

tor induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8: 829-840.

- [15] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, *et al*. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis [J]. *Hum Cell*, 1998, 11: 3-12
- [16] Mahoney D J, Cheung H M, Mrad R L, *et al*. Both cIAP1

and cIAP2 regulate TNF α mediated NF- κ B activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (33): 11778-11783

- [17] Krueger A, Schmitz I, Baumann S, *et al*. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase 8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 20633-20640

黄芪总苷对地塞米松和 β -淀粉样蛋白联合诱导大鼠 海马神经元损伤的影响

吴庆四¹, 刘东梅², 徐东芳¹, 姚余有^{1*}, 李卫平²

(1. 安徽医科大学 检验医学系, 安徽 合肥 230032; 2 安徽医科大学 药理学教研室, 安徽 合肥 230032)

摘要:目的 探讨黄芪总苷 (astragalosides) 对地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 与 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -peptide protein, A β) 联合诱导大鼠海马神经元损伤的影响。方法 通过检测海马神经元细胞活性, 探讨黄芪总苷能否抑制 A β 和 DEX 引起海马神经元活力下降; 通过检测海马神经元胞内 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i), 探讨黄芪总苷是否通过降低 [Ca²⁺]_i 抑制海马神经元凋亡; 通过检测 P-tau Thr231 蛋白水平, 进一步探讨黄芪总苷抗 A β 和 DEX 引起的海马神经毒性机制。结果 黄芪总苷 (10、20、40 μ g/mL) 对体外 DEX (10 μ mol/L) + A β ₂₅₋₃₅ (5 μ mol/L) 引起胎鼠海马神经元的损伤有保护作用 ($P < 0.01$); 黄芪总苷能明显降低 DEX (10 μ mol/L) + A β ₂₅₋₃₅ (5 μ mol/L) 升高的海马神经元 [Ca²⁺]_i、P-tau 蛋白水平 ($P < 0.05$)。结论 黄芪总苷对 A β 和 DEX 诱导的大鼠海马神经元损伤有一定的保护作用。

关键词: 黄芪总苷; β -淀粉样蛋白; 地塞米松; 海马神经元

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1834-05

Neuroprotective effects of astragalosides against amyloid β -protein and DEX-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons

WU Qing-si¹, LIU Dong-mei², XU Dong-fang¹, YAO Yu-you¹, LI Wei-ping²

(1. Department of Laboratory Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Objective To study the effect of astragaloside (AST) on the injury induced by amyloid β -protein (A β) plus Dexamethasone (DEX) in rat hippocampal neurons. **Methods** *In vitro*, the effects of AST on hippocampal neurons cell death with A β plus DEX were detected by MTT assay and intracellular calcium ([Ca²⁺]_i); The effects of AST on phospho-tau (P-tau) protein were analyzed to explore the mechanisms responsible for DEX enhanced A β -induced cell death in hippocampal neurons. **Results** AST (10, 20, and 40 μ g/mL) could protect hippocampal neurons against DEX (10 μ mol/L) plus A β ₂₅₋₃₅ (5 μ mol/L)-induced hippocampal neuronal injury of fetal rat *in vitro* ($P < 0.01$). AST could inhibit the increased levels of [Ca²⁺]_i and P-tau protein level induced by DEX (10 μ mol/L) plus A β ₂₅₋₃₅ (5 μ mol/L) ($P < 0.05$). **Conclusion** AST could protect hippocampal neuron against synergistic neurotoxicity of A β and DEX.

Key words: astragalosides (AST); amyloid β -protein (A β); Dexamethasone (DEX); hippocampal neurons

随着世界人口的老齡化, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 已成为引起人类死亡的

第四大疾病。AD 主要病理特征是选择性的突触和神经元损伤、神经纤维缠绕、胶质细胞激活和老年

①收稿日期: 2010-03-12

基金项目: 安徽省高校省学术带头人科学研究资助项目 (2005hzb18); 安徽省教育厅高等学校优秀青年人才基金资助项目 (2009SQZRZ050)

作者简介: 吴庆四 (1977-), 男, 安徽省淮南市人, 讲师, 硕士, 主要从事神经药理学研究。

Tel: (0551) 3869174 E-mail: qswu1977@163.com

* 通讯作者 姚余有 Tel: (0551) 3869174 E-mail: yaoanqi71@yahoo.com

斑,且主要分布在额叶和海马区^[1]。 β 淀粉样蛋白 (amyloid β peptide protein, A β) 是构成老年斑或淀粉样斑块的主要成分^[2],在 AD 的发病和进展中起关键作用^[3]。糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 是应用最为广泛的激素类药物,以往的研究显示,在体内和体外,应激水平的 GCs 通过增加神经元淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的产生和 β secretase 的活性,促进 A β 形成^[4]。本课题组前期研究结果表明,GCs 明显加重 A β 的海马神经元毒性^[5]。由于 GCs 和 A β 水平均随年龄的增加而升高,且很多 AD 病人的 GCs 和 A β 水平都很高,故 GCs 加重 A β 引起海马神经元损伤可能是引起或加重 AD 发病的重要原因。

黄芪为豆科植物膜荚黄芪和蒙古黄芪的干燥根,具有补中益气、扶正固本和促智等功效。黄芪总苷 (astragalosides) 是黄芪的有效部位^[6,7],具有抗炎、免疫调节和防治缺血引起的脑损伤作用^[8]。已有实验研究显示^[9],黄芪总苷对 A β 引起的海马神经元损伤有保护作用,但黄芪总苷对 GCs 和 A β 联合作用引起的海马神经元损伤是否有保护作用尚未见报道。本课题拟在体外培养海马神经元基础上,研究黄芪总苷对 GCs 和 A β 联合作用引起的海马神经元损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物:成年健康 SD 大鼠,体质量 220~280 g,清洁级,由安徽医科大学实验动物中心提供。以雌性与雄性比例为 2:1 于每日 19:00 配对合笼,次日 8:00 检查,查到黄白色粒样阴栓存在,同时进行阴道涂片镜检,阳性者定为妊娠 0.5 d,并根据体质量增长曲线排除假孕,至孕 18~18.5 d 剖腹,取胎鼠。

1.2 主要药品、试剂和仪器:黄芪提取物(含黄芪总苷 68%,合肥恒星药物研究所提供,批号 20051018,用于细胞培养的黄芪总苷,先用少量无水乙醇溶解,再加双蒸水,高压蒸气灭菌);地塞米松 (Dexamethasone, DEX)、A β_{25-35} 为 Sigma 产品;NB 培养液 (Gibco 公司);甲胍溶解液 (含 40% 二甲基甲酰胺、10% SDS, pH 4.0);鼠抗 β -actin 单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP (武汉博士德生物工程有限公司);兔抗 tau[thr²³¹] 单克隆抗体 (Santbio);Western blotting 化学发光检测试剂盒 (Pierce 公司)。电泳仪 (北京六一仪器厂);半自动生化分析仪 (Biosystem);CO₂ 培养箱 (SANYO);XDS-1B 倒置生物显微镜 (Olympus 公司产品);510META

激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司产品)。

1.3 海马神经元的培养:无菌条件下分离胎鼠海马,经 0.125% 胰蛋白酶 37 °C 消化 20 min 后终止消化,以 1×10^6 / mL 和 5×10^5 / mL 密度分别接种于 6 孔和 96 孔板中,置 5% CO₂、37 °C 湿化的培养箱内培养,第 8 天将 NB 完全培养液换成不含 B27 的 NB 培养液,同时在地塞米松组和地塞米松+ A β 组加入终浓度为 10 μ mol/L 的地塞米松,第 9 天在 A β 组和地塞米松+ A β 组加入终浓度为 5 μ mol/L 的 A β_{25-35} ,地塞米松+ A β 组+ 黄芪总苷组在 A β_{25-35} 加入前 4 h 加入黄芪总苷 (10、20、40 μ g/mL)。拟行细胞活力检测的标本,在细胞生长期分别加入不同浓度地塞米松和 A β_{25-35} 作用 24 h 后,进行细胞活力检测。

1.4 海马神经元的形态观察:培养第 10 天,自 CO₂ 培养箱内取出培养板,在倒置显微镜下用图像采集系统拍摄记录体外培养的细胞生长状况。

1.5 MTT 法检测细胞活力:向 96 孔培养板中加入 20 μ L 用低糖 DMEM 培养液配制的 MTT 溶液 (终浓度 0.5 mg/mL),置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中孵育 4 h 后,吸出全部培养液,再向每孔中加入甲胍溶液 100 μ L,室温避光放置 24 h 后,在波长 550 nm 处,用酶标仪测定各孔吸光度 (A) 值,以反映细胞活力。

1.6 细胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) 的测定:经 10 μ mol/L 地塞米松处理 24 h 和 20 μ g/mL 黄芪总苷处理 4 h 后,加入 5 μ mol/L A β_{25-35} 作用 10、30、60 min,于 37 °C 避光条件下用 DMEM 液稀释的 Fluor-3/AM (终浓度为 2 μ mol/L,内含 0.002% 的 F-127) 荷载,40 min 后用 D-Hank's 液洗涤 3 次,在激发波长 488 nm、发射波长 533 nm 下,用激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 测定神经元的荧光强度,采用形态学图像分析系统分析胞内相对荧光强度 (F) 以反映 [Ca²⁺]_i。

1.7 Western blotting 检测 P-tau 蛋白水平

1.7.1 细胞蛋白质的提取:收集的蛋白经 BCA 法蛋白定量后加入上样缓冲液调蛋白至相同浓度, -70 °C 冰箱保存。

1.7.2 Western blotting:SDS 电泳分离的蛋白经半干电转移法转移到硝酸膜上,室温下 5% 脱脂奶粉作用 2 h 后加入 P-tau 单克隆抗体 (1:5 000),二抗浓度为 1:170 000,孵育 1 h,用化学发光显色系统显示蛋白条带,感光在胶片上。实验重复 3 次,以 β -actin 作内参照,分析条带的变化趋势。

1.8 统计学处理: 各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用 students' *t* test.

2 结果

2.1 各组细胞形态学观察结果: 光镜下观察, 对照组胎鼠海马神经元, 胞体呈锥形或多极形, 折光性强, 核不可见, 突起间相互连接形成网络状。神经元经地塞米松和 $A\beta_{25-35}$ 处理后, 胞体的折光性下降, 突起收缩, 甚至断裂, 部分胞体溶解及细胞死亡。在 $A\beta_{25-35}$ 加入前 4 h 加入黄芪总苷则能明显改善 $A\beta_{25-35}$ 对神经元的形态学损伤 (图 1)。



A 对照组 B $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$
G $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芪总苷
A control group B $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$
G $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AST

图 1 黄芪总苷对海马神经元形态学的影响

Fig 1 Effect of AST on morphology in hippocampal neuron

2.2 MTT 检测细胞活力: 结果显示黄芪总苷 (10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 地塞米松 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol}/\text{L}$) 组的 A 值明显高于地塞米松 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol}/\text{L}$) 组 ($P < 0.01$), 以终质量浓度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 黄芪总苷作用最明显。提示黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 神经元损伤有保护作用 (表 1)。

2.3 黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 升高的海马神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响: 细胞内 Ca^{2+} 与 Fluor-3 结合后, 采用 LSCM 检测荧光强度。结果显示, 地塞米

松 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol}/\text{L}$) 可使海马神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 10 min 时达峰值, 以后逐渐下降; 黄芪总苷 ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) 能明显降低地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 升高的 $[Ca^{2+}]_i$ (图 2 和表 2)。说明黄芪总苷可能通过降低海马神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 抑制地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 引起的海马神经元损伤。

表 1 黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 损伤神经元活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of AST on ability of hippocampal neuron injured by DEX plus $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

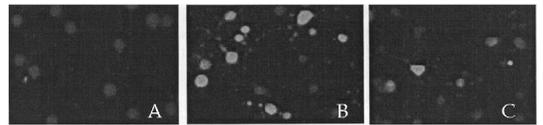
组别	给药量	A
对照	-	0.529 0 ± 0.004 8 [*]
地塞米松	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.518 0 ± 0.005 9 [*]
$A\beta_{25-35}$	$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.498 0 ± 0.003 7 [*]
地塞米松 + $A\beta_{25-35}$	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.450 0 ± 0.009 0 [*]
地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ + 黄芪总苷	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.475 0 ± 0.001 2 ^{△△}
	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.491 0 ± 0.009 8 ^{△△}
	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.482 0 ± 0.001 9 ^{△△}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.01$

与地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 组比较: ^{△△} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

^{△△} $P < 0.01$ vs DEX + $A\beta_{25-35}$ treated group



A 对照组 B $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$
G $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芪总苷
A control group B $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$
G $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AST

图 2 黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 损伤的海马神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

Fig. 2 Effect of AST on $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal neuron injured by DEX + $A\beta_{25-35}$

表 2 黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 损伤的海马神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Inhibition of AST on increased $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal neuron injured by DEX + $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

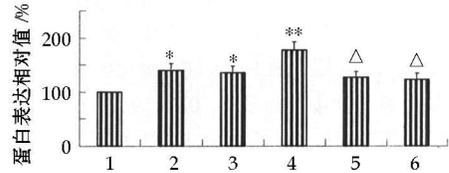
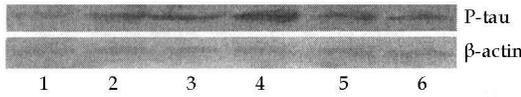
组别	给药量	F / %		
		10 min	30 min	60 min
对照	-	103.00 ± 4.24	102.00 ± 3.76	100.00 ± 2.57
地塞米松 + $A\beta_{25-35}$	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1690.00 ± 5.42 ^{**}	158.00 ± 4.91 ^{**}	146.00 ± 4.72 ^{**}
地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ + 黄芪总苷	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	135.00 ± 4.68 ^{△△}	127.00 ± 3.92 ^{△△}	121.00 ± 4.54 ^{△△}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 组比较: ^{△△} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{△△} $P < 0.01$ vs DEX + $A\beta_{25-35}$ treated group

2.4 黄芪总苷对地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 损伤海马神经元 P-tau 蛋白水平的影响: Western blotting 结果显示, 地塞米松 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol}/\text{L}$) 作用海马神经元后, 海马神经元 P-tau Thr231 表达量显著升高; 地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 组与同剂量的地塞米松和 $A\beta_{25-35}$ 组

相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。黄芪总苷 (10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 地塞米松 ($10 \mu\text{mol}/\text{L}$) + $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol}/\text{L}$) 组 P-tau Thr231 蛋白表达量明显低于地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 组 ($P < 0.05$), 提示黄芪总苷可下调地塞米松 + $A\beta_{25-35}$ 升高的 P-tau-Thr231 蛋白表达 (图 3)。



1 对照组 2 地塞米松组 3 Aβ₂₅₋₃₅组 4 地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 5 地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅+ 10 μg·mL⁻¹ 黄芪总苷
6 地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅+ 20 μg·mL⁻¹ 黄芪总苷 与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅组比较: ^Δ P < 0.05
1 control group 2 DEX 3 Aβ₂₅₋₃₅ 4 DEX+ Aβ₂₅₋₃₅ 5 DEX+ Aβ₂₅₋₃₅+ 10 μg·mL⁻¹ AST
6 DEX+ Aβ₂₅₋₃₅+ 20 μg·mL⁻¹ AST * P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group; ^Δ P < 0.05 vs Dex+ Aβ₂₅₋₃₅ group

图 3 黄芪总苷对地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 损伤的海马神经元 P tau 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of AST on protein level of P tau in hippocampal neuron injured by DEX+ Aβ₂₅₋₃₅ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

AD 是一种多原因引起的涉及多种病理表现的“多因异质性疾病”，可能与中枢神经系统 Aβ 的聚集、钙自体平衡失调等多种因素有密切关系^[10]。目前国内外尚无医治该病的良药，所以 AD 的研究和防治已成为亟待解决的问题。

Aβ 是构成老年斑或淀粉样斑块的主要成分，随着研究的逐渐深入，越来越多的证据表明 Aβ 在 AD 的发生、发展中起主导作用^[11]。GCs 作为一种公认的应激激素，其受体广泛分布于中枢神经系统，尤其是脑组织的海马。正常浓度下的 GCs 不仅能够维持机体正常的生长发育，而且参与体内多种代谢过程和中枢神经系统功能的调节，但长期大剂量应用 GCs 会影响到中枢神经系统中海马神经元的正常生理功能，引起海马神经元萎缩、丢失甚至死亡^[12]。有研究显示，无论是在 Tg2576APP 转基因鼠，还是在非转基因鼠，Aβ 浓度均随着鼠龄的增加而升高^[13]；另有研究显示，在老年人和动物，尤其在阿尔茨海默病患者，GCs 水平明显增高^[14]。根据以上资料结合本课题组前期实验结果，推测 GCs 促进 Aβ 的海马神经元细胞毒性可能是引起或加重阿尔茨海默病的原因之一。

前期实验结果提示地塞米松可协同促进 Aβ 引起的海马神经元活力下降，因此，本研究观察了黄芪总苷对地塞米松+ Aβ 损伤海马神经元活力的影响。结果显示黄芪总苷 (10、20、40 μg/mL) 可明显提高海马神经元活力，提示黄芪总苷对地塞米松+ Aβ 引起的海马神经元损伤有保护作用。

钙离子是大脑重要的细胞内信使，是维持神经元发育、突触传递和可塑性的重要物质。保持胞内的钙稳态对细胞的存活和突触的可塑性是非常重要的^[15]。以往的研究显示，Aβ₁₋₄₀ 可通过质膜上 Ca²⁺ 通道介导钙离子内流引起 [Ca²⁺]_i 升高^[16]；GCs 可

通过抑制神经元细胞膜 Ca²⁺-ATPase 1 抑制 Ca²⁺ 外流^[17]。Fluo-3 与胞内 Ca²⁺ 结合后，在波长 488 nm 的激发光作用下产生荧光，荧光的强度及分布即反映了胞内 Ca²⁺ 的浓度及分布。本课题组前期研究结果显示地塞米松+ Aβ 组 [Ca²⁺]_i 与同剂量的地塞米松和 Aβ 组相比差异有统计学意义 (P < 0.05)^[18]。结果提示，地塞米松可通过提高 [Ca²⁺]_i，进一步增强 Aβ 的神经元毒作用。本研究显示黄芪总苷 (20 μg/mL) 能明显降低地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 升高的 [Ca²⁺]_i。提示黄芪总苷对神经细胞的保护作用可能与降低 [Ca²⁺]_i 有关。

Tau 是一种微管相关蛋白，在调节神经元微管动力、轴突运输和神经突触生长中起重要作用。如果 tau 被高度磷酸化，将引起 tau 蛋白的聚集和微管失去稳定性，最终导致神经元死亡^[19]。Tau 蛋白共有 21 个 tau ser 和 tau thr 磷酸化位点，因 thr231 位点直接影响 tau 与微管结合，且在早期的神经纤维缠结 (Neurofibrillary tangle, NFT) 中就有大量 P-tau thr231 存在^[20]，因此，选用 Thr231 位点的异常磷酸化进行研究。本研究显示，地塞米松、Aβ₂₅₋₃₅ 作用海马神经元后，海马神经元 P-tau Thr231 表达量显著升高；地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 组与同剂量的地塞米松和 Aβ₂₅₋₃₅ 组相比，差异有统计学意义 (P < 0.05)。黄芪总苷 (10、20 μg/mL) + 地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 组 P-tau Thr231 蛋白表达量明显低于地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 组 (P < 0.05)，提示黄芪总苷可下调地塞米松+ Aβ₂₅₋₃₅ 升高的 P-tau Thr231 蛋白表达水平。由于海马神经元 [Ca²⁺]_i 升高可导致细胞周期依赖的蛋白激酶 5 (cyclin dependent kinase 5, CDK5) 和糖原合成酶激酶 3β (Glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β) 活性增加，促进 tau 某些位点高度磷酸化^[21]，推测黄芪总苷通过降低海马神经元 [Ca²⁺]_i 水平可能是下调海马神经元 P-tau

Thr231 蛋白表达量的重要原因。

综上所述,黄芪总苷对地塞米松和 $A\beta_{25-35}$ 引起的海马神经元损伤有一定的保护作用,其作用机制可能与黄芪总苷的抗氧化、抑制 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关,具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Rohn T T, Head E, Su J H, *et al.* Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(1): 189-198
- [2] Ramalho R M, Ribeiro P S, Sola S, *et al.* Inhibition of the E2F1/p53/Bax pathway by tauroursodeoxycholic acid in amyloid beta peptide induced apoptosis of PC12 cells [J]. *J Neurochem*, 2004, 90: 567-575
- [3] Dermaut B, Kumar Singh S, Jonghe C D, *et al.* Cerebral amyloid angiopathy is a pathogenic lesion in Alzheimer's disease due to a novel presenilin 1 mutation [J]. *Brain*, 2001, 124(12): 2383-2392
- [4] Green K, Billings L M, Rozen daal B, *et al.* Glucocorticoids increase amyloid β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(35): 9047-9056
- [5] 吴庆四, 徐东芳, 姚余有, 等. 糖皮质激素促 β -淀粉样蛋白致海马神经元损伤 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(3): 178-180
- [6] 王畅, 张艳军, 冯英, 等. 黄芪甲苷对短暂性前脑缺血模型大鼠海马神经再生的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 754-758
- [7] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, *et al.* Effects of astragaloside IV derivative on heart failure in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53
- [8] 李维祖, 明亮, 何婷, 等. 黄芪提取物对大鼠海马神经元迟发性死亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(5): 584-587
- [9] 刘东梅, 徐东芳, 刘治娟, 等. 黄芪提取物保护 $A\beta$ 致海马神经元损伤 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(4): 543-547
- [10] Milton N G. Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease: implications for treatment [J]. *Drugs*

Aging, 2004, 21(2): 81-100

- [11] Yankner B A, Duffy L K, Kirschner D A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid protein: reversal by tachykinin neuropeptides [J]. *Science*, 1990, 250: 279-282
- [12] McEwen B S, Magarinos A M. Stress effects on morphology and function of the hippocampus [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1997, 821(1): 27-284
- [13] Fukumoto H, Rosene D L, Irizarry M C, *et al.* β Secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 719-725
- [14] Green K, Billings L M, Rozen daal B, *et al.* Glucocorticoids increase amyloid β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(35): 9047-9056
- [15] Stevens T R, Krueger S R, Picciotto M R, *et al.* Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L type calcium channel inactivation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(31): 10093-10099
- [16] Vargas J, Alarcon J M, Rojas E. Displacement currents associated with the insertion of Alzheimer disease amyloid β -peptide into planar bilayer membranes [J]. *Biophysical*, 2000, 79: 934-944
- [17] Bhargava A, Mathias R S, Pearce D, *et al.* Glucocorticoids prolong Ca^{2+} transients in hippocampal derived H19-7 neurons by repressing the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(7): 1629-1637
- [18] 徐东芳, 刘东梅, 李卫平, 等. 糖皮质激素促进 β -淀粉样蛋白对海马神经元损伤的研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 12(6): 435-438
- [19] Ishii T, Furuoka H, Muroi Y, *et al.* Inactivation of integrin linked kinase induces aberrant tau phosphorylation via sustained activation of glycogen synthase kinase 3 in N1E 115 neuroblastoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26970-26975
- [20] Johnson G V W, Stoothoff W H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(24): 5721-5729
- [21] Gong C X, Liu F, Grundke Iqbal, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2005, 115: 813-838

神经元营养活性肽对帕金森病大鼠小胶质细胞保护作用及机制研究

殷盛明¹, 于德钦¹, 彭岩², 赵杰^{1*}, 唐锦^{3**}, 张万琴¹

(1. 大连医科大学 生理学教研室, 辽宁 大连 116044; 2 大连医科大学 机能实验室, 辽宁 大连 116044;

3 大连医科大学, 辽宁 大连 116044)

摘要:目的 观察从东亚钳蝎中提取的神经元营养活性肽 (NNAP) 对帕金森病 (PD) 大鼠的保护作用及其对小胶质细胞的影响。方法 采用 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 制备 PD 大鼠模型, 通过行为学检测和中脑黑质致密部的酪氨酸羟化酶 (TH) 以及 OX-42 的免疫组织化学染色, 同时设立实验给药组, 观察 NNAP 对 PD 大鼠的旋转行为以及黑质 DA 能神经元和小胶质细胞的影响。结果 经 ip NNAP [蛋白浓度为 0.05 mg/(kg·d)] 处理 7 d 后的 PD 大鼠旋转次数较模型组明显减少 ($P < 0.01$)。在 6-OHDA 大鼠损毁侧, 实验给药组与模型组相比, 在黑质处

①收稿日期: 2010-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770737); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (2008180); 高等学校博士学科点专项科研新教师基金 (20092105120006); 大连医科大学大学生科技创新活动基金资助项目

作者简介: 殷盛明 (1974-), 女, 博士后, 副教授, 研究方向为神经变性疾病的治疗和发病机制。

Tel: (0411) 86110287 E-mail: shengmingyin@yahoo.com.cn

* 通讯作者 赵杰 Tel: (0411) 86110005 E-mail: zhaoj@dlmedu.edu.cn

** 唐锦 大连医科大学 2006 级学生