

远志皂苷通过 UPP 通路清除 AD 大鼠脑神经细胞代谢废物积聚的作用机制研究

陈 勤¹ 陈逸青² 叶海燕¹ 于剑奇¹ 施其权¹ 黄 炎¹

摘要 **目的** 探讨远志皂苷(tenuigenin, TEN)对 AD 大鼠脑内 β 淀粉样蛋白(amyloid β protein, A β)沉积、异常磷酸化 Tau 浓度积聚的清除作用及其作用机制。**方法** 大鼠右侧海马 CA1 区注射 A β_{1-40} 建立 AD 模型,透模成功的大鼠分为模型组、TEN 低、中、高剂量组,并用远志皂苷(18.5、37.0、74.0 mg/kg)对大鼠进行灌胃治疗,另设假手术组;免疫组织化学法观察大鼠脑海马神经元中 A β_{1-40} 、Tau p-Ser²⁶² 蛋白的表达;Western blot 检测大鼠神经元中泛素蛋白(ubiquitin, Ub)和泛素连接酶 E₃(ubiquitin-protein ligase E₃)的表达水平。ELISA 法检测大鼠神经元中 26S 蛋白酶体的含量。**结果** 免疫组化显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马神经元中 A β 、Tau p-Ser²⁶² 蛋白阳性反应的神经元数量显著增多($P < 0.01$);Western blot 检测显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 Ub 表达水平上调,而 E₃ 表达下调($P < 0.01$)。ELISA 检测显示,AD 大鼠脑内的 26S 蛋白酶体含量显著减少($P < 0.01$)。与模型组比较,TEN 各组大鼠海马神经元中 A β_{1-40} 、Tau p-Ser²⁶² 和 Ub 表达水平下降明显,泛素连接酶 E₃ 表达水平和 26S 蛋白酶体含量也明显升高,以 37.0 mg/kg 和 74.0 mg/kg 剂量组效果最佳($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** UPP 通路参与了 AD 的发生过程,远志皂苷能明显降低 AD 大鼠脑内 A β_{1-40} 沉积和 tau 异常磷酸化水平。

关键词 远志皂苷;老年性痴呆; β -淀粉样蛋白;Tau 蛋白磷酸化;泛素蛋白酶体通路;代谢废物积聚

The Mechanism of Tenuigenin for Eliminating Waste Product Accumulation in Cerebral Neurons of Alzheimer's Disease Rats via Ubiquitin-Proteasome Pathway CHEN Qin¹, CHEN Yi-qing², YE Hai-yan¹, YU Jian-qi¹, SHI Qi-quan¹, and HUANG Yan¹ 1 School of Life Science, Anhui University, Anhui Province Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Hefei (230601), China; 2 Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3 (68167), German

ABSTRACT **Objective** To explore the scavenging action of tenuigenin (TEN) on intracerebral amyloid β protein (A β) aggregation and the abnormal phosphorylated tau protein and its mechanism in Alzheimer's disease (AD) rats' brain. **Methods** A β_{1-40} was injected into the right CA1 region hippocampus to establish the AD model. Successfully modeled rats were divided into the model group, the low, middle, high TEN group. Rats were administered with TEN (18.5, 37.0, 74.0 mg/kg) by gastrogavage. Besides, a sham-operation group was set up. Expression levels of A β_{1-40} and Tau p-Ser²⁶² were detected by immunohistochemistry. Expression levels of ubiquitin (Ub) and Ub-protein ligase E₃ were measured by Western blotting. The content of 26S proteasome was detected by ELISA. **Results** Immunohistochemical results showed that the number of A β and Tau p-Ser²⁶² positively reacted neurons significantly increased in model group, when compared with the sham-operation group ($P < 0.01$). Results of Western blot showed expression levels of ubiquitinated protein were up-regulated and those of Ub-protein ligase E₃ were down-regulated in the model group ($P < 0.01$). ELISA results showed that the content of 26S proteasome significantly decreased in AD rats' brain ($P < 0.01$). Compared with the model group, expression levels of A β_{1-40} , Tau p-Ser²⁶², and Ub significantly decreased; expression levels of Ub-protein ligase E₃

基金项目:安徽省教育厅自然科学研究项目(No.KJ2009A116, KJ2012A031);教育部大学生创新性实验项目(No. 201210357043);安徽大学大学生科研训练计划项目(No. 2013024);省级精品课程项目(No. 2009024)

作者单位:1.安徽大学生命科学学院,安徽省中药研究与开发重点实验室(合肥 230601);2.德国海德堡大学曼海姆医学院(德国,曼海姆 68167)

通讯作者:陈 勤, Tel:0551-65108552, E-mail:chenqin169@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0327

apparently increased; the content of 26S proteasome significantly increased in each TEN treatment group ($P < 0.05, P < 0.01$). Best effect was shown in 37.0 mg/kg and 74.0 mg/kg TEN groups. Conclusions Ub proteasome pathway (UPP) participated in the occurrence of AD. TEN could obviously reduce intracerebral $A\beta_{1-40}$ accumulation and abnormal tau phosphorylation.

KEYWORDS tenuigenin; Alzheimer's disease; β -amyloid; tau phosphorylation; ubiquitin-proteasome pathway; waste product accumulation

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种大脑神经退行性疾病,其主要病理特征包括神经细胞外以 β 淀粉样蛋白 (amyloid β protein, $A\beta$) 积聚形成的老年斑 (senile plaque, SP)、胞内磷酸化 Tau 蛋白为核心形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 和神经细胞凋亡^[1-3]。目前虽然尚不清楚 AD 的发病机制,但是, $A\beta$ 的沉积形成的神经毒性和 Tau 蛋白异常磷酸化所造成细胞骨架损毁可能是诱发 AD 神经细胞大量凋亡的元凶。大脑是新陈代谢和能量利用非常旺盛的器官,神经细胞在吸取营养与合成 ATP 的同时,会及时将一些代谢废物排外胞外,以维持细胞正常的生命活动。那么神经细胞内异常沉积的 $A\beta$ 和异常磷酸化的 Tau 蛋白为何没有得到及时清除呢? 对此,诸多学者提出了如 APP 基因突变、自由基、炎症、胆碱能减退等各种假说,但这些学说只是部分解释了 AD 可能的发病原因,对于神经细胞中的代谢废物是如何沉积的? 又是如何影响神经细胞功能的? 一直以来没有令人满意的答案。

1987 年 George 等首次证明 AD 发生与泛素—UPP 功能异常有关^[4]。其后有多位学者都证明了 AD 患者大脑海马等脑区存在泛素蛋白 (ubiquitin, Ub) 的表达异常和蛋白酶体 (proteasome, PSM) 活性下降,其 UPP 功能异常的程度与 AD 脑内高度磷酸化的 Tau 蛋白和 $A\beta$ 的积聚浓度有明显的相关性^[5-8]。因为 UPP 是细胞内蛋白质降解的主要途径,约有 85% 以上的蛋白质通过此途径进行降解。UPP 能够识别与降解胞内一些多余的、异常折叠或修饰 (磷酸化、乙酰化、糖基化等) 的或变性的蛋白质,以防止这些无效蛋白质的蓄积造成细胞损伤或死亡,因此 UPP 通路通常被认为是细胞内蛋白降解的“卫士”。AD 患者脑内 UPP 发生功能障碍,不能及时有效地清除 $A\beta$ 和磷酸化 Tau 蛋白,从而导致神经细胞凋亡。

远志皂苷 (tenuigenin, TEN) 是益智健脑中药远志中的主要活性成分,它能显著提高 AD 大鼠和 AD 小鼠的学习记忆能力,降低 AD 大鼠脑组织中总 Tau 蛋白含量和 Tau Ser³⁹⁶ 位点磷酸化的表达水平,并对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的原代神经细胞和 PC12 细胞的神经毒性

有较好的保护效应^[9-14]。但是 TEN 改善 AD 大鼠的学习记忆与神经功能,是否通过增强 UPP 功能,清除脑内积聚的 $A\beta$ 和磷酸化 Tau 浓度来保护神经细胞免遭 $A\beta$ 毒性而引起的细胞凋亡呢? 目前尚未见报道。本研究通过海马注射 $A\beta_{1-40}$ 建立 AD 大鼠模型,并用 TEN 进行干预治疗,观察 TEN 对 AD 大鼠脑神经细胞 UPP 通路中三个重要靶点——Ub、泛素连接酶 E_3 (ubiquitin ligase E_3 , E_3) 的表达与 26S 蛋白酶体 (proteasome) 含量的变化,旨在揭示 TEN 清除 AD 脑内异常蛋白沉积的部分机制。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠,10 周龄,清洁级,体重 (280 ± 30)g,雌雄不限,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号:皖医动准字 01 号。自由进食,饮水,自然昼夜节律光照。饲养于安徽大学生科院动物实验房。

2 药物 TEN 由上海瑞齐生物科技有限公司提供 (批号:20110925,经 HPLC 测定,纯度 $\geq 98\%$)。

3 试剂及仪器 $A\beta_{1-40}$ (批号:131438 - 79 - 4),美国 Sigma 公司,临用前以无菌生理盐水将 $A\beta_{1-40}$ 稀释成 1 g/L,37 °C 孵育 1 周,并不时小心搅拌,使其变为聚集状态的 $A\beta$ ^[11]。大鼠 26 S 蛋白酶体 ELISA 试剂盒 (批号:HY22361E),美国 R&D 公司;兔抗 Ub 多克隆抗体 (批号:DA3049),生工生物工程 (上海) 有限公司;兔抗 $A\beta_{1-40}$ (批号:ab10148)、兔抗 Tau (p-Ser²⁶²) 多克隆抗体 (批号:ab131354),美国 Abcam 公司;兔抗 CHIP 多克隆抗体 (批号:sc-66830),美国 Santa Cruz 公司;生物素标记羊抗兔 IgG (批号:BA1003)、正常山羊血清 (批号:AR1009)、SABC 免疫组化试剂盒 (批号:SA1022)、DAB 显色试剂盒 (批号:SA2022),均为武汉博士德生物工程有限公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (批号:bs-0061R-1)、蛋白裂解液 (批号:C-0013) 与 BCA 试剂盒 (批号:AR0146) 均为北京博奥森生物技术有限公司产品;Pro-light HRP 化学发光检测试剂 (批号:PA112),均为天根生化科技 (北京) 有限公司产

品;江湾 I 型 C 脑立体定位仪,第二军医大学产品;2315 型石蜡切片机,德国 Leica 公司产品;BX41 荧光显微镜(带 DP70 摄像系统),日本 Olympus 公司产品;450 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;FluorChem E 型凝胶成像仪,美国 Protein Simple 公司产品;5417 型台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司产品;DYCZ-24DN 型,迷你双垂直电泳仪(槽)、DYCZ-40D 型半干式转移电泳槽,均为北京市六一仪器厂产品。

4 动物模型制备、分组及干预方法 取 SD 大鼠 50 只,随机分为假手术组,模型组, TEN 低、中、高 3 个剂量组,每组 10 只。按我室方法^[13]行脑定位右侧海马 CA1 区注射(位置:前囟后 3.0 mm,中线旁开 2.0 mm,深度 2.9 mm)。模型组及各给药组大鼠一次注射 $A\beta_{1-40}$,每鼠 1 μL ,假手术组大鼠同部位注射等量无菌生理盐水。术后给予青霉素钠盐 4 万 U 肌注,每天 1 次,连续 3 天。术后第 4 天起, TEN 各剂量组大鼠分别灌胃 TEN 18.5、37.0 及 74.0 mg/kg (根据前期毒性试验结果,取 LD_{50} 1/10 为中剂量,分别取半数中剂量和双倍中剂量为低剂量组和高剂量),假手术组及模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。连续干预 30 天。

5 检测指标及方法 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,剪开胸腔暴露心脏,灌注针从左心室插入致主动脉根底,用手术剪剪开右心耳,先快速灌注生理盐水冲洗致流出液体无血水,再灌注 4% 多聚甲醛,待肝脏变成灰白色停止灌注,断头取脑, PBS 清洗后,用 10% 中性甲醛固定,常规脱水、浸蜡、包埋、进行冠状切片,片厚 4 μm 。取 0.2 g 脑组织加 1 mL 蛋白裂解液,研磨裂解 20 min (以上过程均在冰浴中完成),低温(0 $^{\circ}\text{C}$)高速(14 000 r/min)离心 10 min,取上清置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。

5.1 $A\beta_{1-40}$ 和 Tau p-Ser²⁶² 阳性细胞表达检测 采用免疫组织化学法。石蜡切片常规脱蜡复水,用 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 15 min, PBS 洗 3 $\times$ 5 min,用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液沸水修复 10 min, PBS 洗 3 $\times$ 5 min, 5% 新鲜山羊血清封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min (勿洗,甩干即可),滴加配好的一抗(兔抗 $A\beta_{1-40}$ 和兔抗 Tau p-Ser²⁶² 均按 1:100 PBS 稀释),湿盒孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;滴加生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗工作液(按 1:100 PBS 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 每片滴加 SABC 试剂 30 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育 45 min; PBS 洗 5 min $\times$ 3 次; DAB 室温显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,透明,中性树胶封固。以 PBS 代替一抗作阴性对照。光

镜以胞浆被染为棕黄色或浅棕红色的细胞记为阳性细胞,在低倍视野($\times 200$, $A\beta_{1-40}$)和高倍视野($\times 400$, Tau p-Ser²⁶²)下分别选取海马区,数 100 个细胞中的阳性细胞数,统计阳性细胞数。

5.2 Ub 及 E₃ 蛋白表达检测 采用 Western blot 检测。提取的各组蛋白样品用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取适量样品,加入等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液混匀,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中变性 5 min,各组取 15 μg 样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 250 mA 电压下转膜 2.5 h,将目的蛋白转移到 NC 膜上,室温下用新鲜 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, TBST 洗膜后,加入 TBST 稀释的一抗[β -actin(1:1 000)、Ub(1:500)、E₃(1:1 000)] 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)室温孵育 2 h, TBST 洗涤;化学发光剂避光反应 2~3 min,于凝胶成像仪上成像。以 β -actin 作为内参照,统计各组蛋白与 β -actin 灰度值的比值。

5.3 26S 蛋白酶体含量检测 采用 ELISA 检测。取新鲜全脑组织,将大脑腹面向上,用眼科镊子仔细剥离周边皮层和纹状体,从中分离出完整的海马组织(镰刀状),用预冷生理盐水洗去残留的血液。将海马置于试管中,用剪刀剪成匀浆状,加入 5 mL 0.01 mol/L PBS,用吸管反复吹打后,经 200 目网筛滤过, 1 000 r/min 离心 5 min,如此沉淀与悬浮,制成细胞悬液备用。严格按大鼠 26 S 蛋白酶体 ELISA 试剂盒说明书操作。在 96 孔培养板上设立空白对照孔、标准品和各待测样品孔,分别加入样品稀释液,标准品和脑细胞液,终体积为 200 μL ,均为双复孔。于酶标仪 450 nm 波长下,以空白孔调零,依序测量各孔的吸光度(OD 值)。以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线,根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度(含量以 ng/mL 表示)。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞表达比较(图 1,表 1) 假手术组大鼠海马区神经细胞几乎没有 $A\beta_{1-40}$ 的阳性表达,且神经细胞形态完整,结构清晰和数量较多。与假手术组比较,模型组大鼠海马区神经细胞中 $A\beta_{1-40}$

阳性表达的细胞显著增多($P < 0.01$),许多区域形成明显的炎性斑(即老年斑)或出现神经细胞凋亡后残留的空洞;与模型组比较,TEN 各剂量组干预后大鼠海

表 1 各组大鼠海马神经细胞中 $A\beta_{1-40}$ 、Tau p-Ser²⁶² 蛋白表达和 26S 蛋白酶体含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

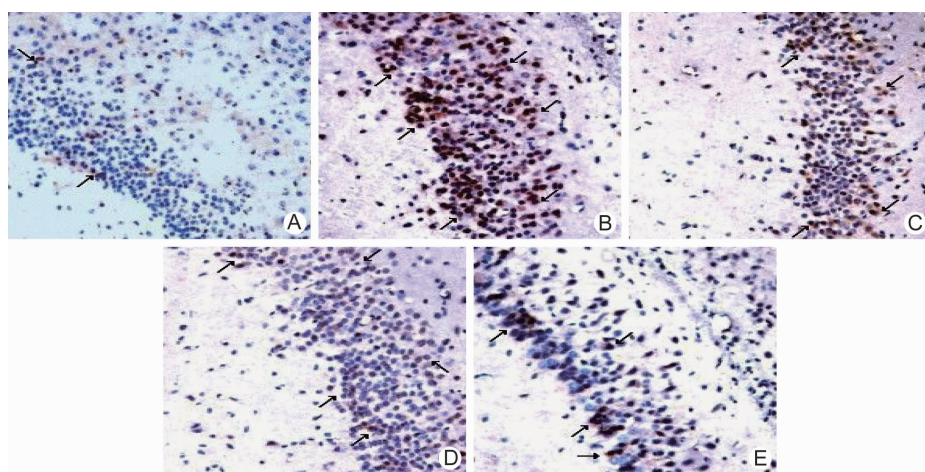
组别	n	剂量 (mg/kg)	$A\beta$ 阳性细胞数 (个)	26 S 蛋白酶体含量 (ng/L)	Tau p-Ser ²⁶² 阳性细胞数 (个)
假手术	10	—	$5.1 \pm 0.6^{**}$	$241 \pm 29^{**}$	$2.5 \pm 0.2^{**}$
模型	10	—	92.5 ± 7.2	66 ± 13	86.3 ± 8.2
TEN 低剂量	10	18.5	$81.0 \pm 6.7^*$	$86 \pm 17^*$	$75.2 \pm 6.8^*$
中剂量	10	37.0	$53.6 \pm 5.6^{**}$	$148 \pm 30^{**}$	$43.1 \pm 5.7^{**}$
高剂量	10	74.0	$27.2 \pm 3.3^{**}$	$185 \pm 30^{**}$	$36.4 \pm 5.9^{**}$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

马区神经细胞中 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞数明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

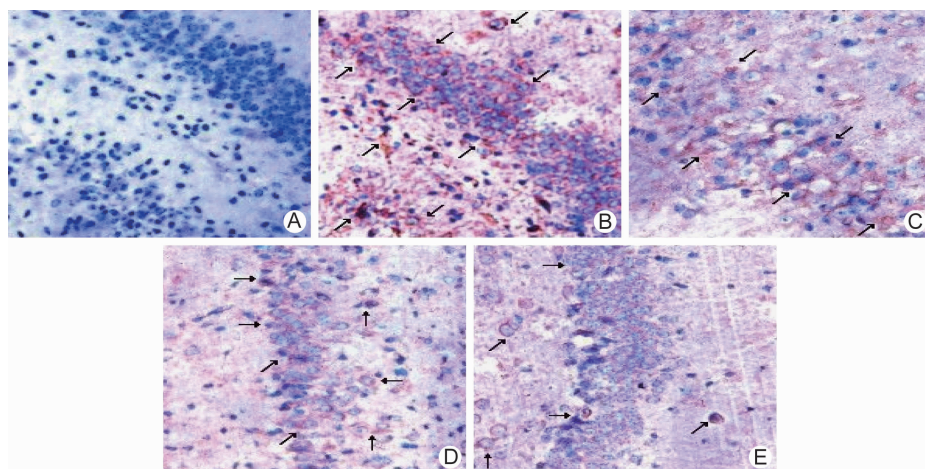
2 各组 Tau p-Ser²⁶² 阳性细胞表达比较(图 2, 表 1) 假手术组大鼠海马中的 Tau p-Ser²⁶² 阳性细胞较少。与假手术组比较,模型组大鼠皮层和海马区神经细胞中可见到大量的棕黄或棕红色斑块的泛素阳性细胞,阳性细胞率明显增多($P < 0.01$)。与模型组比较,TEN 各剂量组干预后海马区和皮层神经元中 Tau p-Ser²⁶² 蛋白的表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组 Ub 及 E_3 蛋白表达比较(图 3) 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 Ub 表达量上调,而 E_3 表达下调($P < 0.01$)。与模型组比较,TEN 各剂量组中 Ub 的表达量下调明显, E_3 表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



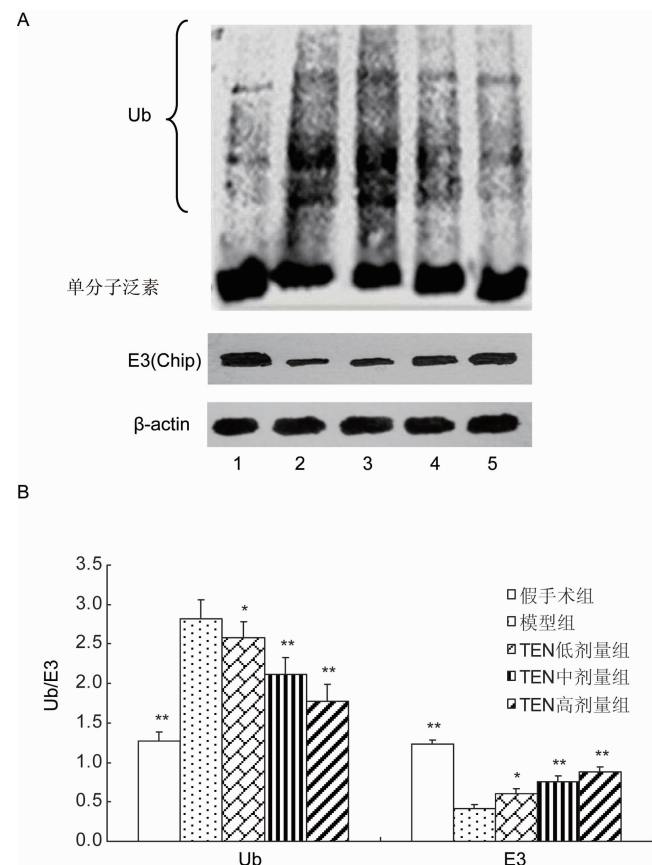
注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为 TEN 低剂量组;D 为 TEN 中剂量组;E 为 TEN 高剂量组;箭头表示阳性表达细胞

图 1 各组 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞表达 (免疫组化, $\times 200$)



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为 TEN 低剂量组;D 为 TEN 中剂量组;E 为 TEN 高剂量组;箭头表示阳性表达细胞

图 2 各组 Tau p-Ser²⁶² 阳性细胞表达 (免疫组化, $\times 400$)



注:1 为假手术组;2 为模型组;3 为 TEN 低剂量组;4 为 TEN 中剂量组;5 为 TEN 高剂量组;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图3 各组 Ub 及 E₃ 蛋白表达比较

4 各组 26S 蛋白酶体含量比较(表1) 与假手术组比较,模型组脑组织中的 26S 蛋白酶体含量下降($P < 0.01$)。与模型组比较,TEN 各剂量组大鼠脑组织 26S 蛋白酶体含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

研究表明,AD 患者脑内 A β 聚集成炎性斑块(即老年斑)是诱发神经细胞毒性的主要原因。A β 由一个大的前淀粉样肽前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 γ -和 β -分泌酶水解所生成,是一个含 N 端与 C 端异质的小分子疏水肽,由 39~43 个氨基酸组成。细胞内 A β 沉积可导致线粒体损伤、内质网应激、钙失衡、氧化应激、细胞凋亡、突触障碍,并可影响神经细胞信号转导。Tau 蛋白早在 1975 年即被发现为是一种能促使微管装配的微管相关蛋白 Tau 的生物学功能是催化微管装配和稳定微管结构。Tau 通过其羧基侧的微管连接序列与微管结合,氨基端则游离于微管,与其他细胞骨架成分或细胞膜连接。在 AD 患者尸解大脑病理切片中发现,Tau 蛋白中多达 37 个丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基有磷酸化位

点,形成 NFT 的双螺旋细丝(paired helical filaments, PHF),在脑中呈“乱麻”状态,诱发神经细胞骨架严重损毁,最终导致神经细胞凋亡。目前 A β 和 Tau 磷酸化已成为开发抗痴呆新药的靶点。本研究通过免疫组化发现,发现 AD 大鼠海马区神经细胞 A β_{1-40} 和皮层和海马区神经细胞中 Tau p-Ser²⁶² 阳性细胞表达明显增加($P < 0.01$)。当连续给 AD 大鼠 TEN 30 天后,与 AD 模型组比较,18.5、37.0、74.0 mg/kg 组大鼠海马区神经细胞 A β_{1-40} 和海马区和皮层神经元中 Tau p-Ser²⁶² 蛋白表达均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 TEN 具有清除 AD 大鼠脑内 A β 和 Tau 异常沉积的作用。

蛋白质是构成细胞生命活动的重要物质之一,其在细胞内的生成和降解保持着一种动态平衡,一旦打破了这种平衡,造成过量的蛋白质积聚,就可使细胞的结构与功能发生改变,造成机体产生疾病。真核细胞中主要有两种蛋白质降解途径:一种是溶酶体途径;另一种是非溶酶体途径,即 UPP。UPP 是细胞内蛋白质降解的主要途径,约有 85% 以上的蛋白质通过此途径进行降解。UPP 能够识别多余的和错误折叠的蛋白质,使其分解成小分子的肽段,以保持细胞内蛋白质的平衡。如果 UPP 功能出现障碍,就可导致某些疾病的发生^[4-6]。

UPP 由 Ub 和 PSM 两部分组成。PSM 是一个 26S 的多催化蛋白酶复合体,其中央是一个 20S 的催化核心颗粒(CP),两端各有一个 19S 调节颗粒(RP)帽,装配成一个分子量大约 2 000 kD 的 26S 全酶。降解蛋白是在 ATP 供能的情况下进行的,首先 Ub 的 C 端与泛素激活酶(E₁)结合形成 E₁-泛素复合物,后者将 Ub 转移到泛素耦联酶(E₂),然后在 E₃ 的催化下连接到靶蛋白,此时 19S RP 识别并结合泛素化的靶蛋白,并将泛素与底物(靶蛋白)分离,同时将底物转运至 20S 的核心区,并由后者将靶蛋白降解为 2~3 个氨基酸的蛋白肽^[17,18]。同时多聚泛素蛋白也解聚为单个泛素分子,重新被循环利用。UPP 正是通过快速降解一些调节蛋白(如转录因子、蛋白激酶、酶和抑制因子等等)、异常折叠或修饰(磷酸化、乙酰化、糖基化等)的或变性的蛋白质,以防止这些无效蛋白质的蓄积造成细胞损伤或死亡。有学者指出^[5-7],在 AD 脑内存在 Ub 的表达异常和蛋白酶体活性降低,使异常代谢的蛋白不能及时有效地清除,可能是 AD 发病的原因之一。

本研究观察到,AD 大鼠脑内泛素化蛋白表达水平升高,E₃ 表达量和 26S 蛋白酶体含量下降,并同时存在海马区神经细胞不仅有大量的 A β_{1-40} 和 Tau p-

Ser²⁶² 阳性细胞,提示 A β 和磷酸化 Tau 的生成过多会抑制蛋白酶体的活性,使得这种聚合体发生堆积,不利于清除 A β ^[15,16],最终造成细胞中毒死亡。由此可见,AD 时 UPP 的功能发生障碍,不能有效及时地清除脑内积聚的 A β 和异常磷酸化 Tau 蛋白,而过量的代谢废物堆积在神经细胞内,影响细胞的新陈代谢,最终造成神经细胞凋亡而出现学习记忆功能障碍^[9,10,12]。在本试验中,经 TEN 干预 30 天后,TEN 各剂量组大鼠海马神经元中 E₃ 表达水平和 26S 蛋白酶体含量也得到明显升高,A β ₁₋₄₀ 和 Tau Ser²⁶² 和 Ub 表达水平下降明显。由此推测,TEN 能明显降低 AD 大鼠脑内 A β ₁₋₄₀ 沉积和 Tau 异常磷酸化水平,可能与其通过激活或增强 UPP 功能,提升 Ub 识别与结合异常积聚的蛋白的能力,增加 E₃ 表达与蛋白酶体的活力,从而达到清除 AD 大鼠脑内有害代谢废物的积聚,保护神经元结构与功能完整性,从而恢复神经细胞的活力之目的。今后我们将在细胞模型上再进一步探讨 UPP 信号通路障碍与 AD 发病机制的关系及远志皂苷抗痴呆的作用机制。

参 考 文 献

- [1] Estrada LD, Soto C. Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer's disease treatment[J]. Curr Top Med Chem, 2007, 7(1): 115-126.
- [2] Zhou XW, Li X, Bjorkdahl C, et al. Assessments of the accumulation severities of amyloid beta-protein and hyperphosphorylated tau in the medial temporal cortex of control and Alzheimer's brains[J]. Neurobiol Dis, 2006, 22(3): 657-668.
- [3] Awasthi A, Matsunaga Y, Yamada T. Amyloid-beta causes apoptosis of neuronal cells via caspase cascade, which can be prevented by amyloid-beta-derived short peptides[J]. Exp Neurol, 2005, 196(2): 282-289.
- [4] Perry G, Friedman R, Shaw G, et al. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer's disease brains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(9): 3033-3036.
- [5] Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2000, 75(1): 436-439.
- [6] Golab J, Bauer TM, Daniel V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in the diagnosis of human diseases[J]. Clin Chem Acta, 2004, 340(1-2): 27-40.
- [7] Song S, Jung YK. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(11): 565-570.
- [8] Blurton-Jones M, Laferla FM. Pathways by which Abeta facilitates tau pathology[J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(5): 437-448.
- [9] 陈勤, 曹炎贵, 张传惠, 等. 远志皂苷对 β -淀粉样肽和鹅膏蕈氨酸引起胆碱能系统功能降低的影响[J]. 药理学学报, 2002, 37(12): 913-917.
- [10] 陈勤, 高晨曦, 葛礼浩. 远志皂苷对脑定位注射 A β ₁₋₄₀ 拟 AD 大鼠脑内神经形态病理学变化的影响[J]. 激光生物学报, 2006, 15(3): 294-298.
- [11] 陈勤, 李磊珂. 远志皂苷对 β 淀粉样蛋白 1-40 诱导的体外培养皮层神经细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1336-1339.
- [12] 陈庆林, 陈勤, 金蓓蓓. 远志皂苷对 AD 小鼠学习记忆能力及中枢胆碱能系统标志酶活性的影响[J]. 中药药理学与临床, 2011, 27(3): 33-36.
- [13] 徐柯乐, 陈勤, 刘伟, 等. 远志皂苷减轻 A β ₁₋₄₀ 诱导的 AD 大鼠脑神经元 tau 蛋白 Ser³⁹⁶ 位点的过度磷酸化[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(9): 1605-1609.
- [14] 杨贤志, 陈勤, 陈庆林, 等. 远志皂苷对 β 淀粉样蛋白 1-40 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 379-384.
- [15] Lusit G, Chana F, Maria EF, et al. Amyloid β -protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation *in vitro* [J]. J Biol Chem, 1995, 270(34): 19702-19708.
- [16] Tseng BP, Green KN, Chan JL, et al. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(11): 1607-1618.
- [17] Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(1): 1-11.
- [18] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration[J]. Nature, 2006, 443(7113): 780-786.

(收稿:2013-8-28 修回:2014-11-27)