大麻二酚对 *D*-半乳糖/三氯化铝诱导的阿尔茨海默病模型小鼠的神经保护作用及机制

李申晖[1,2]，杨 舸[2]，高岩松[2]，李盛钰[2]，赵 雷[1*]

1. 长春中医药大学 药学院，吉林 长春 130117
2. 吉林省农业科学院（中国农业科技东北创新中心）农产品加工研究所，吉林 长春 130033

摘 要：目的 探究大麻二酚在阿尔茨海默症（AD）模型小鼠中的干预效果及其潜在的分子作用机制。**方法** 使用 *D*-半乳糖/三氯化铝（$AlCl_3$）诱导建立 AD 小鼠模型，对照组不造模。将造模小鼠随机分为 4 组：模型组、多奈哌齐（5 mg·kg^{-1}）组和大麻二酚低、高剂量（100、200 mg·kg^{-1}）组，连续 ig 给药 21 d，对照组和模型组 ig 等量 CMC-Na 溶液。进行跳台实验和爬杆实验；试剂盒法检测 AD 小鼠血清中肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、小鼠白细胞介素 1β（IL-1β）、小鼠白细胞介素 6（IL-6）、小鼠白细胞介素 10（IL-10）的表达水平，以及小鼠海马中神经递质乙酰胆碱酯酶（AChE）和丁酰胆碱酯酶（BChE）水平；采用苏木精-伊红（HE）染色分析小鼠海马组织学变化；通过免疫荧光染色对小鼠海马体内 β-淀粉样（Aβ）蛋白进行定量分析；采用 Western blotting 法检测海马组织神经炎症、神经凋亡相关信号蛋白表达的变化。**结果** 与模型组比较，多奈哌齐组和大麻二酚组 AD 小鼠的跳台实验被动回避潜伏期显著延长，错误次数显著减少（P＜0.05、0.01），爬杆实验 AD 小鼠的下降时间显著缩短（P＜0.05、0.01）；血清中促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著降低（P＜0.01），抗炎因子 IL-10 的水平显著升高（P＜0.01）；AD 小鼠脑组织内 AChE 和 BChE 的表达水平显著降低（P＜0.01）；海马组织病理改变显著改善，细胞结构正常，排列紧密，少量坏死；海马组织 Aβ 阳性率显著降低（P＜0.01）；海马体内抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白表达量显著升高（P＜0.01），促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量显著降低（P＜0.01）；核因子 κB（NF-κB）、p-p38 和一氧化氮合酶（iNOS）的蛋白表达量显著降低（P＜0.05、0.01），β-位淀粉样前体蛋白裂解酶 1（BACE1）的蛋白表达量显著降低（P＜0.01），脑啡肽酶（NEP）和胰岛素降解酶（IDE）的蛋白表达量显著增加（P＜0.01）。**结论** 大麻二酚能够通过降低神经炎症、抑制神经细胞凋亡、减低 Aβ 蛋白沉积等方式，改善由 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的小鼠 AD 症状。

关键词：大麻二酚；阿尔茨海默病；神经炎症；神经细胞凋亡；β-淀粉样蛋白

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376(2025)03 - 0618 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.008

Neuroprotective effect and mechanism of cannabidiol on *D*-galactose/aluminum chloride-induced Alzheimer's disease model mice

LI Shenhui[1,2], YANG Ge[2], GAO Yansong[2], LI Shengyu[2], ZHAO Lei[1]

1. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China
2. Institute of Agro-food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences (Northeast Agricultural Research Center of China), Changchun 130033, China

Abstract: Objective To investigate the intervention effects and potential molecular mechanisms of cannabidiol in an Alzheimer's disease (AD) mouse model. **Methods** The AD mouse model was established by using *D*-galactose(*D*-gal)/aluminum chloride ($AlCl_3$), while the control group was not modeled. The modeled mice were randomly divided into 4 groups: model group, donepezil (5 mg·kg^{-1}) group and low and high dose cannabidiol (100, 200 mg·kg^{-1}) groups. The mice were ig administered for 21 d, and the control group and model group were ig administered with the same amount of CMC-Na solution. The step-down test and pole test were conducted. The expression levels of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 10 (IL-10) in the

收稿日期：2024-09-12

基金项目：吉林省科技发展计划项目（20220204028YY）

作者简介：李申晖，硕士研究生。E-mail:17815629580@163.com

***通信作者：**赵 雷，教授，研究方向为药物化学。E-mail: zhaolei@ccucm.edu.cn

serum of AD mice and the levels of neurotransmitters acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) in the hippocampus were detected by the kit method. The histological changes of the hippocampus were analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The Aβ protein in the hippocampus of mice was quantitatively analyzed by immunofluorescence staining. The changes in the expression of neuroinflammation and neuroapoptosis-related signal proteins in the hippocampus were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the passive avoidance latency in the step-down test and the number of errors in the donepezil group and the cannabidiol groups were significantly prolonged and reduced ($P < 0.05, 0.01$), respectively, and the descent time in the pole test was significantly shortened ($P < 0.05, 0.01$). The levels of pro-inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-6 in the serum were significantly decreased ($P < 0.01$), and the level of anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased ($P < 0.01$). The expression levels of AChE and BChE in the brain tissue of AD mice were significantly decreased ($P < 0.01$). The pathological changes in the hippocampus were significantly improved, with normal cell structure and tight arrangement, and a small amount of necrosis. The positive rate of Aβ in the hippocampus was significantly decreased ($P < 0.01$). The protein expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Caspase-3 was significantly decreased ($P < 0.01$). The protein expression of nuclear factor κB (NF-κB), p-p38, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the protein expression of β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) was significantly decreased ($P < 0.01$), while the protein expression of neprilysin (NEP) and insulin-degrading enzyme (IDE) was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Cannabidiol can improve AD induced by *D*-gal/$AlCl_3$ in mice by reducing neuroinflammation, inhibiting neuronal apoptosis, and reducing Aβ protein deposition.

Key words: cannabidiol; Alzheimer's disease; neuroinflammation; neurocyte apoptosis; amyloid β-protein

阿尔茨海默病（AD）是最常见的神经退行性疾病之一，具有慢性、进行性和不可逆的特征，全球 AD 患者总数不断增加，预计到 2050 年将接近 1.15 亿人[1]。主要症状为记忆丧失、认知能力下降和行为障碍[2]。现代药理学研究表明，AD 的主要病因是脑内 β-淀粉样蛋白（Aβ）的过度积累和 Tau 蛋白过度磷酸化造成的神经纤维缠结[3]。目前，可用于治疗 AD 的治疗方案极其有限，只有美国食品药物管理局（FDA）批准的 4 种药物，包括乙酰胆碱酯酶（AChE）抑制剂和 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸（NMDA）受体拮抗剂。这些药物最常见的不良反应包括恶心、呕吐、失眠、疲劳和头晕。

火麻 *Cannabis sativa* L.俗称汉麻、大麻，从中分离出的一些植物大麻素作为潜在的神经治疗药物引起了极大的关注。大麻二酚是火麻中主要的非精神活性成分，大麻二酚已被证明具有一系列抗焦虑、抗精神病、抗惊厥、抗恶心、抗炎、抗风湿性关节炎和抗氧化作用[4]。大麻二酚各种复杂的药理作用使其成为多种疾病的潜在治疗药物，包括运动障碍、慢性疼痛、精神疾病、癌症和神经退行性疾病[5-6]。由于其抗氧化和抗炎特性以及耐受性良好的药理行为，近年来成为神经保护药物开发的潜在原型。最近，越来越多的证据表明，具有抗炎和抗氧化特性的大麻二酚可作为多靶点 AD 治疗药物[7]。此外，在体外实验中，大麻二酚已被证明可以降低 Tau 蛋白过度磷酸化[8]，调节小胶质细胞迁移[9]，从而减少大脑中 Aβ 的总量，防止 Aβ 介导的神经毒性和小胶质细胞激活的炎症[10]。此外，大麻二酚还被发现在改善认知功能和改善脑血管结构、功能方面发挥积极作用[11]。

大麻二酚具有同时靶向大麻素受体和非大麻素受体的优势，可能成为一种有希望的 AD 治疗候选药物。越来越多的证据表明，大麻二酚可以通过抗炎、抗氧化和神经源性作用缓解症状甚至阻止 AD 的进展。然而，大麻二酚如何减缓 AD 神经退行性过程的分子和细胞机制在很大程度上是未知的。本研究旨在对大麻二酚在 AD 中的治疗前景进行进一步评估，揭示其 AD 治疗的潜在作用机制，为大麻二酚预防和治疗 AD 的临床应用提供理论依据。

1　材料

1.1　药物及主要试剂

火麻叶由吉林省麻类工程研究中心提供，经长春中医药大学药学院王淑敏教授鉴定为桑科大麻属植物火麻 *Cannabis sativa* L.的叶。新鲜火麻叶干燥、粉碎（20 目）后，15 倍量的 95%乙醇回流提取 2 次，滤过，滤液减压回收溶剂，硅胶柱色谱分离，再经十八烷基硅烷键合硅胶（ODS）纯化获得单体化合物。经 HPLC 色谱分析，并与对照品比对，化合物鉴定为大麻二酚，质量分数≥99%。

以上述大麻二酚单体为原料，与药用辅料（硬脂酸镁、二氧化硅、微晶纤维素、麦芽糊精）按比例混合均匀。湿法制粒、干燥、筛分整粒后，压制

成大麻二酚片，每片质量为 0.75 g，每片含大麻二酚 50 mg。上述片剂压制完成后，粉碎至 100 目，用 CMC-Na 溶液配制成 150 mg·mL^{-1} 的混悬液（大麻二酚质量浓度为 10 mg·mL^{-1}）。

大麻二酚对照品（成都普思生物科技股份有限公司，货号 PS010755，质量分数≥99%）；三氯化铝（货号 A0718）、*D*-半乳糖（货号 3455，质量分数≥97%），西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；多奈哌齐盐酸盐（上海源叶生物技术有限公司，货号 S70192，质量分数 99%）。小鼠肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、小鼠白细胞介素 1β（IL-1β）、小鼠白细胞介素 6（IL-6）、小鼠白细胞介素 10（IL-10）、小鼠乙酰胆碱酯酶（AChE）、小鼠丁酰胆碱酯酶（BChE）ELISA 试剂盒（江苏酶标生物科技有限公司）；兔多克隆抗体 beta Amyloid 1-42（Aβ1-42）（美国 Invitrogen 公司）；山羊抗兔 IgG 抗体（中国 Beyotime 公司）；兔多克隆抗体 Bax、兔单克隆抗体 Bcl-2、兔单克隆抗体 Caspase-3、兔单克隆抗体核因子 κB（NF-κB）、兔单克隆抗体诱导型一氧化氮合酶（iNOS），兔单克隆抗体 p38 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）、p-p38 MAPK（美国 GeneTex 公司）；兔多克隆抗体 β-位淀粉样前体蛋白裂解酶 1（BACE1）、兔多克隆抗体脑啡肽酶（NEP）、兔多克隆抗体胰岛素降解酶（IDE）[生工生物工程（上海）股份有限公司]。

1.2 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱（美国）；Nikon eclipse 80i 荧光倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；YLS-3TB 跳台记录仪（济南益延科技发展有限公司）；Varioskan LUX 多功能酶标仪（赛默飞世尔科技中国有限公司）。

1.3 实验动物

50 只雄性昆明小鼠，体质量 20～23 g，购买自辽宁长生生物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（辽）2020-0001，饲养于屏障系统，环境条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》（GB14925-2001），实验严格按照长春中医药大学动物伦理委员会标准执行（伦理批准编号 2024776）。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药

适应性饲养 1 周后，随机挑选 10 只作为对照组，其余小鼠 ig 三氯化铝（100 mg·kg^{-1}）和 ip *D*-半乳糖（90 mg·kg^{-1}），每天 1 次，连续 90 d，建立 AD 模型[12]，对照组每天给予等量的 0.9%氯化钠溶液。将造模小鼠随机分为 4 组（n＝10）：模型组、多奈哌齐（5 mg·kg^{-1}）组和大麻二酚低、高剂量组，其中大麻二酚组每天 ig 给药大麻二酚片混悬液，给药剂量以大麻二酚含量计，分别为 100、200 mg·kg^{-1}，连续 ig 给药 21 d，对照组和模型组 ig 等量 CMC-Na 溶液。第 22 天进行跳台和爬杆实验。随后麻醉小鼠，眼球取血，血浆在 4 ℃下 6 000 r·min^{-1} 离心 10 min，收集血清。小鼠颈椎脱臼处死，解剖并收集小鼠的大脑，−80 ℃冻存。

2.2 行为学测试

2.2.1 跳台实验 跳台实验选用跳台记录仪测定，在正式测试开始前 24 h，对小鼠进行 1 次驯化，即给予 36 V 的足部电击，促使小鼠寻找角落的安全平台。次日，首先将小鼠放在平台上，将小鼠停留在平台上的时间视为潜伏期，并记录小鼠第 1 次跳下平台的时间和 5 min 内跳下平台的错误次数（以小鼠的双脚同时接触底部的栅栏为准）。时间超过 5 min 以潜伏期为 5 min 计算。

2.2.2 爬杆实验 设置 1 个平板和 1 个与平板成 45° 角的长杆（直径 1 cm、高 55 cm），长杆的顶部装有一个直径为 2 cm 的球形突起，将小鼠头朝下放置在球形凸起上并计时，当小鼠沿杆爬下且任意后肢触地时，停止计时。每只动物在末次 ig 后进行 1 次训练，在第 2 天进行试验。共进行 3 次测试，每次测试之间有 10 min 间隔，分别记录每只小鼠在 3 次实验中的爬行时间，取平均值。

2.3 生化指标检测

按照说明书所述的方法，使用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 水平。取小鼠海马组织，加入适量 0.9%氯化钠溶液，进行匀浆处理，4 ℃、5 000×g 离心 10 min，收集上清，用 ELISA 试剂盒测定小鼠神经递质 AChE 和 BChE 水平。

2.4 苏木精-伊红（HE）染色

小鼠海马组织在组织固定液中固定 24 h，使用石蜡包埋海马组织，进行切片处理，切片经二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水后，苏木素染液（60 ℃）染色 20 min，伊红染液染色 8 min；再用乙醇梯度脱水、二甲苯透明后，中性树胶封片，光学显微镜下观察组织学改变。

2.5 免疫荧光染色

将固定的小鼠海马组织包埋在石蜡中，冷冻，

并连续切割成 20 μm 厚的切片，切片先用 5%的山羊血清在 37 ℃封闭 1 h 后，在 4 ℃下与 DAPI、Aβ1-42 抗体（一抗）孵育过夜。然后，与山羊抗兔 IgG 抗体在 37 ℃孵育 1 h，磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 3 次。使用荧光倒置显微镜收集免疫荧光图像，并使用 Image J 软件对荧光图像进行定量分析。

2.6　Western blotting 法检测蛋白表达

取小鼠海马组织，加入 RIPA 裂解液，置于冰上研磨，在 4 ℃条件下 10 000×g 离心 15 min 收集上清液，采用 BCA 法检测海马组织蛋白浓度，具体检测步骤依照 BCA 试剂盒说明书进行。测定蛋白浓度后，将适量 RIPA 裂解液和上样缓冲液加入上清液中，沸水煮 10 min 至蛋白变性，将样品分装至 EP 管中，−80 ℃保存备用。将蛋白质样品取 40 μg 在 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离，转移到硝化纤维素膜（PVDF）上，用 5% BSA 封闭，然后与一抗孵育，在 4 ℃下过夜。用 TBST 洗涤后，PVDF 膜与 HRP 偶联二抗在室温下孵育 1 h。使用 Image Quant LAS 4000 对条带进行定量，并使用 β-actin 作为对照。

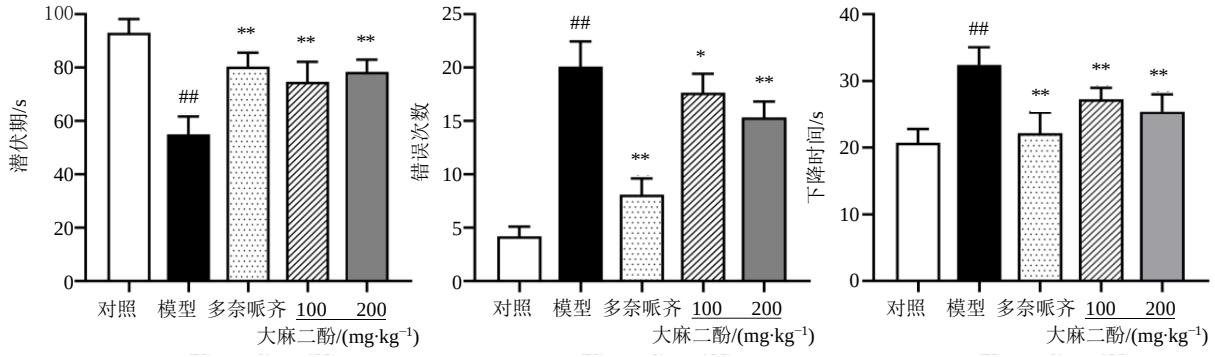
2.7　统计方法

实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据用 SPSS 20.0 和 Origin 8.0 软件进行统计分析，总体显著性差异通过单因素方差分析和 Bonferroni 的后处理检验。

3　结果

3.1　大麻二酚改善 AD 模型小鼠的记忆能力和运动行为

为了研究大麻二酚对 AD 小鼠记忆能力和行为能力的影响，对小鼠进行了跳台实验和爬杆实验。跳台实验的结果显示（图 1），与对照组比较，模型组被动回避潜伏期显著缩短，错误次数显著增加（P＜0.01）；与模型组比较，多奈哌齐组和大麻二酚组小鼠的被动回避潜伏期显著延长，错误次数显著减少（P＜0.05、0.01）。爬杆实验结果显示（图 1），与对照组比较，模型组 AD 小鼠的下降时间显著延长（P＜0.01）；与模型组比较，大麻二酚和多奈哌齐能够显著缩短 AD 小鼠的下降时间（P＜0.05、0.01），且 2 种行为学的结果均呈现剂量相关性。结果表明大麻二酚的治疗改善了 AD 小鼠的记忆能力和运动能力。



与对照组比较：##P＜0.01；与模型组比较：*P＜0.05　**P＜0.01。
##P < 0.01 *vs* control group; *P < 0.05　**P < 0.01 *vs* model group.

图 1　大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠行为学的影响（$\bar{x} \pm s$，n＝10）

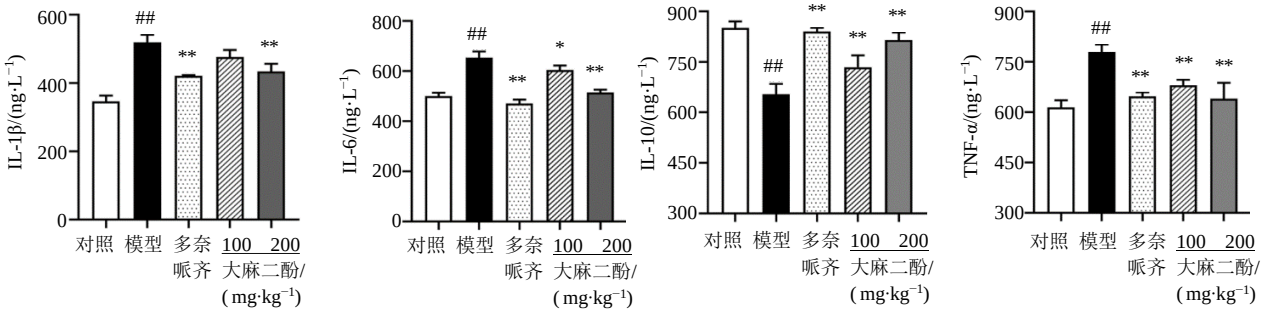
Fig. 1　Effects of cannabidiol on motor deficits of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x} \pm s$, n＝10)

3.2　大麻二酚对 AD 模型小鼠血清炎症因子的影响

通过检测小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 的水平来评估大麻二酚对 AD 模型小鼠炎症的影响。结果表明（图 2），与对照组比较，模型组 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著升高（P＜0.01），IL-10 水平显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，大麻二酚高剂量和多奈哌齐能够显著降低 AD 小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平（P＜0.01），显著提升抗炎因子 IL-10 的水平（P＜0.01）。大麻二酚对炎症因子水平的影响呈现剂量相关性。

3.3　大麻二酚对 AD 模型小鼠脑内 AChE 和 BChE 表达水平的影响

对小鼠海马组织匀浆中 AChE 和 BChE 的检测结果（图 3）表明，与对照组比较，模型组 AD 小鼠脑组织内 AChE 和 BChE 的表达水平显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，大麻二酚和多奈哌齐能够显著降低 AD 小鼠海马组织内 AChE 和 BChE 的表达水平（P＜0.01），高剂量组的 AChE 和 BChE

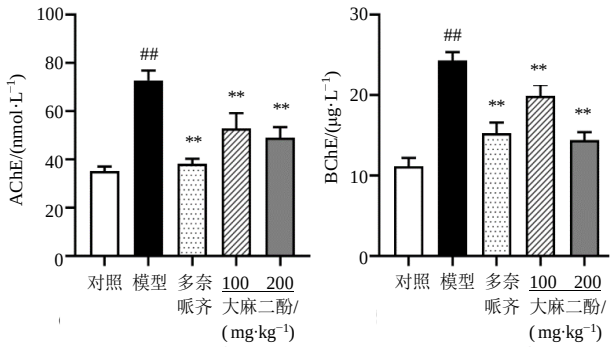


与对照组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$。

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 2 大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠血清炎症因子的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig. 2 Effects of cannabidiol on levels of anti-inflammatory factors in serum of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



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

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 3 大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠脑组织 AChE 和 BChE 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig. 3 Effects of cannabidiol on expression of AChE and BChE in brain tissue of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分别降低了（32.72±0.46）%和（40.79±0.58）%。结果表明大麻二酚可通过调控神经递质的表达水平，抑制 AD 疾病的发展。

3.4 大麻二酚拮抗 AD 模型小鼠海马组织细胞损伤

采用 HE 染色观察小鼠海马组织神经元细胞变化情况。结果显示（图 4），对照组小鼠海马组织神经元完整，清晰可见，细胞呈现椭圆形，神经元数量较多，排列紧凑整齐，未见异常细胞；*D*-半乳糖/$AlCl_3$ 模型组小鼠海马组织神经元细胞结构损坏，导致染色加深，胞体缩小，呈锥形，数量明显减少，细胞间隙增大，排列无序且松散；大麻二酚和多奈哌齐干预后，海马组织细胞结构正常，排列紧密，少量坏死。

3.5 大麻二酚对 Aβ 沉积的抑制作用

AD 小鼠脑内海马体的免疫荧光结果显示（图 5），与对照组比较，模型组 AD 模型小鼠海马体

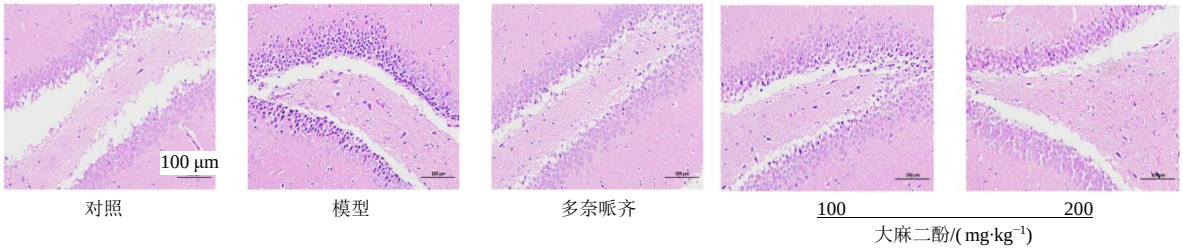


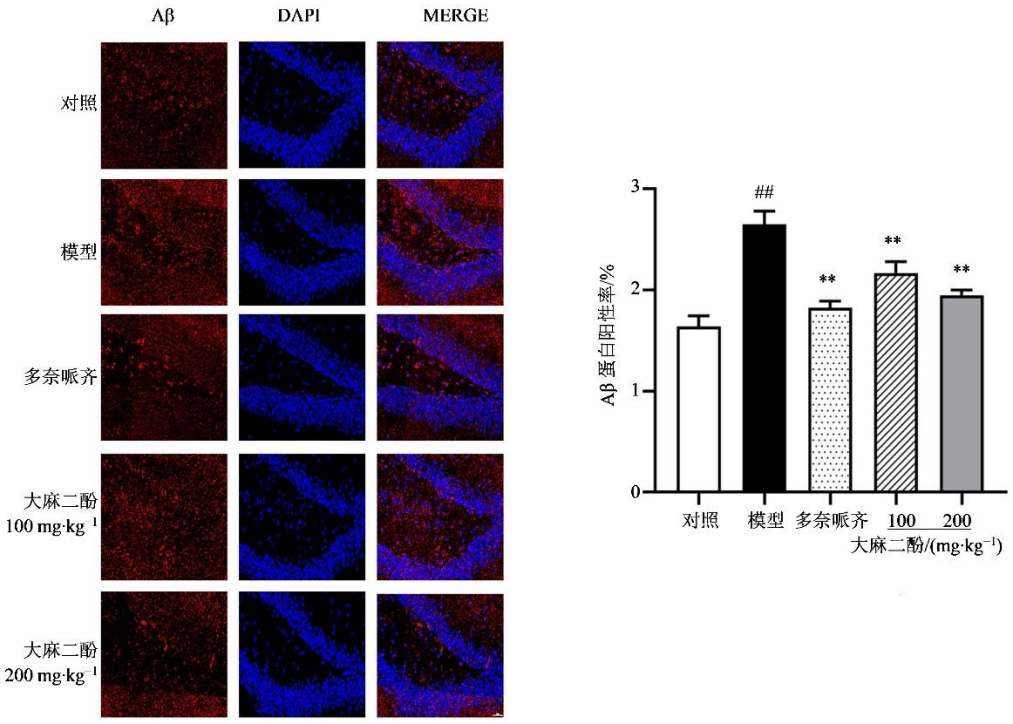
图 4 大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠海马体组织病理学的影响

Fig. 4 Effects of cannabidiol on pathological changes of hippocampal tissue in *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice

Aβ 斑块的累积更明显，Aβ 阳性率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，大麻二酚和多奈哌齐能够降低 Aβ 斑块的累积，Aβ 阳性率显著降低（$P<0.01$），且大麻二酚高剂量较低剂量表现出更强的 Aβ 清除能力，结果表明大麻二酚能够通过降低 AD 小鼠脑内 Aβ 斑块的累积，来延缓 AD 疾病的进程。

3.6 大麻二酚对 AD 小鼠海马体内神经细胞凋亡的影响

为了评价大麻二酚对 AD 小鼠脑内凋亡通路的影响，检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 在小鼠海马组织中的表达程度。结果表明（图 6），与对照组比较，模型组 AD 模型小鼠海马组织中 Bax 和 Caspase-3

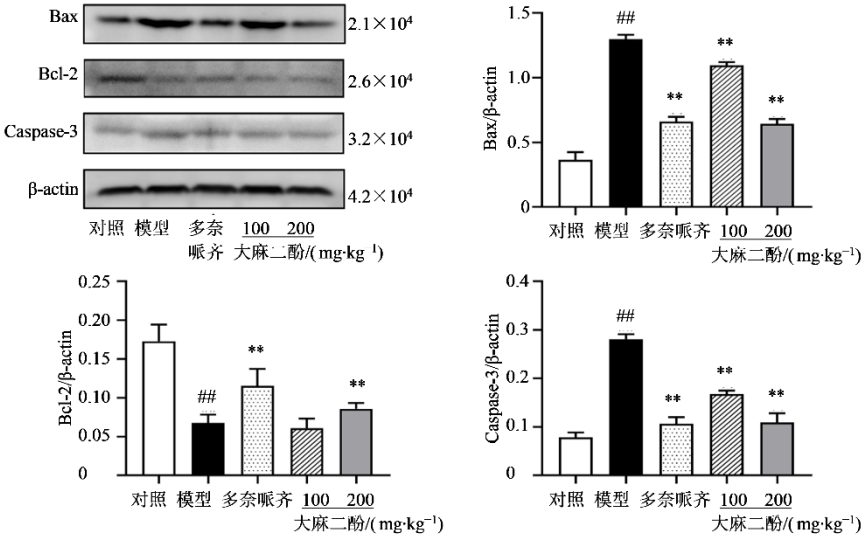


与对照组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{**}P<0.01$。

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 5　大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠海马体中 Aβ 沉积的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig. 5　Effects of cannabidiol on Aβ deposition in hippocampus of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



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

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 6　大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠海马体中神经细胞凋亡蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

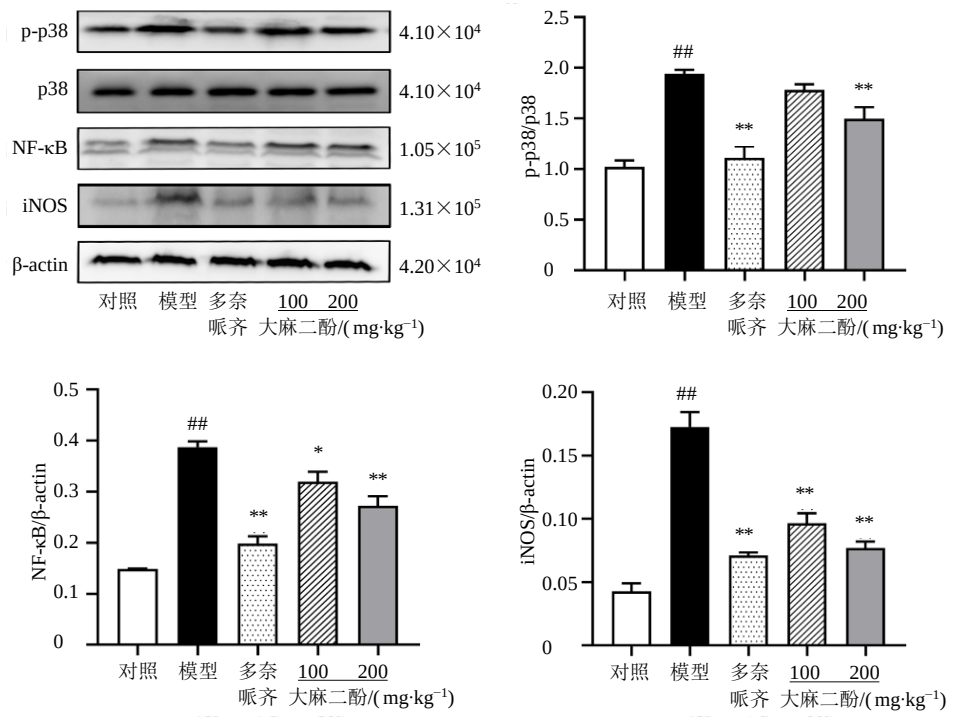
Fig. 6　Effects of cannabidiol on neuronal apoptosis related protein in hippocampus of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$），Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，高剂量大麻二酚及多奈哌齐显著提升了抗凋亡因子 Bcl-2 的表达量（$P<0.01$），降低了促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量（$P<0.01$），有效地抑制了 AD 小鼠海马体中神经细胞的凋亡。

3.7　大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 小鼠海马体内神经炎症的影响

通过检测小鼠海马体内 NF-κB、p-p38 和 iNOS 的表达水平，考察了大麻二酚对 AD 小鼠海马体内

炎症反应的抑制作用。结果显示（图 7），与对照组比较，模型组小鼠海马体中 NF-κB、p-p38 和 iNOS 的表达显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，高剂量大麻二酚和多奈哌齐组小鼠海马体内 NF-κB、p-p38 和 iNOS 的表达被显著抑制（$P<0.01$），且作用呈剂量相关性。结果表明大麻二酚能够通过抑制炎症因子的表达，从而保护神经细胞，降低神经炎症。



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

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 7 大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型海马体中神经炎症的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 7 Effects of cannabidiol on neuroinflammation in hippocampus of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

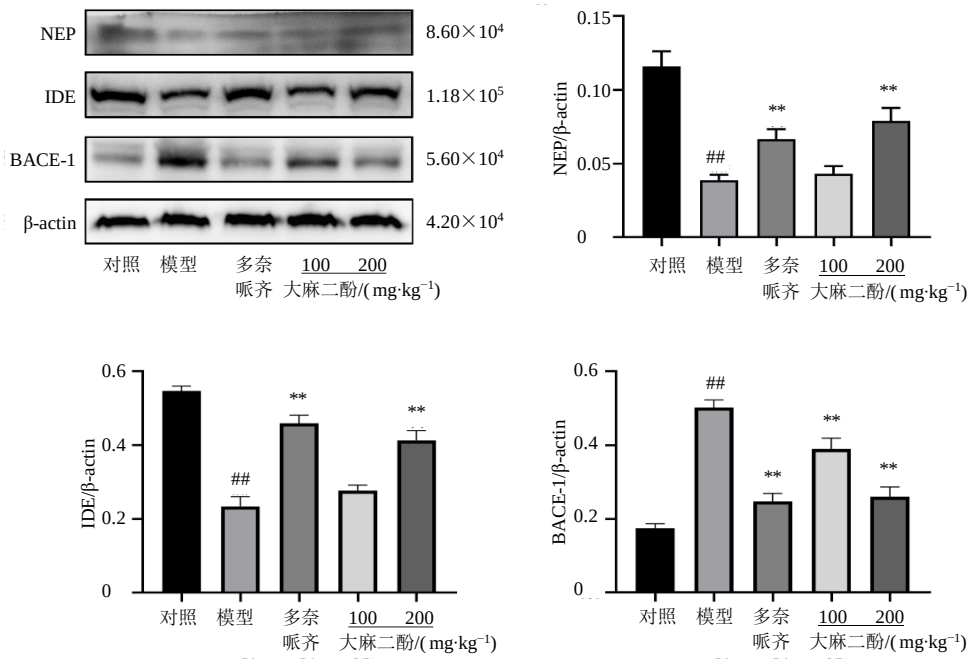
3.8 大麻二酚对 BACE-1 和 Aβ 清除蛋白 NEP、IDE 表达的影响

为了研究大麻二酚对 AD 小鼠海马体内 Aβ 的清除作用，对 NEP、IDE 和 BACE-1 的表达程度进行了检测。结果表明（图 8），与对照组比较，模型组小鼠 NEP、IDE 蛋白表达水平显著降低，BACE-1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，大麻二酚高剂量和多奈哌齐显著抑制 BACE-1 的表达（$P<0.01$），同时显著增加 NEP 和 IDE 的表达（$P<0.01$）。结果表明大麻二酚能够在抑制 BACE-1 活性的同时，提升 NEP 和 IDE 的表达，达到清除 Aβ 蛋白的目的。

4 讨论

本研究结果表明，大麻二酚能够明显抑制促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量，同时提升抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量，有效地拮抗由 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的神经细胞凋亡。在 AD 的发展过程中，Bax 和 Bcl-2 是关于神经元细胞程序性死亡的关键调控因子[13]，Aβ 蛋白所产生的细胞毒性，能够直接导致 Bax 和 Caspase-3 的上调和 Bcl-2 的下调，这使得整个神经系统进入恶性循环[14]。已有研究证实，大麻二酚能够通过降低 Bax、Caspase-3 的表达以及增加 Bcl-2 的表达量，来拮抗 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine（MPTP）诱导的小鼠脑内神经元凋亡[15]，这表示大麻二酚能够通过调控这 3 种凋亡相关蛋白，抑制神经细胞凋亡，抵抗神经元损伤，这与本研究结果一致。另一方面，大麻二酚也能够通过降低 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达，起到在脑铁负荷模型中的抗凋亡作用[16]。

本研究结果证实，大麻二酚能够有效地降低小鼠血清中促炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达水平，增加抗炎因子 IL-10 的水平。Western blotting 分析结果进一步证实大麻二酚通过拮抗 NF-κB/p-p38 MAPK/iNOS 通路蛋白的表达水平，改



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

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{**}P<0.01$ *vs* model group.

图 8　大麻二酚对 *D*-半乳糖/$AlCl_3$ 诱导的 AD 模型海马体中 Aβ 蛋白清除能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 8　Effects of cannabidiol on Aβ clearance ability in hippocampus of *D*-gal/$AlCl_3$-induced AD model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

善 AD 小鼠海马体中的神经炎症。有研究指出，Aβ 可以激活炎症信号通路的启动子 NF-κB[17]，而 NF-κB 的活化又能直接促进 p-p38 MAPK 和 iNOS 的表达[18]，而这些炎症因子的激活将导致神经炎症的加剧。已有研究证实，大麻二酚能够抑制由 Aβ 蛋白诱导的 PC12 细胞中 NF-κB 的活化和 p-p38 MAPK 的表达，并进而抑制 iNOS 的表达以降低细胞内 NO 的产生，这极大地降低了由 Aβ 蛋白诱导神经细胞炎症[8]，这与本研究结果一致。另一方面，在 1 项首次直接在小鼠海马中接种 Aβ42 的体内研究中，大麻二酚剂量相关性地抑制了 Aβ 诱导的 iNOS 和 IL-1β 蛋白的表达，从而降低了 NO 的产生和炎症因子 IL-1β 的释放[19]。值得注意的是，当大麻二酚与火麻中另一种非成瘾性物质大麻萜酚联合给药时，抗炎活性得到了增强，特别是能够更加有效的阻止 NF-κB 的活化和易位，从而抑制炎症反应[20]。这提示未经分离的大麻素，作为一个有效部位，可能拥有更强的抗神经炎症作用。

BACE-1 是一种产生 Aβ 蛋白的关键酶，抑制这种酶的活性已经成为了治疗 AD 的关键靶点之一[21]。已有研究证实，大麻二酚能够在体外直接抑制 BACE-1 的活性[22]。本研究发现，大麻二酚显著降低 AD 小鼠海马内 BACE-1 的表达，而抑制 BACE-1 的生成可以直接降低 Aβ 的产生[23]。另外，NEP 和 IDE 是能够清除 Aβ 且研究最广泛的 2 种酶，这 2 种酶的表达水平在 AD 的影响下会大幅降低[24]。本研究结果表明，大麻二酚明显提高 AD 小鼠海马内 NEP 和 IDE 的表达。有研究证实大麻二酚能够上调充质干细胞中与 AD 病相关的 IDE 编码基因 mRNA 的表达[25]。此外，大麻素中一种大麻二酚结构类似物四氢大麻酚（THC），也被证实能上调 NEP 的表达[26]。以上结果表明大麻二酚能够通过降低 BACE-1 和增加 2 种 Aβ 清除蛋白的表达来抑制 Aβ 蛋白的产生，从而达到治疗 AD 的目的。

大麻二酚能够通过降低神经炎症、抑制神经细胞凋亡、减低 Aβ 蛋白沉积等方式，改善由三氯化铝/*D*-半乳糖诱导的小鼠 AD 症状。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Li H, Liu Y Z, Tian D N, et al. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease [J]. Eur J Med Chem, 2020, 192(4): 112163.

[2] Bhunia S, Kolishetti N, Arias A Y, et al. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: A comprehensive review [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 989717.

[3] Watt G, Karl T. *In vivo* evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 20.

[4] 韩莎莎，张殿杭，李丽. 大麻二酚的药理研究进展[J]. 药物资讯，2019，8(3): 49-55
Han S S, Zhang D H, LI L et al. Advances in pharmacological research of cannabidiol [J]. Pharm Inf, 2019, 8(3): 49-55

[5] Crippa J A, Guimarães F S, Campos A C, et al. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2009.

[6] Seltzer E S, Watters A K, MacKenzie D Jr, et al. Cannabidiol (CBD) as a promising anti-cancer drug [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3203.

[7] Hickey J P, Collins A E, Nelson M L, et al. Modulation of oxidative stress and neuroinflammation by cannabidiol (CBD): Promising targets for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Curr Issues Mol Biol, 2024, 46(5): 4379-4402.

[8] Esposito G, De Filippis D, Maiuri M C, et al. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement [J]. Neurosci Lett, 2006, 399(1/2): 91-95.

[9] Martín-Moreno A M, Reigada D, Ramírez B G, et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation *in vitro* and *in vivo*: Relevance to Alzheimer's disease [J]. Mol Pharmacol, 2011, 79(6): 964-973.

[10] Janefjord E, Mååg J L V, Harvey B S, et al. Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity *in vitro* [J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, 34(1): 31-42.

[11] Calapai F, Cardia L, Sorbara E E, et al. Cannabinoids, blood-brain barrier, and brain disposition [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(3): 265.

[12] Luo Y, Niu F, Sun Z, et al. Altered expression of Abeta metabolism-associated molecules from *D*-galactose/AlCl(3) induced mouse brain [J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(4): 248-252.

[13] Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, et al. Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons [J]. J Neurosci, 1996, 16(23): 7533-7539.

[14] Tajes M, Eraso-Pichot A, Rubio-Moscardó F, et al. Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase-3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease [J]. Neurosci Lett, 2014, 580: 78-82.

[15] Wang L, Wu X H, Yang G, et al. Cannabidiol alleviates the damage to dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mice via regulating neuronal apoptosis and neuroinflammation [J]. Neuroscience, 2022, 498: 64-72.

[16] da Silva V K, de Freitas B S, Garcia R C L, et al. Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload [J]. Transl Psychiatry, 2018, 8(1): 176.

[17] Hwang C J, Choi D Y, Park M H, et al. NF-κB as a key mediator of brain inflammation in Alzheimer's disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2019, 18(1): 3-10.

[18] Jiang N, Lv J W, Wang H X, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates chronic social defeat stress-induced depressive-like behaviors and hippocampal neuroinflammation [J]. Life Sci, 2020, 252: 117669.

[19] Esposito G, Scuderi C, Savani C, et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression [J]. Br J Pharmacol, 2007, 151(8): 1272-1279.

[20] Mammana S, Cavalli E, Gugliandolo A, et al. Could the combination of two non-psychotropic cannabinoids counteract neuroinflammation?effectiveness of cannabidiol associated with cannabigerol [J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(11): 747.

[21] Citron M. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease: Promise and challenge [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(2): 92-97.

[22] Mooko T, Bala A, Tripathy S, et al. Cannabis sativa L. flower and bud extracts inhibited *in vitro* cholinesterases and β-secretase enzymes activities: Possible mechanisms of Cannabis use in Alzheimer disease [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2022, 22(3): 297-309.

[23] Maia M A, Sousa E. BACE-1 and γ-secretase as therapeutic targets for Alzheimer's disease [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(1): 41.

[24] Miners J S, Baig S, Palmer J, et al. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease [J]. Brain Pathol, 2008, 18(2): 240-252.

[25] Libro R, Diomede F, Scionti D, et al. Cannabidiol modulates the expression of Alzheimer's disease-related genes in mesenchymal stem cells [J]. Int J Mol Sci, 2016, 18(1): 26.

[26] Chen R Q, Zhang J, Fan N, et al. Δ9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling [J]. Cell, 2013, 155(5): 1154-1165.

[责任编辑 兰新新]