# 高良姜素调控 TLR4/NF-κB 信号通路对阿尔茨海默病大鼠神经炎症的 影响

郑为娜1, 徐振华2, 庞海英1, 王 珊3\*, 张国华3

(1. 北京市大兴区中西医结合医院,北京 102600; 2. 濮阳市中医医院,河南 濮阳 457001; 3. 河北医科 大学第二医院,河北 石家庄 050000)

摘要:目的 探讨高良姜素对阿尔茨海默病(AD)大鼠学习记忆能力及炎症反应的影响。方法 40 只 SD 大鼠随机 分为假手术组、假手术+高良姜素组、模型组、模型+高良姜素组,每组10只。通过双侧海马注射 Aβ.,。构建 AD 大鼠 模型, 给予高良姜素 100 mg/kg 干预 4 周。Morris 水迷宫实验评价大鼠空间学习记忆能力; HE 染色法观察海马神经元 病理形态改变:免疫组化法检测海马组织小胶质细胞和星形胶质细胞活化情况:Western blot 法检测海马组织 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达; ELISA 法检测海马组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠逃避 潜伏期延长 (P<0.01),穿越平台次数减少 (P<0.01),海马区神经元病理形态受损,小胶质细胞和星形胶质细胞活 化增加 (P<0.01), TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达升高 (P<0.01), 炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平升高 (P< 0.05)。与模型组比较,模型+高良姜素组大鼠逃避潜伏期缩短(P<0.01),穿越平台次数增加(P<0.01),海马组织 神经元病理形态改善,小胶质细胞和星形胶质细胞活化减少 (P<0.01), TLR4 和 p-NF-кВ p65 蛋白表达降低 (P< 0.01), TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低(P<0.01)。结论 高良姜素可改善 AD 大鼠学习记忆能力,其机制可能是抑制 小胶质细胞和星形胶质细胞的活化,下调 TLR4/NF-κB 信号通路传导,从而减轻炎症损伤,发挥神经保护作用。 关键词:高良姜素;阿尔茨海默病;神经炎症;小胶质细胞;星形胶质细胞;TLR4/NF-κB信号通路 中图分类号: R285.5 文献标志码:B 文章编号: 1001-1528(2025)06-2003-05 doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.036

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以学 习、记忆、语言及行为等多种认知功能进行性恶化为主要 表现的神经退行性疾病。预计到 2050 年,全球 AD 患者将 达到 1.52 亿, AD 已成为危害全球公共健康的突出问题, 给患者的家庭和社会带来了沉重的负担<sup>[1]</sup>。因此,积极研 发针对 AD 的有效治疗药物已成为当前医学研究领域的热 点与迫切任务。

多项研究结果表明, β 淀粉样蛋白 (β-amyloid protein, Aβ) 在脑内的异常沉积可导致小胶质细胞和星形胶质细胞 的过度活化,从而触发中枢神经系统炎性损伤,这种持续 的炎性损伤被认为是 AD 病理进程中的重要环节<sup>[24]</sup>。在中 枢神经系统中,离子化钙结合适配分子 1 (ionized calciumbinding adapter molecule 1, Iba-1) 特异性表达于小胶质细 胞,胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 特异性表达于星形胶质细胞,因此被作为小胶质细 胞和星形胶质细胞的标志物。Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 是细胞膜表面重要的免疫受体,在机体 的免疫反应和防御机制中发挥着关键作用<sup>[5]</sup>。TLR4 通过介 导核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 的激活, 促 进其下游炎症因子的表达, 从而放大炎症信号<sup>[6]</sup>。研究发 现, TLR4 介导的神经炎症与 AD 的发生发展有关, 抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的表达可以减轻 AD 认知功能障碍<sup>[78]</sup>。

高良姜素是从高良姜根中提取出的一种天然黄酮类化 合物,具有抗炎、抗氧化、神经保护等多重药理作用<sup>[9]</sup>。 然而高良姜素对于 AD 神经炎症的影响尚不明确,本研究 通过观察高良姜素对 AD 大鼠海马组织小胶质细胞、星形 胶质细胞活化及 TLR4/NF-κB 通路的影响,探讨其对 AD 的神经保护作用。

#### 1 材料

 1.1 动物 SPF级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(250±20)g,
3 月龄,购自河北医科大学实验动物中心[实验动物生产 许可证号 SCXK(冀)2022-001],饲养于河北医科大学第 二医院实验动物中心[实验动物使用许可证号 SYXK(冀)
2021-003],饲养环境温度(23±2)℃,相对湿度(55±

收稿日期: 2024-12-04

基金项目:河北省自然科学基金资助项目 (C2020206041);河北省卫生健康委医学科学研究课题计划项目 (20210309)

作者简介:郑为娜 (1987—),女,硕士,主治医师,研究方向为痴呆和脑血管病。Tel: (010) 61278101, E-mail: zhengweina05@ 163 com

<sup>\*</sup> 通信作者:王 珊 (1980—),女,博士,副主任医师,研究方向为痴呆和脑血管病。Tel: (0311) 66003942, E-mail: wangshan2012@ hebmu. edu. cn

5)%,光照/黑暗周期 12 h/12 h,自由饮水和摄食。动物 实验通过河北医科大学第二医院伦理委员会审批(审批号 2020-R208)。

1.2 药物与试剂 高良姜素 (北京康瑞纳生物科技有限公司, 批号 LA1806); A $\beta_{1.42}$  (美国 Sigma 公司, 批号 AG968); Iba-1 抗体 (日本 Wako 公司, 批号 011-27991); GFAP 抗体 (美国 Millipore 公司, 批号 MAB360); TLR4、 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 分别为 ab13556、ab207297、ab288751); HE 染色试剂盒 (北京凯诗源生物科技有限公司, 批号 SOS-319); 肿瘤坏 死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 (interleukin-1β, IL) -1β、IL-6 ELISA 试剂盒 (江苏酶免实 业有限公司, 批号均为 202301)。

#### 2 方法

2.1 分组、造模及给药 将40只大鼠随机分为假手术组、 假手术+高良姜素组、模型组、模型+高良姜素组,每组10 只。模型组和模型+高良姜素组大鼠腹腔注射10%水合氯 醛(剂量为300 mg/kg)进行麻醉,使用脑立体定位仪器 固定大鼠头部,参照《大鼠脑立体定位图谱》精确定位注 射部位(海马CA1区),颅骨钻打孔,微量注射器在双侧 海马CA1区各注5μLAβ<sub>142</sub>(2μg/mL),留针5min后缓 慢拔出针头,并对伤口进行缝合和消毒处理。假手术组、 假手术+高良姜素组大鼠则注射等剂量生理盐水。造模后, 假手术+高良姜素组、模型+高良姜素组大鼠灌胃给予高良 姜素100 mg/kg,模型组和假手术组灌胃给予等体积溶剂, 每天1次,连续4周。

2.2 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力 给药 4 周 后,开始 Morris 水迷宫实验,该实验包含 2 个部分,①定 位航行实验:水迷宫被均匀划分为四个象限,平台随机放 置在其中一个象限的中心位置,且需确保平台低于液面 2 cm,大鼠则从四个不同的象限,面向池壁放入水中,记录 大鼠从入水到找到平台所需的时间(以 s 为单位),即逃避 潜伏期,若大鼠在 120 s 内未能成功爬上平台,则将其引导 至平台并停留 30 s,同时将该象限的时间记为 120 s。按照 此方法,连续训练 5 d,每天进行 2 次测试,将四个象限的 平均潜伏期作为当天的逃避潜伏期。②空间探索实验:在 第 6 天撤除平台,然后将大鼠随机放入某个象限的水中, 记录 120 s 内大鼠穿越原平台位置的次数。

2.3 标本采集与保存 Morris水迷宫实验结束后,大鼠腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉,断头取脑,其中,每组5 只大鼠剥离海马,液氮速冻后于-80℃冰箱保存待用;另 外5只大鼠脑组织用4%多聚甲醛固定,制备石蜡切片。 2.4 HE 染色法观察海马 CA1 区病理形态学变化 将海马 石蜡切片脱蜡水化后,使用苏木素染色5 min,流水冲洗, 1%盐酸乙醇分化5s,流水冲洗,伊红复染2 min,再次冲 洗,之后脱水、透明、封片,于光学显微镜下拍照成像。 2.5 免疫组织化学法检测海马组织小胶质细胞和星形胶质 细胞的活化 海马石蜡切片经过脱蜡和水化处理后,使用 内源性过氧化物酶封闭液进行封闭处理,接着用枸橼酸盐 缓冲液进行抗原修复,再进行血清封闭。之后依次进行一 抗孵育、二抗孵育,使用 DAB 显色,然后进行复染和封 片,最后于显微镜下观察切片并保存图像,同时记录相关 统计数据。

2.6 Western blot 法检测海马组织 TLR4、p-NF-κB p65 蛋 自表达 取出冻存的海马组织,根据蛋白提取试剂盒说明 书提取蛋白样品,并采用 BCA 法测定蛋白浓度。随后进行 制胶及上样步骤,经 10% 凝胶电泳后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉溶液进行封闭,分别加入一 抗 TLR4 (1:500)、p-NF-κB p65 (1:1000)、NF-κB p65 (1:1000) 以及β-actin (1:1000),4℃孵育过夜,次日 加入二抗,室温孵育 2 h。在避光条件下 TPBS 洗膜后,滴 加化学发光液,使用凝胶成像系统显影并分析目标条带的 灰度值。

2.7 ELISA 法检测海马组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平 按 照试剂盒说明书对海马组织进行前处理,准备 ELISA 试剂 盒,向微孔板中加入捕获抗体并孵育,洗板后加样,包括 标准品和处理后的海马组织样品。随后,加入检测抗体和 酶联底物,再次洗板后进行显色反应。最后,使用酶标仪 测定吸光度,并根据标准曲线计算炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件进行处理, 计量资料以(x±s)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 高良姜素对 AD 大鼠学习记忆能力的影响 与假手术 组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长 (P<0.01),穿越平 台次数减少 (P<0.01),表明模型组大鼠学习和记忆功能 受损,AD 模型复制成功;与模型组比较,模型+高良姜素 组大鼠逃避潜伏期缩短 (P<0.01),穿越平台次数增加 (P<0.01),提示高良姜素能够提高 AD 大鼠学习和记忆功 能,见表1、图 1。

| 表1 高臣 | え姜素对 AD | 大鼠学习记忆能力的影响 | $(\overline{x}\pm s,$ | n = 10) |
|-------|---------|-------------|-----------------------|---------|
|-------|---------|-------------|-----------------------|---------|

| 相別        | 逃避潜伏期/s      |              |                            |                          |              | 容地亚ム波粉/波     |
|-----------|--------------|--------------|----------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| 组加        | 1 d          | 2 d          | 3 d                        | 4 d                      | 5 d          | 牙越十日伏如/伏     |
| 假手术组      | 72. 70±6. 21 | 56.14±5.70   | 39.66±3.13                 | 29.11±4.51               | 20.59±3.50   | 8.31±1.12    |
| 假手术+高良姜素组 | 74.25±6.64   | 55.75±6.11   | 37.38±5.25                 | 27.53±3.52               | 21.32±3.05   | 8.57±1.20    |
| 模型组       | 80.19±5.90   | 73.00±6.13** | 62. 65±2. 80 **            | 55. 79±4. 94 **          | 48.11±3.43** | 3.01±0.74 ** |
| 模型+高良姜素组  | 75.34±5.59   | 64.39±4.95   | 50. 67±4. 33 <sup>##</sup> | 39.78±3.80 <sup>##</sup> | 32.51±2.55## | 5.43±1.12##  |

注: 与假手术组比较,\*\* P<0.01; 与模型组比较,#\*P<0.01。



3.2 高良姜素对 AD 大鼠海马 CA1 区病理形态的影响 假 手术组海马 CA1 区神经元数量丰富,排列整齐,结构完整, 形态正常;模型组海马 CA1 区神经元数量减少,排列紊乱, 结构不完整,形态异常,如细胞体缩小、核固缩、染色质 边集等现象;模型+高良姜素组大鼠海马神经元丢失减少, 形态异常的神经元亦减少,见图 2。

3.3 高良姜素对 AD 大鼠海马区小胶质细胞和星形胶质细胞活化的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马区小胶



注:箭头所示为海马 CA1 区变性的神经元。

# 图 2 高良姜素对 AD 大鼠海马 CA1 区病理形态的 影响(HE 染色, ×200)

质细胞和星形胶质细胞活化数量增多(P<0.01),假手术+ 高良姜素组在小胶质细胞和星形胶质细胞活化水平上无明 显变化(P>0.05);与模型组比较,模型+高良姜素组大鼠 海马区小胶质细胞和星形胶质细胞活化数量均减少(P< 0.01),见图 3。





3.4 高良姜素对 AD 大鼠海马组织 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋 白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达升高 (*P*<0.01),假手术+高 良姜素组 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达无明显变化 (*P*>0.05);与模型组比较,模型+高良姜素组大鼠海马组 织 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达降低 (*P*<0.01),见 图 4。

3.5 高良姜素对 AD 大鼠海马组织炎症因子水平的影响 与 假手术组比较,模型组大鼠海马组织炎症因子 TNF-α、IL-1β和 IL-6 水平升高(P<0.01),假手术+高良姜素组 TNFα、IL-1β和 IL-6 水平无明显变化(P>0.05);与模型组比 较,模型+高良姜素组大鼠海马组织 TNF-α、IL-1β和 IL-6 水平降低(P<0.01),提示高良姜素能改善Aβ<sub>142</sub>诱导的炎 性损伤,见图 5。



注: A 为假手术组, B 为假手术+高良姜素组, C 为模型组, D 为模型+高良姜素组。与假手术组比较,\*\*P<0.01; 与模型组比较,\*\*P<0.01。 图 4 高良姜素对 AD 大鼠海马组织 TLR4 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响( $\bar{x}$ +s, n=5)

D

0

TLR4







## 4 讨论

AD 的核心病理特征包括 AB 沉积、Tau 蛋白异常磷酸 化及神经元丢失等。近年来研究发现, AD 患者脑内 Aβ 的 异常沉积不仅是疾病的早期事件,更是诱发持续性神经炎 症的触发器。这种神经炎症过程涉及小胶质细胞和星形胶 质细胞的过度活化,它们对 Aβ 沉积的响应导致补体系统的 激活和多种炎性细胞因子的释放,如 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等[10-12]。小胶质细胞的过度激活和炎症因子的释放不仅能 够直接损害神经元,还能通过促进 tau 蛋白的异常磷酸化, 加速神经纤维缠结的形成,进一步加剧神经退行性病 变<sup>[13]</sup>。因此,针对神经炎症的治疗策略在 AD 的防治中具 有重要潜力。

TLR4 作为先天免疫系统的重要成员,能够识别多种配 体,包括细菌脂多糖、热休克蛋白等,从而触发一系列信 号转导,引发炎症和免疫反应<sup>[14]</sup>。在生理状态下,TLR4 的激活是机体防御机制的关键一环,有助于清除病原体和 修复组织损伤。然而,在病理状态下,TLR4的过度激活或 异常调节可能导致一系列炎症性疾病<sup>[15]</sup>。在 AD 中, Aβ 的 持续沉积导致 TLR4 过度激活,引发小胶质细胞的过度反 应,并释放大量炎性细胞因子和趋化因子,这些物质不仅 加剧了脑内的炎症反应,还能对周围的神经元造成直接损 伤<sup>[16]</sup>。此外,活化的小胶质细胞通过分泌的 IL-1α、TNF-α 和补体成分1q,诱导A1型星形胶质细胞的产生。与正常 支持神经元的星形胶质细胞不同, A1 型星形胶质细胞失去 了对神经元的营养和支持功能,转而分泌一系列炎性因子, 进一步加剧神经元的损伤和凋亡<sup>[17]</sup>。这一过程中,TLR4 的激活进一步触发了其下游的 NF-κB 信号通路,激活后的 NF-κB进入细胞核,促进炎性细胞因子、趋化因子以及其

他炎症介质的基因转录和表达,从而加剧了神经炎症反应, 导致神经元损伤、突触丢失和认知功能障碍[18]。多项研究 表明, AD 患者和模型动物的脑组织中 TLR4 和 NF-κB 的表 达升高,且与疾病的严重程度和认知功能下降密切相关, 抑制 TLR4/NF-κB 通路的表达可以减轻 AD 认知功能障 碍<sup>[19]</sup>。与之前研究结果一致,本研究发现,大鼠海马内注 射凝聚态 Aβ149 可使小胶质细胞和星形胶质细胞异常活化, 上调 TLR4/NF-κB 信号通路的表达,从而促进炎症因子的 大量分泌。

p-NF-кВ p65

高良姜素作为一种从高良姜根茎中提取的天然黄酮 类化合物,因其丰富的生物活性而备受关注。近年来研 究发现, 高良姜素具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 能通过 增强胆碱能传递来改善大鼠空间记忆障碍[20]。本研究 发现,高良姜素能够改善 AD 大鼠的学习记忆能力。进 一步研究证实,高良姜素可以增强线粒体自噬改善AB 诱导的病理损伤<sup>[21]</sup>。本研究还发现,高良姜素能够抑制 小胶质细胞和星形胶质细胞的过度活化,降低 AD 大鼠 脑组织中 TLR 蛋白表达,进而抑制下游 NF-κB 信号通路 的激活,减少炎症因子的释放,从而改善 AD 大鼠的神 经炎症损伤。

综上所述,高良姜素可能通过调节 TLR4/NF-κB 信号 通路来改善 AD 大鼠的神经炎症损伤和学习记忆能力。这 一发现为 AD 的治疗提供了新的潜在药物候选者,并为进 一步的临床研究和机制探讨奠定了基础。

#### 参考文献.

- [1] Li F Y, Qin W, Zhu M, et al. Model-based projection of dementia prevalence in China and worldwide: 2020-2050 [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 82(4): 1823-1831.
- [2] Gotoh M, Miyamoto Y, Lkeshima-Kataoka H, et al. Astrocytic neuroimmunological roles interacting with miceoglial cells in neurodegenerative discases[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (2): 1599.
- [3] Xiao Y, Wang X F, Wang S Y, et al. Celastrol attenuates learning and memory deficits in an Alzheimer's disease rat model [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 5574207.
- [4] Deepali S. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflamm, 2022, 19(1): 206.
- [5] Bosco J R, Peng X Q, He Y Y, et al. Downregulation of

TREM2 expression exacerbates neuroinflammatory responses through TLR4 mediated MAPK signaling pathway in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Immunol*, 2022, 142; 22-36.

- [6] Yu C Y, Wang D, Yang Z B, et al. Pharmacological effects of polyphenol phytochemicals on the intestinal inflammation via targeting TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 6939.
- [7] He C X, Yu W J, Yang M, et al. Qi Fu Yin ameliorates neuroinflammation through inhibiting RAGE and TLR4/NF-κB pathway in AD model rats[J]. Aging, 2023, 15 (22): 13239-13264.
- [8] Hu G J, Jiang X Y, Du S Y, et al. miR-107-5p ameliorates neurological damage, oxidative stress, and immune responses in mice with Alzheimer's disease by suppressing the Toll-like receptor 4 (TLR4) /nuclear factor-kappaB (NF-κB) pathway[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2024, 40(2): 119-130.
- [9] Hasnat H, Shompa A S, Islam M M, et al. Flavonoids: a treasure house of prospective pharmacological potentials[J]. Heliyon, 2024, 10(6): e27533.
- [10] Perveen A, Alexiou A, Albadrani M G, et al. Neuroinflammatory signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Curr Neuropharmacol, 2024, 20(1): 126-146.
- [11] Ren W, Yan S X, Fan C J, et al. Effect of total flavonoids of Dracocephalum moldavica L. on neuroinflammation in Alzheimer's disease model amyloid-β (Aβ1-42) -peptideinduced astrocyte activation[J]. J Toxicol Environ Health A, 2024, 87(10): 436-447.
- [12] Raba L I, Hidayat T, Hannan J A, et al. Potential Alzheimer's disease drug targets identified through microglial biology

research[J]. Expert Opin Drug Discov, 2024, 19 (5): 587-602.

- [13] Chen H, Zeng Y, Wang D, et al. Neuroinflammation of microglial regulation in Alzheimer's disease: therapeutic approaches[J]. Molecules, 2024, 29(7): 1478.
- [14] Maria R C, Carmen R G, Carlos V, et al. Role of toll like receptor 4 in Alzheimer's disease[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1588.
- [15] Trotta T, Porro C, Calvello R, et al. Biological role of toll-like receptor-4 in the brain[J]. J Neuroimmunol, 2014, 268 (1-2): 1-12.
- [16] Wu L Y, Xian X H, Xu G Y, et al. Toll-like receptor 4: a promising therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. Mediat Inflamm, 2022, 2022: 7924199.
- [17] Liddelow S A, Guttenplan K A, Clarke L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [18] 宋宗胜,李 真,王 玉,等. 基于 Toll 样受体 4/核因子κB 信号通路探讨逆灸调控阿尔茨海默病大鼠小胶质细胞极 化的机制[J]. 针刺研究, 2023, 48 (6): 525-532.
- [19] Tezen D, Konukoglu D, MerveKurtuluş E, et al. Serum sirtuin-1, HMGB1-TLR4, NF-κB and IL-6 levels in Alzheimer's: the relation between neuroinflammatory pathway and severity of dementia[J]. Curr Alzheimer Res, 2023, 19(12): 841-848.
- [20] Kilic F S, Kaygisiz B, Aydin S, et al. The effects and mechanisms of the action of galangin on spatial memory in rats[J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 120(12): 881-886.
- [21] Zhang R, Lu J, Pei G, et al. Galangin rescues Alzheimer's amyloid-β induced mitophagy and brain organoid growth impairment[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3398.