

黑逍遥散通过调控 PP2A/GSK-3 β 通路对阿尔茨海默病大鼠的改善作用

王虎平, 米彩云, 周君, 李明成

(甘肃中医药大学, 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨黑逍遥散通过调控 PP2A/GSK-3 β 信号通路对阿尔茨海默病大鼠的改善作用。**方法** 采用大鼠双侧海马注射 1 μ L A β_{1-42} 溶液复制阿尔茨海默病模型, 大鼠随机分为空白组, 假手术组, 模型组, 黑逍遥散高、中、低剂量组, 盐酸多奈哌齐组, 连续灌胃给药 49 d。Morris 水迷宫试验检测大鼠学习记忆能力, 高尔基染色观察 CA1 区中树突棘数量和形态结构变化, ELISA 法检测大鼠血清及海马中 Tau、PP2A、GSK-3 β 水平。**结果** 与模型组比较, 各给药组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 游泳总路程减少 ($P < 0.01$), 目标象限停留百分比提高 ($P < 0.01$), CA1 区神经元及树突分支数量、树突棘密度增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清及海马 Tau、GSK-3 β 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PP2A 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 黑逍遥散可改善 A β_{1-42} 所致阿尔茨海默病模型大鼠认知能力, 其机制可能与抑制 GSK-3 β 活性, 激活 PP2A 活性, 进而减少 Tau 蛋白表达有关。

关键词: 黑逍遥散; 阿尔茨海默病; Tau; PP2A; GSK-3 β

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)10-3311-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.046

阿尔茨海默病是神经系统常见的一种退行性疾病, 临床表现为渐进性认知障碍、记忆力损害、语言障碍等神经精神症状^[1]。据《2019 年全球卫生估计报告》统计, 全世界约有 5 000 万人患有阿尔茨海默病, 给患者、家庭和社会造成沉重的经济负担和精神压力。

阿尔茨海默病的发病机制复杂, 尚未完全阐明。 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结是其 2 个重要病理特征^[2]。尽管在过去 20 年中对靶向 A β 进行了广泛的研究, 但未能证明其在治疗阿尔茨海默病方面的有效性^[3-4], 而 Tau 蛋白在多种神经退行性疾病中被证明具有广泛的作用^[5-7], 是治疗阿尔茨海默病有前途的候选靶点。因此, 本实验探讨黑逍遥散通过调控蛋白质磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) / 糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 信号通路抑制 Tau 蛋白过磷酸化, 以期为临床应用黑逍遥散防治阿尔茨海默病提供实验支撑。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 4 月龄健康雄性 Wistar 大鼠 110 只, 体质量 (250 \pm 50) g, 购自甘肃中医药大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2015-0005。大鼠饲养于甘肃中医药大学 SPF 级动物实验中心, 实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2015-0005, 饲养环境为温度 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 光照时间 7:00~19:00, 自由饮水, 正常喂养, 实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查通过 (编号 2020-034)。

1.2 药物 黑逍遥散 (熟地 15 g、柴胡 10 g、当归 10 g、白芍 10 g、白术 10 g、茯苓 10 g、生姜 10 g、炙甘草 8 g、薄荷 2 g), 饮片购自甘肃中医药大学附属医院门诊, 经甘肃中医药大学安耀荣教授鉴定为正品。依据 2015 年版《中国药典》和《医略六书·妇科指要》指导, 熟地、柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、生姜、甘草、薄荷按 7.5:5:5:5:5:5:5:4:1 的比例称取药物, 加入 10 倍量冷水浸泡 30 min, 武火煮沸, 文火慢熬 1 h, 薄荷后下煎煮 5 min, 搅拌后趁热过滤药液, 将剩余药渣再加 6 倍量水煎煮 30 min, 过滤后合并 2 次药液, 浓缩至生药量为 2.0 g/mL 的黑逍遥散水煎剂, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。盐酸多奈哌齐 (5 mg \times 7 片/板, 2 板/盒, 国药准字 H20183417), 购自甘肃中医药大学附属医院门诊, 于研钵中研为粉末, 充分溶解于蒸馏水中, 配制成 0.005 mg/mL 溶液。

1.3 试剂与仪器 A β_{1-42} (上海强耀生物科技有限公司, 批号 04010011827); 高尔基染液套装 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1069); Tau、PP2A、GSK-3 β 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司, 批号 YY56922、YY98455、YY69712)。Morris 水迷宫视频分析系统 (成都泰盟科技有限公司, 型号 MT-200); 酶标仪 (美国赛默飞公司, 型号 Multiskan Mk3); 正置光学显微镜 (日本尼康公司, 型号 Eclipse E100); 振动切片机 (德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 模型建立 参照《大鼠脑立体定位图谱》, 在大鼠左

收稿日期: 2022-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960828); 甘肃省自然科学基金项目 (20JR10RA319)

作者简介: 王虎平 (1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治老年病的临床与基础研究。Tel: (0931) 5162454, E-mail: whp@gszy.edu.cn

右海马 CA1 区各注入 1 μL Aβ₁₋₄₂ 溶液复制阿尔茨海默病大鼠模型；假手术组大鼠同位点注射等量生理盐水。

2.2 分组及给药 110 只大鼠随机选取 12 只作为空白组；12 只作为假手术组，双侧海马注射 1 μL 生理盐水；其余 86 只作为造模组，双侧海马注射 1 μL Aβ₁₋₄₂ 溶液复制模型。选取造模成功的大鼠 60 只，随机分为模型组，黑逍遥散低、中、高剂量组，盐酸多奈哌齐组。黑逍遥散低、中、高剂量组根据人和大鼠体表面积折算的等效剂量比值换算，灌胃给予 4.25、8.5、17 g/kg 药物；盐酸多奈哌齐组灌胃给予 0.5 mg/kg 药物；空白组和假手术组灌胃给予等量生理盐水，每天 1 次，连续 42 d。

2.3 Morris 水迷宫行为学实验 平台随机放置在一个象限的中央，将大鼠头朝池壁随机放入东、西、南、北 4 个起始位置之一，记录大鼠找到水下平台的时间，如果寻找时间超过 60 s，则引导大鼠到平台，使其在平台上停留 20 s。每只大鼠每天训练 4 次，2 次训练之间间隔 15~20 min，连续训练 5 d。最后 1 次定位航行训练结束后的第 2 天，将平台撤除，开始 60 s 的探索训练，即将大鼠由原先平台象限的对侧放入水中，记录大鼠进入目标象限所花的时间和穿越平台的次数，以此作为空间记忆的评价指标。

2.4 高尔基染色观察海马 CA1 区中树突棘数量和形态结构变化 将海马组织分别放入配置好的高尔基染色试剂盒固定液 (A 液) 中固定 0.5~4 h，用徕卡振动切片机将脑片切至 150 μm，各组选取海马结构清晰且质量好的第 3~7 张脑片作为观察对象，之后置于浸渍液 (B 液) 浸泡 2~3 d，转移到染色液 (C 液) 中不超过 1 min，显色液 (D 液) 显色，30 s 内明胶封片，显微镜下观察分析神经元情况，其中每 10 μm 树突棘的个数记作树突棘密度。

2.5 ELISA 法检测大鼠血清及海马中 Tau、PP2A、GSK-3β 水平 取大鼠血清及海马组织，按照相应 ELISA 试剂盒说明书进行检测，用酶标仪在 450 nm 波长测定各孔的光密度 (OD) 值，根据标准曲线计算各组大鼠血清及海马中 Tau、PP2A、GSK-3β 水平。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较若方差齐性采用最小显著性差异法 (LSD)；若不齐采用 Dunnett 法。P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 空白组大鼠正常喂养，反应灵敏，进食正常；造模 72 h 后，假手术及造模大鼠活动与摄食量明显减少，精神萎靡，毛色黯淡，共死亡 3 只；分组给药 1 周后，盐酸多奈哌齐组死亡 2 只，逍遥散高剂量组死亡 4 只，中剂量组死亡 3 只，低剂量组死亡 2 只，假手术组死亡 3 只，模型组死亡 4 只。

3.2 黑逍遥散对大鼠学习记忆能力的影响 与空白组比较，假手术组大鼠第 5 天逃避潜伏期均延长 (P<0.01)，大鼠游泳总路程、目标象限滞留时间百分比无明显变化 (P>0.05)；与假手术组比较，模型组大鼠第 5 天逃避潜伏期延长 (P<0.01)，游泳总路程增加 (P<0.01)，目标象限滞留时间百分比降低 (P<0.01)；与模型组比较，盐酸多奈哌齐组及黑逍遥散高、中剂量组大鼠第 5 天逃避潜伏期缩短 (P<0.01)，游泳总路程减少 (P<0.01)，目标象限滞留时间百分比提高 (P<0.01)，而黑逍遥散低剂量组均无明显变化 (P>0.05)，见表 1~2。

表 1 黑逍遥散对大鼠定位航行能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	第 5 天逃避潜伏期/s	游泳总路程/cm
空白组	12	6.67±0.95	95.67±30.19
假手术组	9	9.63±1.18**	119.55±27.90
模型组	9	16.85±0.98 ^{△△}	632.69±82.24 ^{△△}
盐酸多奈哌齐组	10	11.66±1.66 ^{###}	378.27±54.88 ^{###}
黑逍遥散高剂量组	12	10.87±1.07 ^{###}	406.33±54.62 ^{###}
黑逍遥散中剂量组	8	12.57±1.10 ^{###}	389.79±56.30 ^{###}
黑逍遥散低剂量组	10	16.20±1.52	537.68±51.39

注：与空白组比较，**P<0.01；与假手术组比较，^{△△}P<0.01；与模型组比较，^{###}P<0.01。

表 2 黑逍遥散对大鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	各象限滞留时间百分比/%			
		1	2 (目标象限)	3	4
空白组	12	17.03±10.41	41.57±7.74	24.51±9.36	34.38±10.04
假手术组	9	18.62±6.92	40.28±10.72	18.98±9.85	28.67±12.53
模型组	9	17.91±7.47	16.17±6.06** ^{△△}	29.01±11.02	34.86±10.10
盐酸多奈哌齐组	10	23.29±9.00	30.23±8.44 ^{###}	23.47±8.08	36.98±7.35
黑逍遥散高剂量组	12	17.24±7.85	31.97±9.46 ^{###}	28.14±10.93	36.10±11.35
黑逍遥散中剂量组	8	19.45±6.80	24.47±8.30 ^{###}	28.17±6.31	36.64±2.11
黑逍遥散低剂量组	10	20.09±6.68	19.34±5.36	27.28±7.47	26.46±9.19

注：与空白组比较，**P<0.01；与假手术组比较，^{△△}P<0.01；与模型组比较，^{###}P<0.01。

3.3 黑逍遥散对大鼠海马 CA1 区中树突棘数量和形态结构的影响 与空白组比较，假手术组大鼠海马 CA1 区神经元树突棘密度减少 (P<0.01)，树突分支数量无明显变化 (P>0.05)；与假手术组比较，模型组大鼠海马 CA1 区神经

元树突棘密度和树突分支数量减少 (P<0.01)；与模型组比较，盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散各剂量组海马 CA1 区神经元树突棘密度和树突分支数量均增加 (P<0.05，P<0.01)，见图 1~2、表 3。

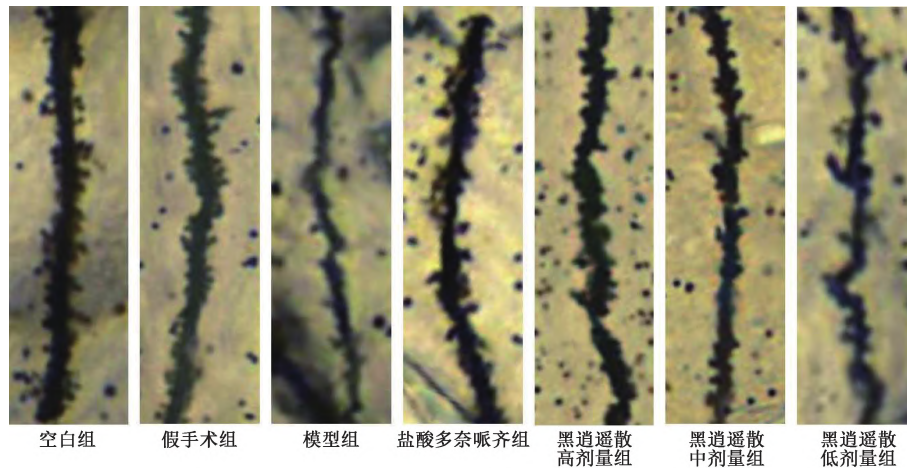


图1 各组大鼠海马CA1区树突棘密度情况(高尔基染色, ×1 000)

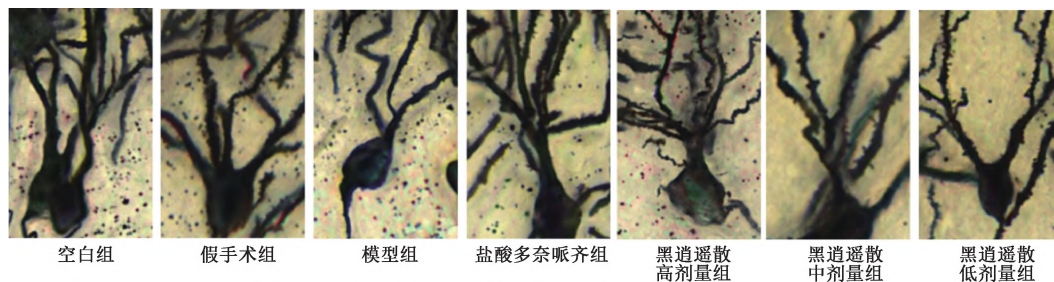


图2 各组大鼠海马CA1区树突分支情况(高尔基染色, ×600)

表3 黑逍遥散对大鼠海马CA1区树突棘密度及树突分支的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	树突棘密度/个	树突分支/个
空白组	27.00±2.64	7.67±0.58
假手术组	20.33±1.16**	6.33±1.53
模型组	10.67±1.53 $\Delta\Delta$	3.00±1.00 $\Delta\Delta$
盐酸多奈哌齐组	19.33±1.53 [#]	5.67±0.58 [#]
黑逍遥散高剂量组	19.67±2.52 [#]	6.33±1.16 [#]
黑逍遥散中剂量组	18.67±1.53 [#]	5.33±0.58 [#]
黑逍遥散低剂量组	14.67±1.53 [#]	5.01±0.52 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表4 黑逍遥散对大鼠血清及海马中Tau、PP2A、GSK-3 β 水平的影响(pg/mL, $\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	血清			海马		
	Tau	PP2A	GSK-3 β	Tau	PP2A	GSK-3 β
空白组	66.87±5.27	90.23±4.20	56.73±2.71	39.68±6.23	81.89±7.69	35.52±1.78
假手术组	70.11±5.29	88.23±4.89	59.67±3.72	52.55±5.92**	75.41±3.55	41.33±0.71
模型组	122.26±3.43 $\Delta\Delta$	69.08±4.26 $\Delta\Delta$	88.26±3.03 $\Delta\Delta$	121.09±0.27 $\Delta\Delta$	33.98±4.66 $\Delta\Delta$	53.38±2.85 $\Delta\Delta$
盐酸多奈哌齐组	81.95±5.32 [#]	87.10±6.57 [#]	71.99±1.80 [#]	64.42±3.69 [#]	67.68±12.93 [#]	47.73±3.89 [#]
黑逍遥散高剂量组	83.00±2.59 [#]	82.89±2.55 [#]	78.26±2.56 [#]	70.88±2.48 [#]	53.99±4.75 [#]	46.28±3.49 [#]
黑逍遥散中剂量组	86.11±7.60 [#]	82.89±2.55 [#]	79.25±4.39 [#]	72.13±4.07 [#]	43.84±5.59 [#]	49.65±2.57 [#]
黑逍遥散低剂量组	88.58±4.78 [#]	79.27±2.14 [#]	82.20±2.93 [#]	77.97±1.93 [#]	39.42±3.25	50.70±2.29

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

4 讨论

阿尔茨海默病属中医“呆病”“痴呆”等范畴,认为其病位在脑,与肾虚密切相关,总属本虚标实,本虚者人老体弱,五脏虚衰,精血不足,脑窍失养;标实者气滞血瘀,痰湿阻滞,蒙闭清窍,故治疗该病基本以补肾为主,

3.4 黑逍遥散对大鼠血清及海马Tau、PP2A、GSK-3 β 水平的影响 与空白组比较,假手术组大鼠海马中Tau水平升高($P<0.01$),血清及海马中PP2A、GSK-3 β 水平未见明显变化($P>0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠血清及海马中Tau、GSK-3 β 水平升高($P<0.01$),PP2A水平降低($P<0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及黑逍遥散高、中剂量组大鼠血清及海马中Tau、GSK-3 β 水平降低($P<0.01$),PP2A水平升高($P<0.05, P<0.01$),黑逍遥散低剂量组血清中Tau、GSK-3 β 水平降低($P<0.01$),PP2A水平升高($P<0.01$),海马中Tau水平降低($P<0.01$),见表4。

课题组在此基础上进一步提出了从“肝脾肾三脏并调”防治阿尔茨海默病的思路。黑逍遥散出自《医略六书·女科指要》,由逍遥散加熟地而成,全方补肾填精,健脾促运,疏肝养血,精血并补,气血同调,补泻兼施,可针对肝、脾、肾三脏防治痴呆,其疗效在课题组前期研究中已被证实^[8-10]。

细胞内的神经纤维缠结是阿尔茨海默病的重要病理特征, 主要是由过度磷酸化的微管相关蛋白 Tau 聚集成双螺旋细丝结构^[11], 具体分子机制还不清楚, 目前认为由于蛋白磷酸酶与蛋白激酶的调节失衡直接导致了 Tau 的过度磷酸化^[12]。因此, PP2A 和 GSK-3 β 作为重要的磷酸酶和激酶, 两者活性的平衡是描述 Tau 去磷酸化/磷酸化状态的关键因素^[13-14]。研究表明, 在阿尔茨海默病患者脑内, 与 Tau 蛋白脱磷酸化相关的所有丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶中, PP2A 的活性比例约占 70%, 且 PP2A 活性显著降低^[15-16]; GSK-3 β 在患者脑组织中多处都有大量的集聚, 包括老年斑、神经原纤维缠结的神经元、星形胶质细胞、神经毡细丝、螺旋体等^[17-18], 能够直接磷酸化 Tau 蛋白的丝氨酸/苏氨酸位点, 加速神经原纤维缠结的形成^[19]。有研究报道, 激活小鼠脑内或者体外培养的细胞内 GSK-3 β , 可显著诱导 Tau 蛋白多个位点的过度磷酸化^[20]。这些研究表明, 细胞内的神经纤维缠结与 PP2A 活性降低和 GSK-3 β 的高水平存在密切相关^[21-22]。因此, PP2A 和 GSK-3 β 可能参与促进 Tau 在阿尔茨海默病患者大脑中的聚集。

本研究发现, 黑逍遥散干预后, 阿尔茨海默病模型大鼠学习能力和记忆障碍得到改善, 轴突棘数量增加, 血清及海马 PP2A 水平升高, GSK-3 β 、Tau 水平降低, 并以高剂量组最为显著, 说明黑逍遥散可能通过调节阿尔茨海默病大鼠体内 PP2A、GSK-3 β 水平, 减少 Tau 过度磷酸化, 进而改善大鼠学习记忆能力, 发挥抗阿尔茨海默病的作用。此外, 与空白组比较, 假手术组大鼠第 5 天逃避潜伏期延长, 海马 CA1 区树突棘密度减少, 海马中 Tau 水平升高, 其他指标未见明显变化, 提示手术创伤对大鼠认知能力和神经元的改变会产生一定影响, 但还需要确切证据来证明。

参考文献:

- [1] Ozben T, Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease [J]. *Clin Biochem*, 2019, 72: 87-98.
- [2] Lei P, Scott A, Bush A I. The essential elements of Alzheimer's disease [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100105.
- [3] Li K, Wei Q, Liu F F, et al. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A β , Tau, and epigenetic alterations [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(4): 3021-3032.
- [4] Drummond E, Pires G, MacMurray C, et al. Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain [J]. *Brain*, 2020, 143(9): 2803-2817.
- [5] Susanne W, Jacek B, Eckhard M. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 69: 131-138.
- [6] Mandelkow E M, Biernat J, Drewes G, et al. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(3): 355-362.
- [7] Zempel H, Dennissen F J A, Kumar Y, et al. Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau is isoform-specific and determined by axon initial segment architecture [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(29): 12192-12207.
- [8] 马春林, 吴红彦, 兰美华, 等. 黑逍遥散干预 APP/PSI 双转基因小鼠海马区 A β 降解相关基因和蛋白表达效应的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 115-118.
- [9] 吴红彦, 马春林, 崔淑梅, 等. 黑逍遥散对 AD 模型小鼠海马区 A β ₁₋₄₂, GSK-3 β , NEP, IDE 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 36-42.
- [10] 马春林, 吴红彦, 兰美华, 等. 黑逍遥散对阿尔茨海默病模型小鼠 Ca²⁺-CaM/CaMK II α 信号通路关键因子表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(10): 50-54.
- [11] Kaur S, DasGupta G, Singh S. Altered neurochemistry in Alzheimer's disease: Targeting neurotransmitter receptor mechanisms and therapeutic strategy [J]. *Neurophysiology*, 2019, 51(Suppl. 2): 293-309.
- [12] Alonso A D, Cohen L S, Corbo C, et al. Hyperphosphorylation of Tau associates with changes in its function beyond microtubule stability [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 338.
- [13] Takaichi Y, Chambers J K, Ano Y, et al. Deposition of phosphorylated α -synuclein and activation of GSK-3 β and PP2A in the PS19 mouse model of tauopathy [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2021, 80(8): 731-740.
- [14] Mohammadzadeh L, Abnous K, Razavi B M, et al. Crocin-protected malathion-induced spatial memory deficits by inhibiting Tau protein hyperphosphorylation and antiapoptotic effects [J]. *Nutr Neurosci*, 2019, 23(3): 221-236.
- [15] Saha P, Sen N. Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging [J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 178: 72-79.
- [16] Xu G B, Guan P P, Wang P. Prostaglandin A1 decreases the phosphorylation of Tau by activating protein phosphatase 2A via a michael addition mechanism at cysteine 377 [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(3): 1114-1127.
- [17] Kaufman S K, Sanders D W, Thomas T L, et al. Tau prionstrains dictate patterns of cell pathology, progression rate, and regional vulnerability *in vivo* [J]. *Neuron*, 2016, 92(4): 796-812.
- [18] DeVos S L, Corjuc B T, Oakley D H, et al. Synaptic Tau seeding precedes Tau pathology in human Alzheimer's disease brain [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 267.
- [19] Sayas C L, Ávila J. GSK-3 and Tau: A key duet in Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(4): 721.
- [20] Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118664.
- [21] Hernandez F, Lucas J J, Avila J. GSK3 and tau: Two convergence points in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 Suppl 1: S141-S144.
- [22] Lovell M A, Xiong S L, Xie C S, et al. Induction of hyperphosphorylated Tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3 [J]. *J Alzheimers Dis*, 2004, 6(6): 659-671.