

· 药理 ·

## 补肾化痰益智方对 APPV717I 小鼠学习记忆能力和海马神经元 Tau 蛋白磷酸化的影响

孔明望, 赵健邦, 石和元, 刘萍, 王平\*  
(湖北中医药大学 老年医学研究所, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的:观察补肾化痰益智方(BSHT)对 APPV717I 转基因小鼠干预效果,揭示其可能作用机制。方法:将 3 月龄 APPV717I 转基因小鼠 120 只分为 2 批,每批 60 只,每批又随机分为 5 组,分别为多奈哌齐( $0.000\ 92\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )组,补肾化痰益智方低、中、高剂量组( $5.2, 10.4, 20.8\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),模型组(APP),每组 12 只(雌雄各半);同月龄遗传背景相同的 C57BL/6J 小鼠 24 只作为正常组,灌胃给药,模型组及正常组予等容积双蒸水灌胃,每日 1 次。第 1 批小鼠给药 8 个月,第 2 批给药 4 个月,最后同时以 Morris 水迷宫进行行为学检测,分别以酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫印迹法测定(Western blot)海马神经元 Tau 蛋白磷酸化(p-Ser 199/202, Tau-1)的表达水平。结果:行为学实验结果表明,与正常组比较,模型组小鼠的潜伏期有所延长( $P < 0.05, P < 0.01$ );各治疗组与模型组比潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ )。ELISA 和 Western blot 实验结果表明,与正常组比较,模型组小鼠海马神经元的 Ser199/202 磷酸化位点磷酸化程度显著升高( $P < 0.01$ );各治疗组 Ser199/202 磷酸化位点磷酸化水平较模型组比明显缩短( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:补肾化痰益智方可以改善 Ser199/202 磷酸化位点磷酸化程度,防止神经原纤维缠结(NFT)的形成,从而改善 APPV717I 转基因小鼠早期的学习记忆能力。

**[关键词]** 补肾化痰益智方;老年性痴呆;APPV717I 转基因小鼠;Morris 水迷宫;学习记忆能力;神经原纤维缠结;Tau 蛋白磷酸化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0096-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120096

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1431.046.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-24 14:31

## Effect of Bushen Huatan Yizhi Decoction on Learning and Memory Ability and Tau Protein Hosphorylation of Hippocampal Neurons in APPV717I Mice

KONG Ming-wang, ZHAO Jian-bang, SHI He-yuan, LIU Ping, WANG Ping\*  
(Institute of Geratology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the intervention effect of Bushen Huatan Yizhi decoction (BSHT) in APPV717I transgenic mice and explore its possible mechanism. **Method:** The 120 three months old APPV717I transgenic mice were randomly divided into two batches,  $n = 60$  in each batch. The mice in each batch were randomly divided into model group (APP), Donepezil group ( $0.000\ 92\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), BSHT low dose group ( $5.2\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), middle dose group ( $10.4\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and high dose group ( $20.8\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $n = 12$  in each group (6 males and 6 females). Another 24 C57BL/6J mice of the same age were set as a normal group, and the mice in model group and normal group received intragastric administration of equivalent volume of distilled water, 1 time/day. The first batch of mice received drug administration for 8 months, and the second

**[收稿日期]** 20170118(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81130064);国家自然科学基金项目(81001542)

**[第一作者]** 孔明望,博士,副教授,从事中医药防治老年病治则治法研究, Tel:027-68891231, E-mail:126959661@qq.com

**[通讯作者]** \*王平,博士,二级教授,从事中医药防治老年病治则治法研究, Tel:027-68890008, E-mail:pwang54@aliyun.com

batch for 4 months. Behavioral ability was measured in Morris water maze finally, and the expression levels of Tau protein phosphorylation (p-Ser 199/202, Tau-1) in the hippocampus was determined by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. **Result:** Behavioral experiment results showed that, as compared with the normal group, the latency was prolonged in model group mice ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). After months treatment, the latency was shortened in various treatment groups as compared with model group ( $P < 0.05$ ). ELISA and Western blot assay showed that as compared with the normal group, the phosphorylation degree of Ser199/202 phosphorylation sites in hippocampal neurons was increased significantly in model group ( $P < 0.01$ ); and the phosphorylation degree of Ser199/202 phosphorylation sites in various treatment groups was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Bushen Huatan Yizhi decoction can improve the phosphorylation degree of Ser199/202 phosphorylation sites, prevent neurofibrillary tangle (NFT) formation, and thus improve the early learning and memory abilities in APPV717I transgenic mice.

[**Key words**] Bushen Huatan Yizhi decoction; Alzheimer's disease; APPV717I transgenic mice; Morris water maze; learning and memory ability; neurofibrillary tangle; Tau protein phosphorylation

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性记忆障碍和智能衰退为主要临床特征的中枢神经系统退行性疾病,是目前公认的世界性公共卫生重大问题<sup>[1]</sup>。中医药在该病的防治方面有着丰富的理论和实践经验,以其疗效确切、毒副作用少而显示了良好的前景。

神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 和老年斑 (senile plaques, SP) 是 AD 患者脑内的特征性病理改变。NFT 在神经元胞体内,由高度磷酸化的 Tau 蛋白聚集形成,其数目和 AD 的痴呆程度密切相关,有人认为 Tau 蛋白的过度磷酸化是 AD 的核心病变<sup>[2]</sup>。所以积极干预 Tau 蛋白的过度磷酸化对防治 AD 有重要指导意义。

AD 属中医学的呆病、郁证、文痴等范畴,脾肾亏虚,髓海不足是老年性痴呆的基础,痰瘀阻窍是发病的重要因素。补肾化痰益智方由半夏、茯苓、枳实、石菖蒲、熟地黄、制何首乌、白芥子等组成,具有补肾化痰益智的功效。课题组临床上应用补肾化痰益智法治 AD 有满意疗效<sup>[3]</sup>,前期研究结果也表明补肾化痰益智方可改善 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠学习记忆能力<sup>[4]</sup>。本实验采用 APPV717I 转基因小鼠动物模型,运用 Morris 水迷宫的方法,根据 AD 临床治疗疗程长的特点,分别观察补肾化痰益智方给药 4 个月和 8 个月对其学习记忆能力和 Tau 蛋白过度磷酸化水平影响,探讨补肾化痰益智方给药不同时期对 Tau 过度磷酸化的作用靶点,为防治 AD 的中医药研究提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 3 月龄 APPV717I 转基因鼠 120 只 (雌雄各半),购自中国医学科学院实验动物研究中心,

合格证号 SCXK(京)2006-0009,同时购买同月龄相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠 24 只 (雌雄各半)作为正常组。所有小鼠均饲养于湖北中医药大学屏障环境实验动物室,许可证号 SYXK(鄂)2012-0068。实验过程中动物自由摄食和饮水,室温 20 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 70%。本研究所涉及的动物相关操作均在湖北中医药大学动物伦理委员会的批准下进行。

**1.2 药物及试剂** 补肾化痰益智方由半夏、茯苓、枳实、石菖蒲、熟地黄、制首乌、白芥子等组成,购自湖北中医药大学附属国医堂,经水煎制成相当于含生药 2 g·mL<sup>-1</sup> 浓缩液。盐酸多奈哌齐 [卫材 (中国) 药业有限公司,批号 20151106,使用时研磨粉碎,用双蒸水溶解配制成质量浓度 0.92 g·L<sup>-1</sup>]。小鼠多克隆抗体 Tau-1 [识别 Tau 蛋白非 p-Ser199/202 (p-Ser199/202) 位点] 及兔多克隆抗体 p-Ser199/202 (识别 Tau 蛋白磷酸化 Ser199/202 位点) (美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBB1236P, SBHL2063Q); 蛋白质免疫印记法 (Western blot) 所用二抗山羊抗兔 IgG 通用二抗 (北京中杉金桥生物技术公司,批号 103658); 5 × 加样缓冲液, 30% Acr-Bis1, 5 mol Tris-HCl 缓冲液, 10% SDS, 四甲基乙二胺 (TEMED), SuperECL, 20 × 洗涤缓冲液 (TBST) 和二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (北京尚柏生物医学技术有限公司,批号分别为 2015021601, 2015032102, 2015030565, 2015050102, 2015040336, 2015040129, 2015050325, 11101214)。

**1.3 仪器** Morris 水迷宫及自动采集处理系统 (上海移数科技有限公司); SpectraMax M5 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 164-5050 型蛋

白免疫印迹相关设备基础型电源,165-8001 型小型垂直电泳槽及 170-4071 型转印仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** APPV7171 转基因小鼠实验小鼠共分 2 批,每批 60 只,每批又随机分为 5 组,分别为模型组、多奈哌齐组、补肾化痰益智方低、中、高剂量组,每组 12 只;同月龄背景相同的 C57BL/6J 小鼠 24 只作为正常组。高、中、低剂量组分别按体表面积换算成含生药 20.8,10.4,5.2  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  灌胃给药,模型组及正常组予等容积双蒸水灌胃,每日 1 次。第 1 批小鼠给药 8 个月,第 2 批给药 4 个月,最后同时进行行为学测试。

### 2.2 检测指标与方法

**2.2.1 空间学习记忆能力测试** 采用 Morris 水迷宫实验法。测试程序包括:①定位航行实验,用于检测动物在水迷宫中的学习记忆能力。前 2 d 为训练,后 3 d 为测试时间,每天测试 2 次,每次 60 s,记录逃避潜伏期,停留时间设为 5 s。如 60 s 内未找到平台,则引至平台停留 10 s,逃避潜伏期记为 60 s。②空间搜索实验,用于检测动物对平台空间位置记忆保持能力。第 6 天撤除平台,从定位航行的测试入水点放入,记录 60 s 内动物在目标象限和其他象限的游泳时间,并用小鼠在目标象限的游泳时间占总游泳时间百分比进行组间比较。

**2.2.2 海马神经元 Tau 蛋白水平检测** 行为学测试完毕后,麻醉后取新鲜脑组织置液氮罐中保存。实验时海马称质量裂解后取上清,bradford 法蛋白含量测定。分别采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法和 Western blot 法检测。ELISA 法步骤为①将稀释好的包被抗体加入 ELISA 板包被,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  放置 48 h;②每孔中依次加入待测样品 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 120 min。③洗涤液充分洗 4~6 次,印干后每孔加第一抗体工作液 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 60 min。洗板同前。④每孔加酶标抗体工作液 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 60 min。⑤每孔加底物工作液 100  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  暗处反应 5~10 min,加入 1 滴终止液混匀。⑥在 492 nm 处测吸光度  $A$ 。实验结果以  $A$  表示,所有  $A$  都减去空白值后再行计算,进行组间对比。

Western blot 法步骤为①样品制备。用 Bradford 法测定蛋白浓度并调节各组蛋白质量浓度统一为 0.8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 4:1 比例加 5 $\times$  上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$  沸水浴变性 5 min。②制胶。制备电泳凝胶,用微量

加样器按照正常组、模型组、多奈哌齐组、补肾化痰益智方低、中、高剂量组的顺序加样于各孔中,加样量 10  $\mu\text{L}$ 。③电泳。连接电源,设定为恒压 80 V,电泳至溴酚蓝到达分离胶后,将电压改为 100 V,溴酚蓝接近分离胶底部时,结束电泳。④转膜。做夹心三明治,从阴极到阳极分别放置海绵、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵,连通电源,设定 100 V,1 h。⑤杂交。PVDF 膜 TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次,5% 脱脂奶粉封闭室温 1 h。弃去封闭液,加入稀释的抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。弃去一抗,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次。加入用抗体稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,稀释比例 1:1 万,摇床室温孵育 1 h。⑥曝光。弃去二抗,TBST 洗膜,10 min $\times$ 3 次。加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。结果以目的条带灰度值/ $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)表示。

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,所得数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间数据比较用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 给药 4 个月对 APPV7171 转基因小鼠空间学习记忆能力的影响**

**3.1.1 定位航行实验** 各组小鼠的逃避潜伏期呈下降趋势。第 3 天,模型组小鼠逃避潜伏期与正常组比较显著延长( $P<0.01$ );多奈哌齐组和补肾化痰益智方高剂量组与模型组比较逃避潜伏期明显缩短( $P<0.05$ ),与正常组比较也无差异;低、中剂量组与模型组比较未见显著差异。第 4 天,正常组与模型组比较呈显著差异( $P<0.01$ )。多奈哌齐组及补肾化痰益智方低、高剂量组与模型组比较呈现明显差异( $P<0.05$ ),但各治疗组及与正常组间无明显差异。第 5 天,正常组与模型组间差异显著( $P<0.01$ ),多奈哌齐组及补肾化痰益智方中、高剂量组与模型组比较有显著差异( $P<0.05$ )。低剂量组与模型组比较无明显差异。见表 1。

**3.1.2 空间探索实验** 模型组小鼠在目标象限游泳时间占总体游泳时间比与正常组比较有明显缩短( $P<0.01$ )。补肾化痰益智方中、高剂量组及多奈哌齐组小鼠与模型组比较目标象限游泳时间比明显延长( $P<0.05$ ),并且都接近正常水平;而低剂量组与模型组比较无显著差异。补肾化痰益智方各剂量组间以及与多奈哌齐组比较亦无显著差异。见表 1。

**3.2 给药 8 个月对 APPV7171 转基因小鼠空间学习记忆能力的影响**

表 1 补肾化痰益智方对给药 4 个月 APPV7171 小鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on behavior of APPV7171 mice when administered for four months( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	逃避潜伏期/s			目标象限的时间比/%
		第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
正常	-	36.80 ± 12.60	32.87 ± 15.5	27.53 ± 14.21	41.63 ± 14.56
模型	-	50.33 ± 9.39 <sup>2)</sup>	47.73 ± 8.65 <sup>2)</sup>	44.87 ± 11.98 <sup>2)</sup>	26.26 ± 10.86 <sup>2)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	42.74 ± 11.66	37.82 ± 12.15 <sup>1)</sup>	31.43 ± 12.48 <sup>1)</sup>	39.81 ± 13.36 <sup>1)</sup>
补肾化痰益智方	5.2	40.93 ± 14.11	36.93 ± 13.78 <sup>1)</sup>	35.00 ± 15.75	36.63 ± 13.06
	10.4	42.92 ± 13.05	38.58 ± 14.15	31.42 ± 14.80 <sup>1)</sup>	38.39 ± 17.53 <sup>1)</sup>
	20.8	38.45 ± 14.12 <sup>1)</sup>	35.27 ± 14.01 <sup>1)</sup>	30.91 ± 13.01 <sup>1)</sup>	39.44 ± 14.67 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与正常组比较<sup>2)</sup>P < 0.01。

**3.2.1 定位航行实验** 测试期各组小鼠的逃避潜伏期均下降趋势。第 3 天,模型组小鼠的潜伏期与正常组比明显延长(P < 0.05),补肾化痰益智方高剂量组与模型组比逃避潜伏期显著缩短(P < 0.05),其他各组与模型组潜伏期间比较未见差异。第 4 天,正常组与模型组比潜伏期明显缩短(P < 0.05),补肾化痰益智片低、高剂量组与模型组比较潜伏期明显缩短(P < 0.05),其他各组与模型组间比较未见差异。第 5 天,正常组、多奈哌齐组及补肾化痰益智方中、高剂量与模型组比较呈现显著差异

(P < 0.05),低剂量组与模型组比较无明显差异,各治疗组之间及与正常组比较亦无显著差异。见表 2。

**3.2.2 空间探索实验** 模型组小鼠在目标象限游泳时间占总游泳时间比与正常组比明显缩短(P < 0.01)。与模型组比较,补肾化痰益智方各剂量组与多奈哌齐组目标象限游泳时间比明显延长(P < 0.05),且与正常组之间比较无明显差异,接近正常水平;补肾化痰益智方各剂量组之间及与多奈哌齐组比较无显著差异。见表 2。

表 2 补肾化痰益智方对给药 8 个月 APPV7171 小鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on behavior of APPV7171 mice when administered for eight months( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	逃避潜伏期/s			目标象限的时间比/%
		第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
正常	-	39.17 ± 12.68	36.75 ± 14.72	33.08 ± 14.49	33.24 ± 7.98
模型	-	51.33 ± 7.80 <sup>2)</sup>	49.83 ± 7.78 <sup>2)</sup>	47.17 ± 10.19 <sup>2)</sup>	22.19 ± 6.79 <sup>3)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	42.25 ± 14.23	40.00 ± 12.69	34.83 ± 13.60 <sup>1)</sup>	29.49 ± 10.31 <sup>1)</sup>
补肾化痰益智方	5.2	43.27 ± 10.32	37.64 ± 13.52 <sup>1)</sup>	37.55 ± 13.92	30.22 ± 7.90 <sup>1)</sup>
	10.4	41.60 ± 10.51	43.60 ± 11.61	35.50 ± 13.91 <sup>1)</sup>	30.90 ± 7.45 <sup>1)</sup>
	20.8	40.00 ± 12.34 <sup>1)</sup>	38.83 ± 14.45 <sup>1)</sup>	34.42 ± 12.38 <sup>1)</sup>	31.28 ± 9.63 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与正常组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,<sup>3)</sup>P < 0.01。

**3.3 对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 p-Ser199/202 含量的影响** 酶联免疫分析结果显示,给药 4 个月后,各组 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202 含量数值上稍有差异,但各组两两比较均无显著性差异。给药 8 个月时,与正常组比较,模型组小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202 含量显著增加(P < 0.01);与模型组比较,高、中剂量组小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202 含量明显减少(P < 0.01),低剂量组和多奈哌齐组 p-Ser199/202 含量与模型组表达也明显减少(P < 0.05)。见表 3。

表 3 补肾化痰益智方对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 p-Ser199/202 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on p-Ser199/202 content of APPV7171 mice when administered for four and eight months( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-Ser199/202	
		(4 个月)	(8 个月)
正常	-	26.18 ± 3.84	32.18 ± 5.42
模型	-	32.61 ± 5.63	64.16 ± 10.36 <sup>3)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	28.49 ± 5.19	52.13 ± 9.37 <sup>1)</sup>
补肾化痰益智方	5.2	31.27 ± 7.06	56.07 ± 8.85 <sup>1)</sup>
	10.4	29.15 ± 4.47	49.31 ± 6.97 <sup>2)</sup>
	20.8	29.37 ± 3.69	43.32 ± 6.49 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与正常组比较<sup>3)</sup>P < 0.01(表 4~6 同)。

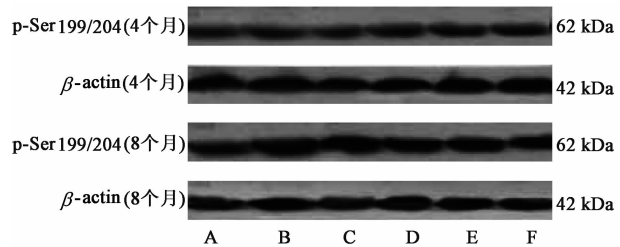
**3.4 对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 p-Ser199/202 蛋白的影响** 免疫印迹分析结果显示,给药 4 个月后,各组 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202

表达数值上稍有差异,但两两比较均无显著性差异。给药 8 个月时,与正常组比较,模型组小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202 表达显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,高、中剂量组小鼠海马 CA1 区 p-Ser199/202 表达明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),低剂量组和多奈哌齐组 p-Ser199/202 表达与模型组无明显差异。见表 4,图 1。

表 4 补肾化痰益智方对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 p-Ser199/202 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on p-Ser199/202 protein expression of APPV7171 mice when administered for four and eight months ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	p-Ser199/202/ β-actin(4 个月)	p-Ser199/202/ β-actin(8 个月)
正常	-	0.75 ± 0.09	0.81 ± 0.12
模型	-	0.81 ± 0.11	1.16 ± 0.28 <sup>3)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	0.79 ± 0.13	1.12 ± 0.22
补肾化痰益智方	5.2	0.75 ± 0.08	1.09 ± 0.18
	10.4	0.77 ± 0.11	1.03 ± 0.16 <sup>1)</sup>
	20.8	0.72 ± 0.09	0.94 ± 0.13 <sup>2)</sup>



A. 正常组;B. 模型组;C. 多奈哌齐组;D. 补肾化痰益智方 5.2 g·kg<sup>-1</sup>组;E. 补肾化痰益智方 10.4 g·kg<sup>-1</sup>组;F. 补肾化痰益智方 20.8 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 给药 4 个月和 8 个月时各组小鼠 p-Ser199/202 表达水平  
Fig.1 Expression of p-Ser199/202 in APP transgenic mice that were dosed of GEPT for four and eight months

**3.5** 对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 Tau-1 含量的影响 酶联免疫分析结果显示,给药 4 个月后,各组 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 Tau-1 表达数值上稍有差异,但各组两两比较均无显著性差异。给药 8 个月时,与正常组比较,模型组小鼠海马 CA1 区表达显著减少 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,多奈哌齐组和高剂量组小鼠海马 CA1 区 Tau-1 表达明显增加 ( $P < 0.01$ ),其中高剂量组与正常组 Tau-1 表达相近,无明显差异;多奈哌齐低、中剂量组小鼠海马 CA1 区 Tau-1 表达显著增加 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

**3.6** Tau-1 的免疫印迹分析结果 给药 4 个月时,各组在 52 ~ 68 kDa。之间出现一系列条带,条带色

表 5 补肾化痰益智方对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 Tau-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on Tau-1 content of APPV7171 mice when administered for four and eight months ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Tau-1 (4 个月)	Tau-1 (8 个月)
正常	-	44.16 ± 9.18	40.61 ± 7.35
模型	-	39.42 ± 8.33	28.16 ± 6.08 <sup>3)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	39.16 ± 10.49	35.28 ± 7.33 <sup>2)</sup>
补肾化痰益智方	5.2	49.18 ± 9.41	32.21 ± 7.64 <sup>1)</sup>
	10.4	41.19 ± 7.66	31.94 ± 8.19 <sup>1)</sup>
	20.8	45.37 ± 10.08	38.14 ± 6.02 <sup>2)</sup>

粗,表明出现磷酸化,但统计各组两两比较均差异不显著。给药 8 个月时,模型组小鼠海马 Tau-1 的表达水平与正常组比较下降 20.4%。各给药组小鼠海马 Tau-1 表达水平与模型组比较都有不同水平的上升,多奈哌齐组上升 10.8% ( $P < 0.05$ ),补肾化痰益智方低剂量组表达水平增加了 8.5% ( $P < 0.05$ ),中剂量组增加 15.5% ( $P < 0.01$ ),高剂量组上升 20.1% ( $P < 0.01$ )。见表 6,图 2。

表 6 补肾化痰益智方对给药 4,8 个月 APPV7171 小鼠 Tau-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Bushen Huatan Yizhi decoction on Tau-1 protein expression of APPV7171 mice when administered for four and eight months ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Tau-1/ β-actin(4 个月)	Tau-1/ β-actin(8 个月)
正常	-	1.05 ± 0.16	0.82 ± 0.12
模型	-	0.95 ± 0.21	0.66 ± 0.11 <sup>3)</sup>
多奈哌齐	0.000 92	0.97 ± 0.18	0.73 ± 0.14 <sup>1)</sup>
补肾化痰益智方	5.2	0.89 ± 0.16	0.71 ± 0.12 <sup>1)</sup>
	10.4	0.92 ± 0.18	0.76 ± 0.09 <sup>2)</sup>
	20.8	0.94 ± 0.15	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

学习记忆障碍是老年痴呆患者最重要的临床症状和特征之一。改善学习记忆能力一直是神经科学的研究热点之一。行为学测试是专门研究动物行为学变化的常用实验方法,通常用于观察和研究神经、心理及精神等方面的异常变化或表现,在基础研究中具有十分重要的意义,也是判断老年性痴呆的基本方法之一。Morris 水迷宫检测是研究小鼠行为学的经典实验方法。

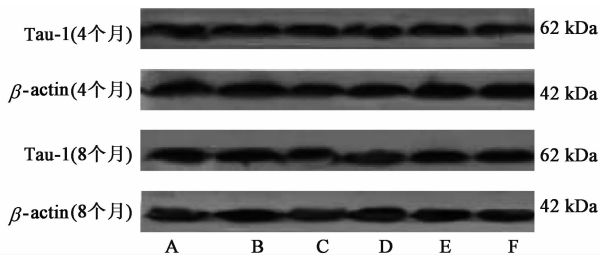


图 2 给药 4 个月和 8 个月时各组小鼠 Tau-1 表达水平  
Fig. 2 Tau-1 expression in APP transgenic mice that were dosed of BSHT for four and eight months

APPV717I 转基因小鼠的 APP 基因跨膜区段中 717 位点发生了缬氨酸转变为异亮氨酸 (V-I) 的突变,较好地再现了 AD 的某些病理和行为学特征,成为研究 AD 发病机制的重要载体。2000 年国内成功建立这种转基因小鼠模型<sup>[5]</sup>,并进行了初步的行为学测试和脑内病理分析,结果显示 APPV717I 小鼠 3 月龄时可见跳台实验错误次数增多,4 月龄时即发生空间学习记忆能力损害<sup>[6]</sup>,9 月龄见小鼠海马及皮层  $\beta$  沉积。行为学改变发生在  $\beta$  沉积之前<sup>[7]</sup>,此时  $\beta$  对于神经系统的损害尚停留在突触阶段,而 AD 的进行性认知损害导致疾病进程不可逆的发展使得对与疾病的早期或前期如 MCI 的研究显得更为重要,预防和早期干预是目前研究的重点,而 APPV717I 小鼠本身恰好符合这一特点,因此已成为研究的可靠对象。另外,由于 AD 病程较长,药物疗效与给药时程关系较大,并且药效难以维持,所以观察药物长时程作用的药物疗效情况更贴切临床用药实际。

此次实验结果表明,模型组小鼠的潜伏期有所延长,各治疗组与模型组比潜伏期明显缩短,与西药组结果相近。说明各治疗组对于痴呆模型小鼠的空间学习记忆能力有非常明显的改善作用,其中,尤以补肾化痰益智方高剂量组的效果更好而平稳,在给药 8 个月后的效果更甚于多奈哌齐组。神经原纤维缠结 (NFT) 和老年斑 (SP) 是最经典的 AD 脑组织病理变化。NFT 由成对螺旋纤维 (PHF) 构成,主要成分为过度或异常磷酸化的 Tau 蛋白, Tau 蛋白过度磷酸化加快了其在大脑和脑脊液中的积累并直接促进 NFT 的形成<sup>[8]</sup>。在生理条件下, Tau 蛋白主要位于中枢和外周神经系统的轴突,结合微管促进微管蛋白聚集和保持微管稳定。研究发现, AD 患者脑中发现 3 种 Tau 蛋白,即胞浆正常 Tau 蛋白 (C-Tau),可溶于水的异常磷酸化 Tau 蛋白 (ADp-Tau) 及异常修饰聚集成 PHF 的 Tau 蛋白 (PHF-Tau)<sup>[9]</sup>。AD 患者脑组织的老年痴呆症的 NFT 严重程度与临

床病理呈正相关<sup>[10]</sup>。而 NFT 在不改变微管完整性的前提下即可减弱顺向轴浆运输能力,进而通过异常复杂的机制诱发神经元变性并最终引起 AD 的发生<sup>[11-12]</sup>。这些都强烈提示 Tau 蛋白过度磷酸化在促进 AD 发病中起重要作用。通过磷酸化依赖位点特异性抗 Tau 蛋白抗体对 PHF-Tau 的免疫印迹以及氨基酸序列分析等进一步对 Tau 蛋白的分析,已发现在 PHF-Tau 蛋白上至少有 21 个磷酸化位点<sup>[13]</sup>。正常成熟脑内 Tau 蛋白磷酸化位点很少,而 AD 患者脑中 Tau 蛋白磷酸化位点高达 40 个以上,主要有 181, 199, 202, 231, 396 和 404 多磷酸化位点<sup>[2]</sup>。本研究选择 Ser199/202 位点,分别采用 ELSIA 和 Western blot 法检测此二位点 Tau 蛋白的磷酸化情况。实验结果表明,补肾化痰益智方可以改善 Ser199/202 磷酸化位点磷酸化程度,防止 NFT 的形成,提高学习和记忆功能,为补肾化痰益智方在 AD 的预防和治疗提供了重要的参考价值。

AD 以本虚标实为主要特征,本虚在于脾肾的精气不足,标实在于痰浊血瘀。正虚可以生痰瘀,痰瘀又可加重正虚,二者互为因果,共同致病,形成恶性循环,以致病程缠绵,见症多端。所以其防治,首应重视脾肾的亏衰,消除脾肾亏虚髓渐空之象。除此之外,当应辅以化痰开窍以图清源固本。通过标本兼治,使精气充盛,脑络畅通,元神得养,神安智生,从而达到体内功能的恢复。该实验结果表明,补肾化痰益智方各治疗组均在一定程度上有效改善模型小鼠学习记忆水平,与阳性药物多奈哌齐盐酸盐有类似的效果,并能显著降低 Tau 蛋白 Ser199/202 位点的磷酸化程度,高剂量效果更显著。补肾化痰益智方可以改善 Ser199/202 磷酸化位点磷酸化程度,防止 NFT 的形成,从而改善 APPV717I 转基因小鼠早期的学习记忆能力。

[参考文献]

[1] JIA J, WANG F, WEI C, et al. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1): 1-9.  
[2] 高珊,孔立红. Tau 蛋白的过度磷酸化机制及其在阿尔茨海默病中的作用[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2016, 45(6): 711-715.  
[3] 张书,王平. 王平运用补肾化痰法治疗老年疑难杂症经验[J]. *中医杂志*, 2013, 54(8): 705-706.  
[4] 许湘,石和元,孔明望,等. 补肾化痰益智法对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(8): 102-105.  
[5] 常洋,秦川,朱华,等. 阿尔茨海默病转基因动物模型

- 的建立[J]. 解剖学报, 2000, 31(2):144-146.
- [ 6 ] 张兰, 邢颖, 赵玲, 等. 不同时程 APP 转基因小鼠学习记忆改变及参乌胶囊、二苯乙烯苷的干预作用[J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(3):193-196.
- [ 7 ] Hsia A Y, Masliah E, Mcconlogue L, et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(6):3228-3233.
- [ 8 ] Plouffe V, Mohamed N V, Rivest-Mc G, et al. Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e36873.
- [ 9 ] Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Lee H G, et al. Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis [J]. Expert Rev Neurother, 2010, 10(5):683-691.
- [10] Riley K P, Snowden D A, Markesbery W R. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study [J]. Ann Neurol, 2002, 51(5):567-577.
- [11] Horvath J, Burkhard P R, Herrmann F R, et al. Neuropathology of parkinsonism in patients with pure Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 39(1):115-120.
- [12] Kövari E, Herrmann F R, Bouras C, et al. Amyloid deposition is decreasing in aging brains: an autopsy study of 1,599 older people [J]. Neurology, 2014, 82(4):326-331.
- [13] Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, et al. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau [J]. J Biol Chem, 1995, 270(2):823-829.

[责任编辑 周冰冰]