

本文引用: 谭惠中, 刘竹暄, 唐洁, 谢乐, 张秀丽, 朱新华, 伍大华. 丹参多酚酸 B 通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路抑制 OGD 诱导海马神经元焦亡的分子机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 638–646.

丹参多酚酸 B 通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路抑制 OGD 诱导海马神经元焦亡的分子机制研究

谭惠中¹, 刘竹暄¹, 唐洁¹, 谢乐², 张秀丽¹, 朱新华³, 伍大华^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省中西医结合医院, 湖南长沙 410006;

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

〔摘要〕 **目的** 通过网络药理学和实验验证, 研究了丹参多酚酸 B(Sal B) 治疗 VD 的潜在分子机制。**方法** 采用网络药理学研究 Sal B 干预 VD 的潜在靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络及 GO 和 KEGG 通路富集分析获得相关靶点通路, 分子对接评估 Sal B 和靶点的相互作用力。CCK-8 法筛选 Sal B 给药浓度, 显微镜观察细胞形态, 酶标仪检测细胞上清中乳酸脱氢酶(LDH)释放率, ELISA 法测炎症因子, 免疫荧光检测 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)蛋白表达, Western blot 检测 NLRP3、凋亡相关蛋白样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)和消泡素 D(GSDMD)蛋白表达水平。**结果** 生物信息学分析获得 Sal B 干预 VD 靶点共 37 个, 网络药理学研究筛选到 Caspase-1、NLRP3、TNFR1 等核心靶基因, 并通过 KEGG 和 GO 富集到 NOD 样受体信号通路(NLRs)等可能涉及这些靶基因。体外实验采用经典的 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡途径进行。建立 OGD-诱导海马神经元焦亡模型, 发现 Sal B 能显著提高 OGD 后 HT22 细胞存活率($P<0.05$, $P<0.01$), 减轻细胞损伤, 减少 LDH 释放量($P<0.05$, $P<0.01$), 降低 OGD 损伤 HT22 细胞 IL-1 β 和 IL-18 水平($P<0.01$), 抑制 NLRP3 炎症小体激活, 并降低了 NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase-1、ASC 蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** Sal B 可能通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路抑制 OGD 诱导的海马神经元细胞焦亡, 为 Sal B 防治 VD 提供了实验依据。

〔关键词〕 血管性痴呆; 丹参多酚酸 B; 氧糖剥夺; 细胞焦亡; NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路; 网络药理学

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.008

Molecular mechanism of salvianolic acid B inhibiting OGD-induced pyroptosis of hippocampal neurons via NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

TAN Huizhong¹, LIU Zhuxuan¹, TANG Jie¹, XIE Le², ZHANG Xiuli¹, ZHU Xinhua³, WU Dahua^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the potential molecular mechanisms of salvianolic acid B (Sal B) in treating vascular dementia (VD) through network pharmacology and experimental verification. **Methods** Network pharmacology was used to identify the potential targets of Sal B intervention in VD. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed, followed by GO and KEGG pathway enrichment analyses to determine biologically relevant target pathways. Molecular docking was performed to evaluate the interaction between Sal B and its targets. The optimal concentration of Sal B was determined via CCK-8 assay,

〔收稿日期〕 2024-12-22

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82374441); 湖南省自然科学基金项目(2024JJ5317); 湖南省卫生健康委卫生科研课题(W20243137); 湖南省研究生科研创新项目(CX20230809)。

〔通信作者〕 * 伍大华, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, E-mail: 89304935@qq.com。

the cell morphology was observed under a microscope, and the release rate of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant was measured using a microplate reader. The levels of inflammatory factors were measured by ELISA, the protein expression of NLRP3 was examined by immunofluorescence, and the protein expression levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (Caspase-1), and GSDMD were checked by Western blot. **Results** A total of 37 targets for Sal B intervention in VD were obtained by bioinformatics analysis. Core target genes such as Caspase-1, NLRP3, and TNFR1 were screened by network pharmacology, and the pathways including the NOD-like receptors (NLRs) signaling pathway that may involve these target genes were identified through KEGG and GO analyses. In vitro experiments were performed using the classic NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway. The OGD-induced pyroptosis model of hippocampal neurons was established, and it was found that Sal B could significantly enhance the survival rate of HT22 cells after OGD ($P<0.05$, $P<0.01$), alleviate cell damage, reduce LDH release ($P<0.05$ or $P<0.01$), decrease the levels of IL-1 β and IL-18 in OGD-damaged HT22 cells ($P<0.01$), inhibit the activation of NLRP3 inflammasome, and reduce the protein expression levels of NLRP3, GSDMD-N, cleaved Caspase-1, and ASC ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Sal B may inhibit OGD-induced pyroptosis of hippocampal neurons through NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway, providing experimental evidence for preventing and treating VD with Sal B.

[**Keywords**] vascular dementia; salvianolic acid B; oxygen-glucose deprivation; pyroptosis; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway; network pharmacology

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是认知功能下降的常见原因,是第二大常见的痴呆类型^[1],约占全球痴呆病例的20%^[2],世界卫生组织已将VD的防治列为21世纪重点科研项目之一^[3-4]。然而,目前VD缺乏特异性治疗药物^[4],临床多用改善认知功能药物,但疗效欠佳。因此,探究VD发病机制,寻找新的治疗策略迫在眉睫。VD发病过程中涉及炎症反应和神经元损伤,中医理论认为VD发病与湿热和血瘀相互搏结为浊毒损伤脑络,这一病机演变和VD发病焦亡机制不谋而合。已有研究表明,细胞焦亡(pyroptosis)^[5]作为一种炎症性的程序性死亡方式与VD发生发展密切相关,特征为NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体的形成^[6]、半胱氨酸蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)^[7]和消皮素D(gasdermin D, GSDMD)^[8]的激活以及促炎细胞因子的释放。炎症介质的激活与中医学“火旺”所致炎症反应相似,“火旺”进一步化毒并耗气伤阴,气滞血瘀,日久火热瘀毒交织进一步加重血管损伤促进VD进展,因此,细胞焦亡可能成为VD潜在的治疗靶点^[9],靶向与焦亡相关的信号通路可能有助于减缓疾病进展。

丹参,作为一种传统活血中药,在《神农本草经》中列为上品药材,具有活血化瘀、凉血解毒等功效^[10]。现代研究表明,丹参具有抗炎抑菌、抗氧化、免疫调节、改善血液循环等功效^[11]。丹参多酚酸B(salvianolic acid B)作为丹参的主要活性成分,已被证实可

以通过抗炎、抗氧化等多种生物活性在神经系统疾病中具有显著的保护作用^[12],然而其对VD和神经元损伤的研究多集中于动物模型,而丹参多酚酸B可能通过凉血解毒减少炎症反应抑制火毒的产生,并通过活血化瘀促进火热瘀毒排出来减轻VD神经元损伤。MA等^[13]发现,丹参多酚酸B可能通过IGF-1/Akt途径显著改善VD模型大鼠的认知缺陷。对丹参多酚酸B在体外氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型中的作用机制探索相对较少,尤其对丹参多酚酸B如何通过细胞焦亡途径调控OGD诱导的海马神经元损伤模型中的分子机制尚不明确,而OGD模型可用于模拟VD中脑血管损伤和海马神经元损伤的病理机制^[14]。网络药理学作为一种新兴且有前景的算法程序,整合了丰富的生物信息学资源,有助于多层次、多维度揭示药物的多途径多靶点效应^[15]。因此,本研究旨在利用网络药理学、分子对接及体外实验验证,结合中医学“火热瘀毒”理论来研究丹参多酚酸B在VD中的多靶点效应和潜在作用机制,以期对丹参多酚酸B作为VD治疗新药物提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 药物

丹参多酚酸B(纯度>98%,购自上海源叶生物科技有限公司,20 mg,批号:B20261),将其粉末溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号:

D5879, 德国 Merck 公司)中,配制成 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,现配现用。

1.2 细胞与试剂

小鼠海马神经元 HT22 细胞(批号:CL-0697)、HT22 完全培养基(批号:CM-0697);DMEM/F12 无糖培养基(批号:PM150322)、0.25%胰蛋白酶(批号:PB180226)、磷酸缓冲盐液(phosphate buffered saline, PBS)(批号:PB180327)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号:164210)均购自武汉 Procell 公司;增强型 cell counting kit-8(CCK-8)(批号:E-CK-A362)、LDH 乳酸脱氢酶活性试剂盒(批号:E-BC-K046-S)、白细胞介素(interleukin, IL)-18 ELISA 试剂盒(批号:E-EL-M0730)、IL-1 β ELISA 试剂盒(批号:E-MSEL-M0003)均购自武汉 Elabscience 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒(批号:23229, 美国 Thermo 公司);cleaved-Caspase1 (批号:3866S, 美国 Cell Signaling Technology 公司);GSDMD-N 抗体(批号:ab215203, 美国 Abcam 公司);NLRP3 抗体(批号:20536-1-AP)、Caspase-1 抗体(批号:22915-1-AP)、ASC 抗体(批号:10500-1-AP)、GSDMD(批号:20770-1-AP)、HRP-山羊抗兔 IgG(批号:SA00001-2)、HRP-羊抗小鼠二抗(批号:HRP-67762)均购自武汉 Proteintech 公司。

1.3 仪器

Steri-Cycle™ i160 CO₂ 型细胞培养箱、3140 CO₂ Incubator 型三气培养箱、PIKOREAL96 型荧光酶标仪、Sorvall ST8R 型低温高速离心机均产自美国 Thermo Fisher 公司;Axiovert 200 倒置荧光显微镜(德国蔡司公司);Gel Doc XR+型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);CKX53 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 网络药理学分析及分子对接

2.1 丹参多酚酸 B 药物靶点预测

以“Salvianolic acid B”为关键词,在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中,检索获得丹参多酚酸 B 药物结构,下载丹参多酚酸 B 的 SMILES 或 3D 化学结构式(SDF)(药物靶点从 3 个数据源收集;SwissTarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), Genecards (<https://www.genecards.org/>), ChemBL(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)3 个数据库筛选出 571

个药物作用靶点,删除重复项后,UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将所有靶标转换为基因名称。

2.2 疾病靶点搜集

以“Vascular dementia”为关键词,检索 GEO 数据库,根据数据集提供的相关信息,获得所需芯片 GSE122063。采用 R 语言“limma”包对 GSE122063 进行差异分析,获取 VD 差异基因。

2.3 丹参多酚酸 B 干预 VD 交集靶点的获取

整合“2.1、2.2”项数据,使用 R 语言分析数据两组之间的共有部分,用 VennDiagram 包对结果进行可视化,获得丹参多酚酸 B 干预 VD 交集靶点。

2.4 丹参多酚酸 B 干预 VD 靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建

通过 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库对丹参多酚酸 B 干预 VD 靶点进行 PPI 分析,数据导出 TSV 文件,采用 Cytoscape 3.9.1 绘制及网络拓扑学分析。

2.5 基因本体(gene ontology, GO)富集与京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析

采用 R 语言 clusterProfiler、org.Hs.eg.db 包,对丹参多酚酸 B 干预靶点进行 GO、KEGG 富集分析,了解丹参多酚酸 B 干预 VD 靶点的生物进程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)及 KEGG 通路,分析丹参多酚酸 B 干预 VD 潜在作用机制。

2.6 实验验证

2.6.1 细胞培养 将 HT22 细胞接种于含 5 mL 完全培养基(10%FBS+1%青链霉素混合液+89%DMEM 培养基)的 T25 细胞培养瓶中,置于 37%、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养,取对数生长期细胞进行后续实验。

2.6.2 氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)模型的构建及处理 待细胞融合度达到 50%~60%时,将 HT22 细胞随机分为对照组、氧糖剥夺模型组(模型组)、丹参多酚酸 B 组(丹参多酚酸 B 组),对照组在常氧培养箱培养仅做换液处理,模型组于造模前弃去完全培养基,用 PBS 冲洗 2 次,更换为 DMEM 无糖培养液,丹参多酚酸 B 组用不同浓度处理 24 h 与模型组置于无氧环境(94%N₂+5%CO₂+1% O₂)37 $^{\circ}\text{C}$ 三气培养箱中培养 4 h^[6]。

2.6.3 CCK-8 检测细胞活力 取对数生长期 HT22 细胞种于 96 孔板中(1×10^4 个/孔)。细胞贴壁良好后,对照组在常氧培养箱培养仅做换液处理,模型组于造模前弃去完全培养基,用 PBS 冲洗 2 次,更换为 DMEM 无糖培养液,丹参多酚酸 B 组用不同浓度($0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 24 h 与模型组置于无氧环境($94\% \text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2 + 1\% \text{O}_2$) 37°C 三气培养箱中培养 4 h。随后,去除培养基,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 溶液,继续孵育 30 min,在 450 nm 处测量吸光度(A)确定细胞活力。细胞存活率 $= (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

2.6.4 LDH 释放检测 收集细胞到离心管中,离心后弃上清,按说明书比例裂解细胞离心后取上清,将样品和不同浓度标准品分别加入相应试管轻轻摇晃混匀, 37°C 水浴 15 min。 450 nm 处检测吸光度(A),计算 LDH 释放量。

2.6.5 ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-1 β 和 IL-18 含量 离心后收集各组细胞上清,按 ELISA 试剂盒说明书操作,将样品和不同浓度标准品($100 \mu\text{L}$ /孔)加入相应孔室温孵育 2 h,洗板后加生物素化抗体室温孵育后洗涤加入过氧化物酶标记显影,室温避光孵育 20 min,加终止液摇匀后置酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A),计算 IL-1 β 、IL-18 含量。

2.6.6 免疫荧光法检测 NLRP3 蛋白表达 将细胞爬片放入 24 孔板,每孔加入 1 mL 细胞悬液,密度为 2×10^4 个/孔放入培养箱培养 24 h。细胞处理同“2.6.2”项,造模成功后弃去培养上清,PBS 润洗 3 次后,用 4%多聚甲醛固定爬片 10 min,PBS 洗 3 次后用 0.5% TritonX-100 通透 10 min,山羊血清封闭 30 min。加入稀释后的 NLRP3(1:200)一抗湿盒孵育 4°C 过夜。加入稀释的荧光二抗室温孵育 1 h。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,封片后荧光显微镜下采集图像。

2.6.7 Western blot 检测通路和细胞焦亡相关蛋白表达 根据实验分组处理细胞后,胰酶消化后收集细胞,加入裂解液裂解离心后收集上清提取蛋白。BCA 法定量后 SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗 3 次, 4°C 一抗孵育过夜,按说明书抗体稀释比例为 NLRP3 抗体(1:1 000)、Caspase-1/cleaved-Caspase-1 抗体(1:1 500)、GSDMD/

GSDMD-N 抗体(1:1 500)、ASC 抗体(1:1 500)、 β -actin(1:5 000)。次日将膜漂洗 3 次后二抗(1:2 000)孵育 2 h,显影后凝胶成像仪器检测,通过 Image J 进行灰度值分析。

2.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 9.3.0 进行统计分析。所有数据均使用单向方差分析检验进行分析,然后进行 *Dunnnett* 多重比较检验。数据表示“ $\bar{x} \pm s$ ”。统计显著性设定为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 丹参多酚酸 B 的潜在靶点

整合 3 个数据库结果使用 SwissTarget、GeneCards、ChEMBL 数据库,使用 UniProt 将所有靶标转换为基因名称,去除重复项后共预测丹参多酚酸 B 潜在靶点 571 个。

3.2 VD 的差异基因(differentially expressed genes, DEGs)

采用 limma 包进行差异分析,以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 为条件筛选差异基因。GSE122063 中筛选出 1 342 个差异基因(图 1B),其中 541 个差异基因在 VD 样本中表达下调,801 个差异基因在 VD 样本中表达上调。

3.3 丹参多酚酸 B 对 VD 的作用靶点

采用 R 语言分析丹参多酚酸 B 和 VD 共有靶点,VennDiagram 包对结果进行可视化(图 1C),获得丹参多酚酸 B 干预靶点共 37 个。

3.4 丹参多酚酸 B 干预 VD 靶点网络药理学

使用 Cytoscape 3.9.1 构建了共表达 PPI 网络,其中包括 37 个交集靶点和 198 条边组成的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,度值越大,节点越大,蛋白质相互作用越密切,其中,关系最强的为 IL-1 β 、TNF α -1、IGF1R、EDN1、Caspase-1、NLRP3(图 2A)。GO 富集分析得到 BP 条目 704 条 CC 相关条目 28 条,MF 相关条目 74 条,将前 10 条进行可视化(图 2B)。丹参多酚酸 B 干预靶点的生物过程主要涉及参与免疫反应的细胞因子、G 蛋白偶联受体信号通路、对活性氧的反应、蛋白磷酸化、细胞分泌的负向调节等,细胞成分包括血小板 α 颗粒、炎症小体复合物、肥大细胞颗粒、分泌颗粒管腔、细胞质囊腔等,分子功能包括儿茶酚胺

结合、氧结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等。KEGG 富集 24 条通路,由 52 个靶点 130 条边组成,关系最强的为 NOD 样受体信号通路等(图 2C)。NOD 受体信号通路关键功能是通过炎症小体的组装,NLRP3 受体激活后,与凋亡相关斑点样蛋白(apop-

tosis-associated speck-like protein containing card, ASC)和 Caspase-1 结合形成多蛋白复合物,激活下游 Caspase-1,切割并释放炎症因子如 IL-1 β 和 IL-18,引发炎症反应,同时激活 GSDMD 导致细胞焦亡。因此,结合 PPI 和富集分析结果,细胞焦亡经典

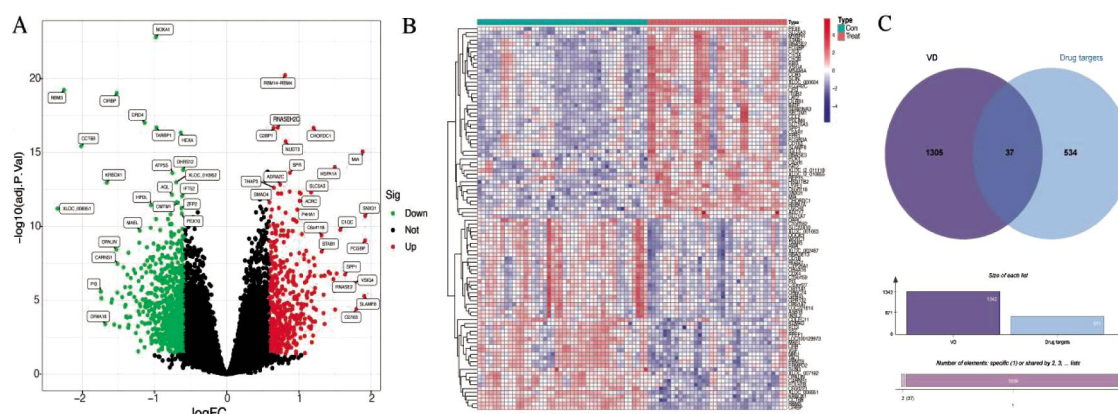


图 1 丹参多酚酸 B 干预靶点的获取

Fig.1 Acquisition of salvianolic acid B intervention targets

注:A.GSE122063 差异分析火山图;B.GSE122063 差异分析热图;C.GSE122063VD 差异基因靶点和丹参多酚酸 B 靶点交集韦恩图。

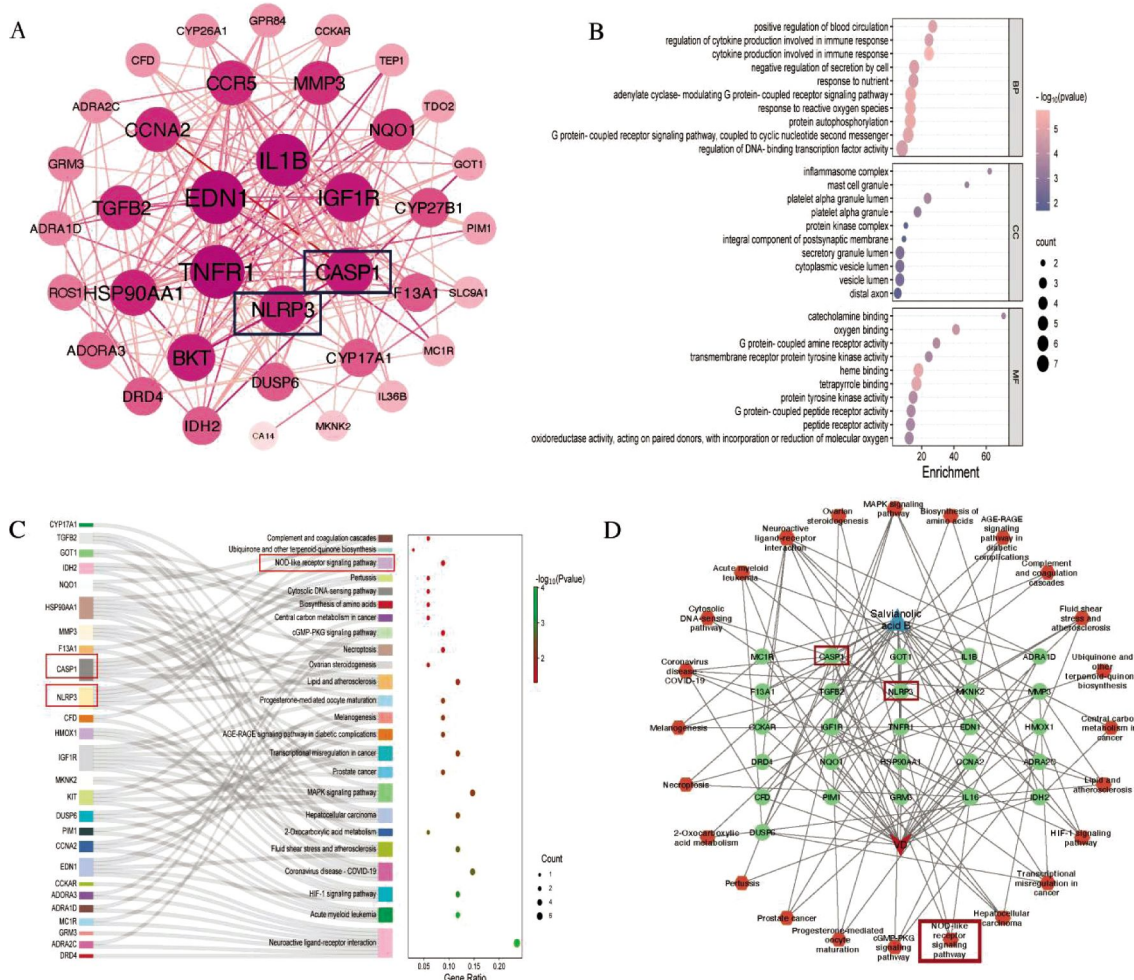


图 2 丹参多酚酸 B 干预 VD 的网络药理学研究

Fig.2 Network pharmacological study of salvianolic acid B intervention in VD

注:A.37 个丹参多酚酸 B 干预靶点蛋白质-蛋白质相互作用网络;B.GO 富集分析;C.KEGG 通路分析;D.丹参多酚酸 B 靶点通路图。

途径 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路可能为丹参多酚酸 B 干预 VD 海马神经元的关键途径(图2D)。

3.5 丹参多酚酸 B 对 OGD 损伤 HT22 细胞给药浓度的筛选

与对照组相比,模型组细胞活力降低($P<0.01$);与模型组比较,不同浓度丹参多酚酸 B($0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 OGD 损伤 HT22 细胞,细胞活力有明显恢复,其中 $2.5, 5, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 随药物浓度增加,HT22 细胞存活率提高显著,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),故以这 3 个浓度为给药浓度组。详见图 3。

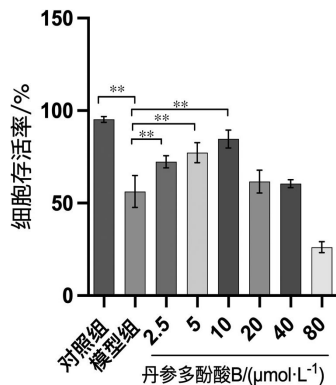


图3 CCK-8 筛选丹参多酚酸 B 最适给药浓度($\bar{x}\pm s, n=4$)

Fig.3 CCK-8 assay for screening the optimal drug concentration of salvianolic acid B ($\bar{x}\pm s, n=4$)

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.6 丹参多酚酸 B 对 OGD 损伤的 HT22 细胞 LDH 释放量及炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响

细胞缺氧后,焦亡发生,膜完整性破坏,LDH 和炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 被释放到细胞外,水平升高。与对照组相比,OGD 模型组 HT22 细胞上清 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,丹参多酚酸 B 组($2.5, 5, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)上清中 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 4。

3.7 丹参多酚酸 B 对 OGD 损伤 HT22 细胞 NLRP3 蛋白表达的影响

免疫荧光染色结果显示,和对照组比较,OGD 模型组细胞中 NLRP3 荧光强度显著增高($P<0.01$);与模型组比较,各浓度丹参多酚酸 B 给药组细胞 NLRP3 荧光强度明显降低($P<0.05, P<0.01$), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 降丹参多酚酸 B 组低最明显($P<0.01$)。详见图 5。

3.8 丹参多酚酸 B 调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导 OGD 损伤 HT22 细胞焦亡

与对照组比较,模型组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 蛋白表达升高($P<0.01$);与模型组比较,丹参多酚酸 B 显著抑制了这些焦亡相关蛋白的表达($P<0.05, P<0.01$)。详见图 6。

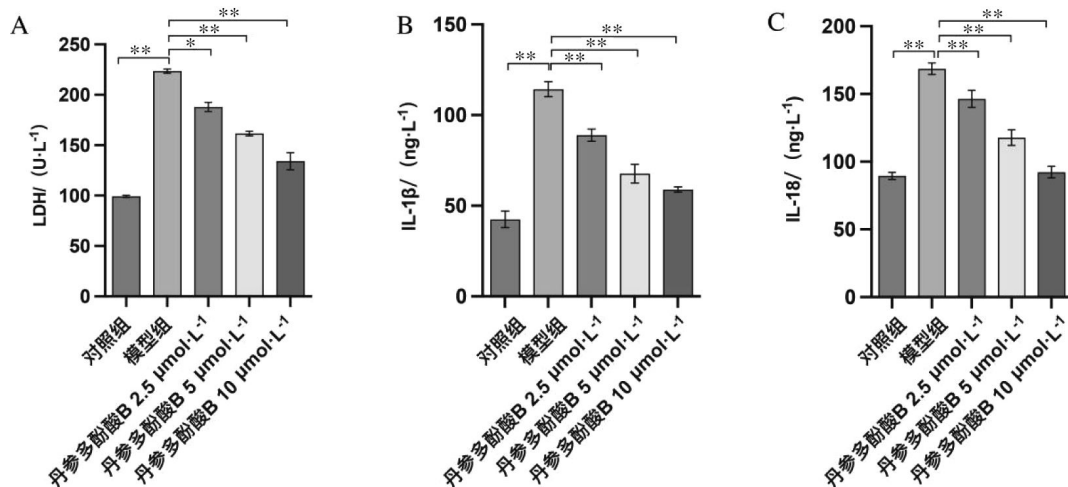


图4 丹参多酚酸 B 对氧糖剥夺(OGD)损伤 HT22 细胞 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.4 Effects of salvianolic acid B on LDH, IL-1 β , and IL-18 levels in OGD-damaged HT22 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:A.乳酸脱氢酶(LDH)释放水平;B.IL-1 β 水平;C.IL-18 水平。与对照组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ** $P<0.01$ 或 * $P<0.05$ 。

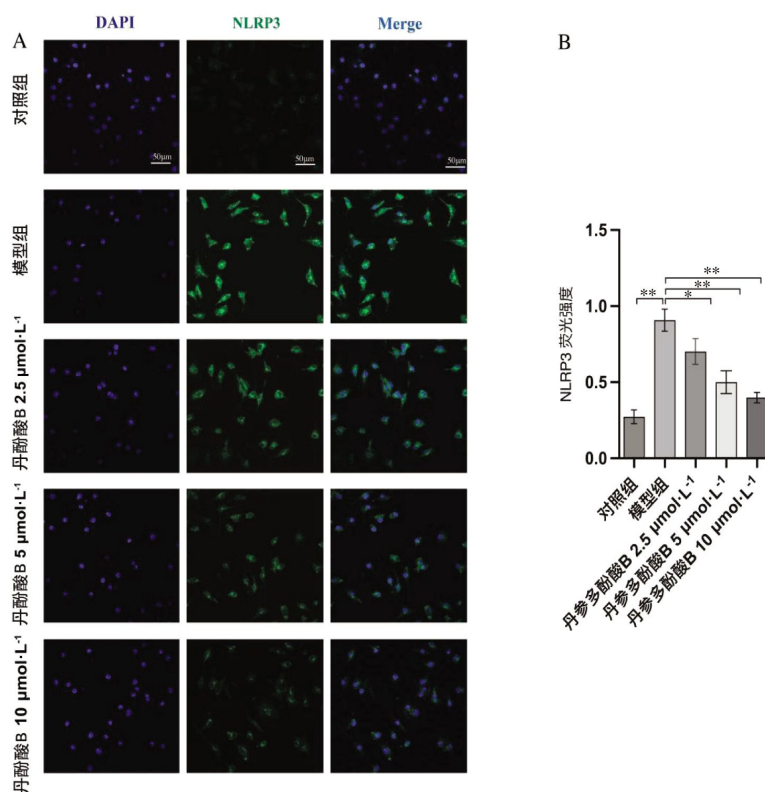


图 5 丹参多酚酸B 对各组细胞 NLRP3 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Effects of salvianolic acid B on NLRP3 expression in different groups of cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.免疫荧光染色观察 NLRP3 在不同处理组的表达情况,比例尺=50 μm;B.NLRP3 荧光强度的定量分析结果。与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 或 * $P<0.05$ 。

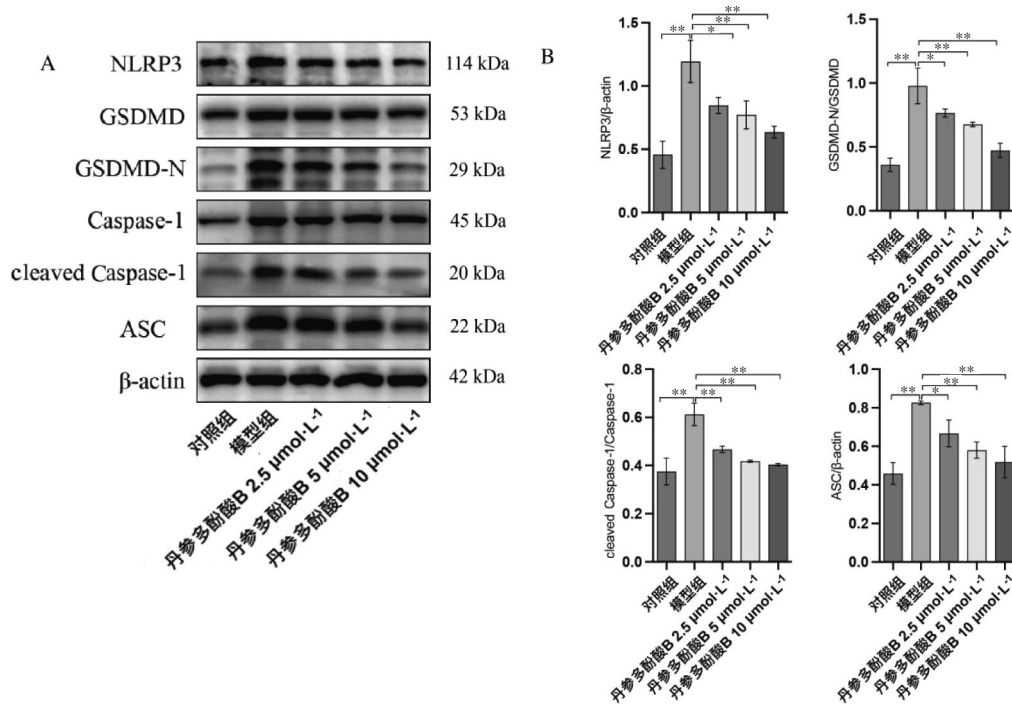


图 6 丹参多酚酸 B 对各组细胞内 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 及 ASC 蛋白表达和影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Effects of salvianolic acid B on protein expressions of NLRP3, GSDMD, Caspase-1, and ASC in different groups of cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A. Western blot 分析不同处理组 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1、ASC 和 β-actin 蛋白的表达情况;B.相应蛋白表达的定量分析。与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 或 * $P<0.05$ 。

4 讨论

本研究基于前期课题组研究成果,进一步探讨了丹参主要活性成分丹参多酚酸 B 在 VD 中的潜在作用机制。此前我们发现,滋肾活血方可通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡,保护 VD 模型大鼠神经血管单元,减少神经元损伤^[17]。丹参作为方中核心药物,其主要成分丹参多酚酸 B 是否也能通过相同通路发挥作用,尚缺乏机制层面的验证。VD 发病率逐年升高,国内患病率约为 0.96%^[18],虽是目前唯一可防治的痴呆类型,但缺乏特异性治疗药物,临床疗效有限^[19]。中医药以其多靶点、多通路的特点在 VD 早期防治中展现出独特优势^[20]。丹参多酚酸 B 具有清热凉血、活血化瘀等药理作用,研究表明其在抗氧化、抗炎及抑制神经元凋亡方面表现出良好潜能^[21]。

本研究通过生物信息学与网络药理学方法,筛选出丹参多酚酸 B 干预 VD 的关键靶点。GSE122063 数据分析鉴定出 1 342 个差异基因,与丹参多酚酸 B 作用靶点交集后获得 37 个共同靶点,PPI 分析进一步锁定 Caspase-1、NLRP3、TNFR1 等核心节点。GO 和 KEGG 富集分析提示,丹参多酚酸 B 可能通过参与免疫炎症反应、NOD 样受体信号通路等机制发挥调控作用,尤其 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路在调控细胞焦亡和神经炎症中发挥关键作用^[22-23]。

体外实验证实,丹参多酚酸 B 浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能显著提高 OGD 模型细胞存活率。但是否与焦亡途径相关需要进一步验证,焦亡与细胞坏死、凋亡途径不同,主要通过激活 NLRP3 炎症小体及其相关蛋白(ASC、Caspase-1)实现^[24-25]。激活的 NLRP3 与 ASC、Caspase-1 组装成大分子炎症复合体,启动 Caspase-1 切割并活化,释放促炎因子如 IL-1 β 、IL-18,并激活 GSDMD 引起细胞膜孔化,最终导致细胞焦亡^[26-28]。Western blot 与免疫荧光检测显示,丹参多酚酸 B 显著下调 NLRP3、ASC、Caspase-1 及其下游分子 GSDMD 的表达,抑制炎症小体激活,减少 IL-1 β 、IL-18 等促炎因子的释放,减轻细胞焦亡与炎症反应,从而保护海马神经元免受损伤。

综上,丹参多酚酸 B 可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的细胞焦亡,减轻 OGD 诱导的神经元损伤,为 VD 的防治提供了新的研究方向和理论依据。后续研究将进一步探索其在体内模型中的药效及代谢特性,为 VD 的防治和药物研发提供新视角。

参考文献

- [1] KALARIA R N. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathologica*, 2016, 131(5): 659-685.
- [2] WOLTERS F J, ARFAN IKRAM M. Epidemiology of vascular dementia[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2019, 39(8): 1542-1549.
- [3] KUANG H, ZHOU Z F, ZHU Y G, et al. Pharmacological treatment of vascular dementia: A molecular mechanism perspective[J]. *Aging and Disease*, 2021, 12(1): 308-326.
- [4] YI YANLAN, XIONG YU, CAO XIAO, et al. An overview of the treatment of vascular dementia with Buyang Huanwu Decoction[J]. *Chinese Ethnic and Folk Medicine*, 2020, 29(17): 76-79.
- [5] RAO Z P, ZHU Y T, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer[J]. *Theranostics*, 12(9): 4310-4329.
- [6] LI Z, GUO J L, BI L Q. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 130: 110542.
- [7] LI J, HAO J H, YAO D, et al. Caspase-1 inhibition prevents neuronal death by targeting the canonical inflammasome pathway of pyroptosis in a murine model of cerebral ischemia[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2020, 26(9): 925-939.
- [8] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [9] LYU Z K, CHAN Y J, LI Q Y, et al. Destructive effects of pyroptosis on homeostasis of neuron survival associated with the dysfunctional BBB-glymphatic system and amyloid-beta accumulation after cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. *Neural Plasticity*, 2021, 2021: 4504363.
- [10] MEIM X D, CAO Y F, CHE Y Y, et al. Danshen: A phytochemical and pharmacological overview[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2019, 17(1): 59-80.
- [11] PENG K Y, GU J F, SU S L, et al. Salvia miltiorrhiza stems and leaves total phenolic acids combination with tanshinone protect against DSS-induced ulcerative colitis through inhibiting TLR4/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in mice[J]. *Journal of*

- Ethnopharmacology, 2021, 264: 113052.
- [12] ZHENG X F, ZHANG X J, DONG L P, et al. Neuroprotective mechanism of salvianolic acid B against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice through downregulation of TLR4, p-p38MAPK, p-JNK, NF- κ B, and IL-1 β [J]. Immunity, Inflammation and Disease, 2023, 11(10): e1030.
- [13] MA X W, XU W W, ZHANG Z X, et al. Salvianolic acid B ameliorates cognitive deficits through IGF-1/Akt pathway in rats with vascular dementia[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 43(4): 1381-1391.
- [14] ZHONG Y, LUO L Y. Exosomes from Human Umbilical Vein Endothelial Cells Ameliorate Ischemic Injuries by Suppressing the RNA Component of Mitochondrial RNA-processing Endoribonuclease via the Induction of miR-206/miR-1-3p Levels[J]. Neuroscience, 2021, 476: 34-44.
- [15] SU Y, CHEN L, YANG J. Network pharmacology and *in vitro* experiments reveal sophoridine-induced apoptosis and G₁ phase arrest *via* ROS-dependent PI3K/Akt/FoxO3a pathway activation in human bladder cancer cells[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2024, 103(2): e14476.
- [16] JIANG H L, ASHRAF G M, LIU M M, et al. Tiliarin ameliorates cognitive dysfunction and neuronal damage in rats with vascular dementia via p-CaMKII/ERK/CREB and ox-CaMKII-dependent MAPK/NF- κ B pathways[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 6673967.
- [17] YAO T, XIE L, XIE Y, et al. Protective effects of Zishen Huoxue recipe against neuronal injury in the neurovascular unit of rats with vascular dementia by interfering with inflammatory cascade-induced pyroptosis[J]. Neuropeptides, 2023, 102: 102358.
- [18] JIA J P, ZHOU A H, WEI C B, et al. The prevalence of mild cognitive impairment and its etiological subtypes in elderly Chinese[J]. Alzheimer's & Dementia, 2014, 10(4): 439-447.
- [19] BARRINGTON J, LEMARCHAND E, ALLAN S M. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology?[J]. Brain Pathology, 2017, 27(2): 205-212.
- [20] YANG YUANYUAN, NI JINXIA, WANG DI, et al. Research Progress on the Mechanisms of Danshen and Its Active Components in the Treatment of Vascular Dementia[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2023, 16(7): 1475-1481.
- [21] PANG Y, ZHANG P C, LU R R, et al. Andrade-Oliveira salvianolic acid B modulates caspase-1-mediated pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury via Nrf2 pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 541426.
- [22] SINHA K, SUN C C, KAMARI R, et al. Current status and future prospects of pathophysiology-based neuroprotective drugs for the treatment of vascular dementia[J]. Drug Discovery Today, 2020, 25(4): 793-799.
- [23] TSUCHIYA K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications[J]. Microbiology and Immunology, 2020, 64(4): 252-269.
- [24] ZHANG Q L, FAN Z J, XUE W, et al. Vitexin regulates Epac and NLRP3 and ameliorates chronic cerebral hypoperfusion injury[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2021, 99(10): 1079-1087.
- [25] SUN L B, MA W, GAO W L, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(8): 542.
- [26] KOVACS S B, MIAO E A. Gasdermins: Effectors of pyroptosis[J]. Trends in Cell Biology, 2017, 27(9): 673-684.
- [27] LU H J, ZHANG S Z, WU J, et al. Molecular targeted therapies elicit concurrent apoptotic and GSDME-dependent pyroptotic tumor cell death[J]. Clinical Cancer Research, 2018, 24(23): 6066-6077.
- [28] LI Y, JIANG Q Z. Uncoupled pyroptosis and IL-1 β secretion downstream of inflammasome signaling[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1128358.

(本文编辑 苏 维)