

文章编号:1001-6880(2016)5-0685-05

# 大蒜素对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内 Tau 蛋白表达的影响

张 浩<sup>1\*</sup>, 潘 海<sup>1</sup>, 王 翊<sup>2</sup><sup>1</sup>沈阳医学院附属中心医院第二神经外科, 沈阳 110024; <sup>2</sup>辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847

**摘要:**本应用免疫荧光技术和 Western blot 方法检测大蒜素对 tau 转基因小鼠脑内磷酸化 tau 蛋白表达的影响, 并测定野生型小鼠、tau 转基因小鼠及大蒜素治疗组三组小鼠脑内 SOD 活力和 MDA 含量, 结果发现大蒜素处理之后的阿尔茨海默病(AD)模型小鼠 SOD 与 AD 组相比活性增加, MDA 含量减少, tau 转基因小鼠脑内所检测的 Ser202、Ser404、Ser396、Thr181 位点 tau 蛋白发生过度磷酸化改变, 大蒜素治疗组这些过度磷酸化的 tau 蛋白明显减少。以上结果提示大蒜素可以通过其强大的抗氧化作用降低 AD 小鼠脑内氧化应激效应, 从而使 AD 小鼠脑内 tau 蛋白磷酸化水平下降, 因此大蒜素在 AD 的临床治疗方面具有重要的理论意义。

**关键词:**大蒜素; tau 转基因小鼠; p-tau; 氧化应激

中图分类号:R741.02

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.008

## Effect of Allicin on the Expression of tau Protein in Transgenic Mice Brain with Alzheimer's Disease

ZHANG Hao<sup>1\*</sup>, PAN Hai<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Second Department of Neurosurgery, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; <sup>2</sup>Department of Tissue Culture, Liaoning University of Tradition Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

**Abstract:** In this study, the effect of allicin on the expression of tau protein phosphorylated in the brain of transgenic mice was investigated by immunofluorescence and Western blot method. The SOD activity and MDA content in the brain of wild type, tau transgenic mice and the treatment group mice were detected. The results showed that the activity of superoxide dismutase(SOD) in the allicin administration mice brain was increased compared to that of AD model mice, and the content of MDA was reduced; Hyperphosphorylation of tau protein were changed at ser202, ser404, ser396, Thr181 site in the transgenic mice brain, but the hyperphosphorylation of tau protein was significantly reduced in the transgenic mice treated with allicin. These results indicated that allicin decreased oxidative stress effect in AD mice brain through its powerful antioxidant activity, and hence declined the level of tau protein phosphorylation in AD mice brain. These results suggested that allicin had potential value for the clinical treatment of AD.

**Key words:** Allicin; tau transgenic mice; p-tau; oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种发生于老年期或老年前期的慢性进行性神经退行性疾病, 该疾病是以记忆力逐渐减退、认知障碍为突出表现, 同时伴有精神行为异常、人格障碍等临床症状。流行病学研究表明, 65 岁以上的老年人中 AD 患病率为 2%~5%, 以后每隔 5 年上升 1 倍, 至 85 岁以上患病率高达 47%, AD 病死率也随年龄增加而逐步增高<sup>[1]</sup>。在发达国家, AD 是继心脏病、癌症、中风后的第四位死因。在我国, 随着人口老龄化程度的加快, 日趋增高的 AD 发病率对其治疗提出

了重大挑战。目前国内外尚无根本治疗 AD 的药物, 因此, 寻求更多和治疗效果更好的药物已成为人们关注的焦点。

神经元内出现神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)是 AD 的病理学特征之一, NFTs 是神经元内 tau 蛋白的过度磷酸化所致<sup>[2]</sup>。氧化应激是指机体内氧自由基的产生和清除失去平衡, 导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内堆积而引起的应激反应。国内外研究证实, 自由基引起的氧化损伤是不同病因诱发神经退行性疾病的共同通路<sup>[3]</sup>。研究表明 AD 患者以及 AD 模型小鼠脑组织中活性氧、丙二醛等氧化应激标志物明显增多, 大量的自由基能够损伤生物大分子使蛋白质、DNA 和脂

质过氧化,致使神经细胞凋亡和缺失,导致学习和记忆障碍,进而导致或加重AD,提示氧化应激在AD发病机制中发挥重要作用。最近研究发现,大蒜素(Diallyl trisulfide,DATS)能清除自由基,减少毒物对机体造成的氧化损伤,Prasad等<sup>[4]</sup>研究发现大蒜素不仅能清除氧自由基和羟基自由基,还能降低羟自由基引起的肝组织脂质过氧化,提高了机体的抗氧化能力,从而减少细胞的凋亡。本实验给予tau转基因小鼠大蒜素处理1个月后,通过氧化应激相关物质的检测,并采用免疫荧光和Western Blot等实验方法观察各组小鼠脑内tau蛋白的磷酸化水平,以探讨大蒜素通过其强大的抗氧化应激能力对神经元的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品

大蒜素(20 mg/粒,湖北金龙福药业有限公司,批号H42022592); $\beta$ -actin,P-Tau,Tau(Tau46),Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG、HRP-labeled goat anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA));DAPI(Beyotime Institute of Biotechnology)(Haimen, China),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

#### 1.1.2 实验仪器

低温离心机,酶标仪,BIO-RAD凝胶图像分析系统,电泳仪,水平摇床,荧光共聚焦显微镜,冰冻切片机。

#### 1.1.3 实验动物与分组

3月龄tau转基因小鼠和C57BL/6野生型小鼠购于美国Jackson Lab(Stock Number 008169),体重约15~20 g,实验动物分笼饲养,每笼3~4只,自由饮食,10/14 h昼夜交替饲养,饲养室温度保持在20~25 ℃。根据SPSS统计软件产生随机数字分为模型组和给药组,每组25只;同月龄同背景C57BL/6小鼠15只,设为正常对照组;具体分组及给药方法如下:对照组:3月龄的C57BL/6小鼠15只,隔日上午10时生理盐水灌胃,连续1个月;模型组:3月龄的tau转基因小鼠20只,隔日上午10时生理盐水灌胃,连续1个月;大蒜素给药组:3月龄的tau转基因小鼠20只,按10 mg/kg进行隔日上午10时大蒜素提取物灌胃给药,连续1个月。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠脑组织取材

各组小鼠断头处死,迅速取出大脑放在冰上,从中间矢状缝切开,一半放入4%多聚甲醛中固定,常规制备冰冻切片,用于免疫荧光染色;另一半放入EP管内,-80 ℃保存备用,用于Western blot等分子生物学指标检测。

#### 1.2.2 Western blot检测

各组小鼠海马组织分别称重,小剪刀剪碎样品(冰上操作),按1:5比例加入蛋白裂解液,超声粉碎,4 ℃裂解过夜,4 ℃12000 rpm低温离心30 min,取上清,BCA蛋白浓度测定,每管8 μg蛋白分装,-80 ℃冻存待用。

10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,4 ℃转膜过夜,5%脱脂奶粉封闭,p-tau202、p-tau404、p-tau396和p-tau181抗体与总tau抗体(1:3000)4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育2 h,ECL发光(ECL试剂盒,Pierce, CA),Kodak-XAR胶片曝光,显影。洗膜重新封闭后, $\beta$ -actin抗体(1:12 000)孵育,二抗孵育,发光,胶片曝光显影,以 $\beta$ -actin作为上样量参照标准。胶片扫描后,用Image-pro Plus 6.0软件包分析。

#### 1.2.3 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

切片正常驴血清室温预孵育1 h,p-tau202、p-tau404、p-tau396和p-tau181抗体(1:100)孵育,4 ℃过夜。切片经0.01M的磷酸盐缓冲液(pH7.4)充分漂洗后,用驴抗兔IgG(1:200)室温孵育2 h,漂洗后甘油封片剂封片。共聚焦激光扫描显微镜下观察实验结果并拍照,图片经Photoshop 8.0软件处理并打印。

#### 1.2.4 大蒜素抗氧化活性检测

测定小鼠脑组织重量,按重量体积比加4 ℃生理盐水制成10%的组织匀浆,离心(2500 rpm,10 min),取上清液,置4 ℃备用。测定SOD活力和MDA含量。

#### 1.2.4.1 脑组织SOD活力测定

采用经胺法测定,通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化径胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下,呈现紫红色,用可见光分光光度计测其吸收度。当被测样品中含SOD时,则对O<sub>2</sub>有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值。550 nm处比色,通过公式计算可求出被测样品中的SOD活力。测定方法严格按照试剂盒说明书操作。计算公式:组织匀浆中SOD活力

$(U/mgprot) = (\text{对照管吸光度}-\text{测定管吸光度})/\text{对照管吸光度} \times 50\% \times \text{反应液总体积}/\text{取样量 (mL)} / \text{组织中蛋白含量 (mgprot/mL)}$ 。

#### 1.2.4.2 脑组织 MDA 含量测定

过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与硫代巴比妥酸(TBA)结合,形成红色产物,在 532 nm 处比色测定各管吸光度,通过公式计算可求出被测样品中的 MDA 含量。测定方法严格按照试剂盒说明书操作式:组织中 MDA 含量(nmol/mgprot) = (测定管吸光度-测定空白管吸光度)/(标准管吸光度-标准空白管吸光度) × 标准品浓度(10 nmol/mL)/蛋白含量(mgprot/mL),nmol/mgprot 为纳摩尔/毫克蛋白。

#### 1.2.5 统计分析

本实验所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件进

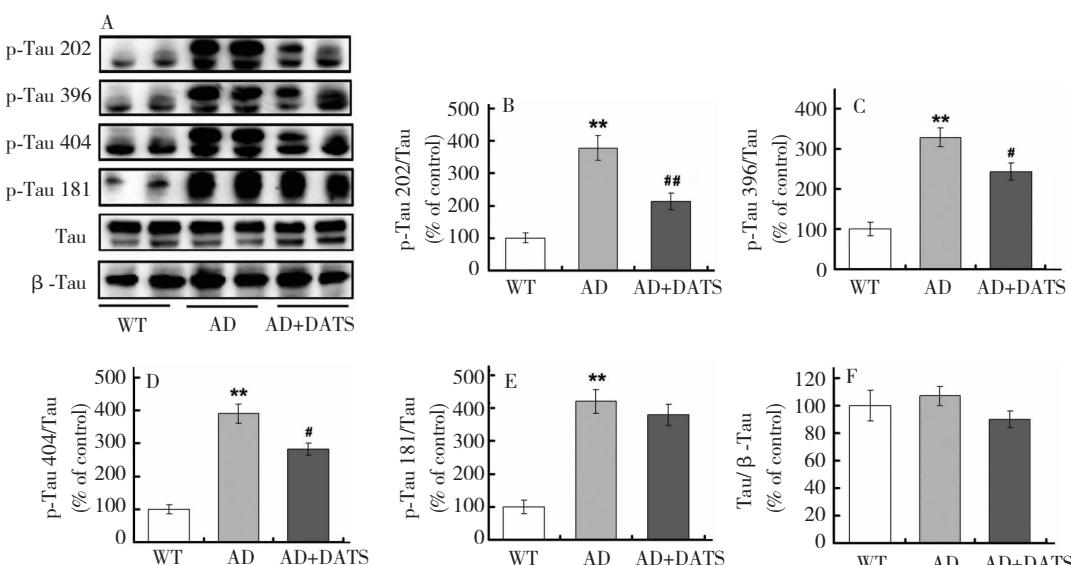


图 1 大蒜素对 AD 模型小鼠海马 p-tau 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of allicin on the expression of p-tau protein in hippocampus of AD mice

注:A:Western blot 检测脑内各位点磷酸化 tau 蛋白(Tau202、Tau396、Tau404、Tau181)的表达;B:p-Tau 202/Tau 的变化;C:p-Tau 396/Tau 的变化;D:p-Tau 404/Tau 的变化;E:p-Tau 181/Tau 的变化;F:总 Tau 蛋白含量变化。与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$ 。

Note: A: The expression of phosphorylated tau protein (Tau202, Tau396, Tau404, Tau181) was detected in the brain by western blot; B: The variation of p-Tau 202/Tau; C: The variation of p-Tau 396/Tau; D: The variation of p-Tau 404/Tau; E: The variation of p-Tau 181/Tau; F: The variation of Tau; Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with model group, ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$ .

#### 2.2 免疫组织化学染色结果

应用免疫荧光双标和共聚焦激光扫描显微术观察海马 CA3 区 tau 蛋白的磷酸化水平,结果显示,与野生型小鼠比较,AD 模型组海马 CA3 区 p-Tau 蛋白的表达增加,大蒜素治疗组的 p-Tau 蛋白较模型组有所减少。

行分析处理,对数据进行 One-way ANOVA 分析,结果以均值 ± 标准差表示( $X \pm SD$ ), $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 Western blot 结果

本实验检测了三组小鼠脑内 p-tau 蛋白(Ser202、Ser396、Ser404、Thr181)及总 tau 的水平(图 1A),统计分析显示:在 Ser202、Ser396、Ser404 及 Thr181 位点上,AD 和 AD + DANTS 两组实验小鼠脑内 p-tau 蛋白水平均具有显著性差异( $P < 0.05$ ,图 1B ~ E);两组实验小鼠脑内总 tau 蛋白的表达无显著差异(图 1F)。

#### 2.3 大蒜素抗氧化活性检测结果

研究结果显示,AD 组小鼠脑内 SOD 的活性明显降低,MDA 的含量明显增高,差异有统计学差异( $P < 0.01$ );当给予 tau 转基因小鼠大蒜素处理后,给药组小鼠脑内 SOD 活性较 AD 组显著升高( $P < 0.05$ ),大蒜素给药组小鼠脑内 MDA 含量与 AD 组比较略降低( $P < 0.05$ )(表 1)。

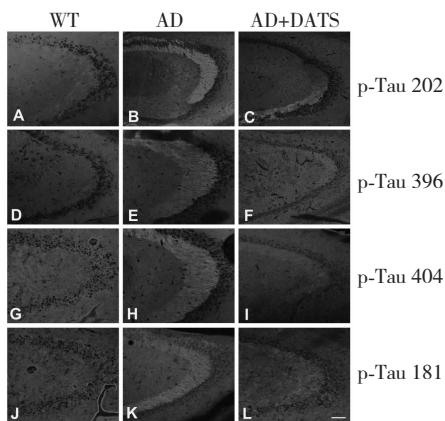


图2 野生对照组(A、D、G、J)、AD模型组(B、E、H、K)及 DATS 处理组(C、F、I、L)小鼠海马 CA1 区 tau 蛋白磷酸化水平

Fig. 2 The phosphorylation of tau protein in hippocampus CA1 region of wild type mice(A, D, G, J), AD model mice(B, E, H, K) and AD + DATS mice(C, F, I, L)

表1 大蒜素对 AD 模型小鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响( $\bar{X} \pm S$ )

Table 1 The effect of allicin on SOD activity and MDA content in brain tissue of AD mice( $\bar{X} \pm S$ )

组别 Group	动物例数 Animal cases(n)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)
对照组 Control group	10	$8.32 \pm 0.34$	$42.43 \pm 5.70$
模型组 Model group	10	$3.51 \pm 0.21^{**}$	$85.05 \pm 2.46^{**}$
大蒜素给药组 Allicin administration group	10	$6.17 \pm 0.46^{\#}$	$58.24 \pm 3.41^{\#}$

注:与对照组相比, $^{**} P < 0.01$ ;与模型组相比, $^{\#} P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group,  $^{**} P < 0.01$ ; Compared with model group,  $^{\#} P < 0.05$ .

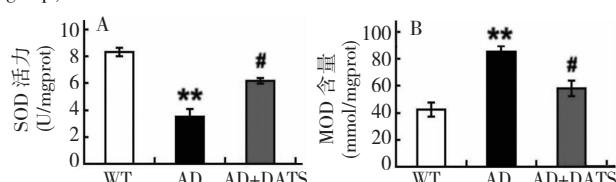


图3 大蒜素对 AD 模型小鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effect of allicin on SOD activity and MDA content in brain tissue of AD mice

注:A: 小鼠脑内 SOD 活性的比较;B: 各组小鼠脑内 MDA 含量变化;与对照组相比, $^{**} P < 0.01$ ;与模型组相比, $^{\#} P < 0.05$

Note: A: Comparison of SOD activity in brain of mice; B: Variation of MDA content in the mice brain of each group; Compared with control group,  $^{**} P < 0.01$ ; Compared with model group,  $^{\#} P < 0.05$

### 3 讨论

AD 的主要病理特征是脑内淀粉样蛋白沉积形成老年斑(senile plaque, SP)和神经元内出现神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)。SP 是细胞外的淀粉样沉积,其核心成分是含有 39~43 个氨基酸残基的  $\text{A}\beta$ ;过度磷酸化的 tau 蛋白是 NFTs 的主要组成部分,是 AD 病理改变中重要的标记性蛋白,与 AD 的发病有着不可分割的联系,tau 聚积在退变神经元胞体,其磷酸化程度与 AD 患者痴呆程度呈正相关。AD 的发病机制及发病原因至今仍是个谜,目前认为有多种学说与 AD 的发病有关,如自由基损伤学说、 $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$ ,  $\text{A}\beta$ )毒性学说、tau 蛋白假说等。近些年有证据显示氧化应激参与了 AD 的发病,但其确切机制还不是很清楚,氧化应激与自由基损伤学说认为,细胞外  $\text{A}\beta$  可以诱导蛋白质、核酸以及脂质的过氧化,产生大量自由基,提示  $\text{A}\beta$  可直接诱导氧化应激,而氧化应激又会促进可溶性  $\text{A}\beta$  转换为不溶性  $\text{A}\beta$ ,促进老年斑的沉积<sup>[5]</sup>。此外,有直接的细胞生物学证据报道,NFTs 中存在大量脂质过氧化的产物 4-HNE,而 4-HNE 修饰后的 tau 蛋白更倾向于形成神经纤维缠结<sup>[7]</sup>,这一途径也可以引起神经元的凋亡。更重要的是,  $\text{A}\beta$  和 tau 在 AD 神经元中往往相互缠结<sup>[6]</sup>,可以推断氧化应激效应可能也通过调控  $\text{A}\beta$  沉积和 tau 的磷酸化来影响 AD 的病程。

大蒜素是一种重要的天然抗氧化剂,不仅能清除氧自由基和羟基自由基,还能降低羟自由基引起的脂质过氧化,而且,大蒜素中的硫化物对线粒体的呼吸具有调控作用,Helen 等<sup>[8]</sup>通过实验发现服用大蒜素的小鼠抵抗尼古丁脂质过氧化物作用明显增加;刘浩等<sup>[9]</sup>通过实验也发现大蒜素具有抗氧化作用,具体表现在它能有效清除致老的自由基,显著提高机体内 SOD 活性,并且体内 MDA 含量显著降低,稳定细胞膜结构,减轻脂质过氧化对内皮细胞的损伤;本实验通过氧化应激相关物质的检测,发现大蒜素处理之后的 AD 模型小鼠 SOD 与 AD 组相比活性增加,MDA 含量减少,这一结果提示大蒜素可以降低 AD 小鼠脑内的氧化应激,并且通过免疫荧光和 western blot 等实验方法检测,我们发现在 AD 组的 tau 转基因小鼠脑内所检测的 Ser202、Ser404、Ser396 及 Thr181 位点 tau 蛋白发生过度磷酸化改变,大蒜素治疗组这些过度磷酸化的 tau 蛋白明显减少,说

明大蒜素可能通过抑制 AD 小鼠脑内氧化应激,降低 tau 蛋白的磷酸化,起到对 AD 转基因小鼠大脑神经元的保护作用。

## 参考文献

- 1 Ferr CP, Prince M, Brayne C, et al. Alzheimer's disease international global prevalence of dementia:a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, 366:2112-1227.
- 2 Xu J, Wen SR, Yu YH, et al. The role of the Tau protein in Alzheimer's disease. *Prog Mod Biomed*, 2015, 3:573-575.
- 3 Yves C. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71:621-629.
- 4 Prasad K, Laxdal VA, Yu M, et al. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem*, 1995, 148:183-189.
- 5 Guadagna S, Esiri MM, Williams RJ, et al. Tau phosphoryla-

tion in human brain; relationship to behavioral disturbance in dementia. *Neurobiol Aging*, 2014, 21:125-126.

- 6 Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease, *Neuron*, 2014, 82:756-771.
- 7 Liu Q, Smith MA, Avila J, et al. Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med*, 2014, 38:746-754.
- 8 Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar K, et al. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion (*Allium cepa* Linn) on nicotine-induced lipid peroxidation. *Veterin Human Toxicol*, 1999, 41:316-319.
- 9 Liu H(刘浩), Cui MZ(崔美芝), Dong J(董娟). 大蒜素抗氧化延缓衰老作用的实验研究. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2006, 26:252-253.

(上接第 706 页)

- 6 Yang L(杨柳), Su ZJ(苏芝军), Xu SJ(许舜军), et al. Simultaneous determination of 4 phenolic acids in Cangerzi by Ultra-performance liquid chromatography. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2010, 45:1537-540.
- 7 Tian J(田静), Xia YF(夏玉凤), Fang KH(房克慧). Simultaneous determination of eight phenolic acids in *Xanthium sibiricum* medicines by HPLC. *Chin Med Mater* (中药材), 2013, 36:1623-1626.
- 8 Hong Y(洪燕), Han YQ(韩燕全), Xia LZ(夏伦祝), et al. Simultaneous determination of nine phenolic acids components in Xanthii Fructus. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, 48:1109-1112.
- 9 Tan ZL(覃振林), Wei HY(韦海英), LI XJ(李学坚), et al. Analysis of chemical constituents of volatile oil by GC-MS of *Xanthium sibiricum*. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2006, 13:248-250.
- 10 Liu ZM(刘明芝), Zhou RY(周仁郁). TCM Statistics and Software Application(中医药统计学与软件应用). Beijing: The Medicine Science Press of China, 2006. 280-284.

- 11 Yan H(严辉), DU JA(段金廒), Qian DW(钱大玮), et al. Correlation analysis and evaluation of inorganic elements in *Angelica sinensis* and its correspondence soil from different regions. *Chin Med Mater* (中药材), 2011, 34:512-516.
- 12 Luo FL(罗夫来), Guo QS(郭巧生). Determination and principal components analyze of mineral elements in different population of *Thesium chinense*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35:1226-1230.
- 13 Cao ZQ(曹治权), Wang XP(王秀萍), Cao GZ(曹广智), et al. Study on the relationship between the presence of trace elements in traditional Chinese medicine and biological activity. *Guangdong Trace Elements Sci* (广东微量元素科学), 1995, 2(10):18-26.
- 14 Su DS(苏达世), Wan BL(万邦莉). Survey of inorganic elements in gypsum. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1989, 9(4):166-167.
- 15 Feng LY(孟令云), Li B(李滨). Determination of inorganic trace elements in leaves of *Ginkgo biloba* and its clinical significance. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2001, 18(5):36-37.