

洗心汤颗粒对散发性老年性痴呆模型大鼠脑内 Tau 蛋白毒性的影响

第五永长¹, 田金洲², 时 晶²

1. 陕西中医学院中医临床医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京 100029

摘要: 目的 研究洗心汤颗粒对散发性老年性痴呆 (SAD) 大鼠模型脑内促 Tau 蛋白毒性形成的重要位点 Thr231、Ser422 磷酸化的影响, 探讨洗心汤颗粒防治 SAD 的作用机制。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组, SAD 模型组, 多奈哌齐阳性对照组, 洗心汤颗粒低、中、高剂量 (7.61、15.21、30.42 g/kg) 组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 2 个月。以免疫组化法及 Western blotting 法检测大鼠脑组织 Tau 蛋白重要位点 Thr231、Ser422 的磷酸化水平。结果 与 SAD 模型组相比, 洗心汤颗粒显著减少 SAD 模型大鼠海马组织 Thr231、Ser422 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 多奈哌齐则无显著作用。结论 洗心汤颗粒抑制 Tau 蛋白重要位点的过度磷酸化及其 Tau 蛋白毒性, 遏制 SAD 的病理进展。

关键词: 洗心汤颗粒; 散发性老年性痴呆; Tau 蛋白毒性; Western blotting; 磷酸化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1448-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.017

Effect of Xixin Decoction Granule on Tau protein toxicity in brain of rats with sporadic Alzheimer's disease

DIWU Yong-chang¹, TIAN Jin-zhou², SHI Jing²

1. Clinical College of Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. First Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish sporadic Alzheimer's disease (SAD) rat model, to investigate the effects of Xixin Decoction Granule (XDG) on the phosphorylation of Thr231 and Ser422 sites as the important promoters of Tau protein toxicity in the brain of SAD rat, and to explore the possible mechanism of XDG on the prevention and treatment of SAD. **Methods** The SPF male SD rats were randomly divided into Sham (S), model (M), donepezil (D, positive control), low-, mid-, and high-dose XDG (LX, MX, and HX, 7.61, 15.21, and 30.42 g/kg) groups, with ig administration once daily for two months. The immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the phosphorylation levels of Thr231 and Ser422 sites in Tau protein in brain of rats with SAD. **Results** Compared with M group, XDG could significantly decrease the expression of Thr231 and Ser422 sites in the hippocampus of SAD rats ($P < 0.05$, 0.01). There were no obvious differences between D and M groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The results suggest that XDG could inhibit the hyperphosphorylation of key sites in site protein and Tau toxicity, so as to prevent SAD pathological progress.

Key words: Xixin Decoction Granule; sporadic Alzheimer's disease; Tau protein toxicity; Western blotting; phosphoglation

老年性痴呆即阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是严重影响人类健康和生活质量的常见疾病, 发病的确切机制尚未明确, 也无特效治疗方法。目前公认的 AD 组织病理变化是细胞外的老年斑沉积 (SP) 和细胞内神经原纤维缠结 (NFT), 其中 NFT 的数量和患者的痴呆程度呈明显的正相关, 是 AD 的核心病理改变。微管蛋白 Tau 的异常过度磷酸化是引起 AD 患者 NFT 的直接原因^[1]。异

常过度磷酸化的 Tau 蛋白主要通过获取细胞毒性作用, 而不是因为丧失生物活性而促进神经元退行性病变的^[2], 许多位点的磷酸化可使 Tau 蛋白变成毒性分子, 从而拮抗正常微管相关蛋白的作用^[3]。

清代名医陈士铎创立的洗心汤 (主要由人参、半夏、茯神、附子、菖蒲等组成) 久经临床验证已被现代中医专著列为治疗 AD 的代表方^[4], 具有升发阳气、祛逐阴邪、开郁化痰、平衡阴阳之功效,

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973738)

作者简介: 第五永长 (1971—), 男, 汉族, 医学博士, 副主任医师、副教授、硕士生导师, 主要研究方向为老年神经血管疾病危险因素、发病机理与中西医结合防治。Tel: (029)38005693 13629189161 E-mail: ycdw07@yahoo.com.cn

方中主要药物人参、石菖蒲具有显著的益智与抗衰老作用^[5-6]。本实验研究洗心汤对链脲佐菌素(STZ)致散发性AD(SAD)模型^[7]大鼠脑内与Tau蛋白毒性形成直接相关的重要位点Thr231、Ser422磷酸化水平的影响,以期揭示该方改善学习记忆能力^[8]、防止SAD病理进展的可能作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

洗心汤颗粒(Xixin Decoction Granule, XDG), 999企业集团医药股份有限公司,批号0908032; STZ粉针剂, Merck公司,批号K0050; 多奈哌齐胶囊,中美合资西安海欣制药有限公司,批号091201。Tau-5抗体,包含磷酸化和非磷酸化Tau蛋白, Biosource公司, Western blotting检测时1:1 000稀释; P-Tau-Thr231抗体(免疫组化和Western blotting检测共用), Novous Bio公司,免疫组化染色时1:400稀释, Western blotting检测时1:1 000稀释; P-Tau-Ser422抗体(免疫组化检测用), Abcam公司,免疫组化染色时1:200稀释; P-Tau-Ser422抗体(Western blotting检测用), Biosource公司, Western blotting检测时1:1 000稀释; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗, Beyotime公司。Folin酚蛋白定量试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量(270±20)g,由第四军医大学实验动物中心提供,合格证号为0034642,使用许可证号为SYXK(陕)2007-2010。

1.3 仪器

DQP-9010型石蜡冷冻切片机,上海天缘医用生物有限公司; YQ-3型电动匀浆机, EHSY西域公司; CR22GII型高速冷冻离心机,日本日立公司; Motic Med 6.0数码医学图像分析系统, Motic公司; PC200电泳仪,美国BIO-RAD公司; PC200转移电泳仪,美国BIO-RAD公司; Syngene GBOX iChemie化学发光凝胶成像多功能系统,英国Syngene公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

大鼠随机分为假手术组,模型组,多奈哌齐阳性对照组,洗心汤颗粒低、中、高剂量组,每组14只。参考Sharma等^[9]的方法,所有大鼠经10%水合氯醛(3.8 mL/kg)麻醉后,固定于大鼠立体定位仪上,常规消毒皮肤,颅骨正中矢状切口,分离骨膜,锥颅器钻开颅骨,暴露硬脑膜。除假手术组外,其

余组大鼠均用微量注射器于侧脑室注射STZ 3 mg/kg(溶于人工脑脊液,质量浓度为25 mg/mL,给药体积约18 μL)。参考文献方法^[10]确定坐标:前囟后1.5 mm,矢状缝左右旁开1.5 mm,脑表面下3.5 mm。第3天按相同剂量重复注射1次;假手术组注射等量人工脑脊液。造模后大鼠死亡率19.2%。

于第2次注射STZ 21 d后开始给药。洗心汤颗粒(每29 g颗粒剂相当于原方生药169 g)高、中、低剂量组大鼠分别ig给予洗心汤颗粒30.42、15.21、7.61 g/kg(以60℃双蒸水溶解稀释);阳性对照组ig 0.92 mg/kg多奈哌齐(以60℃双蒸水溶解稀释);模型组及假手术组给予等体积的双蒸水。各组均每日给药1次,给药体积7.5 mL/kg,连续给药2个月。实验过程中大鼠自由摄食和饮水。

2.2 行为学实验

2.2.1 定位航行实验 大鼠给药结束后,从平台所在象限的相邻象限中选一入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(即逃避潜伏期)及游泳距离,实验进行5 d以检测大鼠的学习和记忆能力。

2.2.2 空间搜索实验 第6天撤除平台,任选一入水点将大鼠放入水中,测120 s内大鼠在原平台所在象限和其他象限的游泳时间,检测大鼠记忆保持能力。

2.3 脑组织样品采集与处理

全部大鼠结束行为学测试后,每组随机选取6只大鼠进行免疫组化检测。大鼠ip 10%水合氯醛4.0 mL/kg麻醉,仰卧位、伸展固定四肢,剪开胸腹充分暴露心脏和肝脏,迅速插导管于左心室至升主动脉并固定,同时剪开右心耳,快速灌注生理盐水100 mL至肝脏完全变白,右心室流出澄清液体后,更换4%多聚甲醛,先快后慢继续灌注30 min后断头,完整取出脑组织,置固定液中,24 h后行石蜡包埋切片。每只大鼠海马CA1区出现后连续冠状切片,放入0.01 mol/L PBST(由氯化钠8.5 g、磷酸氢二钠3.15 g、磷酸二氢钠0.2 g加蒸馏水溶解定容至1 L,再加1 mL聚山梨酯-20混匀制成的缓冲液)溶液中进行免疫组化染色。每组选取5只大鼠进行Western blotting检测,取大鼠新鲜海马组织置液氮中速冻后保存于-70℃冰箱备用。

2.4 Western blotting检测Thr231和Ser422位点的磷酸化水平

按照Folin酚蛋白定量试剂盒说明提取大鼠海马组织蛋白质,并测定海马组织蛋白的量。将蛋白

行 SDS-PAGE 电泳、转膜。免疫反应时，分别加入相应二抗（按 1 : 1 000 稀释）；化学发光检测时，将膜蛋白朝上，放入 Syngene GBOX iChemi 化学发光凝胶成像多功能系统的智能暗箱中，调好焦距，将发光液 A 和 B 两种试剂等体积混匀后，用移液器均匀的加在膜上，充分接触后关上暗箱进行曝光。利用多功能系统的 GeneSnap 图像采集软件和 GeneTools 图像分析软件保存并分析图像各条带的光密度值，分析 Tau 蛋白 Thr231 和 Ser422 位点的磷酸化情况。

2.5 免疫组化法检测 Thr231 和 Ser422 磷酸化水平

大鼠脑组织石蜡切片二甲苯常规脱蜡后，新鲜 3% H₂O₂ 灭活内源性酶处理 10 min，蒸馏水洗 2 min 共 3 次。切片置于枸橼酸盐缓冲液（pH 6.0）中热修复抗原 15 min，PBS（pH 7.4）洗 5 min 共 3 次，滴加 5% BSA 封闭，37 °C 下放置 20 min，吸去多余液体，不洗；滴加稀释的一抗，4 °C 过夜，PBS 洗 2 min 共 3 次（用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对

照）；滴加相应的二抗，37 °C 孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min；滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液，37 °C 孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min；滴加 DBA，室温下作用 5~30 min；苏木素复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。取相同位置大鼠脑片，物镜观察（×200）CA1 区 p-Tau-Thr231 和 p-Tau-Ser422 表达阳性细胞，并以 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统采集图像并进行分析，记录每组图像中阳性细胞数、阳性细胞总面积和积分光密度值。

2.6 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS17.0 进行统计分析，组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 SAD 大鼠行为学的影响

洗心汤对 SAD 大鼠在定位航行实验中行为的影响见表 1 和 2。从实验第 3 天开始，与模型组相比，多奈哌齐组、洗心汤颗粒各组大鼠平均逃避潜

表 1 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠平均逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of XDG on average escape latency of SAD rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	平均逃避潜伏期 / s				
			第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术	—	11	76.74 ± 25.03	31.37 ± 10.76	20.46 ± 10.14	12.91 ± 3.10	10.67 ± 6.59
模型	—	12	94.69 ± 7.01	88.98 ± 26.02**	50.96 ± 31.85**	47.43 ± 30.50**	40.23 ± 34.12**
洗心汤颗粒	7.61	11	69.09 ± 41.59	60.99 ± 28.91 [△]	25.89 ± 20.46 [△]	23.62 ± 11.16 [△]	16.75 ± 13.30 ^{△△}
	15.21	11	56.54 ± 19.81 [△]	40.69 ± 19.14 ^{△△}	26.62 ± 21.43 [△]	30.68 ± 27.75 [△]	19.95 ± 23.07 ^{△△}
	30.42	11	66.29 ± 20.85 [△]	27.07 ± 10.17 ^{△△▲}	19.84 ± 11.89 ^{△△}	16.84 ± 12.38 ^{△△}	11.19 ± 7.98 ^{△△}
多奈哌齐	0.000 92	12	78.92 ± 24.19	66.95 ± 26.47	27.99 ± 17.48 [△]	28.26 ± 25.97 [△]	15.62 ± 13.58 ^{△△}

与假手术组比较：**P<0.01；与模型组比较：[△]P<0.05 ^{△△}P<0.01；与多奈哌齐组比较：[▲]P<0.05，表 3 同
^{**}P<0.01 vs Sham group; [△]P<0.05 ^{△△}P<0.01 vs model group; [▲]P<0.05 vs Donepezil group, same as Table 3

表 2 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠游泳距离的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of XDG on swimming distance of SAD rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	总游泳距离 / cm				
			第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术	—	11	968.74 ± 368.03	676.65 ± 408.62	334.22 ± 175.44	231.23 ± 22.87	179.15 ± 105.79
模型	—	12	1 210.51 ± 303.78	1 093.50 ± 498.43*	764.34 ± 375.98**	748.82 ± 376.27**	601.59 ± 409.03**
洗心汤颗粒	7.61	11	822.28 ± 544.56 [△]	665.53 ± 493.53 [△]	328.29 ± 173.62 ^{△△}	316.62 ± 146.44 ^{△△}	260.75 ± 215.79 ^{△△}
	15.21	11	742.90 ± 313.50 [△]	529.96 ± 329.79 ^{△△}	361.29 ± 206.50 ^{△△}	461.85 ± 387.99 [△]	307.56 ± 310.55 ^{△△}
	30.42	11	968.91 ± 400.43	422.41 ± 204.95 ^{△△▲}	341.913 6 ± 171.92 ^{△△}	252.18 ± 123.28 ^{△△}	157.18 ± 105.47 ^{△△}
多奈哌齐	0.000 92	12	1 063.38 ± 407.53	755.59 ± 348.04 [△]	451.88 ± 272.12 [△]	408.39 ± 244.89 [△]	247.31 ± 224.99 ^{△△}

与假手术组比较：^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01；与模型组比较：[△]P<0.05 ^{△△}P<0.01；与多奈哌齐组比较：[▲]P<0.05
^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs Sham group; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01 vs model group; [▲]P<0.05 vs Donepezil group

伏期及总游泳距离显著缩短 ($P < 0.05, 0.01$)。在空间搜索实验中,与模型组相比,多奈哌齐组、洗心汤颗粒各组在第 I 象限的活动时间明显延长 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 3。

表 3 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠在第 I 象限活动时间的影
响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of XDG on swimming time around quadrant I of SAD rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	第 I 象限活动时间 / s
假手术	—	11	59.49 ± 8.57
模型	—	12	15.92 ± 6.16**
洗心汤颗粒	7.61	11	39.91 ± 13.97 [△]
	15.21	11	52.81 ± 4.30 ^{△△}
	30.42	11	56.45 ± 5.32 ^{△△}
多奈哌齐	0.000 92	12	41.02 ± 10.76 [△]

3.2 对 Thr231 和 Ser422 位点磷酸化水平的影响

3.2.1 Western blotting 检测 大鼠海马组织总 Tau (即磷酸化和非磷酸化的 Tau 蛋白) 表达的检测结果显示,假手术组、模型组、多奈哌齐组、洗心汤各组间无显著差异。结果见表 4、图 1。模型组大鼠 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达明显高于假手术组 ($P < 0.01$);与模型组相比,洗心汤颗粒各组 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达均显著下调 ($P < 0.05, 0.01$),洗心汤颗粒各组间无显著差异,而多奈哌齐组与模型组比较无显著差异。结果见表 5 和图 2、表 6 和图 3。

表 4 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织总 Tau-5 表达的影
响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of XDG on expression of total Tau-5 in hippocampus of SAD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	Tau-5 / β -actin
假手术	—	0.493 7 ± 0.004 8
模型	—	0.420 8 ± 0.001 3
洗心汤颗粒	7.61	0.458 2 ± 0.002 4
	15.21	0.461 5 ± 0.002 8
	30.42	0.478 8 ± 0.001 9
多奈哌齐	0.000 92	0.483 9 ± 0.001 6

3.2.2 免疫组化检测 假手术组大鼠海马 CA1 区 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达的阳性细胞数很少。与假手术组相比,模型组大鼠 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达的阳性细胞数、阳性染色面积、积分光密度值均明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组相

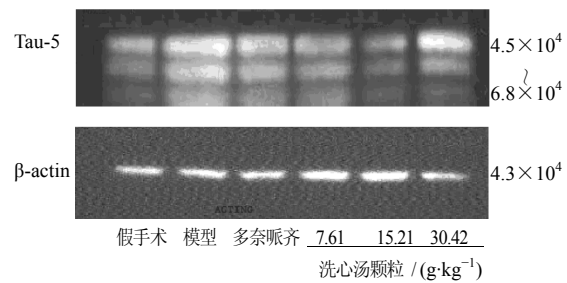


图 1 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织总 Tau-5 表达的影响

Fig. 1 Effect of XDG on expression of total Tau-5 in hippocampus of SAD rats

表 5 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织 p-Tau-Thr231 表达的影
响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of XDG on expression of p-Tau-Thr231 in hippocampus of SAD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	p-Tau-Thr231 / β -actin
假手术	—	0.159 9 ± 0.004 6
模型	—	0.601 4 ± 0.004 5**
洗心汤颗粒	7.61	0.350 3 ± 0.010 5 ^{△△△}
	15.21	0.162 9 ± 0.005 7 ^{△△△}
	30.42	0.170 9 ± 0.007 6 ^{△△△}
多奈哌齐	0.000 92	0.559 1 ± 0.004 5

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.01$

与多奈哌齐组比较: ^{△△△} $P < 0.01$, 表 6 同

** $P < 0.01$ vs Sham group; ^{△△} $P < 0.01$ vs model group;

^{△△△} $P < 0.05$ vs Donepezil group, same as Table 6

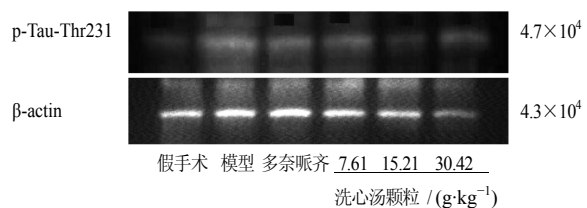


图 2 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织 p-Tau-Thr231 表达的影
响

Fig. 2 Effect of XDG on expression of p-Tau-Thr231 in hippocampus of SAD rats

比,洗心汤颗粒各组 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达的阳性细胞数、阳性染色面积、积分光密度值均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),而洗心汤各组间比较无显著差异;多奈哌齐组 p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422 表达的阳性细胞数、阳性染色面积、积分光密度值与模型组比较无显著差异。结果见表 7、8。

表 6 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织 p-Tau-Ser422 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of XDG on expression of p-Tau-Ser422 in hippocampus of SAD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	p-Tau-Ser422 / β-actin
假手术	—	0.187 2 ± 0.002 2
模型	—	0.806 4 ± 0.006 3**
洗心汤颗粒	7.61	0.427 3 ± 0.008 3 ^{△△△}
	15.21	0.219 3 ± 0.011 9 ^{△△△}
	30.42	0.246 8 ± 0.018 4 ^{△△△}
多奈哌齐	0.000 92	0.796 7 ± 0.006 9

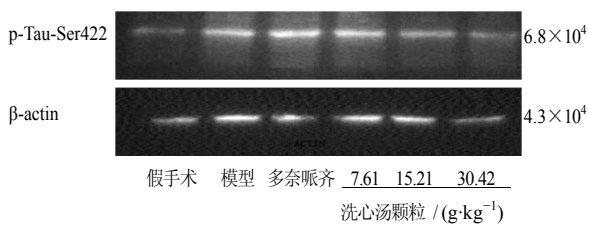


图 3 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马组织 p-Tau-Ser422 表达的影响

Fig. 3 Effect of XDG on expression of p-Tau-Ser422 in hippocampus of SAD rats

表 7 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马 CA1 区 p-Tau-Thr231 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 7 Effect of XDG on expression of p-Tau-Thr 231 in hippocampus CA1 region of SAD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	阳性细胞数 / 个	阳性染色面积 / μm ²	积分光密度值
假手术	—	12.970 0 ± 0.864 7	5 677.848 3 ± 164.261 1	39.626 7 ± 0.781 3
模型	—	61.650 0 ± 1.594 3**	19 833.596 7 ± 734.075 9**	148.685 0 ± 2.420 1**
洗心汤颗粒	7.61	43.663 3 ± 1.904 2 ^{△△}	14 858.210 0 ± 412.278 9 ^{△△}	122.561 7 ± 1.855 8 [△]
	15.21	18.085 0 ± 0.996 3 ^{△△△}	7 525.538 3 ± 200.731 1 ^{△△△}	54.53 ± 1.822 8 ^{△△△}
	30.42	14.391 7 ± 0.715 3 ^{△△△}	6 730.636 7 ± 170.904 1 ^{△△△}	57.908 3 ± 3.288 4 ^{△△△}
多奈哌齐	0.000 92	55.025 0 ± 0.903 8	18 998.231 7 ± 693.928 6	133.611 7 ± 4.116 8

与假手术组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01; 与多奈哌齐组比较: [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01

**P < 0.01 vs Sham group; [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 vs model group; [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 vs Donepezil group

表 8 洗心汤颗粒对 SAD 大鼠海马 CA1 区 p-Tau-Ser422 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 8 Effect of XDG on expression of p-Tau-Ser422 in hippocampus CA1 region of SAD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	阳性细胞数 / 个	阳性染色面积 / μm ²	积分光密度值
假手术	—	13.608 3 ± 0.932 3	4 259.888 3 ± 206.425 9	41.860 1 ± 0.956 8
模型	—	64.908 3 ± 2.419 2**	22 263.081 7 ± 953.172 1**	163.206 7 ± 1.236 1**
洗心汤颗粒	7.61	43.600 1 ± 0.937 6 ^{△△△}	15 850.951 7 ± 188.842 5 ^{△△△}	121.341 7 ± 1.051 4 ^{△△△}
	15.21	18.748 3 ± 0.528 7 ^{△△△}	7 570.571 7 ± 80.654 2 ^{△△△}	49.163 3 ± 0.339 7 ^{△△△}
	30.42	16.611 7 ± 0.411 9 ^{△△△}	5 492.561 7 ± 93.996 8 ^{△△△}	48.183 3 ± 0.899 6 ^{△△△}
多奈哌齐	0.000 92	61.820 3 ± 0.366 8	20 376.461 7 ± 510.642 6	153.408 3 ± 0.531 3

与假手术组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: ^{△△}P < 0.01; 与多奈哌齐组比较: ^{△△}P < 0.01

**P < 0.01 vs Sham group; ^{△△}P < 0.01 vs model group; ^{△△}P < 0.01 vs Donepezil group

镜下观察可见, 假手术组表达 p-Tau-Thr231 和 p-Tau-Ser422 的阳性细胞极少; 模型组上述阳性细胞明显增多, 胞浆深染; 多奈哌齐组阳性细胞较多; 洗心汤低剂量组阳性细胞较多, 中剂量组阳性细胞明显减少, 高剂量组阳性细胞则明显减少。结果见图 4、5。

4 讨论

近年来, AD 发病的分子机制研究中一个重要发现是阐明高度磷酸化的微管相关蛋白 Tau 为组成双螺旋细丝 (PHF) 的主要蛋白成分, 而 PHF 则是最终形成 AD 特征性病理改变 NFT 的基础^[1]。聚积成 PHF 的 Tau 蛋白被进一步泛素化、聚氨基化、非酶促糖基化、硝酸化及部分水解等修饰, 从而形成晚期 PHF/NFT^[1]。近年研究表明, 过度磷酸化的 Tau 蛋白主要是通过获取细胞毒性作用而促进神经元退变的, 细胞内不溶性 PHF/NFT 的形成则可能是一种细胞减弱其毒性作用的防御反应。Thr231/Ser235, Ser422, Ser199/Ser202/Thr205, Thr212 以及 Ser262/Ser356 等位点的磷酸化可使得 Tau 变成毒性分子, 从而拮抗正常微管相关蛋白的作用^[3]。Thr231, Ser422 及 Ser396 位点的进一步磷酸化则促使 Tau

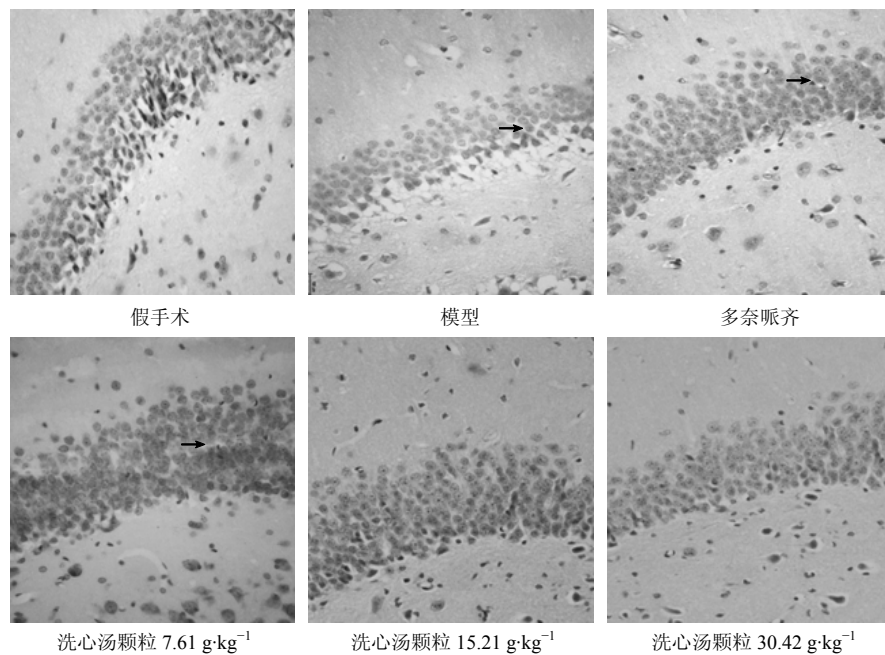


图4 各组大鼠海马CA1区p-Tau-Thr231表达的显微镜观察(图中箭头所示为主要阳性细胞部位, 下图同)
 Fig. 4 Microscope observation of p-Tau-Thr231 expression in hippocampus CA1 region of rats in each group
 (Arrows show main positive cells, same as below)

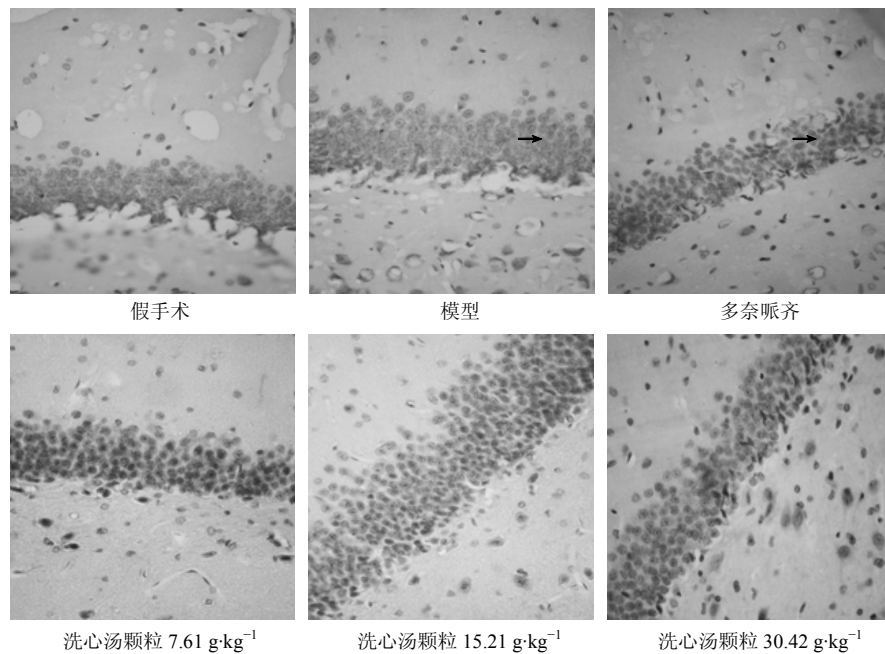


图5 各组大鼠海马CA1区p-Tau-Ser422表达的显微镜观察
 Fig. 5 Microscope observation of p-Tau-Ser422 expression in hippocampus CA1 region of rats in each group

蛋白自身聚积成纤维状结构。

前期研究表明, 洗心汤能明显改善脑侧室注射STZ致SAD大鼠的空间学习记忆能力, 其作用的超微形态学基础可能与保护海马神经元线粒体及轴

突内微管结构有关^[8]。洗心汤颗粒是在洗心汤基础上经剂型优化形成的有效成分提取物颗粒。本研究结果表明, 洗心汤颗粒能明显降低p-Tau-Thr231、p-Tau-Ser422的表达, 提示其抑制Tau蛋白在Thr

231 和 Ser4222 个重要位点的过度磷酸化,从而可能有效阻止学习记忆损害病理过程,最终防止 Tau 的过度磷酸化及 NFT 形成。有关洗心汤抑制 Tau 蛋白异常过度磷酸化,防止 Tau 毒性和病理性纤维状结构形成的深层次作用机制,尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kepke E, Tung Y C, Sha I S, *et al.* Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 24374-24384.
- [2] Gong C X, Liu F, Iqbal K, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2005, 112(6): 813-838.
- [3] Alonso A, Del C, Mederl Yova A, *et al.* Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33): 34878-34881.
- [4] 王永炎, 严世芸. 实用中医内科学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- [5] 张均田. 人参皂苷 Rg₁ 的促智作用机制对神经可塑性和神经发生的影响 [J]. *药学报*, 2005, 40(5): 385-388.
- [6] 唐洪梅, 李 锐, 周莉玲. 石菖蒲对中枢神经系统作用研究进展 [J]. *广州中医药大学学报*, 2000, 17(2): 181-183.
- [7] Lester-Coll N, Rivera E J, Soscia S J, *et al.* Intra-cerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9(1): 13-33.
- [8] DiWu Y C, Tian J Z, Shi J. The effect of Chinese herbal medicine Yinsiwei compound on spatial learning and memory ability and the ultrastructure of hippocampal neurons in a rat model of sporadic Alzheimer disease [J]. *J Chin Integr Med*, 2011, 9(2): 209-215.
- [9] Sharma M, Gupta Y K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment [J]. *Life Sci*, 2001, 68(9): 1021-1029.
- [10] Waston G P C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [11] Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2005, 112(6): 813-838.