

白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 HT22 细胞损伤及 NLRP-1 炎症小体激活的影响

黄茸茸¹, 陆松侠¹, 许 燕¹, 李维祖^{2*}
(1. 安徽新华学院药学院药理教研室, 安徽 合肥 230088; 2. 安徽医科大学药理学教研室, 抗炎免疫药理学教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药药理三级实验室, 安徽 合肥 230032)

摘要: **目的** 研究白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 HT22 细胞损伤及 NLRP-1 炎症小体激活的影响。**方法** Aβ₂₅₋₃₅ (1 μmol/L) 诱导 HT22 建立细胞损伤模型, 同时白果内酯 (6、12、24 μmol/L) 和 NADPH 氧化酶抑制剂 (DPI, 15 μmol/L) 处理 24 h, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, Annexin V-FITC/PI 双染法检测神经元细胞凋亡率, 流式法 (DCFH-DA 荧光探针) 测定细胞内 ROS 生成, ELISA 法测定 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平, Western blot 法检测 NLRP-1、ASC、caspase-1 的蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组细胞活力下降 ($P<0.01$), 神经元细胞凋亡率提高 ($P<0.01$), 同时, ROS 的生成、细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平及 NLRP-1、ASC、caspase-1 的蛋白表达均增多 ($P<0.01$); 与模型组比较, 白果内酯 (12、24 μmol/L) 组能提高细胞活力, 减少 ROS 生成, 降低 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平与神经元细胞凋亡率 ($P<0.05$, $P<0.01$), 白果内酯 (24 μmol/L) 组能抑制细胞 NLRP-1、ASC 及 caspase-1 的蛋白表达 ($P<0.01$)。**结论** 白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的小鼠海马神经元 HT22 细胞损伤具有较好的保护作用, 其机制可能与抑制 NADPH 氧化酶-ROS 介导的 NLRP-1 炎症小体激活有关。
关键词: 白果内酯; 阿尔茨海默病; Aβ₂₅₋₃₅; ROS; NLRP-1; ASC; caspase-1
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2317-07
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.013

Effects of bilobalide on Aβ₂₅₋₃₅-induced HT22 cell injury and the activation of NLRP-1 inflammasome

HUANG Rong-rong¹, LU Song-xia¹, XU Yan¹, LI Wei-zu^{2*}
(1. Department of Pharmacology, Anhui Xinhua University, Hefei 230088, China; 2. Department of Pharmacology/Key Laboratory of Antiinflammatory and Immunopharmacology/Ministry of Education Key Laboratory for Research and Development of Chinese Medicine/Level 3 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of bilobalide on Aβ₂₅₋₃₅-induced HT22 cell injury and the activation of NLRP-1 inflammasome. **METHODS** Cell damage models built upon HT22 cells by Aβ₂₅₋₃₅ induction were subsequently exposed to 24 h treatments of bilobalide (6, 12, 24 mol/L) and NADPH oxidase inhibitor (DPI, 15 mol/L) respectively. The activity of HT22 cells and neuronal apoptosis rate were detected by CCK-8 method and Annexin V-FITC/PI double staining, the production of reactive oxygen species (ROS) was examined by DCFH-DA fluorescent probe, the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were determined by ELISA, and the expression of NLRP-1, ASC and caspase-1 protein in neurons were identified by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the model group was observed with decreased cell activity and increase neuronal apoptosis rate ($P<0.01$), more ROS production, and increased levels of cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α, and stronger expression of NLRP-1, ASC and caspase-1 protein ($P<0.01$). Bilobalide at concentrations of 12 μmol/L and 24 μmol/L improved cell viability, reduced ROS production, and lowered IL-1β, IL-6, TNF-α levels and neuronal

收稿日期: 2020-01-13
基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (KJ2015A298); 安徽省教育厅质量工程项目 (2018mooc438)
作者简介: 黄茸茸 (1981—), 女, 硕士, 副教授, 从事神经免疫药理学研究。Tel: 13966662620, E-mail: miyababy@163.com
* 通信作者: 李维祖 (1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事神经免疫药理学研究。Tel: 13856081917, E-mail: liweizu@126.com

cell apoptosis rate ($P<0.05$, $P<0.01$). Bilobalide at concentration of 24 $\mu\text{mol/L}$ inhibited the protein expression of NLRP-1, ASC and caspase-1 ($P<0.01$). **CONCLUSION** Bilobalide's protective effect on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced HT22 cells damage may be associated with its inhibition to NADPH oxidase-ROS-mediated activation of NLRP-1 inflammasome.

KEY WORDS: Bilobalide; Alzheimer's disease (AD); $\text{A}\beta_{25-35}$; ROS; NLRP-1; ASC; caspase-1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿的中枢神经退行性疾病, 病因复杂且机制未明, 临床治疗难度较大。随着我国人口老龄化水平的日益加重, 该病的发病率呈持续升高趋势, 家庭和社会负担沉重, 因此, 寻找有效的治疗药物迫在眉睫。近年来有研究^[1]显示, β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $\text{A}\beta$) 在脑内沉积介导的氧化应激所致的慢性炎症反应是导致神经元凋亡与神经元退行性病变的重要因素之一。因此, 抑制氧化应激导致的细胞炎症反应被认为是防治神经退行性病变的有效策略。炎症小体是由胞浆内模式识别受体 (PRRs) 参与组装的多蛋白复合物, 是与免疫炎症反应密切相关的关键性物质, 主要负责促进相关促炎因子的形成。炎症小体激活后可通过活化 caspase-1 来切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 使其裂解成熟并介导机体炎症反应的发生和发展。研究^[2]表明, 炎症小体核苷酸结合 NLRP-1 参与了神经退行性疾病的病理过程, 在小鼠 AD 模型中, $\text{A}\beta$ 可通过破坏小胶质细胞的溶酶体来激活 NLRP-1, 表明 NLRP-1 活化促进了老年痴呆症的病理发展, 而 NADPH 氧化酶-ROS 生成增加也是激活炎症小体的主要途径之一^[3]。因此, 推测 $\text{A}\beta$ 诱导的神经元细胞损伤可能与 NADPH 氧化酶-ROS 途径导致的 NLRP-1 炎症小体激活有关。

银杏叶提取物是治疗 AD 的常用中药, 而白果内酯 (Bilobalide) 是银杏叶提取物中重要的生物活性成份, 其在神经保护以及促进神经生长等方面发挥着重要作用^[4]。已有研究结果表明, 白果内酯能改善 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 模型大鼠的学习记忆能力, 对大脑皮层和海马神经元也具有较好的保护作用^[5]。NADPH 氧化酶诱导的 ROS 生成增多能够使海马神经元 NLRP1 炎症小体激活从而促进神经元损伤^[6]。白果内酯是否可通过抑制 ROS 生成来抑制神经元 NLRP-1 炎症小体的活化, 参与对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导海马神经元损伤的保护作用目前尚不清楚。因此, 本研究采用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的小鼠海马神经元 HT22 细胞损伤模型, 观察白果内酯对 HT22 细胞损伤的保护作用是否与其干预 ROS 生成过多所致

的 NLRP-1 炎症小体激活有关。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠海马神经元细胞 HT22 (编号 BNCC337709), 购于北京北纳创联生物技术研究院。

1.2 药物与试剂 白果内酯 (纯度 $\geq 98\%$, 美国 sigma 公司, 批号 20160612); $\text{A}\beta_{25-35}$ (美国 sigma 公司, 批号 20160503); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1227697); DMEM/F12 (美国 Gibco 公司, 批号 1868819); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 E004-1-1); CCK-8 检测试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号 C0038); IL-1 β 、IL-6、TNF- α 检测 ELISA 试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号分别为 PI301、PI326、PT512); 兔抗 NLRP-1 多克隆抗体、兔抗 caspase-1 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab3685、ab1874); 兔抗 ASC 多克隆抗体 (美国 Santa cruz 公司, 批号 sc-33956); β -actin 单克隆抗体 (北京中杉金桥生物有限公司, 批号 TA-07); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 E-CK-A211); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 无菌超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 5% CO_2 恒温培养箱 (力康生物医疗科技控股集团); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); PowerPac200 Western blotting 电泳仪 (美国伯乐公司); IX-71 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); 756MC 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); TGL16H 高速低温离心机 (珠海黑马仪器有限公司); Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽 (美国 Bio Rad 公司); PowerPac™ 电泳仪 (美国 Bio Rad 公司); 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 96 孔培养板 (美国 Costar 公司); Tanon-4500 全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); Image-Pro Plus (IPP 7.0) 图像处理分析软件 (美国 Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 取对数生长期的 小鼠海马神经

元 HT22 细胞，分为对照组、模型组（ $A\beta_{25-35}$ ， $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）及白果内酯低、中、高剂量组（6、12、 $24\text{ }\mu\text{mol/L}$ ），NADPH 氧化酶抑制剂（DPI， $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）阳性对照组。用完全培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。除对照组，其余各组均以 $A\beta_{25-35}$ （ $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）刺激细胞，并分别给予白果内酯和 DPI 干预，作用 24 h 后检测相关指标。

2.2 CCK-8 法检测 HT22 细胞活力 细胞药物处理 24 h 后，小心弃去孔内培养液，向每孔加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 溶液，放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱继续孵育 2 h，将培养板放置在摇床上摇动 5 min，酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值（OD），按以下公式计算各组细胞存活率。细胞存活率 = $[(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

2.3 流式细胞术 DCFH-DA 荧光法检测 HT22 细胞 ROS 生成 利用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 生成。DCFH-DA 本身无荧光，进入细胞后可被水解生成 DCFH，而 DCFH 无法透过细胞膜。细胞内的 ROS 可以将无荧光的 DCFH 氧化生成为有荧光的 DCF，通过 DCF 荧光强度检测即可反映细胞内 ROS 水平。取药物作用 24 h 后的各组细胞制成细胞悬液，移入离心管 800 r/min ，离心 5 min 弃上清。再按 ROS 试剂盒说明书加入 1 mL 染色工作液（ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA），混匀并放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中避光孵育 30 min。用无血清细胞培养液重复洗涤细胞 3 次，以充分清除未进入细胞内的 DCFH-DA。最后在激发波长 488 nm ，发射波长 525 nm 处，使用流式细胞仪（FITC-A 通道）检测各组细胞内荧光强度。

2.4 ELISA 法检测 HT22 细胞上清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 取给药 24 h 后的各组细胞，吸取培养板每孔上清液 $100\text{ }\mu\text{L}$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，采用双抗体夹心 ELISA 法，按 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 细胞因子检测试剂盒说明书进行测定操作。酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度值（OD），通过标准曲线算出各组细胞上清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.5 Western blot 法检测 HT22 细胞 NLRP-1、ASC、caspase-1 蛋白的表达 取给药 24 h 后的各组细胞，弃去细胞培养液，PBS 清洗细胞后每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 细胞裂解液，裂解 5 min，再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $11\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min，取其上清。将上清液倒入预冷的离心管中，用 BCA 法对蛋白进行定量，再加入 loading buffer 煮沸变性，SDS-PAGE 凝胶电

泳并转 PVDF 膜，转膜完成后将膜放入 5% 脱脂奶粉封闭液中室温孵育 1 h，再加一抗（NLRP-1 $1:1\text{ }000$ ；ASC $1:1\text{ }000$ ；caspase-1 $1:1\text{ }000$ ），于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。TBST 洗涤 3 次， 10 min/次 ，加入 HRP 标记的二抗（ $1:5\text{ }000$ ），室温下孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次， 10 min/次 。最后加 ECL 化学发光剂，用 Tanon-4500 化学发光成像系统进行显影。以 β -actin 的表达作为参照，利用 Image J 软件处理目的蛋白的灰度值进行半定量分析。

2.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 HT22 细胞凋亡 取给药 24 h 后的各组细胞， $2\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min，弃去培养基。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次，用 $400\text{ }\mu\text{L}$ binding buffer 悬浮细胞，调整浓度约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。在细胞悬浮液中加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC，轻轻混匀后于 $2\sim8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min，再加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ PI 后混匀于 $2\sim8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min，最后在荧光显微镜下观察各组细胞的凋亡情况。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理与分析。计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较选用单因素方差分析，组间比较采用 t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞存活率的影响 与对照组比较， $A\beta_{25-35}$ （ $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）刺激 HT22 细胞 24 h 后，细胞存活率下降（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，白果内酯中、高剂量组（12、 $24\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）与阳性对照组（ $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ ）的细胞存活率提高（ $P < 0.01$ ），而白果内酯低剂量组（ $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ ），差异无统计学意义。提示白果内酯中、高剂量与 DPI 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 海马神经元细胞损伤具有较好的保护作用。见表 1。

表 1 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞存活率的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$ ）

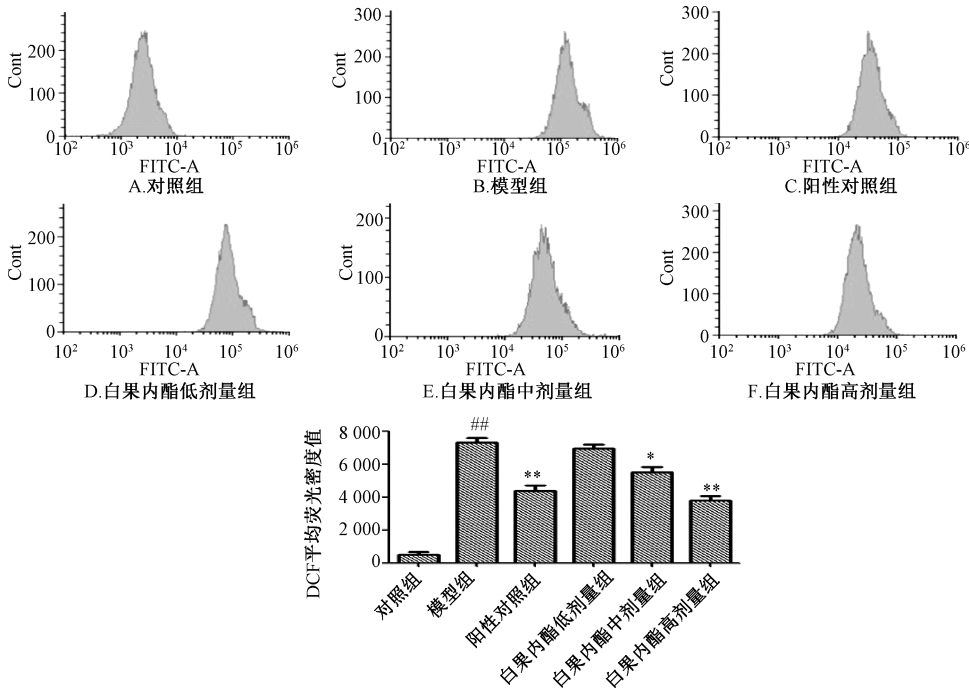
Tab.1 Effects of bilobalide on the survival of $A\beta_{25-35}$ -induced HT22 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)	
组别	细胞存活率/%
对照组	98.3 $\pm$ 13.0
模型组	43.1 $\pm$ 10.2 ^{##}
阳性对照组	90.2 $\pm$ 12.7 ^{**}
白果内酯低剂量组	48.0 $\pm$ 13.1
白果内酯中剂量组	89.7 $\pm$ 11.4 ^{**}
白果内酯高剂量组	84.5 $\pm$ 17.1 ^{**}

注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞内 ROS 生成的影响 流式法（FITC-A 通道）测定细胞内 ROS 的流式图中横坐标代表平均荧光强度，纵坐

标代表细胞计数。与对照组比较，模型组细胞平均荧光强度增高 ($P<0.01$)，表明经 $A\beta_{25-35}$ 诱导后细胞内 ROS 生成增多；与模型组比较，白果内酯中、高剂量组 (12、24 $\mu\text{mol/L}$) 与阳性药组细胞平均

荧光强度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，白果内酯低剂量组 (6 $\mu\text{mol/L}$)，差异无统计学意义。白果内酯能减少 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞内 ROS 生成，其机制可能与其抑制 NADPH 酶有关。见图 1。



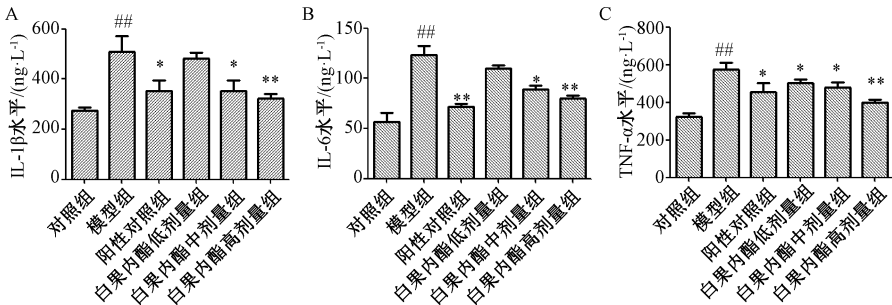
注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞内 ROS 生成的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effects of bilobalide on ROS generation in $A\beta_{25-35}$ -induced HT22 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞上清液中细胞炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，白果内酯中、高剂量组 (12、24 $\mu\text{mol/L}$) 与

阳性对照组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)，而白果内酯低剂量组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 仅减少 TNF- α 水平 ($P<0.05$)，对细胞因子 IL-1 β 、IL-6 释放的无影响。见图 2。



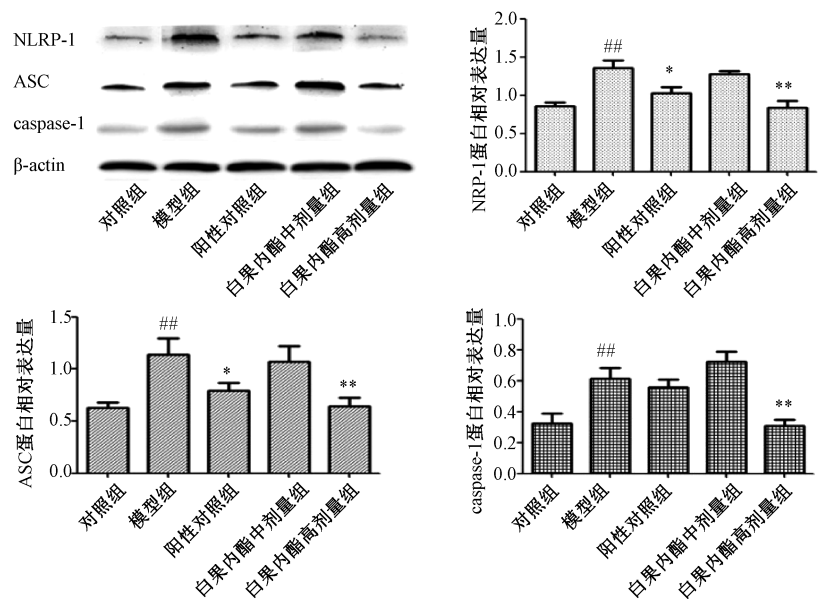
注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 2 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effects of bilobalide on the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in $A\beta_{25-35}$ -induced HT22 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 白果内酯对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞NLRP-1、ASC、caspase-1 蛋白表达的影响 与对照组比较， $A\beta_{25-35}$ (1 $\mu\text{mol/L}$) 刺激细胞 24 h 后，模型组细胞 NLRP-1、ASC、caspase-1 蛋白表达增加 ($P<0.01$)；

与模型组比较，白果内酯高剂量组 (24 $\mu\text{mol/L}$) 下调 NLRP-1、ASC、caspase-1 的蛋白表达 ($P<0.01$)，阳性对照组 NLRP-1 与 ASC 蛋白表达减少 ($P<0.05$)。见图 3。



注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 3 白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 HT22 细胞 NLRP-1、ASC、caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig. 3 Effects of bilobalide on the expression of NLRP-1, ASC, caspase-1 protein in Aβ₂₅₋₃₅-induced HT22 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

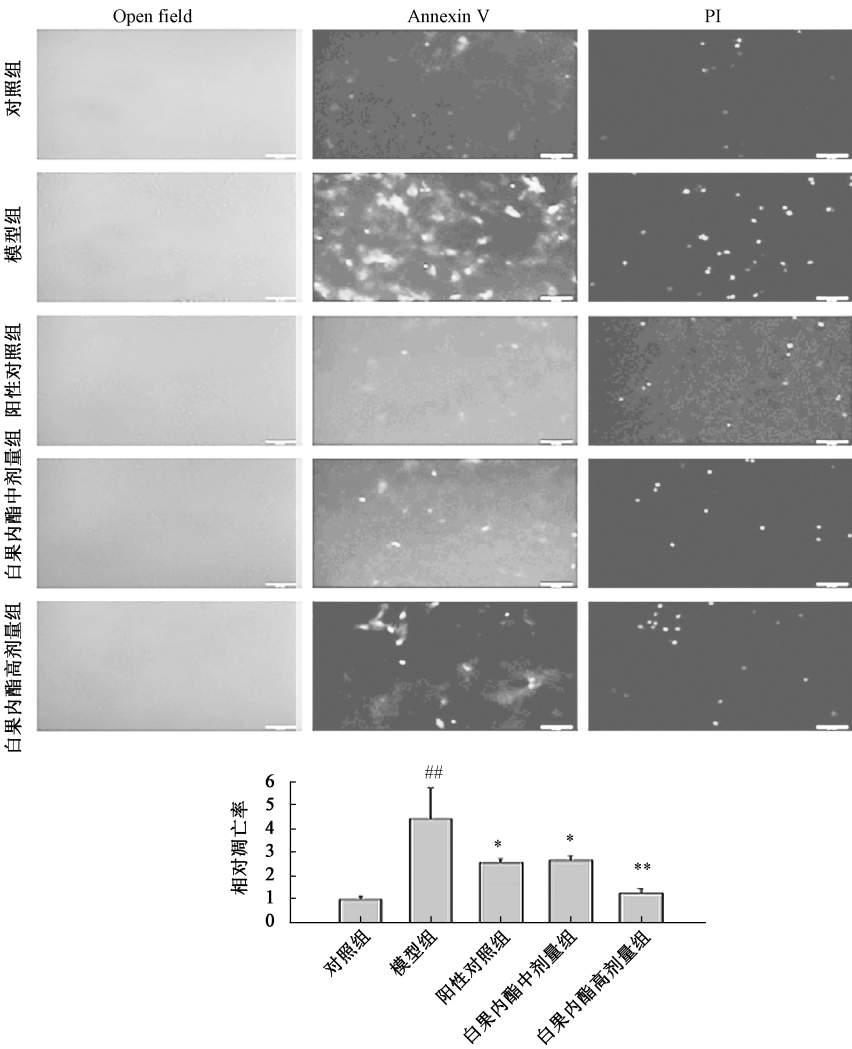
3.5 白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 HT22 细胞凋亡的影响 与对照组比较，模型组可提高 Annexin V-FITC 染色神经元与 PI 染色神经元的比值 (*P*<0.01)；与模型组比较，白果内酯中、高剂量组（12、24 μmol/L）及阳性对照组 Annexin V-FITC 染色神经元与 PI 染色神经元的比值下降 (*P*<0.05, *P*<0.01)。见图 4。

4 讨论

大量研究显示，AD 的发病与 Aβ 沉积引起的继发性炎症反应密切相关。炎症是机体对于外界刺激的一种防御性反应，但过度的炎症反应也是导致神经元退行性疾病的重要因素，抗炎治疗能一定程度延缓 AD 的病程，但具体机制尚不完全清楚。炎症小体是先天免疫系统中重要的组成部分，近年研究发现，异常活化的炎症小体能够导致多种炎症性疾病的发生，如痛风、关节炎和中枢神经系统疾病等，而炎症小体所介导的炎症反应与中枢神经退行性疾病的发生密切相关^[7]。炎症小体是在多种细胞的胞质中存在的多聚体蛋白复合体，激活后的炎症小体以应对感染或应激信号导致宿主细胞膜受损。NLRP-1 炎症小体主要由 3 种蛋白构成，即 NLRP-1、ASC、caspase-1。其中 ASC 是接头蛋白并主要负责催化，NLRP-1 是始动分子，caspase-1 则为效应分子。NLRP-1 通过 ASC 招募 Pro-caspase-1，caspase-1 激活后可对 pro-IL-1β 等炎症因子前体进行加工，使其成熟并释放到胞外，诱发神经炎症反应

而导致中枢神经系统病变。因此，抑制 NLRP-1 炎症小体活化成为防治 AD 的可能机制。另外，ROS 过量生成导致的氧化应激亦被认为是在 Aβ 介导的神经细胞凋亡中发挥作用的关键因素。有研究^[8]表明，Aβ 可诱发细胞内 ROS 大量蓄积，有助于促进 AD 老年斑和神经纤维缠结的形成，使细胞受到氧化性损伤。NADPH 氧化酶是脑内生成 ROS 的重要酶系统，已被证明在各种神经系统疾病的发生发展中起着重要作用，通过调控 ROS 水平来抑制氧化应激，对防治 AD 具有积极意义。

白果（又称银杏果）是银杏树的种子，是一种含有特异生物活性成分的中药材，已有研究表明，其在抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降压以及抗炎免疫等方面均具有较好疗效，因此，在医药保健方面具有很高的研发价值。白果内酯是从银杏科植物银杏中提取出来的倍半萜物质，是目前银杏中最受关注的活性成分，其在心脑血管疾病的临床治疗中已有较确切的疗效。课题组前期研究^[9]发现，白果内酯可改善痴呆小鼠的学习记忆能力，具有清除自由基、抗氧化、抗炎、扩脑血管与促神经生长等作用，而其神经营养作用更强于银杏内酯。因此，进一步研究 AD 的发生发展机制及白果内酯对 AD 的防治作用机制具有非常重要的意义。本课题组前期研究还发现，应激水平的糖皮质激素长期作用可增加脑内 ROS 生成，促进 NLRP-1 炎症小体的激活，使炎症因子生成增多，促进小鼠皮层和海马区神经



注：图片标尺为 50 μm。与对照组比较，##*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

图 4 白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 HT22 神经元细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

Fig. 4 Effects of bilobalide on neuronal apoptosis in Aβ₂₅₋₃₅-induced HT22 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

元的损伤^[10]。人参皂苷 Rg1 能够减少 ROS 产生，抑制 NLRP-1 炎症小体的激活，从而改善神经元老化和认知功能障碍^[11]。因此推测白果内酯可能通过抑制 NADPH 氧化酶-ROS 介导的神经元 NLRP-1 炎症小体激活，从而减轻 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的神经元炎症损伤及细胞凋亡。

本研究发现，Aβ₂₅₋₃₅ (1 μmol/L) 处理 HT22 细胞 24 h 后，HT22 细胞活力明显降低，神经元细胞凋亡率、细胞内活性氧 ROS 生成、NLRP-1 炎症小体相关蛋白的表达及 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症细胞因子释放量均明显升高。本研究结果表明，ROS 过度生成导致的神经元 NLRP-1 炎症小体激活在 Aβ 诱导的神经元炎症损伤中具有十分重要的作用，而白果内酯可通过抑制 NADPH 氧化酶-ROS 途径来抑制神经元 NLRP-1 炎症小体激活，从而减

轻 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的神经元损伤。

本实验研究的创新之处在于，首次初步探讨了白果内酯对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的小鼠海马神经元 HT22 细胞损伤模型的保护作用及其炎症机制，但仍存在诸多不足。临床和神经病理学研究发现，过度激活的小胶质细胞会导致神经毒性，它们是氧化应激和炎症因子的重要来源。体外实验也已证实 Aβ 可上调星形胶质细胞前体炎症介质的表达，而趋化因子释放增多则可导致小胶质细胞活化。Aβ 形成后既可直接产生神经细胞毒性作用，又可通过激活神经系统中的胶质细胞释放炎症介质如 ROS、蛋白水解酶、NO 等，对邻近的神经元产生杀伤作用，同时细胞因子介导的炎症反应又可以促进 Aβ 前体蛋白 (β-mayloid precursor protein, APP) 代谢为 Aβ，形成恶性循环^[12-15]。因此，白果内酯是否还可通过

抑制 A β 诱导的小胶质细胞炎症小体激活来发挥神经保护作用及其机制将有待进一步研究。

参考文献:

[1] Allgaier M, Allgaier C. An update on drug treatment options of Alzheimer's disease[J]. *Front Biosci (landmark Ed)*, 2014, 19(6): 1345-1354.

[2] Salminen A, Ojala J, Suuronen T, et al. Amyloid- β oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A): 2255-2262.

[3] Fischer M T, Sharma R, Lim J L, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury [J]. *Brain*, 2012, 135 (Pt3): 886-899.

[4] 唐远鹏, 曾 靖, 黄起壬. 白果内酯药理作用的研究[J]. 赣南医学院学报, 2015, 35(1): 153-155.

[5] Yin Y Y, Ren Y G, Wu W Y, et al. Protective effects of bilobalide on A β ₂₅₋₃₅ induced learning and memory impairments in male rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 106(5): 77-84.

[6] 杜烨湘, 罗 敏, 冯 敏, 等. 甘草素通过抗炎发挥对阿尔茨海默病的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(4): 327-333.

[7] 梁跃霞, 曹国琼, 张文生. 阿尔茨海默症炎症反应及中药干预研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(5): 597-602.

[8] Kim H J, Jung S W, Kim S Y, et al. Panax ginseng as an

adjuvant treatment for Alzheimer's disease[J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(4): 401-411.

[9] 武汪洋, 曹明成, 朱正义, 等. 白果内酯对半乳糖诱导的痴呆小鼠学习记忆功能的保护作用[J]. 安徽医药, 2012, 16(11): 1575-1577.

[10] Zhang B, Zhang Y, Xu T, et al. Chronic dexamethasone treatment results in hippocampal neurons injury due to activate NLRP1 inflammasome in vitro [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 222-230.

[11] Zhang Y, Hu W, Zhang B, et al. Ginsenoside Rg1 protects against neuronal degeneration induced by chronic dexamethasone treatment by inhibiting NLRP-1 inflammasomes in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1134-1142.

[12] Fowler S W, Chiang A C, Savjani R R, et al. Genetic modulation of soluble A β rescues cognitive and synaptic impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(23): 7871-7885.

[13] Savage M J, Lin Y G, Ciallella J R, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3376-3385.

[14] Xie A, Gao J, Xu L, et al. Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 648740.

[15] Halliday G, Robinson S R, Shepherd C, et al. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27(1-2): 1-8.