

· 实验研究 ·

调心方药物血清对动物阿尔茨海默病相关的 tau 蛋白磷酸化的调节作用^{*}

朱粹青 曹小定

内容提要 目的:研究调心方对动物阿尔茨海默病相关的 tau 蛋白磷酸化的调节及其可能的作用机制。方法:采用冈田酸(Okadaic acid)处理 NG108 细胞模型,MTT 比色法、蛋白印迹法、免疫共沉淀等方法进行测定。结果:MTT 方法观察到磷酸脂酶抑制剂冈田酸(20nmol/L)处理 NG108 细胞 12h 能导致细胞活性明显下降,调心方药物血清能改善细胞的活性;多种 tau 蛋白抗体免疫印迹法见调心方药物血清能逆转冈田酸导致的 NG108 细胞 tau 蛋白过度磷酸化。免疫共沉淀研究观察到调心方提取液抑制 tau 蛋白与可调节 tau 蛋白磷酸化的早老蛋白-1(Presenilin-1)的结合。结论:调心方能抑制 tau 蛋白的过度磷酸化,其部分机制可能与调心方调节早老蛋白-1 与 tau 蛋白结合有关。

关键词 调心方 阿尔茨海默病 冈田酸 tau 蛋白 早老蛋白-1

Regulatory Effect of Tiaoxin Recipe Drug Serum on Animal's Alzheimer Disease Related tau Protein Phosphorylation ZHU Cui-qing, CAO Xiao-ding *Fudan University, National Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai (200032)*

Objective: To study the regulatory effect and possible mechanism of Tiaoxin Recipe (TXR) on animal's Alzheimer disease related tau protein phosphorylation. **Methods:** NG108 cell model was treated with Okadaic acid and related parameters were determined using MTT staining, immunoblot, coimmunoprecipitation assay, etc. **Results:** Shown by MTT staining, NG108 cell activity decreased significantly after treated with Okadaic acid for 12 hrs, which could be ameliorated by TXR rat serum. Revealed by immunoblot method, the Okadaic acid induced elevation of phosphorylated tau protein could partly be reversed after co-treated with TXR rat serum. TXR extract could inhibit the binding of tau protein with presenilin-1, which may regulate the tau protein phosphorylation, and could be observed by coimmunoprecipitation. **Conclusion:** TXR could inhibit tau protein hyperphosphorylation, which might partially be due to the TXR caused binding of presenilin-1 with tau protein.

Key words Tiaoxin Recipe, Alzheimer disease, Okadaic acid, tau protein, presenilin-1

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种以脑内老年斑的大量沉积、大量神经原纤维缠结形成、神经元缺失为主要脑病理特征的进行性的神经系统退行性疾病⁽¹⁾,其中神经原纤维缠结的数量明显与痴呆程度相关联⁽²⁾。神经原纤维缠结主要由超磷酸化的 tau 蛋白组成。为了解调心方⁽³⁾治疗阿尔茨海默病的机理,本研究就调心方对 tau 蛋白磷酸化的影响进行了研究。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 240~260g,昆明种雄性小鼠,体重 20~25g,原上海医科大学动物中心提供。

1.2 药物及药物血清制备 调心方由党参、茯苓、甘草、石菖蒲、远志中药组成⁽⁴⁾。调心方提取液生药含量为 7.4g/ml(上海中医药大学老年研究所提供)。用调心方提取液分别以小剂量(26g 生药/kg 体重)、中剂量(46.4g 生药/kg 体重)、大剂量(66g 生药/kg 体重)大鼠灌胃 3 天,每天 2 次,最后 1 次给药 1h

^{*} 国家自然科学基金(No. 39830450) 教技司(No. 2000-66) 国家基础研究基金(No. G1999054007) 资助

复旦大学医学神经生物国家重点实验室(上海 200032)

后取血,分离药物血清。

1.3 细胞株 大鼠神经母细胞和小鼠胶质细胞瘤细胞的杂交细胞系 NG108(中国科学院细胞研究所提供)。

2 观察项目及方法

2.1 细胞代谢分析 采用 MTT 法。接种于 96 孔板($n=6$)的 NG108 细胞经以下处理(1)分别加入含 20nmol/L 冈田酸(Sigma 公司产品)及 0~20% 的调心方提取液的 1640 培养液 100 μ l,培养 12h(2)加入含 20% 正常大鼠血清或不同药物血清的 20nmol/L 冈田酸-1640 培养液,培养 12h。MTT 显色,在 570 处测 OD 值。数据用 t 检验。

2.2 tau 蛋白磷酸化分析 采用免疫印迹方法。细胞用含不同浓度的冈田酸,或含 20nmol/L 冈田酸与含 20% 正常大鼠血清或药物血清的细胞培养液培养 12h。细胞裂解液裂解细胞⁽⁵⁾,离心取上清液,Bradford 法蛋白定量,用抗 tau 蛋白单克隆抗体(tau 1 识别 tau 的非磷酸化的 Ser199/202 位点,PHF 1 识别 Ser396/404 磷酸化位点,C5 识别 Ser 396 位磷酸化)进行免疫印迹分析。

2.3 tau 蛋白与早老蛋白-1 结合分析 采用免疫共沉淀法。小鼠大脑皮层组织加入预冷的细胞裂解液匀浆,离心取上清液,上清液中分别加入终浓度为 0、0.1%、1%、5%、10% 的调心方提取液,4℃ 孵育 2h。用早老蛋白-1 抗体(Santa cruz)和 Sepharose Protein-G (Pharmacia)进行免疫沉淀⁽⁵⁾。取沉淀用免疫印迹法分析其中的 tau 蛋白。

结 果

1 调心方对细胞活性的调节作用 MTT 法检测显示冈田酸能明显抑制细胞活性,OD 值由正常对照的 0.290 ± 0.025 降为 0.202 ± 0.025 ($P < 0.05$)。而调心方提取液可改善冈田酸导致的细胞活性的下降,在 0.1%~1% 浓度范围作用有加强(OD 值为 $(0.207 \pm 0.021) \sim (0.214 \pm 0.027)$)。而 10% 浓度的调心方提取液作用反而减小(OD 值为 0.210 ± 0.022)。但各数据与单纯冈田酸组比较差异无显著性。

用冈田酸和不同剂量调心方血清共同处理细胞,结果显示与单纯冈田酸对照组(OD 值为 0.205 ± 0.019)相比调心方血清低剂量组细胞活性增加(OD 值为 0.243 ± 0.026 , $P < 0.05$),中剂量组进一步增强(OD 值为 0.259 ± 0.019 , $P < 0.01$),而高剂量组(OD 值为 0.242 ± 0.030)的效应却比中剂量组有所下降。

2 调心方抑制冈田酸诱导 tau 蛋白磷酸化 NG108 细胞经冈田酸处理后,用 PHF 1 抗体免疫印迹检测。结果观察到 20nmol/L 冈田酸处理样品可使 NG108 细胞的 42~50kD 的 tau 蛋白磷酸化程度明显加强。用调心方药物血清和冈田酸共同处理细胞后,用 C5 抗体免疫印迹显示药物血清能逆转冈田酸诱导 42~50kD 的 tau 蛋白 Ser 396 位点的磷酸化(见图 1A)。PHF 1 抗体同样表明(见图 1B)药物血清可减少 tau 蛋白 Ser 396/404 位点的磷酸化。tau 1 抗体显示药物血清可增加 NG108 细胞 Ser 199/202 位点非磷酸化的 tau 蛋白组份(见图 1C)。

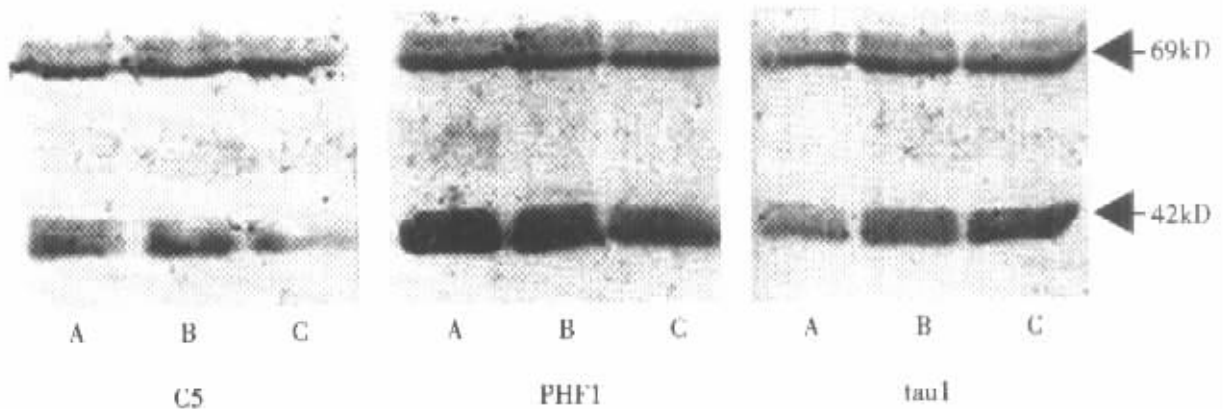


图 1 调心方对 tau 蛋白磷酸化的影响

A: NG108 细胞用冈田酸(20nmol/L)+20% 正常大鼠血清培养 12h; B: 冈田酸+20% 低剂量调心方药物血清; C: 冈田酸+20% 中剂量调心方药物血清; C5 和 PHF1 都是识别 tau 蛋白磷酸化位点的单克隆抗体,显示调心方药物血清可减少 tau 蛋白磷酸化;而识别 tau 蛋白非磷酸化位点的 tau 1 抗体显示药物血清使去磷酸化 tau 增加。

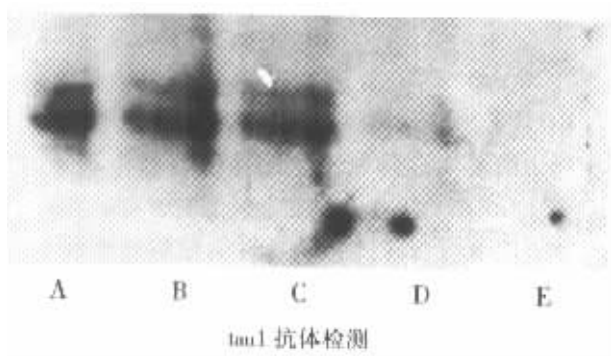


图 2 调心方对早老蛋白-1 与 tau 蛋白结合的影响

小鼠脑匀浆液中分别不加(A)中药提取液,或分别加入终浓度为 0.1%(B)、1%(C)、5%(D)、10%(E)的调心方提取液

3 调心方对 tau 蛋白和早老蛋白-1 结合的影响
用 Sepharose-G protein 结合早老蛋白-1 抗体,俘获小鼠脑匀浆液中的早老蛋白-1 及其结合蛋白。用 tau 1 抗体免疫印迹观察免疫沉淀物中的 tau 蛋白。早老蛋白-1 抗体沉淀的免疫复合物用免疫印迹检测,见其中结合有 tau 蛋白(见图 2A)。用 0.1%、1% 的调心方提取液时并不能明显影响早老蛋白-1 与 tau 蛋白的结合(见图 2B、C);当调心方提取液含量达 5%、10% 时可明显抑制早老蛋白 tau 蛋白的结合(图 2D、E)。提示低浓度调心方提取液 B、C 与对照 A 没有明显区别,而高浓度 D、E 调心方提取液明显减少了结合的 tau 蛋白。

讨 论

AD 的标志性病理结构神经原纤维缠结由过度磷酸化的 tau 蛋白形成。AD 脑内的神经元的蛋白激酶系统和磷酸脂酶系统之间的失衡被认为是 tau 蛋白过度磷酸化的原因⁽⁶⁾。郝天玲等⁽⁷⁾报道磷酸脂酶抑制剂冈田酸可导致细胞损伤和死亡。我们用 NG108 细胞经冈田酸处理,也观察到细胞活性降低,而调心方药物血清可有效地抑制冈田酸导致的细胞损伤,但直接加入调心方药物提取液的效果不那么明显。这可能提示调心方的一些有效成分可能需通过机体的处理促进其作用,或者是调心方中的部分有效成分是间接地通过使机体产生某些因子,由这些因子作用于中枢神经系统,也有可能通过机体的代谢减少了药方中的不利物质。

有文献报道冈田酸可促进培养神经细胞 tau 蛋白的磷酸化⁽⁸⁾,本实验在 NG108 细胞上也显示有类似的现象。应用此细胞模型,观察到调心方药物血清可抑

制 tau 蛋白某些位点的磷酸化,但对不同的位点的作用有所差异。这提示调心方的治疗或减轻阿尔茨海默病病情发展⁽³⁾的部分机制可能是通过抑制 tau 蛋白的过度磷酸化,但同时根据结果显示这种作用比较温和。

早老蛋白-1 是一种 AD 相关的蛋白⁽⁹⁾。已知早老蛋白-1 能与 tau 蛋白及 tau 蛋白激酶 GSK-3 结合,因此早老蛋白-1 被认为具有介导 tau 蛋白磷酸化的作用⁽⁸⁾。我们实验观察到调心方提取液可抑制 tau 蛋白与早老蛋白-1 的结合,这或许是调心方调节 tau 蛋白磷酸化的方式之一。当然对于这一结果应谨慎审视,因为要到达抑制早老蛋白-1 和 tau 蛋白的结合需要较高浓度的调心方提取液,在体内较难达到这一浓度,其次调心方内有该作用的成分是否能够跨越血脑屏障,是否能够进入细胞等方面尚需进一步研究。

参 考 文 献

1. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 1997;278:412—419.
2. Cummings JL, Vinter HV, Cole GM, et al. Alzheimer's disease (etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities). *Neurology* 1998;51(Suppl):2—17.
3. 林长兴, 杨柏灿, 林水淼. 调心补肾改善老年性痴呆智力的临床研究. *上海中医药杂志* 1995(9):8—9.
4. 赵伟康, 戴向东. 调心方对痴呆大鼠模型的 N 受体和神经肽的作用研究. *中国中西医结合杂志* 1995;15(基础理论研究特集):194—196.
5. Akihiko T, Miyuki M, Ohoshi M, et al. Presenilin-1 associates with glycogen synthase kinase-3 and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9637—9641.
6. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, et al. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1995;65:732—738.
7. 郝天玲, 王建枝, Grundke-Iqbal I, et al. 蛋白磷酸酯酶-2A 和 -1 抑制剂对成神经瘤细胞的影响. *Chin J Neurosci* 1998;14:242—246.
8. Malchiodi-Albedi F, Petrucci TC, Picono B, et al. Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 1997;48:425—438.
9. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing mis-sense mutations in early-onset familial Alzheimer disease. *Nature* 1995;375:754—760.

(收稿 2000-09-29 修回 2001-07-12)