

信号通路糖原合成酶激酶-3 β 在 β 淀粉样蛋白损伤脑微血管内皮细胞 Tau 蛋白表达中的作用及通心络干预研究

张志慧*, 吴相春, 葛小丽, 周龙岗, 魏聪
(河北以岭医药研究院, 石家庄 050035)

[摘要] 目的: 信号通路糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 在 β 淀粉样蛋白(A β) 损伤脑微血管内皮细胞分泌 Tau 蛋白中的作用及通心络干预作用研究。方法: 采用人脑微血管内皮细胞, 随机分为正常组、模型组、通心络 3 个剂量组, 通心络组细胞经通心络预处理 6 h 后, 除正常组, 各组加入终浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 A β_{1-42} 干预 24 h 诱导细胞损伤, 检测经处理后内皮细胞上清液中 Tau 蛋白表达及内皮细胞中 Tau 蛋白及其信号通路 GSK-3 β 的表达情况。结果: 模型组内皮细胞中 Tau 蛋白及其信号通路 GSK-3 β 的表达均增强, 通心络组 Tau 蛋白表达及其信号通路 GSK-3 β 的表达均减弱。结论: A β_{1-42} 可通过信号通路 GSK-3 β 增强 Tau 蛋白的表达, 而通心络降低 A β_{1-42} 损伤的人脑微血管内皮细胞 Tau 蛋白表达可能通过抑制信号通路 GSK-3 β 表达而实现的。

[关键词] 人脑微血管内皮细胞; β 淀粉样蛋白 $_{1-42}$; 通心络; 糖原合成酶激酶-3 β ; Tau 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)10-0116-03

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD) 为一种退行性中枢神经系统疾病, 其中 β 淀粉样蛋白(A β) 是各种原因诱发 AD 共同通路^[1]。其可促使 Tau 蛋白大量分泌, 体外研究也证实凝聚态的 A β_{1-40} , A β_{1-42} 或其活性片段 A β_{25-35} 能导致 Tau 蛋白在特定位点的磷酸化增多^[2]。过度磷酸化的 Tau 蛋白在细胞内的聚集是许多神经变性的特征, 并被共认为是老年人群中大部分痴呆疾病的病因^[3]。

通心络在临床治疗 AD 40 例, 总有效率达 98.3%^[4]。并可对抗 A β_{23-35} 的神经毒性作用^[5]。实验中, 我们用 A β_{1-42} 诱导脑微血管内皮细胞损伤, 观察信号通路 GSK-3 β 在 Tau 被诱导表达中的作用, 运用通心络作为干预研究, 以探索 AD 发病机制及其药物治疗途径和靶点。

1 材料

1.1 药物 通心络药粉, 石家庄以岭药业股份有限公司, 批号 070901。

1.2 主要试剂 A β_{1-42} (国家疾病预防控制中心病毒学研究所馈赠), 人脑微血管内皮细胞株(美国 ATCC 公司), Tau 蛋白检测 ELISA 试剂盒(美国 blue gene 公司), Tau, GSK-3 β 抗体(Santa cruz Biotechnology 公司)。

2 方法

2.1 人脑微血管内皮细胞 复苏人脑微血管内皮细胞株, 将其用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基转移至细胞培养瓶中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中继续传代培养, 待细胞生长至融合状态后用 0.5% 胰蛋白酶消化传代备用。

2.2 通心络药粉的配置 先用无血清 DMEM 配制成 50 mg \cdot mL⁻¹ 母液, 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 用前无血清 DMEM 稀释。

2.3 淀粉样蛋白的老化处理 将 A β_{1-42} 1 mg 溶解在 1 mL 的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 7 d, 使其成为凝聚状态, 然后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

2.4 A β_{1-42} 损伤人脑微血管内皮细胞的量效关系 待人脑微血管内皮细胞生长状态良好时, 取对数生长长期的人脑微血管内皮细胞以 1×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板, 实验分为①空白对照组: 用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后进行检测; ②模型组: 细胞培养后, 加入终浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β_{1-42} 作用 24 h 诱导细胞损伤; ③通心络组: 细胞培养后, 分别加入终浓度为 100, 200, 400 mg \cdot L⁻¹ 的通心络

[收稿日期] 20100106(005)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2005CB523301); 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病)

[通讯作者] * 张志慧, 主治医师, 医学博士, 主要从事神经免疫性疾病、老年性疾病的基础和临床研究, Tel: 13930112633, E-mail: zhzhui358@sohu.com

预处理 6 h,换培养液,并加入终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用 24 h 诱导细胞损伤^[6]。

2.5 $\text{A}\beta_{1-42}$ 损伤人脑微血管内皮细胞上清液中 Tau 蛋白表达 实验结束后,收集各组细胞培养液,离心取上清液,ELISA 法检测 Tau 蛋白的分泌情况,步骤按试剂盒说明书进行。

2.6 $\text{A}\beta_{1-42}$ 损伤人脑微血管内皮细胞上清液中 Tau 蛋白、GSK-3 β 表达 实验结束提取各组内皮细胞蛋白,各组取 $30 \mu\text{g}$ 样品蛋白行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V 3 h)后,转入硝酸纤维素膜。应用 5% 的脱脂奶粉(TBST 稀释, pH7.4)室温封闭硝酸纤维素膜 1 h,加入 1:500 稀释的 Tau 特异性兔抗多克隆抗体、GSK-3 β 多克隆抗体,4 °C 密封过夜。次日, TBST 振荡洗膜后,应用荧光兔源二抗孵育 1.5 h,应用 TBST 振荡洗膜后,再经 TBS 洗膜一次,上 odyssey 扫膜仪上成像分析,判断 Tau 的诱导情况。

3 结果

3.1 人脑微血管内皮细胞培养液中 Tau 表达 结果表明,与正常组比较,模型组 Tau 蛋白表达增多 ($P < 0.01$),通心络大剂量可降低 Tau 蛋白的分泌 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 通心络对 $\text{A}\beta$ 损伤内皮细胞上清液中 Tau 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	$\text{A}\beta/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	通心络/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Tau/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	-	$5.98 \pm 0.29^{2)}$
模型	20	-	8.88 ± 0.39
通心络	20	400	$6.25 \pm 0.53^{1)}$
		200	7.74 ± 1.26
		100	7.41 ± 1.95

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 $\text{A}\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞 Tau 蛋白表达的影响 结果见图 1。与正常组细胞比较,模型组 Tau 蛋白表达增强 ($P < 0.01$),通心络 3 个剂量组均可减弱人脑微血管 Tau 蛋白的表达 ($P < 0.05$),见图 1。

3.3 对 $\text{A}\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞中 GSK-3 β 蛋白表达的影响 结果见图 2。

与正常组比较,模型组 GSK-3 β 蛋白表达增强 ($P < 0.01$),通心络 3 个剂量组均可减弱 GSK-3 β 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。

4 讨论

祖国医学中没有 AD 这个病名,但综其以善忘、呆、傻、愚、笨为主要临床特征临床症状,应属于中医

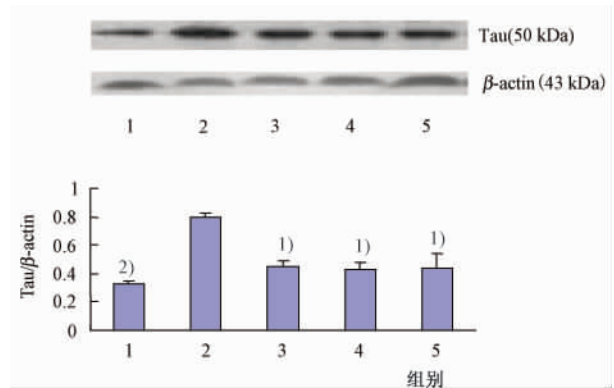


图 1 通心络对 $\text{A}\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞中 Tau 蛋白表达情况

1. 正常组;2. 模型组;3. 通心络 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
4. 通心络 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;5. 通心络 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2 同)

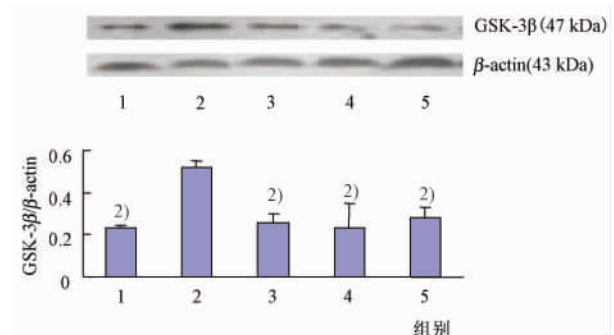


图 2 通心络对 $\text{A}\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞中 GSK-3 β 蛋白表达情况

老年“呆傻病”范畴,而中医素有“老人多瘀”、“久病必瘀”、“瘀久伤络”、“久病入络”之说,综合 AD 年老体虚,病久入络,最终应归属“络病”范畴。通心络(人参、全蝎、蜈蚣、水蛭、土鳖虫、蝉蜕、酸枣仁、降香、冰片等)是依据络病理论建立的复方制剂,具有益气活血,通络活络的功效,方中用人参补益元气,元气充足,络气畅通,气旺血行,虫类药活血、化痰、通络,酸枣仁养血安神,降香、冰片引药入络,诸药合用,达到气旺血行,脑络通畅。

该研究中用凝聚的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 片断诱导体外培养的人脑微血管内皮细胞损伤,ELISA 检测内皮细胞上清液中 Tau 蛋白分泌增多,蛋白免疫印迹中发现内皮细胞中 Tau 蛋白表达增强,而通心络 3 个剂量组 Tau 蛋白的含量和表达均呈现不同程度降低,表明通心络可以在一定意义上抑制 $\text{A}\beta$ 对于脑微血管内的人脑微血管内皮细胞中 Tau 蛋白的诱导。

以往的实验证明 $\text{A}\beta$ 可促使 Tau 蛋白大量分泌,Gotz 小组直接将凝聚态 $\text{A}\beta_{1-40}$ 注射到高表达人突变型 Tau 蛋白的转基因鼠海马,观察到 Tau 蛋白增加了 5 倍,从而证明了 $\text{A}\beta$ 和 Tau 蛋白之间的因果关

系^[7]。研究表明,Tau 蛋白异常磷酸化很可能是凋亡过程的始动因素^[8]。信号通路糖原合酶激酶-3 (GSK-3 β) 是 A β 诱导 Tau 蛋白过度磷酸化中的主要中介^[9]。D. Muiyallaert 等研究表明 GSK-3 β 在 Tau 磷酸化病变和淀粉样沉积过程中可能起重要作用^[10], 因此针对 GSK-3 β 作为老年性痴呆的治疗的靶点治疗日益备受人们关注。

在实验中我们发现,模型组信号通路分子 GSK-3 β 表达增强,而通心络 3 个剂量组 GSK-3 β 表达均降低。GSK-3 β 与 Tau 在实验同一个时间表达的方向的一致性,与其在神经元内存在的关系不矛盾,Tau 作为 GSK-3 β 调控的下游因子,其在 A β 诱导脑微血管内皮细胞中蛋白的高度表达很可能同样是通过这一信号通路实现的,而在蛋白免疫印迹中通心络组 GSK-3 β 与 Tau 都出现了表达减弱的趋势,由此,我们推测通心络可通过下调信号 GSK-3 β 进而起到抑制 A β 损伤人脑微血管内皮细胞 Tau 表达,这在一定程度上会减少过度磷酸化的 Tau 蛋白产生,从而起到防治过度磷酸化的 Tau 蛋白在神经元细胞内的聚集,而通心络对脑微血管内皮细胞内 Tau 表达及其表达途径趋势的逆转,可能是通心络治疗老年性痴呆的其中一个机制。

[参考文献]

[1] Deshpande A, Mina E, Glabe C, et al. Different conformations of amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons [J]. Neuroscience 2006 26(22): 6011.

- [2] Rapoport M, Ferreira A. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons [J]. J Neurochem 2000 74(1):125.
- [3] Castellani R J, Lee H G, Perry G Smith M A. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: role of amyloid-beta and Tau [J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2006 21(2):126.
- [4] 张原莉,刘颖芳,李秀敏.通心络治疗老年性痴呆 40 例观察 [J]. 山东医药 2002 42(31):11.
- [5] 冯凯,王晓明,孟晓梅等.通心络对体外培养 SH-SY5Y 细胞 A β_{25-35} 毒性损伤的保护作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志 2007 14(2):90.
- [6] 张志慧,吴以岭.通心络对 A β_{1-42} 损伤人脑微血管内皮细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志 2009 15(7):504.
- [7] Gotz J, Chen F, Van Dorpe J, et al. Formation of neurofibrillary tangles in P301 L tau transgenic mice induced by a beta 42 fibrils [J]. Science, 2001, 293(5534): 1491.
- [8] Bancher C, Lassmann H, Breitschopf H, et al. Mechanisms of cell death in Alzheimer disease [J]. J Neural Transm Suppl, 1997, 50:141.
- [9] Wang L L, Ying P Z, Wang X M. Clinical efficacy of Tongxinluo capsule in the treatment of vascular dementia [J]. Chin J Diffic Compl Cas 2005 4(5):260.
- [10] Hao W P, Ye F H, Li L Z. Clinical observations of Tongxinluo capsule in the treatment of vascular dementia [J]. J Clin Psychosom Dis 2006 12(6):424.

[责任编辑 聂淑琴]