现，表示甲减模型制备成功；对照组则饮用纯水。造模成功后，将甲减小鼠随机分为模型组，优甲乐组（15 μg/kg），温肾方低、高剂量组（12.87、25.74 g/kg），联合用药组（15 μg/kg+12.87 g/kg），每组 10 只，连续给药 12 周。实验过程中，所有小鼠自由进食，每周更换 1 次垫料、饮用水，

称量体质量，实验期间，模型小鼠继续给予含 1 mg/mL PTU 的饮用水，自由饮用。

2.2 样本采集 小鼠禁食不禁水 12 h，麻醉后眼球取血，快速分离海马和皮质组织，装于冻存管放入液氮中保存待用。

2.3 ELISA 法检测血清 TT₃、TT₄、TSH 水平 小鼠眼球取血，室温静置 30 min 后，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，取上层血清备用。取小鼠血清，按照试剂盒说明书检测血清总 3，5，3-三碘甲状腺原氨酸（total 3，5，3-triiodothyronine，TT₃）、TT₄、TSH 水平。

2.4 生化法检测皮质和海马 GSH 及 TC 水平 取小鼠皮质和海马组织，加入裂解液，于低温组织研磨仪中匀浆。将所得匀浆液 3 500 r/min 离心 10 min，分离上清液，按照试剂盒说明书检测皮质和海马组织中 GSH 及 TC 水平。

2.5 流式细胞仪检测皮质和海马 ROS 水平 将皮质和海马剪成小碎块，过筛网，1 500 r/min 离心 5 min，PBS 润洗 2 次，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL DHE（1：1 000 稀释）37 ℃ 孵育 20 min，使用无血清培养基洗涤细胞 3 次，500 μL PBS 重悬，流式细胞仪上机检测。

2.6 Western blot 法检测皮质和海马 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路相关蛋白表达 取适量皮质和海马，加入裂解液裂解 30 min 后，4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min，取上清液，即为总蛋白，使用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定，加热使蛋白变性，于-20 ℃ 保存待用。取各组样本上样，每孔蛋白量约 20~30 μg，电泳分离蛋白，转移至 PVDF 膜，加含 5% 脱脂奶粉的 TBST（封闭液）室温摇床封闭 2 h，滴加兔多抗 NLRP3（1：1 000）、Caspase1（1：3 000）、GSDMD（1：1 000）、ASC（1：1 000）、UCP4（1：1 000）、APOE4（1：1 000）、GAPDH（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜，TBST 清洗 5 次，加 HRP 标记二抗（1：10 000）室温摇床孵育 2 h。用 ECL 化学发光法曝光，并对图像进行分析。

2.7 RT-qPCR 法检测皮质和海马 UCP4 mRNA 表达 称取 100 mg 冻存的海马和皮质，TRIzol 法分离出总 RNA，超微量紫外可见光分光光度计测定 RNA 浓度。根据逆转录说明书操作，将 RNA 逆转录成 cDNA，最后再按照 qPCR 试剂盒说明书操作，并在 qPCR 仪上检测皮质和海马 UCP4 mRNA 的表达。具体扩增条件为 95 ℃ 预变性 10 min；95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火/延伸 60 s，共 40 个循环；熔解曲线设置为 60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s。引物购自北京擎科生物科技股份有限公司，序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	正向 5'-GAGAGTGTTCCTCGTCCCGTA-3	290
	反向 5'-CCTCACCCCATTTGATGTTAGT-3	
UCP4	正向 5'-CCTGCTATTGAACACACCCGC-3	260
	反向 5'-ACCAAGGGGTCATTCTCAGC-3	

2.8 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理，计量资

2743

料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 符合正态分布和方差齐性时采取最小显著性差异法 (LSD) - t 检验, 方差不齐时采取 Tamhane's T2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温肾方对甲减小鼠甲状腺功能水平的影响 与正常组

表 2 各组小鼠甲状腺功能水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	TT ₃ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TT ₄ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TSH/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
正常组	85.13 $\pm$ 5.16	2 758.08 $\pm$ 205.42	732.38 $\pm$ 70.29
模型组	42.53 $\pm$ 3.13**	1 374.38 $\pm$ 100.98**	2 066.82 $\pm$ 108.35**
优甲乐组	61.02 $\pm$ 3.82##	2 172.70 $\pm$ 138.41##	1 191.54 $\pm$ 86.21##
温肾方低剂量组	51.00 $\pm$ 3.19 ^{#$\Delta\Delta$}	1 635.88 $\pm$ 94.96 ^{#$\Delta\Delta$}	1 609.00 $\pm$ 127.57 ^{##$\Delta\Delta$}
温肾方高剂量组	64.22 $\pm$ 3.21##	2 055.25 $\pm$ 141.79##	1 306.59 $\pm$ 110.36##
联合用药组	74.37 $\pm$ 3.32 ^{##$\Delta\Delta$}	2 426.50 $\pm$ 142.25 ^{##$\Delta\Delta$}	926.77 $\pm$ 76.80 ^{##$\Delta\Delta$}

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与优甲乐组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.2 温肾方对甲减小鼠皮质和海马 TC、GSH 水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠皮质和海马 TC 水平升高 ($P<0.01$), GSH 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方各剂量组和联合用药组小鼠皮质和海马区

比较, 模型组小鼠血清 TT₄、TT₃ 水平降低 ($P<0.01$), TSH 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方各剂量组和联合用药组小鼠血清 TT₃、TT₄ 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), TSH 水平降低 ($P<0.01$); 温肾方高剂量组作用与优甲乐组相当 ($P>0.05$), 联合用药组作用则优于优甲乐组 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 2。

TC 水平降低 ($P<0.01$), GSH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 温肾方高剂量组作用与优甲乐组相当 ($P>0.05$), 联合用药组作用效果优于优甲乐组 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 3。

表 3 各组小鼠皮质和海马区 TC、GSH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	皮质		海马	
	TC/($\text{mmol}\cdot\text{g prot}^{-1}$)	GSH/($\mu\text{mol}\cdot\text{g prot}^{-1}$)	TC/($\text{mmol}\cdot\text{g prot}^{-1}$)	GSH/($\mu\text{mol}\cdot\text{g prot}^{-1}$)
正常组	0.27 $\pm$ 0.04	10.03 $\pm$ 0.47	0.18 $\pm$ 0.03	9.18 $\pm$ 0.38
模型组	1.06 $\pm$ 0.07**	5.01 $\pm$ 0.44**	0.82 $\pm$ 0.04**	3.95 $\pm$ 0.33**
优甲乐组	0.53 $\pm$ 0.03##	8.03 $\pm$ 0.46##	0.46 $\pm$ 0.03##	7.30 $\pm$ 0.39##
温肾方低剂量组	0.76 $\pm$ 0.05 ^{##$\Delta\Delta$}	6.03 $\pm$ 0.44 ^{##$\Delta\Delta$}	0.70 $\pm$ 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}	5.87 $\pm$ 0.33 ^{##$\Delta\Delta$}
温肾方高剂量组	0.58 $\pm$ 0.03##	7.51 $\pm$ 0.47##	0.56 $\pm$ 0.03 ^{##$\Delta\Delta$}	6.77 $\pm$ 0.37##
联合用药组	0.40 $\pm$ 0.04 ^{##$\Delta\Delta$}	8.83 $\pm$ 0.37 ^{##$\Delta\Delta$}	0.36 $\pm$ 0.02 ^{##$\Delta\Delta$}	9.02 $\pm$ 0.35 ^{##$\Delta\Delta$}

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与优甲乐组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.3 温肾方对甲减小鼠皮质和海马 ROS 水平的影响 与正常组比较, 甲减模型组小鼠皮质和海马 ROS 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方高剂量组和联合用药组小鼠皮质和海马 ROS 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 温肾方低剂量组小鼠皮质 ROS 水平降低 ($P<0.01$); 联合用药组作用优于优甲乐组 ($P<0.01$), 见表 4。

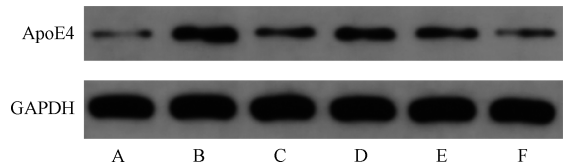
表 4 各组小鼠皮质和海马区 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	皮质 ROS 水平	海马 ROS 水平
正常组	21 308.57 $\pm$ 1 349.16	18 213.77 $\pm$ 911.60
模型组	70 048.23 $\pm$ 675.30**	57 192.80 $\pm$ 506.50**
优甲乐组	38 856.23 $\pm$ 1 451.41##	34 555.27 $\pm$ 765.20##
温肾方低剂量组	54 744.73 $\pm$ 1 085.67 ^{##$\Delta\Delta$}	49 050.80 $\pm$ 2 519.07
温肾方高剂量组	43 403.30 $\pm$ 1 050.05 ^{##$\Delta\Delta$}	40 186.96 $\pm$ 1 418.16 [#]
联合用药组	31 082.63 $\pm$ 812.72 ^{##$\Delta\Delta$}	25 668.50 $\pm$ 1 118.61 ^{##$\Delta\Delta$}

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与优甲乐组比较, Δ $P<0.01$ 。

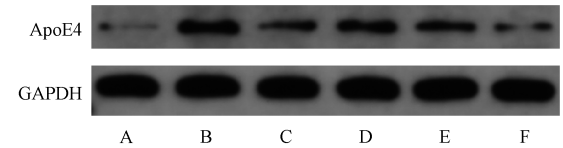
3.4 温肾方对甲减小鼠皮质和海马 ApoE4 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠皮质和海马 ApoE4 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方高剂量组和联合用药组小鼠皮质和海马 ApoE4 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 温肾方低剂量组小鼠海马 ApoE4 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 温肾方高剂量组作用与优甲乐组相当

($P>0.05$), 联合用药组作用效果优于优甲乐组 ($P<0.05$), 见图 1~2、表 5。



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为模型组, D 为温肾方低剂量组, E 为温肾方高剂量组, F 为联合用药组。

图 1 各组小鼠皮质 ApoE4 蛋白条带图



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为模型组, D 为温肾方低剂量组, E 为温肾方高剂量组, F 为联合用药组。

图 2 各组小鼠海马 ApoE4 蛋白条带图

3.5 温肾方对甲减小鼠皮质和海马 UCP4 mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠皮质和海马 UCP4 mRNA 和蛋白表达均降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 优

甲乐组、温肾方高剂量组和联合用药组小鼠皮质和海马 UCP4 mRNA 和蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 温肾方高剂量组作用与优甲乐组相当 ($P>0.05$), 见图 3~4、表 6。

表 5 各组小鼠皮质和海马 ApoE4 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	皮质 ApoE4 蛋白	海马 ApoE4 蛋白
正常组	0.07±0.02	0.06±0.02
模型组	0.59±0.08**	0.55±0.03**
优甲乐组	0.26±0.08##	0.22±0.07##
温肾方低剂量组	0.46±0.11 ^Δ	0.42±0.06 ^{##ΔΔ}
温肾方高剂量组	0.32±0.12 ^{##}	0.29±0.05 ^{##}
联合用药组	0.15±0.12 ^{##}	0.09±0.05 ^{##Δ}

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$; 与优甲乐组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠皮质和海马 UCP4 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	皮质		海马	
	UCP4 mRNA	UCP4 蛋白	UCP4 mRNA	UCP4 蛋白
正常组	1.07±0.10	0.63±0.03	1.15±0.13	0.40±0.03
模型组	0.47±0.09**	0.15±0.05**	0.58±0.08**	0.04±0.01**
优甲乐组	0.87±0.04 ^{##}	0.43±0.06 ^{##}	0.89±0.10 ^{##}	0.23±0.04 ^{##}
温肾方低剂量组	0.61±0.07 ^{##ΔΔ}	0.20±0.07 ^{ΔΔ}	0.69±0.10 ^Δ	0.08±0.01 ^{ΔΔ}
温肾方高剂量组	0.75±0.08 ^{##}	0.35±0.07 ^{##}	0.87±0.03 ^{##}	0.16±0.03 ^{##ΔΔ}
联合用药组	0.90±0.06 ^{##}	0.52±0.07 ^{##}	0.96±0.12 ^{##}	0.37±0.01 ^{##ΔΔ}

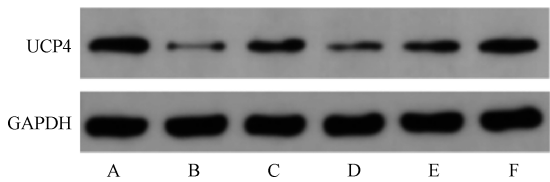
注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与优甲乐组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

3.6 温肾方对甲减小鼠皮质和海马 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路相关蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠皮质和海马 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 优甲乐组、温肾方高剂量组和联合用药组小鼠皮质 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达, 海马 NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 温肾方高剂量组作用与优甲乐组相当 ($P>0.05$), 见图 5~6、表 7~8。

4 讨论

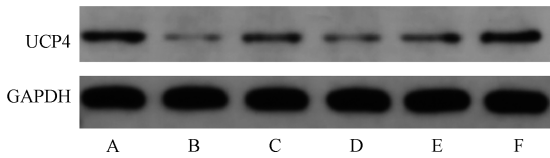
ApoE4 与认知障碍关系密切, 携带 ApoE4 的大鼠脑内可观察到 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积、胆固醇异常、线粒体功能障碍。靶向 ApoE4 与 AD 的相互作用是治疗 AD 的有效策略^[5]。课题组前期研究发现, 甲减小鼠皮质和海马中 ApoE4 表达升高, 学习、记忆障碍和认知功能下降^[3], 由此推测甲减认知障碍可能与 ApoE4 表达升高有关。

在人类 AD 中, ApoE4 大脑类器官显示出 TC 代谢的改变^[6]。升高的 ApoE4 可促进 TC 的合成增加和分解代谢减少^[7], 导致细胞内脂滴积聚^[8], 使得髓磷脂再生受损^[9]; 同时产生大量的 ROS, 进一步加剧脂滴积聚^[10], 最终导致神经退行性改变^[11]。以上结果说明, ApoE4 表达的升高可增加 TC 在脑部的累积, 改变小胶质细胞功能, 引起神经功



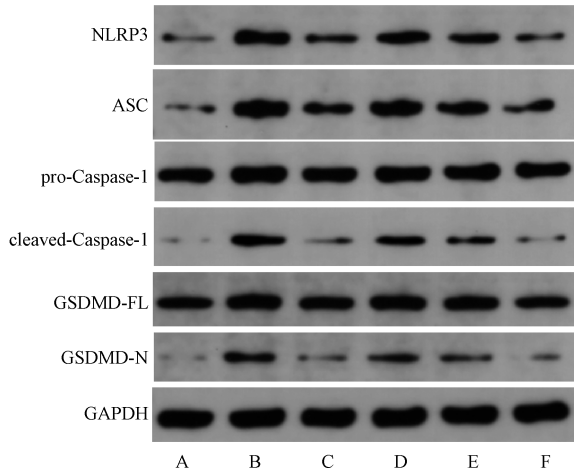
注: A 为正常组, B 为模型组, C 为模型组, D 为温肾方低剂量组, E 为温肾方高剂量组, F 为联合用药组。

图 3 各组小鼠皮质 UCP4 蛋白条带图



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为模型组, D 为温肾方低剂量组, E 为温肾方高剂量组, F 为联合用药组。

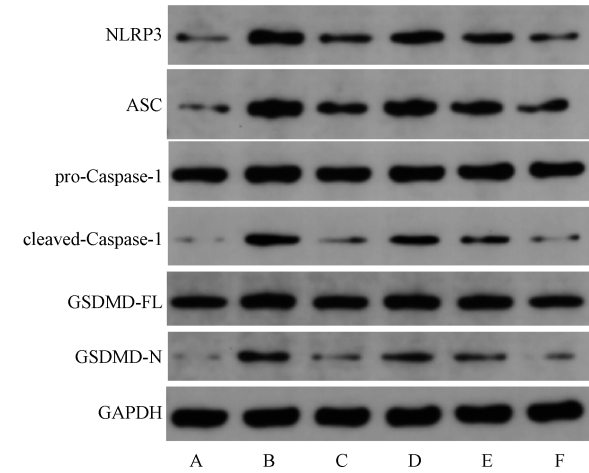
图 4 各组小鼠海马 UCP4 蛋白条带图



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为模型组, D 为温肾方低剂量组, E 为温肾方高剂量组, F 为联合用药组。

图 5 各组小鼠皮质 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白条带图

能异常。ApoE4 在神经星形胶质细胞中的积累还会损害线粒体功能^[12]。ApoE4 诱导的 TC 积累损害了溶酶体依赖性的受损线粒体的清除^[13], 造成线粒体吞噬缺陷^[14]。ApoE4 还能破坏神经元和胶质线粒体的裂变-融合平衡, 导致内质网应激^[15], 引起过氧化敏感性增高^[16], 加剧促炎反应, 促进有毒脂质积累, 引起神经元细胞死亡和退行性病变。GSH 的消耗可增加 ROS 形成, 导致氧化应激^[17]。由于 ROS



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为模型组，D 为温肾方低剂量组，E 为温肾方高剂量组，F 为联合用药组。

图 5 各组小鼠海马 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白条带图

表 7 各组小鼠皮质 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)						
组别	NLRP3	ASC	pro-Caspase-1	cleaved-Caspase-1	GSDMD-FL	GSDMD-N
正常组	0.09±0.04	0.09±0.02	0.68±0.05	0.03±0.01	0.58±0.02	0.02±0.01
模型组	0.66±0.04**	0.85±0.08**	0.88±0.02**	0.45±0.06**	0.77±0.01**	0.32±0.03*
优甲乐组	0.25±0.07##	0.42±0.09##	0.73±0.02##	0.11±0.03##	0.62±0.02##	0.07±0.02#
温肾方低剂量组	0.48±0.07## $\Delta\Delta$	0.69±0.11## $\Delta\Delta$	0.82±0.04 Δ	0.29±0.05##	0.70±0.05#	0.22±0.06
温肾方高剂量组	0.33±0.06##	0.50±0.10##	0.78±0.04##	0.18±0.02##	0.66±0.04##	0.11±0.03#
联合用药组	0.14±0.05## Δ	0.28±0.09##	0.69±0.04##	0.06±0.03##	0.59±0.02##	0.04±0.01#

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与优甲乐组比较， $\Delta P<0.05$ ， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 8 各组小鼠海马 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)						
组别	NLRP3	ASC	pro-Caspase-1	cleaved-Caspase-1	GSDMD-FL	GSDMD-N
正常组	0.21±0.07	0.19±0.03	0.68±0.02	0.03±0.01	0.69±0.06	0.03±0.01
模型组	0.78±0.05**	0.80±0.02**	0.98±0.10**	0.43±0.07**	0.88±0.04**	0.52±0.04**
优甲乐组	0.46±0.06##	0.45±0.08##	0.82±0.08	0.13±0.05##	0.76±0.06#	0.20±0.02##
温肾方低剂量组	0.68±0.08 $\Delta\Delta$	0.68±0.02## $\Delta\Delta$	0.95±0.11	0.34±0.07 $\Delta\Delta$	0.86±0.04 Δ	0.41±0.05##
温肾方高剂量组	0.50±0.08##	0.52±0.09##	0.90±0.11	0.20±0.08##	0.77±0.03#	0.26±0.04##
联合用药组	0.35±0.10##	0.33±0.06## Δ	0.77±0.10#	0.08±0.04##	0.72±0.06##	0.12±0.01## Δ

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与优甲乐组比较， $\Delta P<0.05$ ， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

皮质和海马 ApoE4、TC 水平降低，GSH、UCP4 mRNA 和蛋白表达升高，ROS 水平降低，NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达降低，说明温肾方还能通过减少 ROS 的形成，调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡起到治疗甲减认知障碍的作用。

综上所述，温肾方可抑制 ApoE4 和 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路，抑制 NLRP3 炎症小体介导的胶质细胞焦亡，改善甲减小鼠的认知功能。

参考文献：

[1] van Vliet N A, van Heemst D, Almeida O P, *et al.* Association of thyroid dysfunction with cognitive function: an individual participant data analysis[J]. *JAMA Intern Med*, 2021, 181(11): 1440-1450.

水平的升高，ApoE4 脑内皮细胞有更大的炎症反应和更高的细胞旁通透性^[18]。皮质和海马体中 ROS 生成的增强还可触发 NLRP3 炎症体的激活^[19]，NLRP3 炎症小体可激活 Caspase-1，加速促炎因子的成熟和释放。同时，GSDMD 被募集到 NLRP3 炎症小体，引起焦亡^[20-21]。

UCP4 与抗氧化应激和线粒体的功能密切相关，以药物靶向神经元解偶联蛋白家族（uncoupling proteins, UCPs）是预防神经退行性疾病的关键策略^[22]。UCP4 在 AD 患者中的表达降低^[23]，UCP4 基因的内含子变异增加了迟发性 AD 和额颞叶痴呆的风险^[24]。过表达 UCP4 可以提高神经元的体外存活率，有效地阻止 AD 小鼠海马代谢物水平的改变^[25]。促进 UCPs 的表达，可降低 ROS 的产生，有助于保护海马神经元免受缺血性损伤^[26]。本研究发现，甲减小鼠皮质和海马 ApoE4、TC 水平升高，GSH、UCP4 mRNA 和蛋白表达降低，NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达升高。经温肾方干预后，甲减小鼠 TT₃、TT₄ 水平升高，TSH 水平降低，

[2] Mulat B, Ambelu A, Yitayih S, *et al.* Cognitive impairment and associated factors among adult hypothyroid patients in referral hospitals, Amhara Region, Ethiopia: multicenter cross-sectional study[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 935-943.

[3] 曾明星, 向楠, 陈继东, 等. 温肾方调控外泌体 ApoE4 介导的胆固醇稳态改善甲减认知障碍的机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(3): 440-447.

[4] Zhang M, Gong W, Zhang D, *et al.* Ageing related thyroid deficiency increases brain-targeted transport of liver-derived ApoE4-laden exosomes leading to cognitive impairment[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 406.

[5] Sun Y Y, Wang Z, Huang H C. Roles of ApoE4 on the pathogenesis in Alzheimer's disease and the potential therapeutic approaches[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(7): 3115-3136.

[6]

Zhao J, Ikezu T C, Lu W, *et al.* APOE deficiency impacts neural differentiation and cholesterol biosynthesis in human iPSC-derived cerebral organoids[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 214.

[7]

Tew J, Qian L, Pipalia N H, *et al.* Cholesterol and matrisome pathways dysregulated in astrocytes and microglia[J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2213-2233. e25.

[8]

Wang C, Lu J, Sha X, *et al.* TRPV1 regulates ApoE4-disrupted intracellular lipid homeostasis and decreases synaptic phagocytosis by microglia[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55 (2) : 347-363.

[9]

Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, *et al.* Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(2): 194-208.

[10]

Hu X, Ma Y N, Xia Y. Association between abnormal lipid metabolism and Alzheimer’s disease; new research has revealed significant findings on the APOE4 genotype in microglia[J]. *Biosci Trends*, 2024, 18(2): 195-197.

[11]

Husain M A, Laurent B, Plourde M. APOE and Alzheimer’s disease; from lipid transport to physiopathology and therapeutic[J].*Front Neurosci*, 2021, 15: 630502.

[12]

Lee H, Cho S, Kim M J, *et al.* ApoE4-dependent lysosomal cholesterol accumulation impairs mitochondrial homeostasis and oxidative phosphorylation in human astrocytes[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113183.

[13]

Eisenbaum M, Pearson A, Ortiz C, *et al.* ApoE4 expression disrupts tau uptake, trafficking, and clearance in astrocytes[J]. *Glia*, 2024, 72(1): 184-205.

[14]

Zhou Y, Zhao Q, Zhang Y, *et al.* A new andrographolide derivative ADA targeting SIRT3-FOXO3a signaling mitigates cognitive impairment by activating mitophagy and inhibiting neuroinflammation in Apoe4 mice[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155298.

[15]

Haddadi M, Haghi M, Rezaei N, *et al.* APOE and Alzheimer’s disease: pathologic clues from transgenic *Drosophila melanogaster*[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2024, 123: 105420.

[16]

Sienski G, Narayan P, Bonner J M, *et al.* APOE4 disrupts intracellular lipid homeostasis in human iPSC-derived glia[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(583): eaaz4564.

[17]

Borges C G, Canani C R, Fernandes C G, *et al.* Reactive nitrogen species mediate oxidative stress and astrogliosis provoked by *in vivo* administration of phytanic acid in cerebellum of adolescent rats: a potential contributing pathomechanism of cerebellar injury in peroxisomal disorders[J]. *Neuroscience*, 2015, 304: 122-132.

[18]

Marottoli F M, Trevino T N, Geng X, *et al.* Autocrine effects of brain endothelial cell-produced human apolipoprotein E on metabolism and inflammation *in vitro*[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 668296.

[19]

Zhou R, Yazdi A S, Menu P, *et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2011, 469 (7329): 221-225.

[20]

He W T, Wan H, Hu L, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1285-1298.

[21]

Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-158.

[22]

Reyad-Ul-Ferdous M, Gul I, Raheem M A, *et al.* Mitochondrial UCP1: potential thermogenic mechanistic switch for the treatment of obesity and neurodegenerative diseases using natural and epigenetic drug candidates[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155672.

[23]

Montesanto A, Crocco P, Anfossi M, *et al.* The genetic variability of UCP4 affects the individual susceptibility to late-onset Alzheimer’s disease and modifies the disease’s risk in APOE- ϵ 4 carriers[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 51 (4) : 1265-1274.

[24]

Montesanto A, Crocco P, Dato S, *et al.* Uncoupling protein 4 (UCP4) gene variability in neurodegenerative disorders: further evidence of association in frontotemporal dementia[J]. *Aging*, 2018, 10: 3283-3293.

[25]

Rosenberg N, Reva M, Binda F, *et al.* Overexpression of UCP4 in astrocytic mitochondria prevents multilevel dysfunctions in a mouse model of Alzheimer’s disease[J]. *Glia*, 2023, 71(4): 957-973.

[26]

Han B, Jiang W, Liu H, *et al.* Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2832-2848.