

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0942.009

加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所致的 PC12 细胞 tau 蛋白高度磷酸化的抑制作用及机制

曾克武, 王学美*, 富宏, 刘庚信

(北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034)

[摘要] **目的:**研究加味五子衍宗方对 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta_{25-35}$)所致的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(PC12)中的微管相关蛋白(tau 蛋白)高度磷酸化的抑制作用和潜在机制。**方法:**将 PC12 细胞分为正常对照组、模型组、给药组,使用 $A\beta_{25-35}$ ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导 PC12 细胞的 tau 蛋白高度磷酸化,并同时加入加味五子衍宗方提取物($50 \sim 400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用细胞 24 h,然后考察加味五子衍宗方对 PC12 细胞 tau 蛋白高度磷酸化的抑制作用。**结果:**加味五子衍宗方单独作用细胞后,无明显毒性作用。但是加味五子衍宗方可以显著的抑制 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的神经毒性,细胞存活率由损伤组的 $70\% \pm 4.9\%$ 提高到治疗组的 $98\% \pm 6.5\%$ ($P < 0.01$);且凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 PARP 的表达也受到了显著性的抑制,分别从损伤组的 $378.15\% \pm 34.65\%$ 和 $985.12\% \pm 45.32\%$ 降低到治疗组的 $127.65\% \pm 12.65\%$ 和 $543.61\% \pm 39.07\%$ ($P < 0.01$)。此外,PC12 细胞中 tau 蛋白的高度磷酸化也出现了显著下调,Ser396 位点的磷酸化水平从损伤组的 $130.01\% \pm 5.83\%$ 降低到治疗组的 $113.75\% \pm 6.34\%$ ($P < 0.01$),Ser404 位点的磷酸化水平从损伤组的 $150.17\% \pm 10.28\%$ 降低到治疗组的 $105.37\% \pm 4.57\%$ ($P < 0.01$),其机制可能是通过抑制糖原合酶激酶(glycogen synthase kinase 3β , GSK- 3β) 在 Ser9 位点的磷酸化以及促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)的磷酸化来实现的。**结论:**加味五子衍宗方可以有效的抑制 $A\beta_{25-35}$ 所致的 PC12 细胞中 tau 蛋白的高度磷酸化,具有潜在的治疗阿尔茨海默病的作用。

[关键词] 加味五子衍宗方;阿尔茨海默病;PC12 细胞; $A\beta$ 蛋白;神经保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0159-05

Modified Wuzi Yanzong Prescription Inhibited Tau Protein Hyperphosphorylation induced by $A\beta_{25-35}$ -in PC12 Cells

ZENG Ke-wu, WANG Xue-mei*, FU Hong, LIU Geng-xin

(Research Studio of Integration of Traditional and Western Medicine, First Hospital,
Peking University, Beijing 100034, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effect of modified Wuzi Yanzong prescription (MWP) on β -amyloid protein ($A\beta_{25-35}$)-induced tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells and the potential mechanism. **Method:** Control, $A\beta_{25-35}$ model and sample treatment groups were set in our study. $A\beta_{25-35}$ ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was used to induce tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells, and MWP ($50\sim 400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was also simultaneously added. Then, the neuroprotective effects of MWP were investigated. **Result:** MWP alone did not show any cytotoxicity in PC12 cells. MWP significantly protected PC12 cells from $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity, cell

[收稿日期] 20101108(006)

[基金项目] 教育部博士点基金项目(20070001707);国家自然科学基金项目(30973813,30672760)

[第一作者] 曾克武,博士研究生,主要研究方向为中药治疗老年病,Tel:010-83573053, E-mail: zkwbjmu@163.com

[通讯作者] *王学美,博士,研究员,博士生导师,主要研究方向为中药治疗老年病,Tel:010-83573053, E-mail: wangxuemeibjmu@163.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:42

viability increased from $(70 \pm 4.9)\%$ to $(98 \pm 6.5)\%$ ($P < 0.01$), and apoptosis-related protein (Caspase-3 and PARP) expressions were also effectively inhibited, Caspase-3 and PARP were down-regulated from $(378.15 \pm 34.65)\%$ and $(985.12 \pm 45.32)\%$ to $(127.65 \pm 12.65)\%$ and $(543.61 \pm 39.07)\%$ ($P < 0.01$). In addition, tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells was significantly down-regulated, p-tau (in Ser396 site) expression decreased from $(130.01 \pm 5.83)\%$ to $(113.75 \pm 6.34)\%$ ($P < 0.01$), and p-tau (in Ser404 site) expression decreased from $(150.17 \pm 10.28)\%$ to $(105.37 \pm 4.57)\%$ ($P < 0.01$). The inhibitory effects of MWP on the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3β (GSK- 3β) at Ser9 site and mitogen-activated protein kinases (MAPK) may explain the potential mechanism. **Conclusion:** MWP could inhibit $A\beta_{25-35}$ -induced tau protein hyperphosphorylation on PC12 cells, showing a neuroprotective effect in Alzheimer's disease.

[**Key words**] Modified Wuzi Yanzong prescription (MWP); Alzheimer's disease; PC12 cell; β -amyloid protein; neuroprotection

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种最常见的神经系统退行性疾病, 患者脑中常出现神经细胞内的微管相关蛋白 tau 的异常磷酸化, 聚集成神经原纤维缠结, 最终导致老年性痴呆^[1-2]。加味五子衍宗方是由 6 味中药构成的复方^[3], 主要治疗老年性痴呆^[4-5]。前期研究表明, 该方可以提高老年患者的瞬时记忆力, 对轻度认知障碍患者的血清 $A\beta$ 水平有良好的改善作用^[6]。此外, 其含药脑脊液还可以抑制 $A\beta$ 蛋白对神经元的毒性作用^[7]。但是, 加味五子衍宗方保护神经细胞的调节机制目前尚不清楚, 因此本研究主要建立了 tau 蛋白高度磷酸化的 PC12 细胞模型, 并研究了该方对 tau 蛋白高度磷酸化的影响及相关信号调节通路。

1 材料

1.1 细胞 大鼠肾上腺嗜铬肿瘤细胞株 (rat pheochromocytoma cells, PC12, 高分化型) 由日本 RIKEN BRC 细胞库提供。

1.2 加味五子衍宗方 加味五子衍宗方中的各单味药 (枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿) 均购自同仁堂制药有限公司, 并经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定。

1.3 试剂 β -淀粉样蛋白片段 25-35 (β -amyloid protein 25-35, $A\beta_{25-35}$, 批号 A4559) 购自美国 Sigma 公司。Tau 蛋白的磷酸化抗体 p-tau (Ser396, 批号 Sc-101815), p-tau (Ser404, 批号 Sc-12952) 以及总 tau 蛋白抗体 (批号 Sc-1996) 购自美国 Santa cruz 公司; 其他蛋白抗体: p-GSK- 3β (Ser9, 批号 9322), GSK- 3β (批号 9315), p-JNK (批号 4668), p-p38 (批号 4631), JNK (批号 9258), p38 (批号 9212), PARP (批号 9545), pro-PARP (批号 9542), caspase-3 (批号

9664) 以及 GAPDH (批号 2118) 抗体均购自美国 Cell Signal Technology 公司。高糖 DMEM 培养基 (批号 12100046)、胎牛血清 (批号 16000-044) 购自美国 Gibco 公司。细胞活力分析试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 购自日本 Kumamoto 公司。

1.4 仪器 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司 (BIO-TEK[®] Dower 型), 凝胶成像系统购自日本富士公司 (FUJIFILM LAS-4000 型), 垂直凝胶电泳设备 (BIO-RAD Criterion Cell 165-6001 型) 以及半干转膜设备 (Semi-Dry Transfer Cell 170-3940 型) 均购自美国伯乐 (BIO-RAD) 公司。

2 方法

2.1 加味五子衍宗方提取物的制备 枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿按照 8:8:4:1:2:8 的质量比进行混合, 然后加入 8 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h, 再加入 6 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h, 合并两次提取液。将合并后的提取液在 50 °C 条件下减压浓缩成干粉, 并于 4 °C 条件下避光保存。使用前将药物粉末溶解于完全培养基进行稀释, 终浓度为 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 过 0.2 μm 滤膜后进行细胞给药。

2.2 细胞培养与处理 PC12 细胞株使用高糖 DMEM 培养基, 内含 10% 胎牛血清, 100 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素进行传代培养。每隔 3 d 传代 1 次, 细胞接种后 24 h 用于实验。 $A\beta_{25-35}$ 粉末溶解于无菌蒸馏水, 制备成终浓度为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 并避光储存于 4 °C。实验时, 用含 1% 血清的 DMEM 培养基将该储备液稀释成终浓度为 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液, 并诱导细胞损伤 24 h。

2.3 CCK-8 法检测细胞存活率 PC12 细胞活力的

检测采用 CCK-8 试剂盒。将 PC12 细胞接种到 96 孔板中 (1.5×10^4 /孔), 24 h 后将含有 $A\beta_{25-35}$ ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和加味五子衍宗方 (50, 100, 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的培养基加入到细胞中, 对照组为不含药的空白培养基, 继续培养细胞 24 h, 温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 。药物处理细胞后, 吸出原来的培养基, 每孔加入 $90 \mu\text{L}$ 的新培养基和 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液的混合液, 总体积 $100 \mu\text{L}$, 避光 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A), 并以正常对照组的平均 A 作为 100%, 对其他各组数值进行统计学分析。

2.4 Western blot 蛋白免疫分析 加药处理细胞到指定的时间后, 收集各组所有细胞并用 RIPA 裂解液 (内涵 Cocktail 蛋白酶抑制剂) 裂解细胞, 获得总蛋白。然后, 采用 6% ~ 15% 的 SDS-PAGE 分离总蛋白, 并采用半干法将蛋白转至聚偏氟乙烯膜上, 然后 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 (1:250) 室温孵育 2 h, 充分洗涤, 二抗 (anti-rabbit IgG, 1:1 000) 室温孵育 1 h。充分洗涤后, 用 ECL 显色剂显色, 并在 FUJIFILM LAS-4000 成像系统上拍照分析, 结果用 Image Ready LAS-4000 软件进行条带的 A 积分分析。

2.5 统计学处理 使用 Excel 2003 处理实验数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 加味五子衍宗方抑制 $A\beta_{25-35}$ 所致的 PC12 细胞

存活率降低 不同浓度的加味五子衍宗方单独处理 PC12 细胞后, 未引起任何明显的细胞毒性 (数据未显示)。而 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞后出现了细胞活力的显著性降低, 当加味五子衍宗方与 $A\beta_{25-35}$ 共同处理 PC12 细胞后, 细胞存活率出现了剂量依赖性的升高 (表 1)。

表 1 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的 PC12 细胞毒性的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
正常对照	-	100 ± 1.2
模型	-	70 ± 4.9 ¹⁾
加味五子衍宗方	50	72 ± 3.5
	100	85 ± 3.1 ²⁾
	200	90 ± 2.0 ²⁾
	400	98 ± 6.5 ³⁾

注: 与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与 $A\beta_{25-35}$ 损伤组相比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 加味五子衍宗方抑制 $A\beta_{25-35}$ 所致的凋亡相关蛋白的激活及 tau 蛋白的高度磷酸化 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞后出现了 PARP 以及 Caspase-3 活性蛋白表达的升高 (表 2)。而 $A\beta_{25-35}$ 和加味五子衍宗方 ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 共处理的细胞中, 这 2 种活性蛋白的表达均出现了显著性的降低。此外, 加味五子衍宗方单独处理细胞对 PARP 以及 Caspase-3 活性蛋白的表达没有显著性影响。

表 2 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的 PC12 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白激活的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	蛋白相对表达率/%		
		pro-PARP	PARP	Caspase-3
正常对照	-	100.00 ± 9.10	100.00 ± 3.61	100.00 ± 8.46
$A\beta_{25-35}$ ³⁾	-	32.95 ± 4.19 ¹⁾	985.12 ± 45.32 ¹⁾	378.15 ± 34.65 ¹⁾
加味五子衍宗方	400	124.77 ± 14.30 ²⁾	543.61 ± 39.07 ²⁾	127.65 ± 12.65 ²⁾
$A\beta_{25-35}$ ³⁾ + 加味五子衍宗方	400	126.21 ± 10.86	93.54 ± 15.31	94.78 ± 30.18

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 $A\beta_{25-35}$ 损伤组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $A\beta_{25-35}$ 剂量为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 3 ~ 5 同)。

$A\beta_{25-35}$ 处理后的 PC12 细胞中出现了 tau 蛋白磷酸化 (Ser396 和 Ser404 位点) 的显著性升高 (与对照组相比), 而加味五子衍宗方共处理后的细胞中, tau 蛋白在上述 2 个位点的磷酸化均出现了明显降低。而总 tau 蛋白的表达量无显著性变化。此外, 单独加味五子衍宗方处理组对 PC12 细胞中 tau 磷酸化以及总 tau 蛋白的表达没有影响 (表 3)。

3.3 加味五子衍宗方抑制 $A\beta_{25-35}$ 所致的 GSK-3 β 和 JNK/p38 MAPK 蛋白的激活 实验结果表明, $A\beta_{25-35}$ 可以引起 GSK-3 β 蛋白在 Ser9 位点 (抑制性位点) 磷酸化水平的降低, 即引起 GSK-3 β 的激活。而加味五子衍宗方处理组的 PC12 细胞中 GSK-3 β 蛋白的磷酸化水平出现了明显升高 (表 4)。单独加味五子衍宗方对 GSK-3 β 的活性没有影响。

表 3 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的 PC12 细胞 tau 蛋白高度磷酸化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蛋白相对表达率/%		
		p-tau (Ser396)	p-tau (Ser404)	tau
正常对照	-	100.00 \pm 3.12	100.00 \pm 4.09	100.00 \pm 2.60
$A\beta_{25-35}^{3)}$	-	130.01 \pm 5.83 ¹⁾	150.17 \pm 10.28 ¹⁾	97.12 \pm 3.49
$A\beta_{25-35}^{3)}$ + 加味五子衍宗方	400	113.75 \pm 6.34 ²⁾	105.37 \pm 4.57 ²⁾	99.84 \pm 8.21
加味五子衍宗方	400	92.30 \pm 9.05	82.81 \pm 23.09	103.39 \pm 2.17

除了 GSK-3 β 蛋白之外, JNK/p38 MAPK 也是 tau 蛋白磷酸化的重要激酶。从表 5 可以看出, $A\beta_{25-35}$ 可以时间依赖性的 (0 ~ 6 h) 促进 JNK/p38 MAPK 的激活 (磷酸化蛋白表达量升高)。而同时给予了加味五子衍宗方处理后, JNK/p38 MAPK 的激活受到了明显的抑制。

4 讨论

Tau 蛋白是一种重要的微管相关蛋白, 具有维持神经元微管正常生理功能的作用。而 tau 蛋白的高度磷酸化则会引起微管降解, 营养成分无法得到

表 4 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的 PC12 细胞中 GSK-3 β 蛋白激活的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蛋白相对表达率/%	
		p-GSK-3 β (Ser 9)	GSK-3 β
正常对照	-	100.00 \pm 16.49	100.00 \pm 9.41
$A\beta_{25-35}^{3)}$	-	71.32 \pm 4.13 ¹⁾	110.14 \pm 12.76
$A\beta_{25-35}^{3)}$ + 加味五子衍宗方	400	103.61 \pm 17.90 ²⁾	101.52 \pm 6.09
加味五子衍宗方	400	119.93 \pm 6.33	112.71 \pm 16.43

表 5 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中 JNK/p38 MAPK 蛋白磷酸化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	处理时间/h	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蛋白相对表达率/%	
			p-JNK/JNK	p-p38/p38
正常对照	0	-	100.00 \pm 5.31	100.00 \pm 3.08
$A\beta_{25-35}^{3)}$	0.5	-	114.18 \pm 7.90	140.16 \pm 19.08 ¹⁾
	1	-	120.31 \pm 12.62	144.35 \pm 18.21 ¹⁾
	3	-	160.96 \pm 6.43 ¹⁾	198.31 \pm 20.58 ¹⁾
	6	-	192.55 \pm 9.02 ¹⁾	341.53 \pm 37.45 ¹⁾
	$A\beta_{25-35}^{3)}$ + 加味五子衍宗方	0.5	400	104.33 \pm 5.44
1		400	118.82 \pm 13.87	133.54 \pm 12.80
3		400	130.12 \pm 12.09 ²⁾	88.83 \pm 19.34 ²⁾
6		400	133.33 \pm 6.51 ²⁾	87.35 \pm 8.12 ²⁾

正常的输送, 进而诱导神经元损伤, 诱发痴呆^[8-9]。 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 是引起 tau 蛋白高度磷酸化的重要因素, 同时也是诱发阿尔茨海默病 (AD) 的重要病因。因此, 抑制由 $A\beta$ 所引起的 tau 蛋白高度磷酸化一直是 AD 治疗的一个热点^[10-11]。目前, 处于临床使用阶段的具有抑制 tau 蛋白高度磷酸化的药物尚不多见, 而西药通常还会引发一定的副作用。因此, 如何更好的利用祖国医学宝库中的中药, 特别是中药复方制剂, 已经成为目前 AD 治疗中的一个重要研究领域。

本实验主要是采用淀粉样蛋白 $A\beta_{25-35}$ 诱导大鼠

肾上腺嗜铬瘤细胞株 PC12 损伤模型, 并在此基础上研究了中药复方制剂——加味五子衍宗方对 PC12 损伤的保护作用。结果发现, 加味五子衍宗方可以有效的抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞毒性和细胞凋亡相关蛋白 (PARP, Caspase-3) 的激活。此外, 加味五子衍宗方还可以显著性的抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白高度磷酸化, 这可能是通过抑制细胞内与 tau 蛋白磷酸化相关的上游激酶 GSK-3 β 的激活而实现的, 同时加味五子衍宗方也可以抑制 tau 蛋白磷酸化的另外 2 种激酶, 即 JNK 和 p38 MAPK 的激活。由此可知, 加味五子衍宗方对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的 tau 蛋白高度磷

酸化的抑制作用是通过多条上游调节通路来实现的,而这正与中药复方制剂多成分、多靶点的特性相符合。值得一提的是,以往曾有报道指出加味五子衍宗方可以改善轻度认知障碍患者的记忆商以及 $A\beta$ 所致的 AD 模型大鼠的空间学习记忆能力^[12-13],从本实验结果可以看出,其分子机制可能是由于加味五子衍宗方对 tau 蛋白磷酸化的抑制作用,从而减轻了脑内神经原纤维的缠结,进而降低了神经元的功能损伤,发挥其促智作用的。另外,除了 GSK-3 β 和 JNK/p38 MAPK 之外,细胞周期依赖性蛋白激酶 5 (CDK5) 也在诱导 tau 高度磷酸化的过程中发挥着重要的作用^[14],而这一通路是否也参与了加味五子衍宗方的神经保护机制有待于今后进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies[J]. *Biochim Biophys*, 2005, 1739(2/3): 198.
- [2] Wang J Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(1): 59.
- [3] 褚松龄,王学美,富宏,等. 加味五子衍宗方及有效组分对记忆障碍小鼠中枢胆碱能系统的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(2): 18.
- [4] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及海马体积的磁共振研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(12):1066.
- [5] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的随访研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(2): 67.
- [6] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及血清 β 淀粉样蛋白的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(8): 715.
- [7] 曾克武,王学美,富宏,等. 加味五子衍宗方含药脑脊液对 β 淀粉样蛋白诱导海马神经元损伤的保护作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(8): 851.
- [8] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y C, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology[J]. *PNAS*, 1986, 83(13): 4913.
- [9] Goederta M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease[J]. *Trends Neurosci*, 1993, 16(11): 460.
- [10] Köpke E, Tung Y C, Shaikh S, et al. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease[J]. *JBC*, 1993, 268(32): 24374.
- [11] Gambelin T C, Chen F, Zambrano A, et al. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease[J]. *PNAS*, 2003, 100(17): 10032.
- [12] 富宏,王学美,刘庚信. 加味五子衍宗方有效部位对 β -淀粉样肽致大鼠行为学改变的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(6): 44.
- [13] 王学美,富宏,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*. 2008, 15(3): 159.
- [14] Alvarez A, Toro R, Cáceres A, et al. Maccioni inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death[J]. *FEBS*, 1999, 459(3): 421.

[责任编辑 聂淑琴]