

人参皂苷 Rb1 对 $A\beta_{1-42}$ 导致的 Tau 蛋白异常磷酸化的影响

杨淑达,于浩飞,张兰春,李媛,耿艺娟,张荣平*,胡炜彦*

昆明医科大学 药学院暨云南省天然药物药理重点实验室,昆明 650500

摘要:为探讨人参皂苷 Rb1 对 $A\beta_{1-42}$ 所致小鼠脑片微管相关蛋白(Tau)异常磷酸化的抑制作用及其可能机制,采用 $A\beta_{1-42}$ 诱导小鼠海马脑片建立 Tau 蛋白过度磷酸化模型,运用免疫印迹方法观察人参皂苷 Rb1 对 $A\beta_{1-42}$ 导致小鼠脑片 p-Tau、p-Erk1/2、Erk1/2 蛋白水平的影响。实验结果显示,模型组 p-Tau、p-Erk1/2 表达水平明显高于空白对照组 ($P < 0.01$);与模型组比较,人参皂苷 Rb1 各剂量组 p-Tau、p-Erk1/2 表达水平显著性降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且大、中剂量组优于小剂量组;人参皂苷 Rb1 呈一定的剂量依赖性下调 $A\beta_{1-42}$ 导致的 p-Tau、p-Erk1/2 的蛋白水平。本研究表明,人参皂苷 Rb1 可能通过抑制 Erk1/2 的激活逆转 $A\beta_{1-42}$ 所导致的 Tau 蛋白水平的升高来减少神经纤维缠结。

关键词:人参皂苷 Rb1; $A\beta_{1-42}$ 淀粉样蛋白;Tau 蛋白;Erk1/2;p-Erk1/2

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1143-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.1008

The effect of ginsenoside Rb1 on abnormal phosphorylation of Tau induced by $A\beta_{1-42}$

YANG Shu-da, YU Hao-fei, ZHANG Lan-chun, LI Yuan, GENG Yi-juan, ZHANG Rong-ping*, HU Wei-yan*

School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: To observe the effects and the possible mechanisms of ginsenoside Rb1 on abnormal phosphorylation of Tau induced by $A\beta_{1-42}$ in the hippocampal slices. Slices were divided into model group (treated with $A\beta_{1-42}$), ginsenoside Rb1 group (treated with $A\beta_{1-42}$ and different doses of ginsenoside Rb1) and control group (treated with the same volume of vehicle). The expressions of Tau, p-Tau, Erk1/2 and p-Erk1/2 were observed by Western blot. Results showed that the expressions of p-Tau (199, 202, 396) and p-Erk1/2 in the model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). While, the expressions of p-Tau (199, 202, 396) and p-Erk1/2 in ginsenoside Rb1 treated groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and ginsenoside Rb1 showed a dose-dependent reverse effects of p-Tau and p-Erk1/2 expression. The results suggested that ginsenoside Rb1 could reverse $A\beta_{1-42}$ induced hyperphosphorylation of tau and the mechanism maybe through inhibiting the activation of Erk1/2.

Key words: ginsenoside Rb1; β -amyloid protein ($A\beta$); Tau protein; Erk1/2; p-Erk1/2

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),又叫老年性痴呆,是一种中枢神经系统慢性退行性疾病。Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结为其特征性病理改变之一。正常人的大脑中微管相关蛋白(protein Tau)与磷酸化微管相关蛋白(P-Tau)处于

相对平衡状态,但在 AD 患者,Tau 蛋白处于过度磷酸化状态,参与了神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)的形成,并且 AD 病人的痴呆程度与 NFT 的数目密切相关^[1-4]。

人参皂苷是我国传统的名贵中草药材——人参中的一类主要的有效成分,约占 4%,研究表明:人参皂苷在调节中枢神经系统功能方面,具有增强记忆和认知功能的作用,是研究中药抗痴呆的热点之一^[5-7]。Rb1、Rg1 同属于人参皂苷的单体之一,国内外文献对 Rb1 和 Rg1 的报道较多,对人参皂苷

收稿日期:2019-11-22 接受日期:2020-06-22

基金项目:国家自然科学基金(81960666,81860254);云南省创新团队(2020HC008);云南省科技厅项目(2019FC033);云南省高层次人才培养支持计划—云岭学者项目

* 通信作者 Tel:86-013700645416; E-mail: huweiyuan2004@163.com, zhrpk@163.com

Rb1 在 AD 微管相关蛋白 (Tau) 异常磷酸化中的作用有一些报道,但多是针对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经元^[8-10]或神经干细胞分化过程中^[11]Tau 蛋白磷酸化的影响,限于细胞水平,对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的组织水平 Tau 磷酸化的影响却鲜有报道。本实验参照国内外有关文献^[12,13],采用 $A\beta_{1-42}$ 诱导小鼠海马神经元和离体脑片的方法,建立 Tau 蛋白过度磷酸化的模型,观察人参皂苷 Rb1 对 $A\beta_{1-42}$ 所致小鼠海马神经元呵和脑片微管相关蛋白 (Tau) 异常磷酸化的抑制作用及其可能机制,旨在丰富人参皂苷 Rb1 抑制 β 淀粉样蛋白诱导神经元 Tau 蛋白过度磷酸化的机制研,为含人参皂苷 Rb1 药物在抗痴呆治疗中的应用提供实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级 C57 小鼠,雄性 10 只,雌性 E18 天孕鼠 5 只,鼠龄均为 8 周,由昆明医科大学实验动物学部提供(合格证号:SCXK(滇)-2011004)。

1.2 药物与试剂

人参皂苷 Rb1 (云南植物药业有限公司,批号:20171201,纯度 98.5%),使用前溶于生理盐水配成浓度分别为 10、50 和 250 mg/mL 的三种溶液。 $A\beta_{1-42}$ (Peptide 公司,纯度 98%),使用前溶于生理盐水中,配制成 1mg/mL 溶液待用。Tau [pS²⁰²] (Thermo 公司);Tau [pS¹⁹⁹]、Tau [pS³⁹⁶]、Erk1/2、p-Erk1/2 和 β -actin 抗体 (SIGMA 公司);Tau 多克隆抗体 (DAKO 公司);Tuj1 抗体 (Abcam 公司);荧光二抗 (Invitrogen 公司);DAPI 染色液 (碧云天公司)。

2 方法

2.1 离体海马脑片的制备

小鼠用 6% 水合氯醛麻醉 (400 mg/kg),断头,冰上迅速切开头皮,暴露颅骨,取出全脑,置于经 95% CO₂ 和 5% CO₂ 混合气体饱和的人工脑脊液冰水混合物中,用振动切片机 (WPI, Sarasota, FL, USA) 行冠状切制海马脑片 (厚度 350 μ m)。海马脑片置盛有 95% CO₂ 和 5% CO₂ 混合气体饱和的人工脑脊液中孵育培养 (温度 32 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)。人工脑脊液成分 (mmol/L): (NaCl 126、KCl 2.5、NaH₂PO₄ 1、CaCl₂ 2.5、MgSO₄ 1.5、NaHCO₃ 26 和 glucose 10)。

2.2 实验分组和给药

将海马脑片分为模型组、人参皂苷 Rb1 高、中、低剂量组和试剂空白组,各组脑片分别置盛有 95% CO₂ 和 5% CO₂ 混合气体饱和的人工脑脊液中孵育

培养 (温度 32 \pm 0.5 $^{\circ}$ C) 1 h 后,人参皂苷 Rb1 高、中、低剂量组分别加入浓度为 250、50、10 mmol/L 的人参皂苷 Rb1,加入等体积生理盐水做试剂空白。继续培养 2 h 后,模型组和人参皂苷 Rb1 高、中、低剂量组分别加入 $A\beta_{1-42}$ 至其浓度达到 1 mmol/L。继续培养 6 h,取出脑片,做后续检测。

2.3 蛋白表达量测定

2.3.1 蛋白提取

各组脑片取出后,迅速经人工脑脊液清洗后,放入 1.5 mL 的离心管中,每片加入 200 μ L 的 RIPA 组织裂解液 (已加入蛋白酶及磷酸酶抑制剂)。冰上研磨成组织匀浆,4 $^{\circ}$ C 离心 (15 000 \times g, 20 min),取上清,测定总蛋白含量。取测定总蛋白浓度后的蛋白提取液样品,加入等体积的 2 \times 上样缓冲液 (125 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) pH 6.8,质量浓度为 10 g/L 甘氨酸 (glycerol),质量浓度为 10 g/L 的十二烷基磺酸钠 (SDS),质量分数为 0.006% 溴酚蓝,130 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)) 混匀,在 95 $^{\circ}$ C 沸水中煮 5 min,冰上冷却后,-80 $^{\circ}$ C 储存备用。

2.3.2 总蛋白含量测定

蛋白含量按照 BCA 试剂盒操作进行测定:1) 将 50 体积的 BCA reagent 与 1 体积 Cu reagent 混合,配置成工作溶液 (working reagent, WR); 2) 用超纯水将标准品 BSA (4 000 μ g/mL) 稀释至 2 000、1 000、500、250、125、25 μ g/mL; 3) 将 25 μ L 不同浓度的标准品 BSA 或待测样品与同体积的 WR 工作溶液混合; 4) 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,冷却至室温,混匀,加入 96 孔培养板 (设 3 个复孔)。562 nm 下测定的吸光度,绘制标准曲线并计算总蛋白浓度。

2.3.3 蛋白印迹反应

配置 5% 浓缩胶 (30% acrylamide 1 700 μ L, 1.0 M Tris (pH 6.8) 1 250 μ L, 10% SDS 100 μ L, 10% AP 100 μ L, TEMED 10 μ L, dd H₂O 6 800 μ L)、10% ~ 12% 分离胶 (30% acrylamide 3 300 μ L, 1.5 M Tris (pH 8.8) 2 500 μ L, 10% SDS 100 μ L, 10% AP 100 μ L, TEMED 4 μ L, ddH₂O 4 000 μ L) 及电泳缓冲液 (Tris 15.1 g, glycine 94 g, SDS 5 g, 加入 800 mL 去离子水溶解后定容至 1 L), 按预定顺序将 30 μ g 各蛋白样品上入泳道上样; 连接电泳装置与电源, 调节电压进行电泳分离; 将凝胶板置于盛有转膜缓冲液 (Tris 5.8 g, glycine 2.9 g, SDS 0.37 g, 加入去离子水 600 mL 溶解, 调节 PH 值至 8.3, 定容至 800 mL 后, 加入 200 mL 甲醇) 的容器中, 安装转膜装置, 注

满 4 °C 预冷的转膜缓冲液,调节电压转膜;洗膜(室温,5 min);室温封闭 1 h(封闭液:5% 脱脂奶粉用 TBST 预先配制,并于摇床上震荡均匀);孵一抗(4 °C,大于 8 小时);TBST 洗膜(室温,3 × 5 min);孵二抗(室温,60 min);TBST 洗膜(室温,3 × 5 min);用 ECL 显影液显影条带,凝胶成像仪拍照。用 anti- β -actin 孵育同一张 PVDF 膜作为内参。用 Quantity One 软件对条带进行光密度分析,用目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的光密度比值代表目的蛋白的相对含量。

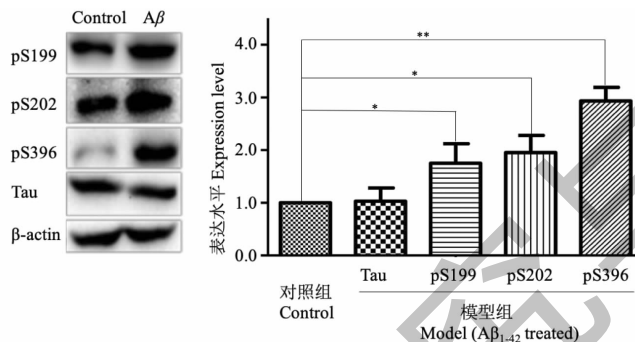


图 1 $A\beta_{1-42}$ 诱导对小鼠培养脑片 Tau 及 p-Tau 的影响

Fig. 1 The effects of $A\beta_{1-42}$ on Tau and p-Tau in the culturing mouse brain slices

注:与模型组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.2 $A\beta_{1-42}$ 诱导对小鼠培养脑片 Erk1/2 及 p-Erk1/2 的影响

与空白组比较,模型组 Erk1/2 蛋白水平无增加

($P > 0.05$),模型组 p-Erk1/2 蛋白水平明显增加($P < 0.01$)(见图 2)。

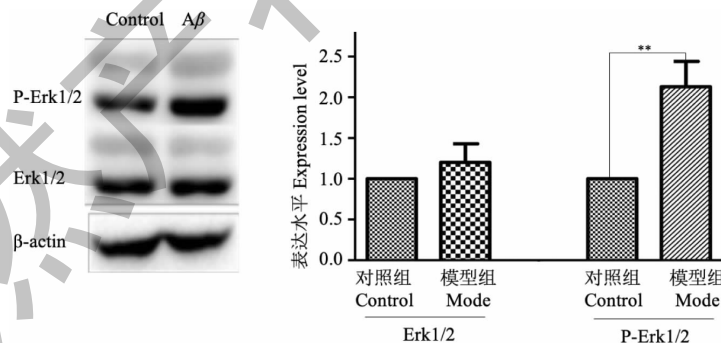


图 2 $A\beta_{1-42}$ 诱导对小鼠培养脑片 Erk1/2 及 p-Erk1/2 的影响

Fig. 2 The effects of $A\beta_{1-42}$ on Erk1/2 and p-Erk1/2 in the culturing mouse brain slices

注:与模型组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.3 人参皂苷 Rb1 对小鼠培养脑片 Tau 及 p-Tau 的影响

小鼠脑片经过 Rb1 培养后,与空白对照相比,Tau 蛋白表达量无明显增加;与模型组相比,人参皂苷 Rg1 各剂量组 Ser¹⁹⁹、Ser²⁰²、Ser³⁹⁶ 位点标记的 p-

2.4 统计学分析

数据结果均以平均数 ± 标准差表示,数据处理采用 one-way ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 视为具有显著性统计学差异。

3 结果

3.1 $A\beta_{1-42}$ 诱导对小鼠培养脑片 Tau 及 p-Tau 的影响

与空白组比较,模型组 Tau 蛋白表达无增加($P > 0.05$),模型组 p-Tau 表达增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(见图 1)。

Tau 蛋白表达水平均有不同程度减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),人参皂苷 Rb1 各剂量组之间比较,大剂量组较中、小剂量组更有效降低 p-Tau 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见图 3)。

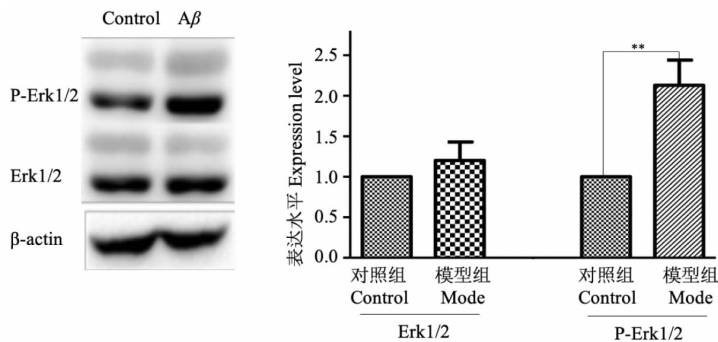


图3 人参皂苷 Rb1 对 AD 模型小鼠脑片 Tau 及 p-Tau 的影响

Fig. 3 The effects of Rb1 on Tau and p-Tau in the brain slices of AD model

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。A: 对照组; B: 模型组; C: Rb1 低剂量组; D: Rb1 中剂量组; E: Rb1 高剂量组。下同。Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. A: Control group; B: Model group; C: A β + Rb1 (10 μ M); D: A β + Rb1 (50 μ M); E: A β + Rb1 (250 μ M). The same below.

3.4 人参皂苷 Rb1 对小鼠培养脑片 Erk1/2 及 p-Erk1/2 的影响

小鼠脑片经过 Rb1 培养后,与空白对照相比, Erk1/2 蛋白表达量无明显增加;与模型组相比,人参皂苷 Rb1 各剂量组 p-Erk1/2 蛋白表达水平均有

不同程度减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),人参皂苷 Rb1 各剂量组之间比较,大剂量组较中小剂量组更有效降低 p-Erk1/2 的蛋白水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图 4)。

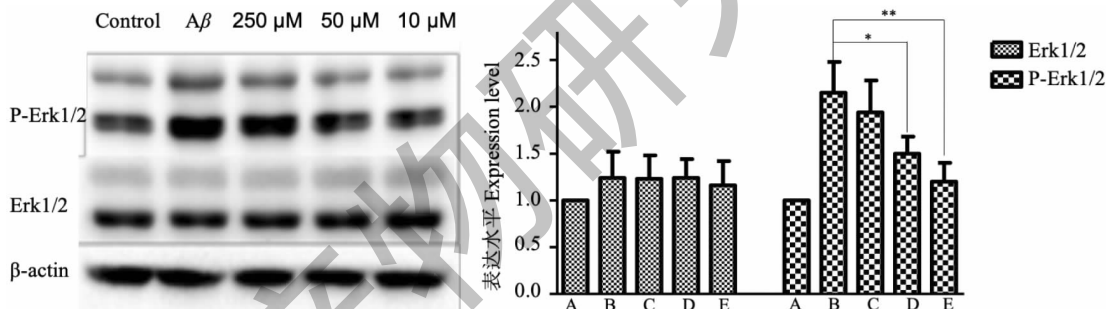


图4 人参皂苷 Rb1 对 AD 模型小鼠脑片 p-Erk1/2 及 Erk1/2 的影响

Fig. 4 The effects of Rb1 on p-Erk1/2 and Erk1/2 in the brain slices of AD model

3 讨论

老年痴呆(AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,严重危害老年人健康。由于微管相关蛋白(Tau)过度磷酸化而形成的神经纤维结节(NFT)是AD患者脑内典型病理改变之一。正常的微管相关蛋白(Tau)能促进微管蛋白聚合成微管并增强其稳定性,在神经系统形成和轴突信号传导中起着重要作用,过度磷酸化的Tau丧失了促进微管蛋白聚合的能力,导致神经元微管解体,引起轴浆转运障碍,神经纤维变性。当Tau蛋白去磷酸化后,可使NFT发生松散,释放出的Tau又重新恢复其促微管的活力^[14-16]。

A β ₁₋₄₂是AD患者脑内引起Tau蛋白磷酸化的主要物质,抑制A β ₁₋₄₂引起Tau蛋白磷酸化对AD的

预防和治疗有帮助^[17,18]。本实验研究发现:A β ₁₋₄₂可诱导小鼠脑片Tau蛋白在特异性位点(Ser¹⁹⁹、Ser²⁰²、Ser³⁹⁶)的磷酸化水平增加(与正常组比较差异具有显著性, $P < 0.01$);而给与不同剂量人参皂苷Rb1处理后,可降低这些特异性位点的Tau蛋白的磷酸化水平(与A β ₁₋₄₂组比较差异具有显著性, $P < 0.05$)。我们的部分研究结果(Tau蛋白Ser³⁹⁶位点)与Zhao等^[11]在神经干细胞分化过程中的研究结果一致(人参皂苷Rb1可减轻 β -淀粉样蛋白25-35诱导的神经干细胞分化过程中Tau蛋白过度磷酸化),与他们的实验不同的是:本实验以小鼠海马脑片为研究对象,观察了三个Tau蛋白的特异性位点,从组织水平说明了人参皂苷Rb1能有效减轻A β ₁₋₄₂

引起的 Tau 蛋白不同位点的过度磷酸化,从而减轻 NFT 的形成;本研究还发现, $A\beta_{1-42}$ 引起的 Tau 蛋白不同特异性位点 (Ser¹⁹⁹、Ser²⁰²、Ser³⁹⁶) 磷酸化水平的异常升高随人参皂苷 Rb1 剂量的增加而降低,表明人参皂苷 Rb1 对 Tau 蛋白不同特异性位点磷酸化的抑制作用具有剂量依赖性。

Tau 蛋白的磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的调节,许多蛋白激酶如周期蛋白依赖性激酶 (CDK)、糖原合成激酶 3 β (GSK-3 β)、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 都能促使 Tau 蛋白磷酸化^[19-23]。已有研究表明:人参皂苷 Rb1 可能可以通过激活 PI3K、抑制 GSK-3 β 、影响 p25/cdk5 等减轻 Tau 蛋白过度磷酸化善作用^[8-10]。我们的研究发现: $A\beta_{1-42}$ 可使 p-Erk1/2 蛋白水平明显增加(与正常组比较差异具有显著性, $P < 0.01$),总 Erk1/2 水平升高未见显著性差异 ($P > 0.05$),说明 $A\beta_{1-42}$ 可能通过激活 Erk1/2,诱导 Tau 蛋白在特异性位点发生磷酸化;而我们用人参皂苷 Rb1 (50 $\mu\text{mol/L}$ 和 250 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后, p-Erk1/2 蛋白水平的异常升高得到明显改善(与 $A\beta_{1-42}$ 组比较差异具有显著性, $P < 0.05$, $P < 0.01$),对总 Erk1/2 水平的影响未见显著性差异 ($P > 0.05$)。本研究还发现, $A\beta_{1-42}$ 引起的 p-Erk1/2 表达水平的异常升高随人参皂苷 Rb1 剂量的增加而降低,表明人参皂苷 Rb1 对 Erk 磷酸化的抑制作用具有剂量依赖性。

我们的研究结果表明: $A\beta_{1-42}$ 可通过激活 Erk 诱导 Tau 蛋白发生异常磷酸化,人参皂苷 Rb1 则能剂量依赖性的通过抑制 Erk1/2 的过度激活降低 Tau 蛋白的磷酸化水平,使其去磷酸化增多而稳定神经元的微管系统,恢复其功能,进而有可能逆转 AD 的病理改变,成为用于治疗 AD 的药物。本研究为人参皂苷 Rb1 作为 AD 的治疗的潜在药物研究提供了实验依据,然而对于其具体的作用机制,尚有待于进一步的研究证明。

参考文献

- 1 Wang Y, Yu S, Wang X. The Effects of COX-2 specific inhibitor rofecoxib on the deposition of A beta in Alzheimer's disease[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30:958-963.
- 2 Zeng K, Jiang DK, Wang XC. Research progress of etiopathogenic factors and mechanisms in Alzheimer's disease [J]. J Chin Microcirc (微循环学杂志), 2018, 28(2):61-65.

- 3 Wei CR, Wu JY. New research progress on the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. J Jinggangshan Univ (井冈山大学学报), 2008, 29(12):58-59.
- 4 Avila J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology [J]. FEBS Lett, 2006, 580:2922-2927.
- 5 Zheng J. Pharmaceutical Botany (药用植物学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999:179-181.
- 6 Dou DQ, Jin L, Chen YJ. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng* [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 1999, 16(2):151-156.
- 7 Zhang CZ, An LJ, Jin FX. Progress on the research of physiological function of ginsenosides [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2002, 28(4):70-74.
- 8 Zeng YQ, Chen XC, Zhu YG, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates β -amyloid peptide 25-35-induced tau hyperphosphorylation in cortical neurons [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40:225-230.
- 9 Huang TW, Chen XC, Zhang J, et al. Involvement of p25/cdk5 in ginsenoside Rb1 attenuating β -amyloid peptide 25-35-induced tau hyperphosphorylation [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2006, 22:688-693.
- 10 Song JQ, Chen XC, Zhang J, et al. NK/p38 MAPK involves in ginsenoside Rb1 attenuating beta-amyloid peptide (25-35)-induced tau protein hyperphosphorylation in embryo rat cortical neurons [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43(1):29-34.
- 11 Zhao QX, Liu XZ, Li B, et al. Effect of ginsenoside Rb1 and beta-amyloid 25-35 on tau hyperphosphorylation in differentiated neural stem cells [J]. J Clin Rehab Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15:5076-5079.
- 12 Giannakopoulos P, Herrmann FR, T Bussièrè, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease [J]. Neurol, 2003, 60:1495-5001.
- 13 Shankar M, Li S, et al. Soluble amyloid β -protein dimers isolated directly from Alzheimer's disease patients potentially impair synaptic plasticity and memory [J]. Nat Med, 2008, 14:837-842.
- 14 Zhu Y, Peng L, Hu J, et al. Current anti-Alzheimer's disease effect of natural products and their principal targets [J]. J Integr Neurosci, 2019, 18:327-339.
- 15 Liao YJ, Gao TY, Shen JY, et al. The different functions of Tau protein in the cytoplasm and nucleus of neuron and the effect of its phosphorylation on Alzheimer's disease [J]. Chin J Histochem Cytochem (中国组织化学与细胞化学杂志), 2016, 25(6):243-247.