

# 二苯乙烯苷对冈田酸致NG108-15细胞Tau蛋白磷酸化的影响<sup>△</sup>

谭俊杰<sup>1\*</sup>, 吴文雪<sup>2</sup>, 廖艳花<sup>2</sup>, 苏彦兆<sup>1</sup>, 李振中<sup>2</sup>, 黄健<sup>2</sup>, 黄忠仕<sup>2#</sup> (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 右江民族医学院科技处, 广西百色 533000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2485-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.07

**摘要** 目的: 观察二苯乙烯苷(TSG)对冈田酸(OA)诱导致NG108-15细胞Tau蛋白磷酸化的影响, 探讨该化合物抗阿尔茨海默病(AD)的可能机制。方法: 以OA诱导NG108-15细胞复制AD细胞模型, 采用MTT法检测经TSG低、中、高剂量(50、100、200 μmol/L)预处理后的细胞存活率, 采用吖啶橙/溴乙锭双染色法检测细胞凋亡情况, 采用Western blotting法和逆转录-聚合酶链反应法检测细胞周期蛋白依赖性激酶5(CDK5)、糖原合成酶激酶3β(GSK3β)蛋白及其mRNA以及Tau、磷酸化Tau(p-Tau)蛋白的表达情况, 采用免疫荧光法检测CDK5、GSK3β、Tau蛋白的分布情况。结果: 正常对照组细胞形态正常, 未见或少见CDK5、GSK3β、Tau蛋白分布。模型组可见固缩或圆珠状的早期凋亡细胞, 且CDK5、GSK3β、Tau蛋白分布明显增多, 其细胞存活率显著降低, CDK5、GSK3β蛋白及其mRNA的相对表达量以及p-Tau与Tau相对表达量的比值(p-Tau/Tau)均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。经TSG预处理后, 各给药组早期凋亡细胞和CDK5、GSK3β、Tau蛋白分布均有所减少, 其细胞存活率均显著升高, 中、高剂量组细胞CDK5蛋白、p-Tau/Tau以及各剂量组细胞CDK5 mRNA、GSK3β蛋白及其mRNA的相对表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。结论: TSG对AD模型细胞具有一定的保护作用, 这种作用与其提高细胞存活率, 下调磷酸激酶CDK5、GSK3β的蛋白表达和基因转录水平, 抑制Tau蛋白的磷酸化有关。

**关键词** 二苯乙烯苷; NG108-15细胞; 阿尔茨海默病; Tau蛋白; 磷酸化; 周期蛋白依赖性激酶5; 糖原合成酶激酶3β

## Effects of Stilbene Glycoside on Okadaic Acid-induced Tau Protein Phosphorylation in NG108-15 Cells

TAN Junjie<sup>1</sup>, WU Wenxue<sup>2</sup>, LIAO Yanhua<sup>2</sup>, SU Yanzhao<sup>1</sup>, LI Zhenzhong<sup>2</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, HUANG Zhongshi<sup>2</sup> (1. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Technology Department, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To observe the effects of stilbene glycoside (TSG) on okadaic acid (OA)-induced Tau protein phosphorylation in NG108-15 cells, and to investigate the potential anti-Alzheimer's disease (AD) mechanism of this compound. **METHODS:** AD model of NG108-15 cells was induced by OA. The survival rate of NG108-15 cells was observed by MTT assay after pretreated with low-dose, medium-dose and high-dose of TSG (50, 100, 200 μmol/L). The apoptosis of NG108-15 cells was detected by AO/EB double fluorescence staining. The protein and mRNA expression of CDK5 and GSK3β, and the protein expression of Tau and p-Tau were detected by Western blotting assay and RT-PCR. The distribution of CDK5, GSK3β and Tau protein were detected by immunofluorescence. **RESULTS:** The normal morphology of NG108-15 cells was observed in normal control group, but CDK5, GSK3β and Tau protein were not found or few was found. Contracted or globular early apoptotic cells were observed in model group; the distribution of CDK5, GSK3β and Tau protein was increased, while survival rate of the cells was decreased; protein and mRNA expression of CDK5 and GSK3β as well as ratio of the relative expression of p-Tau to that of Tau (p-Tau/Tau) were all increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After pretreatment of TSG, the distribution of early apoptotic cells as well as CDK5, GSK3β and Tau protein were all decreased to some extent in administration groups, while survival rates of the cells were increased significantly. Protein expression of CDK5 and p-Tau/Tau in medium-dose group and high-dose group as well as mRNA expression of CDK5, protein and mRNA expression of GSK3β in administration group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** TSG can protect against AD model cells, the effects of which may be associated with improving survival rate of the cells, down-regulating the protein expression and gene transcription level of phosphokinase CDK5 and GSK3β, inhibiting Tau protein phosphorylation.

**KEYWORDS** Stilbene glycoside; NG108-15 cells; Alzheimer's disease; Tau protein; Phosphorylation; CDK5; GSK3β

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81860709); 广西自然科学基金资助项目(No.2016GXNSFAA380249)

\* 硕士研究生。研究方向: 抗老年痴呆药物研发。E-mail: 412544784@qq.com

# 通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 抗老年痴呆药物研发。电话: 0776-2876020。E-mail: hzs1004@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)亦称老年性痴呆, 是一种以近期记忆障碍为主要临床症状, β淀粉样蛋白沉积致老年斑、Tau蛋白过度磷酸化致神经元纤维缠结以及神经元丢失伴胶质细胞增生为特征性病理改变的一种进行性神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。其中, Tau蛋白为

一种磷酸蛋白,其磷酸化程度是体内多种磷酸化特异性蛋白激酶和脱磷酸化蛋白磷酸酶相互作用平衡的结果<sup>[2]</sup>。在正常情况下,大部分 Tau 蛋白是不会被磷酸化的,但在 AD 或其他 Tau 病变(如进行性核上性麻痹、慢性创伤性脑病<sup>[3-4]</sup>等)患者大脑中, Tau 蛋白被过度磷酸化<sup>[5]</sup>。由此可见, Tau 蛋白磷酸化异常在 AD 的发病机制中发挥了重要的作用,调节 Tau 蛋白表达及其磷酸化水平可能成为干预 AD 进展的有效手段之一。

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷是一种多羟基酚类化合物,简称二苯乙烯苷(TSG)。该化合物分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>,分子量为 406.39,是中药何首乌的主要生物活性成分<sup>[6]</sup>。有研究指出,TSG 具有保护神经、提高学习记忆力、抗衰老、防治 AD、舒张血管、保护肝脏、降血脂、抗炎、抗肿瘤等药理活性<sup>[7]</sup>。本研究通过冈田酸(OA)诱导致 NG108-15 细胞 Tau 蛋白异常磷酸化,模拟 AD 的发病机制以建立 AD 细胞模型,考察了 TSG 对 AD 发病关键物质 Tau 蛋白及其磷酸化水平的影响,以期揭示该化合物抗 AD 的作用机制,为其临床应用提供实验依据和理论支持。

## 1 材料

### 1.1 仪器

3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、Nanodrop3000 型微量核酸蛋白分析仪、Micro17R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Spectra Max Plus 384 型连续光谱扫描式酶标仪(香港分子仪器公司);7300 型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司);CKX-41 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Odyssey SA 型双色红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR 公司)。

### 1.2 药品与试剂

TSG 对照品(批号:#017M4703V,纯度:≥98%)、OA(批号:#SLBS1501V)均购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司,批号:8116486);胎牛血清(澳大利亚 AusGenex 公司,批号:FBSSA00418-2);MTT 试剂(合肥白鲨生物科技有限公司,批号:2016106);兔源 Tau 多克隆抗体(批号:00036062)、兔抗小鼠周期蛋白依赖性激酶 5(CDK5)单克隆抗体(批号:00032730)、兔抗小鼠糖原合成酶激酶 3β(GSK3β)单克隆抗体(批号:00041503)、兔抗小鼠 β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(批号:00057922)均购自美国 Proteintech Group 公司;兔抗小鼠磷酸化 Tau(p-Tau)单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号:1);山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:C70620-05);Western 一抗稀释液(批号:082118180821)、Western 二抗稀释液(批号:061418180703)均购自碧云天生物技术公司;Trizol 试剂(批号:AA7101-1)、PCR 试剂盒(含 TB II<sup>®</sup> Premix Ex Taq II、ROX Reference Dye 等试剂,批号:AI1777A)、逆转录试剂盒(批号:AI12361A)均购自宝生物工程(大连)有限公司,CDK5、GSK3β、甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(GAPDH)扩增引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计、合成;十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(上海雅酶生物科技有限公司,批号:2017042415);磷酸酶抑制剂(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:20351);抗荧光淬灭封片剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:D105FA0005];青链霉素混合液(批号:20170929)、胰蛋白酶消化液(批号:20181109)、RIPA 高效快速裂解液(批号:20171021)、苯甲基磺酰氟(PMSF)(批号:20161025)、吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)染色试剂(AO、EB 试剂体积比为 1:1,批号:20161029)、Triton X-100 试剂(批号:524A0510)、封闭用山羊血清(BSA,批号:1206C052)、4',6-联脒-2-苯基叫啉(DAPI)试剂(批号:20170927)均购自北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 细胞

大、小鼠神经瘤混合细胞 NG108-15 购自广州新晋生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养与传代

将 NG108-15 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基(以下简称“完全培养基”)于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养(培养条件下同),每天观察细胞生长状态。待细胞融合至 85% 后,用胰蛋白酶消化、吹打,以 800 r/min 离心 5 min,弃去上清液,沉淀加入完全培养基适量,反复吹打使之成为单细胞悬液,并分装至 2~3 个培养瓶中,继续培养。

### 2.2 AD 细胞模型复制

采用 OA 诱导。取对数生长期的 NG108-15 细胞适量,以适宜密度接种至培养板中,培养 24 h。吸弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4,下同)清洗 3 次后,加入以完全培养基配制的 80 nmol/L OA 溶液(浓度根据本课题组前期预试验结果确定),继续培养 24 h 以复制 AD 细胞模型。

### 2.3 细胞增殖情况检测

采用 MTT 法检测。取对数生长期的 NG108-15 细胞适量,以 6×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。将细胞随机分为正常对照组、模型组和 TSG 低、中、高剂量组(50、100、200 μmol/L,剂量设置参考本课题组前期预试验结果),每组设 5 个复孔。吸弃各孔上清液,正常对照组加入完全培养基 1 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基 1 mL,继续培养 24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制 AD 细胞模型。随后每孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液 10 μL,避光孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入二甲基亚砜 100 μL,室温振荡 10 min,使用连续光谱扫描式酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞生存率,生存率(%)=(试验组细胞平均 OD 值/正常对照组细胞平均 OD 值)×100%。上述试验重复 3 次。

## 2.4 细胞凋亡情况检测

采用AO/EB双染色法检测。取对数生长期的NG108-15细胞适量,以 $4 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,培养24 h。按“2.3”项下方法分组,每组设3个复孔。正常对照组加入完全培养基5 mL,各含药组加入含相应药物的完全培养基5 mL,继续培养24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制AD细胞模型。随后用PBS清洗2次,每孔加入AO/EB染色试剂20  $\mu$ L和PBS 1 mL,混匀,避光孵育2~5 min后,使用荧光倒置显微镜观察细胞凋亡情况,并拍照[活细胞(VE):核染色质着绿色,且结构正常;早期凋亡细胞(VA):核染色质着绿色,呈固缩或圆珠状]。

## 2.5 CDK5、GSK3 $\beta$ 、Tau、p-Tau蛋白表达情况检测

采用Western blotting法检测。取对数生长期的NG108-15细胞适量,以 $6 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,培养24 h。按“2.3”项下方法分组,每组设5个复孔。正常对照组加入完全培养基1 mL,各含药组加入含相应药物的完全培养基1 mL,继续培养24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制AD细胞模型。随后吸弃上清液,用PBS清洗2次,加入蛋白裂解液(RIPA高效快速裂解液、PMSF、磷酸酶抑制剂按体积比100:1:1配制)150  $\mu$ L,于冰上裂解30 min,收集上清液,于4  $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心15 min,取上清液,使用微量核酸蛋白分析仪测定蛋白浓度。蛋白经5 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液稀释后,于95~100  $^{\circ}$ C变性5 min。取变性蛋白适量行SDS-PAGE,电泳结束后湿法转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,用TBST溶液清洗5 min $\times$ 3次,加入相应一抗[内参( $\beta$ -actin)的稀释度为1:5 000,其余蛋白的稀释度均为1:1 000],4  $^{\circ}$ C孵育过夜;用TBST溶液清洗5 min $\times$ 3次,加入二抗(稀释度为1:10 000),37  $^{\circ}$ C摇床避光孵育2 h,用TBST溶液清洗5 min $\times$ 3次后,采用双色红外荧光扫描成像系统成像并使用ImageJ V1.48u软件进行定量分析,以相应蛋白与内参条带的灰度值比值表示该蛋白的相对表达量。上述试验重复3次。

## 2.6 CDK5、GSK3 $\beta$ mRNA表达情况检测

采用逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)检测。取对数生长期的NG108-15细胞适量,以 $6 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,培养24 h。按“2.3”项下方法分组,每组设3个复孔。正常对照组加入完全培养基1 mL,各含药组加入含相应药物的完全培养基1 mL,继续培养24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制AD细胞模型。随后采用Trizol法抽提细胞总RNA,使用微量核酸蛋白分析仪检测RNA浓度及纯度(即 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ;当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为1.8~2.1,表明RNA的纯度较高),将提取的RNA按试剂盒步骤进行去DNA和逆转录后,采用两步法以实时荧光定量PCR仪进行扩增。反应体系(共20  $\mu$ L):上/下引物(引物序列见表1)各0.8  $\mu$ L、模板cDNA 2  $\mu$ L、

2 $\times$ TB II<sup>®</sup> Premix Ex Taq II 10  $\mu$ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L、无酶水6  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C预变性30 s;95  $^{\circ}$ C变性5 s,60  $^{\circ}$ C延伸31 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的mRNA的相对表达量( $C_t$ 表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数)。上述试验重复3次。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因	序列	产物长度, bp
GAPDH	上游:5'-TGTGTCCTGCTGGATCTGA-3'	150
	下游:5'-TTGCTGTTGAAGTCGACGAG-3'	
CDK5	上游:5'-GGCAATGATGGATGACCAAG-3'	142
	下游:5'-CGACGTTCAACAGGATGTTGTAG-3'	
GSK3 $\beta$	上游:5'-TTCTCGGTACTACAGGGCACCAG-3'	107
	下游:5'-GTCCTAGCAACAATTGAGCAACA-3'	

## 2.7 CDK5、GSK3 $\beta$ 、Tau蛋白分布情况检测

采用免疫荧光法检测。取对数生长期的NG108-15细胞适量,以 $4 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中(培养板中有玻片),培养24 h。按“2.3”项下方法分组,每组设3个复孔。正常对照组加入完全培养基1 mL,各含药组加入含相应药物的完全培养基1 mL,继续培养24 h。除正常对照组外,其余各组均按“2.2”项下方法复制AD细胞模型。随后吸弃各孔上清液,用PBS清洗5 min $\times$ 3次。将细胞置于4%多聚甲醛溶液中固定20 min,用PBS清洗5 min $\times$ 3次,于0.2% Triton X-100试剂中静置5 min,用PBS清洗5 min $\times$ 3次,用5% BSA-PBS混合溶液封闭30 min,把装有玻片的培养板放于自制湿盒中,室温孵育1 h后,吸弃多余液体。在玻片上滴加相应一抗(CDK5、GSK3 $\beta$ 、Tau的稀释度分别为1:500、1:300、1:200),4  $^{\circ}$ C孵育过夜,用PBS清洗5 min $\times$ 3次,加入二抗(稀释度为1:1 000),室温避光孵育1 h,用PBS清洗5 min $\times$ 3次,加入DAPI试剂50  $\mu$ L,室温避光孵育5 min。取出玻片,晾干,加入抗荧光淬灭封片剂适量,于荧光倒置显微镜下观察目标蛋白的分布情况(目标蛋白呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光)。

## 2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TSG对AD模型细胞存活情况的影响

与正常对照组比较,模型组细胞的存活率显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,TSG各剂量组细胞的存活率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表2。

### 3.2 TSG对AD模型细胞凋亡情况的影响

正常对照组可见大量VE,呈绿色,且形态未见异常。模型组可见部分VA,呈固缩或圆珠状;经TSG预处理后,各给药组VA均有所减少,详见图1(图中,“圆圈”

表示VE,“箭头”表示VA)。

表2 TSG对AD模型细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Effects of TSG on survival rate of AD model cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	存活率, %	组别	存活率, %
正常对照组	100	TSG中剂量组	69.89 ± 5.11 <sup>#</sup>
模型组	55.84 ± 1.17 <sup>**</sup>	TSG高剂量组	67.21 ± 2.06 <sup>#</sup>
TSG低剂量组	59.19 ± 0.48 <sup>#</sup>		

注:与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

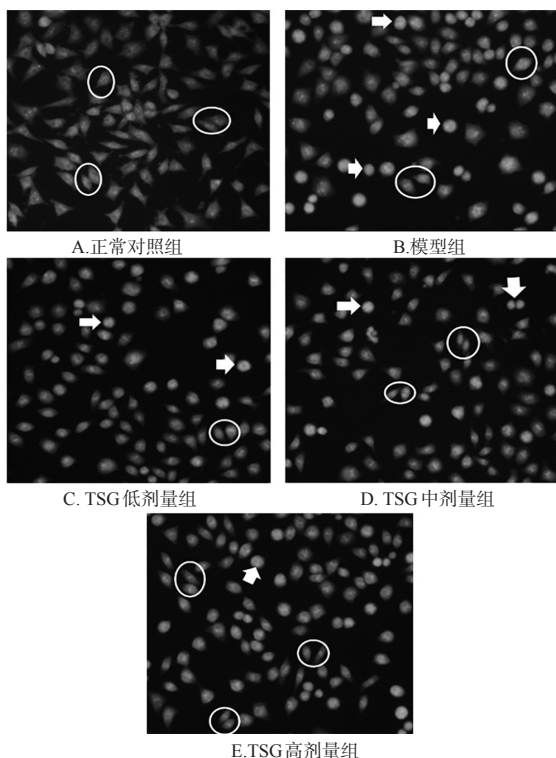


图1 TSG对AD模型细胞凋亡情况影响的显微图(AO/EB双染色, ×200)

Fig 1 Micrographs of the effects of TSG on the apoptosis of AD model cells (AO/EB double fluorescence staining, ×200)

### 3.3 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β、Tau、p-Tau蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞CDK5、GSK3β的相对表达量以及p-Tau与Tau相对表达量的比值(p-Tau/Tau)均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,TSG中、高剂量组细胞CDK5的相对表达量和p-Tau/Tau以及各剂量组细胞GSK3β的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图2、表3。

### 3.4 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β mRNA表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞CDK5、GSK3β mRNA的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义

( $P < 0.05$ );与模型组比较,TSG各剂量组细胞CDK5、GSK3β mRNA的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表4。

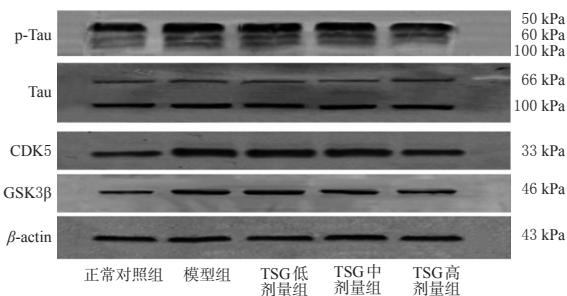


图2 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β、Tau、p-Tau蛋白表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of the effects of TSG on the protein expression of CDK5, GSK3β, Tau and p-Tau in AD model cells

表3 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β、Tau、p-Tau蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Effects of TSG on the expression of CDK5, GSK3β, Tau and p-Tau in AD model cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	CDK5	GSK3β	p-Tau/Tau
正常对照组	1.26 ± 0.01	0.71 ± 0.18	0.29 ± 0.01
模型组	2.00 ± 0.09 <sup>*</sup>	1.08 ± 0.06 <sup>*</sup>	1.20 ± 0.01 <sup>*</sup>
TSG低剂量组	1.92 ± 0.06	1.01 ± 0.03 <sup>#</sup>	1.18 ± 0.11
TSG中剂量组	1.76 ± 0.01 <sup>#</sup>	0.99 ± 0.17 <sup>#</sup>	1.00 ± 0.03 <sup>#</sup>
TSG高剂量组	1.34 ± 0.04 <sup>#</sup>	0.85 ± 0.14 <sup>#</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>#</sup>

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

表4 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Effects of TSG on mRNA expression of CDK5 and GSK3β in AD model cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	CDK5 mRNA	GSK3β mRNA
正常对照组	1	1
模型组	2.17 ± 0.26 <sup>*</sup>	2.04 ± 0.35 <sup>*</sup>
TSG低剂量组	1.49 ± 0.02 <sup>#</sup>	1.40 ± 0.05 <sup>#</sup>
TSG中剂量组	1.58 ± 0.05 <sup>#</sup>	1.32 ± 0.10 <sup>#</sup>
TSG高剂量组	1.33 ± 0.09 <sup>#</sup>	1.31 ± 0.11 <sup>#</sup>

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.5 TSG对AD模型细胞CDK5、GSK3β、Tau分布的影响

正常对照组细胞中,未见或少见CDK5、GSK3β、Tau蛋白分布。模型组细胞中,CDK5、GSK3β、Tau蛋白分布明显增多。经TSG预处理后,各给药组细胞中CDK5、GSK3β、Tau蛋白的分布均有不同程度的减少,详见图3~图5(图中,“箭头”表示目标蛋白)。

## 4 讨论

AD作为一种进行性神经退行性疾病,其主要的神经

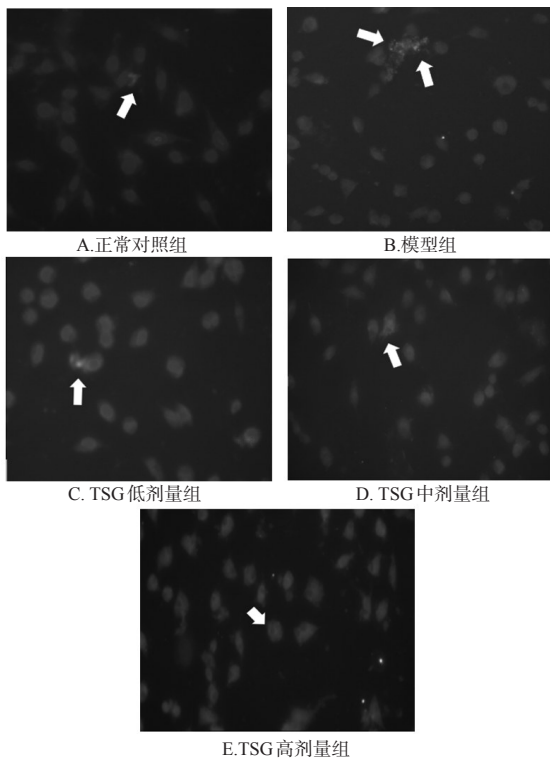


图3 TSG对AD模型细胞CDK5蛋白分布的影响(免疫荧光法, ×400)

Fig 3 Effects of TSG on the distribution of CDK5 protein in AD model cells (immunofluorescence, ×400)

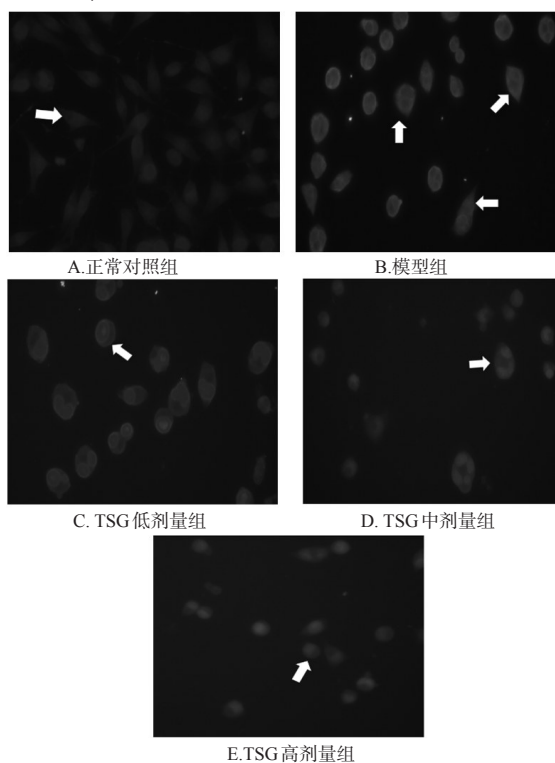


图4 TSG对AD模型细胞GSK3β蛋白分布的影响(免疫荧光法, ×400)

Fig 4 Effects of TSG on the distribution of GSK3β protein in AD model cells (immunofluorescence, ×400)

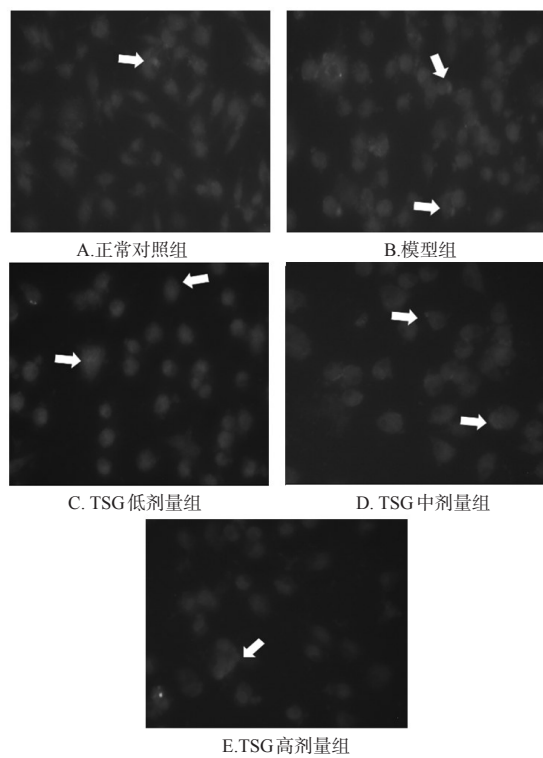


图5 TSG对AD模型细胞Tau蛋白分布的影响(免疫荧光法, ×400)

Fig 5 Effects of TSG on the distribution of Tau protein in AD model cells (immunofluorescence, ×400)

经病理性特征包括β淀粉样蛋白沉积所导致的老年斑、Tau蛋白过度磷酸化造成的神经元纤维缠结以及神经元丢失伴胶质细胞增生<sup>[1]</sup>。现有研究证实,AD的发生与β淀粉样蛋白、Tau蛋白有关,且后者的异常磷酸化可导致AD患者的认知障碍<sup>[8-9]</sup>。因此,抑制和调控Tau蛋白的磷酸化可能是预防和治疗AD的关键。

TSG是我国传统中药何首乌的主要活性成分。研究表明,该化合物具有抗氧化、抗衰老、防治AD、提高DNA修复功能等作用<sup>[6-7]</sup>。本课题组前期以淀粉样前体蛋白(APP)/早老蛋白1(PS1)双转基因AD模型小鼠为对象,发现TSG能有效改善其学习记忆功能,但具体机制尚不清楚<sup>[10]</sup>。NG108-15细胞是神经瘤细胞,具有与神经元细胞相似的生理结构和形态特点,能较好地模拟AD的病理过程<sup>[11]</sup>。因此,本研究通过OA诱导NG108-15细胞Tau蛋白异常磷酸化以建立AD模型,初步探讨TSG对Tau蛋白磷酸化水平的影响及可能机制。

Tau蛋白的异常磷酸化是AD的重要病理特征之一,可引发神经毒性反应,从而破坏神经元细胞骨架的正常生理功能<sup>[12]</sup>。在病理状态下,Tau聚集可导致神经元死亡进而造成认知障碍<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,模型组可见固缩或圆珠状的VA和聚集的Tau蛋白,其细胞存活率较正常对照组显著降低,p-Tau/Tau较正常对照组显著升高,提示OA可导致神经细胞Tau蛋白的异常磷酸

化,增加 Tau 蛋白的聚集,最终造成细胞凋亡。经 TSG 预处理后,各给药组 VA 和 Tau 蛋白均有不同程度的减少,各剂量组细胞的存活率均较模型组显著升高,中、高剂量组细胞 p-Tau/Tau 均较模型组显著降低,提示 TSG 可抑制 OA 诱导的 Tau 磷酸化,并减少 Tau 蛋白的聚集和细胞的凋亡。

CDK5 和 GSK3 $\beta$  已被确定为引发神经退行性疾病 Tau 蛋白异常磷酸化的主要蛋白激酶<sup>[14-15]</sup>。其中,CDK5 是调控 Tau 蛋白磷酸化的重要激酶,可引起 Tau 蛋白 11 个磷酸化位点的磷酸化,与神经元迁移、细胞黏附、突触活化、多巴胺传递等信号通路底物作用有关,是神经系统发育及功能维持的必需蛋白之一<sup>[16]</sup>;GSK3 $\beta$  可加重神经系统炎症反应,增加 $\beta$ 淀粉样蛋白的生成,并降低 AD 患者体内乙酰胆碱的合成,造成神经元丢失,与 Tau 蛋白磷酸化过程、细胞凋亡及患者记忆障碍密切相关<sup>[17-19]</sup>。本研究结果显示,正常对照组细胞未见或少见 CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白分布。经 OA 诱导后,模型组细胞 CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白分布明显增多,CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白及其 mRNA 的相对表达量均较正常对照组显著升高,提示细胞 Tau 磷酸化异常可能与 CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白表达增强有关。经 TSG 预处理后,各给药组细胞 CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白分布有所减少,中、高剂量组细胞 CDK5 蛋白以及各剂量组 CDK5 mRNA、GSK3 $\beta$  蛋白及其 mRNA 的相对表达量均较模型组显著降低,提示 TSG 对 Tau 磷酸化的调控作用可能是通过抑制 CDK5、GSK3 $\beta$  蛋白的表达及其 mRNA 的转录来实现的。

综上所述,TSG 可下调相关磷酸激酶的蛋白表达和基因转录水平,抑制 Tau 蛋白的磷酸化,提高细胞存活率,对 AD 模型细胞具有一定的保护作用。但 TSG 与 Tau 蛋白磷酸化相关蛋白磷酸激酶间的相互作用机制尚有待后续研究进一步完善。

## 参考文献

- [1] JONES DT, GRAFF-RADFORD J, LOWE VJ, et al. Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum[J]. *Cortex*, 2017. DOI: 10.1016/j.cortex.2017.09.018.
- [2] CÁRDENAS-AGUAYO MDEL C, GÓMEZ-VIRGILIO L, DEROSA S, et al. The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5(12): 1178-1191.
- [3] MOSZCZYNSKI AJ, STRONG W, XU K, et al. Pathologic Thr<sup>175</sup> Tau phosphorylation in CTE and CTE with ALS[J]. *Neurology*, 2018, 90(5): e380-e387.
- [4] 冯枫,张熙,王鲁宁.全脑胶质细胞 Tau 蛋白病的研究进展[J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(10): 763-765.
- [5] PASCOAL TA, MATHOTAARACHCHI S, MOHADES S, et al. Amyloid- $\beta$  and hyperphosphorylated Tau synergy drives metabolic decline in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(2): 306-311.
- [6] 任红微,魏静,高秀梅,等.何首乌及其主要化学成分药理作用及机制研究进展[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(7): 1357-1362.
- [7] 赵明宇.何首乌化学成分和药理作用[J]. *北方药学*, 2018, 15(3): 192-193.
- [8] 申潇竹,董燕,汪玲玲,等.广泛性脑萎缩者血浆 Tau 蛋白、磷酸化 Tau 蛋白水平与认知功能的关系[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2017, 43(10): 608-611.
- [9] 申潇竹,董燕,汪玲玲,等.老年低血糖患者血浆 Tau 蛋白、p-Tau 蛋白与认知功能关系的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2018, 26(7): 559-562.
- [10] 刘宁,廖艳花,赖术,等.二苯乙炔苷对淀粉样前体蛋白/早老蛋白 1 双转基因小鼠脑组织半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 和淀粉样前体蛋白表达的影响[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(15): 1854-1859.
- [11] 朱美娥. A $\beta$  片段神经毒性诱导 NG108-15 细胞创建老年性痴呆细胞模型的作用[C]//《中国医院药学杂志》学术年会论文集. 昆明: 中国医院药学杂志编辑部, 2016: 246.
- [12] POOLER AM, POLYDORO M, MAURY EA, et al. Amyloid accelerates Tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015. DOI: 10.1186/s40478-015-0199-x.
- [13] MELIS V, ZABKE C, STAMER K, et al. Different pathways of molecular pathophysiology underlie cognitive and motor tauopathy phenotypes in transgenic models for Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(11): 2199-2222.
- [14] LEE S, HALL GF, SHEA TB. Potentiation of Tau aggregation by CDK5 and GSK3 $\beta$ [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26(2): 355-364.
- [15] 于艳红,许杰,李文彬,等. Tau 蛋白磷酸化在阿尔茨海默病中所处的地位[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(8): 1573-1576.
- [16] BHOUNSULE AS, BHATT LK, PRABHAVALKAR KS, et al. Cyclin dependent kinase 5: a novel avenue for Alzheimer's disease[J]. *Brain Res Bull*, 2017. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.006.
- [17] 刘晏伊,陈超,李志鹏,等. Tau 蛋白的磷酸化对阿尔茨海默病影响的相关研究[J]. *中国老年保健医学*, 2016, 14(5): 8-11.
- [18] DUAN J, MARCELLUS KA, QIN X, et al. Cystatin C promotes Tau protein phosphorylation and causes microtubule instability by inhibiting intracellular turnover of GSK3 $\beta$  in neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2018. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.03.009.
- [19] KAMARUDIN MN, MOHD RAFLEE NA, HUSSEIN SS, et al. (R)-(+)- $\alpha$ -lipoic acid protected NG108-15 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3 $\beta$  pathway and suppression of NF- $\kappa$ B-cytokines[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014. DOI: 10.2147/DDDT.S67980.

(收稿日期:2018-12-23 修回日期:2019-06-28)

(编辑:张元媛)