

五脏温阳化痰汤抑制周期蛋白依赖激酶-5 过表达对 SAMP8 小鼠脑神经纤维缠结的影响

农微, 卫智权, 莫雪妮, 吴林, 唐农*

(广西中医药大学 广西中医基础研究重点实验室, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探讨五脏温阳化痰汤改善 SAMP8 小鼠认知能力的周期蛋白依赖性激酶-5(CDK-5)相关脑神经纤维缠结机制。**方法:**10 只 SAMR1 小鼠为正常组,40 只 SAMP8 小鼠随机分为模型组,多奈哌齐组($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),五脏温阳化痰汤高、低剂量组($5, 1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续灌胃给药 4 周。Morris 水迷宫测试定位航行与空间探索能力;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测脑神经组织 CDK-5 mRNA 表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑神经组织 CDK-5 蛋白表达与 Tau 蛋白磷酸化水平;银染法检测脑神经纤维缠结。**结果:**与正常组比较,模型组脑神经组织 CDK-5 与 Tau 蛋白磷酸化表达水平均显著升高($P < 0.01$),脑神经纤维缠结明显增多,定位航行与空间探索能力显著减弱($P < 0.01$);与模型组比较,五脏温阳化痰汤高、低剂量组脑神经组织 CDK-5 与 Tau 蛋白磷酸化表达水平均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),脑神经纤维缠结减少,小鼠定位航行并空间探索能力明显改善($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**五脏温阳化痰汤可显著改善 SAMP8 小鼠认知能力,可能与其抑制 CDK-5 过表达进而抑制 Tau 蛋白过磷酸化导致脑神经纤维缠结减少有关。

[关键词] 五脏温阳化痰汤; 桂枝加附子汤; 痴呆; 周期蛋白依赖性激酶-5 (CDK-5); Tau 蛋白过磷酸化; 神经纤维缠结

[中图分类号] R289;R745.1;R944.6+1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0061-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20190839

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.1038.006.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 11:08

Effect of Wuzang Wenyang Huayu Decoction on Neurofibrillary Tangles by Inhibiting Cyclin-dependent Kinase-5 Over-expression in SAMP8 Mice

NONG Wei, WEI Zhi-quan, MO Xue-ni, WU Lin, TANG Nong*

(Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Foundation Research, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Wuzang Wenyang Huayu decoction in improving the cognitive competence and the pharmacological mechanism for neurofibrillary tangles related to cyclin-dependent kinase-5 (CDK-5). **Method:** The 10 SAMR1 mice were used as normal group, 40 SAMP8 mice were randomly divided into model group, donepezil group ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), high and low dose Wuzang Wenyang Huayu decoction groups ($5, 1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Drugs were administered by gastric lavage for 4 continuous weeks. Directional navigation and space exploration ability were evaluated with Morris amaze. Real-time PCR was used to measure the mRNA expression of CDK-5 in brain nerve tissues. Western blot was used to detect the protein expression of CDK-5 and phosphorylation of Tau protein. Meanwhile, neurofibrillary tangles in brain tissue were

[收稿日期] 20181101(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573938);广西中医基础研究重点实验室开放课题项目(16-380-58-09,K201137907,K201137909)

[第一作者] 农微,博士,讲师,从事分子药理学研究,E-mail:33234528@qq.com

[通信作者] *唐农,博士,教授,从事中医脑病学临床研究,E-mail:Tang_Nong@hotmail.com

detected with silver staining method. **Result:** As compared with normal group, both CDK-5 expression and Tau protein phosphorylation in brain nerve tissues were remarkably increased in model group ($P < 0.01$), with significantly increased neurofibrillary tangles and significantly decreased directional navigation ability and space exploration ability ($P < 0.01$). As compared with model group, CDK-5 expression and Tau protein phosphorylation were lower in Wuzang Wenyang Huayu decoction treated groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), accompanied by decreased number of neurofibrillary tangles as well as improved directional navigation and space exploration ability ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Wuzang Wenyang Huayu decoction can markedly improve the cognitive competence of SAMP8 mice, and the mechanism may be related to its inhibition on CDK-5 over-expression, and down-regulation of Tau protein phosphorylation and neurofibrillary tangles in brain tissue.

[**Key words**] Wuzang Wenyang Huayu decoction; Guizhi Jia Fuzitang; dementia; cyclin-dependent kinase-5 (CDK-5); Tau protein over-phosphorylation; neurofibrillary tangles

痴呆已经成为全球性的公共卫生问题,阿尔茨海默病(AD),血管性痴呆(VD),混合性痴呆(MD)是导致痴呆的前三位病因^[1]。无论是VD,AD或MD,Tau蛋白过度磷酸化进而导致大脑皮质神经纤维缠结,是其共同的基础病理变化^[2]。周期蛋白依赖性激酶-5(CDK-5)是调控Tau蛋白磷酸化的主要的磷酸化酶之一,有研究表明痴呆患者神经细胞CDK-5过表达,故推测抑制CDK-5的过表达,抑制Tau蛋白磷酸化,进而减轻神经纤维缠结,可改善痴呆患者的预后状况^[3]。截至目前为止,现代医学尚无治疗痴呆的特效药,仍以改善认知和对症治疗为主,虽然胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐等药物短期内能改善患者接受新事物的能力,延缓痴呆的进一步加重,但并不能从根本上改变神经细胞CDK-5过表达,Tau蛋白过度磷酸化、神经纤维缠结等痴呆的基本病理进程。

在长期的临床实践中,在中医理论的基础上衍生的方剂取得了较好的临床疗效^[4-5]。基于中医扶阳学派对于痴呆的病因病机的认识,“阴化太过,阳化不足,内生浊邪”是痴呆的主要病因病机,“元阳虚衰”“阳虚阴实”在痴呆的发生发展过程中起主导性的作用^[6]。五脏温阳化痰汤由《伤寒论》的经典名方桂枝加附子汤加减而来,为广西中医药大学唐农教授多年来用于痴呆治疗的临床经验方,由附片、干姜、巴戟天、桂枝、法半夏、石菖蒲、三七粉、淫羊藿、人参片、大黄组成,具有壮元阳、补脑髓、促气化、消痰瘀、醒神窍的功效,临床应用于痴呆的治疗,疗效显著且安全性良好^[7-9]。目前关于五脏温阳化痰汤的研究基本上均为临床观察研究,对于其药效机制的研究尚无报道,不利于该方剂的临床推广运用。本研究以广泛使用的痴呆模式动物快速衰老SAMP8小鼠为研究对象,研究其对于神经组织

CDK-5过表达,Tau蛋白过磷酸化,脑神经纤维缠结的潜在影响,探讨五脏温阳化痰汤治疗痴呆的药效机制。

1 材料

1.1 动物 8周龄SPF级健康雄性SAMR1正常老化小鼠10只,8周龄SPF级健康雄性SAMP8快速衰老小鼠40只,体质量18~22g,均购自北京大学医学部(实验动物科学部),合格证号SCXK(京)2016-0010。实验所用小鼠均于广西中医药大学中医药科学实验中心实验动物部无病原菌动物房饲养,温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 15)%。本实验涉及的动物实验已经通过广西中医药大学伦理委员会的动物实验伦理审查。

1.2 药物 五脏温阳化痰汤由附片30g,干姜15g,巴戟天15g,桂枝15g,法半夏15g,石菖蒲15g,三七粉15g,淫羊藿15g,人参片15g,大黄6g组成,饮片均由广西中医药大学第一附属医院仁爱分院提供,并经广西中医药大学药学院中药鉴定教研室廖月葵高级实验师鉴定为正品,中药饮片加蒸馏水回流提取2次,第1次加10倍蒸馏水提取2h,第2次加8倍蒸馏水提取1.5h,药液过滤、合并浓缩,终质量浓度为含生药 $2.5 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$, 4°C 保存备用,使用时以蒸馏水稀释至所需浓度;多奈哌齐片[卫材(中国)药业有限公司,批号1612082]。

1.3 试剂 RNA样本保存液,总RNA提取试剂盒,Quant cDNA第一链合成试剂盒,SuperReal PreMix(SYBR Green)预混试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为Q5324, Q5821, Q5317, M1729);组织蛋白抽提试剂盒,蛋白酶与磷酸酶抑制剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为CA21DA0003, C819DB004];改良Bielschowsky神经染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号20170921);兔

抗小鼠 CDK-5, p-Tau, Tau, β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR103646-22, GR303639-6, GR64732-31, GR324494-4); 羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(上海碧云天生物技术公司, 批号 P0180-1); PCR 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CDK-5	上游 CTGGACCCTGAGATTGTGAAG	155
	下游 TCCCCATTCTGTTTATGAGC	
β -actin	上游 CTATCGGCAATGAGCGGTTC	175
	下游 CAGCACTGTGTTGGCATAGAG	

1.4 仪器 7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司); Mini-PROTEAN 型垂直电泳仪, Mini Trans-blot 型转印仪, ChemiDoc 成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); BW-1 型 Morris 水迷宫动物行为学分析系统(上海软隆科技公司); ASP300S 型全自动组织脱水机, RM2245 型半自动轮转切片机, EG1150H 型石蜡包埋机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与标本采集 SAMR1 正常老化小鼠 10 只, 为正常组。SAMP8 快速衰老小鼠 40 只, 随机数字表法平均分为 4 组, 模型组, 多奈哌齐组, 五脏温阳化痰汤高、低剂量组, 每组 10 只。正常组与模型组小鼠给予蒸馏水灌胃, 上下午各 1 次。药物剂量设置参考章元沛编著人民卫生出版社《药理学实验(第二版)》, 人与小鼠体表面积换算给药剂量的方法^[10], 以及本研究团队既往动物实验的药物剂量^[11]。以多奈哌齐为阳性对照药物, 给药剂量为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每日 1 次灌胃给药。五脏温阳化痰汤高剂量组给药剂量为 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 低剂量组为 $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 上下午各灌胃 1 次。各组均连续灌胃给药或蒸馏水 4 周。给药最后 5 d, 各组小鼠进行 Morris 水迷宫动物行为学测试, 然后脱颈椎处死, 迅速开颅取脑置于干冰上, 分离大脑颞叶皮质。部分大脑皮质组织置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 用于提取总 RNA 与总蛋白; 部分大脑皮质组织置于 4% 多聚甲醛溶液中保存, 用于神经纤维缠结银染色病理分析。

2.2 Morris 水迷宫检测定位航行和空间探索能力 连续 5 d 进行定位航行和空间探索能力实验, 前

4 d 为定位航行实验, 记录小鼠找到水面下平台的时间(潜伏期); 第 5 天撤去平台, 进行空间探索能力实验, 记录小鼠到达平台位置的潜伏期与穿越平台的次数^[12]。

2.3 Real-time PCR 检测大脑神经组织 CDK-5 mRNA 表达水平 采用总 RNA 提取试剂盒提取大脑颞叶皮质组织总 RNA, 以 Quant cDNA 第一链合成试剂盒完成 cDNA 第一链合成。单个 PCR 反应体系内容为双蒸水 $26 \text{ } \mu\text{L}$, cDNA $2 \text{ } \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1 \text{ } \mu\text{L}$, SuperReal PreMix (SYBR Green) $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 循环 40 次, 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min, 每次扩增均进行融解曲线分析验证 PCR 产物特异性。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 CDK-5 mRNA 相对表达量。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大脑神经组织 CDK-5 蛋白及 Tau 蛋白磷酸化水平 采用总蛋白提取试剂盒提取大脑颞叶皮质组织总蛋白, 改良 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量。配制 12% SDS-PAGE 分离胶与 5% 浓缩胶, 蛋白上样量为 $20 \text{ } \mu\text{g}$ 。垂直电泳条件为浓缩胶恒压 80 V 20 min, 分离胶恒压 100 V, 垂直电泳至凝胶中下部。采用半干法转膜, 封闭, 室温一抗孵育 60 min, CDK5, p-Tau, Tau, β -actin, 稀释倍数均为 1:1 200, 二抗稀释倍数为 1:1 000, 室温孵育 60 min, ChemiDoc 成像系统测定并计算目的蛋白与内参蛋白 β -actin 条带灰度值的比值作为蛋白的相对表达量。

2.5 银染色法检测大脑神经纤维缠结 小鼠大脑颞叶皮质组织常规制作石蜡切片, 厚度为 $20 \text{ } \mu\text{m}$, 脱蜡至水, 进行银染色, 封片, 于光镜下观察。神经纤维缠结镜下表现为皮质组织内的深褐色或黑色火焰状深染区域, 呈现灶状或丛集性分布。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行多组样本间均数比较, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性数据采用单因素方差分析 LSD 检验, 方差不齐数据采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠定位航行能力的影响 与正常组比较, 模型组小鼠找到水下平台的潜伏期显著延长 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 多奈哌齐组及五脏温阳化痰汤高、低剂量组小鼠找到水下平台的潜伏期均显著缩短 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 对大鼠空间探索能力的影响 与正常组

表 2 五脏温阳化痰汤对小鼠定位航行潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Wuzang Wenyang Huayu decoction on directional navigation latency in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常	-	31.18 ± 5.96	24.42 ± 5.24	27.74 ± 5.61	18.29 ± 3.76
模型	-	51.61 ± 8.89 ¹⁾	45.37 ± 8.17 ¹⁾	40.98 ± 6.66 ¹⁾	44.41 ± 7.78 ¹⁾
多奈哌齐	0.4 ³⁾	34.83 ± 5.64 ²⁾	36.66 ± 5.97 ²⁾	33.98 ± 4.68 ²⁾	30.97 ± 4.96 ²⁾
五脏温阳化痰汤	5	36.02 ± 5.45 ²⁾	36.99 ± 5.02 ²⁾	26.88 ± 4.60 ²⁾	25.81 ± 4.80 ²⁾
	1.25	43.34 ± 6.62 ²⁾	41.94 ± 8.22 ²⁾	34.20 ± 5.66 ²⁾	32.16 ± 6.21 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾表示剂量单位为 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

SAMR1 小鼠比较,模型组 SAMP8 小鼠进入原水下平台区域的潜伏期显著延长 ($P < 0.01$),穿越原水下平台区域次数则显著减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组与五脏温阳化痰汤高、低剂量组小鼠进入原水下平台区域的潜伏期显著缩短,穿越原水下平台区域次数则明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 五脏温阳化痰汤对小鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

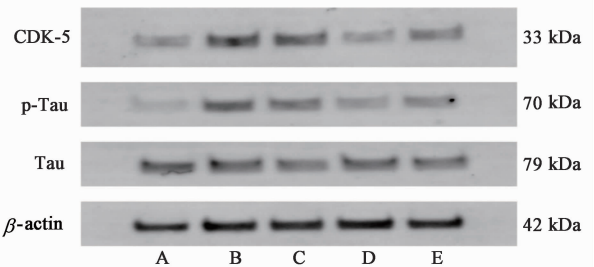
Table 3 Effect of Wuzang Wenyang Huayu decoction on space exploration ability in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	潜伏期/s	穿越平台次数/次
正常	-	24.95 ± 4.61	3.50 ± 1.08
模型	-	43.45 ± 6.27 ¹⁾	1.40 ± 1.17 ¹⁾
多奈哌齐	0.4 ⁴⁾	26.78 ± 3.74 ³⁾	2.60 ± 1.16 ²⁾
五脏温阳化痰汤	5	23.55 ± 5.93 ³⁾	3.30 ± 1.49 ³⁾
	1.25	29.25 ± 8.77 ³⁾	2.50 ± 1.08 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05, ^3) P < 0.01$; ⁴⁾表示剂量单位为 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (表 4 同)。

3.2 对小鼠大脑神经组织 CDK-5 mRNA 及蛋白, Tau 蛋白磷酸化水平的影响 与正常组小鼠比较,模型组小鼠颞叶组织的 CDK-5 mRNA 及蛋白表达水平均显著增加,伴 Tau 蛋白磷酸化水平显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,五脏温阳化痰汤高、低剂量组 CDK-5 mRNA 及蛋白表达水平, Tau 蛋白磷酸化水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1,表 4。

3.3 对小鼠大脑神经纤维缠结的影响 正常组小鼠颞叶无或极少神经纤维缠结。与正常组比较,模型组小鼠颞叶可见大量点状或火焰状棕黑色神经纤维缠结,散在分布或丛集性分布;与模型组比较,多奈哌齐组 SAMP8 小鼠神经纤维缠结情况无明显减少;五脏温阳化痰汤高剂量组 SAMP8 小鼠颞叶神经纤维缠结明显减少。见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 多奈哌齐对照组; D. 五脏温阳化痰汤高剂量组; E. 五脏温阳化痰汤低剂量组 (图 2 同)

图 1 小鼠 CDK-5, Tau 及 p-Tau 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of CDK-5, Tau, p-Tau protein in mice

表 4 五脏温阳化痰汤对小鼠 CDK-5 表达水平与 Tau 蛋白磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Wuzang Wenyang Huayu decoction on CDK-5 expression and Tau protein phosphorylation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	CDK-5 mRNA	CDK-5/ β -actin	Tau/p-Tau
正常	-	0.23 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.06
模型	-	0.48 ± 0.08 ¹⁾	0.25 ± 0.04 ¹⁾	0.48 ± 0.08 ¹⁾
多奈哌齐	0.4 ⁴⁾	0.42 ± 0.07	0.22 ± 0.04	0.47 ± 0.08
五脏温阳化痰汤	5	0.26 ± 0.06 ³⁾	0.15 ± 0.05 ³⁾	0.31 ± 0.08 ³⁾
	1.25	0.27 ± 0.05 ³⁾	0.21 ± 0.04 ²⁾	0.38 ± 0.07 ²⁾

4 讨论

大脑皮质是控制躯体协调运动与感觉的关键部位,并与学习记忆功能密切相关。皮质神经纤维缠结等神经退行性病变与 Tau 蛋白的过度磷酸化密切相关,是痴呆患者协调运动与学习记忆功能进行性丧失的重要病理基础。现代医学目前尚无针对 Tau 蛋白过度磷酸化导致的神经退行性病变的标准疗法^[13-14]。中医药治疗痴呆有其独到之处,在延缓疾病进展、改善症状方面显示了较好的效果^[15-19]。

痴呆属于中医“健忘”“呆病”范畴,神经纤维缠结属“痰浊”“瘀血”范畴。痴呆病位在脑,根于

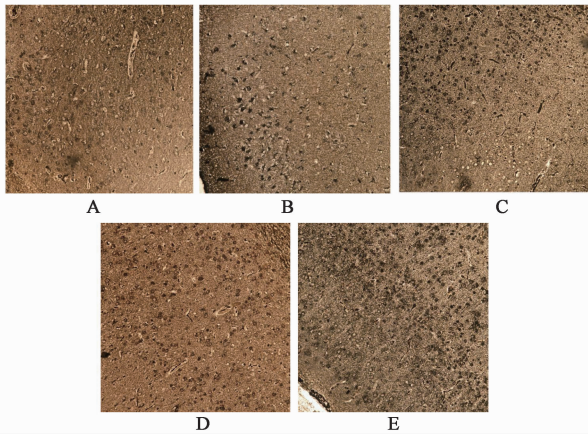


图 2 五脏温阳化痰汤对小鼠神经纤维缠结的影响(银染色, ×200)
Fig. 2 Effect of Wuzang Wenyang Huayu decoction on neurofibrillary tangles in mice (silver staining, ×200)

五脏,病性属本虚标实,本虚为五脏亏损、气血不足,标实为痰浊、血瘀。痴呆发病与“阳化气,阴成形”失常关系密切^[20-21]。根据中医“阳化气,阴成形”与“五脏藏神”理论,痴呆的主要病机本质多为“阴化太过,阳化不足,内生浊邪”。在病理状态下,“阳化气”不足从而导致“阴成形”太过,阳化不足则痰瘀沉着血脉,阴化太过则精微膏脂化生太过而成痰浊、瘀血,共同构成内生各种阴微浊邪的环境,终致神机失养,五脏虚衰,神机失用,机体功能低下,思维认知能力下降。“气化不足”则气血津液不能正常输布、排泄并转化为气,必然会导致“阴成形”太过,出现精微膏脂化生太过而成痰浊、瘀血等病理产物如神经纤维缠结等,气血运行阻滞则神机失养,发为痴呆^[22]。根据上述病因病机,由《伤寒论》经典方桂枝加附子汤加减而来的五脏温阳化痰汤。原方去甘草片、芍药、大枣,并强化其温五脏之阳的功效,加巴戟天、淫羊藿并重用附子,温肾阳;桂枝温通血脉,温心阳;原方生姜改为干姜,温脾肺之阳;加法半夏化痰瘀,加三七粉化血瘀,加石菖蒲豁痰开窍;加人参片培补气、安神增智;加大黄通腑泻浊,使痰浊瘀血有出路。全方具有壮元阳、补脑髓、促气化、消痰瘀、醒神窍之功效,经长期临床实践证明,其对于痴呆具有显著改善学习记忆功能的疗效^[7-9,11]。由此推测,五脏温阳化痰汤对于 Tau 蛋白过磷酸化具有某种程度的负调控作用的可能性是存在的。

Tau 蛋白是神经细胞的骨架蛋白,过度磷酸化的 Tau 蛋白与微管蛋白的结合力仅约为正常 Tau 蛋白的 1/10,其促进微管装配形成的生物学功能被严重削弱,并且丧失维持神经细胞微管结构稳定的作用。Tau 蛋白的过度磷酸化导致神经纤维微管功能

异常而出现神经纤维缠结,与淀粉样蛋白斑块同为痴呆的标志性病理改变。病理学研究显示,受累神经元微管结构广泛破坏,神经轴突转运功能障碍,导致细胞突触丢失以及神经元功能损伤,从而发生神经退行性病变^[23]。Tau 蛋白磷酸化由 CDK-5 等磷酸化酶催化,若磷酸化酶过表达则可致 Tau 蛋白过磷酸化,进而出现神经纤维缠结。本实验研究结果显示,与正常衰老模式动物 SAMR1 小鼠比较,快速衰老模式动物 SAMP8 小鼠神经细胞的 CDK-5 存在过表达现象,与此前文献报道的结果是一致的。与此相伴随的是 SAMP8 小鼠大脑皮质的 Tau 蛋白磷酸化水平明显增高,皮质组织切片银染色可见异常增多的神经纤维缠结。以上实验结果提示,CDK-5 等催化 Tau 蛋白磷酸化的磷酸化酶在增龄相关的 VD,AD 或 MD 的病理进程中可能发挥了重要作用,也许能够成为 VD,AD 或 MD 治疗药物的潜在靶点^[14]。

本实验研究中,五脏温阳化痰汤对于神经细胞 CDK-5 过表达具有较为明显的抑制作用,并且 Tau 蛋白在 S396 位点的磷酸化蛋白水平亦随之显著下降,病理检测可见神经纤维缠结现象的减少;Morris 水迷宫动物行为学分析也显示其在改善学习记忆功能方面的良好效果,且显示了某种程度的药物剂量正相关关系。五脏温阳化痰汤对于上述检测指标的良性影响表明,五脏温阳化痰汤具有改善快速老化模式动物 SAMP8 小鼠学习记忆功能的药理作用,此作用可能与其抑制 CDK-5 在神经细胞的过表达,减轻 Tau 蛋白过磷酸化,进而减少皮质神经纤维缠结有关。然而,五脏温阳化痰汤虽然使得 SAMP8 小鼠神经细胞 CDK-5 表达水平降至与 SAMR1 小鼠接近的水平,但是 Tau 蛋白磷酸化水平仍然高于 SAMR1 小鼠,且两组间差异仍具有统计学意义,提示药物治疗并不能够完全消除促使 Tau 蛋白过磷酸化的病理生理因素。有研究证据显示,催化 Tau 蛋白磷酸化的磷酸化酶并不仅限于 CDK-5,多种磷酸化酶均参与了 Tau 蛋白的磷酸化,五脏温阳化痰汤是否同样影响这些酶的活性需要更多的实验证据支持^[24]。

中医药对于 VD,AD 或 MD 的疗效是客观存在的,但受限于动物实验的个体差异、模式动物与人类痴呆疾病机制差异等因素,中医药治疗 VD,AD 或 MD 的药理机制研究应在细胞药理学水平有所作为,新近出现的血清药理学、肠吸收液药理学等实验研究手段有助于实现在细胞、分子水平发现并验证中医药的药理机制。

[参考文献]

- [1] Anor C J, O'Connor S, Saund A, et al. Neuropsychiatric symptoms in alzheimer disease, vascular dementia, and mixed dementia[J]. *Neurodegener Dis*, 2017, 17(4/5): 127-134.
- [2] XIA C J, Dickerson B C. Tau PET; the next frontier in molecular imaging of dementia[J]. *Int Psychogeriatr*, 2016, 28(9): 1403-1406.
- [3] SHEN X Y, LUO T, LI S, et al. Quercetin inhibits okadaic acid-induced tau protein hyperphosphorylation through the Ca²⁺ calpain p25 CDK5 pathway in HT22 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 1138-1146.
- [4] 许小泰, 谢炜. 中医补肾法联合西药治疗老年性痴呆的 Meta 分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(3): 205-208.
- [5] 王若丹, 李国春. 健脑灵片联合复方银杏通脉口服液治疗血管性认知障碍 45 例[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(19): 181-184.
- [6] 王晋平, 唐农, 刘布谷, 等. 基于《内经》重阳思想的痴呆病因病机及治疗思路探讨[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(1): 150-151.
- [7] 翟阳, 唐农, 黎军宏, 等. 五脏温阳化痰胶囊治疗血管性痴呆的随机对照临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(6): 1212-1214.
- [8] 唐农, 古联, 严雁. 五脏温阳化痰汤治疗动脉硬化性血管性痴呆 87 例临床疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(6): 1421-1422.
- [9] 陈炜, 吴林, 胡跃强, 等. 五脏温阳化痰汤治疗肾虚血瘀型老年性痴呆 30 例临床研究[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(9): 4-6, 15.
- [10] 章元沛. 药理学实验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 238.
- [11] 孔小广. 五脏温阳化痰汤治疗动脉硬化性血管性痴呆的临床疗效观察[J]. *实用医技杂志*, 2018, 25(6): 659-660.
- [12] 张海燕, 唐农, 葛金文, 等. 五脏温阳化痰汤对动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠海马组织 Nrf2 蛋白通路的影响[J]. *云南中医学院学报*, 2013, 36(3): 8-11, 20.
- [13] ZHANG J H, YU L J, YANG H, et al. Huatuo Zaizao pill ameliorates cognitive impairment of APP/PS1 transgenic mice by improving synaptic plasticity and reducing A β deposition[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 167.
- [14] Das S, Basu S. Multi-targeting strategies for alzheimer's disease therapeutics; pros and cons[J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(27): 3017-3061.
- [15] 孙岩, 马晨铭, 刘锐, 等. 中西医治疗老年性痴呆研究述评[J]. *中医学报*, 2016, 31(5): 730-733.
- [16] 黄丽萍, 熊玉洁, 赵梦岚, 等. 覆盆子有效部位改善肾阳虚型痴呆大鼠学习记忆作用机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(19): 192-196.
- [17] 王飞, 王民集. 补肾活血汤加减结合五神针治疗肝肾不足型血管性痴呆症临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12): 168-172.
- [18] 刘根, 贺文彬, 赵子强, 等. 基于中医传承辅助平台对老年性痴呆防治方剂核心药物组合的筛选研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(7): 223-228.
- [19] 易亚乔, 方锐, 葛金文, 等. 基于数据挖掘的历代医家痴呆相关病症用药规律分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(16): 3376-3381.
- [20] 宗鑫, 季旭明, 魏凤琴, 等. 基于中医传承辅助系统的治疗老年痴呆组方规律分析[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(4): 640-643.
- [21] 胡跃强, 唐农, 吴林, 等. 中医综合疗法联合西药治疗血管性痴呆 103 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2014, 55(23): 2003-2006.
- [22] 杜娟, 滕晶, 王高峰. 中医学对老年性痴呆的病机理论探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(1): 54-56.
- [23] MA R H, ZHANG Y, HONG X Y, et al. Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(3): 307-312.
- [24] Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, et al. Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(6): 218-229.

[责任编辑 孙丛丛]