

本文引文格式:刘超宇,蒙婉莹,李彦炳,等.二苯乙烯苷通过调节 GSK-3 β /PP2A 活性干预 A β ₂₅₋₃₅ 致拟痴呆大鼠模型 Tau 蛋白磷酸化进程[J].
右江民族医学院学报,2022,44(2):139-146.

【论著与临床报道】

二苯乙烯苷通过调节 GSK-3 β /PP2A 活性干预 A β ₂₅₋₃₅ 致拟痴呆大鼠模型 Tau 蛋白磷酸化进程

刘超宇¹,蒙婉莹²,李彦炳¹,夏小燕²,李振中³,朱晓莹⁴,廖艳花⁴,黄忠仕¹

1. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000;
2. 广西中医药大学药学院,广西 南宁 530200;
3. 右江民族医学院药学院,广西 百色 533000;
4. 右江民族医学院临床医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside, TSG)通过调节 A β ₂₅₋₃₅ 致拟痴呆大鼠模型脑组织中糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、蛋白磷酸酯酶-2A(PP2A)、环磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(PKA)的表达干预 Tau 蛋白磷酸化的机制。**方法** 采用 Morris 水迷宫定位航行实验对 50 只 24 月龄老年雄性 SD 大鼠进行筛选,剔除天生痴呆大鼠后,筛选出 36 只,随机分为正常组、假手术组、模型组、TSG 低剂量组(0.033 g/kg)、TSG 中剂量组(0.1 g/kg)、TSG 高剂量组(0.3 g/kg),每组 6 只。大鼠手术造模 14 d 后,TSG 各剂量组大鼠按相应剂量灌胃药物(连续 28 d);其余 3 组大鼠每天灌胃等量生理盐水。灌胃结束后,采用避暗箱实验对大鼠学习记忆能力进行检测;免疫荧光法(IF)检测各组大鼠脑组织 GSK-3 β 蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR)检测 GSK-3 β 、PP2A、PKA mRNA 表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Tau、PP2A、PKA 蛋白表达情况。**结果** 正常组、假手术组及 TSG 各剂量组大鼠避暗箱实验的潜伏期及错误次数均无明显变化;脑组织中 GSK-3 β 、PP2A、PKA mRNA 表达及 GSK-3 β 、Tau、PP2A、PKA 蛋白表达均无明显变化;模型组大鼠避暗箱实验的潜伏期明显下降($P < 0.01$),错误次数明显增多($P < 0.01$);模型组大鼠脑组织中 GSK-3 β 、PKA mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$),PP2A mRNA 表达水平明显下降($P < 0.05$);GSK-3 β 、PKA 及 Tau 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),PP2A 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,TSG 各剂量组大鼠避暗箱实验的潜伏期均出现明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),错误次数均明显减少($P < 0.01$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 GSK-3 β 、PKA mRNA 表达水平均出现明显下降($P < 0.05$),PP2A mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.05$);TSG 中剂量组大鼠脑组织中皮层区 GSK-3 β 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$),TSG 中剂量组及 TSG 高剂量组大鼠脑组织中海马区 GSK-3 β 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$);TSG 中剂量组及 TSG 高剂量组大鼠脑组织中 PKA 蛋白的表达水平明显降低($P < 0.05$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 Tau 蛋白的表达水平均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),PP2A 蛋白的表达水平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** TSG 可以通过调节 GSK-3 β /PP2A 活性干预 A β ₂₅₋₃₅ 致拟痴呆大鼠模型 Tau 蛋白磷酸化进程发挥抗痴呆作用,其机制可能与下调 GSK-3 β 及 PKA 的表达和上调 PP2A 的表达有关。

关键词:二苯乙烯苷;阿尔茨海默病;糖原合成酶激酶 3 β ;蛋白磷酸酯酶-2A;Tau 蛋白磷酸化

中图分类号:R745.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2022)02-0139-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.001

基金项目:国家自然科学基金项目(81860709);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA294153)

第一作者简介:刘超宇(1997-),男,在读硕士研究生,研究方向:老年性痴呆基础研究,E-mail:liuchaoyu199706@163.com

通讯作者简介:黄忠仕(1970-),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:老年性痴呆基础研究,E-mail:hzs1004@163.com

The intervention of TSG in Tau protein phosphorylation of the $A\beta_{25-35}$ -induced dementia-like rat model by regulating GSK-3 β /PP2A activity

Liu Chaoyu¹, Meng Wanying², Li Yanbing¹, Xia Xiaoyan², Li Zhenzhong³,
Zhu Xiaoying⁴, Liao Yanhua⁴, Huang Zhongshi¹

(1. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China; 3. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 4. School of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the intervention mechanism of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside (TSG) in Tau protein phosphorylation by regulating the expressions of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), protein phosphatase-2A (PP2A) and cyclic adenosine phosphate dependent protein kinase (PKA) in the brain tissues of the $A\beta_{25-35}$ -induced dementia-like rat model. **Methods** Navigation experiment in the Morris water maze was performed to screen 50 24-month-old male SD rats. After the rats with congenital dementia were removed, 36 rats were screened out. They were randomly divided into the normal group, the sham operation group, the model group, the low-dose TSG (0.033 g/kg), medium-dose TSG (0.1 g/kg), and high-dose TSG (0.3 g/kg) groups, with 6 rats in each group. After being surgically modeled for 14 days, rats in each TSG group were given corresponding doses of drugs by intragastric administration (for 28 consecutive days). The other three groups were given intragastrically the same amount of normal saline every day. After gavage, the learning and memory ability of the rats was tested by dark box experiment; the protein expression of GSK-3 β by immunofluorescence assay (IF). The mRNA expressions of GSK-3 β , PP2A and PKA were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Western blot was adopted to detect the protein expressions of Tau, PP2A and PKA. **Results** There was no significant change in the incubation period and number of errors showed by the dark box experiment in the normal group, the sham operation group and each TSG group. And their mRNA expressions of GSK-3 β , PP2A, PKA and protein expressions of GSK-3 β , Tau, PP2A, PKA in brain tissues did not significantly change. The model group had significantly decreased incubation period and significantly increased number of errors in the dark box experiment ($P < 0.01$). They also had significantly increased mRNA expressions of GSK-3 β and PKA ($P < 0.05$) and significantly decreased mRNA expression of PP2A ($P < 0.05$). Their protein expressions of GSK-3 β , PKA and Tau significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the protein expression of PP2A decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, all the TSG groups had significant increase in the incubation period ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but significant decrease in number of errors ($P < 0.01$) as well as significant decrease in mRNA expressions of GSK-3 β and PKA in brain tissues ($P < 0.05$). And their mRNA expression of PP2A significantly increased ($P < 0.05$). There was a significant decrease in the protein expression of GSK-3 β in the cortical region of rat brain tissues in the medium-dose TSG group ($P < 0.05$), as well as in the protein expression of GSK-3 β in hippocampus of the medium-dose TSG group and the high-dose TSG group ($P < 0.01$). The medium-dose TSG group and high-dose TSG group had significantly decreased protein expressions of PKA ($P < 0.05$). Each TSG group had significantly decreased expression of protein Tau in brain tissues of rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but significantly increased protein expression of PP2A ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion TSG can regulate the activity of GSK-3 β /PP2A and interfere with Tau phosphorylation in the

$A\beta_{25-35}$ -induced dementia-like rat model, thus having an anti-dementia effect. The mechanism may be related to down-regulation of GSK-3 β and PKA expressions and up-regulation of PP2A expression.

Key words: 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside; Alzheimer's disease; GSK-3 β ; PP2A; Tau phosphorylation

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经系统退行性疾病,多发于 70 岁以上人群,具体表现为认知功能障碍,判断力下降,记忆减退,日常生活能力下降等。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside, TSG)广泛存在于各类植物和藓类植物中,且为中药何首乌的有效成分^[1-2]。二苯乙烯苷有较大的药用价值,其在抗动脉粥样硬化,舒展血管,保护血管内皮细胞,减缓细胞衰老损伤,改善认知功能障碍有一定的作用^[3-4]。本课题组前期研究发现, TSG 通过抑制 Tau 蛋白过度磷酸化过程,保护受损的神经细胞,从而改善 APP/PS1/Tau 三转基因痴呆小鼠的学习记忆能力^[5]。但具体的作用机制目前尚未清楚。因此,本实验以 $A\beta_{25-35}$ 致拟痴呆大鼠模型为研究对象,探讨 TSG 通过调节 GSK-3 β 、PP2A 和 PKA 的表达干预 Tau 蛋白磷酸化的机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,24 月龄,体重(680~720) g,从长沙市天勤生物技术有限公司购入,合格证号 SCXK(湘)2019-0014。饲养于右江民族医学院 SPF 级动物实验室。本实验由右江民族医学院实验动物伦理审查委员会批准开展,批准号:2020101501。

1.2 药物与试剂 二苯乙烯苷(成都克洛玛生物科技有限公司,批号:CHB180810); $A\beta_{25-35}$ (美国 SIGMA 公司,批号:118M4892V); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术公司,批号:070618181227); TRIZOL(美国 ThermoScientific 公司,批号:257401); 极敏化学发光试剂(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:1927b02); 10%聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物技术有限公司,批号:03512300); 12.5%聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物技术有限公司,批号:03513300); 山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(美国 ProteintechGroup 公司,批号:20000174); 兔抗鼠 β -actin 多克隆抗体(美国 Invitrogen 公司,批号:UD277186); 100 \times 蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司,批号:20200724); 兔抗鼠 Tau 多克隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:18s9967); 兔抗鼠 PP2A 多克隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:72u4146); 兔抗鼠 PKA 多克

隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:15j0929); 兔抗鼠 GSK-3 β 多克隆抗体(美国 Thermo Scientific 公司,批号:WE3287929C)。

1.3 仪器 ZH-蓝星 B/S 型大小鼠脑立体定位仪(安徽正华生物仪器设备有限公司); ZH-KES 型微量注射泵(安徽正华生物仪器设备有限公司); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices); Neofuge15R 型高速冷冻离心机; Tanon-5200 multi 型全自动化学发光图像分析仪; LightCycler96 型实时荧光定量聚合酶链式反应系统(罗氏); PAT-8R 被动逃避黑白箱(成都泰盟软件有限公司); CM1650 型冷冻切片仪(德国徕卡公司); D1MI-3000B 型荧光倒置显微镜(徕卡上海贸易有限公司)。

1.4 动物筛选、分组、造模及给药 采用 Morris 水迷宫定位航行实验对 50 只 24 月龄老年雄性 SD 大鼠逃避潜伏期进行测试,以青年大鼠逃避潜伏期为参照,剔除天生痴呆大鼠后,筛选出 36 只,随机分为正常组、假手术组、模型组、TSG 低剂量组、TSG 中剂量组和 TSG 高剂量组,每组 6 只。SD 大鼠称重,盐酸二甲苯噻嗪(8 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将其固定于脑立体定位仪。75%乙醇消毒大鼠头顶部,使用手术刀片将顶部纵向切开,剥开皮下筋膜暴露顶骨。将大鼠前囟定为原点,按大鼠脑立体定位图谱选择海马区域(前囟后 3.5 mm,中线外侧 2.0 mm)使用牙科钻在两侧钻出小孔,微量进样器垂直进入 2.7 mm。将在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 周的质量浓度为 5 μ g/ μ l 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液以 0.2 μ l/min 的速度缓慢注入两侧脑室,注入体积 1 μ l,注射完成后留针 5 min,避免拔针时药物溢出。手术后缝合头部皮肤,7 d 内每日给予肌注青霉素 G 10 万单位预防感染。经 $A\beta_{25-35}$ 海马区造模 14 d 后开始灌胃给药,正常组、假手术组、模型组(生理盐水,30 ml/kg), TSG 低、中、高剂量组(给药剂量分别为 0.033 g/kg, 0.1 g/kg, 0.3 g/kg), 每组每日灌胃给药 1 次,连续 4 周。

1.5 大鼠避暗箱行为学测试 给予给药干预 4 周后,对实验大鼠进行避暗箱测试。避暗箱又名被动回避实验,主要用于测试实验动物的短期记忆。首先,将实验大鼠放入箱体,让其适应环境 10 min 后,将大鼠放置于明室,记录大鼠由明室进入暗室的时间为潜伏期,进入暗室受到电击的次数为错误次数。24 h 后再次进

行实验,记录每只大鼠的潜伏期和 5 min 内的错误次数。

1.6 免疫荧光法(IF)检测大鼠脑组织中海马区和脑皮层 GSK-3 β 蛋白的表达 行为学测试结束后,每组取 3 只大鼠,盐酸二甲苯噻嗪(8 mg/kg)腹腔注射麻醉后,置于冰上剖取出脑组织,冷冻包埋剂包埋后,置于液氮中快速固定,固定好的组织块,切片 6 μ m;将切片置入-20 $^{\circ}$ C 的甲醇中固定 10 min 后,PBS 浸洗 5 min \times 3 次;1%BSA 封闭 40 min,PBS 浸洗 5 min \times 2 次;加入 GSK-3 β 抗体(稀释比例 1:1000),于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,PBS 浸洗 5 min \times 2 次;加入带有荧光标记的二抗和 DAPI 荧光染剂的混合液,室温孵育 1 h,PBS 浸洗 5 min \times 2 次;组织上滴加荧光猝灭剂,封片。于荧光倒置显微镜下观察海马 CA1 区蛋白表达情况,拍照;使用 Image J 软件测定目的蛋白及 DIPA 的光密度值,将目的蛋白与 DIPA 光密度值的比值作为平均光密度值。

1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR)检测大鼠脑组织中 PP2A,PKA,GSK-3 β mRNA 的表达

使用骨科钳暴露脑组织,迅速取出脑组织,按 Trizol 试剂盒说明进行操作,提取大鼠脑组织内总 RNA,使用微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度、纯度。OD260/OD280 比值在 1.8~2.1 范围内的 RNA 样本可进入逆转录实验。按 cDNA 逆转录试剂盒操作将总 RNA 逆转录 cDNA。引物序列合成由武汉金开瑞生物工程有限公司完成,以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列	长度/bp
PP2A	上游 5'-AGAGCGTATCACCATACTCCG-3'	170
	下游 5'-AGAAGATCTGCCATCCACC-3'	
PKA	上游 5'-GGATTGGGAGGTTTCAGTGAG-3'	85
	下游 5'-AGGTCCAGGGAGTGCAGTAT-3'	
GSK-3 β	上游 5'-ACCATCCTTATCCCTCCTCAC-3'	95
	下游 5'-CCACGGTCTCCAGCATTAGTA-3'	
GAPDH	上游 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'	100
	下游 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	

1.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织 PP2A,PKA,Tau 蛋白的表达 将大鼠脑组织按比例加入配制好的蛋白裂解液置冰上裂解 30 min;裂解完成后,高速冷冻离心机 12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,5 min,收集管内上清液;按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定总蛋白浓度,加入 4 \times 蛋白上样缓冲液稀释后,置 100 $^{\circ}$ C 水浴变性 10 min。对变性好的总蛋白进行凝胶电

泳,SDS-PAGE 凝胶电泳 80 V,30 min;再 120 V,60 min。转膜条件为 300 mA,60 min,25 $^{\circ}$ C。使用快速封闭液摇床室温封闭 15 min。将相应 NC 膜分别置于 PP2A,PKA,Tau(1:1500)中 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。一抗孵育 16 h 后取出 NC 膜,置于 TBST 缓冲液中冲洗 3 次,每次 5 min。二抗(1:6000)孵育室温孵育 2 h,置于 TBST 缓冲液中冲洗 3 次,每次 5 min。显影按照 ECL 说明书进行操作;应用自动化学发光图像分析仪分析及进行条带密度扫描,将 Tau,PKA,PP2A 条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达水平。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件分析,计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较使用单因素方差分析,方差齐性时组间比较采用 LSD 检验;当方差不齐时比较采用 Tamhane's T2 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TSG 对大鼠学习记忆能力的影响 在大鼠避暗箱实验数据中可以观察到,与正常组比较,假手术组大鼠的潜伏期及错误次数与正常组相近;模型组大鼠的潜伏期显著低于正常组($P<0.01$),错误次数显著高于正常组($P<0.01$);TSG 各剂量组潜伏期及错误次数与正常组无明显差异。与假手术组比较,模型组大鼠的潜伏期显著低于假手术组($P<0.01$),错误次数显著高于假手术组($P<0.01$);TSG 各剂量组潜伏期及错误次数与假手术组均无明显差异。与模型组比较,TSG 各剂量组大鼠潜伏期均有明显延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),错误次数均出现明显减少($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠错误次数、潜伏期对比

组别	错误次数	潜伏期/s
正常组	0.50 \pm 0.55	283.28 \pm 21.43
假手术组	0.67 \pm 0.52	262.83 \pm 37.78
模型组	2.00 \pm 0.89 ^{ab}	21.33 \pm 13.99 ^{ab}
TSG 低剂量组	0.83 \pm 0.41 ^d	213.12 \pm 49.17 ^d
TSG 中剂量组	0.83 \pm 0.40 ^d	153.26 \pm 84.30 ^c
TSG 高剂量组	0.50 \pm 0.55 ^d	231.81 \pm 104.09 ^c

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示;②与正常组比较,a: $P<0.01$;与假手术组比较,b: $P<0.01$;与模型组比较,c: $P<0.05$,d: $P<0.01$ 。

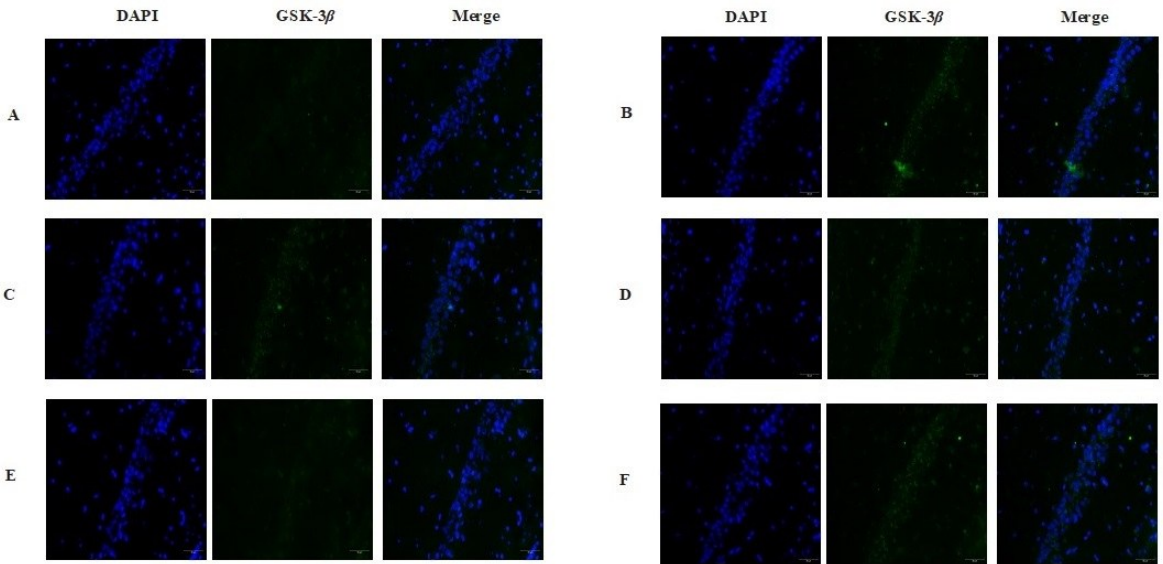
2.2 TSG 对大鼠脑组织中海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达的影响 与正常组比较,假手术组大鼠海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量无明显变化;模型组

大鼠海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$); TSG 各剂量组大鼠海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量均无明显变化。与假手术组比较,模型组大鼠海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TSG 各剂量组大鼠海马区和皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量均无明显变化。与模型组比较, TSG 中剂量组大鼠皮层区 GSK-3 β 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$); TSG 中剂量组及高剂量组大鼠海马区 GSK-3 β 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3、图 1、图 2。

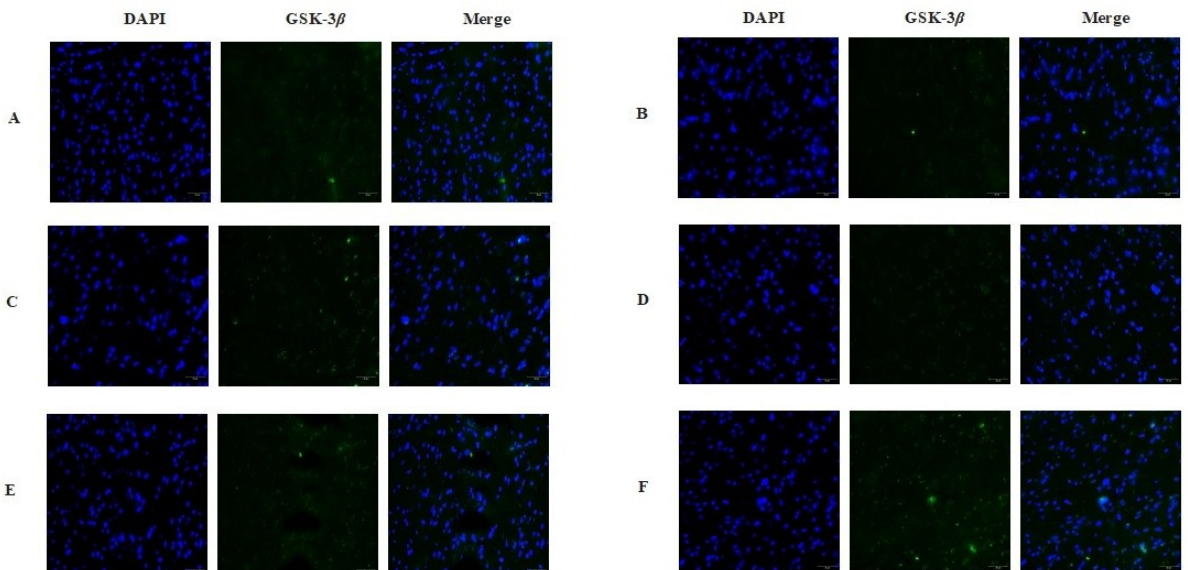
表 3 各组大鼠海马区、皮层区的 GSK-3 β 蛋白表达对比

组别	海马区	皮层区
正常组	0.072 \pm 0.007	0.068 \pm 0.013
假手术组	0.059 \pm 0.013	0.078 \pm 0.009
模型组	0.142 \pm 0.009 ^{ab}	0.111 \pm 0.010 ^{ac}
TSG 低剂量组	0.126 \pm 0.007	0.105 \pm 0.003
TSG 中剂量组	0.102 \pm 0.012 ^e	0.095 \pm 0.003 ^d
TSG 高剂量组	0.899 \pm 0.009 ^e	0.100 \pm 0.010

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示;②与正常组比较,a: $P < 0.01$;与假手术组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$;与模型组比较,d: $P < 0.05$,e: $P < 0.01$ 。



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.TSG低剂量组;E.TSG中剂量组;F.TSG高剂量。

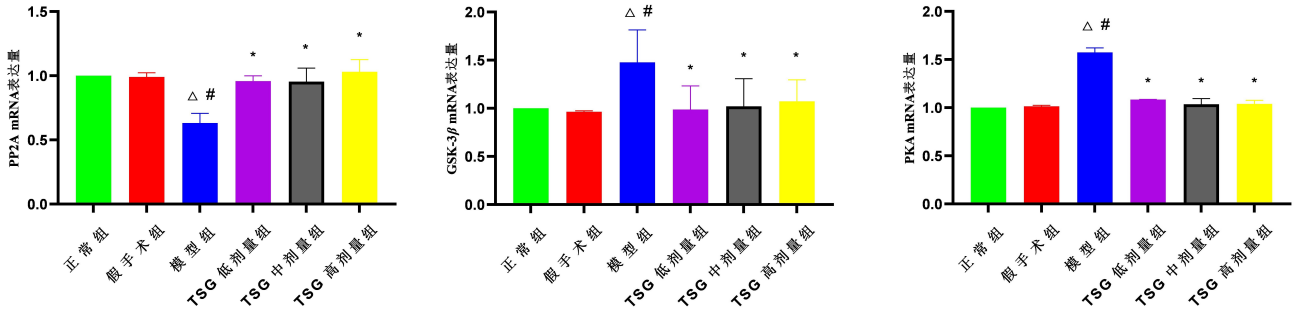
图 1 各组大鼠脑组织中海马区 GSK-3 β 蛋白表达情况(免疫荧光, $\times 200$,图中标尺为 50 μm)

注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.TSG低剂量组;E.TSG中剂量组;F.TSG高剂量。

图 2 各组大鼠脑组织中大脑皮层 GSK-3 β 蛋白表达情况(免疫荧光, $\times 200$,图中标尺为 50 μm)

2.3 TSG 对大鼠脑组织中 PP2A、GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量的影响 与正常组比较,假手术组大鼠脑组织中 PP2A、GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量无明显变化;模型组大鼠脑组织中 PKA、GSK-3 β mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$),PP2A mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A、GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量无明显变化。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 PKA、GSK-3 β mRNA

表达量明显升高 ($P < 0.05$),PP2A mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A、GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量无明显变化。与模型组比较,TSG 各剂量组大鼠脑组织中 GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量明显下降 ($P < 0.05$),TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A mRNA 表达量均出现明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。



注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$;与假手术组比较, $\# P < 0.05$;与模型组比较, $* P < 0.05$ 。

正常组各指标 mRNA 表达量均为 1。

图 3 各组大鼠脑组 PP2A、GSK-3 β 、PKA mRNA 表达量对比

2.4 TSG 对大鼠脑组织中 PP2A、PKA、Tau 蛋白表达的影响 与正常组比较,假手术组大鼠脑组织中 PP2A、PKA、Tau 蛋白表达量无明显改变;模型组大鼠脑组织中 PP2A 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.01$),PKA 蛋白及 Tau 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A、PKA、Tau 蛋白表达量均无明显改变。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 PP2A 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.01$),PKA 蛋白及 Tau 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A、PKA、Tau 蛋白表达量均无明显改变。与模型组比较,TSG 各剂量组大鼠脑组织中 PP2A 蛋白表达量均出现显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSG 中剂量组和高剂量大鼠脑组织中 PKA 蛋白表达量均出现显著升高 ($P < 0.05$),TSG 各剂量组大鼠脑组织中 Tau 蛋白表达量均出现显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4、图 4。

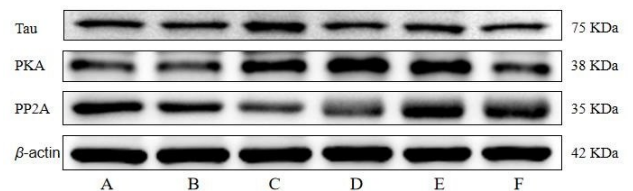
3 讨论

Tau 蛋白过度磷酸化学说是目前阿尔茨海默症发生的重要学说之一。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,主要与微管结合,使微管结构稳定,减少微管蛋白分子的解离。在痴呆模型及 AD 患者的脑内,可以观察到过度磷酸化的 Tau 蛋白相互缠绕形成神经元纤维缠

表 4 各组大鼠 PP2A、PKA、Tau 蛋白表达对比

组别	PP2A	PKA	Tau
正常组	0.747 \pm 0.100	0.808 \pm 0.027	0.512 \pm 0.094
假手术组	0.749 \pm 0.093	0.813 \pm 0.033	0.561 \pm 0.060
模型组	0.444 \pm 0.113 ^{bd}	1.034 \pm 0.109 ^{ac}	0.838 \pm 0.070 ^{ad}
TSG 低剂量组	0.886 \pm 0.199 ^f	0.868 \pm 0.172	0.688 \pm 0.032 ^f
TSG 中剂量组	0.909 \pm 0.164 ^f	0.800 \pm 0.104 ^e	0.682 \pm 0.028 ^e
TSG 高剂量组	0.846 \pm 0.252 ^e	0.838 \pm 0.135 ^e	0.628 \pm 0.084 ^e

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与正常组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与假手术组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$;与模型组比较,e: $P < 0.05$,f: $P < 0.01$ 。



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.TSG 低剂量组;E.TSG 中剂量组;F.TSG 高剂量组。

图 4 各组大鼠脑组织 PP2A、PKA、Tau 凝胶电泳图

结(NFTs)的现象,被磷酸化的 Tau 蛋白与微管结合的能力只有正常状态下的 1/10,导致微管结构不稳定,大量神经元微管结构受到破坏,引起神经细胞凋亡、突触丢失、神经系统退行性改变^[6]。目前研究较多

的 Tau 蛋白激酶有糖原合成酶激酶 $\beta 3$ (GSK-3 β)、周期蛋白依赖性激酶 5(CDK5)和环磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(PKA),它们催化 Tau 蛋白磷酸化过程,加重神经系统的炎症反应,增加 A β 蛋白的生成,还会使患者脑内乙酰胆碱的合成下降,导致严重的神经损害^[7]。另有研究表明,调节 PP2A 活性抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化也可能是治疗 AD 的有效策略^[8]。本实验旨在探讨 TSG 调节 GSK-3 β 、PP2A、PKA 等相关因子干预 Tau 蛋白磷酸化的作用机制。

在正常的生理状态下,Tau 蛋白在蛋白激酶和蛋白磷酸酶的共同调节下处于磷酸化与去磷酸化的动态平衡状态,而 AD 患者中非正常 Tau 蛋白则打乱了这种平衡,主要表现为 Tau 蛋白和 P-tau 蛋白的增多^[9-13]。本实验通过蛋白质免疫印迹法对 Tau 蛋白进行定量分析。从结果中发现,模型组中 Tau 蛋白相对表达量明显高于正常组,指示 Tau 蛋白和 P-tau 蛋白的相对平衡状态被打破,Tau 蛋白在 AD 大鼠脑组织中出现过度磷酸化;TSG 各剂量组 Tau 蛋白相对表达量均明显低于模型组,指示 TSG 可以降低 Tau 蛋白水平,抑制 Tau 蛋白过度磷酸化进程。

有研究表明^[14],Tau 蛋白的过度磷酸化过程是由多种激酶联合作用的结果,Tau 蛋白被一种激酶预磷酸化后可以促进或抑制其他激酶的进一步磷酸化作用。蛋白激酶在催化磷酸化反应时在不同的序列下催化特点各不相同,根据其这一特点将蛋白磷酸酶分为以下两大类:脯氨酸依赖性蛋白激酶;非脯氨酸依赖性蛋白激酶,环磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(PKA)作为非脯氨酸依赖性蛋白激酶家族中一个具有代表性的激酶,其对 Tau 蛋白异常磷酸化的预磷酸化作用受到广泛关注^[15]。本实验通过实时荧光定量聚合酶链式反应法和蛋白质免疫印迹法对 PKA 进行定性定量分析。结果表明,模型组中 PKA 的 mRNA 及蛋白质相对表达量明显高于正常组,指示 PKA 的激活在 Tau 的异常磷酸化进程中发挥促进作用;TSG 各剂量组 PKA 的 mRNA 相对表达量均明显低于模型组;TSG 中剂量组及高剂量组 PKA 蛋白相对表达量均明显低于模型组,指示 TSG 通过下调 PKA 的表达抑制了 Tau 蛋白过度磷酸化进程。

同为非脯氨酸依赖性蛋白激酶的糖原合成酶激酶 $\beta 3$ (GSK-3 β)是 AD 的核心因素,它的功能紊乱与 Tau 蛋白的过度磷酸化有着密切联系,可以引起散发与家族性 AD 的多种病理标志物的形成^[16-18]。研究显示,PKA 与 GSK-3 β 之间相互影响,经过 PKA 预磷酸化后的 Tau 蛋白,更易于被 GSK-3 β 磷酸化,这也是引起

Tau 蛋白处于过度磷酸化状态的原因之一^[19-20]。本实验通过实时荧光定量聚合酶链式反应法和免疫荧光法对 GSK-3 β 进行定性定量分析,结果表明模型组中 GSK-3 β 的 mRNA 及蛋白质相对表达量明显高于正常组,TSG 中剂量组及高剂量组中 GSK-3 β 的 mRNA 及蛋白质相对表达量均明显低于模型组。从结果推测 GSK-3 β 的上调推动了 Tau 蛋白过度磷酸化进程,进而诱发 AD;TSG 可以在一定程度上抑制 GSK-3 β 的高表达,缓解 Tau 蛋白过度磷酸化进程。

蛋白磷酸酯酶-2A(PP2A)是一种去磷酸化的关键蛋白质磷酸酶,广泛表达于不同的组织和细胞中,其活性在 AD 患者的大脑中明显减少,PP2A 的失活会导致多种蛋白的异常高磷酸化^[21]。Tau 蛋白的脱磷也受 PP2A 的监管,高活性的 PP2A 可以抑制 Tau 蛋白磷酸化的增加^[22]。因此,重新激活 AD 中的 PP2A 在抗 AD 治疗中具有重大意义^[23]。本实验通过实时荧光定量聚合酶链式反应法和蛋白质免疫印迹法对 PP2A 进行定性定量分析。结果表明,经 TSG 治疗后 TSG 各剂量组中 PP2A 较模型组均出现明显上调,提示 TSG 可以重新激活 AD 脑中 PP2A 的活性,抑制 Tau 过度磷酸化进程,发挥抗 AD 的作用。

综上所述,TSG 对 A β_{25-35} 致拟痴呆大鼠模型脑组织中的 GSK-3 β /PP2A 具有调节作用,其机制可能是从两方面进行:一方面抑制 PKA 的活性,干预 Tau 蛋白的预磷酸化过程,使 Tau 蛋白处于不易过磷酸化的状态;同时,另一方面抑制 GSK-3 β 的活性,激活 PP2A 的活性,最后阻碍 Tau 蛋白磷酸化进程,从而改善 AD 症状。但是,该机制所涉及的调控因子还不全面,各因子的作用位点尚未清楚,仍需进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] 张欣,贾敏,秦巧红,等.二苯乙烯苷对血管活性物质引起的体外血管收缩作用的影响[J].中药新药与临床药理,2021,32(8):1114-1119.
- [2] 李少华,姜丽萍,牛佳瑶,等.二苯乙烯苷调控胰岛素/IGF-1 信号通路延缓大鼠睾丸间质细胞衰老的作用机制[J].河北大学学报(自然科学版),2021,41(3):297-303.
- [3] 张奇龙,薛威,徐博涵,等.二苯乙烯苷减轻小鼠急性脑缺血再灌注后的氧化应激损伤及其对自噬的影响[J].安徽医科大学学报,2019,54(8):1232-1236.
- [4] 谭俊杰,吴文雪,廖艳花,等.二苯乙烯苷对冈田酸诱导的 NG108-15 细胞 tau 蛋白磷酸化的干预作用[J].右江民族医学院学报,2019,41(2):121-126.
- [5] 苏彦兆,吴文雪,刘超宇,等.二苯乙烯苷对 APP/PS1/Tau 三转基因小鼠痴呆模型 GSK3 β ,PKA,PP2A 的影响

- [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 64-69.
- [6] 王国权. 黄蒲通窍胶囊的物质基础及其对阿尔茨海默病大鼠 EGFR-PLC γ 信号通路的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [7] Gao Y, Tan L, Yu JT, et al. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15(3): 283-300.
- [8] Wang YX, Yang RY, Gu JL, et al. Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 β and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(1): 188-200.
- [9] Sanders O, Rajagopal L. Phosphodiesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials and Epidemiology with a Mechanistic Rationale[J]. *J Alzheimers Dis Rep*, 2020, 4(1): 185-215.
- [10] Wang C, Holtzman DM. Bidirectional relationship between sleep and Alzheimer's disease: role of amyloid, tau, and other factors[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(1): 104-120.
- [11] Drummond E, Pires G, MacMurray C, et al. Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain[J]. *Brain*, 2020, 143(9): 2803-2817.
- [12] Kuo YC, Lou YI, Rajesh R. Dual functional liposomes carrying antioxidants against tau hyperphosphorylation and apoptosis of neurons[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(9): 949-960.
- [13] Ni HL, Han YJ, Jin XH. Celastrol inhibits colon cancer cell proliferation by downregulating miR-21 and PI3K/AKT/GSK-3 β pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(3): 808-816.
- [14] Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, et al. The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(3): 757-763.
- [15] Ye JW, Yin YL, Liu HH, et al. Tau inhibits PKA by nuclear proteasome-dependent PKAR2 α elevation with suppressed CREB/GluA1 phosphorylation[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1): e13055.
- [16] Liu BH, Lin J, Bai LX, et al. Paeoniflorin Inhibits Mesangial Cell Proliferation and Inflammatory Response in Rats With Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Through PI3K/AKT/GSK-3 β Pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 978.
- [17] Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118664.
- [18] Luo Z, Chen W, Wu WW, et al. Metformin promotes survivin degradation through AMPK/PKA/GSK-3 β -axis in non-small cell lung cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2019 Feb 21. doi:10.1002/jcb.28470.
- [19] Pan B, Deng C. Modulation by chronic antipsychotic administration of PKA- and GSK3 β -mediated pathways and the NMDA receptor in rat ventral midbrain[J]. *Psychopharmacology(Berl)*, 2019, 236(9): 2687-2697.
- [20] Liu F, Liang ZH, Shi JH, et al. PKA modulates GSK-3 β - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site and kinase-specific manners[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(26): 6269-6274.
- [21] Lauretti E, Praticò D. Alzheimer's disease: phenotypic approaches using disease models and the targeting of tau protein[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(4): 319-330.
- [22] Bhatia V, Sharma S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease[J]. *J Neurol Sci*, 2021, 421: 117253.
- [23] Naseri NN, Wang H, Guo J, et al. The complexity of tau in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 705: 183-194.

收稿日期: 2022-02-10; 修回日期: 2022-03-02