

- adipose-derived stem cells *in vitro* [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(6): 467-475.
- [12] Lin T, Liu Y, Shi M, *et al.* Promotive effect of ginsenoside R<sub>d</sub> on proliferation of neural stem cells *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 754-761.
- [13] 李英博, 赵香琴, 姜英虹, 等. 基因芯片技术筛选人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub> 促进人神经干细胞增殖的分子靶点研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2701-2705.
- [14] 郑玉芹, 姜正林, 徐美玉. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对体外培养胎鼠神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(3): 273-279.
- [15] 汪宏锦, 李晶晶, 柯慧, 等. 中药对神经干细胞增殖分化信号通路的综合调控作用分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4093-4103.
- [16] Wang C, Han Z. Ginkgo biloba extract enhances differentiation and performance of neural stem cells in mouse cochlea[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(6): 861-869.
- [17] 查倩, 江琼, 伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1721-1723.
- [18] 谢兴文, 李应福, 李宁, 等. 不同浓度麝香含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、分化的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(1): 57-61.
- [19] Tao J, Chen B, Gao Y, *et al.* Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(3): 204-212.
- [20] 王俊杰, 楼琦, 石巧娟, 等. 中医药调控 Notch 信号通路影响神经干细胞增殖分化研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 408-411.
- [21] Saeb S, Azari H, Mostafavi-Pour Z, *et al.* 9-cis-Retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> improve the differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes through the inhibition of the notch and Wnt signaling pathways [J]. *Iran J Med Sci*, 2018, 43(5): 523-532.
- [22] Miller S R, Benito C, Mirsky R, *et al.* Neural crest Notch/Rbpj signaling regulates olfactory gliogenesis and neuronal migration [J]. *Genesis*, 2018, 56(6-7): e23215.
- [23] Cui C P, Zhang Y, Wang C, *et al.* Dynamic ubiquitylation of Sox2 regulates proteostasis and governs neural progenitor cell differentiation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4648.

## 醒脑益智汤对 AD 模型小鼠 tau 蛋白及 A $\beta$ 表达的影响

殷紫<sup>1</sup>, 张二飞<sup>2</sup>, 邓祥敏<sup>1</sup>, 张建华<sup>1</sup>, 季润元<sup>1</sup>, 韩永红<sup>1</sup>, 齐越<sup>3\*</sup>

(1. 江苏护理职业学院 检验药理学系 江苏 淮安 223001; 2. 江苏食品药品职业技术学院 江苏 淮安 223001; 3. 辽宁中医药大学附属第二医院 辽宁 沈阳 110034)

**摘要:** 目的 观察醒脑益智汤对 AD 模型小鼠 tau 蛋白及 A $\beta$  表达的影响。方法 小鼠右侧海马注射 3  $\mu$ L 老化的 A $\beta$ <sub>25-35</sub> (3 nmol/L) 构建 AD 模型, 将 114 只 ICR 小鼠随机分成假手术组、模型组、醒脑益智汤组 (18 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (9 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (4.5 g 生药/kg)、多奈哌齐组 (1.3 mg/kg)。造模后第 2 天, 小鼠分别灌胃给予不同剂量的醒脑益智汤及盐酸多奈哌齐, 灌胃 28 d。第 23 天进行 Morris 水迷宫训练; 第 28 天, ELISA 及硫黄素 S 染色测定 A $\beta$  表达; Western blot 测定 tau 蛋白磷酸化位点 (Ser 202, Thr 231)、PI3K/Akt 及 NEP、IDE 蛋白表达。结果 醒脑益智汤可降低 AD 模型小鼠的游泳潜伏期, 降低 A $\beta$  表达, 抑制 tau 蛋白位点 (Ser 202, Thr 231) 发生磷酸化, 增加 p-PI3K、p-Akt、NEP 及 IDE 的表达 ( $P < 0.05$ )。结论 醒脑益智汤可能是通过 PI3K/Akt 信号通路, 抑制 tau 蛋白位点的异常磷酸化, 通过增加 NEP、IDE 的表达, 抑制 AD 模型小鼠脑内的 A $\beta$  表达, 进而改善其学习记忆能力。

**关键词:** 阿尔茨海默病; 醒脑益智汤; A $\beta$ ; tau 蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)06-1473-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.014

## Effects of Xingnao Yizhi Decoction on expression of tau protein and A $\beta$ in AD mouse models

收稿日期: 2019-10-12

基金项目: 江苏省卫生职业技术教育研究项目 (J201709); 淮安市 2017 年科技局指导项目 (HANZ201714); 江苏省高校青蓝工程项目 [苏教师 (2019) 3 号]; 2018—2019 年度江苏食品药品职业技术学院面上引导基金项目 (JS-FP 2018006-Z)

作者简介: 殷紫 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: (0517) 87088237, E-mail: jshlxx\_yz@163.com

\* 通信作者: 齐越, 博士, 研究员, 研究方向为神经药理学。Tel: (024) 86803170, E-mail: lnzyxyqy2003@163.com

YIN Zi<sup>1</sup>, ZHANG Er-fei<sup>2</sup>, DENG Xiang-min<sup>1</sup>, ZHANG Jian-hua<sup>1</sup>, JI Run-yuan<sup>1</sup>,  
HAN Yong-hong<sup>1</sup>, QI Yue<sup>3\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Jiangsu Vocational College of Nursing, Huaian 223001, China; 2. Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huaian 223001, China; 3. The Second Hospital Affiliated to Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

**ABSTRACT: AIM** To observe the effects of Xingnao Yizhi Decoction (XNYZD) on expression of tau protein and A $\beta$  in AD mouse models. **METHODS** Mice were induced into AD models by injection of 3  $\mu$ L aged A $\beta$ <sub>25-35</sub> (3 nmol/L) in the right hippocampus. One hundred and fourteen ICR mice were randomly divided into sham operation group, model group, XNYZD groups (18 g of crude drug/kg; 9 g of crude drug/kg; 4.5 g of crude drug/kg), and donepezil group (1.3 mg/kg). On the 2nd day after modeling, mice started their 28 days corresponding administration of different doses of XNYZD and donepezil hydrochloride. On the 23rd day, Morris water maze training was performed; on the 28th day, ELISA and thioflavin S staining were used to determine the expression of A $\beta$ . Western blot was used to determine the phosphorylation sites of tau protein (Ser 202, Thr 231), PI3K/Akt, NEP, and IDE protein. **RESULTS** XNYZD reduced the swimming latency and A $\beta$  expression, inhibited the phosphorylation of tau protein (Ser 202, Thr 231), increased the expression of p-PI3K, p-Akt, NEP and IDE ( $P < 0.05$ ) of AD mouse models. **CONCLUSION** XNYZD may inhibit the cerebral tau expression of phosphorylation site through PI3K/Akt signaling pathway, and A $\beta$  expression by increasing the expression of NEP and IDE, thereby improving their learning and memory ability in AD mouse models.

**KEY WORDS:** Alzheimer's disease (AD); Xingnao Yizhi Decoction (XNYZD); A $\beta$ ; tau protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性神经退行性疾病, 病理特征在于细胞内神经原纤维缠结, 细胞外淀粉样蛋白斑块沉积和神经元丢失, 以及诸如学习、记忆障碍等。越来越多的研究表明,  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ) 沉积是 AD 发病机制中最早和最重要的事件, 并且在疾病的发展中其表达不断增加<sup>[1-2]</sup>, tau 蛋白的磷酸化, 可加速 AD 脑内 A $\beta$  的沉积<sup>[3]</sup>, 因此, 抑制 A $\beta$  沉积和 tau 蛋白磷酸化, 将有易于 AD 的治疗。

醒脑益智汤是辽宁省中医研究院的临床经验方, 具有健脾益肾填精、除痰、化痰之功效, 临床应用疗效较好, 但具体作用机制尚不明确。因此, 本实验以 AD 模型小鼠为研究对象, 从 A $\beta$  沉积和 tau 蛋白磷酸化 2 个方面, 考察醒脑益智汤对 AD 的治疗作用及其相关机制。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 雄性小鼠, 8 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 总共 114 只, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (辽) 2010-0001, 在辽宁中医药研究所实验动物中心饲养, 使用许可证号 SYXK (辽) 2010-0003。

1.2 药物与试剂 醒脑益智汤主要由茯苓、人参、知母、菖蒲、牛膝等组成, 用 10 倍量的水浸泡 400 g 药材 30 min, 煮沸, 用火煎熬药材 45 min;

过滤出汤药, 剩余药渣加入 8 倍量水, 沸腾, 用文火煎煮 20 min, 过滤出汤药, 将 2 次药液合并, 即得 1.02 g 生药/mL 药液。A $\beta$ <sub>1-42</sub> 试剂盒 (小鼠, 货号 842401, 美国 Cusabio 公司); A $\beta$ <sub>1-40</sub> 试剂盒 (小鼠, 货号 842301, 美国 Cusabio 公司); A $\beta$ <sub>25-35</sub> (批号 A4559, 美国 Sigma 公司); 硫黄素 S 染色 (批号 T1892, 美国 Sigma 公司); 盐酸多奈哌齐片 [批号 B14202012042, 规格 10 mg/片, 卫材 (中国) 药业有限公司提供]; 脑啡肽酶 (NEP, 批号 bs-11102R, 美国 Bioass 公司); Phospho-Tau (Ser 202, 批号 MN1020, 美国 Invitrogen 公司); Phospho-Tau (Thr 231, 批号 701056, 美国 Invitrogen 公司); p-PI3K (批号 4228p, 美国 Cell Signaling 公司); PI3K (批号 bs-6423R, 美国 Bioass 公司); 胰岛素降解酶 (IDE, 批号 21728-1-AP, 美国 Proteintech 公司);  $\beta$ -actin (批号 sc-47778, 美国 Santa Cruz 公司); Akt (批号 sc-1619, 美国 Santa Cruz 公司); p-Akt (批号 sc-7985, 美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 仪器 Western blot 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); DW-200 型脑立体定位仪 (成都泰盟科技公司); Azure AO 型酶标仪 (美国 Azure 公司)。

## 2 方法

2.1 造模及给药 按体质量将 114 只小鼠随机分为

假手术组、模型组、醒脑益智汤组 (18 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (9 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (4.5 g 生药/kg)、多奈哌齐组 (1.3 mg/kg), 每组 19 只。手术前腹腔注射水合氯醛 (300 mg/kg), 剃去头部毛发, 用碘酒或酒精消毒, 置脑立体定位仪。沿颅骨中线切开头部皮肤约 2 cm, 囟门为零点, 旁开 1.0 mm, 向后 0.5 mm, 深度为 3.0 mm, 3 min 内将 3  $\mu$ L 老化 (用无菌的生理盐水溶解  $A\beta_{25-35}$ , 放于 37  $^{\circ}$ C 培养箱, 孵育 120 h)  $A\beta_{25-35}$  缓缓注射入侧脑室, 留针 5 min。假手术组小鼠注入生理盐水。第 2 天, 按灌胃给药 (20 mL/kg), 连续灌胃 28 d。同时假手术组和模型组给予蒸馏水。

2.2 Morris 水迷宫检测 第 23 天给药 1 h 后进行 Morris 水迷宫定位航行实验。此装置直径 80 cm, 高 33 cm, 顶部开口铁桶。底面标记四个象限 (I、II、III、IV), 把平台设置于 I 象限, 且低水平面 1 cm, 水温 25  $^{\circ}$ C 左右。实验时把小鼠从入水到登录平台的时间, 作为潜伏期。不能登陆的进行训练直到找到平台, 停留 10 s。间隔时间为 4 h, 2 次/d, 连续 5 d。

2.3 硫黄素 S 染色 给药结束, 每组随机取 6 只小鼠, 腹腔注射水合氯醛, 用输液针从心尖刺入左心室, 同时右心耳剪一小口, 生理盐水灌注 (预冷), 使右心房流出液体, 接着灌注 4% 多聚甲醛 (预冷), 直到四肢抽搐、尾巴僵硬, 肝脏发白时, 取脑。将大脑放于 4% 多聚甲醛, 制成石蜡切片, 脱水, PBS 洗涤 3 次, 3 min/次, 滴加过氧化酶阻断剂, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 用 0.012 5% 硫黄素 S 乙醇溶液避光孵育 10 min, PBS 清洗 3 次, 封片, 荧光观察。

2.4 ELISA 法检测海马内可溶性及难溶性  $A\beta$  给药结束后 1 h, 取各组 8 只小鼠的海马组织, 加裂解液, 匀浆 10 s, 重复 5 次, 隔 30 s 一次, 离心 5 min (20 000 r/min), 取上清, 检测可溶性待测物质; 沉淀物加入 70% 蚁酸, 匀浆 (冰上); 离心 5 min (44 000 r/min), 用 1 mol/L Tris 中和上清, 分装, 检测非可溶性待测成分。依据 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤进行测定。

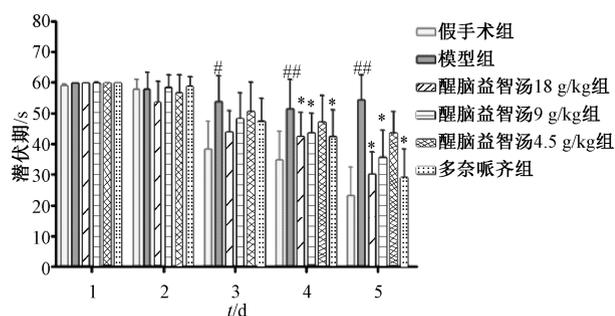
2.5 Western blot 检测海马组织相关蛋白表达 给药结束后, 每组取 5 只小鼠的海马。提取总蛋白, BSA 法测定蛋白浓度。电泳 (8% ~ 12% 的凝胶、100 mA、2 h) 转膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加一抗 (Ser 202、Thr 231、NEP、IDE、p-PI3K、

PI3K、p-Akt、Akt), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 二抗孵育, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 加入特超敏 ECL 化学发光液, 用凝胶成像系统观察蛋白表达。采用 ImageJ 图像分析软件对条带进行灰度分析, 将模型组或假手术组灰度值设置 1, 其余各组按照对应的比率得到相应的灰度值, 组间比较, 进行相关数据分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 醒脑益智汤对 AD 模型小鼠 Morris 水迷宫的影响 与假手术组比较, 第 3~5 天模型组小鼠游泳潜伏期延长 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 第 4、5 天醒脑益智汤 (18、9 g 生药/kg) 及盐酸多奈哌齐可缩短游泳潜伏期 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。



注: 与假手术组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 1 醒脑益智汤对 AD 模型小鼠游泳潜伏期的影响 ( $n = 19$ )

Fig. 1 Effects of XNYZD on latent time in AD mouse models ( $n = 19$ )

3.2 醒脑益智汤对 AD 模型小鼠可溶性及难溶性  $A\beta_{1-40}$  及  $A\beta_{1-42}$  水平的的影响 与假手术组相比, 模型组可溶性及难溶性  $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$  水平增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 醒脑益智汤 (18、9 g 生药/kg) 及盐酸多奈哌齐可减少可溶性及难溶性  $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$  水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 醒脑益智汤 (4.5 g 生药/kg 组) 可降低难溶性  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 1。说明醒脑益智汤具有降低  $A\beta$  水平的作用。

3.3 醒脑益智汤对  $A\beta$  表达的影响 硫黄素 S 染色结果表明, 与假手术组比较, 模型组  $A\beta$  表达增加, 与模型组比较, 醒脑益智汤可降低脑组织内  $A\beta$  表达, 见图 2。

表1 醒脑益智汤对AD模型小鼠可溶性及难溶性Aβ<sub>1-40</sub>及Aβ<sub>1-42</sub>表达的影响 (pg/mg,  $\bar{x}\pm s$ , n=8)

Tab. 1 Effects of XNYZD on soluble and insoluble Aβ<sub>1-40</sub> and Aβ<sub>1-42</sub> expression in AD mouse models (pg/mg,  $\bar{x}\pm s$ , n=8)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	可溶性		难溶性	
		Aβ <sub>1-40</sub>	Aβ <sub>1-42</sub>	Aβ <sub>1-40</sub>	Aβ <sub>1-42</sub>
假手术组	—	297.4±28.8	197.4±18.1	68.5±7.3	57.1±4.3
模型组	—	503.9±51.1 <sup>#</sup>	302.7±21.9 <sup>#</sup>	106.3±8.1 <sup>#</sup>	78.9±3.4 <sup>#</sup>
醒脑益智汤组	18	373.1±34.1 <sup>**</sup>	265.5±32.5 <sup>**</sup>	79.4±7.8 <sup>**</sup>	51.2±4.9 <sup>**</sup>
	9	432.2±40.8 <sup>*</sup>	279.1±21.7 <sup>*</sup>	83.3±7.2 <sup>**</sup>	59.3±8.1 <sup>**</sup>
	4.5	481.3±35.0	295.1±21.1	94.2±7.6 <sup>*</sup>	66.1±5.2 <sup>**</sup>
盐酸多奈派齐组	1.3×10 <sup>-3</sup>	409.2±31.5 <sup>**</sup>	251.1±19.1 <sup>**</sup>	72.3±7.3 <sup>**</sup>	59.1±3.2 <sup>**</sup>

注:与假手术组比较,<sup>#</sup>P<0.05;与模型组比较,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01。

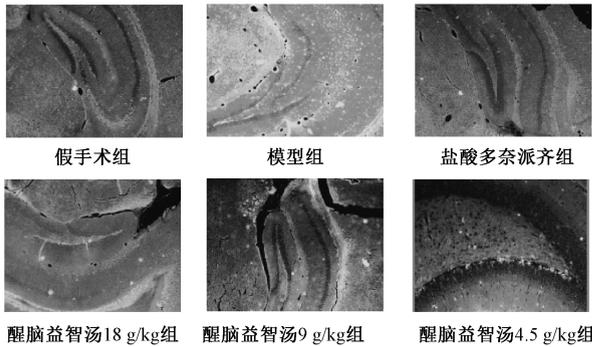


图2 醒脑益智汤对Aβ表达的影响

Fig. 2 Effects of XNYZD on Aβ expression in AD mouse models

3.4 醒脑益智汤对AD模型小鼠海马组织相关蛋白的影响 与假手术组相比,模型组tau蛋白化点(Ser 202, Thr 231)表达增加,p-PI3K、p-Akt、NEP及IDE表达减少(P<0.05);与模型组相比,醒脑益智汤(18 g生药/kg)可减少tau蛋白化点

表2 醒脑益智汤对AD模型小鼠海马组织相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=5)

Tab. 2 Effects of XNYZD on protein expression in hippocampal tissue of AD mouse models ( $\bar{x}\pm s$ , n=5)

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	Ser 202	Thr 231	p-PI3K	p-Akt	NEP	IDE
假手术组	—	1.00±0	1.00±0	1.63±0.08	1.73±0.06	2.06±0.07	1.98±0.07
模型组	—	1.81±0.12 <sup>#</sup>	1.91±0.14 <sup>#</sup>	1.00±0 <sup>#</sup>	1.00±0 <sup>#</sup>	1.00±0 <sup>#</sup>	1.00±0 <sup>#</sup>
醒脑益智汤组	18	1.27±0.18 <sup>*</sup>	1.23±0.07 <sup>*</sup>	1.38±0.11 <sup>*</sup>	1.53±0.12 <sup>*</sup>	1.84±0.11 <sup>*</sup>	1.82±0.06 <sup>*</sup>
	9	1.32±0.16 <sup>*</sup>	1.25±0.08 <sup>*</sup>	1.19±0.08	1.28±0.07	1.38±0.19	1.77±0.08 <sup>*</sup>
	4.5	1.69±0.15	1.27±0.13 <sup>*</sup>	1.08±0.09	1.14±0.06	1.29±0.12	1.68±0.09 <sup>*</sup>
盐酸多奈派齐组	1.3×10 <sup>-3</sup>	1.38±0.19 <sup>*</sup>	1.26±0.11 <sup>*</sup>	1.12±0.06	1.55±0.07 <sup>*</sup>	1.31±0.06	1.79±0.07 <sup>*</sup>

注:与假手术组比较,<sup>#</sup>P<0.05;与模型组比较,<sup>\*</sup>P<0.05。

#### 4 讨论

AD发病机制复杂,目前研究多集中在tau蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结及Aβ异常导致的细胞死亡<sup>[3]</sup>,两者多存在于大脑皮质及海马区,与痴呆有关<sup>[4]</sup>。

tau蛋白是一种微管相关蛋白,在人体内由于其mRNA剪辑方式不同,存在着6种不同的同功异构体<sup>[5]</sup>,主要分布于中枢神经系统的神经元内,具有维持细胞骨架完整性、神经突起的形成及轴突

(Ser 202, Thr 231)表达,增加p-PI3K、p-Akt、NEP及IDE表达(P<0.05),醒脑益智汤(9 g生药/kg)可降低tau蛋白化点(Ser 202, Thr 231)表达,增加IDE表达(P<0.05);醒脑益智汤(4.5 g生药/kg)可降低Thr 231表达,增加IDE表达(P<0.05);盐酸多奈派齐可减少tau蛋白化点(Ser 202, Thr 231)表达,增加p-Akt及IDE表达,见图3、表2。

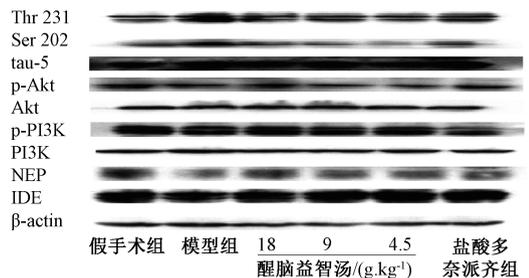


图3 Western blot检测各组小鼠海马组织相关蛋白表达  
Fig. 3 Expression of related proteins in mouse hippocampus by Western blot

运输的作用。AD时,tau蛋白发生异常磷酸化,过度磷酸化的tau蛋白则丧失了微管结合能力,易聚集,形成难溶的螺旋状细丝,导致神经元纤维缠结,细胞骨架异常及细胞死亡<sup>[6]</sup>。tau蛋白的磷酸化位点主要为丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)残基。在本研究中,采用Western blot法对Ser 202及Thr 231位点进行了考察,结果表明,醒脑益智汤可降低Ser 202及Thr 231磷酸化位点的表达。

Aβ是由淀粉样前体蛋白经过β、γ水解酶分

解得到的, 主要包括  $A\beta_{1-40}$  和  $A\beta_{1-42}$ <sup>[7]</sup>。AD 患者中, APP 经  $\beta$  途径代谢增多, 产生较多的  $A\beta_{1-40}$  和  $A\beta_{1-42}$ , 沉积于脑组织中<sup>[8]</sup>。本研究中, 与假手术组比较, 模型组小鼠脑内的  $A\beta_{1-40}$  和  $A\beta_{1-42}$  显著增加, 与相关报道一致<sup>[9-11]</sup>。醒脑益智汤可降低其增加。 $A\beta$  清除机制主要包括蛋白酶体系统, 小胶质细胞吞噬作用, 以及血液循环清除方式。其中细胞外  $A\beta$  降解酶包括 NEP、IDE、基质金属蛋白酶、血管紧张素转换酶、内皮素转化酶和纤溶酶等。研究最广泛的酶是 NEP、IDE。NEP 为体外降解  $A\beta$  最有效的水解酶。研究表明, NEP 缺乏会导致脑内  $A\beta$  沉积<sup>[12]</sup>。APP 转基因小鼠中, NEP 的长期基因治疗可降低  $A\beta$  水平<sup>[13]</sup>。IDE 可以降解细胞外  $A\beta$ , 其表达会随着年龄增加而下降<sup>[14]</sup>。本研究中, 与假手术比较, 模型组的 NEP、IDE 表达降低, 醒脑益智汤可增加 NEP 及 IDE 的表达。

PI3K/Akt 信号通路是细胞增殖, 分化, 凋亡和衰老的关键调节因子。活化的 Akt 可通过调节 CREB 和抑制线粒体相关因子 (主要是细胞色素 C 和 AIF) 的释放来调节 Bcl-2 启动子的活性, 从而抑制细胞凋亡<sup>[15]</sup>。PI3K/Akt 通路的激活与突触形成有关。体内外实验表明 PI3K/Akt 的活化可阻止  $A\beta$  聚集及 tau 蛋白磷酸化诱导的神经毒性<sup>[16-17]</sup>。可见, 通过调控 PI3K/Akt 信号通路的活性可以影响细胞的凋亡, 最终达到改善记忆功能减退的目的。本实验结果显示, 醒脑益智汤可增加 PI3K 和 Akt 磷酸化表达水平, 促进其活化。这些结果均提示醒脑益智汤可通过 PI3K/Akt 途径减少  $A\beta$  聚集及 Tau 蛋白磷酸化。

综上所述, 醒脑益智汤可升高脑内的降解酶, 增加  $A\beta$  清除, 同时减少 Ser 202 及 Thr 231 位点的磷酸化, 其作用机制可能与 PI3K/Akt 信号通路有关。

#### 参考文献:

[ 1 ] Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2006, 368(9533): 387-403.  
[ 2 ] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.  
[ 3 ] Roberson E D, Scarce-Lavie K, Palop J J, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Science*, 2007, 316 (5825): 750-754.

[ 4 ] Wang J Z, Xia Y Y, Grundke-Iqbal I, et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(S1): S123-S139.  
[ 5 ] Lee M J, Lee J H, Rubinsztein D C. Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 105: 49-59.  
[ 6 ] Correia S C, Resender R, Moreira P I, et al. Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34 (4): 261-273.  
[ 7 ] 沈怡君.  $A\beta$  蛋白在阿尔兹海默病中的损伤机制以及研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 18(1): 127-129.  
[ 8 ] Coughlan C M, Breen K C. Factors influencing the processing and function of the amyloid beta precursor protein-a potential therapeutic target in Alzheimer's disease? [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 86(2): 111-145.  
[ 9 ] 潘名志, 杜向东, 徐晓文, 等. 阿尔茨海默病患者血清 Hey、 $A\beta_{1-42}$ 、Tau 蛋白水平测定及临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(6): 1511-1512.  
[ 10 ] 季娜, 郑欣宁, 张凤华, 等. 血液中  $A\beta_{1-42}$  和 P-tau-181 对阿尔茨海默病临床诊断的应用价值[J]. *医学与哲学 (B)*, 2017, 38(11): 38-40; 48.  
[ 11 ] 傅燚, 肖世富, 王涛, 等. 阿尔茨海默病与血管性痴呆血浆和脑脊液  $A\beta$  淀粉样蛋白肽比较研究[J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2010, 4(8): 1193-1197.  
[ 12 ] Madani R, Poirier R, Wolfer D P, et al. Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit *in vivo* [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84 (8): 1871-1878.  
[ 13 ] Spencer B, Marr R A, Rockenstein E, et al. Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular  $A\beta$  and behavioral improvement in APP transgenic mice[J]. *BMC Neurosci*, 2008, 9: 109.  
[ 14 ] Kochkina E G, Plesneva S A, Vasilev D S, et al. Effects of ageing and experimental diabetes on insulin-degrading enzyme expression in male rat tissues [J]. *Biogerontology*, 2015, 16 (4): 473-484.  
[ 15 ] Vázquez de la Torre A, Junyent F, Folch J, et al. PI3k/akt inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 70(1): 116-125.  
[ 16 ] Wei W, Wang X, Kusiak J W. Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection [J]. *J Biol Chem*. 2002, 277 (20): 17649-17656.  
[ 17 ] Stein T D, Johnson J A. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways [J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (17): 7380-7388.