

·基础研究·

运动训练抑制NLRP3介导的小胶质细胞焦亡改善阿尔茨海默病小鼠焦虑样行为和认知障碍的作用与机制研究*

李莉莉¹ 李明月¹ 何小飞¹ 张丽颖¹ 胡昔权^{1,2}

摘要

目的:探讨运动训练改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)情绪和认知功能的作用,及NLRP3[NACHT-, LRR, and pyrin(PYD)-domain-containing protein 3]炎症小体介导的小胶质细胞焦亡的参与机制。

方法:选取10只5月龄的雄性5xFAD小鼠为AD模型,分为对照组和运动训练组,选取年龄匹配的C57/BL6小鼠为野生型(wild type, WT)组。WT组和对照组小鼠在普通饲养笼里饲养,运动训练组小鼠在装配有跑轮的笼子里饲养,小鼠可以自由跑步训练。采用旷场试验检测小鼠的情绪功能, Morris水迷宫试验检测小鼠的空间认知功能,免疫荧光染色检测神经元存活、淀粉样斑块沉积和小胶质细胞激活,以及小胶质细胞溶酶体的聚集和焦亡相关蛋白(GSDMD)的表达情况。通过Western Blot实验检测小鼠促炎因子、抑炎因子、GSDMD蛋白的表达。

结果:在旷场试验中,与WT组小鼠相比,5xFAD对照组小鼠在中心区域停留的时间显著缩短,而5xFAD运动训练组小鼠在中心区域停留的时间较对照组显著延长。在Morris水迷宫训练期间,WT组和5xFAD运动训练组小鼠到达平台的潜伏期逐渐缩短,而5xFAD对照组小鼠到达平台的时间无明显变化。在空间探索实验中,5xFAD对照组小鼠穿越平台的次数比WT组显著减少,而5xFAD运动训练组小鼠较对照组显著增加。5xFAD运动训练组小鼠皮质和海马的神经元数量较对照组显著增加,而A β 1-42斑块所占面积显著减小。5xFAD对照组小鼠A β 淀粉样斑块周围可见明显的溶酶体相关膜蛋白1抗体(Lysosomal associated membrane protein 1, Lamp1)聚集,而运动训练小鼠的Lamp1荧光强度较对照组显著减少。Western Blot结果显示,5xFAD对照组小鼠皮质和海马的Lamp1和(Cathepsin B, CtsB)的表达比WT组小鼠显著增加,而运动训练可降低5xFAD小鼠皮质和海马的Lamp1和CtsB的表达。5xFAD对照组小鼠皮质和海马的促炎因子的表达较WT组小鼠显著增加,运动训练可减少5xFAD小鼠皮质和海马促炎因子的表达,增加抑炎因子的表达。与WT小鼠比较,5xFAD对照组小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白的表达显著增加,而运动训练可降低5xFAD小鼠GSDMD的表达,且GSDMD蛋白与Iba-1阳性小胶质细胞共定位。

结论:运动训练通过抑制NLRP3介导的小胶质细胞焦亡改善阿尔茨海默病情绪和认知功能。

关键词 阿尔茨海默病;认知康复;运动训练;小胶质细胞;焦亡;NLRP3

中图分类号:R493, R749.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2025)-09-1298-10

Protective effects of exercise training on emotional and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease mice: the involvement of NLRP3 mediated microglial pyroptosis/LI Lili, LI Mingyue, HE Xiaofei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2025, 40(9): 1298—1307

Abstract

Objective: To investigate the protective effect of exercise training on emotional and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease (AD), as well as the involvement of NLRP3 mediated microglial pyroptosis.

Method: Male 5xFAD mice at the age of 5 months were randomly divided into control and physical exer-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2025.09.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(82272609);中山大学青年教师培育项目(82000-31610009)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广东省广州市,510630; 2 通讯作者

第一作者简介:李莉莉,女,博士,主治医师;收稿日期:2024-08-19

1298 www.rehab.com.cn

cise, (PE) groups. Age-matched C57/BL6 mice were used as wild type (WT) group. The mice in the WT and the control groups were fed in a common cage, while the mice in the PE group were fed in a cage equipped with a running wheel, in which mice were freely to run. Open field test was used to detect the emotional function, the Morris water maze test was used to detect the spatial cognitive function, and immunofluorescence staining was used to detect the neuronal survival, Amyloid beta (A β) plaque deposition, the microglial activation, the aggregation of microglial lysosomes and the expression of GSDMD, which is related to pyroptosis. The expression of inflammatory cytokines, proinflammatory cytokines and GSDMD protein were detected by Western Blots.

Result: In open field test, when comparing with WT group, the time spent in the central area was significantly shortened in the control-5xFAD group, which was significantly extended in the PE-5xFAD group. During the Morris water maze training period, the latencies of mice in the WT and PE-5xFAD groups to the platform were gradually decreased, while there was no significant differences in the control-5xFAD group. During the probe trial test, the times crossing the platform in the control-5xFAD group was significantly reduced compared with that in the WT group, while which was significantly increased in the PE-5xFAD mice. The number of neurons in the PE-5xFAD group was significantly increased in cortex and hippocampus compared with those in the control-5xFAD group, while A β 1-42 plaques were significantly decreased in the PE-5xFAD group. Compared with the WT group. In addition, the lysosomal associated membrane protein-1 (Lamp1) was obviously detected around the A β plaques in the control-5xFAD group. However, physical exercise significantly reduced the expressions of Lamp1 and CtsB in the cortex and hippocampus of 5xFAD mice. In the control-5xFAD group, the proinflammatory cytokines were significantly increased in cortex and hippocampus when compared with the WT mice, while PE decreased the expression of proinflammatory cytokines and increased the expression of anti-inflammatory cytokine. When compared with the WT mice, the 5xFAD mice exhibited a significantly increased expression of GSDMD protein in cortex and hippocampus, while PE decreased the expression of GSDMD protein. Moreover, GSDMD protein was co-localized with Iba-1-positive microglia.

Conclusion: Physical exercise improves cognitive function in Alzheimer's disease by inhibiting NLRP3-mediated microglial pyroptosis.

Author's address Department of Rehabilitation, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, 510630

Key word Alzheimer's disease; cognitive rehabilitation; physical exercise; microglia; pyroptosis; NLRP3

根据《中国阿尔茨海默病报告2024》显示,我国现存的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)及其他痴呆患病人数为1699万例,已是中国城乡居民中排名第五的死因。AD是最常见的痴呆类型,以进行性认知障碍为主要临床特征。另外,70%—80%的AD患者合并有精神行为症状,最常见的是激越/攻击、易怒、抑郁和焦虑^[1]。其中,焦虑症状与日常生活能力障碍和其他行为障碍显著相关^[2]。随着AD患病人数的增加,我国公众健康和社会可持续发展受到严重影响,给患者、家庭和社会带来了沉重的精神和经济负担^[3]。然而,目前用于AD治疗的药物只能改善症状,不能延缓疾病的进展,当前AD认知障碍的康复治疗是医学研究领域亟待解决的科

学热点和难点。

运动训练是常用的康复治疗手段,可以减少A β 沉积、增加脑血流量、增加老年患者海马体积、促进神经网络连接,有效改善认知功能^[4-6]。然而,运动训练改善AD认知功能的分子机制,尚未明确。神经炎症在神经退行性疾病的病理过程中起着重要作用,炎症小体是存在于免疫细胞的病原识别受体复合物,对炎症的产生有关键作用,凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3[NACHT-, LRR-, and pyrin (PYD)-domain-containing protein 3, NLRP3]及pro-caspase-1共同组成NLRP3炎症小体,是目前研究最多的炎症小体,在AD疾病进

程发挥重要作用^[7]。本研究旨在研究运动训练改善阿尔茨海默病情绪与认知功能的作用及NLRP3炎症小体的参与机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本研究经广州吉尼欧生物实验动物管理与使用委员会批准(编号:JENNIO-IACUC-2022-A012),5xFAD小鼠购买自Jackson实验室(货号:#034848),广州吉尼欧生物科技有限公司饲养并繁殖。将SPF级5月龄雄性小鼠5xFAD雄性小鼠(25—30g)随机分为对照组(control-5xFAD)和运动训练组(physical exercise, PE),阴性对照小鼠为野生型SPF级小鼠(wild type, WT)。将小鼠置于12:12h的明暗循环下(07:00—19:00亮灯),控制温度和湿度,随意提供食物和水。将WT组和对照组5xFAD组小鼠饲养在普通聚丙烯笼(36cm×20cm×14cm)中饲养,而运动训练组小鼠在相同尺寸的聚丙烯笼中饲养,笼内安装直径16cm的跑轮,当小鼠爬上跑轮时,跑轮可旋转,小鼠在上述条件下饲养3个月。所有动物实验程序都遵循动物伦理委员会制定的规则。

1.2 行为学检测

旷场试验:用于检测焦虑和探索活动^[8]。

Morris水迷宫:采用Morris水迷宫测试小鼠的空间学习记忆能力。水迷宫装置由一个带有头顶摄像机的圆柱形桶和自动化软件组成(欣欣科技有限公司,上海)。浴缸直径120cm,高50cm,将浴盆分为四个象限,以每个象限中心的端点作为小鼠的入口点,在其中一个象限的中心放置一个直径10cm的白色圆形平台(目标象限),该平台位于水面以下1cm处。在水迷宫训练中,将小鼠面朝浴缸壁置于水中,每天四象限,连续5天。摄像头记录了游泳轨迹图,并记录到达平台的时间,称为逃避延迟,最长可达60s。小鼠若在60s内未能到达平台,则被引导到平台上,并在平台上停留3s。第6天取出平台,进行60s的探索试验,通过Visual track分析系统记录小鼠的游泳轨迹数据,并进行指标提取和分析,记录并分析其游泳速度、穿越目标区域(原平台)次数。

1.3 免疫荧光染色

行为学检测结束后,用浓度为1%的戊巴比妥钠

对小鼠进行深度麻醉,然后经心灌注50ml的0.9%生理盐水。取出左侧脑组织,分离皮质与海马,置于液氮中速冻,后置于-80℃冰箱,用于Western Blot实验。取出右侧脑组织,4%(w/v)的多聚甲醛中浸泡固定过夜,然后用20%和30%蔗糖进行梯度脱水,直至完全沉淀。随后,用最佳切割温度复合物包埋脑样品,并使用冷冻切片机(Leica CM 1950, Leica Biosystem, 海德堡, 德国)进行连续冰冻切片,10μm/片,玻片保存在-80℃冰箱,以备以后的实验。切片在柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中微波5min进行抗原修复,冷却后,采用免疫染色封闭缓冲液(P0102, Beyotime)常温封闭1h,然后用一抗(1:200抗兔Iba1抗体,赛维尔,货号:GB153502, 1:200抗鼠Iba1抗体,赛维尔,货号:GB15105, 1:300抗鼠Aβ1-42抗体,美国Biolegend公司,货号805501; FITC荧光抗大鼠Anti-Lamp1抗体, Abcam, 货号:ab24871; 1:100抗兔GSDMD抗体, ABclonal, 货号:A17308),然后用荧光二抗常温孵育1h(Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 555 Conjugate; Cell Signaling公司, 货号:4413; Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 488 Conjugate), Anti-mouse IgG (H+L), Cell Signaling公司, 货号:4412; F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 647 Conjugate), Cell Signaling公司, 货号:4410)。切片采用含DAPI的抗荧光淬灭剂(Fluoroshield™, F6057, Sigma)进行封片。使用尼康荧光显微镜(尼康, 日本)或共聚焦显微镜(Leica, DM6000, 德国)获取图像。

1.4 Western Blot

用RIPA (radio-immunoprecipitation assay)裂解液(含有磷酸化蛋白酶抑制剂+PMSF)提取总蛋白,并使用BCA(bicinchoninic acid assay)蛋白测定试剂盒(P0012, 碧云天)进行蛋白浓度检测。将20μg蛋白质加入浓度为10%或12%的SDS-PAGE进行凝胶电泳,在120V下电泳分离90min,然后转移到PVDF膜(ISEQ00010, Millipore, 美国)上,在300mA下转膜2h。将膜在5%脱脂牛奶或牛血清白蛋白中封闭1h,4℃冰箱孵育过夜一抗,包括抗兔β-tubulin抗体(1:1000, 货号:AF7011, Affinity, 中国),抗兔GAPDH抗体(1:1000, 货号:AF7021, Affinity,

中国),抗兔 NLRP3 抗体(1:1000,货号:GB114320,赛维尔,中国),抗兔 Caspase-1 抗体(1:1000, Affinity, 货号: AF5418), 抗兔 Cleaved- Caspase 1 (Asp296), p20 抗体(1:1000, Affinity, 货号: AF4005), 抗兔 IL1 beta 抗体(1:1000, Affinity, 货号: AF5103), 抗兔 Cleaved-IL-1 beta (Asp116) 抗体(1:1000, Affinity, 货号: AF4006), 抗兔 GSDMD 抗体(1:1000, ABclonal, 货号: A17308), 抗兔 IL-18 (1:1000, ABclonal, 货号: A23076), 抗 IL-10 (1:1000, ABclonal, 货号: A2171), 然后用 TBST 洗涤, 常温孵育二抗 1h (anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling 公司, 货号: 7076; Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling 公司, 货号: 7074)。使用 ECL 免疫印迹发光液(SQ202L, Epizyme)和荧光成像系统(ProteinSimple, Santa Clara, 美国)显示蛋白质条带。利用 Image J 软件对免疫反应带灰度值进行分析。

1.5 统计学分析

采用 Image J (National Institutes of Health, USA) 分析免疫荧光和 Western Blot 的实验结果。使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析。采用重复测量方差分析和 Tukey 事后多重比较检验分析水迷宫训练中到达平台的潜伏期, 采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 和 Turkey 事后多重比较检验方法分析其他数据。所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动训练减轻 5xFAD 小鼠的焦虑样行为, 改善空间记忆功能。

旷场试验结果显示, 野生型 (WT)、对照组 5xFAD (control-5xFAD) 与运动训练组 5xFAD (PE-5xFAD) 三组小鼠的活动速度无明显差异 ($P>0.05$), 但对照组 5xFAD 小鼠中心区域停留的时间较野生型小鼠显著缩短 (图 1A, B) ($P<0.001$), 运动训练组 5xFAD 小鼠在中心区域停留的时间较对照组 5xFAD 小鼠显著延长 ($P<0.01$)。

在 5 天的 Morris 水迷宫训练学习过程中, 与第 1 天比较, WT 和 PE-5xFAD 两组小鼠到达平台时间逐渐缩短, 而 control-5xFAD 小鼠到达平台的时间无明

显差异 (图 1C, D)。采用双因素方差分析三组小鼠第 5 天到达平台的时间 (逃避潜伏期), 结果显示, 与 WT 组小鼠相比, control-5xFAD 小鼠到达平台的时间明显延长 ($P<0.0001$), PE-5xFAD 小鼠到达平台的时间较 control-5xFAD 组小鼠显著缩短 ($P<0.0001$) (图 1C, D)。第 6 天, 取出平台, 进行水迷宫探索试验, 单因素方差分析结果显示, 与 WT 组相比, control-5xFAD 组小鼠穿越平台的次数与在目标象限停留的时间均显著减少 ($P<0.01$, $P<0.001$), 而 PE-5xFAD 小鼠穿越平台次数和在目标象限停留的时间较 control-5xFAD 组小鼠显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 1E, F)。

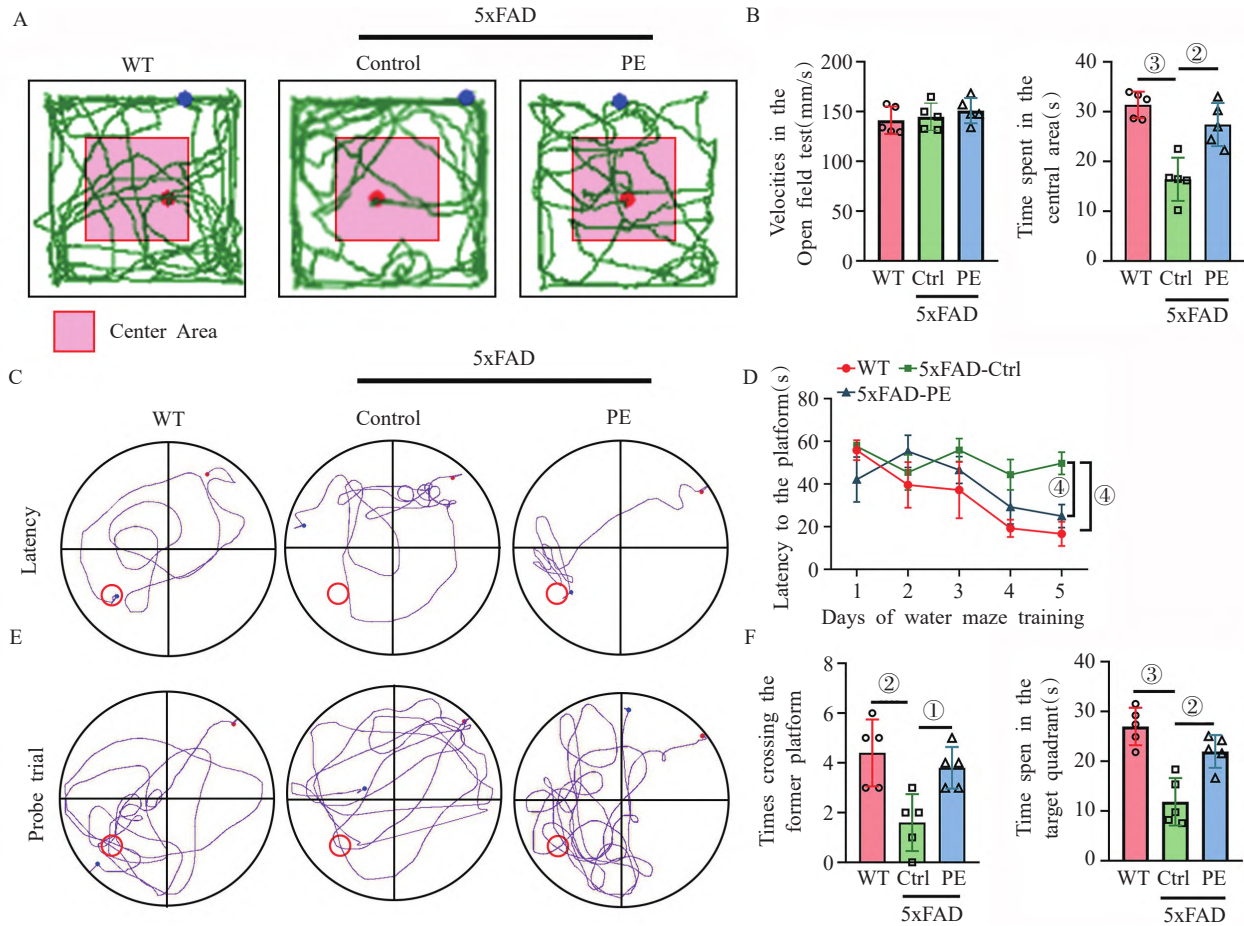
2.2 运动训练减少 5xFAD 小鼠皮质和海马 A β 斑块沉积, 增加神经元存活

免疫荧光结果显示, 与野生型小鼠相比, 5xFAD 对照组的皮质和海马均可见明显的 A β 斑块沉积 ($P<0.0001$, $P<0.0001$), 而 PE-5xFAD 小鼠皮质和海马的 A β 斑块沉积比对照组显著减少 ($P<0.001$, $P<0.01$) (图 2A, B)。同时, A β 斑块沉积周围可见神经元丢失, 单因素方差分析结果显示, 与野生型小鼠相比, 5xFAD 对照组小鼠的皮质和海马的神经元数量明显减少 ($P<0.01$, $P<0.01$), 而运动训练组小鼠的神经元数量较对照组显著增加 ($P<0.05$, $P<0.05$) (图 2A, B)。

2.3 运动训练抑制 A β 斑块周围小胶质细胞溶酶体的聚集

免疫荧光结果显示, 与 WT 组相比, 对照组小鼠皮质 A β 斑块周围的 Lamp1 荧光强度显著增加 ($P<0.0001$), 而运动训练可明显降低 A β 斑块周围小胶质细胞内的 Lamp1 荧光强度 ($P<0.01$), 运动训练组小鼠小胶质细胞的 Lamp1 荧光强度比 WT 组小鼠显著增加 ($P<0.05$) (图 3A, B)。Western Blot 实验结果显示, 对照组 5xFAD 小鼠皮质和海马的 Lamp1 蛋白水平较野生型小鼠显著增加 ($P<0.01$, $P<0.01$), 运动训练可显著减少 5xFAD 小鼠皮质和海马 Lamp1 蛋白水平的表达 ($P<0.01$, $P<0.01$)。对照组 5xFAD 小鼠皮质和海马的溶酶体组织蛋白酶 B (cathepsin B, CtsB) 的表达较 WT 小鼠明显增加 ($P<0.01$, $P<0.01$), 而运动训练可显著降低 5xFAD 小鼠皮质和海马的溶酶体组织蛋白酶 B 的蛋白水平 ($P<0.05$, $P<0.001$) (图 3C, D)。

图1 运动训练减轻5xFAD小鼠的情绪和空间认知障碍

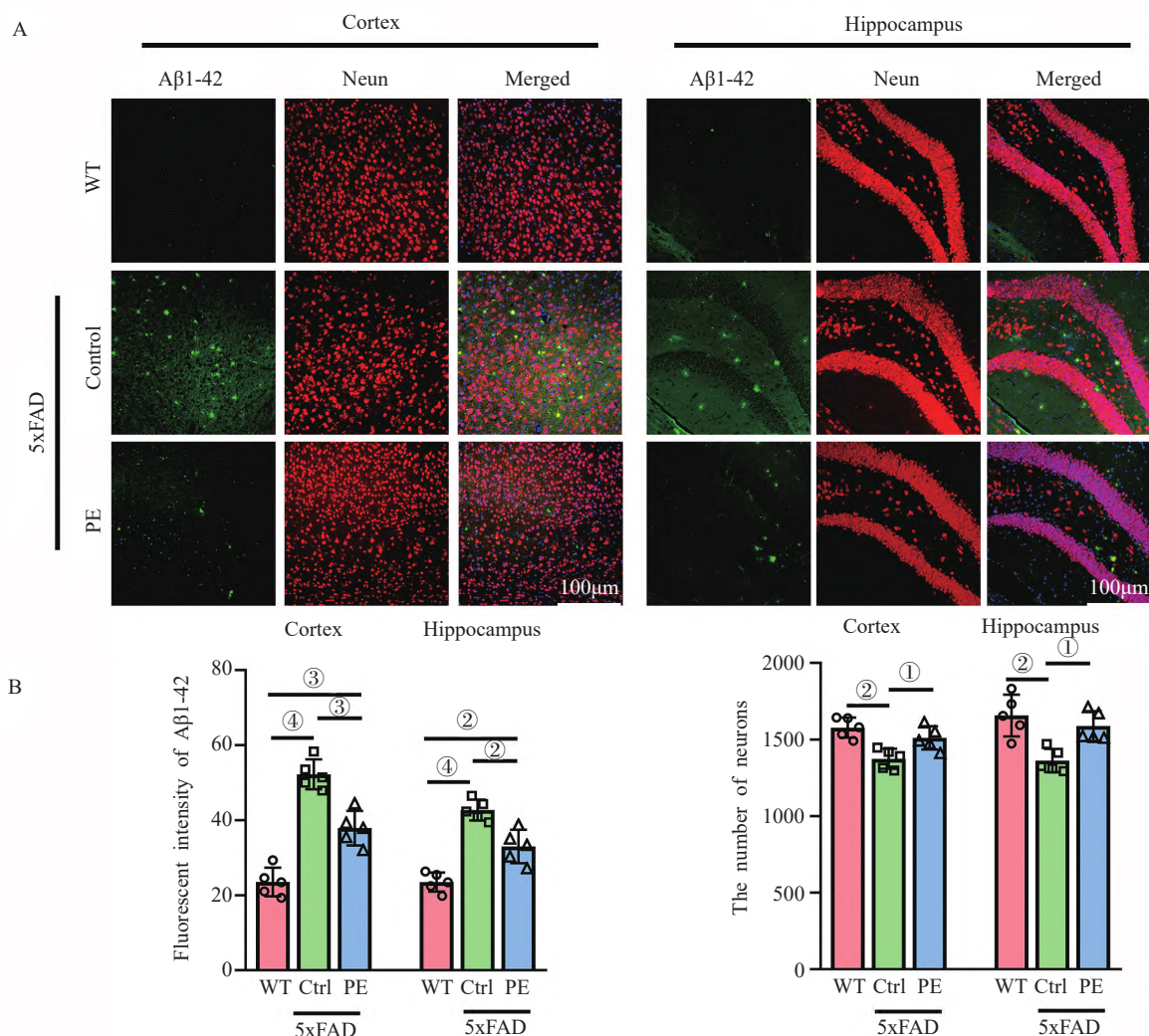


注:A:旷场实验轨迹图。B:单因素方差分析比较野生型小鼠(WT),对照组(Control)和运动训练组(PE)5xFAD小鼠的活动速度、在中心区域停留的时间。C:水迷宫空间训练期间的代表性轨迹图。D:双因素方差分析比较野生型小鼠(WT),对照组(Control)和运动训练组(PE)5xFAD小鼠到达平台的时间。E:空间探索实验的代表性轨迹图。F:单因素方差分析比较野生型小鼠(WT),对照组(Control)和运动训练组(PE)5xFAD小鼠穿越平台次数和在目标象限停留的时间。① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$,④ $P<0.0001$ 。

2.4 运动训练减少5xFAD小鼠皮质和海马促炎因子,增加抑炎因子的表达

Western Blot实验结果显示,与野生型(WT)小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的NLRP3、Cleaved caspase-1的蛋白水平显著增加(皮质: $P<0.05$, $P<0.01$;海马: $P<0.05$, $P<0.01$),而运动训练组5xFAD小鼠皮质和海马的NLRP3、Cleaved caspase-1的蛋白水平较对照组5xFAD小鼠显著降低(皮质: $P<0.05$, $P<0.001$;海马: $P<0.05$, $P<0.05$) (图4A, B)。与野生型小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的ASC、IL-1 β 的蛋白水平显著增加(皮质: $P<0.01$, $P<0.05$;海马: $P<0.01$, $P<0.01$),而运动训练组5xFAD小鼠皮质和海马的ASC、IL-1 β 的蛋白水平

较对照组5xFAD小鼠显著降低(皮质: $P<0.01$, $P<0.05$;海马: $P<0.05$, $P<0.05$),与野生型小鼠无明显差异($P>0.05$) (图4C, D)。与野生型小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的IL-18的蛋白水平显著增加(皮质: $P<0.0001$;海马: $P<0.001$),而运动训练组5xFAD(PE-5xFAD)小鼠皮质和海马的IL-18的蛋白水平较对照组5xFAD小鼠(Control-5xFAD)显著降低(皮质: $P<0.01$;海马: $P<0.05$),较野生型(WT)小鼠显著增加(皮质: $P<0.05$;海马: $P<0.05$) (图4E, F)。与野生型小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的IL-10的蛋白水平显著减少(皮质: $P<0.01$;海马: $P<0.01$),而运动训练组5xFAD小鼠皮质和海马的IL-10的蛋白水平较对照组5xFAD小鼠显著增加

图2 运动训练减轻5xFAD小鼠皮质和海马的A β 斑块沉积,增加神经元存活

注:A:免疫荧光染色标记A β 1-42与Neun阳性神经元的定位表达。B:单因素方差分析比较野生型小鼠(WT),对照组(Control)和运动训练组(PE)5xFAD小鼠皮质和海马的A β 1-42荧光强度与神经元数量的表达差异。① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$,④ $P<0.0001$ 。

(皮质: $P<0.0001$;海马: $P<0.0001$),较野生型小鼠也显著增加(皮质: $P<0.001$;海马: $P<0.01$)(图4E,F)。

2.5 运动训练抑制5xFAD小鼠皮质和海马小胶质细胞焦亡

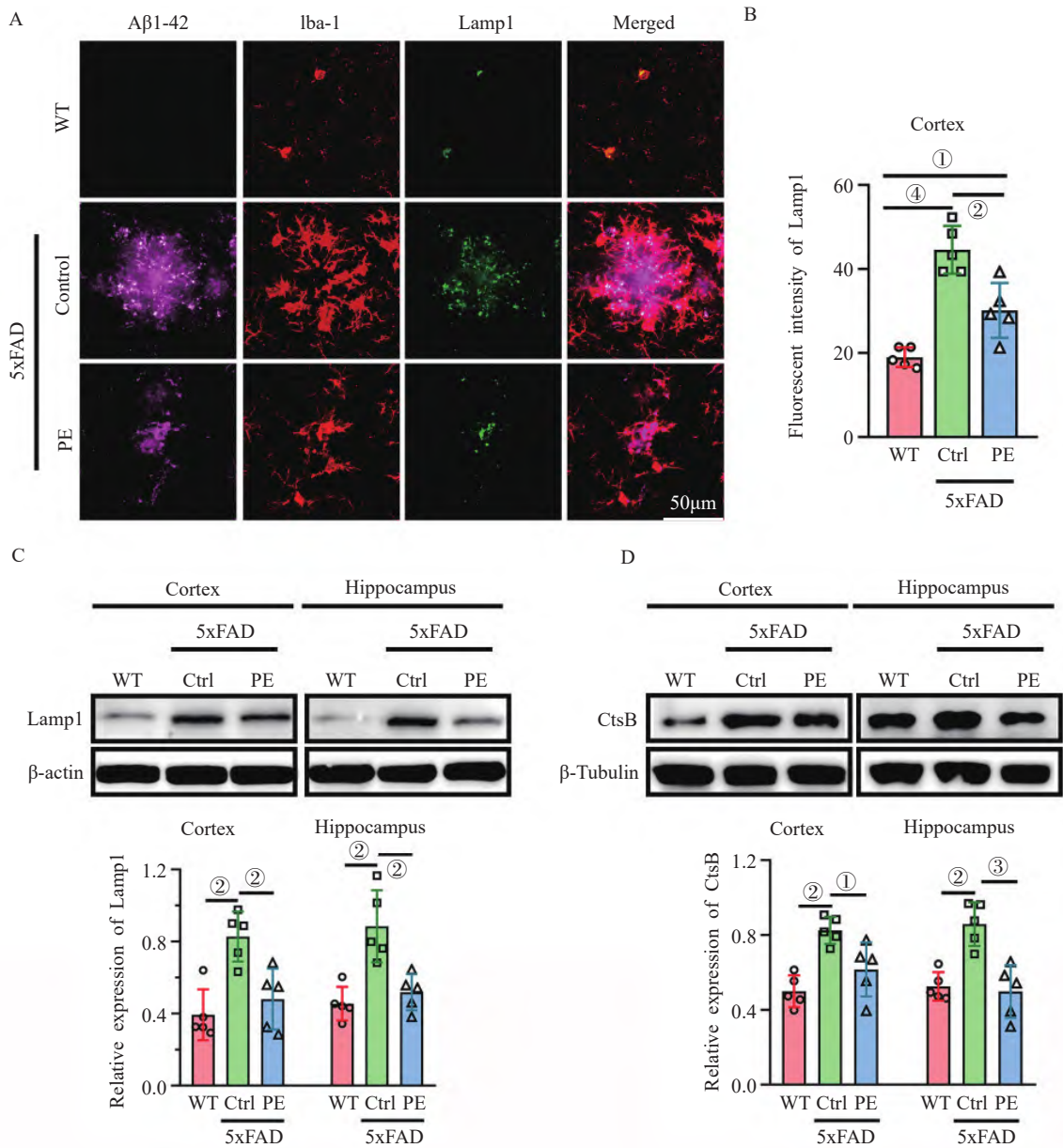
免疫荧光结果显示,与野生型小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白的荧光强度明显增加(皮质: $P<0.01$;海马: $P<0.001$),而运动训练组5xFAD小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白的荧光强度较对照组5xFAD小鼠显著降低(皮质: $P<0.05$;海马: $P<0.01$)(图5A,B),且GSDMD蛋白与Iba-1阳性小胶质细胞共定位(图5A)。Western Blot实验结果

显示,与野生型小鼠比较,对照组5xFAD小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白的表达显著增加(皮质: $P<0.001$;海马: $P<0.001$),而运动训练5xFAD小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白的表达比对照组5xFAD小鼠显著降低(皮质: $P<0.05$;海马: $P<0.01$)(图5C,D)。

3 讨论

研究证明,除A β 沉积和Tau蛋白的过度磷酸化以外,炎症性神经免疫系统紊乱已成为AD的第三个核心病理特征^[9]。5xFAD转基因小鼠是一种携带五个家族性基因突变的转基因小鼠,这些基因突变

图3 运动训练抑制5xFAD小鼠脑内Aβ斑块周围小胶质细胞Lamp1阳性初级溶酶体的聚集，减轻皮质和海马溶酶体组织蛋白酶B的活性

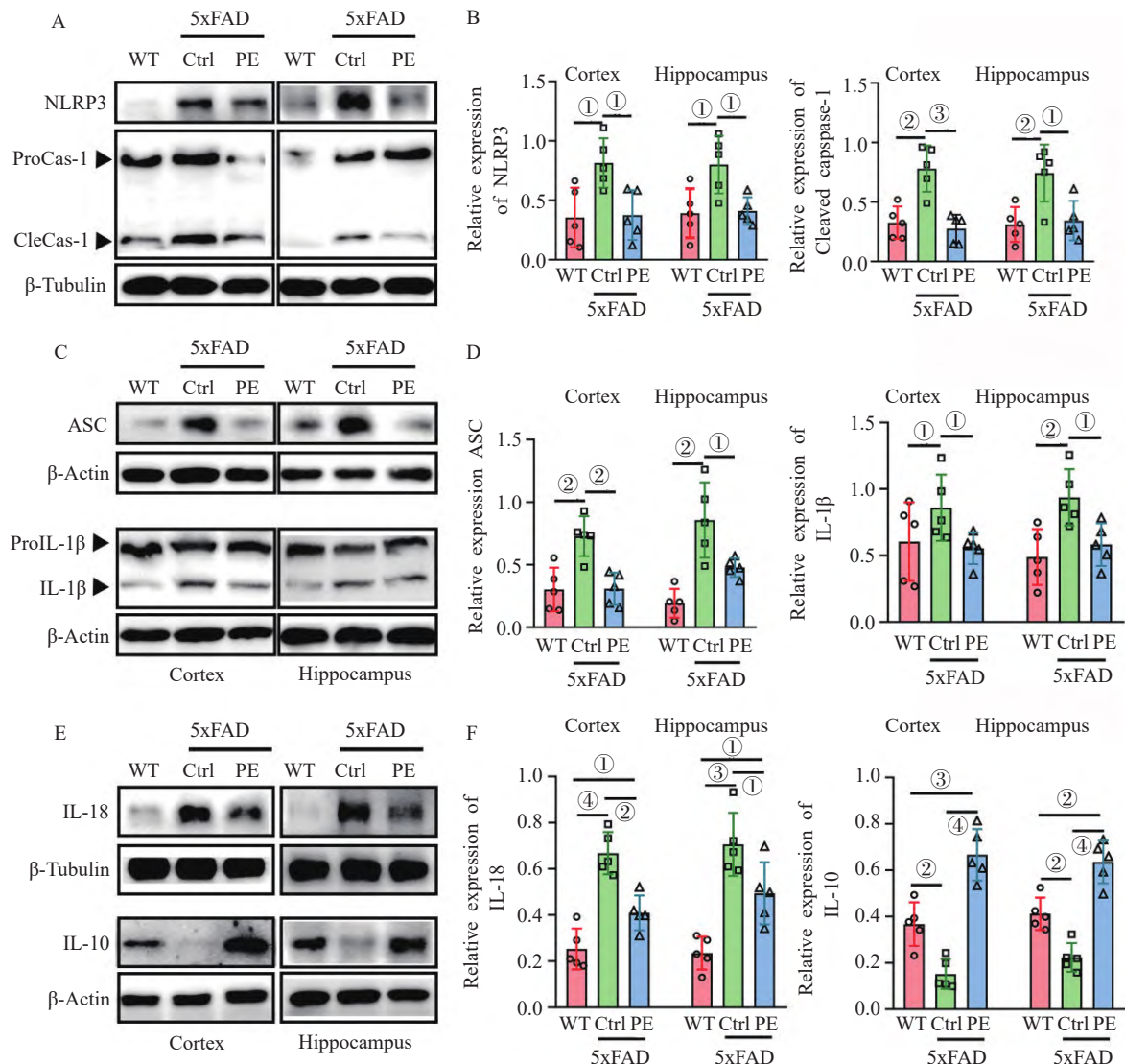


注:A:免疫荧光显示野生型、对照组-5xFAD和运动训练5xFAD三组小鼠皮质Aβ1-42、Lamp1和Iba-1共定位染色。B:单因素方差分析比较三组小鼠皮质Iba-1阳性小胶质细胞的Lamp1荧光强度。C:Western Blot化学发光成像分析野生型(WT)、对照组-5xFAD和运动训练5xFAD三组小鼠皮质和海马的Lamp1的表达。D:Western Blot化学发光成像分析野生型(WT)、对照组-5xFAD和运动训练5xFAD三组小鼠皮质和海马溶酶体组织蛋白酶B(Cathepsin B,CtsB)的表达差异。① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$,④ $P<0.0001$ 。

与阿尔茨海默病的发生密切相关。这些突变包括与β-淀粉样蛋白前体(APP)相关的瑞典(K670N/M671L)、佛罗里达(I716V)和伦敦(V717I)突变,以及与早老素-1(PSEN1)相关的M146L和L286V突变广泛,是阿尔茨海默病的经典动物模型,应用于

AD的发病机制和治疗研究。本研究采用5月龄的5xFAD动物模型,研究发现自主运动训练可减少5xFAD小鼠脑内皮质和海马的淀粉样斑块沉积,抑制NLRP3炎症小体的激活,增加神经元数量,最终改善AD认知功能。

图4 运动训练抑制5xFAD小鼠皮质和海马NLRP3炎症小体的激活

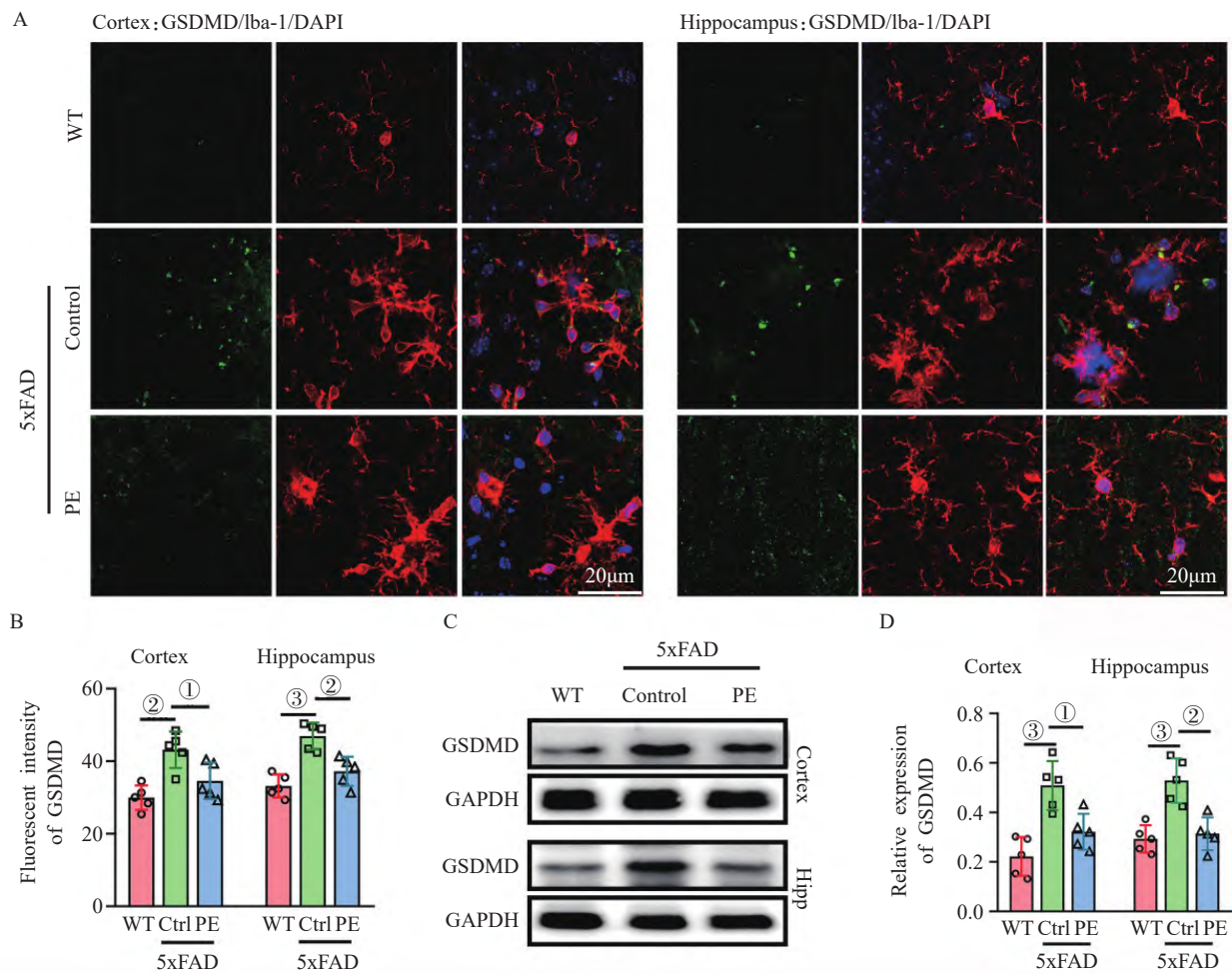


注:A:Western Blot化学发光实验显示野生型小鼠,对照组-5xFAD和运动训练-5xFAD三组小鼠皮质和海马NLRP3和Caspase-1/Cleaved caspase-1的表达。B:统计学分析比较三组小鼠皮质和海马的NLRP3和Cleaved caspase-1的蛋白水平差异。C:Western Blot化学发光实验显示野生型小鼠,对照组-5xFAD和运动训练-5xFAD三组小鼠皮质和海马的ASC和IL-1 β 蛋白表达。D:统计学比较分析三组小鼠皮质和海马的ASC和Cleaved caspase-1的蛋白水平差异。E:Western Blot化学发光实验显示野生型小鼠,对照组-5xFAD和运动训练-5xFAD三组小鼠皮质和海马的IL-18和IL-10蛋白表达。F:统计学比较分析三组小鼠皮质和海马的IL-18和IL-10的蛋白表达水平差异。① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$,④ $P<0.0001$ 。

小胶质细胞(microglia)是中枢神经系统中的固有免疫细胞,在AD疾病进程中具有双刃剑作用。一方面,小胶质细胞可摄取细胞外A β ,通过自噬或溶酶体系统降解清除A β ^[10]。另一方面,小胶质细胞的激活会介导慢性炎症,导致其正常吞噬、降解和清除能力下降^[11]。小胶质细胞焦亡是依赖于半胱天冬蛋白酶-1(caspase-1)焦亡相关的蛋白质GSDMD,而

GSDMD也被caspase-1切割形成跨膜孔,介导成熟白细胞介素1 β (IL-1 β)的释放,导致细胞内容物释放至细胞外,产生强烈的神经炎症级联反应,并诱导炎症性细胞死亡,在介导AD脑内神经元变性损伤中具有重要作用^[12]。抑制小胶质细胞焦亡,可有效改善AD认知功能,是AD治疗的新策略^[13-14]。另外,NLRP3炎症小体可介导tau蛋白的过度磷酸化水

图5 运动训练抑制5xFAD小鼠皮质和海马小胶质细胞焦亡



注:A:免疫荧光共定位显示野生型小鼠,对照组-5xFAD和运动训练-5xFAD三组小鼠皮质和海马GSDMD蛋白与Iba-1阳性小胶质细胞的共定位表达。B:统计学分析比较三组小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白表达差异。C:Western Blot化学发光实验显示野生型小鼠,对照组-5xFAD和运动训练-5xFAD三组小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白水平。D:统计学比较分析三组小鼠皮质和海马的GSDMD蛋白表达差异。① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$,④ $P<0.0001$ 。

平,敲除NLRP3可降低AD小鼠中A β 水平,从而促进A β 斑块的吞噬和清除,改善记忆缺陷^[15],而小胶质细胞释放的ASC斑点可迅速与A β 结合,增加A β 寡聚体的形成及沉积,而ASC的缺陷或抗体可以阻止病理扩散,证实炎症激活与疾病过程相关^[16]。运动干预可显著抑制AD小鼠海马小胶质细胞介导的炎症反应,改善认知功能^[9]。本研究进一步发现,3个月的有氧跑轮运动训练干预可通过抑制NLRP3、ASC炎症小体的激活,进而抑制小胶质细胞焦亡,降低AD脑内神经炎症因子水平。

有研究显示,小胶质细胞的溶酶体组织蛋白酶

B(cathepsin B,CtsB)是导致线粒体活性氧和促炎介质产生增加的主要原因,与认知功能障碍的产生密切相关^[17]。另外,A β 蛋白和氧化应激均可通过诱导CtsB,激活NLRP3炎症小体,随后启动pro-caspase-1加工形成caspase-1,进而剪切pro-IL-1 β 形成IL-1 β ,促进淀粉样斑块形成和神经退行性病变^[18]。科学合理的运动可以有效调节神经免疫系统^[19],降低C反应蛋白、IL-6、肿瘤坏死因子 α 等促炎因子的产生,增加白细胞介素10、IL-1受体拮抗剂、白细胞介素4、转化生长因子 β -1等抑炎因子的产生,缓解神经退行性疾病的症状,延缓病理进展^[20-21]。本研

究进一步提示,运动训练抑制神经炎症的作用可能通过改善小胶质细胞溶酶体功能而实现。

本研究存在一定不足。首先,根据小鼠喜好跑笼的习性,我们参照以往的研究^[22],采用了自主跑笼运动方案,但此运动方案无法保证小鼠的运动量,且本研究每组纳入小鼠5只,样本量较小。在以后的研究中,我们将采用更合理的运动跑台训练方案,并增加样本量,研究不同运动量对AD小鼠认知功能的影响。其次,本研究采用旷场试验检测小鼠的焦虑情绪。旷场实验被广泛用来分析啮齿动物的运动,焦虑和刻板的行为^[23],在旷场实验中,更多喜欢在周边活动的小鼠被描述趋向性(向固体物体移动),这代表焦虑样行为,而焦虑程度较低的小鼠倾向于花更多的时间在旷场中央的开放区域^[24]。

综上所述,自主运动训练可改善AD小鼠的情绪和认知功能,减少A β 斑块的沉积,增加神经元存活。运动训练改善AD认知功能的机制与抑制小胶质细胞NLRP3炎症小体激活,进而减轻细胞焦亡有关。

参考文献

- [1] Tag SH, Kim B, Bae J, et al. Neuropathological and behavioral features of an APP/PS1/MAPT (6xTg) transgenic model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Brain*, 2022, 15(1):51.
- [2] Teri L, Ferretti LE, Gibbons LE, et al. Anxiety of Alzheimer's disease: prevalence, and comorbidity[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1999, 54(7): M348—352.
- [3] 徐勇,王军,王虹峥,等. 2023中国阿尔茨海默病数据与防控策略[J]. *阿尔茨海默病及相关病杂志*, 2023, 6(3): 175—192+173.
- [4] Li F, Geng X, Yun HJ, et al. Neuroplastic effect of exercise through astrocytes activation and cellular crosstalk[J]. *Aging Dis*, 2021, 12(7): 1644—1657.
- [5] Maliszewska-Cyna E, Lynch M, Oore JJ, et al. The benefits of exercise and metabolic interventions for the prevention and early treatment of Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(1): 47—60.
- [6] De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. *J Sport Health Sci*, 2020, 9(5): 394—404.
- [7] Xie Y, Chen X, Li Y, et al. Transforming growth factor β 1 protects against LPC-induced cognitive deficit by attenuating pyroptosis of microglia via NF- κ B/ERK1/2 pathways[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 194.
- [8] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice[J]. *J Vis Exp*, 2015, (96): e52434.
- [9] Wang M, Zhang H, Liang J, et al. Exercise suppresses neuroinflammation for alleviating Alzheimer's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 76.
- [10] Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(41): E8788—E8797.
- [11] 马婷婷,陈建红,刘爱翠,等. 抑制 lncRNA TUG1 下调核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白1 炎症小体在延缓阿尔茨海默病进展的作用[J]. *解剖学报*, 2024, 55(1): 32—42.
- [12] Wang C, Zong S, Cui X, et al. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1117172..
- [13] 贾露露,何茂锐,陶鹏. 经NLRP3通路的细胞焦亡在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2022, 22(2): 149—152.
- [14] Hu B, Zhang J, Huang J, et al. NLRP3/1-mediated pyroptosis: beneficial clues for the development of novel therapies for Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(11): 2400—2410.
- [15] Ising C, Venegas C, Zhang S, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 669—673.
- [16] Venegas C, Kumar S, Franklin BS, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-beta in Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2017, 552(7685): 355—361.
- [17] Nakanishi H. Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2003, 2(4): 367—381.
- [18] Ni J, Wu Z, Stoka V, et al. Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induce cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(1): e12856.
- [19] Booth FW, Roberts CK, Thyfault JP, et al. Role of inactivity in chronic diseases: evolutionary insight and pathophysiological mechanisms[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4): 1351—1402.
- [20] Mahalakshmi B, Maurya N, Lee SD, et al. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5895.
- [21] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(9): 607—615.
- [22] De Miguel Z, Khoury N, Betley MJ, et al. Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin[J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 494—499.
- [23] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99—103.
- [24] Bale TL, Contarino A, Smith GW, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 410—414.